

UMWELTFORSCHUNGSPLAN DES
BUNDESMINISTERIUMS FÜR UMWELT,
NATURSCHUTZ UND REAKTORSICHERHEIT

Forschungsbericht 298 89 418
UBA-FB 000358



Mathematische Modellierung der Populationsdynamik von genetisch veränderten Mikroorganismen am Beispiel von Baculoviren

von

Susanne Steineke und Dr. Johannes A. Jehle,
SG Biotechnologischer Pflanzenschutz
Staatliche Lehr- und Forschungsanstalt für Landwirtschaft,
Weinbau und Gartenbau, Neustadt an der Weinstraße

in Zusammenarbeit mit

Dr. Eva Fritsch, Dr. Karin Undorf-Spahn, Dr. Jürg Huber
Institut für biologischen Pflanzenschutz
Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft,
Darmstadt

Dr. Dietmar Roßberg
Institut für Folgenabschätzung im Pflanzenschutz
Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft,
Kleinmachnow

Prof. Dr. Horst Backhaus
Institut für Biochemie und Pflanzenvirologie
Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft,
Braunschweig

Im Auftrag des Umweltbundesamtes

Diese TEXTE-Veröffentlichung kann bezogen werden bei

Vorauszahlung von 10,00 €

durch Post- bzw. Banküberweisung,
Verrechnungsscheck oder Zahlkarte auf das

Konto Nummer 4327 65 - 104 bei der
Postbank Berlin (BLZ 10010010)
Fa. Werbung und Vertrieb,
Ahornstraße 1-2,
10787 Berlin

Parallel zur Überweisung richten Sie bitte
eine schriftliche Bestellung mit Nennung
der **Texte-Nummer** sowie des **Namens**
und der **Anschrift des Bestellers** an die
Firma Werbung und Vertrieb.

Der Herausgeber übernimmt keine Gewähr
für die Richtigkeit, die Genauigkeit und
Vollständigkeit der Angaben sowie für
die Beachtung privater Rechte Dritter.
Die in dem Bericht geäußerten Ansichten
und Meinungen müssen nicht mit denen des
Herausgebers übereinstimmen.

Herausgeber: Umweltbundesamt
Postfach 33 00 22
14191 Berlin
Tel.: 030/8903-0
Telex: 183 756
Telefax: 030/8903 2285
Internet: <http://www.umweltbundesamt.de>

Redaktion: Fachgebiet IV 2.5
Wolfgang Dubbert
Wolfram Reichenberger
Birgit Winkel

Berlin, Dezember 2002

Berichts-Kennblatt

1. Berichtsnummer UBA-FB 000358	2.	3.
4. Titel des Berichts Mathematische Modellierung der Populationsdynamik von genetisch veränderten Mikroorganismen am Beispiel von Baculoviren		
5. Autor(en), Name(n), Vorname(n) Steineke, Susanne Dr. Jehle, Johannes A. et al.	8. Abschlußdatum 18.07.02	
6. Durchführende Institution (Name, Anschrift) Staatliche Lehr- und Forschungsanstalt für Landwirtschaft, Weinbau und Gartenbau (SLFA) Breitenweg 71 67435 Neustadt a. d. Wstr.	9. Veröffentlichungsdatum	
7. Fördernde Institution (Name, Anschrift) Umweltbundesamt, Postfach 33 00 22, D-14191 Berlin	10. UFOPLAN-Nr. 298 89 418	
	11. Seitenzahl 157	
	12. Literaturangaben 159	
	13. Tabellen und Diagramme 38	
	14. Abbildungen 35	
15. Zusätzliche Angaben		
16. Kurzfassung Baculoviren werden zunehmend als selektive und umweltfreundliche Bioinsektizide zur biologischen Kontrolle von Schadinsekten verwendet. Die Methoden der Gentechnologie haben in jüngster Zeit zusätzliche Möglichkeiten ermöglicht, deren genetische und damit auch insektizide Eigenschaften zu verändern. Eine Abschätzung mittel- und langfristiger ökologischer Konsequenzen des Einsatzes natürlicher und gentechnisch veränderter Viren ist nur bei hinreichender Kenntnis ihrer biologischen Eigenschaften in der Umwelt und der daraus resultierenden Abundanzdynamik in der Population der Wirtsinsekten möglich. Im Rahmen dieses Projektes wurden verschiedene Parameter quantifiziert, mit deren Hilfe die Populationsdynamik des Apfelwicklergranulovirus (CpGV) mathematisch beschrieben werden kann. Hierfür wurden die Virulenz (mittlere Lethaldosis, Wirkgeschwindigkeit), Menge der Virusnachkommen, UV-Inaktivierung der Viren, horizontale Transmission und vertikale Transmission in Labor- und Freilandexperimenten quantitativ erfasst. Relevante Parameter, welche die Dynamik der Wirtspopulation (Apfelwickler: <i>Cydia pomonella</i>) beschreiben, wurden der Literatur entnommen oder in Laborexperimenten bestimmt. Für die sich gegenseitig beeinflussenden Populationsdynamiken des Systems CpGV-Apfelwickler wurde ein deterministisches mathematisches Modell GRANULO programmiert, in das die erhobenen Parameter eingeflossen sind. Das Modell erlaubt die Simulation der Populationsdynamiken von Wirt und Virus unter verschiedenen Bedingungen. Durch Verändern der Viruseigenschaften (Parameter) im Modell kann der mögliche Effekt der genetischen Veränderung auf die Populationsdynamiken von Wirt und Virus simuliert werden. Die Modellierung und ihre Überprüfung sollen zu einer Abschätzung der Prognosesicherheit für die Populationsdynamik veränderter Viren in der natürlichen Umwelt eingesetzt werden. Damit wird die Einschätzung möglicher Risiken bei dem Einsatz gentechnisch veränderter Baculoviren in der Umwelt verbessert. Weiterhin soll das Modell zur präziseren Planung biologischer Bekämpfungsstrategien mit natürlichen Baculoviren beitragen.		
17. Schlagwörter Baculoviren, <i>Autographa californica</i> MNPV, AcMNPV, <i>Cydia pomonella</i> Granulovirus (CpGV), Apfelwickler, Populationsdynamik, mathematische Modellierung, Biologische Sicherheit		
18. Preis	19.	20.

Report Cover Sheet

1. Report No. UBA-FB 000358	2.	3.
4. Report Title Mathematical modeling of the population dynamics of genetically modified microorganisms using baculoviruses as an example		
5. Autor(s), Family Name(s), First Name(s) Steineke, Susanne B. Dr. Jehle, Johannes A. et al.	8. Report Date 18.07.02	
6. Performing Organisation (Name, Address) Staatliche Lehr- und Forschungsanstalt für Landwirtschaft, Weinbau und Gartenbau (SLFA) Breitenweg 71 67435 Neustadt a. d. Weinstr.	9. Publication Date	
7. Sponsoring Agency (Name, Address) Umweltbundesamt, Postfach 33 00 22, D-14191 Berlin	10. UFOPLAN-Ref. No. 298 89 418	
	11. No. of Pages 157	
	12. No. of Reference 159	
	13. No. of Tables, Diagrams 38	
	14. No. of Figures 35	
15. Supplementary Notes		
16. Abstract Baculoviruses are increasingly being used as selective and environmentally friendly bio-insecticides. With the advent of genetic engineering, it has become possible to modify their genetic information for improved insecticidal properties. Before releasing a recombinant baculovirus, it is necessary to assess the long-term ecological consequences. This can only be accomplished by understanding the biological traits and forces that drive the population dynamics. This project focussed on the analysis and quantification of parameters that are important in describing the population dynamics of the codling moth granulovirus (CpGV) in mathematical terms. Parameters, such as the virulence of the virus (median lethal concentration and median lethal time), its inactivation rate, the production rate of virus progeny and both the horizontal and vertical transmission rate, were quantified in laboratory and field experiments. Parameters essential to the host population dynamics of the codling moth, <i>Cydia pomonella</i> , (mortality rate, developmental rate, reproduction rate) were largely extracted from previously published articles. A deterministic model that integrated all parameters, was developed for the two interacting systems of CpGV and the codling moth. With this model, the population dynamics of CpGV and the codling moth can be simulated under various conditions. Simulations for a genetically modified CpGV can be generated by varying the virus parameters in the model. The model's purpose is to help assess the risks of a recombinant virus by forecasting its fate in the field and also to aid a more precise planning of the control strategies using a naturally occurring baculovirus.		
17. Keywords baculovirus, <i>Autographa californica</i> MNPV, AcMNPV, <i>Cydia pomonella</i> granulovirus (CpGV), codling moth, population dynamics, mathematical model, risk assessment		
18. Price	19.	20.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen.....	6
1 Einleitung.....	7
1.1 Zielsetzung.....	9
1.2 Biologische Eigenschaften von Baculoviren	10
1.3 Anwendung der Gentechnologie bei Baculoviren	16
1.4 Populationsdynamik von Baculoviren in Abhängigkeit des Trophie-Typs des Wirtes	23
1.5 Modellierung.....	26
2 Beschreibung des Systems <i>C. pomonella</i> /CpGV	29
2.1 Biologie von <i>C. pomonella</i> und CpGV	29
2.2 Populationsdynamik des CpGV und deren Parameter.....	31
3 Virusparameter.....	35
3.1 Virusaktivität CpGV	35
3.1.1 Mittlere Letalkonzentration und mittlere Letaldosis.....	35
3.1.2 Mittlere Letalzeit.....	38
3.1.3 Temperaturabhängigkeit der Wirkgeschwindigkeit.....	40
3.1.4 Virusnachkommen bei CpGV	42
3.1.5 UV-Inaktivierung.....	43
3.1.6 Transmission.....	49
3.1.6.1 Horizontale Transmission CpGV	49
3.1.6.2 Persistenz und horizontale Transmission im Freilandversuch	59
3.1.6.3 Vertikale Transmission CpGV	70
3.2 Einfluss gentechnischer Veränderungen auf die Virusaktivität.....	76
3.2.1 <i>Egt</i> -Deletion bei CpGV	77
3.2.2 <i>Egt</i> -Deletion bei AcMNPV	77
3.2.2.1 Mittlere Letalkonzentration	78
3.2.2.2 Mittlere Letalzeit	79
3.2.2.3 Virusnachkommen.....	82
3.2.3 Bewertung der <i>egt</i> -Deletion bei Baculoviren	83

4	Insektenparameter	84
4.1	Populationsdynamik des Apfelwicklers.....	84
4.1.1	Natürliche Mortalitäten	84
4.1.2	Ontogenese.....	84
4.1.3	Reproduktionsrate & Geschlechterverhältnis	86
4.1.4	Zeitpunkt der Apfelwicklerentwicklung	87
4.1.5	Weitere für die Populationsdynamik wesentliche Faktoren	89
4.1.6	Relevantes Verhalten für die horizontale Transmission von CpGV.....	89
4.2	Experimentelle Daten zur Populationsdynamik des Apfelwicklers.....	91
4.2.1	Temperaturspezifische Entwicklung.....	91
4.2.2	Relevantes Verhalten für die horizontale Transmission des CpGV	93
5	Methoden zur Quantifizierung von Viren in Umweltkompartimenten.....	94
5.1	Biotests Zur Bestimmung der Virusmenge im Boden und auf Blättern	95
5.2	Virus-Nachweis mittels PCR (Polymerase-Ketten-Reaktion, polymerase chain reaction)	98
6	Das Modell GRANULO	104
6.1	Zielsetzung.....	104
6.2	Modellbeschreibung.....	104
6.2.1	Allgemeine Angaben	104
6.2.2	Voraussetzungen für den Simulationsbeginn	107
6.2.3	Abgebildete Prozesse	107
6.2.3.1	Immigration der Apfelwickler-Adulten (Bestimmung des Simulationsstartes)	107
6.2.3.2	Apfelwickler-Reproduktion (Eiablage)	108
6.2.3.3	Ontogenese des Apfelwicklers	108
6.2.3.4	Mortalität	109
6.2.3.5	Infektion	111
6.2.3.6	Horizontale Transmission.....	112
6.2.3.7	Vertikale Transmission.....	112
6.2.3.8	Inaktivierung von Viren.....	112
6.2.4	Output	114

6.3	Sensitivitätsanalyse.....	114
6.3.1	Veränderungen bzgl. des Maximalabundanzwertes von L2-L5	115
6.3.2	Veränderungen bzgl. des Abundanzintegrals von L2-L5	118
6.3.3	Veränderungen bzgl. der zeitlichen Kriterien für das Starkauftreten von L2-L5	120
7	Simulationen	121
7.1	Simulationen der Freilandversuche	121
7.2	Simulationen mit veränderten Parameterwerten.....	124
7.2.1	Simulationen zur UV Stabilität.....	125
7.2.2	Simulation unterschiedlicher Wirkgeschwindigkeiten	129
8	Abschließende Betrachtung	133
9	Zusammenfassungen.....	140
10	Literatur	142

Abkürzungen

AaIT	aus dem Skorpion <i>Androctonus australis</i> stammendes Neurotoxin
Abb.	Abbildung
BAN	<i>pheromone biosynthesis activating neuropeptide</i>
BBA	Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft
bp	Basenpaare
BV(s)	budded virus(es)
bzgl.	bezüglich
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
c-	centi (10^{-2})
d	Tage
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxynukleosid-5'-triphosphat
dsDNA	doppelsträngige DNA
EGT	Ecdysteroid-UDP-Glycosyltransferase
<i>egt</i>	Gen, welches die Ecdysteroid-UDP-Glycosyltransferase kodiert
<i>et al.</i>	und andere
ET	effektive Zeit (<i>effective time</i>)
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
f-	femto (10^{-15})
g	Gramm
GV	Granulovirus (<i>granulovirus</i>)
h	Stunde(n)
JHE	Juvenil-Hormon-Esterase
Kap.	Kapitel
kb	Kilobase(n)
l	Liter
L1,...L5	Larvenstadium
LC ₅₀	mittlere Letalkonzentration (<i>median lethal concentration</i>)
LD ₅₀	mittlere Letaldosis (<i>median lethal dose</i>)
Lsg.	Lösung
LT ₅₀	mittlere Letalzeit (<i>median lethal time</i>)
M	Molar
m	Meter
ml	Milliliter
m-	milli (10^{-3})
μ-	micro (10^{-6})
min	Minuten
MNPV	Multipler Kernpolyedervirus (<i>multiple nucleopolyhedrovirus</i>)
n-	nano (10^{-9})
NPV	Kernpolyedervirus (<i>nucleopolyhedrovirus</i>)
nt	Nukleotide(e) (Nukleotidposition)
OB	Einschlusskörper (<i>occlusion body</i>)

ODV	<i>occlusion derived virus</i>
p-	pico (10^{-12})
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
pers. Mitt.	persönliche Mitteilung
p.i.	nach Infektion (<i>post infection</i>)
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
S.E.	Standardfehler (<i>standard error</i>)
S.D.	Standardabweichung (<i>standard deviation</i>)
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SLFA	Staatliche Lehr- und Forschungsanstalt für Landwirtschaft, Weinbau und Gartenbau, Neustadt a.d. Weinstraße
ST ₅₀	mittlere Überlebensdauer (<i>median survival time</i>)
Tab.	Tabelle
UV	Ultraviolett
vgl.	vergleiche
wt-	Wildtyp
x g	Vielfaches der Erdbeschleunigung (g)
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

Baculoviren

AcMNPV	<i>Autographa californica</i> MNPV
AdorGV	<i>Adoxophyes orana</i> GV
BmMNPV	<i>Bombyx mori</i> MNPV
CeleGV	<i>Cryptophlebia leucotreta</i> GV
CpGV	<i>Cydia pomonella</i> GV
LdMNPV	<i>Lymantria dispar</i> MNPV
MbMNPV	<i>Mamestra brassicae</i> MNPV
PiGV	<i>Plodia interpunctella</i> GV
SeMNPV	<i>Spodoptera exigua</i> MNPV
TnMNPV	<i>Trichoplusia ni</i> MPNV

Insekten

Bm	<i>Bombyx mori</i>
Ha	<i>Helicoverpa armigera</i>
Hv	<i>Helicoverpa virescens</i>
Hz	<i>Helicoverpa zea</i>
Ld	<i>Lymantria dispar</i>
Pi	<i>Plodia interpunctella</i>
Se	<i>Spodoptera exigua</i>
Sf	<i>Spodoptera frugiperda</i>
Tn	<i>Trichoplusia ni</i>

1 Einleitung

1.1 Zielsetzung

Natürlich vorkommende Baculoviren werden zunehmend als selektive und umweltfreundliche Bioinsektizide zur biologischen Kontrolle von Schadinsekten eingesetzt. Die Methoden der Gentechnologie haben in jüngster Zeit zusätzliche Möglichkeiten erschlossen, deren genetischen Eigenschaften und damit auch insektiziden Parameter zu verändern. Eine Abschätzung mittel- und langfristiger ökologischer Konsequenzen des Einsatzes natürlicher und gentechnisch veränderter Viren ist nur bei hinreichender Kenntnis ihrer biologischen Eigenschaften und der daraus resultierenden Abundanzdynamik in der Population der Wirtsinsekten möglich. Daher leistet die vertiefte Kenntnis derjenigen Parameter und Prozesse, welche die Populationsdynamik von Baculoviren bestimmen, und deren präzisierte Formulierung in mathematischen Modellen einen wesentlichen Beitrag zur Abschätzung ihrer biologischen Sicherheit.

Das Ziel dieses Forschungsprojektes war daher die Entwicklung eines mathematischen Modells, das unter Berücksichtigung der populationsdynamischen Parameter von Baculoviren und ihren Wirtsinsekten die Vermehrung, Ausbreitung und Etablierung von natürlich vorkommenden und gentechnisch veränderten Baculoviren in der Umwelt mathematisch beschreibt und simuliert. Als experimentelle Systeme wurde neben verschiedenen natürlichen und gentechnisch veränderten Varianten des *Autographa californica* Nukleopolyhedrovirus (AcMNPV) schwerpunktmäßig das *Cydia pomonella* Granulovirus (CpGV) gewählt, das in Deutschland und in anderen Ländern in Europa als Pflanzenschutzmittel zur Bekämpfung des Apfelwicklers (*Cydia pomonella*) zugelassen ist. Im Mittelpunkt der Untersuchungen stand die qualitative und quantitative Beschreibung der Populationsdynamik des CpGV und seines Wirtes. Auf der Basis der Virus-Insekt-Interaktion wurden diejenigen Parameter, welche die Populationsdynamik des CpGV beeinflussen, in Labor- und Freilandversuchen experimentell ermittelt und in einem deterministischen mathematischen Modell sublimiert.

Die Modellierung und ihre Überprüfung sollen schließlich zu einer Abschätzung der Prognosesicherheit für die Populationsdynamik veränderter Viren in der natürlichen Umwelt eingesetzt werden. Damit wird die Einschätzung möglicher Risiken bei dem Einsatz gentechnisch veränderter Baculoviren in der Umwelt verbessert. Weiterhin soll das Modell zur präziseren Planung biologischer Bekämpfungsstrategien beitragen.

1.2 Biologische Eigenschaften von Baculoviren

Baculoviren umfassen eine Familie von arthropodenspezifischen Viren, die wegen ihrer hohen Pathogenität und Selektivität für ihre jeweiligen Wirtslarven und ihre Unbedenklichkeit für Nicht-Zielorganismen zunehmend an Bedeutung im biologischen und integrierten Pflanzenschutz gewinnen. Bis heute wurden mehr als 600 verschiedene Baculovirus-Isolate beschrieben, die ganz überwiegend von den Insektenordnungen Lepidoptera, Diptera und Hymenoptera isoliert wurden (Murphy *et al.*, 1995). Es ist geschätzt worden, dass ca. 30% aller land- und forstwirtschaftlichen Schadinsekten durch Baculoviren effizient kontrolliert werden könnten (Falcon, 1978). Eine umfassende Übersicht zur Biologie, Genetik, Pflanzenschutzanwendung und den ökologischen Eigenschaften von Baculoviren ist im *Consensus Document on Information used in the Assessment of Environmental Applications involving Baculovirus* der OECD (OECD, 2002) zusammengestellt.

Baculovirusmorphologie

Eine hervortretende morphologische Eigenschaft von Baculoviren ist die Bildung eines Einschlusskörpers (*occlusion body*, OB), der den Viren erlaubt, auch außerhalb des Wirtes ihre biologische Aktivität über längere Zeit zu bewahren. Die Überdauerung aktiver Viruspartikel in einem schützenden Einschlusskörper in Umweltkompartimenten stellt sicher, dass auch bei stark alternierenden Abundanzen von Insektenpopulationen die Infektionskette über eine perorale Infektion suszeptibler Insektenlarven geschlossen bleibt.

Der Einschlusskörper von Baculoviren besteht aus einer Proteinmatrix eines einzigen Proteins, dem sogenannten Polyhedrin oder Granulin. Entsprechend der Morphologie der Einschlusskörper werden Baculoviren in zwei Gattungen unterteilt, die Nukleopolyhedroviren und Granuloviren (van Regenmortel *et al.*, 2000).

Nukleopolyhedroviren bilden polyederförmige Einschlusskörper mit 0,15-15µm Durchmesser, die jeweils bis zu mehreren hundert Virionen enthalten können. Die Virionen können jeweils ein einziges Nukleokapsid (*single nucleopolyhedrovirus*, SNPV) oder mehrere Nukleokapside (*multiple nucleopolyhedrovirus*, MNPV) enthalten (Abb. 1.1). Hierzu zählt auch das *Autographa californica* Multiple Nucleopolyhedrovirus (AcMNPV), welches die Typusart der Nukleopolyhedroviren darstellt. Granuloviren hingegen bilden ovi-zylindrische Einschlusskörper mit einem Durchmesser von 120-300 nm und einer Länge von 300-500 nm. Diese deutlich kleineren Einschlusskörper enthalten lediglich ein Virion bestehend aus einem einzigen Nukleokapsid (in seltenen Fällen auch zwei bis drei Nukleokapside) (Abb. 1.2). Die Typusart der Granuloviren ist das *Cydia pomonella* Granulovirus (CpGV) (van Regenmortel *et al.*, 2000).

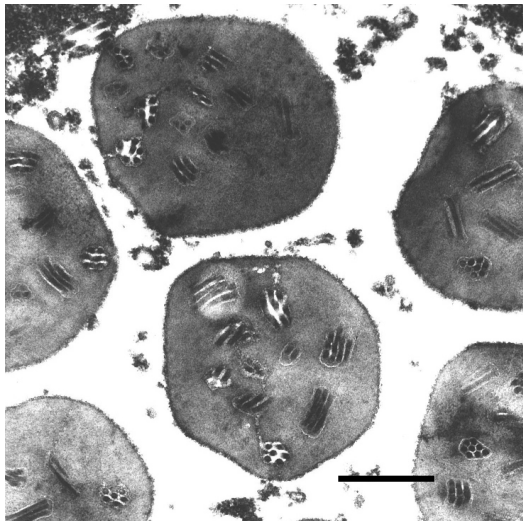


Abb. 1.1: Einschlusskörper eines Nukleopolyhedrovirus (MNPV) (Balken = 500 nm).
Foto A. Huger, BBA Darmstadt

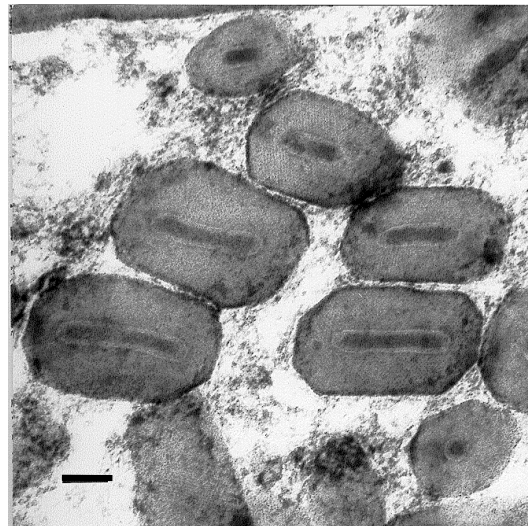


Abb. 1.2: Einschlusskörper des *Cydia pomonella* Granulovirus (CpGV) (Balken = 100 nm).
Foto A. Huger, BBA Darmstadt

Baculovirusreplikation

Der Infektions- und Replikationszyklus von Baculoviren wurde besonders intensiv am AcMNPV untersucht und ist schematisch in Abb. 1.3 dargestellt. Die AcMNPV-Replikation dient als Modell für die übrigen Baculoviren (Granados & Williams, 1986; Federici, 1997). Die natürliche Baculovirus-Infektion beginnt mit der peroralen Aufnahme der Einschlusskörper (OBs) durch die Wirtslarve während des Fraßes ((1) in Abb. 1.3). Mit dem Nahrungsbrei werden die OBs zum Mitteldarm transportiert, dissoziieren im alkalischen Milieu des Mitteldarmes (2) und setzen die infektiösen Viruspartikel (*occlusion derived virions*, ODVs) frei (3). Die ODVs binden an die Membran des Mitteldarmepithels und entlassen die Nukleokapside in die Mitteldarmepithelzellen (4). Die Nukleokapside, die etwa 50 x 300 nm groß sind und das zirkuläre, doppelsträngige Virusgenom enthalten, werden in den Zellen zum Zellkern transportiert, wo die virale DNA transkribiert und repliziert wird (5). Aus einem ersten Replikationszyklus geht eine neue Generation von Viren hervor, die im Zellkern zusammengebaut werden.

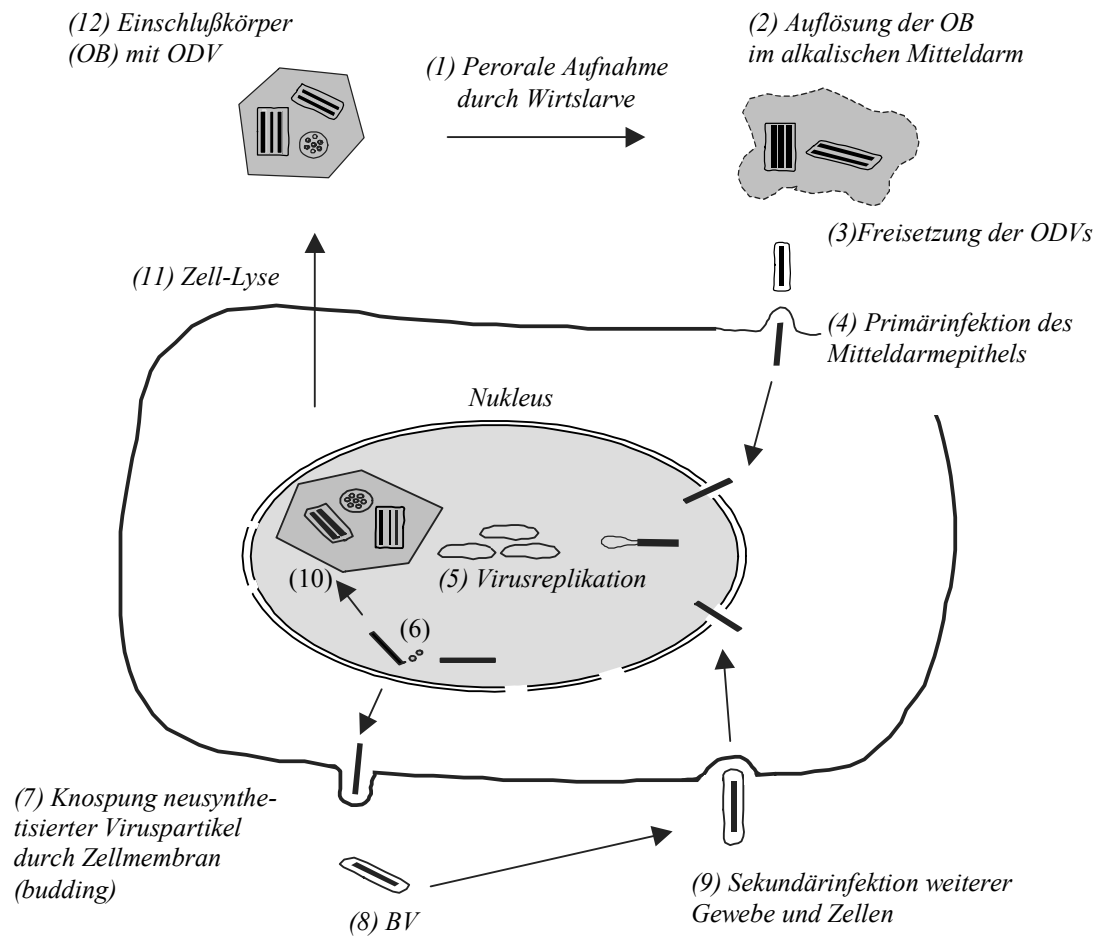


Abb. 1.3: Schematischer Replikationszyklus eines Nukleopolyhedrovirus. Die Beschreibung der Einzelschritte ist dem Text zu entnehmen.

Die neu synthetisierten Viruspartikel verlassen den Nukleus und umgeben sich beim Austritt aus der Wirtszelle mit der wirtseigenen Zellmembran (7). Diese neuen Virusphänotypen nennt man *budded virus* (BV), da sie durch die Membran der Wirtszelle knospen (8). Jedes BV enthält nur ein einzelnes Nukleokapsid. Die BVs werden mit der Hämolymphe oder dem trachealen System in andere Organe der Insektenlarven transportiert (Engelhardt und Volkmann, 1994) und initiieren dort Sekundärinfektionen, z. B. in Hämocyten, Nervenzellen, Tracheen oder dem Fettkörper (9). In der Spätphase der Infektion wird die Produktion von BVs abgeschaltet. Jetzt wird das Einschlusskörperprotein Polyhedrin überexprimiert, ODVs werden gebildet und in die neuen Einschlusskörper eingebettet (10). Das Ende des Replikations- und Infektionszyklus ist mit dem

Tod, einer Lyse der Zellen (11) und der vollständigen Desintegration der Larve verbunden, mit der die Freisetzung von Abermillionen bis Milliarden von neuen Einschlusskörpern je Larve erreicht wird (12). Neben den genannten morphologischen Eigenschaften unterscheiden sich Granuloviren von Nukleopolyhedroviren dadurch, dass die Kernmembran während der GV-Infektion nicht wie bei NPVs intakt bleibt, sondern bereits zu einem sehr frühen Zeitpunkt dissoziiert.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass im Replikationszyklus von Baculoviren zwei unterschiedliche Virusphänotypen mit unterschiedlicher biologischer und ökologischer Funktion auftreten. ODVs sind peroral infektiös und dienen der horizontalen Verbreitung der Virusinfektion von einem Wirt zum anderen. Sie leiten die Primärinfektion des Mitteldarmepithels ein und dienen der Verbreitung der Viren in Insektenpopulationen. BVs hingegen sind für die übrigen Zellen und Gewebe bzw. für kultivierte Zellen infektiös, sie sind außerhalb des Wirtes nicht stabil. Sie sind für die Sekundärinfektion und der Verbreitung der Infektion innerhalb der Insektenlarve verantwortlich.

Baculoviren im Pflanzenschutz

Die Attraktivität von Baculoviren für eine Anwendung im Pflanzenschutz besteht neben ihrer hohen Virulenz in einer im Vergleich mit anderen mikrobiellen oder chemischen Insektiziden unerreichten Wirtsspezifität. Viele Baculoviren infizieren nur eine einzige oder wenige, nah verwandte Wirtsarten, und selbst Baculoviren mit einem vergleichsweise breiten Wirtsbereich wie AcMNPV infizieren nur wenige Dutzend Insektenarten (Gröner, 1986) (siehe auch Kap. 1.3). Damit sind Baculoviren die selektivsten Insektizide, die sich gegenwärtig auf dem Markt befinden. Die hohe Selektivität lässt Baculoviren als ideale Kontrollinstrumente von Schadinsekten in einer auf Umweltverträglichkeit und Schonung von Nicht-Zielorganismen bedachten Pflanzenschutzstrategie erscheinen. Allerdings werden die praktischen und ökonomischen Nachteile dieser ökologisch wünschenswerten Eigenschaft deutlich, wenn Schädlingskomplexe, die sich aus mehreren Schädlingsarten zusammensetzen, kontrolliert werden müssen. Hier versagen Baculoviren häufig wegen ihrer einseitigen Selektivität, zudem erscheint es für

Pflanzenschutzmittelhersteller unter den derzeitigen Zulassungsbestimmungen angesichts eines engen Marktsegmentes wenig attraktiv, Mittel zur Kontrolle eines einzigen Schadinsektes zu produzieren und zu vermarkten. Hinzu kommt, dass die Virulenz der Viren mit zunehmendem Alter der Insektenlarven rapide abnimmt, man spricht von einer sogenannten Altersresistenz. Dies bedeutet, dass bei einer entsprechenden Kontrollstrategie insbesondere junge Larvenstadien (L1 oder L2) getroffen werden müssen, was eine sehr exakte Terminierung der Mittelapplikation erfordert. Außerdem besitzen Baculoviren im Vergleich zu chemischen Insektiziden eine relativ langsame Wirkung: vom Zeitpunkt der peroralen Aufnahme bis zum Fraßstopp bzw. Tod der Insektenlarven können je nach Virus-Wirt-Kombination mehrere Tage bis Wochen vergehen. Diese vergleichsweise langsame Wirkung führt dazu, dass sich die Schädigung der Pflanze durch das Insekt noch eine Zeit lang fortsetzt, bis die Viren ihre Kontrollfunktion entfalten. Dies ist je nach Fruchtart, Zeitpunkt und Befallshöhe nicht immer akzeptierbar.

Tab. 1.1: In Europa zugelassene kommerzielle Baculovirenpräparate (Stand 2002, BBA).

Schädling	Virus-Typ	Handelsname/Vertreiber	Erstzulassung
<i>Adoxophyes orana</i> (Apfelschalenwickler)	GV	CAPEX Andermatt-Biocontrol	CH, 12/89
<i>Cydia pomonella</i> (Apfelwickler)	GV	MADEX, Andermatt-Biocontrol	CH, 12/87
		GRANUPOM Probis GmbH	D, 03/89
		CARPOVIRUSINE Calliope S.A.	F, 10/92
<i>Mamestra brassicae</i> (Kohleule)	NPV	MAMESTRIN Calliope S.A.	F, 07/93
<i>Neodiprion sertifer</i> (Rote Kiefernbusch- hornblattwespe)	NPV	MONISÄRMIÖVIRUS Kemira Oy	SF, 05/83
		VIROX Oxford Virology Ltd.	GB, 1984
<i>Spodoptera exigua</i> (Gemüseeeule)	NPV	SPOD-X Brinkmann B.V.	NL, 12/93

Der mögliche langfristige Effekt einer Baculovirenapplikation in Form einer nachhaltigen Populationsreduktion der Zielorganismen tritt heute wieder in den Vordergrund der Virusapplikation, wie z.B. beim CpGV (Kienzle *et al.*, 2001a, b).

Innerhalb der Europäischen Union sind derzeit etwa 10 Baculovirenpräparate zur Kontrolle verschiedener Forst- und Obstschädlinge zugelassen, unter denen das *Cydia pomonella* GV (CpGV) , *Spodoptera exigua* NPV (SeMNPV) und das *Adoxophyes orana* GV (AdorGV) die größte kommerzielle Bedeutung haben (Tab. 1.1).

1.3 Anwendung der Gentechnologie bei Baculoviren

Wie oben erwähnt, besteht das Matrixprotein des Einschlusskörpers von Baculoviren aus einem einzigen Protein, dem sogenannten Polyhedrin bei NPVs bzw. Granulin bei GVs. Dieses Protein wird in der sehr späten Phase der Zellinfektion in großen Mengen exprimiert, ist aber für die eigentliche Replikation der Viren nicht erforderlich. Auf dieser Beobachtung beruhend wurde Anfang der 80er Jahren das Baculovirus-Expressionsvektor-System entwickelt, das die Expression von Fremdgenen unter der Kontrolle des Promotors des Polyhedrin-Gens erlaubt (Smith *et al.*, 1983). Seit diesen frühen Tagen der Molekularbiologie und Gentechnologie ist das Wissen und das Verständnis um die molekularen und biochemischen Prozesse, die Gen- und Genomfunktion vieler Baculoviren um ein Vielfaches gestiegen (Miller, 1997). Gentechnologische Methoden erlauben es heute, gezielt in die Gen- und Genomstruktur von Baculoviren einzugreifen und diese zu verändern. Diese Methoden haben nicht nur zur funktionalen Charakterisierung vieler Baculoviren-Gene und damit zum besseren Verständnis der molekularen Prozesse während der Baculovirusinfektion beigetragen. Sie eröffneten auch neue Felder der biotechnologischen Anwendung von Baculoviren, z. B. bei der Expression pharmazeutisch wertvoller Proteine im Baculovirus-Expressionsvektor-System oder bei der Entwicklung neuer Transfervektoren in der Gentherapie am Menschen (Hofmann *et al.*, 1995, 1998).

Ein weiteres Ziel der Anwendung der Gentechnologie bei Baculoviren ist die Optimierung ihres insektiziden Potentials, z.B. ihre Wirkgeschwindigkeit zu erhöhen, die Virulenz gegenüber älteren Larvenstadien zu verstärken oder ihren Wirtsbereich spezifisch zu erweitern. Hierzu wurden in der Vergangenheit verschiedene Strategien gewählt: (1) die gentechnische Expression von Hormonen oder Enzymen, von denen bekannt war, dass Sie im Larvenmetabolismus eine Rolle spielen, (2) die Expression von insekten-spezifischen Toxinen, und (3) die Deletion des viralen *egt*-Gens, das in den Häutungsstoffwechsel der infizierten Larven eingreift (Tab. 1.2). Die Expression des Diuretischen Hormons oder der Juvenil-Hormon-Esterase (JHE) führte zu keinen nennenswerten Unterschieden in der Wirkgeschwindigkeit. Hingegen konnte durch die Integration von Neurotoxin-Genen bzw. einer Deletion des viralen *egt*-Gens bei zahlreichen gentechnologisch hergestellten Baculovirus-Rekombinanten eine signifikante Beschleunigung der Wirkgeschwindigkeit erreicht werden (zusammengefasst bei Black, 1997).

Die besten Erfolge hinsichtlich einer Beschleunigung der Wirkung wurden bisher mit rekombinanten Viren, die insektenspezifische Neurotoxine aus dem Skorpion *Androctonus australis* (AaIT), der Milbe *Pyemotes tritici* (PxP-I) oder aus dem Gelben Israelischen Skorpion *Leiurus quinquestriatus hebraeus* exprimieren, erzielt. Durch die Expression dieser Toxin-Gene werden die infizierten Larven gelähmt und beenden ihren Fraß vorzeitig. Darüber hinaus konnte eine Verringerung der LT_{50} (der Zeitspanne, bei der 50% der infizierten Larven tot sind) um 20-30% und damit einhergehend eine deutliche Reduktion des Fraßschadens beobachtet werden (Tab. 1.2).

Eine andere Strategie, die Wirkgeschwindigkeit bei Baculoviren zu erhöhen, liegt in der Deletion des viruseigenen *egt*-Gens, welches das Enzym Ecdysteroid-UDP-Glycosyltransferase (EGT) kodiert (O'Reilly und Miller, 1989, O'Reilly, 1995). Das *egt*-Gen wurde in allen bisher sequenzierten Baculoviren gefunden und interagiert während der Virusinfektion mit dem Häutungsstoffwechsel der Larven. Durch die Expression des EGT wird die Häutung der befallenen Larven verzögert oder ganz unterbunden. Dadurch werden infizierte Larven größer als nicht infizierte Larven. Dies geschieht zum biologischen Vorteil des Baculovirus, das so seinen Replikationszyklus beenden und

besonders viele Virusnachkommen produzieren kann, bevor die befallene Insektenlarve stirbt. Aus der Perspektive des Pflanzenschutzes ist diese Verzögerung hingegen nicht erforderlich, ja sogar unerwünscht. Allein die gezielte Deletion dieses Gens in AcMNPV resultierte in einer Reduktion der LT₅₀ um etwa 25% (O'Reilly & Miller, 1991). Wie Versuche gezeigt haben, sind diese sogenannten *egt*-Deletions-Mutanten zwar hinsichtlich ihrer Wirkgeschwindigkeit den Wildtypviren überlegen, jedoch biologisch mit diesen nicht konkurrenzfähig. Es war erwartet worden, dass *egt*-Deletions-Mutanten, die im pflanzenschützerischen Sinne allein dadurch effektiver sind, dass ihnen lediglich ein Gen entfernt wurde, die ersten gentechnisch veränderten Baculoviren mit kommerzieller Bedeutung sein könnten (Black, 1997).

Tab. 1.2: Zusammenfassung der rekombinanten Viren, die zur Schädlingsbekämpfung entwickelt wurden. Aus Chen, 2001.

Virusbezeichnung	Heterologes Protein	Wirt	Verbesserte Wirkgeschwindigkeit	Referenz
Gen-Deletion				
VEGTDEL	<i>egt</i> -Deletion	Sf	22%	O'Reilly & Miller, 1991
VEGTDEL	<i>egt</i> -Deletion	Tn	0,5-1 Tag	Treacy <i>et al.</i> , 1997
VEGT-DEL(LdMNPV)	<i>egt</i> -Deletion	Ld	33%	Slavicek <i>et al.</i> , 1999
Gen-Insertion (Insektenhormone)				
BMDH5 (BmNPV)	M.S. diuretic hormone	Bm	~1Tag	Maeda, 1989
AcRP23(B)JHE	Hv JHE	Tn	keine [#]	Hammock <i>et al.</i> , 1990
AcUW(2)JHE	Hv JHE	Tn	keine	Bonning <i>et al.</i> , 1992
Ac-JHE29	Hv JHE mit R statt K Substitution	Tn	keine	Bonning <i>et al.</i> , 1995
Ac-JHE524	Hv JHE mit R statt K Substitution	Hv	keine	Bonning <i>et al.</i> , 1995
VWTPPTTHM, vEGTPPTTHM	Bm PTTH, <i>egt</i> -Deletion	Sf	keine	O'Reilly <i>et al.</i> , 1995
Ie1-JHE-KK	Hv-JHE mit R statt K Substitution	Hv	keine	Jarvis <i>et al.</i> , 1996
P10-JHE-KK	Hv JHE mit R statt K Substitution	Tn	4-9 %	Kunimi <i>et al.</i> , 1996
Ac-JHE-KK	Hv JHE mit R statt K Substitution	Pi	keine	Kunimi <i>et al.</i> , 1997
AcJHE-KSK AcJHE-KHK	HvJHE mit Aminosäuren Substitution	Hv	keine	Van Meer <i>et al.</i> , 2000

Virusbezeichnung	Heterologes Protein	Wirt	Verbesserte Wirkgeschwindigkeit	Referenz
Gen-Insertion (Toxin Gene)				
BmAaIT(BmNPV)	Toxin AaIT von <i>Androctonus australis</i>	Bm	~40%	Maeda <i>et al.</i> , 1991
AcST3	Toxin AaIT von <i>A. australis</i>	Tn	24%	Stewart <i>et al.</i> , 1991
ACUW2(B)AaIT	Toxin AaIT von <i>A. australis</i>	Hv	36%	McCutchen <i>et al.</i> , 1991
AcMNPVAaIT	Toxin AaIT von <i>A. australis</i>	Tn	20-30%	Kunimi <i>et al.</i> , 1996
P10-AaIT	Toxin AaIT von <i>A. australis</i> anderer Promoter	Hv	P10:22% leI:10%	Jarvis <i>et al.</i> , 1996
VSP-tox-34	Neurotoxin 34 von <i>P. tritici</i>	Tn	39%	Tomalski & Miller, 1991
VSP-tox21A	Neurotoxin 34 von <i>P. tritici</i>	Tn	49%	Tomalski <i>et al.</i> , 1993a
VSP-toxin 34, vp6.9toxin34, vDA26toxin34, vHSPtoxin34	Neurotoxin 34 von <i>P. tritici</i> , various single sequence(ss), various promoter (pr)	Tn Sf	Ss:26-47%, pr:28-58%; ss:47-53%, pr:39-59%	Lu <i>et al.</i> , 1996
VSP-TOX34#4	Neurotoxin 34#4 von <i>P. tritici</i>	Hv Tn	27-33% 56%	Watkins <i>et al.</i> , 1997
VEV-HA5fl7	Venom Dol m V Gen <i>Delichovespula maculata</i>	Tn	keine	Tomalski <i>et al.</i> , 1993b
VSA2p+	Neurotoxin As II von <i>Anemonia sulcata</i>	Tn Sf	Tn:37% Sf:36%	Prikhod'ko <i>et al.</i> , 1996
VMAg4+	Neurotoxin Aga-IV von <i>Angelenopsis aperta</i>	Tn Sf	Tn:17% Sf:43%	Prikhod'ko <i>et al.</i> , 1996
VSSh1p+	Neurotoxin Sh I von <i>Stichodactyla helianthus</i>	Tn Sf	Tn:37% Sf:40%	Prikhod'ko <i>et al.</i> , 1996
VAcTaITX1	Toxin aus der Spinne <i>Tegenaria agrestis</i>	Tn Se	Tn:20% Se:18%	Hughes <i>et al.</i> , 1997
AcNPVLIT	Alpha-latroinsecto Toxin aus der Schwarzen Witwe	Hv Tn	1:4% 2:12%	Watkins <i>et al.</i> , 1997
AcLqhlT2	Toxin LqhlT2 von <i>Leiurus quinquestriatus hebraeus</i>	Tn Se Hv	50/56% 37/47% 40/45%	Presnail <i>et al.</i> , unpubl.
AcLIT1.p10	Toxin LqhlT1 und LqhlT2 von <i>L. quinquestriatus hebraeus</i>	Ha	32%; 24%	Gershburg <i>et al.</i> , 1998
Ac(PH+)BT	Delat-Endotoxin	Tn	keine	Merryweather <i>et al.</i> ,

Virusbezeichnung	Heterologes Protein	Wirt	Verbesserte Wirkgeschwindigkeit	Referenz
AcBtm, AcBt5, AcBt3, AcBt5/3	CryI(b) & verkürzte Formen	Hv		1990 Ribeiro & Crook, 1993
AcMNPV/JM2, AcMNPV/FW3	Verkürzte Formen CryIA(b)	Se	keine	Martens <i>et al.</i> , 1995
Gen-Insertion (andere Gene)				
BV13T, BV13.3940	Mais mitochondriales GenURF13	Tn	~40%	Korth & Levings, 1993
AcMNPV.chi	Ms Chitinase Gen	Sf	22-23%	Gopalakrishnan <i>et al.</i> , 1995
Vhcf-1z, vhc-1del	AcMNPV Wirtszellfaktor 1	Tn	+ 20-29%, keine	Lu & Miller, 1996
AcMNPV-MycAs	Humanes c-myc Antisense	Sf	28%	Lee <i>et al.</i> , 1997
AcBX-PBAN-4	HzPBAN	Tn	19-26%	Ma <i>et al.</i> , 1998
AcMNPV-	JHE antisense	Hv	keine	Hajos <i>et al.</i> , 1999
Deletion und Insertion				
VJHEEGTD	HV JHE, <i>egt</i> -Deletion	Tn	keine	Eldridge <i>et al.</i> , 1992a
VEHEGTD	Ms Eclosion Hormone, <i>egt</i> -Deletion	Sf	keine	Eldridge <i>et al.</i> , 1992b
VSPTox34	Neurotoxin 34 von <i>P. tritici</i>	Tn	~2 days	Tomalski & Miller, 1992
HzEGTp6, 9tox34, HzEGThsptox34, HzEGTDA26tox34 (HzSNPV)	Neurotoxin 34 von <i>P. tritici</i> , <i>egt</i> -Deletion, verschiedene Promotoren	Hz	35-42%, 34-47%	Popham <i>et al.</i> , 1997

Anm. ET: effektive Zeit, LT: Letalzeit, ST: Überlebenszeit, LC: Letalkonzentration

Bm: *Bombyx mori*, Ha: *Helicoverpa armigera*, Hv: *Helicoverpa virescens*, Hz: *Helicoverpa zea*,
Ld: *Lymantria dispar*, Pi: *Plodia interpunctella*, Se: *Spodoptera exigua*, Sf: *Spodoptera frugiperda*, Tn: *Trichoplusia ni*

*Fraßreduktion

In Klammern angegeben ist das parentale Virus, wenn anders als AcMNPV.

Freisetzungsversuche mit gentechnisch veränderten Baculoviren

Die ersten Feldversuche mit gentechnisch veränderten Baculoviren, die allerdings lediglich ein Marker-Gen enthielten, wurden bereits 1986 unternommen (Tab. 1.3). In den vergangenen Jahren wurden rekombinante Baculoviren, die mit einem zusätzlichen aus dem Skorpion *A. australis* stammenden Neurotoxigen AaIT ausgestattet waren, in England und in Nordamerika im Freiland getestet. Diese Tests haben die höhere Effizienz der gentechnisch veränderten Viren gegenüber Wildtyp-Viren unter Feldbedingungen bestätigt (Cory *et al.*, 1994, Cory, 2000). Darüber hinaus wurde festgestellt, dass Larven, die mit einem rekombinanten AcMNPV (AaIT) infiziert wurden, aufgrund der höheren Wirkgeschwindigkeit etwa 10mal weniger virale Einschlusskörper enthielten als Larven, die mit Wildtypvirus infiziert waren. In Mischinfektionen mit einem Verhältnis rekombinanter zu natürlichen Baculoviren von 9:1 konnte das eingeführte Gen nach sechs Generationen nicht mehr nachgewiesen werden (Traynor, 1997). Die beschleunigte Wirkgeschwindigkeit hatte einen enormen negativen Effekt auf die ökologische Persistenz der Viren, da diese deutlich weniger Nachkommen als die entsprechenden Wildtyp-Viren produzierten (Cory, 2000). Keine der physikalischen Eigenschaften der Viren, wie z.B. Größe, Stabilität, UV-Sensitivität etc., zeigten hingegen einen Unterschied. Außerdem wurde keine Wirkung der in den infizierten Larven exprimierten Insektenkontrollproteine auf natürliche Räuber, Parasiten, Parasitoide oder Honigbienen festgestellt (Miller, 1995).

Tab. 1.3: Freisetzungsversuche mit gentechnisch veränderten Baculoviren (Stand Februar 2002; modifiziert nach Hu & Vlak, 1997).

Jahr	Land	Wildtyp	Gentechnische Veränderung
1986-89	Großbritannien	AcMNPV	Markersequenz
1989	USA	AcMNPV	Polyhedrin-Deletion
1993	USA	LdMNPV	Markergen (β -Galaktosidase)
1994-5	Kanada	AcMNPV	p10-Deletion, Markergen
1994-8	Großbritannien	AcMNPV	Neurotoxigen (AaHIT)
1995	USA	AcMNPV	Neurotoxigen (AaIT), egt-Deletion
1996	USA	AcMNPV	Neurotoxigen (AaIT), egt-Deletion
(12 Bundesstaaten)			
1999-2002	China	HaMNPV	Neurotoxigen (AaIT), egt-Deletion

Biologische Sicherheit

Der Einsatz von Baculoviren im Pflanzenschutz blickt auf langjährige praktische Erfahrungen zurück. Dabei konnte ihre biologische Sicherheit für Nicht-Zielorganismen und die Umwelt nachgewiesen werden (Gröner, 1986). Mehr noch, Baculoviren sind die selektivsten Insektizide, die es gegenwärtig gibt. Manche monospezifischen Baculoviren, wie z. B. SeMNPV (SPOD-X) oder das *Cryptophlebia leucotreta* GV (CeleGV), können in ihrer Selektivität für eine einzige Wirtsart nicht übertroffen werden.

Die ersten Schritte hin zur möglichen Anwendung gentechnisch veränderter Baculoviren haben die Diskussion über die biologische Sicherheit dieser Viren neu belebt. Als mögliche Risiken des Einsatzes gentechnisch veränderter Viren werden neben der ungewollten Etablierung eines gentechnisch veränderten Virus die unvorhergesehene Veränderung der Genomstruktur freigesetzter Viren durch Mutation, Rekombination bzw. durch die Insertion mobiler genetischer Elemente (Transposons) betrachtet. Unvorhergesehene Effekte der modifizierten Viren bzw. der modifizierten Gene können hierdurch nicht ausgeschlossen werden (Jehle *et al.*, 1993). Versuche in Modellökosystemen und begrenzte Freisetzungsexperimente wurden durchgeführt, um die Konkurrenzfähigkeit und die Wahrscheinlichkeit der Etablierung gentechnisch veränderter Viren abzuschätzen (Tab. 1.3). Hierbei hat sich regelmäßig gezeigt, dass gentechnisch veränderte Viren mit beschleunigter Wirkung bzw. erhöhter Virulenz ihren entsprechenden Wildtyp-Viren in ihrer ökologischen Konkurrenzfähigkeit deutlich unterlegen waren. Dies verringert die Wahrscheinlichkeit einer ungewollten Etablierung entsprechender Viren in der Umwelt.

Eine verringerte ökologische Konkurrenzfähigkeit, die sich aus der Erhöhung der Wirkungsgeschwindigkeit bzw. der Virulenz modifizierter Baculoviren ergab, ist ein wertvoller Wegweiser, wie die Etablierung dieser Viren in der Umwelt verhindert werden kann. Durch die Deletion weiterer viraler Gene, die für die Stabilität und Ausbreitung von Baculoviren verantwortlich sind, aber nicht für die Wirtserkennung, Infektion bzw. Replikation benötigt werden, ließe sich ihre Persistenzmöglichkeit weiter verringern. Am Ende dieses Reduktionsprozesses viraler Gene könnten nicht-replikative Bioinsek-

tizide stehen, deren Selektivität auf den molekularen Erkennungsmechanismen der Virus-Insekt-Interaktion beruht und deren verbliebene virale Funktionen als biologische Boten lediglich die genetische Information für Insektenkontrollproteine an die Schadinsekten überbringen (Jehle, 1997).

Eine hinreichende Kenntnis der biologischen Eigenschaften von gentechnisch veränderten Baculoviren und der daraus resultierenden Populationsdynamik in ihren Wirtsinsekten spielen für die Abschätzung mittel- oder längerfristiger ökologischer Konsequenzen eine wichtige Rolle. Eine vertiefte Kenntnis über die Populationsdynamik der Baculoviren und deren präzisierten Formulierung in mathematischen Modellen können einen wesentlichen Beitrag zur Sicherheitsabschätzung und zur Optimierung von Kontrollstrategien leisten (Cory & Hails, 1997; Cory *et al.*, 1997). Die mathematische Modellierung der Populationsdynamik von Baculoviren beruht auf der Formulierung und Abstraktion wesentlicher Interaktionen zwischen Virus, Wirt und Umwelt um Prognosen über ihr Verhalten machen zu können.

1.4 Populationsdynamik von Baculoviren in Abhängigkeit des Trophie-Typs des Wirtes

Die taxonomische Klassifikation von Baculoviren basiert überwiegend auf morphologischen, physiko-chemischen und molekularen Merkmalen der Virionen. Darüber hinaus werden auch biologische und ökologische Eigenschaften der Viren, wie z. B. Wirtsbereich, Transmissionsstrategien, etc. berücksichtigt (van Regenmortel *et al.*, 2000). Ein wesentlicher Gesichtspunkt, der weitreichende Folgen für die Populationsdynamik der Viren hat, sind die Lebensweise und die trophischen Eigenschaften der Wirtsinsekten. Bei den Wirtsinsekten können zwei Trophie-Typen unterschieden werden: (1) offene Blattfresser und (2) verdeckt fressende Minierer.

Offene Blattfresser sind dadurch gekennzeichnet, dass sie häufig polyphag, also nicht auf einzelne Fraßpflanzen spezialisiert, sind. Die Insekten können sporadisch ein Mas-

senaufreten zeigen, das dazu führt, dass ein in der Insektenpopulation vorhandenes Pathogen relativ einfach von einem Individuum auf ein anderes übertragen wird (horizontale Transmission). Das Auftreten des Schwammspinners (*Lymantria dispar*) oder der Gammaeule (*Autographa gamma*) sind klassische Beispiele für diesen Wirtstyp. Da diese Insekten ihre gesamte Larvenentwicklung auf der Pflanzenoberfläche durchlaufen, ist bei ihnen die Möglichkeit einer Pathogenübertragung durch eine horizontale Transmission im Prinzip in allen Larvenstadien möglich. Aus vielen Freilandbeobachtungen ist bekannt, dass Epizootien dieser Insekten auf Grund einer Pathogeninfektion, wie z.B. Baculoviren, spontan zusammenbrechen können.

Verdeckt fressende Minierer hingegen bohren sich in die Fraßpflanze ein und entwickeln sich dann abgeschieden von der Außenwelt an einem relativ geschützten Ort. Diese Insekten sind in der Regel auf wenige Wirtspflanzen spezialisiert. Die Individuen selbst sind monophag, da sie die Wirtspflanze bis zum Diapause- bzw. Verpuppungsstadium in der Regel nicht verlassen. Ein Beispiel hierfür ist der Apfelwickler (*Cydia pomonella*), der zwar auf Apfel, Birne und wenigen anderen Wirtspflanzen vorkommen kann, aber eine einmal befallene Frucht bis zum L5-Stadium nicht mehr verlässt. Für die perorale Infektion durch Pathogene, die solche Insekten befallen, bedeutet dies, dass es nur eine kurze Zeitspanne gibt, während der sich die Larven noch auf der Fruchtoberfläche befinden und sie das Pathogen aufnehmen können. Beim Apfelwickler z. B. erstreckt sich diese Zeitspanne auf das erste (L1) maximal noch frühe zweite (L2) Larvenstadium. Da Larven auf dem Apfel überwiegend einzeln vorkommen, ist die Wahrscheinlichkeit einer horizontalen Transmission im Vergleich zum offenen Blattfresser deutlich herabgesetzt. Bei einem solchen Wirtsinsekt erscheint eine vertikale Transmissionsstrategie (die Übertragung des Pathogens von einer Wirtsgeneration in die nächste) evolutionär als erfolgversprechender, um in einer Wirtspopulation zu persistieren.

Beispiele für Baculoviren, die für die beiden beschriebenen Trophie-Typen pathogen sind, sind das AcMNPV, das einen relativ breiten Wirtsbereich hat und das für *C. pomonella* spezifische CpGV (Gröner, 1986). Beide Viren unterscheiden sich auch hinsichtlich ihrer Virulenz gegenüber den Wirten. CpGV ist für *C. pomonella* extrem viru-

lent, ein bis wenige Einschlusskörper sind ausreichend, um bei einer L1-Larve eine Infektion auszulösen (LC_{50} : $2,6 \times 10^3$ OB/ml) (Jehle *et al.*, 1995). AcMNPV zeigt gegenüber den verschiedenen Wirten eine unterschiedlich ausgeprägte Virulenz. Neben hochsuszeptiblen Wirten, wie z. B. *Autographa gamma* (LC_{50} : $3,2 \times 10^2$ OB/ml) gibt es auch weniger anfällige Wirte, wie *Spodoptera exigua* (LC_{50} : $6,5 \times 10^4$ OB/ml) (El-Salamouny, 1998). Die LC_{50} der Larven nimmt dabei mit höheren Larvenstadien dramatisch zu und ist für L4-Larven um das bis zu 100-1000 fache höher als für L1-Larven (Bianchi *et al.*, 2000).

Tab. 1.4: Biologische Eigenschaften zweier Systeme im Vergleich.

	<i>System I</i>	<i>System II</i>
Virus	<i>Autographa californica</i> MNPV	<i>Cydia pomonella</i> GV
Wirtsbereich	breit, ca. 70 Arten	eng, 4 Arten
horiz. Transmissionswahrscheinlichkeit	hoch	niedrig
Wirtsinsekt	<i>Autographa gamma</i>	<i>Cydia pomonella</i>
Fraßverhalten	polyphag offener Blattfresser	± monophag verdeckt, minierend
Bekämpfungsstadien	L1-L5	L1-L2

Für offene Blattfresser und das AcMNPV bzw. SeMNPV wurden in den vergangenen Jahren bereits verschiedene Modelle zur Populationsdynamik entwickelt, z. B. für das tri-trophische System Chrysanthemum/*S. exigua*/AcMNPV (siehe Kap. 1.4). Verdeckt fressende Minierer und ihre entsprechenden Pathogene, wie z. B. das Apfel/Apfelwickler/CpGV-System wurden hingegen bisher bei der Modellierung der Populationsdynamik nicht berücksichtigt. Eben dieses System ist auf Grund der Pflanzenschutzmittelzulassung des CpGV von großer praktischer Bedeutung. Da für das praxisrelevante CpGV bereits gentechnisch veränderte Varianten erzeugt wurden (siehe Kap. 3.2.1), sollte der Modellierung der Populationsdynamik des Apfelwicklers und des CpGV das besondere Gewicht dieser Studie gelten. Des weiteren kann dieses Modell

natürlich auch als Grundlage für andere Systeme mit minierenden Insekten, wie z. B. dem System (Baumwolle/*Helicoverpa armigera*/HaSNPV) dienen.

1.5 Modellierung

Die meisten mathematischen Modelle zur Populationsdynamik von Baculoviren basieren auf einem Modell für Mikroparasiten von Anderson & May (1981). Dieses Modell berücksichtigt „freilebende infektiöse Stadien“ und ist Teil einer Serie von epidemiologischen Modellen, die aus dem ursprünglichen Modell von Kermack & McKendrick (1927) weiterentwickelt wurden. Im Vordergrund steht jeweils die infektiöse Krankheit, deren Dynamik mit Hilfe von kontinuierlichen deterministischen Modellen untersucht wird. Im Hinblick auf Baculoviren haben Dwyer *et al.* (1997; 2000) und Sait *et al.* (2000) diesen analytischen Ansatz, der nur sehr wenige Parameter verwendet, weiterverfolgt und das ursprüngliche Anderson & May-Modell ihren Systemen angepasst. Im Gegensatz zum Anderson & May-Modell haben einige Autoren, darunter Dwyer (1992) und Dwyer und Elkinton (1993), die abgewandelten Modelle validiert und diesen Modellen somit eine freilandbezogene Aussagekraft verschafft.

Bianchi (2001) hat in einem Modell über die biologische Bekämpfung von *S. exigua* mittels SeMNPV einen etwas anderen und sehr umfassenden Ansatz gewählt. Um Aussagen auf relativ kurze Sicht für ein sehr definiertes System machen zu können, verwendet er ein numerisches Simulationsmodell (BACSIM) mit einer Vielzahl an Parametern. Mit BACSIM verglich er die Effektivität zweier Viren mit unterschiedlichem Wirkungsgrad. Das Modell ist speziell für die Kontrolle von *S. exigua* auf Chrysanthemen im Gewächshaus zugeschnitten. Für die Verifizierung des Modells wurden sämtliche Daten erhoben, welche die biologische Aktivität von SeMNPV, AcMNPV und drei Deletionsmutanten von AcMNPV ($-\Delta_{egt}$, $-\Delta_{pp34}$, $-\Delta_{p10}$) gegenüber *S. exigua* beschreiben (Bianchi *et al.*, 2000).

In BACSIM wird das Gewächshaus räumlich in Chrysanthemenbeet, Blatt und *patch* differenziert, wobei *patch* als die Fläche definiert ist, die Larven aus einem Eigelege

nach Nahrung absuchen. Zusätzlich wird die Pflanze vertikal in zwei Schichten unterteilt, um einerseits die Larven verfolgen zu können und andererseits ein Profil der applizierten Polyhedroviren zu erstellen. Das Pflanzenwachstum wird anhand vom Blattflächenindex und der Anzahl an Blättern berechnet. Die Entwicklung der Larven wird Stadien-spezifisch modelliert, indem alle Individuen einer Altersklasse zusammengefasst werden. Jede Altersklasse besitzt eine eigene Mortalitätsrate und eine temperaturabhängige Entwicklungsrate. Infizierte und nicht infizierte Larven werden getrennt gehandhabt. Infizierte Larven wechseln in ein parallel laufendes Kompartiment, in dem eine alters- und temperaturabhängige Sterberate verwendet wird. Außerdem wird im Modell zwischen *suszeptiblen* (anfälligen) und *resistenten* Larven unterschieden. *Suszeptible* Larven machen die Hälfte aller Larven aus und können sich auch in späteren Stadien mit dem Virus infizieren. Ebenfalls enthalten im Modell sind UV-Inaktivierung, horizontale- sowie vertikale Transmission, die räumliche Verteilung der Insekten und der Ertragsschaden.

Eine Sensitivitätsanalyse des Modells zeigte, dass die Mortalitätsraten und der durch Blattfraß verursachte Schaden robust auf Veränderungen in den Parameterwerten reagierten. Zum Beispiel hatte eine 10%-ige Veränderung der UV-Inaktivierungsrate so gut wie keinen Einfluss auf das Ausmaß des Schadens. Ähnlich riefen 10%-ige Veränderungen der Infektionschance und der Wirkgeschwindigkeit des Virus sowie der natürlichen Mortalitätsrate der Insekten keine nennenswerten Unterschiede in der virusbedingten Mortalität und im Ausmaß des Schadens. In der Validierung von BACSIM hat sich herausgestellt, dass Modellvorhersagen für die Mortalität und Fraßmenge bei verschiedenen Aufwandmengen von AcMNPV und SeMNPV mit gemessenen Werten in Gewächshausversuchen übereinstimmten. Lediglich die im Gewächshaus beobachteten Letalzeiten waren stets höher als die Modellvorhersagen, was darauf hin deutet, dass ein Teil des Systems noch nicht komplett verstanden wurde und noch näher untersucht werden muss. Es wird vermutet, dass die Larven sehr viel Zeit auf der Unterseite der Blätter verbringen – einem Ort an dem sich so gut wie keine applizierten Viren befinden.

Mit dem validierten Modell konnten verschiedene Szenarien durchgespielt werden, in denen gezeigt wurde, dass der Zeitpunkt der Virusapplikation für eine effektive Kontrolle des Schädling am wichtigsten war. Wurden die Chrysanthemen direkt nach der Eiablage bis spätestens 10 Tage danach gespritzt, konnte bei den höheren Dosen (1×10^7 , 3×10^7 , 1×10^8 Einschlusskörper/m²) eine vollständige Kontrolle erzielt werden. Bei einem Vergleich von Viren mit unterschiedlicher Wirkgeschwindigkeit, konnten zwar teilweise unterschiedliche Ergebnisse erzielt werden, doch musste sehr genau auf den Zeitpunkt der Virusapplikation geachtet werden, um eine ausreichende Kontrolle zu erhalten. Es wurden Varianten mit einer 25% (AcMNPV_{-25%}) und 50% (AcMNPV_{-50%}) schnelleren Wirkgeschwindigkeit mit dem Wildtyp-Virus verglichen. In einer realistischen Simulation mit einem täglichen Einflug von *S. exigua* und einer Virusbehandlung in Abständen von 10 Tagen zeigten AcMNPV_{-25%} und AcMNPV_{-50%} eine effizientere Kontrolle als das Wildtyp-Virus. Nach dem Modell wurde mit AcMNPV_{-25%} die Anzahl der beschädigten Pflanzen gegenüber einer Behandlung mit AcMNPV um 17%, bei AcMNPV_{-50%} sogar um 43% reduziert. Obwohl diese schneller tötenden Viren den Wildtyp-Viren nicht in allen Situationen überlegen waren, stellten sie sich als erfolgreicher bei den älteren Larvenstadien heraus und könnten somit das Zeitfenster der Behandlung vergrößern. Simulationen mit unterschiedlichen Inaktivierungsraten brachten bei den üblich verwendeten Dosen keine bemerkenswerten Unterschiede hervor, da die UV-Inaktivierung im Gewächshaus ohnehin schon sehr niedrig ist.

BACSIM konzentriert sich auf die Suche nach Viruseigenschaften, deren Veränderung die Anwendung verbessern. Es beinhaltet keine Informationen über die Wahrscheinlichkeit eines Gentransfers von rekombinanten Viren zu natürlich vorkommenden Populationen, oder über den Effekt, den fremde Genprodukte auf Nicht-Zielorganismen haben können, noch enthält es Informationen über den Einfluss einer Expression eines fremden Gens auf die Fitness des Baculovirus.

2 Beschreibung des Systems *C. pomonella*/CpGV

2.1 Biologie von C. pomonella und CpGV

Der Apfelwickler (*Cydia pomonella*) gehört zu der Familie der Tortriciden (Lepidoptera) und ist ein bedeutender Schädling in Obstanlagen. Unbehandelt kann er innerhalb einer Saison eine komplette Apfelernte zerstören. Generell beginnt im Mai der Apfelwicklerflug. Nach der Paarung legen die Weibchen 7-10 Tage lang ihre Eier einzeln in der Nähe der Frucht oder auf der Frucht ab. Einige Tage nach der Eiablage schlüpfen die Eilarven und wandern in Richtung Frucht. Dort suchen sie nach einer geeigneten Stelle, an der sie sich in die Frucht bohren können. In einer kleinen Kammer unterhalb der Schale erfolgt die Häutung zum zweiten Larvenstadium (Ferro & Harwood, 1973). Die weitere Entwicklung der Larve findet in der Frucht statt. Die Larve frisst einen Gang zum Kerngehäuse und verlässt die Frucht erst als ausgewachsene L5. Diese L5 sucht sich einen geschützten Verpuppungsort am Stamm oder auch im Boden. Nach dem Puppenschlupf beginnt eine neue Generation. In den wärmeren Anbaugebieten Deutschlands gibt es häufig zwei, in seltenen Fällen sogar drei Generationen in einem Jahr. Der Apfelwickler überwintert als Diapauselarve (L5).

Die für die Untersuchungen eingesetzten Apfelwicklerlarven stammten aus der an der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Institut für biologischen Pflanzenschutz, in Darmstadt vorhandenen Erhaltungszucht. Die Zucht der Apfelwickler-Larven erfolgte auf semi-synthetischem Nährmedium, wie es in leicht modifizierter Zusammensetzung auch für Biotests Verwendung findet (Ivaldi-Sender, 1974). Um zu verhindern, dass die gesamte Zucht durch mögliche Kontaminationen mit dem CpGV beeinträchtigt wird, wurden die Larven einzeln in Döschen (ca. 8 cm³) gehalten, die mit Nährmedium ausgefüllt waren. Alle Entwicklungsstadien wurden in einem klimatisierten Raum bei 26°C, 70% relativer Luftfeuchte und einer 16-stündigen Fotoperiode gehalten. Unter diesen Bedingungen begannen die Larven etwa 4-5 Tage nach der Eiablage zu schlüpfen und entwickelten sich innerhalb von 12-14 Tagen zur Puppe. Nach einer Puppenruhe von etwa 7 Tagen schlüpfen die ersten Falter. Zur Kopulation und

Eiablage wurden je 10-20 Falter in Plexiglaszylinder gesetzt, die mit Schaumstoff-Futter ausgekleidet waren. Deren obere und untere Öffnung wurde mit Cellophanpapier abgedeckt, an das die Falter bevorzugt ihre Eier ablegten. Als Nahrung wurde den Faltern lediglich Wasser über ein befeuchtetes Filterpapier angeboten. Die Apfelwickler-Zucht erfolgte im wesentlichen nach der von Bathon (1981) beschriebenen Methode.

Das *Cydia pomonella* Granulovirus (CpGV) wurde zuerst von Tanada (1964) beschrieben. Da dieses aus mexikanischen *C. pomonella* Larven isoliert worden war, wurde es als mexikanisches Isolat benannt (CpGV-M). Neben diesem Isolat wurden später auch ein russisches (CpGV-R) und ein englisches (CpGV-E) Isolat charakterisiert (Harvey & Volkman, 1983; Crook *et al.*, 1985; 1997).

Das CpGV ist ein hoch spezifisches Pathogen des Apfelwicklers, das seit mehreren Jahren als Insektizid im Obstbau zugelassen ist. Mit wiederholten Spritzungen des Viruspräparates (z. B. Madex®, Granupom® oder Carpovirusine®) zur Eiablage, kann der Apfelwickler effektiv bekämpft werden.

Im Rahmen dieser Untersuchung erfolgten die notwendigen Virusvermehrungen in L5-Larven des Apfelwicklers, um eine möglichst große Ausbeute an Viren zu erhalten (vgl. Kap. 3.1.4). Die Larven wurden mit einer Dosis von 1000 OB infiziert und die virustoten Larvenkadaver anschließend in etwas Detergenz (0,5% SDS) gemörsert. Die Suspension wurde über Mull filtriert, mehrfach zentrifugiert und schließlich über einen 20-80%-igen kontinuierlichen Glyceringradienten aufgereinigt. Nach einem weiteren Waschschrift wurden die Einschlusskörper in Wasser resuspendiert und deren Konzentration durch Auszählen in einer Zählkammer bestimmt. Die Virussuspension wurde aliquotiert bei -20°C gelagert. Da das Virus durch wiederholtes Einfrieren und Auftauen an Aktivität verliert, wurde jeweils nur das benötigte Aliquot aufgetaut.

2.2 Populationsdynamik des CpGV und deren Parameter

Die Populationsdynamik von Baculoviren wird im wesentlichen durch die Interaktion zwischen Virus und Insekt geprägt (Abb. 2.1). Da die Viren nicht ohne ihren Wirt existieren können, muss zunächst die Insektenentwicklung modelliert werden. Notwendig sind hierfür

- (1) die temperaturabhängigen Entwicklungsraten der einzelnen Entwicklungsstadien
- (2) die natürlichen Mortalitätsraten der einzelnen Entwicklungsstadien
- (3) die Reproduktionsrate des Insekts

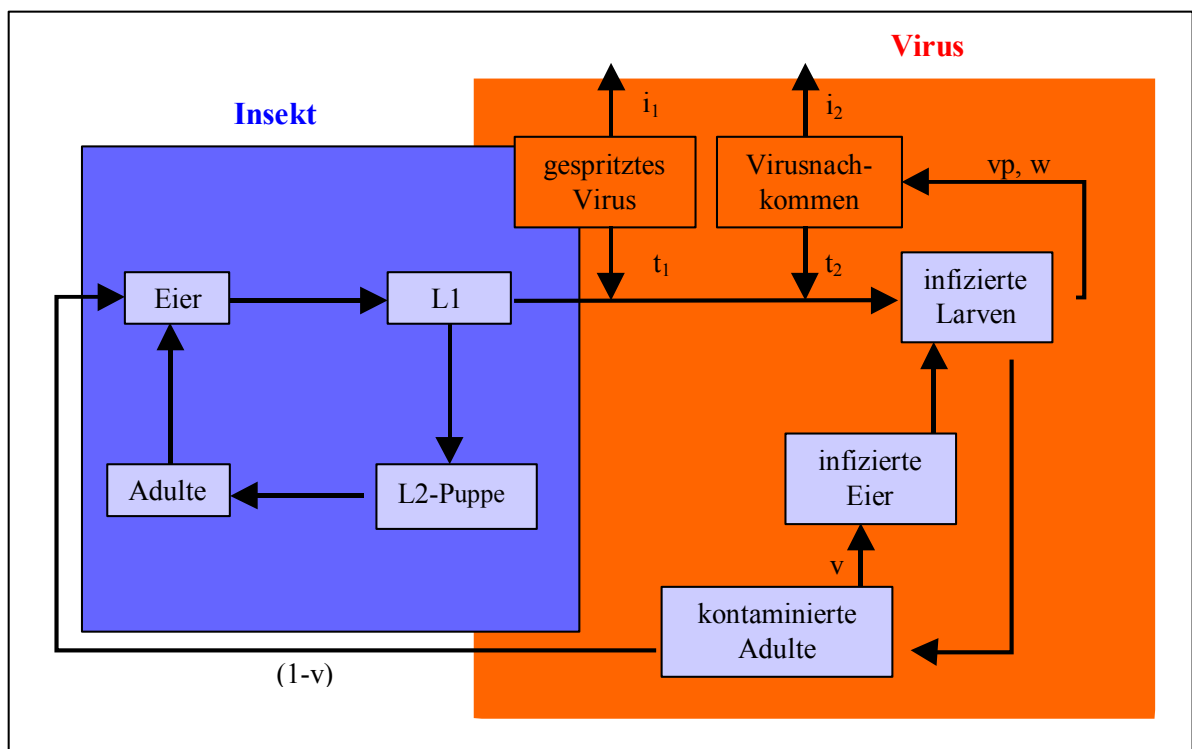


Abb. 2.1: Vereinfachte Darstellung der CpGV-Apfelwickler-Interaktionen mit t_1 (Infektionsrate), t_2 (horizontale Transmissionsrate), vp (Virus Produktionsrate), w (Wirkgeschwindigkeit), $i_{1,2}$ (Inaktivierungsrate) und v (vertikale Transmissionsrate).

Die Hauptgrößen, welche die Vermehrung und Ausbreitung der Viren in der Umwelt beschreiben, sind

- (1) die Virusmenge (appliziertes Virus und viröse Larvenkadaver=Virusflecken)
- (2) die Inaktivierungsrate
- (3) die Infektionsrate und Wirkgeschwindigkeit
- (4) die horizontale und vertikale Transmissionsrate
- (5) die Menge an Virusnachkommen

Für das System Apfelwickler/CpGV wurde angenommen, dass sich nur die an der Oberfläche befindlichen L1-Larven mit Virus infizieren können. Ob sich eine frischgeschlüpfte Eilarve mit gespritzten Virus infiziert, hängt von der Infektionsrate, der Virulenz und der Dichte der aktiven Viren ab. Die Dichte der aktiven Viren resultiert aus dem Spritzzeitpunkt, der Aufwandmenge und der in der Zwischenzeit erfolgten Inaktivierung der Viren. Hat sich eine Larve infiziert, so bestimmt unter anderem die Wirkgeschwindigkeit, wie schnell die Larve stirbt und wie viele Virusnachkommen produziert werden. Eine an einer Infektion verendete Larve löst sich auf und setzt Abermillionen an neuproduzierten viralen Einschlusskörpern frei. Die Gesamtheit der Virusnachkommen einer Larve können als ein Virusfleck angesehen werden, da diese zunächst am Ort der lysierten Larve konzentriert sind. Andere frischgeschlüpfte Eilarven können mit einer bestimmten Wahrscheinlichkeit, der horizontalen Transmissionsrate, auf einen Virusfleck treffen, sich infizieren und an der Infektion zugrunde gehen. Überlebt eine Larve eine Infektion, so besteht die Möglichkeit, das Virus an ihre Nachkommen weiterzugeben. Diese Form der Übertragung ist die sogenannte vertikale Transmission. Nicht infizierte Larven entwickeln sich über L2-L5 zu Puppen und Adulten, die sich wiederum vermehren.

Virusmenge

Die Virusmenge des Systems setzt sich aus den applizierten Viren und den von infizierten Larven freigesetzten Viren zusammen. Baculoviren werden in der Regel durch Spritzapplikation ausgebracht und werden in unserem System als gleichmäßig verteilt

angesehen. Da sich die Virusnachkommen aus infizierten Larven nicht gleichmäßig verteilen, werden diese als Virusflecken betrachtet und immer getrennt geführt.

Inaktivierungsrate

Die aktive Virusdosis aus der Applikation ergibt sich aus der Menge der ausgebrachten Virenpartikel und der Inaktivierung durch UV-Licht. Die Inaktivierung der applizierten Viren durch UV-Licht ist einer der wesentlichen Parameter, welche die Persistenz der Viren im Freiland limitieren. Sie folgt einer Gleichung erster Ordnung (Fritsch & Huber, 1985, Ignoffo *et al.*, 1989). Virusflecken werden nach einer bestimmten Sonnenscheindauer inaktiviert. Ein Virusfleck wird im Modell immer als eine Einheit dargestellt und ist einheitlich aktiv oder inaktiv.

Infektionsrate und Wirkgeschwindigkeit

Infektionsrate und Wirkgeschwindigkeit beziehen sich auf das applizierte Virus und beschreiben die Wirkung des Virus auf die Larve. Aufgrund der Biologie des Apfelwicklers kann sich nur das erste Larvenstadium (L1) an der Apfeloberfläche und auf Blättern infizieren. Spätere Larvenstadien bleiben weitestgehend unberührt. Die Infektionsrate ergibt sich aus der Aufnahmerate an Einschlusskörpern und der Virulenz der Viren und wird mittels Biotests durch die LD₅₀ (Dosis bei der 50% der Larven sterben) gemessen. Die Wirkgeschwindigkeit stellt die Sterberate dar und wird ebenfalls in Biotests durch die LT₅₀ (Zeitraum, nach dem 50% der Larven an der Virusinfektion gestorben sind) bestimmt. Die Virulenz beschreibt somit in quantitativer Form die Wirkung des Virus. Zwar wurden keine Daten für ein gentechnisch verändertes CpGV erhoben, doch kann ein gentechnisch verändertes Virus simuliert werden, indem Viruseigenschaften wie Infektiösität und Wirkgeschwindigkeit im Modell verändert werden.

Horizontale und vertikale Transmissionsraten

Horizontale Transmission findet immer dann statt, wenn eine infizierte Larve lysiert, Virusnachkommen freigesetzt werden und eine zweite Larve diese Virusnachkommen aufnimmt. Die auf diese Art freigesetzten Viren werden im Modell als Virusfleck betrachtet. Die horizontale Transmissionsrate ist die Wahrscheinlichkeit, dass eine Larve

beim Durchqueren eines Virusflecks oder beim Einfressen in der Nähe eines solchen Flecks, Virus aufnimmt und infiziert wird. Sie wird somit größtenteils durch das Verhalten der Larven bestimmt. Hingegen kann die vertikale Transmission stattfinden, wenn Larven eine Virusinfektion überleben, sich zu Adulten entwickeln und die Infektion an ihre Nachkommen weitergeben. Bei verschiedenen Baculovirus-Insekt-Beziehungen trägt die vertikale Transmission in erheblichem Ausmaß zur Verbreitung der Infektion innerhalb der Wirtspopulation bei (Easwaramoorthy & Jayaraj, 1989, Kukan, 1999, Nordin *et al.*, 1990).

Die Virusnachkommen aus dem Infektionsgeschehen

Infizierte Larven produzieren abhängig von ihrem Larvenstadium und der Infektionsdosis eine bestimmte Anzahl von Nachkommen. Im Modell werden ausschließlich die Virusnachkommen von Larven, die sich im ersten Larvenstadium infizieren verwendet, da die älteren Larvenstadien für die horizontale Transmission von geringerer Bedeutung sind. Die Anzahl der Virusnachkommen ist besonders in Hinblick auf gentechnisch veränderte Viren von Bedeutung. Viren, die schneller töten, haben weniger Zeit sich zu replizieren und produzieren in der Regel weniger Nachkommen. Beispielsweise führt die Deletion des viralen *egt*-Gens zu einer erhöhten Wirkgeschwindigkeit und einer verringerten Anzahl von Virusnachkommen je infizierter Larve (O'Reilly & Miller, 1991). Eine verminderte Virusnachkommenschaft je Larve könnte die Ausbreitungs- und Etablierungschancen einer Virus-Rekombinanten erheblich beeinträchtigen.

3 Virusparameter

3.1 Virusaktivität CpGV

3.1.1 Mittlere Letalkonzentration und mittlere Letaldosis

Für die Beurteilung der Baculovirus-Wirt-Beziehung sind Kenntnisse über die Infektiosität des CpGV von grundlegender Bedeutung. Zur Parametrisierung der Virusinfektiosität diente ein von Huber (1981) standardisiertes Biotestsystem, das für jede Virus-Wirt-Beziehung reproduzierbare Ergebnisse liefert. Hierfür wurden frisch geschlüpften Eilarven (L1) von *C. pomonella* über viruskontaminiertes Futter infiziert und die Wirkung der Viren anhand der Larvenmortalität bestimmt. Als Nahrung für die Larven wurde das normale Zuchtmedium von Ivaldi-Sender (1971) dahingehend modifiziert, dass es sich bei einer Temperatur von 40°C noch ausgießen ließ, um eine thermische Inaktivierung der Viren auszuschließen. Bei einer Temperatur von 40-45°C wurden die Viren nach einem bestimmten Pipettierschema in frisch zubereitetes Futter eingerührt, so dass man verschiedene Viruskonzentrationen im Medium erhielt. Nach dem Ausgießen des Mediums in Schalen, wurden diese durch den Einsatz eines Rasters in jeweils 50 Quadrate unterteilt. Diese Rasterschalen blieben über Nacht zum Ausdünsten von Feuchtigkeit offen stehen. Anschließend wurde jedes Quadrat mit einer frisch geschlüpften Eilarve besetzt. Als Kontrolle diente eine Rasterschale mit virusfreiem Nährmedium. Die verschlossenen Schalen wurden bei 26°C unter Langtagbedingungen (16 Stunden Licht / 8 Stunden Dunkel) inkubiert. Nach 6 Tagen wurde die virusbedingte Mortalität registriert. Als klassische Methode zur statistischen Auswertung der Biotests diente die Probit-Analyse nach Finney (1971), die auf dem Maximum-Likelihood-Prinzip basiert. Hiermit können qualitative Dosis-Wirkungskurven berechnet werden. Für die Berechnung wurde die PC-Software MLP 3.08 (NAG, Lawes Agricultural Trust, Rothamsted Experimental Station, 1987) verwendet. Anhand der resultierenden Probit-Regressionsgeraden, wurde die Viruskonzentration berechnet, die eine Mortalitätswahrscheinlichkeit von 50% hervorruft. Dieser Wert, der als mittlere letale Konzent-

ration (LC_{50}) bezeichnet wird, stellt ein relatives Maß für die biologische Aktivität der Viren dar.

In Tab. 3.1 sind die für das CpGV ermittelten Biotests-Ergebnisse zusammen mit LC_{50} -Werten aus der Literatur aufgeführt, die nach vergleichbarer Methode für das CpGV-M bestimmt wurden. Die mittlere LC_{50} von $2,56 \times 10^3$ OB/ml Medium zeigt dabei eine gute Übereinstimmung mit den von Fritsch (1989) und Crook *et al.* (1984 und 1985) angegebenen Daten. Der relativ steile Verlauf der Probit-Regressionsgeraden mit einer Steigung von 2,12 bei Fritsch (1989) wurde in den Biotests, die mit Eilarven aus dem gleichen Zuchtstamm des Apfelwicklers durchgeführt wurden, bestätigt. Dies lässt auf eine große Homogenität der Versuchstiere schließen.

Tab. 3.1: Übersicht über die in Biotests auf künstlichem Nährmedium (Inkubationszeit 6 Tage) ermittelten LC_{50} -Werte für das CpGV-M.

LC_{50} [OB/ml Medium]	Steigung der Probitgeraden	Quelle
$2,56 \times 10^3$	2,16	diese Untersuchung
$2,73 \times 10^3$	2,12	Fritsch (1989)
$2,40 \times 10^3$	1,38	Crook <i>et al.</i> (1984)
$2,60 \times 10^3$	1,21	Crook <i>et al.</i> (1985)

Die vorliegenden LC_{50} -Daten geben zwar Hinweise auf die biologische Aktivität des CpGV, sie sagen jedoch alleine noch nichts über die tatsächlich wirksame Virusdosis aus, da diese in hohem Maße auch von der Fraßaktivität und dem Fraßvolumen der Wirtslarven abhängig ist. Da die Bestimmung der LD_{50} (Dosis bei der 50% der Versuchstiere sterben) insbesondere bei Eilarven des Apfelwicklers problematisch ist, kann hier auf Daten aus der Literatur zurückgegriffen werden (Tab. 3.2). So leiteten Crook *et al.* (1984) aufgrund der Methode des „*in vivo cloning*“ des CpGV für Eilarven theore-

tisch eine LD₅₀ von 1-2 OB ab. Beim „*in vivo cloning*“ werden Eilarven für einen kurzen Zeitraum (24h) einer so niedrigen Viruskonzentration ausgesetzt, dass höchstens 10% der Versuchstiere an der Virose sterben. Nach einem Modell von Huber & Hughes (1984) ist bei einer so geringen Mortalität davon auszugehen, dass bei etwa 95% der Versuchstiere die Virose durch die Aufnahme eines OBs ausgelöst wurde. Anhand der Biotests von Payne (1981) schätzten Crook *et al.* (1985) die LD₅₀ für L1 von *C. pomonella* auf maximal 3 OB pro Larve. In Biotests mit Apfelrondellen, auf die das CpGV mit und ohne Netzmittel appliziert wurde, ermittelte Keller (1973) für L1-Larven Werte von 28 bzw. 14 OB. Im Vergleich zu den Eilarven ist die LD₅₀ von L5-Larven des Apfelwicklers, wie zu erwarten höher und beträgt nach Etzel & Falcon (1976) 50 bzw. 92 OB nach Angaben von Camponovo & Benz (1984).

Tab. 3.2: Übersicht der LD₅₀-Werte für L1- und L5-Larven des Apfelwicklers, *C. pomonella*.

L1		L5	
LD ₅₀ [OB/Larve]	Quelle	LD ₅₀ [OB/Larve]	Quelle
1,5	Crook <i>et al.</i> (1984)	50	Etzel & Falcon (1976)
3	Crook <i>et al.</i> (1985)	92	Camponovo & Benz (1984)
1,37	Winstanley (pers. Mitt.)	10	Winstanley (pers. Mitt.)
14	Keller (1973)		
28	Keller (1973)		

3.1.2 Mittlere Letalzeit

Bei der Virogenese werden die Wirtslarven erst relativ spät durch die mit der Replikation verbundene Lysis lebenswichtiger Organe abgetötet. Dies bedeutet, dass infizierte Larven im Frühstadium der Virose zunächst ihre Aktivität beibehalten und dabei auch noch in Früchte einzudringen vermögen. Die Infektiösität von Viren wird daher nicht nur von der Dosis-Wirkungs-Beziehung zwischen Pathogen und Wirt, sondern auch von der Zeit-Mortalitäts-Beziehung bestimmt. Als Maß hierfür dient die sogenannte mittlere Letalzeit (LT_{50}), d. h. die Zeit, in der 50% der Testtiere sterben.

Um Auskunft über das Absterbeverhalten infizierter Apfelwickler-Larven zu erhalten, wurden Eilarven auf Nährmedien mit unterschiedlichen CpGV-Konzentrationen (2500, 5000, 10000 und 20000 OB pro ml Medium) gesetzt. Als Kontrolle diente virusfreies Medium. Da sich im Freiland die Apfelwickler-Larven im Allgemeinen während des kurzzeitigen Oberflächenfraßes und damit vor dem Eindringen in virusbehandelte Früchte infizieren, wurden die Tiere im Laborversuch auch nur kurze Zeit, d.h. 24 h auf viruskontaminierter Nahrung exponiert. Anschließend wurden sie (100 Larven pro Variante) auf virusfreies Medium umgesetzt und in Einzelhaltung bei Standardbedingungen (26°C und Langtagbedingungen) weiter inkubiert. Während der Inkubation bis zur Verpuppung wurden in verschiedenen Zeitabständen die Larvenmortalitäten registriert. Zur Berechnung der virusbedingten mittleren Letalzeiten wurden zunächst für jede Infektions-Konzentration die zeitabhängigen Wirkungskurven mit Hilfe der Probit-Analyse ermittelt. Hierfür wurde eine Software verwendet (MLP 3.08), bei der Obergrenzen für die Larvensterblichkeit vorgegeben werden können, da die unterschiedlichen Infektionskonzentrationen verschiedene Endmortalitäten zur Folge hatten (Tab. 3.3).

Tab. 3.3: Mittlere Letalzeiten (LT_{50}) für Eilarven von *C. pomonella*, die die ersten 24 h auf unterschiedlichen CpGV-Konzentrationen bei 26°C gehalten wurden (Inkubationszeit 11 Tage).

Virus-Konzentration [OB/ml Medium]	Endmortalität [%]	LT_{50} [h]	Steigung (Standard- abweichung)
2500	27	114,5	0,0717 (0,0241)
5000	34	109,0	0,0709 (0,0274)
10000	57	104,6	0,0605 (0,0192)
20000	85	105,9	0,0862 (0,0138)

Die Ergebnisse zeigten, dass mit zunehmender Viruskonzentration die Werte für die mittlere Letalzeit in dem gewählten Bereich unabhängig von der Viruskonzentration sind. Bei der niedrigsten Viruskonzentration (2500 OB/ml Medium), die innerhalb der Testlarvenpopulation eine Endmortalität von 27% bewirkte, wurde im Vergleich zu den übrigen Konzentrationen eine kaum höhere LT_{50} ermittelt. Auch bei einer Erhöhung der Viruskonzentration um den Faktor 2, 4 bzw. 8 zeigte sich kein signifikanter Unterschied in den mittleren Letalzeiten. Die virusbedingten Endmortalitäten erhöhten sich auf 34%, 57% bzw. 85% der Testlarven. Die aus allen Konzentrationsvarianten berechnete mittlere Letalzeit betrug 108,5 h (4,5 Tage). Nach dem Modell von Huber & Hughes (1984) kann man bei diesen Mortalitäten davon ausgehen, dass die Versuchstiere durch die Aufnahme weniger infektiöser Viruspartikel gestorben sind. Damit wird, unabhängig von der angebotenen Viruskonzentration, die Infektion einer Larve durch eine ähnlich wirksame Dosis ausgelöst. Erst bei hohen Viruskonzentrationen kommt es zu einer gleichzeitigen Infektion durch mehrere Viruspartikel. Dies bedeutet, dass die Virusreplikation in mehreren Zellen des larvalen Mitteldarms gleichzeitig beginnen kann und sich die Virose in der Larve schneller ausbreitet. Die infizierten Tiere sterben früher ab und die LT_{50} wird in der Tendenz herabgesetzt. Darüber hinaus zeigte sich in allen Versuchen, dass an einer Virose gestorbene Larven nicht vor dem 3. Versuchstag auftraten. Die Erklärung hierfür liegt in der zeitlichen Entwicklung der Virose. Nach der erfolg-

reichen Primärinfektion der Larven werden von den Viren mehrere Replikationszyklen in den larvalen Geweben durchlaufen, ehe der Wirt an einer Lysis der inneren Organe stirbt. In Pathogenitätstests mit Apfelrondellen kam Keller (1973) für das CpGV-M zu vergleichbaren Resultaten. Allerdings lag die mittlere Letalzeit der Apfelwicklerlarven zwischen 5,48 und 6,0 Tagen etwas höher. Erste viröse Larven wurden am 4. Tag beobachtet, ebenfalls unabhängig von der verabreichten Viruskonzentration.

3.1.3 Temperaturabhängigkeit der Wirkgeschwindigkeit

Ziel der Untersuchungen war es, die Replikationsfähigkeit und Wirkgeschwindigkeit des CpGV bei unterschiedlichen Temperaturen zu beschreiben. In Biotests wurden daher jeweils 500 Eilarven von *C. pomonella* auf viruskontaminiertem Medium (5000 OB/ml = LC₉₅ bei 26°C) bei Temperaturen von 19°C, 22°C, 24°C, 26°C, 28°C, 30°C und 32°C unter Langtagbedingungen bis zur Verpuppung inkubiert. Für jeden Auswertungzeitpunkt wurden pro Temperaturvariante 50 Tiere entnommen und bonitiert, um die virusbedingte Mortalität zu bestimmen. Aus den voneinander unabhängigen Mortalitätsdaten konnten mittels Probit-Analyse (MLP 3.08-Software) für jede Temperatur Wirkungsgeraden und die daraus resultierenden mittleren Absterbezeiten (LT₅₀) als Maß für den zeitlichen Verlauf der Virose ermittelt werden.

Wie in Tab. 3.4 ersichtlich, nahmen die LT₅₀-Werte mit zunehmender Temperatur ab und zwar von 467 h bei 19°C auf 172 h bei 30°C. Erst bei 32°C ist ein erneuter Anstieg auf 298 h zu verzeichnen. Die Probitgeraden für 19°C und 32°C zeigten eine geringere Steigung als die Geraden für die übrigen Temperaturen, die nahezu parallel verlaufen. Obwohl alle Testlarven mit der gleichen Viruskonzentration infiziert wurden, nahm die Mortalität bei 30°C auf 81% und bei 32°C auf 50% deutlich ab. Die überlebenden Larven zeigten keinerlei Symptome einer Virusinfektion. Bei niedrigeren Temperaturen zwischen 19°C und 28°C war die Empfindlichkeit der Apfelwicklerlarven gegenüber dem CpGV unverändert und die erreichten Endmortalitäten lagen wie zu erwarten um 95%.

Tab. 3.4: Mittlere Letalzeiten (LT_{50}) für Eilarven von *C. pomonella* bei unterschiedlichen Temperaturen. Die Larven wurden bis zur Verpuppung auf viruskontaminierter Nahrung gehalten.

Temperatur [°C]	End- mortalität [%]	LT_{50} [h]	95% Vertrauens- grenzen	Steigung (SE)
19	95	467	445 – 492	0,007 (0,0007)
22	90	230	218 – 242	0,015 (0,0010)
24	93	201	192 – 210	0,022* (0,0020)
26	95	190	182 – 200	0,021* (0,0020)
28	95	174	166 – 182	0,024* (0,0020)
30	81	172	162 – 183	0,017* (0,0020)
32	50	298	264 – 382	0,008 (0,0020)

* gekennzeichnete Werte, unterscheiden sich im Chi-Quadrat-Test (95% Schranke) nicht signifikant im Vergleich zum Standard-Biotest bei 26°C.

Die Ergebnisse machen deutlich, dass für die Entwicklung der Virose der optimale Temperaturbereich ungefähr zwischen 26 und 28 °C liegt. Sowohl niedrigere als auch höhere Temperaturen beeinflussen das Virus-Wirt-System, was sich in einer deutlich reduzierten Wirkgeschwindigkeit ausdrückt. Die Verringerung der Larvensterblichkeit bei 30°C und 32°C deutet auf eine Hemmung der Virusreplikation bei erhöhten Temperaturen hin. Auch aus der Literatur ist bekannt, dass die LT_{50} des CpGV bei Temperaturen über 30°C ansteigt und die Resistenz der Apfelwicklerlarven gegenüber den Viren zunimmt (Keller, 1973). Diese Beobachtung ist jedoch nicht auf eine thermische Inaktivierung der Viren zurückzuführen, sondern vielmehr auf Veränderungen im physiologischen Zustand der Wirtslarven, die möglicherweise zu einer Hemmung der Virusreplikation führen. Die ermittelten Daten können zu einer quantitativen und zeitlichen Prognose über den Verbleib der Viren in der Umwelt herangezogen werden.

3.1.4 Virusnachkommen bei CpGV

Aus der Literatur war bekannt, dass Larven im L5-Stadium bis zu 10^{11} Virusnachkommen produzieren, während Larven im L4-Stadium 10 bis 15mal weniger produzieren (Keller, 1973). Die Anzahl der Virusnachkommen von Eilarven sollte entsprechend ihrer Körpergröße um einen Faktor 660 kleiner sein als bei den L5-Larven. Außerdem wurde angenommen, dass Larven, die mit einer höheren Dosis infiziert wurden, schneller sterben und somit weniger Virusnachkommen produzieren. Frisch geschlüpfte Eilarven wurden über die *droplet-feeding*-Methode (Kadir *et al.* 1999; Hughes & Wood, 1981) mit einer Dosis von 100, 500 oder 5000 Einschlusskörpern pro Larve infiziert. Die Larven wurden anschließend auf Zucht-Medium gehalten. Tote Larven wurden abgesammelt, zerrieben und in Wasser aufgenommen. Die Viren wurden in einer Petroff-Hauser-Zählkammer im Lichtmikroskop ausgezählt. Die Ergebnisse sind in Abb. 3.1 dargestellt. Bei einer Dosis von 100 OB wurden durchschnittlich $3,5 \times 10^8$ Nachkommen gebildet und bei 500 OB pro Larve $6,4 \times 10^7$ OB. Einen signifikanten Unterschied gab es bei einer Dosis von 5000 OB, bei der nur $2,2 \times 10^6$ OB gebildet wurden. Das entspricht einer Reduktion von 99,4% im Vergleich zu der niedrigsten Dosis, die getestet wurde. Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung könnte sein, dass die Larven durch den massiven Befall des Mitteldarms kaum noch Nahrung zu sich nehmen können und verhungern. Sie sterben schneller und lassen den Viren weniger Zeit für die Replikation. Eine ähnlich hohe Reduktion der Anzahl an Virusnachkommen konnte auch bei einem schneller tötenden gentechnisch veränderten AcMNPV, dem AcTOX34.4, festgestellt werden (Burden *et al.*, 2000). Da in unseren Versuchen eine 50-fach höhere Infektionsdosis bezüglich der Virusnachkommenproduktion vergleichbar war mit einem schneller tötenden gentechnisch veränderten Virus, könnte für bestimmte Fragestellungen eine solche höhere Infektionsdosis ein gentechnisch verändertes Virus in den Versuchen ersetzen.

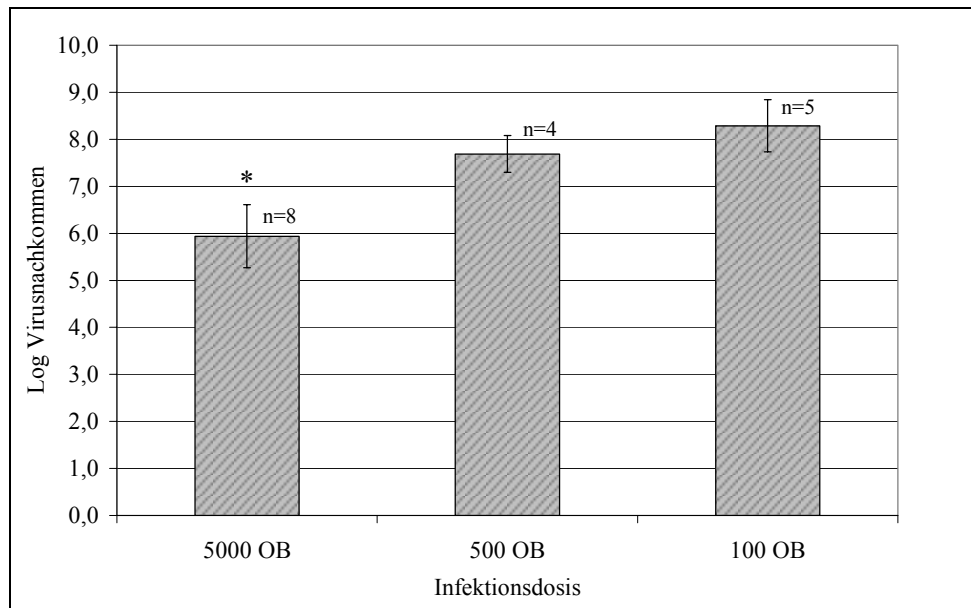


Abb. 3.1: Anzahl der Virusnachkommen von Larven, die als frischgeschlüpfte Eilarven mit unterschiedlichen Dosen CpGV infiziert wurden. Es wurden je vier Verdünnungen einer Larvensuspension mikroskopisch ausgezählt. Die Anzahl der Nachkommen bei einer Dosis von 5000 OB unterscheidet sich signifikant von denen der anderen beiden Dosen ($p < 0,01$).

3.1.5 UV-Inaktivierung

Im Freiland wird die Persistenz von Baculoviren, wie bei anderen Pathogenen auch, erheblich von Umwelteinflüssen beeinträchtigt. Die UV-Strahlung der Sonne, die etwa 1% der Gesamtstrahlung ausmacht, gilt als Hauptfaktor, der die biologische Aktivität und damit die Persistenz der Viren in der Natur begrenzt. Im Körper des Wirtes sind Baculoviren vor dieser inaktivierenden Strahlung relativ gut geschützt und im Boden können sie unter günstigen Bedingungen über Jahre hinweg persistieren (Thompson *et al.*, 1981). Dagegen ist die Stabilität von applizierten Viren auf Pflanzen und Blättern, die dem Sonnenlicht direkt ausgesetzt sind, äußerst begrenzt.

In einer Reihe von Untersuchungen unter Labor- und Freilandbedingungen konnte der Einfluss des UV-Lichtes auf die Aktivität von verschiedenen Baculoviren nachgewiesen werden (Übersicht bei Jaques, 1977, Krieg *et al.*, 1981). Während eine Strahlung im Wellenlängenbereich von über 320 nm nur einen geringen Einfluss auf die Virusaktivi-

tät zeigte, erwies sich das kurzwellige UV-C (254 nm) als besonders wirksam. Unter natürlichen Bedingungen ist dieser UV-C-Anteil allerdings von geringer Bedeutung, da dieser größtenteils in der Ozonschicht der Erdatmosphäre absorbiert wird. Die mittel- und langwellige UV-B (285-315 nm) und UV-A (315-380 nm) in der erdnahen Strahlung der Sonne ist es, die im wesentlichen zur Inaktivierung der Pathogene im Freiland beitragen. Dabei ist die Intensität der UV-Einstrahlung auf der Erdoberfläche von verschiedenen Faktoren abhängig, wie z.B. der Ozonkonzentration in der Atmosphäre, von Witterungsbedingungen, insbesondere aber von der Höhe des Sonnenstandes und damit von der Jahreszeit.

In Laborversuchen untersuchten Fritsch & Huber (1985) die Inaktivierung von trockenen Virusspritzbelägen des CpGV unter Verwendung einer künstlichen UV-Strahlenquelle (Ultravitalux-Lampen), deren Strahlenspektrum dem natürlichen Sonnenlicht relativ ähnlich ist. Die Experimente zeigten, dass ca. 95% der Viren bereits nach kurzzeitiger UV-Exposition inaktiviert wurden und eine weitere Aktivitätsabnahme wesentlich langsamer erfolgte. Es war auch dann kein signifikanter Unterschied im Verlauf der Inaktivierung festzustellen, wenn die Umgebungstemperatur von 25°C auf 50°C erhöht wurde. Die aus den Inaktivierungskurven ermittelten Halbwertszeiten, bei denen 50% der Viren inaktiviert wurden, betrugen 6,4 min bei 25°C und 4,2 min bei 50°C. Erst bei hohen Temperaturen von über 70°C war eine deutlich schnellere Aktivitätsabnahme des CpGV und eine signifikant niedrigere Halbwertszeit von 2,7 min zu verzeichnen, was auf einen Synergismus zwischen UV-Strahlung und Temperatur hinweist. Für das CpGV bedeuten diese Resultate, dass selbst bei maximal erreichbaren Temperaturen (40-50°C) auf Blättern im Freiland die UV-Empfindlichkeit der Viren durch hohe Umgebungstemperaturen nicht weiter erhöht wird und somit das Sonnenlicht den größten Einfluss auf die Virusinaktivierung hat.

Die Ergebnisse der Laborversuche vermitteln zwar Hinweise über die UV-Inaktivierung des CpGV, sie lassen sich aber nicht direkt auf Freilandbedingungen übertragen. Erkenntnisse hierüber lieferten Freilanduntersuchungen von Fritsch & Huber (1989), die bei unterschiedlichen Witterungsbedingungen durchgeführt wurden. Die Spritzversuche

mit dem CpGV wurden im Sommer 1981 bei häufig bewölktem Himmel und 1982 bei überwiegend sonniger Witterung auf dem Versuchsfeld der BBA in Darmstadt durchgeführt. Nach Applikation der Viren wurden zu verschiedenen Zeiten Blattproben entnommen, um im Labor in Biotests nach der Methode von Krieg *et al.* (1980) mit Apfelwickler-Larven die Virusaktivitäten (LC_{50}) zu bestimmen. Die reziproken LC_{50} -Werte stellen dabei ein direktes Maß für die Virusaktivität auf den Blattoberflächen dar. Wie in den Laboruntersuchungen, so zeigte sich auch im Freiland, dass die Aktivität der CpGV-Spritzbeläge innerhalb weniger Tage signifikant herabgesetzt wird und die weitere Inaktivierung langsamer voranschreitet. Für den Untersuchungszeitraum lässt sich jedoch der Verlauf der Aktivitätsabnahme bis zu einer 99,9%igen Inaktivierung durch eine lineare Beziehung beschreiben, wenn die Aktivitätswerte logarithmisch gegen die Expositionszeit in Sonnenstunden aufgetragen werden (Abb. 3.2). Anhand dieser linearen Inaktivierungskurven wurden die in Tab. 3.5 dargestellten Halbwertszeiten für das CpGV errechnet. Bei sonniger Witterung wurden bereits nach 2 Tagen bzw. 14,4 Sonnenstunden 50% der Viren inaktiviert, während bei bewölktem Himmel die Halbwertszeit auf etwa eine Woche bzw. 20 Sonnenstunden anstieg. Die Ergebnisse zeigen, dass die Stabilität des CpGV in hohem Maße von den jeweils herrschenden Witterungsbedingungen abhängig ist, d.h. die Virusspritzbeläge bei bedecktem Himmel wesentlich besser persistieren, als bei hoher Sonneneinstrahlung. Ein Grund hierfür ist die in unseren Breiten insgesamt geringere UV-Einstrahlung, die durch den niedrigeren Stand der Sonne in der zweiten Jahreshälfte bedingt ist und deren Intensität bei Bewölkung noch weiter reduziert wird. Spritzbeläge des CpGV werden zwar im Freiland größtenteils (zu 95%) sehr schnell innerhalb kurzer Zeit inaktiviert und damit unwirksam, dennoch ist zu berücksichtigen, dass ein gewisser Prozentsatz an Viren an geschützten Stellen im Boden, auf Blättern und Früchten durchaus längere Zeit persistieren kann, zumal Einschlusskörper sogar in Blattstomata einzudringen vermögen (Reed, 1971; siehe auch Kap. 3.1.6.1 Persistenz und horizontale Transmission im Freiland).

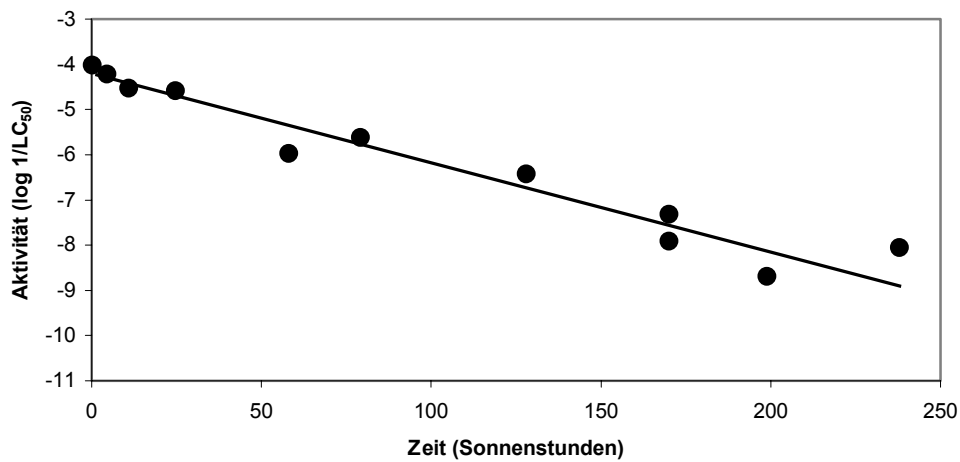


Abb. 3.2: Verlauf der Inaktivierung des CpGV im Freiland (nach Huber unveröffentlicht, 1982)

Tab. 3.5: Halbwertszeiten für das CpGV in Freilandversuchen 1981 und 1982 (Fritsch & Huber, 1989).

Versuch	Durchschnittliche Sonnenstunden	Höhe der Mittagssonne	Halbwertszeit Tage (Sonnenstunden)]
I 07.07.-03.08.81	3,7	62° - 57°	6,5 (20,0)
II 21.06. 20.07.82	6,9	63° - 60°	2,0 (14,3)

Parallel zu den Freiland-Untersuchungen über die horizontale Transmission (Kap. 3.1.6.2), wurde im Rahmen dieses Forschungsvorhabens ein Versuch zur UV-Inaktivierung in der ‚Braeburn‘-Parzelle der Versuchsanlage ‚Nussacker‘ der Staatlichen Lehr- und Forschungsanstalt, Neustadt/Weinstr. durchgeführt. Die ‚Braeburn‘-Parzelle wird in Abb. 3.7, Kap. 3.1.6.1 näher beschrieben. Am 12.06.01 fand eine einmalige Spritz-Applikation des CpGV-Insektizids, Granupom®, statt. Aufgrund von Laborversuchen (siehe Kap.



Abb. 3.3: Inkubation des Biotests.

3.1.6.1), wurde die Hypothese aufgestellt, dass sich viele Larven in der Stielgrube infizierten und das Virus dort möglicherweise weniger UV-Strahlung ausgesetzt war und dadurch länger aktiv blieb. Hierfür wurden ebenfalls am 12.06.01 bei 13 Bäumen in den unbehandelten Kontrollparzellen 2µl verdünntes Granupom® (Konzentration 2×10^4 OB/µl) in die Stielgrube punktuell appliziert. Um die verbleibende Aktivität des CpGV in einem Biotest zu bestimmen, wurden anschließend jeweils 50 Äpfel der beiden CpGV applizierten Gruppen und 50 Äpfel der unbehandelten Kontrolle zu zehn unterschiedlichen Zeitpunkten geerntet (siehe Tab. 3.6). Bis zur Durchführung des Biotests wurden die Äpfel bei 4°C gelagert. Für den Biotest wurde je eine Eilarve auf einen Apfel in einem verschließbaren Becher gesetzt (Abb. 3.3) und deren Mortalität nach drei Wochen bestimmt.

Tab. 3.6: Übersicht der Termine für die Probenentnahmen.

Zeitraum nach CpGV-Applikation am 12.06.01			
Datum, Uhrzeit	Σ Tage	Σ Sonnenstunden	Σ Gesamteinstrahlung
13.06.01, 18:00	1	23,5	14,8
15.06.01, 17:00	3	40,3	26,8
17.06.01, 19:00	5	55,2	38,0
19.06.01, 18:00	7	61,8	44,8
23.06.01, 18:00	11	105,4	72,8
27.06.01, 17:30	15	150,2	101,4
04.07.01, 18:30	22	204,7	138,4
11.07.01, 19:00	29	272,1	183,8
25.07.01, 16:30	43	389,5	263,9
29.08.01, 16:00	35	693,3	443,4

Beim gleichmäßig gespritzten Virus lässt sich eine deutliche Aktivitätsabnahme erkennen. Diese Aktivitätsabnahme wird durch folgende angepasste Gleichung beschrieben

$$y=76,1132*\exp(-0,013291*x).$$

Die berechnete Halbwertszeit liegt somit bei 52,2 Sonnenstunden und ist im Vergleich zu den bisherigen Arbeiten von Fritsch & Huber (1989) wesentlich höher (Tab. 3.5). Das zeigt, dass die unterschiedlichen Versuchsmethoden (sonnenexponierte Blattschei-

ben bei Fritsch & Huber, 1989 bzw. sonnenexponierte Äpfel in diesem Versuch) sehr abweichende Ergebnisse liefern.

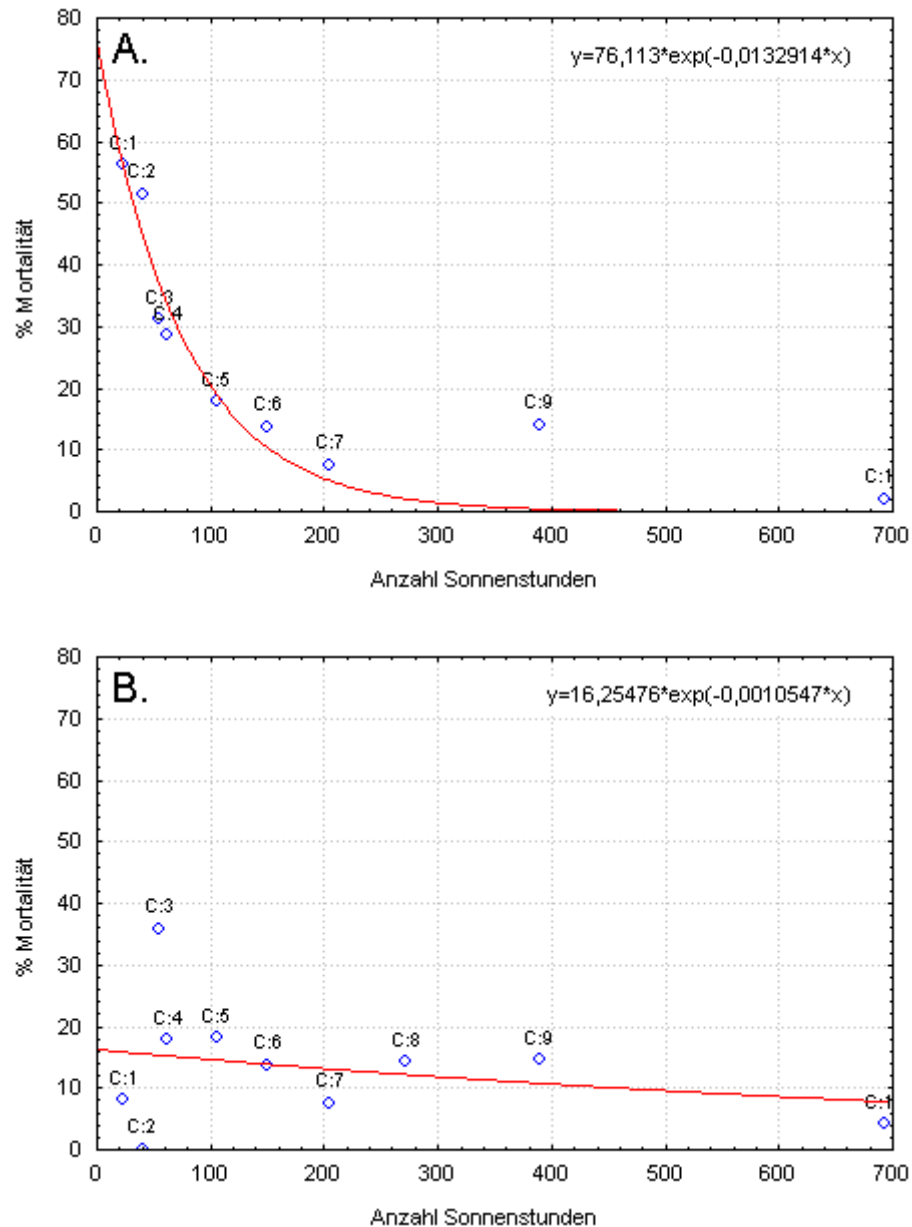


Abb. 3.4: UV-Inaktivierung von CpGV aus einem Freilandversuch. Das CpGV wurde entweder durch eine Spritzung gleichmäßig appliziert (A.) oder in die Stielgrube des Apfels aufgetragen (B.). Die im Biotest erhaltenen Mortalitäten wurden über die Abbott-Formel gegen eine Kontrolle korrigiert (Abbott, 1925); $n = 50$. Die hohe Mortalität des gleichmäßig gespritzten CpGV bei 272 Sonnenstunden (C8, entspricht 29% Mortalität) wurde als Ausreißer betrachtet und in der Auswertung nicht berücksichtigt. Für die Anpassungskurven wurde jeweils das gleiche Modell verwendet. Die erklärte Varianz des gleichmäßig verteilten CpGV (A.) liegt bei 89,0%, die des punktuell applizierten Virus (B.) liegt bei 7,8%.

Im Gegensatz zu dem gespritzten Virus, lässt sich bei dem punktuell in der Stielgrube aufgetragenem Virus keine exponentiell verlaufende Abnahme der Virusaktivität erkennen. Erwartet wurde, dass viele der Larven die Äpfel in der Nähe des Stielansatzes anfressen. Die Vermutung, dass CpGV in der Stielgrube weniger UV-Strahlung ausgesetzt wurde und länger aktiv blieb, konnte jedoch nicht eindeutig bestätigt werden, da sich relativ wenig Larven an dieser Stelle in den Apfel fraßen. Annäherungsweise nimmt die Inaktivierung einen eher linearen Verlauf. Verwendet man jedoch, wie in anderen Fällen, eine exponentielle Anpassung, dann ergibt sich eine Inaktivierungsrate von 0,001 und eine Halbwertszeit von 657,2 Sonnenstunden (Abb. 3.4 B.), was dennoch eine sehr geringe Abnahme der Virusaktivität in der Stielgrube andeutet.

3.1.6 Transmission

Obwohl das CpGV bereits seit mehreren Jahren im Obstbau erfolgreich angewendet wird, ist unbekannt, ob und wie sich das Virus in einer Insektenpopulation halten kann. Für den Apfelwickler ist das CpGV extrem pathogen, was auf eine horizontale Transmission schließen ließe. Hingegen spricht die eher solitäre Lebensweise und das saisonale Auftreten des Apfelwicklers mehr für eine vertikale Transmission des CpGVs. Um die Dynamik des CpGVs modellieren zu können, sind qualitative und quantitative Kenntnisse über beide mögliche Übertragungsstrategien notwendig.

3.1.6.1 Horizontale Transmission CpGV

Die horizontale Übertragung einer Baculovirus-Infektion setzt voraus, dass eine Larve auf einen an einer Virose gestorbenen Larvenkadaver trifft. Denkbar wäre auch, dass aus Larvenkadavern freigesetzte Viren durch andere Insekten oder auch Vögel verteilt würden (Entwistle *et al.*, 1977, Entwistle *et al.*, 1993 Vasconcelos *et al.*, 1996) und somit das Infektionspotential erhöhen würden, doch sind diese Ansätze nur sehr schwierig quantifizierbar. Apfelwickler-Eier werden einzeln abgelegt und es entwickelt sich in der Regel nur eine Larve pro Apfel. Die Wahrscheinlichkeit, dass sich zwei Larven bege-

nen scheint, rein flächenmäßig betrachtet, äußerst gering. Hinzu kommt, dass im Herbst Laub und Äpfel abfallen bzw. geerntet werden und sich das Virus, außer in Borkenritzen, nicht bis zur nächsten Saison auf dem Baum halten kann. Wegen dieser Überlegung wurde die horizontale Transmission für das CpGV bisher weitgehend ignoriert.

Um quantitative Aussagen über die Wahrscheinlichkeit der horizontalen Transmission des CpGV treffen zu können, wurden gezielte Experimente in einem Modellsystem mit "losen" Äpfeln und im Freiland durchgeführt. Im Modellsystem wurden Szenarien der möglichen horizontalen Transmission unter definierten Bedingungen getestet. Verwendet wurden Larven im L1-Stadium, da für diese die größte Wahrscheinlichkeit einer Begegnung angenommen wurde. In der Regel machen sich frisch geschlüpfte Eilarven sofort auf die Suche nach einem Apfel. An einer geeigneten Stelle bohren sie sich schnell in den Apfel ein, weshalb sie sich nur sehr kurze Zeit auf der Apfeloberfläche befinden. Junge Larven, die sich außerhalb des Apfels infizieren, sterben entweder an oder direkt unter der Oberfläche und hinterlassen dort bis zu 9×10^8 OB. Da sich ältere Larvenstadien im Kerngehäuse territorial verhalten, tragen die wenigen Apfelwickler, die erst in späteren Stadien an der Virose erkranken, wahrscheinlich nicht zu einer horizontalen Übertragung bei. Für eine horizontale Transmission auf der Oberfläche spricht zudem eine größere Wahrscheinlichkeit, dass ein weiblicher Falter ein weiteres Ei auf oder in der Nähe eines Apfels ablegt, wenn sich auf dem Apfel nur ein oberflächlicher, abgestoppter Fraß befindet.

Experimentelle Infektionsrate: Einfluss der Virusverteilung

Ausgangspunkt für die Modellversuche zur horizontalen Transmission war die Annahme, dass die Infektionswahrscheinlichkeit von der Verteilung der Viren abhängig ist. Aus diesem Grund wurde eine Serie von Experimenten durchgeführt, in der unterschiedlich große Flächen korrespondierend der produzierten Virusmenge einer Eilarve auf Äpfel appliziert wurden. Die gleiche Virusmenge wurde jeweils (1) auf einem punktuellen Fleck, (2) auf einer kreisförmigen Fläche von 7cm^2 und (3) auf dem gesamten Apfel aufgetragen. Der Virusfleck sollte einen an einer Virose gestobenen Larvenkadaver imitieren, die kleine Fläche die gleichen Virusnachkommen, die durch Regen ver-

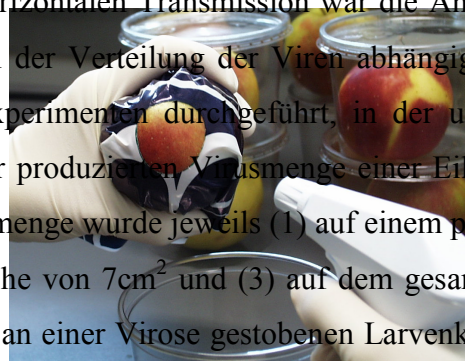


Abb. 3.5: CpGV-Applikation auf einer Fläche von 7cm^2 .

teilt wurden und die vollständige Benetzung eine Spritzbehandlung. Um festzustellen, ob die Virusmenge ebenfalls einen Einfluss auf die Infektionswahrscheinlichkeit hat, wurden die Modellapplikationen mit jeweils drei verschiedenen Viruskonzentrationen durchgeführt (siehe Abb. 3.6). Nachdem das Virus angetrocknet war, wurde jeweils eine frischgeschlüpfte *C. pomonella*-Eilarve auf einen Apfel gesetzt. Die Auswertung der Mortalitäten erfolgte nach drei Wochen, einem Zeitraum, in dem sich nicht infizierte Larven bis zum L5-Stadium entwickelt hatten, wodurch das Wiederfinden der Überlebenden erleichtert wurde.

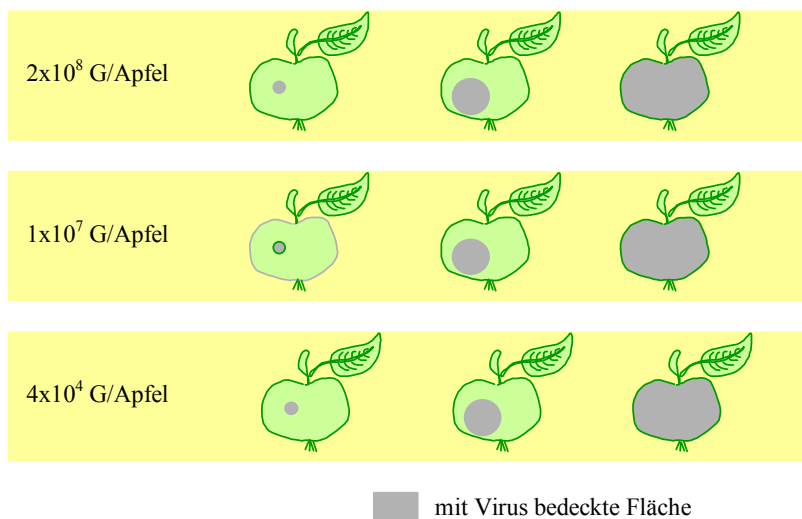


Abb. 3.6: Schematischer Versuchsaufbau.

Diese Versuchsreihe wurde mit Äpfeln der Sorte 'Elstar' durchgeführt und zeigte, dass punktuell aufgetragenes Virus nur eine sehr geringe, vernachlässigbare Mortalität hervorruft (Abb. 3.7). Die kleine Virusfläche hatte insbesondere bei der höchsten Konzentration eine erkennbar höhere Mortalität als die Virusflecken. Wie erwartet, war die Mortalität bei der kompletten Benetzung eindeutig am höchsten. Dabei stellte sich heraus, dass sowohl bei der kleinen Fläche als auch bei der kompletten Benetzung ein Unterschied in der Mortalität in Abhängigkeit von den applizierten Virusmengen erkennbar

war. Als weiteres Ergebnis dieses Versuches konnte gezeigt werden, dass die Häufigkeitsverteilung der Fraßstellen nicht mit dem jeweiligen Flächenanteil der Apfeloberfläche korrelierte (Abb. 3.9, Tab. 3.7). Vielmehr hatten die Larven bevorzugte Fraßstellen auf der Oberfläche. Obwohl bezüglich der Fraßstellenpräferenz zum Teil deutliche Unterschiede zwischen den vier verglichenen Sorten beobachtet werden konnte, war bei allen Sorten der Stielansatz derjenige Ort mit der anteilig höchsten Präferenz. Im Bereich des Stielansatzes, der weniger als 1% der Oberfläche des Apfels einnimmt, fraßen je nach Sorte 25-63% der Larven an (Tab. 3.7)

Bevorzugte Fraßstellen wurden auch von anderen Autoren beobachtet. Zum Beispiel beobachtete Geier (1963) in Australien, dass 18% der 'Granny Smith' Äpfel am Stiel angefressen wurden. Hingegen stellten Coutin (1959) in Frankreich bei der Sorte 'Reinette du Canada' und Glen & Clark (1985) in Großbritannien bei der Sorte 'Cox's Orange Pippin' einen bevorzugten Fraß im Kelch fest. Audemard (1976) bemerkte außerdem, dass Larven die Äpfel nicht nur bevorzugt im Stielansatz und Kelch anfressen, sondern häufig auch an Stellen, an denen sich zwei Früchte oder ein Blatt oder Zweig und eine Frucht sich berühren. Diese Unebenheiten auf der Apfeloberfläche erleichtern den Larven den Eintritt (Putman, 1963). Durch sie könnten auch viele der Fraßstellen die im Freiland auf der Seite des Apfels auftreten als sehr kleine definierte Stellen gelten.

Wie schon Audemard (1976) feststellte, hängt die Fraßstellen-Präferenz mit der Apfelsorte, den Witterungsbedingungen und möglicherweise auch anderen Faktoren zusammen. In den Modellversuchen wurden ausschließlich reife Äpfel verwendet, während im Freiland bereits sehr junge Äpfel für eine horizontale Transmission relevant wären. Es ist dabei nicht auszuschließen, dass das Reifestadium ebenfalls das Verhalten der Larven beeinflusst und die Larven im Feld den Apfel woanders anfressen. Außerdem wurde in den Modellversuchen beobachtet, dass ein Teil der Larven den Apfel dort anfraß, wo der Apfel im apikalen Bereich auf dem Becherboden auflag. Dieses stimmt mit Beobachtungen von Audemard (1976) überein, nach denen sich Larven auch häufig an Berührungspunkten zwischen zwei Äpfeln oder einem Blatt und einem Apfel in den

Apfel bohrten. Obwohl ein geringer Teil der Fraßstellen im apikalen Bereich ein Artefakt darstellen könnte, wurden sie nicht weiter berücksichtigt, da für den Modellversuch die Fraßstellen im Stielansatz die größte Bedeutung haben. Zudem wurde in einem Vergleich zwischen hängenden und aufliegenden Äpfeln kein Unterschied in dem Anteil der Fraßstellen im apikalen Bereich festgestellt (Winstanley, pers. Mitt.).

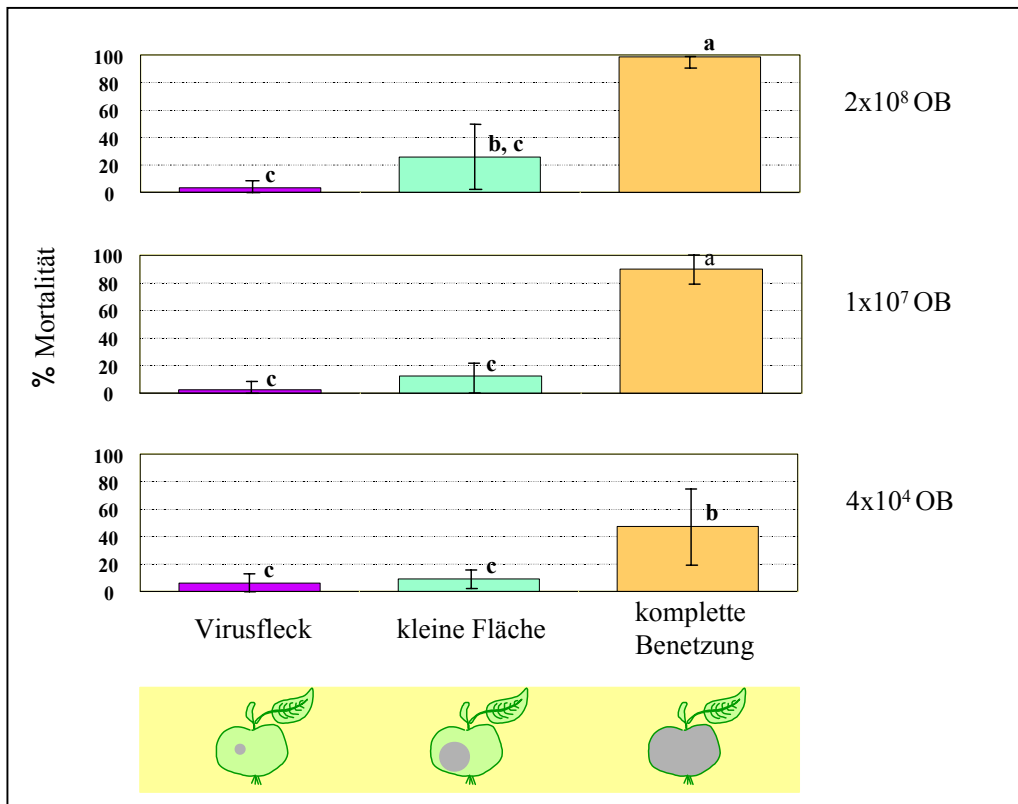


Abb. 3.7: Prozentuale Mortalität in Biotests mit oberflächlich aufgetragenem CpGV. In diesem Versuch wurden verschiedene Virusmengen punktuell, auf eine 7cm² Fläche oder auf die gesamten Apfeloberfläche aufgetragen. Die Versuchsmortalitäten wurden gegen die Mortalität der unbehandelten Kontrollen nach Abbott (1925) korrigiert und einer Varianzanalyse unterworfen. Gleiche Buchstaben unterscheiden sich bei einer Wahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ nicht voneinander; $n=20$ je Versuchsglied; 4 Wiederholungen.

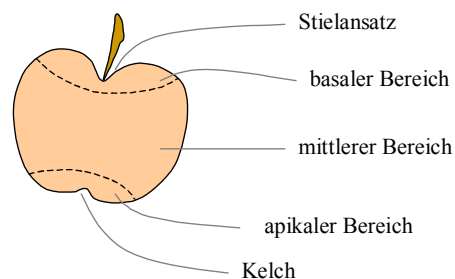


Abb. 3.8: Um die Einbohrstellen zu charakterisieren, wurden Äpfel in fünf Bereiche unterteilt.

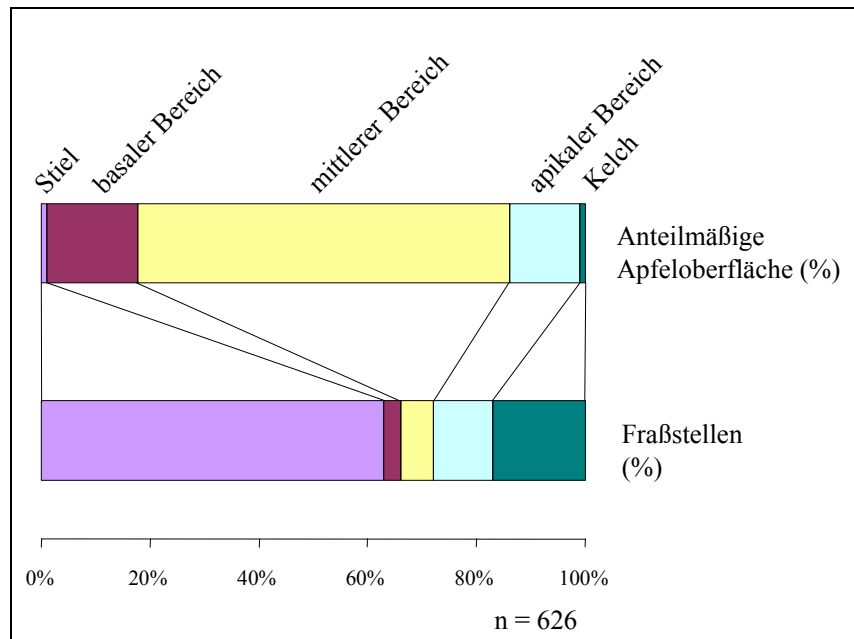


Abb. 3.9: Fraßstellenanteil (%) im Vergleich zu der dazugehörigen anteilmäßigen Apfeloberfläche. Dargestellt am Beispiel der Sorte ‚Elstar‘.

Tab. 3.7: Fraßstellenanteil (%) im Vergleich zu der dazugehörigen anteilmäßigen Apfeloberfläche. Die bevorzugten Fraßorte unterscheiden sich bei verschiedenen Sorten.

Fraßort	Flächen- anteil (%)	Elstar	Jonagold	Braeburn	HER123T
Stielansatz	<1	62,6	37,4	36,6	25,3
basaler Bereich	~17	3,2	2,6	6,6	10,9
mittlerer Bereich	~70	6,2	20,0	13,2	30,8
apikaler Bereich	~13	10,9	21,0	23,1	17,2
Kelch	<1	2,1	3,1	8,8	7,7
unbekannt		15,0	15,9	12,1	8,1
		n=626	n=195	n= 91	n=221

Experimentelle Infektionsrate: Einfluss der Lage des Virus

Aus der im Modellsystem beobachteten Fraßstellenpräferenz der *C. pomonella*-Larven konnte *a posteriori* die Hypothese aufgestellt werden, dass eine Nichtgleichverteilung der bevorzugten Fraßstellen am Apfel die Wahrscheinlichkeitsverteilung möglicher Kontakte zwischen Larven und simulierten Larvenkadavern auf der Apfeloberfläche

beeinflusst. Denn für das Zusammentreffen einer sich in den Apfel einbohrenden, nicht infizierten Larve und eines Virusflecks (bzw. einer an einer Virose gestorbenen Larve) macht es einen Unterschied, ob deren Häufigkeitsverteilung über die Apfeloberfläche gleich verteilt oder aufgrund biologischer Präferenzen an bestimmten Stellen, wie z.B. den Stielansatz, besonders hoch ist.

Um eine mögliche Abhängigkeit zwischen der Lage eines Virusflecks (bzw. einer toten Larve) und der Infektionsrate zu prüfen, wurde Virus in der Nähe des Stielansatzes punktuell aufgetragen. Wegen der hohen Virulenz des CpGV wurde auch bei diesem Experiment nicht erwartet, dass die Virusmenge Auswirkungen auf die Infektionswahrscheinlichkeit hat. Um diese Annahme dennoch zu testen, wurden wiederum verschiedene Virusmengen verwendet. Ähnlich wie im bereits beschriebenen Versuch, wurden nach Antrocknen der Virussuspension Eilarven auf die Äpfel gesetzt. Äpfel in der Kontrolle blieben unbehandelt. Die Anzahl der überlebenden Larven wurde nach drei Wochen festgestellt. Die Ergebnisse sind in Tab. 3.8 aufgeführt und zeigen, dass sich die Mortalitäten für die verschiedenen Virusmengen nicht voneinander unterscheiden. Für einen Vergleich mit den Mortalitäten, die im vorangegangenen Versuch bei einem seitlichen Virusfleck entstanden, wurden deshalb jeweils die drei verschiedenen Virusmengen zusammengefasst und anschließend einem Wilcoxon-Rang-Test unterworfen. Dabei konnte ein hoch signifikanter Unterschied ($p < 0,001$) zwischen den Mortalitäten, die durch einen Virusfleck im mittleren Bereich (Abb. 3.7) bzw. im Stielansatz (Tab. 3.8) festgestellt werden.

Tab. 3.8: Einfluss der Lage des Virusflecks auf die Mortalität von Eilarven von *C. pomonella*. Die in 3-4 Versuchswiederholungen mit jeweils 18-20 Äpfeln erhaltenen Mortalitäten wurden nach Abbott (1925) korrigiert.

Virusfleck		Mortalität±S.D. (%)
Menge	Lage	
4×10^4 OB	Stiel	$37,4 \pm 13,9$
1×10^7 OB	Stiel	$48,6 \pm 9,6$
2×10^8 OB	Stiel	$33,3 \pm 19,9$

Experimentelle Infektionsrate: Larvenkadaver als Inokulum

Die einfachen, aber sehr effizienten Versuche hatten gezeigt, dass sich in Abhängigkeit von der Lage des Virusflecks Larven mit hoher Wahrscheinlichkeit infizieren können. Vorausgesetzt die virösen Larven sterben in der Nähe ihres Bohrlochs, dann würde die beobachtete Fraßstellenpräferenz somit auch die Wahrscheinlichkeit der horizontalen Transmission erhöhen, da davon ausgegangen werden kann, dass eine nicht infizierte Larve an einer bevorzugten Fraßstelle mit höherer Wahrscheinlichkeit auf einen Larvenkadaver trifft als an jedem anderen Ort auf der Apfeloberfläche.

Um diese Hypothese zu testen, wurden in einem weiteren Versuch frisch geschlüpfte Eilarven mit einer sehr hohen Dosis CpGV (LD 99,9; 5000 OB/Larve) mittels der *droplet-feeding*-Methode infiziert. Die frisch infizierten Larven wurden dann auf einen losen Apfel gesetzt und 7 Tage lang bei Raumtemperatur gehalten. Da sich die Larven noch bis zu ihrem Tod in den Apfel fraßen, befand sich das freigesetzte Virus nicht unmittelbar an der Oberfläche wie in den bisherigen Versuchen. Der Versuch wurde in zwei Versuchsgruppen mit unterschiedlicher Dichte an infizierten Larven und eine unbehandelte Kontrolle gegliedert. Um die Transmissionsrate zu bestimmen, wurde nach 7 Tagen (zu diesem Zeitpunkt waren alle infizierten Larven tot) jeweils eine gesunde Larve auf einen Apfel gesetzt und drei Wochen später deren Mortalitätsrate bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tab. 3.9 dargestellt. Je nach Anzahl der primär infizierten Larven schwankte die Mortalität der Sekundärinfizierten zwischen 40-75%. Die relativ hohe Mortalitäts- bzw. horizontale Transmissionsrate lässt sich durch die bevorzugten Fraßstellen erklären, durch die die Wahrscheinlichkeit, auf eine sehr kleine definierte Stelle zu treffen, hoch ist.

Auf der Basis dieses Ergebnisses, wurde ein ähnlicher Versuch an losen Äpfeln durchgeführt, bei dem jedoch eine 20fach niedrigere Dosis für die Primärinfektion gewählt wurde. Wie in Kap. 3.1.4 gezeigt wurde, starben Larven bei einer niedrigeren Infektionsdosis langsamer und produzierten mehr Virusnachkommen. Der folgende Versuchsansatz hatte zum Ziel, festzustellen, wie sich die Transmissionsrate ändert, wenn die an einer Virose gestorbenen Larven mit einer geringeren Dosis infiziert wurden. Frischge-

schlüpfte Eilarven wurden mit einer niedrigeren Dosis (LD_{99} ; 250 OB / Larve) mittels der *droplet-feeding*-Methode infiziert. In diesem Versuch wurden die Eilarven nach der Inokulation mit Wasser gespült um eine äußere Virus-Kontamination der Larven zu vermeiden. Eine oder drei inokulierte Larven wurden auf Äpfel gesetzt und 7 Tage bei Raumtemperatur gehalten. Anschließend wurde wieder je eine gesunde Eilarve auf die Äpfel gesetzt und deren Mortalität nach drei Wochen bestimmt.

Tab. 3.9: Horizontale Transmission auf losen Äpfeln in Abhängigkeit der unterschiedlichen Infektionsdosen und der Anzahl an primär infizierten Larven. Die Prozent Mortalitäten und Standardabweichungen beziehen sich auf eine Stichprobe von 20 Äpfeln mit jeweils 4 Wiederholungen. Die Mortalitäten wurden nach der Abbott-Formel mit den Mortalitäten in der unbehandelten Kontrolle korrigiert (Abbott, 1925). Verwendet wurden Äpfel der Sorte 'Braeburn' (alle 4 Wdh. bei einer Kadaverinfektionsdosis von 5000 OB sowie eine Wdh. bei einer Kadaverinfektionsdosis von 250 OB) und HER123T-Äpfel (3 Wdh. bei einer Kadaverinfektionsdosis von 250 OB).

Kadaverdichte (pro Apfel)	Prozent Mortalität	
	Kadaverinfektionsdosis	
	5000 OB	250 OB
1	40,3±7,5	42,7±6,9
3	74,8±18,1	56,9±10,1
	n=18-20	n=16-20

Die Versuchsserien haben gezeigt, dass eine horizontale Transmission stattfinden kann. In den Versuchen, in denen ein Virusfleck korrespondierend der produzierten Virusmenge einer Eilarve seitlich auf den Apfel appliziert wurde, war unter den aufgesetzten Apfelwicklerlarven lediglich eine sehr geringe Mortalität von 3,5-4,7% zu beobachten. Wurde jedoch ein Virusfleck im Stielansatz appliziert, so erhöhte sich diese Mortalität auf 33,3-48,6%. Das zeigt einerseits, dass die Mortalität stark vom dem Ort des applizierten Virusflecks abhängig ist und andererseits, wie das Verhalten der Larven, genauer gesagt die bevorzugten Fraßstellen, eine horizontale Transmission zulassen. Nur so konnte eine hohe horizontale Transmission von über 40% erreicht werden.

Obwohl bekannt ist, dass die Dichte von *C. pomonella* relativ gering ist, weil sich meist nur eine Larve pro Apfel entwickelt, so wurde doch gelegentlich beobachtet, dass sich auch zwei oder drei Larven pro Apfel entwickelten. Dies geschieht besonders dann, wenn sich diese Larven nicht gleichzeitig im Apfel befinden (Garlick, 1948). Vorstellbar wäre auch, dass weibliche Falter, vor allem bei einem abgestoppten Fraß ein weiteres Ei auf einen Apfel legen. So wurden beispielsweise ein oder mehrere Eier auf einem Apfel beobachtet, der bereits eine junge Larve enthielt (Washburn, 1893). In diesem Zusammenhang wäre es wichtig zu wissen, inwieweit Pheromone und vom Apfel abgesonderte flüchtige Bestandteile das Verhalten der weiblichen Falter bei der Eiablage beeinflussen. Untersuchungen hatten gezeigt, dass Äpfel in den ersten drei Tagen nach einem Befall größere Mengen Aldehyde und das Terpene α -Farnesen absondern. Die Mengen der abgesonderten Substanzen werden in den nächsten Tagen wieder reduziert, bis nach 9-21 Tagen kein Unterschied zu unbefallenen Äpfeln feststellbar ist (Hern & Dorn, 2001). Auch haben Wearing & Hutchins (1973) festgestellt, dass α -Farnesen die Eiablage der Weibchen stimuliert. Zudem haben Landolt *et al.* (2000) beobachtet, dass sogar die Eilarven von befallenen Äpfeln, genauer gesagt vom (*E, E*)- α -Farnesen in den Äpfeln, angelockt werden. Diese Beispiele zeigen, dass im Freiland eine horizontale Transmission durchaus durch weitere Faktoren begünstigt werden könnte.

Aus der Praxis ist bekannt, dass das CpGV als Bio-Insektizid auch bei relativ unregelmäßiger Spritzung geringerer Dosen erstaunlich effektiv ist (Kienzle *et al.*, 2001a). Die beschriebenen Modellexperimente deuten darauf hin, dass die horizontale Transmission eine zusätzliche Komponente der Wirksamkeit vom CpGV darstellen könnte (siehe auch Kap. 3.1.6.2).

3.1.6.2 Persistenz und horizontale Transmission im Freilandversuch

Nachdem unter den gewählten Bedingungen in den Modellversuchen im Labor eine hohe Wahrscheinlichkeit für eine horizontale Transmission nachgewiesen werden konnte, sollte ein Freilandversuch klären, ob eine solche Erreger-Übertragung auch im Freiland stattfinden kann. Außerdem war aus einem Vorversuch bekannt, dass sich ältere

Larvenstadien, die sich bereits im Apfel befanden, mit oberflächlich appliziertem Virus infizieren können. Auch diese Annahme wurde im Freiland getestet. Parallel dazu wurde ein UV-Versuch durchgeführt, der im Kap. 3.1.5 beschrieben wird. Als letztes Ziel sollten die erhobenen Daten dieses Freilandversuches zur Modellverifizierung herangezogen werden.

Ausgewählt wurde eine Parzelle mit 320 Bäumen der Sorte 'Braeburn' in der Versuchsanlage „Nussacker“ der Staatlichen Lehr- und Forschungsanstalt in Neustadt/Weinstr., die im vorigen Jahr einen geringen Apfelwicklerdruck von 3% hatte (Abb. 3.11). Da während des Versuchs bis auf eine einzige CpGV-Behandlung auf Insektizidbehandlungen verzichtet werden musste, wurde der natürlich vorkommende Apfelwicklerbefall weitestgehend durch die Verwirrungstechnik unterdrückt. Für die Verwirrungstechnik wurden Pheromondispenser mit dem Lockstoff der Apfelwicklerweibchen (RAK 3, BASF) ausgebracht, um die Paarung der Apfelwickler zu unterbinden. Der zeitliche Ablauf des Versuchs ist in Tab. 3.10 schematisch dargestellt. Das handelsübliche CpGV-Insektizid Granupom® wurde einmalig in der vom Hersteller empfohlenen Menge ($2,1 \times 10^{13}$ OB pro ha) ausgebracht. Am darauf folgenden Tag wurden über 2000 Apfelwicklereilarven (Fa. Andermatt Biocontrol, Schweiz) mit Pinseln auf Äpfel gebracht. Dabei wurde auf jeden Apfel eines Baumes eine Eilarve gesetzt. Bestückte Äpfel wurden mit einem kleinen farbigen

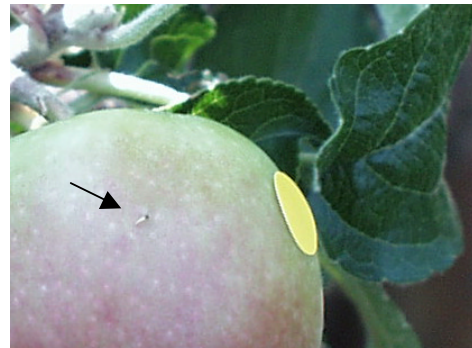


Abb. 3.10: Frisch applizierte Eilarve; ca. 1,5mal vergrößert.

Aufkleber markiert (Abb. 3.10). Über 1600 Larven der zweiten Larvencharge wurde in der gleichen Weise nach 27 Tagen (entsprach 254 Sonnenstunden) auf die Äpfel gesetzt. Die Erntezeitpunkte wurden so gewählt, dass sich ein großer Teil der überlebenden Larven im L5-Stadium befand. Die Äpfel wurden bei der Ernte individuell eingetütet, um zu verhindern, dass Larven entkommen konnten, und anschließend bis zur Auswertung bei 4°C gelagert. Um auch Larven zu erfassen, die sich schneller entwickelt hatten, wurden vor den Ernteterminen Wellpappringe an den Baumstämmen angebracht

und kurze Zeit nach der Ernte wieder entfernt. Bei der Auswertung wurden die Anzahl der lebenden und toten Larven, ihr Stadium und der Schaden bonitiert. Beim Schaden wurden drei Stufen unterschieden: oberflächlicher Schalenfraß, etwas tieferer Fraß (ab 5 mm, aber nicht bis zum Kern) und das Vordringen zum Kerngehäuse (Kernfraß).

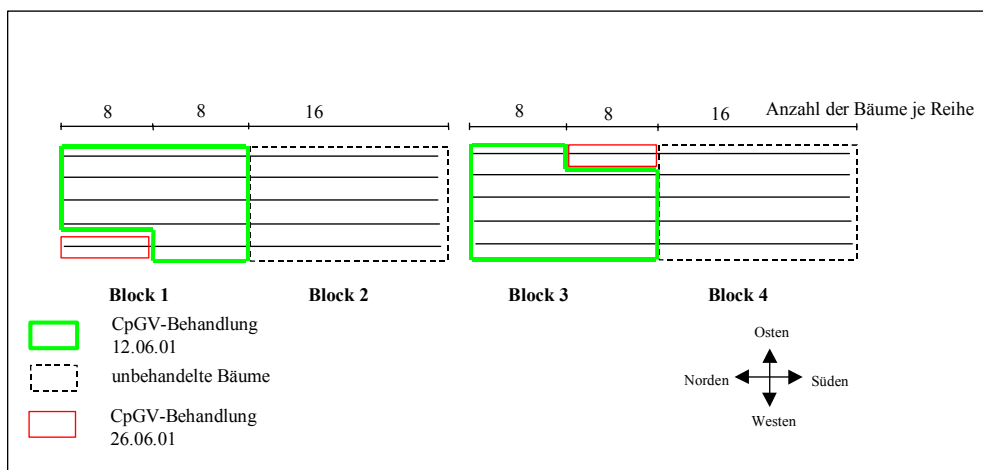


Abb. 3.11: Übersicht des Versuchsfeldes im „Nussacker“ der SLFA, Neustadt/Weinstr. Das Versuchsfeld bestand aus 5 Reihen mit je 64 Apfelbäumen der Sorte `Braeburn` (M9 Unterlage, 1997). Das Feld wurde in 4 Blocks unterteilt, in denen die Bäume der jeweiligen Gruppen zufällig ausgewählt wurden. Block 1 und 3 wurden mit Ausnahme von jeweils 8 Bäumen am 12.06.01 mit CpGV in der vom Hersteller empfohlenen Menge mit 3,8 bar bei 6 km/h und 5 Düsen des Typs DG 8003 VS ausgebracht (Schlachtnner Druckluft und Holder Gebläse). Block 2 und 4 blieben unbehandelt. Die 16 ausgesparten Bäume in Block 1 und 3 wurden am 26.06.01 mit CpGV behandelt. Weitere Erklärungen befinden sich im Text.

Der Versuchsaufbau setzte sich aus zwei getrennten Versuchen zusammen und ist in Tab. 3.10 dargestellt. Versuch 1 (Wirkung auf ältere Larvenstadien) sollte beantworten, ob sich ältere Larvenstadien, die sich bereits in den Apfel eingefressen haben, mit gespritztem CpGV infizieren können. In diesem Versuch wurden die überlebenden Larven bzw. der Schaden an den Äpfeln untersucht, die entweder einen Tag vor dem Ausbringen der Larve (*CpGV-I*) bzw. zwei Wochen nach dem Ausbringen der Larven (*VI-ÄL*) mit einem handelsüblichen CpGV-Insektizid (Granupom®) gespritzt wurden. Als Kontrolle diente eine unbehandelte Parzelle (Kontrolle-1) (Abb. 3.11).

In Versuch 2 (Horizontale Transmission im Freiland) sollte die horizontale Transmission unter Feldbedingungen quantifiziert werden. Hierzu wurden ein Tag nach CpGV-Applikation L1-Larven auf die Äpfel gesetzt. Nach einem Zeitraum von vier Wochen, während dem sich die L1-Larven infizieren und sterben konnten und während dem entsprechend dem damaligen Kenntnisstand (vgl. Kap. 3.1.5) ausreichend Sonnenstrahlung herrschte, um das ursprünglich applizierte CpGV zu 99,9996% zu inaktivieren, wurde eine zweite Charge von Apfelwicklerlarven auf die Äpfel gesetzt (*V2-HT*). Die zweite Larvencharge sollte sich daher nur an den neu produzierten Viren, nicht jedoch an der ursprünglichen CpGV-Applikation infizieren. Als Kontrollen zu diesem Versuch dienten (1) eine Variante *CpGV-2* zur Überprüfung der tatsächlich stattgefundenen UV-Inaktivierung, bei der die Restaktivität des CpGV nach vier Wochen bestimmt wurde, (2) die *Kontrollen-1* und *-2*, in denen die Überlebensraten bzw. der Schaden der jeweiligen unbehandelten Larvenchargen bestimmt wurden und (3) Variante *CpGV-1*, aus der der Schaden durch die behandelte erste Larvencharge abgegrenzt werden konnte.

Mit der Gruppe *Hintergrund-Cp* sollte etabliert werden, wie hoch der natürliche Apfelwicklerdruck während des Versuchs war.

Für die Auswertung der Daten wurden die Prozent überlebenden Larven und die Prozent Kernfraß über die Anzahl der Äpfel errechnet, um einen subjektiven Fehler beim Bonitieren der oberflächlichen Fraßstellen auszuschließen. Die Bonitierung wurde in einer randomisierten Form durchgeführt, wobei die Bonituroshelfer weder Herkunft noch Inhalt der Versuchsglieder kannten. Die statistische Auswertung erfolgte über eine Varianzanalyse bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$.

Tab. 3.10: Schema und Zeitplan zum Versuchsaufbau im Freiland. Es wurden zwei Versuche *Infektion älterer Larvenstadien* und *Horizontale Transmission* parallel durchgeführt. Die Tabelle gibt die Daten für die jeweiligen CpGV-Behandlungen (CpGV) und Larvenapplikationen wieder (L1). Bei der Gruppe V1-ÄL (Versuch 1- ältere Larven) handelt es sich um die Versuchsgruppe des Versuchs 1, bei dem die CpGV-Behandlung zwei Wochen nach der Larvenapplikation stattfand. Verglichen wurden die Überlebensraten nach Ernten der Äpfel mit einer Gruppe in der die Larvenapplikation nach der CpGV-Behandlung stattfand (CpGV-1) und einer unbehandelten Kontrolle (Kontrolle-1). Bei der Gruppe V2-HT handelt es sich um die Versuchsgruppe des Versuchs 2, bei der sich die Larven der 2. Larvenapplikation an den Kadavern der 1. Larvenapplikation infizieren sollten. Auch hier wurden die Überlebensraten mit einer unbehandelten Kontrolle (Kontrolle-2) und einer weiteren Gruppen verglichen, um festzustellen, ob von der 4 Wochen zuvor erfolgten CpGV-Behandlung noch Restaktivität vorhanden war (CpGV-2).

	Infektion älterer Stadien -Versuch 1-			Horizontale Transmission -Versuch 2-			
Datum	V1-ÄL	CpGV-1	Kontrolle-1	V2-HT	CpGV-2	Kontrolle-2	Hintergrund-Cp
12.06.01	—	CpGV	—	CpGV	CpGV	—	—
13.06.01	L1	L1	L1	L1	—	—	—
26.06.01	CpGV	—	—	—	—	—	—
09.07.01	—	—	—	L1	L1	L1	—
12.-13.07.01	ernten	ernten	ernten	—	—	—	ernten
02.08.01				ernten	ernten	ernten	ernten

Versuch 1: Wirkung des CpGV auf ältere Larvenstadien

Viele Larven bringen ihren Kot aus dem Tunnel nach draußen und könnten so auch in späteren Stadien mit dem gespritzten Virus in Kontakt kommen. Um diese Hypothese zu testen, wurden Bäume der Gruppe *V1-ÄL*, erst nachdem sich die Larven zwei Wochen lang in die Äpfel gefressen hatten, mit CpGV behandelt. Im Versuch war die Mortalität in dieser Gruppe (*V1-ÄL*) ebenso hoch wie in der Gruppe *CpGV-1*, bei der die L1-Larven mit CpGV behandelt waren (Abb. 3.13; bei $p < 0,05$ kein signifikanter Unterschied zwischen diesen beiden Gruppen in einer Varianzanalyse der mittleren Überlebensraten feststellbar). Dies bedeutet, dass das CpGV auch auf ältere Larven, die sich bereits innerhalb des Apfels befanden, eine Wirkung hatte. Dagegen gab es bzgl. des Schadens, ausgedrückt als Anteil der Äpfel mit Kernfraß, einen deutlichen Unterschied zwischen den beiden Gruppen *V1-ÄL* und *CpGV-1* (Abb. 3.14). Hier war der Kernfraß bei den älteren behan-



Abb. 3.12: Virustote *C. pomonella* Larve im L5-Stadium.

delten Larven signifikant ($p < 0,05$) größer als bei den behandelten L1-Larven. Im Vergleich zu der unbehandelten *Kontrolle-I*, gibt es eine Tendenz, dass dieser Schaden etwas geringer ausfiel, doch war das statistisch nicht signifikant. Das bedeutet, dass die Population älterer Larvenstadien durch eine CpGV-Applikation in gleichem Masse reduziert wurde wie die L1-Larven, dass der Schaden aber fast so groß war wie auf unbehandelten Flächen. Abb. 3.12 zeigt dies exemplarisch: eine Larve stirbt im L5-Stadium an der Virusinfektion, hinterlässt aber einen unbrauchbaren Apfel.

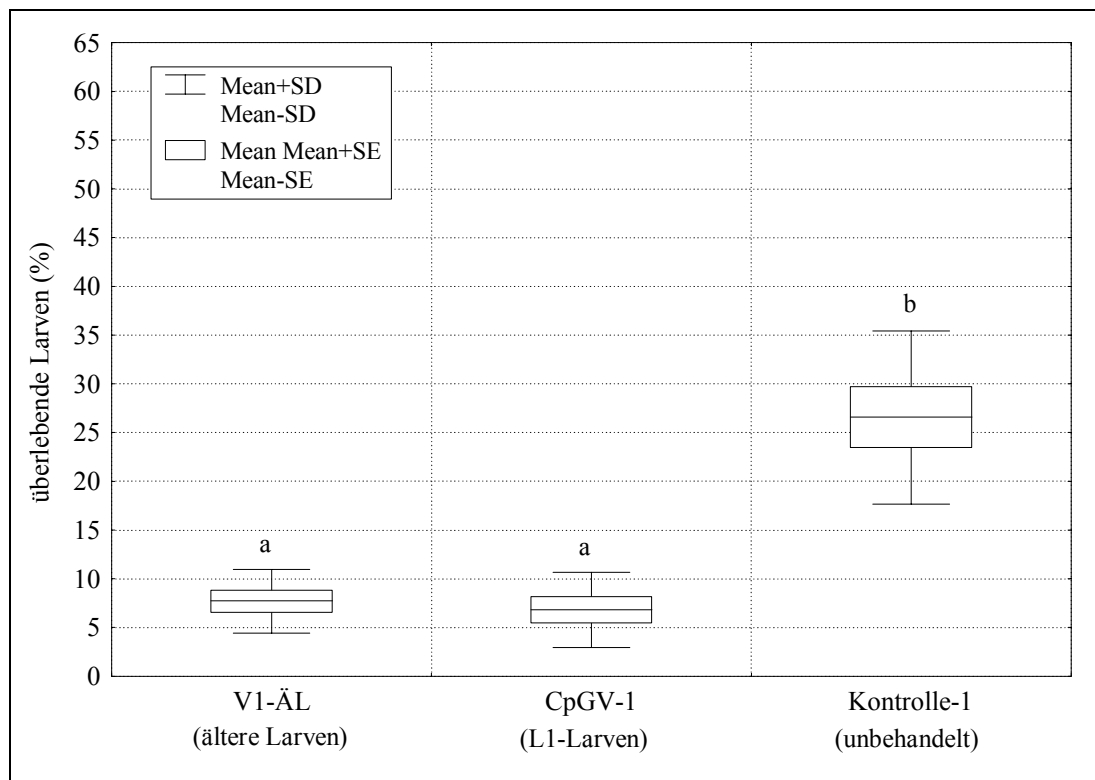


Abb. 3.13: Die Wirkung von CpGV auf L1- und auf ältere Larven. Dargestellt sind Mittelwerte der Prozent überlebender Larven ($n=8$ Bäume). Gleiche Buchstaben unterscheiden sich nicht signifikant voneinander ($p > 0,05$).

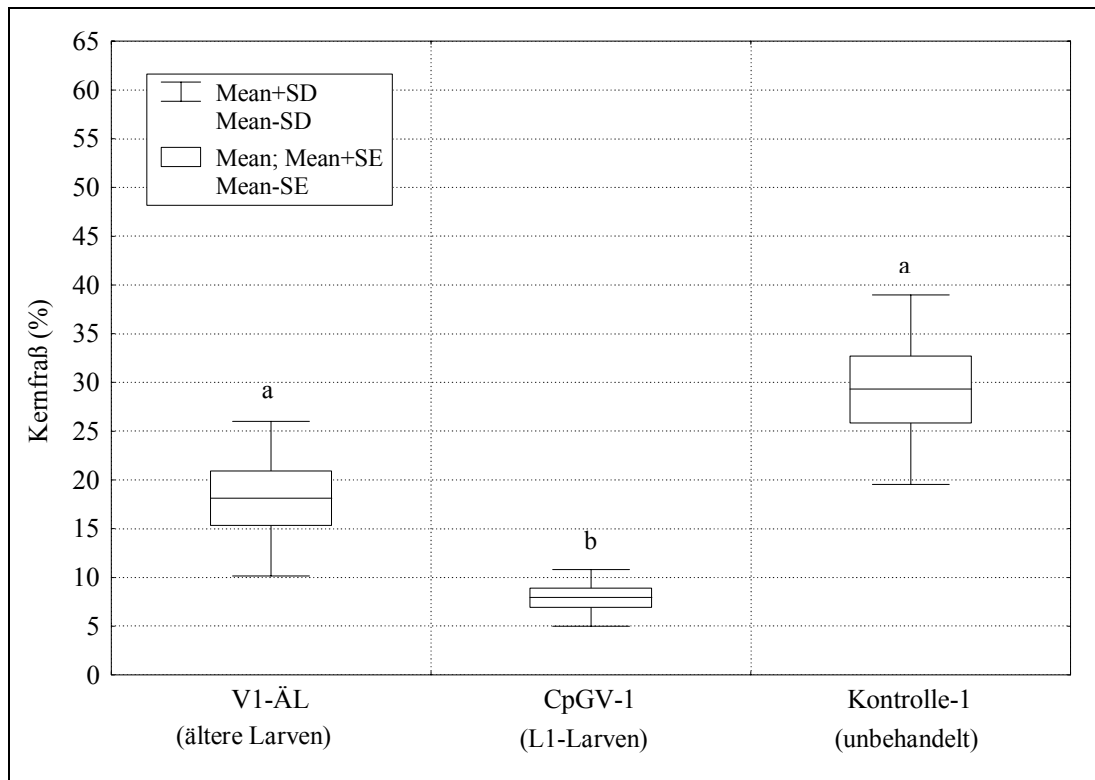


Abb. 3.14: Die Wirkung von CpGV auf L1- und auf ältere Larven. Dargestellt ist der Schaden als mittlerer Prozent Kernfraß ausgedrückt. (n=8 Bäume). Gleiche Buchstaben unterscheiden sich nicht signifikant voneinander ($p>0.05$).

Versuch 2: Horizontale Transmission im Freiland

Bei diesem Versuch wurde zwischen einer ersten und einer zweiten Larvencharge differenziert (siehe Tab. 3.10). Anstatt infizierte Larven auf Äpfel zu setzen, wie in den Laborversuchen durchgeführt, sollten sich die applizierten Eilarven der ersten Larvencharge an dem zuvor gespritzten CpGV infizieren. Die zweite Larvencharge wurde auf die Äpfel gesetzt, nachdem die infizierten Larven der ersten Charge gestorben waren und das gespritzte CpGV laut Berechnungen größtenteils UV-inaktiviert sein sollte. Für die zweite Larvencharge sollten somit die Larvenkadaver aus der ersten Charge das Virus-Inokulum sein. Die restlichen Gruppen (*CpGV-1*, *CpGV-2*, *Kontrolle-1* und *Kontrolle-2*) waren Kontrollgruppen. Aus der Literatur ist generell die Befallsreduktion aufgrund regelmäßiger CpGV-Behandlungen bekannt, nicht aber die Mortalitätsrate einer einzelnen Spritzung (Keller, 1973; Huber & Dickler, 1975; Sheppard & Stairs, 1976; Glen &

Payne, 1984; Charmillot, 1989). Mit den Gruppen *CpGV-1* und *Kontrolle-1* wurde daher im Nachhinein der Anteil an Larvenkadavern als Ergebnis einer Einzelanwendung errechnet. Der eigentliche Vergleich der Versuchsgruppe *V2-HT* wurde mit den Gruppen *CpGV-2* und *Kontrolle 2* durchgeführt. Mit der Gruppe *CpGV-2* wurde auf eine mögliche Restaktivität des gespritzten CpGVs getestet. Die unbehandelte *Kontrolle-1* wurde für die Abschätzung der natürlichen Mortalität der ersten Larvencharge verwendet.

Die Ergebnisse sind in Abb. 3.15 dargestellt. In der Versuchsgruppe *V2-HT* war im Mittel eine geringere Anzahl an überlebenden Larven gegenüber der Gruppe *CpGV-2* und der unbehandelten *Kontrolle-2* zu erkennen. Außerdem war im Mittel eine geringere Anzahl an überlebenden Larven in *CpGV-2* gegenüber der *Kontrolle-2* zu finden. Das gespritzte Virus persistierte demnach länger als erwartet und verursachte natürlich auch in der Gruppe *VT-HT* ähnliche Mortalitäten. Die beobachteten Unterschiede konnten zwar in einer Varianzanalyse statistisch nicht abgesichert werden, da die Unterschiede zwischen den Gruppen relativ gering und die Schwankungen innerhalb einer Gruppe verhältnismäßig groß waren. Anhand der Wirkungsgrade können die beschriebenen Tendenzen jedoch verdeutlicht werden. Dieser Versuch erlaubt somit, in mehrfacher Hinsicht, interessante neue Einblicke in die Persistenz und mögliche horizontale Transmission des CpGV unter praxisnahen Bedingungen.

- (1) Nach 254 h Sonneneinstrahlung war die UV-Inaktivierung des CpGV nicht vollständig, sondern es konnte noch anhand der überlebenden Larven ein Wirkungsgrad von 21,6% gegenüber der Kontrolle gemessen werden. Dieser Befund deckt sich nicht mit den Daten von Fritsch & Huber (1989; Kap. 3.1.5), nach denen 254 h Sonneneinstrahlung eine Restaktivität von lediglich 0,0004% erwarten ließe. In der Arbeit von Fritsch & Huber (1989) wurde die Inaktivierung über Blattscheiben in einem Biotest gemessen, was ein nicht ganz zutreffendes Modell ist, da das Virus zum Beispiel in Kelch, Stielgrube oder Blattachsen länger persistieren könnte.
- (2) Der Wirkungsgrad der Variante *V2-HT* lag bei 32,6% und war damit um 30% höher als in der Variante *CpGV-2*, die keine Larvenkadaver aus der ersten Larvencharge hatte. Zwar waren die Unterschiede dieser beiden Gruppen nicht signifikant, doch

belegen die Beobachtungen die horizontale Transmission mehr, als dass sie diese widerlegen. Das Ergebnis ist umso beachtlicher, wenn man sich vor Augen führt, dass wahrscheinlich nur auf einem geringen Teil der Äpfel Larvenkadaver vorhanden waren. Die Varianten *Kontrolle-1* und *Kontrolle-2* zeigten, dass die natürliche Mortalität in diesem Versuch sehr hoch war. Bei einer 100%-igen Infektionschance konnten auf maximal 27% der Äpfel Larvenkadaver vorkommen. Da die Gruppe *CpGV-1* aber zeigte, dass auch bei einer CpGV-Behandlung einige Larven überlebten, fiel die Anzahl an potentiellen Larvenkadavern somit noch geringer aus.

Die beobachteten Tendenzen wurden anhand von überlebenden Larven beschrieben. Auch beim Schaden machte sich die Persistenz vom CpGV bemerkbar (Abb. 3.16). Der Wirkungsgrad des vier Wochen zuvor gespritzten CpGVs (*CpGV-2*) lag bei immerhin 15,6% gegenüber der *Kontrolle-2*. Der Schaden der Gruppe *V2-HT* fiel in diesem Fall

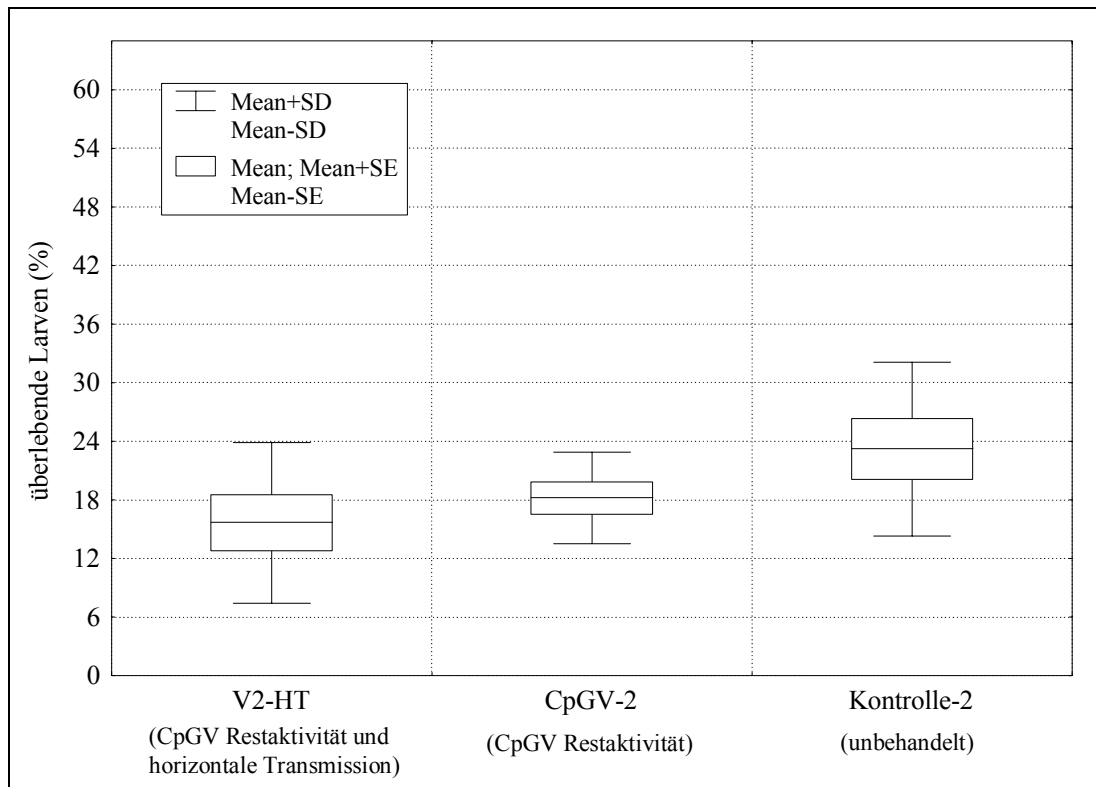


Abb. 3.15: Horizontale Transmission und eine Restaktivität des CpGV 4 Wochen nach der Applikation. Dargestellt sind Mittelwerte der Prozent überlebender Larven (n=8 Bäume)

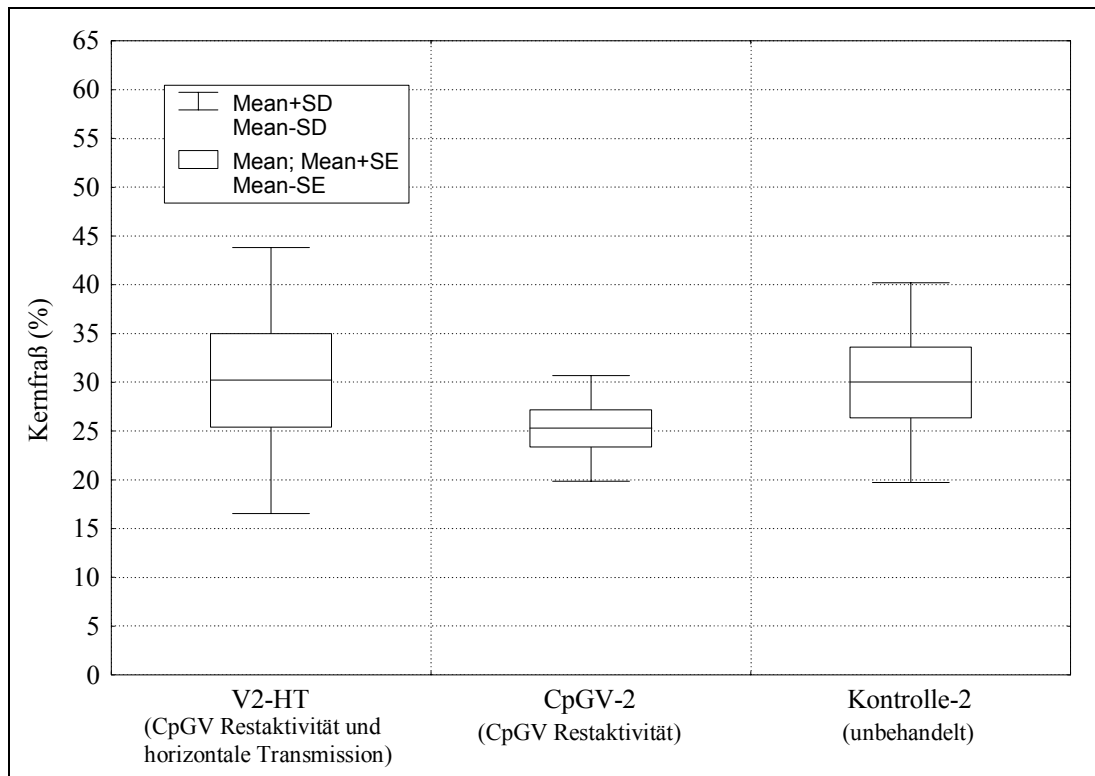


Abb. 3.16: Horizontale Transmission und eine Restaktivität des CpGV 4 Wochen nach der Applikation. Dargestellt ist der Schaden als mittlerer Prozent Kernfraß ausgedrückt. (n=8 Bäume)

sehr hoch aus und ließ sich nicht mit dem der Gruppen *CpGV-2* und *Kontrolle-2* vergleichen, da hier nicht zwischen dem Schaden durch die erste und die zweite Larvencharge unterschieden werden konnte.

Natürlicher Apfelwicklerbefall während des Versuchs

Zu beiden Erntezeitpunkten wurden die Äpfel von jeweils vier unbehandelten Bäumen der Gruppe *Hintergrund* geerntet. Zum ersten Erntezeitpunkt (n=188) konnten 1,64% überlebende Larven und 1,54% Kernfraß festgestellt werden. Zum zweiten Erntezeitpunkt (n=154) gab es keine überlebenden Larven und keinen Kernfraß. Im Vergleich zu den $69,9 \pm 8,5\%$ angefressenen Äpfeln bei den Bäumen, auf denen L1-Larven ausgebracht wurden, wurden nur $12,4 \pm 5,6\%$ aller Äpfel der Gruppe *Hintergrund* angefressen. Der natürlich vorkommende Apfelwicklerbefall in der Anlage wurde daher als vernachlässigbar betrachtet, da er die Versuchsergebnisse nicht beeinflussen konnte.

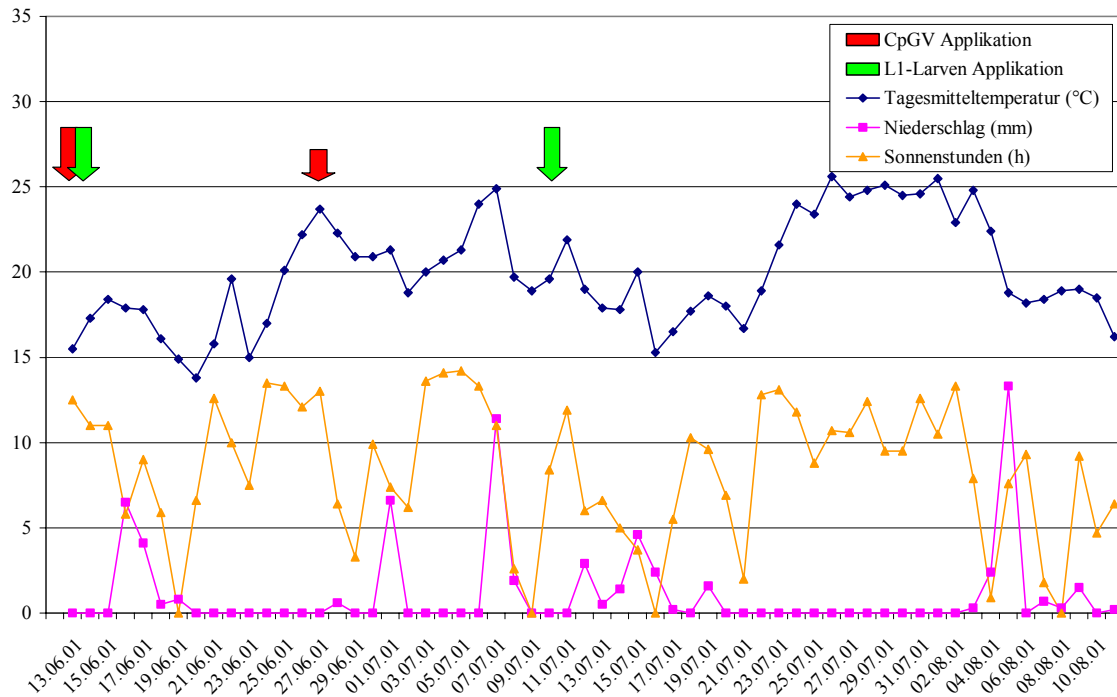


Abb. 3.17: Wetterdaten, CpGV- und Larvenapplikation für den Freilandversuch.

Daten für die Modellverifizierung

Da in diesem Freilandversuch die Anzahl der L1-Larven und die Anzahl der sich daraus entwickelnden Larven im L4-bis L5-Stadium genau bekannt war und diese Daten auch gleichzeitig mit dem Wetter (Abb. 3.17) und verschiedenen Spritzterminen korreliert werden konnten, eignen sich die Daten (in Tab. 3.11 zusammengefasst) zusätzlich für eine Modellverifizierung (Kap. 7.1).

Tab. 3.11: Für eine Modellverifizierung relevante Daten aus dem Freilandversuch.

Versuchs- gruppe	Larven		Virus		Überlebens- rate (%) $\pm$ SD
	Datum der L1 Applikation	Datum bei Er- reichen der Stadien L4-L5	Datum der Applikation	Anzahl der Sonnenstd. zw. Virus- und L1- Applikation	
Kontrolle-1	13.06.01	12.07.01	—	—	26,6 $\pm$ 8,9
Kontrolle-2	09.07.01	02.08.01	—	—	23,2 $\pm$ 8,9
CpGV-1	13.06.01	12.07.01	12.06.01	0	6,8 $\pm$ 3,9
CpGV-2	09.07.01	02.08.01	12.06.01	233	18,2 $\pm$ 4,7
V1-ÄL	13.06.01	12.07.01	26.06.01	0	7,7 $\pm$ 3,3
V2-HT	09.07.01	02.08.01	12.06.01 + Kadaver	233	15,6 $\pm$ 8,2

3.1.6.3 Vertikale Transmission CpGV

Bei einer vertikalen Transmission handelt es sich um eine Übertragung eines Erregers von den Elterntieren auf ihre Nachkommen. Die vertikale Transmission ermöglicht einem Pathogen bei einer relativ niedrigen Dichte der Wirtspopulation fortzubestehen, was bei einer ausschließlich horizontalen Transmission ausgeschlossen ist (Anderson & May, 1981). Die vertikale Transmission des CpGV auf die Nachkommen seines Wirtes könnte daher für die Persistenz des Virus von großer Bedeutung sein. Pathogene und so auch Baculoviren können generell *transovum*, d.h. äußerlich auf der Ei-Schale, oder *transovarial*, d.h. im Ei-Innern übertragen werden. Vertikale Transmission wurde bei einigen NPVs und GVs, wie z.B. *Spodoptera frugiperda* NPV (Fuxa & Richter, 1991), *Spodoptera exigua* MNPV (Smits & Vlak, 1988; Bianchi, 2001), *Chilo fuscicollis* GV (Easwaramoorthy & Jayaraj, 1989), *Mythimna separata* (Neelgund & Mathad, 1978), *Sesamia nonagroides* GV (Melamed-Madjar *et al.*, 1979) beobachtet. Für *S. exigua* wurde gezeigt, dass 18% bzw. 10-28% der Nachkommen von subletal infizierten Insekten an einer Virusinfektion sterben (Bianchi, 2001; Smits & Vlak, 1988).

In Zuchten des Apfelwicklers treten auch bei strengen Hygienemaßnahmen immer wieder viröse Larven auf. Obwohl das CpGV eine sehr hohe Pathogenität gegenüber allen fünf Larvenstadien des Apfelwicklers besitzt, wird eine latente Infektion, die auf Nachkommen übertragen wird und unter bestimmten Stress-Situation zum Ausbruch kommt,

zwar häufig vermutet, doch konnte diese bisher nicht nachgewiesen werden. Bei einer latenten Infektion geht man von einer nicht replikativen Form des Virus aus, bei der sich das genetische Material in das Wirtszellgenom ähnlich wie beim Hepatitis-B-Virus integriert (Howard, 1986) oder wie beim Herpes-Simplex-Virus im Ruhezustand als eigenständiges genetisches Material im Zellkern vorhanden ist (Mellerik & Fraser, 1987). Alternativ kann es auch eine persistente Infektion geben, in der Bildung von Virusproteinen auf einem sehr niedrigen Niveau stattfindet. Beispiele hierfür sind das Marners-Virus (Cattaneo *et al.*, 1988) und das Baculovirus, *Mamestra brassicae* NPV (Hughes *et al.*, 1997). Diese latenten und persistenten Infektionsformen können wiederum in einer vertikalen Transmission auf die Nachkommen übertragen werden und unter bestimmten Bedingungen wie Stress durch zu hohe Populationsdichte, sehr hohe oder auch niedrige Temperaturen, Nahrungsknappheit zum Ausbruch der Krankheit führen (Goulson & Cory, 1995).

Etzel & Falcon (1976) untersuchten die vertikale Transmission von CpGV histologisch und mit Biotests und kamen zu dem Schluss, dass das Virus mit Sicherheit nicht in den Eiern übertragen wurde. Es konnte aber nicht ausgeschlossen werden, dass CpGV auf der Ei-Schale übertragen wurde. In dieser Studie testeten sie Apfelwickler-Eier aus ihrer eigenen und einer anderen Zucht, wobei die Eier aus der fremden Zucht auf der Ei-Schale anscheinend mit Viruspartikeln kontaminiert waren. Mit Medium verfütterte Eier der fremden Zucht waren infektiös für Apfelwicklerlarven. Die der eigenen Zucht waren nicht infektiös. Interessanterweise waren auch die Eier der fremden Zucht nach einer äußerlichen Desinfektion ebenfalls nicht infektiös. In Versuchen in denen Larven subletal infiziert wurden, konnte Virus mit einer fluoreszierenden Antikörperfärbung in den Fettkörpern und in der Epidermis eines weiblichen Falters, nicht aber im Reproduktionsgewebe, nachgewiesen werden. In anschließend durchgeführten Biotests mit der F-1 Generation von subletal infizierten Insekten starb nur 1 der 144 Larven an Virus.

Experimentelle vertikale Transmissionsrate

Um die Möglichkeit und das Ausmaß der vertikalen Transmission von CpGV im Apfelwickler abzuschätzen, wurde ein Versuch durchgeführt, bei dem die Nachkommen von subletal infizierten *C. pomonella* Larven hinsichtlich ihrer Mortalität untersucht wurden.

Ausschlaggebend für den Erfolg der Versuche war, dass jegliche Kontamination mit CpGV vermieden wurde. Daher wurden autoklavierbares Material und Instrumente verwendet. Kontrolltiere, sowie Adulttiere und Eier wurden getrennt von jeglichem infektiösen Material gehalten. Zusätzlich wurden Insekten im Ei- und Puppenstadium desinfiziert, da auch in vorangegangenen Versuchen festgestellt wurde, dass wesentlich mehr Kontrolltiere überlebten, wenn sie als Eier mit Formaldehyd behandelt wurden.

Verwendet wurden Insekten aus der Apfelwicklerzucht der SLFA. Die Eier wurden nach der Ablage mit Formaldehyd behandelt, um eventuell vorhandene Viren auf der Ei-Schale abzutöten, und anschließend auf semi-synthetischem Medium bei 26°C und 60% Luftfeuchte herangezogen. Um Larven mit einer subletalen Infektion zu erhalten, wurden Larven im L5-Stadium mit 50 CpGV OB pro Larve (entspricht einer LD₅₀) inokuliert. Hierfür wurde ein Virustropfen auf ein etwa 8 mm³ großes Medium-Blöckchen aufgetragen und nach Antrocknen den Larven angeboten. Nach 24 h wurden diejenigen Larven für den Versuch verwendet, die das Blöckchen mit Virus komplett gefressen hatten. Diese Larven erhielten ausreichend Futter für ihre weitere Entwicklung. Bei den überlebenden Larven wurde angenommen, dass zumindest ein Teil der Larven subletal infiziert war und diese nicht-invasive Infektion möglicherweise an die Nachkommen weitergeben könnte. Kontrolltiere blieben unbehandelt. An dieser Stelle ist zu erwähnen, dass sich unter den Kontrolltieren viele Larven nicht verpuppten und schließlich sehr spät im L5-Stadium starben. Die Ursache hierfür ist noch unklar. Nachdem sich Puppen aus den inokulierten und den Kontrolllarven entwickelt hatten, wurden sie je nach Geschlecht getrennt und anschließend mit 70%-igem Ethanol desinfiziert, um auch in diesem Schritt eine oberflächliche Kontamination mit Virus zu meiden. Maßgeblich für den Versuch war die Paarung der Adulten:

unbehandelte ♂ x *unbehandelte* ♀ (Kontrolle)

subletale ♂ x *unbehandelte* ♀

unbehandelte ♂ x *subletale* ♀

Mit diesen Paarungen sollte festgestellt werden, welches Geschlecht in der Lage ist, die Infektion zu übertragen. Je nach Falterschlupf wurden 4-15 Falter in einen Paarungskäfig gesetzt. Die Eier wurden auf Plastikblättchen abgelegt und alle zwei bis drei Tage abgesammelt. In diesem Schritt wurde auf eine Formaldehydbehandlung der Eier verzichtet, da eine Übertragung des CpGV möglicherweise auf der Ei-Schale stattfindet. Die Mortalität der Nachkommen der verschiedenen Paarungsvarianten wurde in einem Biotest bestimmt. Der Biotest wurde in Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen angesetzt und an zwei Zeitpunkten ausgewertet. Nach ein bis zwei Tagen sollte festgestellt werden, welcher Anteil der Larven das Umsetzen nicht überlebte. Zum Zeitpunkt als die Larven im L4- oder L5-Stadium waren, wurde ein zweites Mal bonitiert. Larven, die bereits durch das Umsetzen gestorben waren, wurden in die eigentliche Mortalitätsbestimmung nicht mit einbezogen.

Beim Trennen der Geschlechter im Puppenstadium war festzustellen, dass mehr Männchen als Weibchen die Infektion überlebten. Bei den Kontrolltieren war das Verhältnis von Männchen zu Weibchen 60:63 (also etwa 1:1), bei der experimentellen Gruppe der subletal infizierten Tiere war es 73:33 (also etwa 2:1). Die Tatsache, dass weniger Weibchen als Männchen eine niedrige Infektionsdosis überleben, hat ein stark geschwächtes Wachstumspotential der Population zur Folge. Die Weibchen sind der eigentliche Vermehrungsfaktor einer Population. Sie legen im Freiland durchschnittlich 47 Eier ab (siehe Kap. 4.1.3), von denen schließlich ca. 25% überleben (siehe Kap. 4.1.1). Wenn es umgekehrt wäre und mehr Weibchen die Infektion überleben würden, wäre das Wachstumspotential der Population wesentlich geringer beeinflusst, da männliche Apfelwickler in der Lage sind, mehrere Weibchen zu begatten.

Die anschließend durchgeführten Biotests zeigten, dass die Mortalität der F1-Generation bei unbehandelten Männchen und Weibchen bzw. subletal infizierten Männ-

chen und unbehandelten Weibchen bei 27-28% lag, während die Nachkommen aus der Paarungskombination mit unbehandelten Männchen und subletal infizierten Weibchen eine 44%-ige Mortalität aufwiesen, was wiederum einem Wirkungsgrad von 23% entspricht. Dies lässt den Schluss zu, dass eine subletale CpGV-Infektion von den Weibchen auf ihre Nachkommen übertragen wird (Tab. 3.12), denn die Mortalität der Nachkommen subletal infizierter Männchen unterscheidet sich nicht von den Nachkommen der Kontrolltiere. Die relativ hohe Mortalität der Nachkommen von Kontrolltieren könnte mehrere Ursachen haben. Es ist nicht auszuschließen, dass Apfelwicklerzucht der SLFA nicht ganz frei von CpGV ist und zumindest ein Teil der Mortalitäten durch das Virus bedingt ist. Außerdem könnte die Mortalität der Nachkommen in der Kontrollgruppe die gleiche Ursache haben wie die unerwartete und bisher ungeklärte Mortalität in den L5-Larven der Elterngeneration.

Tab. 3.12: Mortalitäten der F1-Generation die sich aus unterschiedlichen Paarungen der Elterntiere ergeben.

<i>Paarungen der Elterngeneration</i>		<i>% Mortalität der F1-Generation</i>	<i>Stichproben-Umfang</i>
♂	♀		
Unbehandelt	Unbehandelt	27	253
Subletal	Unbehandelt	28	80
Unbehandelt	Subletal	44	86

Ein Teil der Puppen und ein Teil der Larven, die nicht in Biotests verwendet wurden, wurden bei -20°C gelagert, um sie mittels der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) auf Vorkommen von CpGV-DNA zu testen. Mit der PCR steht ein weitaus sensitiverer molekularer Nachweis zur Verfügung, der im Gegensatz zu immunologischen Färbungen (Etzel & Falcon, 1976) nicht voraussetzt, die Form zu kennen, in der das Virus vorliegt.

Alternative vertikale Transmission

Eine alternative Form der vertikalen Transmission ist die äußerliche Kontamination der Adulttiere. Diese wurde in den Versuchen bisher nicht berücksichtigt, obwohl sie für CpGV ebenfalls in Frage kommen könnte. Nordin *et al.* (1990) erreichten in Biotests beachtliche Mortalitäten von 69% und 53% bei Nachkommen von *Helicoverpa virescens*-Männchen, die als Adulttiere mit AcMNPV und *Helicoverpa zea* SNPV bestäubt wurden. Bei Virus-bestäubten Weibchen konnten sie in elektronenmikroskopischen Aufnahmen ebenfalls Viruspartikel auf der Ei-Schale nachweisen. Besonders in Anlagen, die mit CpGV-Präparaten gespritzt werden, wäre diese Form der Transmission ebenfalls vorstellbar.

Subletale Effekte

Die Folgen von subletalen Infektionen, wie z.B. ein verändertes Geschlechterverhältnis, können gravierende Folgen für die Populationsdynamik des Wirtes haben. Einige Autoren haben sich aus diesem Grund mit subletalen Effekten von Baculoviren befasst (Goulson & Cory, 1995; Sait *et al.*, 1994; Vail & Hall, 1969; Geier & Oswald, 1977; Shapiro & Robertson, 1987; Vargas-Osuna & Santiago-Alvarez, 1988; Young & Yearian, 1982; Melamed-Madjar & Raccach, 1979). In den verschiedenen Untersuchungen wurden unter anderem die Entwicklungsdauer, das Gewicht der Puppen, das Geschlechterverhältnis, die Anzahl der Eier pro Weibchen und die Lebensfähigkeit der Eier subletal infizierter Insekten bestimmt (siehe Tab. 3.13). Doch lassen sich die Ergebnisse nicht auf beliebige Insekt-Baculovirus-Beziehungen übertragen, da in diesen Arbeiten keine einheitlichen Ergebnisse für die verschiedenen Insekten- und Virenarten vorliegen. So konnten Goulson & Cory (1995) im Gegensatz zu unseren Ergebnissen, keinen Unterschied im Geschlechterverhältnis bei *Mamestra brassicae* und dem MbMNPV erkennen. Es gab selbst für das gleiche Insekt-Virus-System widersprüchliche Aussagen (Myers *et al.*, 2000; Murray *et al.*, 1991). Auswirkungen von subletalen Baculovirus-Infektionen könnten einen enormen Beitrag zur Reduktion bzw. Schwächung einer Wirtspopulation leisten. Bisher fehlen jedoch theoretische Ansätze, die solche altersspezifischen Effekte in einer Prognose integrieren.

Tab. 3.13: Eine Zusammenfassung der beobachteten subletalen Effekte bei verschiedenen Baculovirus-Insekt Beziehungen.

Virus	Untersuchte Eigenschaften	Veränderte Eigenschaften	Referenz
<i>Plodia interpunctella</i> GV	Entwicklungsrate, Gewicht der Puppen, Fruchtbarkeit	Entwicklungsrate, Fruchtbarkeit	Sait <i>et al.</i> , 1994
<i>Mamestra brassicae</i> NPV	Entwicklungsrate, Gewicht der Puppen, Geschlechterverhältnis, Fruchtbarkeit	Entwicklungsrate	Goulson & Cory, 1995
<i>Lymantria dispar</i> NPV	Gewicht der Puppen, Fruchtbarkeit	Gewicht der Puppen, Fruchtbarkeit	Myers <i>et al.</i> , 2000
<i>Lymantria dispar</i> NPV	Gewicht der Puppen, Fruchtbarkeit, Gewicht der F1-Larven und F1-Puppen	Keine	Murrey <i>et al.</i> , 1991
<i>Sesamia nonagrioides</i> GV	Geschlechterverhältnis, Pigmentation der Puppen, Fruchtbarkeit	Geschlechterverhältnis, Pigmentation der Puppen, Fruchtbarkeit	Melemed-Madjar & Raccach, 1979
<i>Chilo inuscatellus</i> GV	Geschlechterverhältnis, Pigmentation der Puppen	Geschlechterverhältnis, Entwicklungsrate	Easwaramoorthy & Jayaraj, 1989

3.2 Einfluss gentechnischer Veränderungen auf die Virusaktivität

Wie in Kap. 1.2 aufgeführt, wurden in den vergangenen Jahren verschiedene gentechnisch veränderte Baculoviren mit verbesserter Wirkgeschwindigkeit erzeugt. Dabei zeigten die Expression von Neurotoxin-Genen und die Deletion des *egt*-Gens den stärksten Effekt. Hierdurch konnten in verschiedenen Virus/Wirt-Systemen die mittlere Letalzeit um 20-50% gesenkt werden (siehe Tab. 1.2). Die *egt*-Deletionsmutanten sind gentechnische Konstrukte, die nicht mit einem zusätzlichen Gen aus einem anderen Organismus ausgestattet sind, sondern lediglich eine Deletion besitzen, wie sie auch natürlicherweise entstehen könnte. Dieser Unterschied ist selbstverständlich auch in Hinblick auf die biologische Sicherheit der Viren eine bedeutende Eigenschaft. Daher galten auch Baculoviren mit einer *egt*-Deletion als die wahrscheinlichsten Kandidaten gentechnisch veränderter Baculoviren-Insektizide, die eventuell als erste in der Pflanzenschutzpraxis

eingesetzt werden könnten. In den vergangenen Jahren wurden die *egt*-Gene von über 20 Baculoviren identifiziert und charakterisiert (Chen *et al.*, 1997; Chen *et al.*, 2000; Wormleaton & Winstanley, 2001).

3.2.1 *Egt*-Deletion bei CpGV

Erste mittels Gentechnologie hergestellte *egt*-Deletionsmutanten von CpGV wurden von Doreen Winstanley und Mitarbeitern vom Horticulture Research International in Warwick, England erzeugt (Winstanley, pers. Mitt.). Wirksamkeitsstudien haben allerdings gezeigt, dass sich diese Deletionsmutanten, CpGV-*egt*(-), hinsichtlich ihrer Wirkgeschwindigkeit gegenüber Apfelwicklerlarven nicht in der gewünschten Form vom Parentalvirus CpGV-M1 unterscheiden. Zwischen beiden Virus-Typen gab es keinen Unterschied im ersten Larvenstadium, lediglich gegenüber L5-Larven zeigte CpGV-*egt*(-) eine um etwa 9% reduzierte LT₅₀ (D. Winstanley, pers. Mitt.). Da das Ziel der CpGV-Applikation aber L1- und L2-Larven sind, spielt dieser Effekt für die Praxis keine große Rolle. Daher wurde diese Mutante bei der Modellierung der Populationsdynamik nicht weiter betrachtet.

3.2.2 *Egt*-Deletion bei AcMNPV

Das hier verwendete Nukleopolyhedrovirus von *Autographa californica* (AcMNPV) wurde gegenüber den Zielorganismen *Spodoptera exigua* und *Helicoverpa armigera* getestet, deren Larven als polyphage offene Blattfresser bekannt sind. Als Wildtyp-Isolat diente das AcMNPV/E2. Bei dem verwendeten rekombinanten Nukleopolyhedrovirus (AcMNPV/RM1) handelt es sich um eine gentechnisch hergestellte *egt*-Deletionsmutante, die anstelle des *egt*-Gens das Markergen β -Galaktosidase besitzt. Diese Rekombinante wurde uns freundlicherweise von Prof. Just M. Vlak, Department of Virology, Wageningen University, Niederlande, überlassen. Für das AcMNPV wurde früher gezeigt, dass eine *egt*-Deletion einerseits zu einer Erhöhung der Wirkgeschwindigkeit der Viren und andererseits zu einer Verringerung der Zahl an Virennachkommen

führen kann, was wiederum eine geringere Freisetzung von Viren in das Ökosystem zur Folge hätte (O'Reilly & Miller, 1989; O'Reilly, 1991).

Um diese möglicherweise veränderten Eigenschaften zu untersuchen, wurden in Labor-experimenten die biologischen Parameter wie Virulenz (LC_{50} -Bestimmung, LT_{50} -Bestimmung) sowie das Vermehrungspotential (Bestimmung der Virennachkommen in infizierten Larven) an dem rekombinanten AcMNPV/RM1 und dem Wildtyp AcMNPV/E2 vergleichend untersucht.

3.2.2.1 Mittlere Letalkonzentration

Die zur Verfügung stehenden, in Zellkultur produzierten Proben des AcMNPV/E2-Wildtyps und der AcMNPV/RM1-Rekombinante wurden zunächst *in vivo* vermehrt, um ausreichend Virusmaterial für die Biotests zur Verfügung zu haben. Bei den Untersuchungen des Wildtyps standen zwei verschiedene Varianten zur Verfügung; ein älteres Isolat mit der Bezeichnung AcMNPV/E2-I, dass 1992 in Larven von *S. exigua* vermehrt und anschließend in *A. gamma* passagiert wurde und ein neueres Isolat (AcMNPV/E2-II), welches 2001 nur in *S. exigua* vermehrt wurde. Das rekombinante Virus (AcMNPV/RM1) wurde ebenfalls in *S. exigua* Wirtslarven vermehrt. Zum Vergleich der biologischen Aktivität (LC_{50}) dieser Virusisolate diente wiederum der von Huber (1981) entwickelte standardisierte Biotest, wobei als Testtiere Eilarven von *S. exigua* und *H. armigera* eingesetzt wurden. Die Inkubation der Larven erfolgte bei 26°C unter Langtagbedingungen (16 Stunden Licht / 8 Stunden Dunkel) über eine Versuchsdauer von 6 bzw. 12 Tagen.

Die Biotestergebnisse zeigten, dass sich die drei verschiedenen Isolate untereinander nicht signifikant in ihrer Aktivität gegenüber den jeweiligen Wirten unterscheiden. Allerdings erscheint das Isolat AcMNPV/E2-I gegenüber E2-II und RM1 um den Faktor 2,3 aktiver. Wenn diese Beobachtungen nicht ein Effekt der Vermehrung des Viruspräparates in unterschiedlichen Wirts-Spezies ist, könnte sie auch auf geringfügigen genetischen Variationen beruhen. Restriktionsanalysen wären ein erster Ansatz solche geni-

schen Unterschiede zwischen den Präparaten zu entdecken. Alle untersuchten Viren zeigten eine um Faktor 2-3 höhere Wirksamkeit gegenüber Eilarven von *S. exigua* als gegenüber den Wirtslarven von *H. armigera*.

Tab. 3.14: Virusaktivität von Wildtyp (Isolat E2/-I und E2/-II) und Rekombinante des AcMNPVs getestet an Eilarven von *S. exigua* und *H. armigera* im 12-Tage-Biotest. Als klassische Methode zur statistischen Auswertung der Biotests diente wiederum die Probit-Analyse nach Finney (1971), mit deren Hilfe aus den Regressionsgeraden die mittlere Letalkonzentration (LC_{50} -Werte) bestimmt wurde und als relatives Maß für die biologische Aktivität der Viren angegeben wurde. Für diese Berechnungen wurde das Computer-Programm (MLP 3.08, NAG, Lawes Agricultural Trust, Rothamsted Experimental Station, 1987) verwendet.

Virus	<i>Spodoptera exigua</i>	<i>Helicoverpa armigera</i>
	LC_{50} [OB/ml] (95% Vertrauensgrenzen)	LC_{50} [OB/ml] (95% Vertrauensgrenzen)
AcMNPV/E2-I	$7,1 \times 10^4$ (5,59 – 8,61)	$1,6 \times 10^5$ (0,95 – $2,17 \times 10^5$)
AcMNPV/E2-II	$1,6 \times 10^5$ (0,47 – $2,73 \times 10^5$)	$4,5 \times 10^5$ (1,09 – $7,96 \times 10^5$)
AcMNPV/RM1	$2,1 \times 10^5$ (1,34 – $2,86 \times 10^5$)	$6,7 \times 10^5$ (0,65 – $1,28 \times 10^5$)

3.2.2.2 Mittlere Letalzeit

Ebenso wie die Virulenz wurde auch die Wirkgeschwindigkeit der verschiedenen Virus-Isolate im Biotest unter standardisierten Laborbedingungen bestimmt. Bei der Infektion der Larven wurde die unterschiedliche Virulenz der beiden Wildtyp-Isolate berücksichtigt, in dem das Nährmedium mit 2 bzw. 6×10^5 OB /ml kontaminiert wurde, womit im Biotest eine Virusmortalität von 80-90 % hervorgerufen wurde. Die Testlarven wurden bei 26 °C unter Langtagbedingungen bis zur Verpuppung inkubiert. Zur Feststellung der Überlebenszeit wurden pro Variante 200 Larven täglich ein bis zweimal gesichtet. Die statistische Auswertung der Biotestdaten erfolgte mit Hilfe des Lifetest- Programms aus

Tab. 3.15: Mittlere Überlebenszeit (ST₅₀) von Eilarven von *S. exigua* infiziert im Biotest mit dem Wildtyp (AcMNPV/E2-I und II) und der Rekombinante AcMNPV/RM1 bei 26 °C unter Langtagbedingungen.

Virus	Virus-Konzentration [OB/ml Medium]	Endmortalität [%]	Mittlere Überlebenszeit (ST₅₀) [Tage] (Standardabweichung)
AcMNPV/E2-I	2 x 10 ⁵	92,1	6,79 (0,215)
AcMNPV/E2-I	6 x 10 ⁵	95,9	5,72 (0,197)
AcMNPV/E2-II	6 x 10 ⁵	92,9	5,99 (0,172)
AcMNPV/RM1	6 x 10 ⁵	95,7	5,45 (0,137)

dem SAS 6.11 Software Package (SAS Institute Inc., 1989) und lieferte die mittleren Überlebenszeiten (ST₅₀) für die verschiedenen Viren (Tab.3.15).

Tab. 3.15 zeigt, dass Wildtyp und rekombinante AcMNPV bzgl. der Eilarven von *S. exigua* keinen signifikanten Unterschied in der Wirkgeschwindigkeit (ST₅₀) aufweisen. Stellt man die Überlebensrate der verschiedenen Testlarven-Populationen in Abhängigkeit von der Zeit graphisch dar, zeigte sich für das in etwas geringerer Konzentration (2 x 10⁵ OB/ml Medium) verabreichte Wildtyp-Isolat (AcMNPV/E2-I) ein weniger steiler Verlauf der Überlebenskurve (Abb. 3.18). Dieser war im Vergleich zu den übrigen Kurven signifikant verschieden. Dieses Resultat und die daraus resultierende etwas erhöhte ST₅₀ hängen möglicherweise mit der Wechselwirkung zwischen verabreichter Viruskonzentration und der Überlebensdauer zusammen. Die verringerte Virusdosierung führt offensichtlich zu einer Abnahme der Wirkungsgeschwindigkeit.

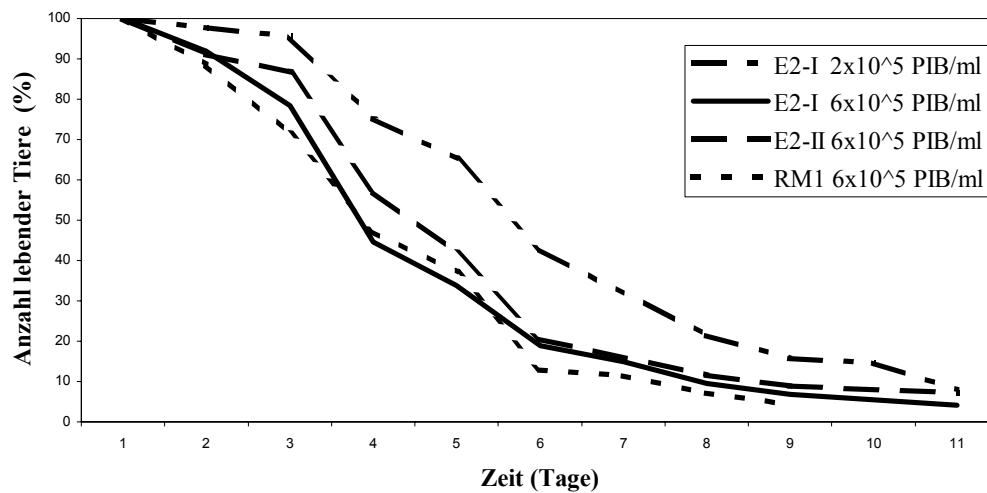


Abb. 3.18: Verlauf der Überlebenskurven für die beiden Wildtyp-Isolate (Ac/E2-I und II) und der Rekombinante (Ac/RM1) getestet an Eilarven von *S. exigua* im Biotest mit Medium bei 26 °C unter Langtagbedingungen.

Alle für das AcMNPV ermittelten experimentellen Daten aus Biotests mit Eilarven von *S. exigua* und *H. armigera* lassen keinen signifikanten Unterschied zwischen dem Wildtyp und dem hier verwendeten rekombinanten Virus hinsichtlich ihrer biologischen Eigenschaften (LC_{50} und ST_{50}) erkennen. Auch Bianchi *et al.* (2000) konnten keinen Unterschied in den biologischen Parametern (LD_{50} und LT_{50}) zwischen dem AcMNPV Wildtyp und einer AcMNPV-*egt*(-) Mutante bei L2-Larven feststellen. Bezüglich der Infektiösität (LC_{50}) fanden O'Reilly & Miller (1991) ebenfalls keinen signifikanten Unterschied zwischen dem AcMNPV-*egt*(-) und dem Wildtyp in Eilarven von *S. frugiperda*. Untersuchungen zur Wirkgeschwindigkeit im gleichen Wirt ergaben jedoch eine um 27,5 h niedrigere ST_{50} für die Rekombinante im Vergleich zum Wildtyp.

3.2.2.3 Virusnachkommen

Die Bestimmung der Virusnachkommen in Einzellarven erfolgte in *S. exigua* nach Infektion mit dem Wildtyp bzw. der gentechnisch veränderten Variante des AcMNPV. Hierzu wurden sowohl Eilarven als auch ältere Larvenstadien über kontaminiertes Nährmedium infiziert. Die dabei verabreichte Viruskonzentration im Medium variierte je nach Alter der Larven zwischen 10^6 und 10^8 OB/ml Medium, so dass Larvenkadaver in allen Stadien erhalten wurden. Die Inkubation der Testtiere erfolgte bei 26°C unter Langtagbedingungen. Zur Quantifizierung der im Wirt replizierten Viren wurden die virustoten Larven einzeln in Eppendorfgläser überführt und zunächst bei -18°C eingefroren. Anschließend wurden die Larvenkadaver nach Zugabe von Tris-HCl-Puffer (pH 8) in den Eppendorfgläsern homogenisiert und die Virussuspension ggf. seriendiluiert. Die Titerbestimmung der Nukleopolyhedroviren erfolgte anschließend durch Auszählen im Phasenkontrastmikroskop unter Verwendung einer Thomakammer. Tab. 3.16 zeigt die Anzahl der Virusnachkommen der rekombinanten- bzw. Wildtypviren in unterschiedlichen Larvenstadien von *S. exigua*. Die Virusnachkommen steigen mit zunehmendem Larvenstadium von L2 – L4 etwa um den Faktor 10 an. Lediglich im Übergang vom L4- ins L5-Stadium blieb der Virusgehalt konstant. Die mit der Rekombinante infizierten Larven zeigten dabei keinen signifikanten Unterschied im Vergleich zu den Tieren, die mit dem Wildtyp infiziert waren.

Untersuchungen von O'Reilly & Miller (1991) an L5-Larven von *S. frugiperda* haben dagegen einen signifikanten Unterschied im Virusgehalt ergeben, wobei für das AcMNPV-*egt*(-) 23% weniger Virennachkommen bestimmt wurden als für das natürliche AcMNPV.

Tab. 3.16: Mittlerer Virusgehalt in unterschiedlichen Entwicklungsstadien virustoter Einzellarven von *S. exigua* infiziert mit dem Wildtyp-Isolat (E2-II) und der Rekombinante (RM1) von AcMNPV. Virusgehalt wurde bestimmt aus 5 Larven pro Variante mit den zugehörigen 95 % Vertrauensgrenzen (in Klammern) nach einer Inkubation bei 26 °C und Langtagbedingungen.

Virus	Larvenstadium			
	L2	L3	L4	L5
AcMNPV/E2-II	$2,9 \times 10^6$ (1,5 – 4,2 x 10 ⁶)	$2,6 \times 10^7$ (1,1 – 4,0 x 10 ⁷)	$6,5 \times 10^8$ (2,0 – 11 x 10 ⁸)	$6,6 \times 10^8$ (4,9 – 8,1 x 10 ⁸)
AcMNPV/RM1	$4,4 \times 10^6$ (2,0 – 6,7 x 10 ⁶)	$4,8 \times 10^7$ (0,5 – 15 x 10 ⁷)	$6,1 \times 10^8$ (0,7 – 13 x 10 ⁸)	$4,2 \times 10^8$ (1,3 – 6,9 x 10 ⁸)

3.2.3 Bewertung der *egt*-Deletion bei Baculoviren

Die eigenen Ergebnisse als auch die Daten aus der Literatur machen deutlich, dass die Deletion des *egt*-Gens in den betrachteten Virus/Wirt-Kombinationen, CpGV/*C. pomonella* und AcMNPV/*H. armigera* bzw. AcMNPV/*S. exigua* nicht die in anderen Virus/Wirt-Kombinationen beobachtete schnellere Wirkgeschwindigkeit und reduzierte Anzahl an Virusnachkommen zeigt. Dies bedeutet, dass die *egt*-Deletion keine generelle und allgemeingültige Methode darstellt, um die Wirkgeschwindigkeit bei Baculoviren zu erhöhen. Vielmehr muss jede einzelne Virus/Wirt-Kombination individuell betrachtet und hinsichtlich der möglichen Veränderung der Wirkgeschwindigkeit und damit einhergehenden Fraßreduktion betrachtet werden.

4 Insektenparameter

4.1 *Populationsdynamik des Apfelwicklers*

Ein sehr wichtiger Teil des Modells ist die Populationsdynamik des Apfelwicklers, die sich im wesentlichen aus der natürlichen Mortalitätsrate (Mortalitäten, die nicht CpGV bedingt sind), der temperaturabhängigen Entwicklungsrate und der Reproduktionsrate zusammensetzt. Die Literatur des letzten Jahrhunderts birgt eine Fülle an Erkenntnissen über den Apfelwickler. Im folgenden Abschnitt sollen besonders die Daten, die für unser System von Bedeutung sind, zusammengefasst werden. Hierbei werden auch solche Daten berücksichtigt, die nicht direkt in das Modell eingeflossen sind, vielmehr aber dem Verständnis dienen.

4.1.1 Natürliche Mortalitäten

Wie in Tab. 4.1 ersichtlich ist, unterscheiden sich die Mortalitätsraten von *C. pomonella* z.T. erheblich von Studie zu Studie. Dieses liegt zum einen an unterschiedlichen geographischen Lagen und klimatischen Bedingungen, zum anderen an wahrscheinlich unterschiedlichen biologischen Gegenspielern (Räuber, Parasiten). Für das Modell wurden die Mortalitätsraten aller Regionen gemittelt.

4.1.2 Ontogenese

Die Entwicklungsgeschwindigkeit ist bei Insekten stark temperaturabhängig. Um Ergebnisse verschiedener Wetterbedingungen miteinander vergleichen zu können, werden in ökologischen Studien und auch beim Modellieren sehr häufig Gradtage verwendet. Die für die Entwicklungsberechnungen notwendigen Gradtage setzen sich bei *C. pomonella* folgendermaßen zusammen (Glenn, 1922)

$$\text{Gradtage} = \text{Anzahl der Tage} \times [(\text{Tagesmaximum} + \text{Tagesminimum})/2 - 10] \text{ } ^\circ\text{C}$$

Tab. 4.1: Aus verschiedenen Studien zusammengefasste Mortalitätsraten der verschiedenen Entwicklungsstadien von *C. pomonella* mit den dazugehörigen Mortalitätsursachen: ¹ Räuber, ^{1a} Vögel, ^{1b} Ameisen, ² Krankheit, ^{2a} Parasiten, ^{2b} Pilze, ^{2c} andere Pathogene, ³ Klima, ^{3a} Temperatur, ^{3b} Regen, ⁴ Unfruchtbarkeit, ⁵ unbekannt. Modifiziert nach Ferro *et al.*, 1975 und der CMISS Datenbank.

	% Mortalität	Insektenherkunft	Region	Referenz
Ei-Stadium	25 ⁴	Feld	N. Amerika	Ferro <i>et al.</i> , 1975
	19 ⁴	Feld	N. Amerika	Ferro <i>et al.</i> , 1975
	29 ⁴	Labor	N. Amerika	Ferro <i>et al.</i> , 1975
	17 ⁴	Labor	N. Amerika	Ferro <i>et al.</i> , 1975
	14,4 ¹	Feld	Kanada	MacLellan, 1962
	22,1 ^{1,2b}	Feld	Kanada	MacLellan, 1977 (9 Jahre)
	1-5 ^{2b}	Feld	USA	Riedl & Croft, 1978
	32-43 ¹ , 19-23 ^{2a}	Feld	N. Amerika	Summerland & Steiner, 1943
	12-62	-	Kanada	Hagley, 1972b
	18-35	Labor	N. Amerika	Hathaway <i>et al.</i> , 1971
	5-18	Feld	N. Seeland	Wearing, 1979
	3,8			Lischke, 1992
L1-Stadium	62	Feld	N. Amerika	Ferro <i>et al.</i> , 1975
	72	Feld	N. Amerika	Ferro <i>et al.</i> , 1975
	63	Labor	N. Amerika	Ferro <i>et al.</i> , 1975
	63	Labor	N. Amerika	Ferro <i>et al.</i> , 1975
	69	Feld	Kanada	McLellan, 1962
	55,4 ^{1,3b,5}	Feld	Kanada	McLellan, 1977 (9 Jahre)
	18,2 ^{3b}	-	Kanada	Hagley, 1972a
	66	-	N. Amerika	Hall, 1934
	10-55	Feld	N. Seeland	Wearing, 1979
	2,9			Lischke, 1992
L2-L5	67,8 ^{1,2b,5}	Feld	Kanada	MacLellan, 1977 (9 Jahre)
	43-66	Feld	N. Seeland	Wearing, 1979
L5 Stadium*	28 ^{1,3}	Feld	N. Amerika	Ferro <i>et al.</i> , 1975
	23 ^{2a}	Feld	N. Amerika	Ferro <i>et al.</i> , 1975
	14 ^{1,3}	Labor	N. Amerika	Ferro <i>et al.</i> , 1975
	5 ^{2a}	Labor	N. Amerika	Ferro <i>et al.</i> , 1975
	39,9 ^{5,1,1a,3}	Feld	Kanada	McLellan, 1977 (9 Jahre)
	14-30 ^{1b}	Feld	N. Amerika	Jaynes & Marucci, 1947
	94 ¹	Feld	Kanada	McLellan, 1960
Puppen	2,8	Feld	N. Amerika	Ferro <i>et al.</i> , 1975
	5	Feld	N. Amerika	Ferro <i>et al.</i> , 1975
	2-14		N. Seeland	Wearing, 1979
	8,5			Lischke, 1992
Adult	2,5			Lischke, 1992

* L5-Stadium nach Verlassen des Apfels.

Das Temperaturminimum, unterhalb dessen keine Entwicklung stattfindet, unterscheidet sich für *C. pomonella* leicht zwischen den Stadien, doch wird der Einfachheit halber 10°C generell als Basislinie verwendet (in CMISS; Riedl & Croft, 1978; Jorgensen *et al.*, 1979; Howell & Neven, 2000). Die Anzahl der benötigten Gradtage für die jeweiligen Stadien sind in Tab. 4.2 zusammengefasst. Die Embryonalentwicklung im Freiland dauert bei 12°C 26 Tage, bei etwa 26°C sind es 6 Tage (Andermatt *et al.*, 1988). Um die Entwicklung der Larven unter Freilandbedingungen noch genauer zu simulieren, können außerdem die mikroklimatischen Effekte im Apfelbaum bzw. im Apfel berücksichtigt werden (Gold *et al.*, 1987).

Tab. 4.2: Notwendige Temperatursummen für die Entwicklung von *C. pomonella*. Modifiziert nach der CMISS Datenbank.

Stadium	Mittelwert der benötigten Gradtage	95% Konfidenz-interval	Referenz
L1	54,59	(53,10-56,08)	Setyobudi, 1990
L2	55,75	(53,09-58,41)	Setyobudi, 1989
L3	33,18	(28,32-38,04)	Setyobudi, 1989
L4	21,20	(17,50-24,80)	Setyobudi, 1989
L5	124,24	(115,2-132,96)	Setyobudi, 1989
Puppe	222,2		Pickel <i>et al.</i> , 1986
Puppe	152,30	(147,43-157,17)	Setyobudi, 1989

4.1.3 Reproduktionsrate & Geschlechterverhältnis

Für die Reproduktionsrate wird hauptsächlich die Legeleistung der Weibchen berücksichtigt (Tab. 4.3). Wetterverhältnisse, Populationsdichte und Geschlechterverhältnis tragen zusätzlich zur Reproduktionsrate bei (siehe Tab. 4.5 in Abschnitt 4.1.5), dienen einem Modell jedoch nicht zum weiteren Verständnis des Systems Apfelwickler – CpGV.

Tab. 4.3: Die Legeleistung der Weibchen (Eier pro Weibchen) mit Standardabweichung (S.D.) und Standardfehler (S.E.). Daten aus der CMISS Datenbank, (n = Anzahl der Studien).

	Labor	Freiland
Mittelwert	88,24	46,70
S.D.	58,32	18,24
S.E.	14,6	3,9
n	17	23

Nach Hall (1929) liegt bei Faltern im Frühjahr der Anteil der Weibchen bei 56,5%. In einer Studie von McLellan (1977) war der Anteil der Weibchen, die größtenteils in Ringen aus Sackleinen um den Stamm gefangen wurden, bei 51,5%. Ebenso konnten Glen *et al.* (1981) ein Verhältnis von 1:1 und Geier & Briese (1978) ein ähnliches von $1,16 \pm 0,06$ (Männchen/Weibchen) feststellen. Außerdem hatte MacLellan (1972) beobachtet, dass in Obstbau-Anlagen das Geschlechterverhältnis von Weibchen zu Männchen umgekehrt proportional zu der Falterdichte ist.

Für den Apfelwickler existiert demnach generell ein 1:1 Geschlechterverhältnis, doch hat der Versuch zur vertikalen Transmission gezeigt, dass sich das Geschlechterverhältnis bei einer subletalen CpGV-Infektion zu Gunsten der Männchen verschieben kann. Das Geschlechterverhältnis ist im Modell ein essentieller Teil der Apfelwicklerpopulationsdynamik, wenngleich das verschobene Verhältnis bei einer subletalen Infektion derzeit noch nicht integriert wurde.

4.1.4 Zeitpunkt der Apfelwicklerentwicklung

Zusätzlich zu einer mit der Temperatur korrelierten Entwicklung ist für Berechnungen der Apfelwicklerpopulation auch der Zeitpunkt dieser Entwicklung wichtig. Gottwald (1996) berechnet den Eiablagebeginn indem er die Gradstunden über der Schwelle 10°C ab dem 1. März addiert. Ab einer Gradstundensumme von 5700 erfolgt die Eiablage. Tab. 4.4 zeigt ein Beispiel für die Schlupfzeitpunkte in einem wärmeren deutschen Gebiet mit zwei Apfelwickler Generationen.

Tab. 4.4: Berechnete Schlupfzeitpunkte von Apfelwicklerlarven in frühen Lagen. Daten aus Walder (1999).

Gradtage	Anteil der geschlüpften Larven
0 (Biofix)	Flugbeginn
140	3 % Larven der 1. Gen.
555	100 % Larven der 1. Gen.
655	3 % Larven der 2. Gen.
1189	100 % Larven der 2. Gen.

Tab. 4.5: Relevante Daten aus der Literatur für die Populationsdynamik des Apfelwicklers. Modifiziert nach Geier & Briese, 1978.

Parameter	Eigenschaft	Referenz
Reproduktionsverhalten	<i>Photoperiode</i> : lange Photoperioden in den frühen Entwicklungsstadien (1) maximiert die Anzahl der Eier/ Weibchen (2) minimiert die Frequenz ungepaarter Weibchen	(1) Deseö & Saringer, 1975 (2) Geier & Briese, 1978
Eier pro Weibchen	<i>Befallsdichte</i> : bei einer hohen Befallsdichte kann die Anzahl der Eier pro Ovariole reduziert sein	Ferro & Harwood, 1973
Eiablage	<i>Wind</i> : kein Falterflug bei Wind 1 od. auch mehrere Eier wurden auf einem Apfel gefunden, der bereits eine junge Larve enthielt <i>Ort</i> : siehe auch Tab. 4.6	Borden, 1931 Washburn, 1893
Fruchtbarkeit der Eier	<i>Photoperiode</i> : lange Photoperioden in den frühen Entwicklungsstadien maximiert die Fruchtbarkeit der Eier (1) und die Frequenz gepaarter Weibchen (2)	(1) Geier & Briese, 1978 (2) Deseö, 1973
Entwicklungsrate	<i>Photoperiode</i> : lange Photoperioden beschleunigen die Entwicklung der prä-Imagines <i>Befallsdichte</i> : Larvenentwicklung ist bei hoher Befallsdichte verzögert	Geier & Briese, 1978 Ferro & Harwood, 1973
Immigration	<i>Flugentfernung</i> : bis zu 11 km; 16,7% der ungepaarten u. 10% der gepaarten ♂ sowie 20% der ungepaarten u. 7,4% der gepaarten ♀ flogen über 5 km in einer Flugmühle	Schumacher <i>et al.</i> , 1997
Vorzeitiger Tod von Adulten	<i>Temperatur & relative Luftfeuchte (RH)</i> : bei >30°C und <50% RH sterben Adulttiere frühzeitig <i>Geschlechterverhältnis</i> : ein übermäßiger Anteil an Männchen kann durch Überpaarung zu einem frühzeitigen Tod der Weibchen führen	Hagley, 1972b Hathaway <i>et al.</i> , 1970
Wintermortalität	<i>Dichteabhängigkeit</i> : die Wintermortalität ist bei Diapause-larven z. T. erheblich und wird als abhängig von der Apfelwicklerdichte beschrieben (1), hängt lediglich von der Anzahl sicherer Kokonunterschlüpfte ab (2)	(1) McLellan, 1977 (2) Geier, 1961

4.1.5 Weitere für die Populationsdynamik wesentliche Faktoren

In der Literatur ist eine Vielzahl an biologischen Parametern des Apfelwicklers beschrieben, die für ein Modell wie GRANULO (Kap. 6) jedoch zu speziell sind. Dennoch sind einige in Tab. 4.5 und Tab. 4.6 aufgelistet, um Abweichungen, die durch ein vereinfachtes Modell entstehen, besser zu erklären.

Tab. 4.6: Zusammenfassung der Orte der Eiablage für die 1. und 2. Generation von *C. pomonella*.

Gen.	Abgelegte Eier (%)						Referenz
	Blatt		Frucht			Ast	
	Oberseite	Unterseite	Stielgrube	Kelchgrube	sonstig		
1.	22-39	17-18	1-3	0-1	3-7	—	Blago & Dickler, 1990
2.	22-15	12-27	13-20	3-7	4-10	—	Blago & Dickler, 1990
1.	45	27	6			22	Audemard, 1976
2.	25	27	20			28	Audemard, 1976
	53	30	16			—	McLellan, 1962

4.1.6 Relevantes Verhalten für die horizontale Transmission von CpGV

In Kap. 3.1.6.1 wurde bereits auf das Verhalten der Apfelwicklerlarven eingegangen. In Tab. 4.7 sind mögliche Infektionsquellen und die für eine horizontale Übertragung des Virus relevanten Daten nochmals in Tabellenform umfassender zusammengefasst.

Tab. 4.7: Verhaltenstypische Daten aus der Literatur, die für das System Apfelwickler-CpGV relevant sind.

Parameter	Eigenschaft	Referenz
Infektionsquelle und -zeitraum (CpGV)	<i>Nicht auf der Ei-Schale:</i> mit Virus bespritzte Eier verursachen keine Mortalität	Glen & Clark, 1985
	<i>Vor dem eigentlichen Anfressen:</i> Die Virusaufnahme war unabhängig vom aktiven Fressen. Larven konnten sich innerhalb 3,5 min durch Grasen und Überqueren einer mit Virus bedeckten Fläche infizieren.	Ballard <i>et al.</i> , 2000
	<i>Kontinuierlich:</i> Larven konnten vor dem Einbohren, kurz nach dem Einbohren und bis zum Vordringen zum Kerngehäuse mit dem Virus infiziert werden	Sheppard & Stairs, 1976
Verhalten	<i>Außerhalb des Apfels:</i> (1) 90% der Larven verbringen mindestens 10 min auf Blättern, ehe sie eine Frucht aufsuchen (2) Eilarven, die auf eine Frucht gesetzt werden, finden nach einigen Minuten bis zwei Stunden eine geeignete Fraßstelle; das Einbohren dauert 1-2,5 h	(1) Glen & Clark, 1985 (2) Geier, 1963
	<i>Fraßstellen:</i> Bevorzugt wurden Unebenheiten auf der Frucht und Stellen an denen sich Früchte oder eine Frucht und ein Blatt od. Zweig berührten (1),(2); 73% auf der Seite, 27% im Kelch (1); 22% auf der Seite, 26% beim Stiel, 52% beim Kelch (3); Die Fraßstellen unterscheiden sich je nach Fruchtsorte, Region, Wetter (2)	(1) Hall, 1929 (2) Audemard, 1976 (3) Glen & Clark, 1985
	<i>Anfressen der Eilarven:</i> Beim Eindringen in den Apfel fressen die Larven keine Schale. Erst das Fruchtfleisch wird gefressen.	Simpson, 1903 Hall, 1929 Audemard, 1976 Andermatt <i>et al.</i> , 1988
	<i>Einbohrdauer:</i> 43,5±24,5 min (n=17) (1); 15-200 min (2) (3); die benötigte Zeit hängt von Temperatur, Lichtverhältnissen, Apfelsorte und der Vitalität der Larven ab (3) (4).	(1) Jackson, 1982 (2) Hoerner, 1925 (3) Hall, 1934 (4) Smith, 1926
	<i>Bei Regen:</i> bei nassem Wetter können Larven ihren Tunnel verlassen und fressen sich entweder in die gleiche Frucht oder in eine andere.	McLellan, 1962
	<i>Dichte:</i> meist eine Larve pro Apfel, gelegentlich bis zu 3 – Beobachtungen im Freiland (1)(2)(3); in einem Freilandversuch waren etwa 10% der Äpfel mehrfach angefressen (2); in Versuchen überleben 20% bei 10 Larven pro Apfel, 30% bei einer Dichte von 5-6 Larven, 45% bei 2-3 und 60% bei einer Larve (4). Wenn 2 Larven in einem Apfel vorhanden sind, dann sind sie generell von unterschiedlicher Größe (5)	(1) Garlick, 1948 (2) Wearing, 1979 (3) Geier, 1961 (4) Jackson, 1982 (5) Howard, 1887
Besiedlung von Äpfeln		

4.2 Experimentelle Daten zur Populationsdynamik des Apfelwicklers

4.2.1 Temperaturspezifische Entwicklung

Laborbeobachtungen, die parallel zu den Infektionsversuchen in Abschnitt 3.1.2 angestellt wurden, zeigten, dass sich die Entwicklungsdauer vom ersten Larvenstadium bis zum Puppenstadium ab 15°C bei zunehmender Temperatur bis 32°C von 49 auf 16 Tage verringerte (Abb. 4.1, Tab. 4.8). Dabei wurde die maximale Entwicklungsrate bereits bei 26°C erreicht.

In einer Studie von Pitcairn *et al.* (1991) wurde mit den Entwicklungszeiten von Eiern, Larven und Puppen bei Temperaturen von 8,9°C, 10,0°C, 11,1°C, 12,2°C, 15,6°C, 25,6°C, 27,8°C, 30,0°C, 32,2°C und 34,4°C untersucht. Bei 12,2°C und darunter konnte keine Entwicklung in den jeweiligen Stadien gemessen werden. Bei Temperaturen bis zu 25,6°C verlief die Entwicklung der Larven ähnlich wie den in Abb. 4.1 und Tab. 4.8 dargestellten Daten und betrug bei 25,6°C beispielsweise $17,14 \pm 0,53$ Tage. Im Gegensatz zu eigenen Beobachtungen zeigte diese Arbeit bei höheren Temperaturen jedoch keine stagnierende, sondern eine kürzer werdende Entwicklungsdauer, die bei 32,2°C nur noch $11,27 \pm 0,25$ Tage betrug. Bei 34,4°C starben nicht nur Larven, sondern auch Puppen. Lediglich die Eier konnten sich bei dieser Temperatur, wenngleich auch etwas langsamer, weiterentwickeln.

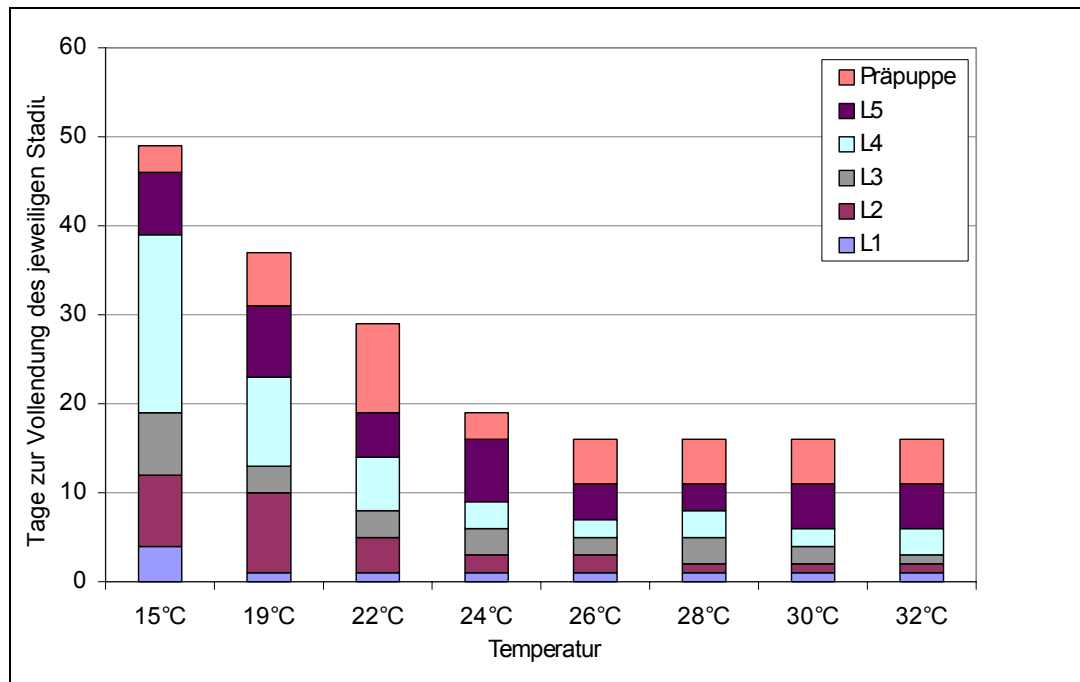


Abb. 4.1: Entwicklungsdauer der einzelnen Larvenstadien von *C. pomonella*. Angegeben ist die Dauer in der 50% der Tiere das entsprechende Stadium erreicht hatten. Diese von uns erhobenen Daten wurden im Modell verwendet.

Tab. 4.8: Entwicklungsdauer der einzelnen Larvenstadien. Zeit (in Tagen) in der 50% der Tiere das entsprechende Stadium erreicht hatten.

Entwicklungs- stadium	Entwicklungsdauer (Tage)							
	15°C	19°C	22°C	24°C	26°C	28°C	30°C	32°C
L1	4	1	1	1	1	1	1	1
L2	8	9	4	2	2	1	1	1
L3	7	3	3	3	2	3	2	1
L4	20	10	6	3	2	3	2	3
L5	7	8	5	7	4	3	5	5
Präpuppe	3	6	10	3	5	5	5	5

4.2.2 Relevantes Verhalten für die horizontale Transmission des CpGV

Für Laborversuche über die horizontale Transmission war es wichtig zu wissen, wie viele Larven sich auf einem Apfel entwickeln können. Bei extrem unrealistischen Dichten von 10 Larven pro Apfel, hatte zwar ein relativ großer Anteil der Larven überlebt ($46 \pm 14\%$, Tab.4.9), doch waren die meisten der Larven sehr klein und unterentwickelt. Generell konnten nur eine, gelegentlich auch zwei, manchmal drei L4- und L5-Larven im Kerngehäuse gefunden werden. Die Überlebensraten in diesem Versuch waren höher als die von Jackson (1982) in Tab. 4.7 dargestellten Überlebensraten bei höheren Dichten.

Tab. 4.9: Anteil der überlebenden Larven (%) bei unterschiedlich dichter Apfelbesiedlung. Hierfür wurden 1-10 frisch geschlüpfte Eilarven auf jeweils einen Apfel gesetzt und deren Überlebensrate nach 3 Wochen ausgewertet.

Anzahl Larven pro Apfel	Überlebende (%) $\pm$ S.D.	n (Stichpro- benumfang)
10	46 ± 14	14
5	56 ± 17	16
3	62 ± 28	21
2	80 ± 28	15
1	81 ± 40	21

5 Methoden zur Quantifizierung von Viren in Umweltkompartimenten

In der Vergangenheit wurden Viren in Umweltproben überwiegend mittels Biotests nachgewiesen (Undorf, 1991, Lopez-Pila, 1988). In diesen Biotests wurden den Larven die Umweltproben angeboten und die Mortalität mit einem Virus-Standard mit bekannter Konzentration verglichen. Bei einem solchen Nachweis können nur aktive, infektiöse Viren nachgewiesen (Kap. 5.1) werden. Einen alternativen Nachweis von Baculoviren in der Umwelt stellt der direkte DNA-Nachweis mittels der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) dar, bei der die virale DNA durch eine enzymatische Reaktion vermehrt wird (Kap. 5.2). Dieser Nachweis ist sensitiver, unterscheidet jedoch nicht zwischen infektiösen und inaktiven Viren.

Verlässliche Untersuchungen zum Verbleib und zur Ausbreitung von Baculoviren, die in die Umwelt eingebracht wurden, erfordern, dass man den Virusgehalt in den einzelnen System-Komponenten (Pflanzen, Boden und Sickerwasser) quantitativ bestimmen kann. Virusbeläge auf Pflanzen lassen sich relativ einfach und schnell untersuchen, indem die viralen OBs mit Hilfe einer Detergenzlösung (0,1 % SDS) von den Pflanzen abgewaschen werden. Anschließend werden die OBs durch Zentrifugation aufkonzentriert, und der Titer wird mikroskopisch bestimmt. Ähnlich kann auch der Virusgehalt des aus Boden aufgefangenen Sickerwassers bestimmt werden (Undorf, 1991).

Sehr viel schwieriger erweist sich die Bestimmung der Virusmenge im Boden selbst, da die OBs je nach Bodenart und Zusammensetzung unterschiedlich adsorbiert werden (Bitton, 1980 & Dizer, 1988) und durch Anwendung verschiedener Elutionsverfahren mit unterschiedlicher Effizienz aus dem Boden extrahiert werden können. Die von Evans *et al.* (1980) beschriebene Methode eignet sich für die Standardisierung der Extraktion (Undorf, 1991). Direktes Auszählen der OBs in den auf diese Art gewonnenen Bodenextrakten kann jedoch unpraktikabel sein, da die OBs optisch nicht von den Kleinstbodenpartikeln zu unterscheiden sind und meist an ihrer Oberfläche aggregieren.

Zwar bietet die Literatur adäquate Methoden zur Demonstration von Nukleopolyhedroviren im Boden an; doch sind diese recht aufwändig, da sie auf Techniken der Immunofluoreszenz-Mikroskopie (Hukuhara, 1987) und der Proteinfärbung (Jaques, 1971) beruhen. Eine recht zuverlässige Methode für den quantitativen Nachweis der Viren ist dagegen der Biotest, mit dem die biologische Aktivität der Virusproben bestimmt werden kann.

5.1 Biotests zur Bestimmung der Virusmenge im Boden und auf Blättern

Werden im Biotest definierte Virusmengen in aufsteigender Konzentration eingesetzt, so können die hieraus gewonnenen Dosis-Wirkungs-Kurven auch als Eichkurven zur Berechnung von Versuchsproben mit unbekannter Virusmenge herangezogen werden. Für die Bestimmung der Virusmenge in Bodenproben finden zwei Methoden Verwendung. Die Viren können entweder über die von Evans *et al.* (1980) beschriebene Methode extrahiert werden und im Biotest in das Nährmedium gemischt werden oder die Bodenproben können direkt in das Nährmedium gemischt werden (Undorf, 1991). Ein Beispiel für Eichkurven für die Bestimmung des extrahierten Virusgehalts ist in Abb. 5.1 dargestellt. Die zweite Methode eignet sich besonders bei Bodenproben mit geringem Virusgehalt, kann aber nur in relativ kurzen Biotests (6 Tage) angewendet werden, da die Mortalität der Larven durch vermehrtes Pilzwachstum und bakterielle Kontamination sonst deutlich höher ist.

Zur Berechnung unbekannter Virusmengen in den Versuchsproben werden die oben erwähnten Dosiswirkungskurven (Eichkurven) zunächst durch Transformation der Mortalitätsprozentwerte in Probit-Einheiten in eine Gerade überführt. Durch Einsetzen der im Biotest mit Versuchsproben registrierten Probit-Mortalität in die Geradengleichung, lässt sich der Einschlusskörper-Gehalt in der Bodenproben über folgende Beziehung berechnen, wobei p für Probe und E für Eichkurve steht:

$$\log \text{Konzentration}_p = \frac{\text{Probit Mortalität}_p - (5 - (\log \text{LC}_{50\text{E}} \times \text{Steigung}_E))}{\text{Steigung}_E}$$

Der LC-Wert sowie die Steigung werden aus den Regressionsgeraden der Eichkurven abgeleitet. Eine exemplarische Zusammenstellung von LC-Werten für das AcMNPV aus Bodenproben und der zugehörigen Steigungswerte, die aus den einzelnen Eichkurven der verschiedenen Virus-Wirt-Systeme bzw. Virus-Boden-Varianten ermittelt wurden, ist in Tab. 5.1 zu finden.

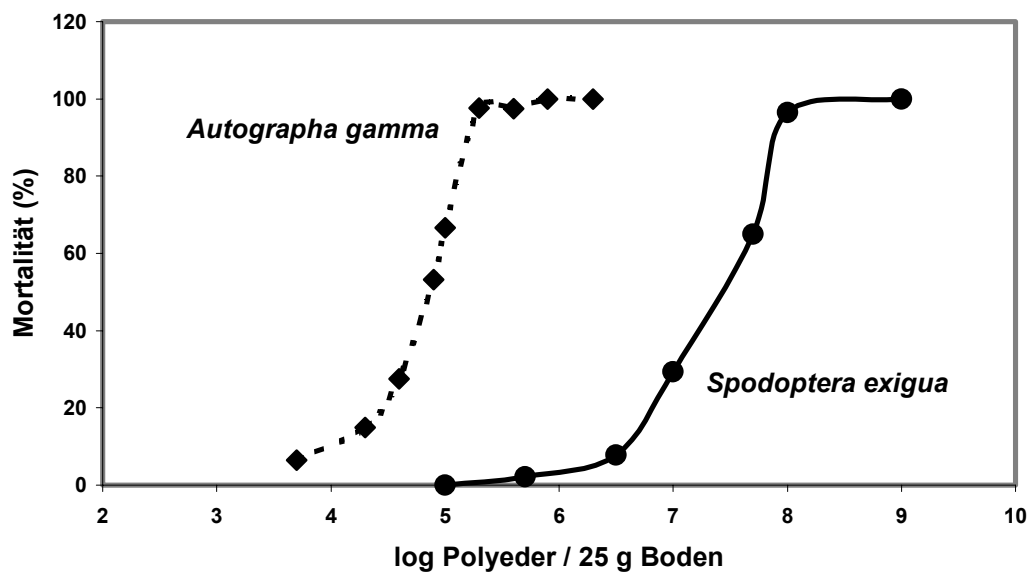


Abb. 5.1: Eichkurven zur Bestimmung von unbekannten Virusmengen von AcMNPV in Erdproben einer künstlichen Mischerde (bestehend zu 50 % Kompost, 25 % Sand und 25 % Torf) nach Extraktion mit 0,1%iger SDS-Lösung. Die Aktivitätsbestimmung der Bodenextrakte erfolgte im 12-Tage-Biotest bei 26 °C mit Eilarven von *A. gamma* und *S. exigua* (Undorf, 1991).

Tab. 5.1: Parameter zur Berechnung der Viruskonzentrationen in Bodenextrakten. LC₅₀-Werte und Steigung der Wirkungsgeraden aus Biotests mit Extrakten aus Bodenproben mit definierten Viruskonzentrationen (Undorf, 1991).

Variante	LC ₅₀ (OB/25 g Boden) (95 % Vertrauensgrenzen)	Steigung (± S.D.)
AcMNPV/ <i>S. exigua</i> künstliche Mischerde	1,9 x 10 ⁷ (1,1 – 3,5 x 10 ⁷)	1,65 (± 0,22)
AcMNPV/ <i>S. exigua</i> Lehm	2,9 x 10 ⁶ (2,4 – 3,5 x 10 ⁶)	1,46 (± 0,08)
AcMNPV/ <i>A. gamma</i> künstliche Mischerde	5,8 x 10 ⁴ (3,9 – 8,4 x 10 ⁴)	2,14 (± 0,33)

Bei der Bestimmung der Virusmenge auf Blättern mittels Biotest gibt es wiederum zwei Methoden. Das Virus kann entweder abgewaschen werden und anschließend für den Biotest mit semi-synthetischen Nährmedium vermischt werden oder die Blätter können den Larven im Biotest direkt angeboten werden. Wird das Virus abgewaschen, können die aus den Biotestergebnissen ermittelten LC₅₀-Werte (µl/ml Medium) mit den LC₅₀-Werten (OB/ml Medium) aus Standard-Biotests direkt verglichen werden. Zur Abschätzung eventuell noch verbleibender Virusrückstände an den bereits gewaschenen Pflanzen, wird das Blattmaterial luftgetrocknet und gewogen. Anschließend werden die getrockneten Blätter mit einem Mörser zerkleinert und zur Aktivitätsbestimmung ebenfalls ins Biotest-Medium eingerührt. Die anhand der Virusmortalität bestimmte Restaktivität wird bei der Bilanzierung der Gesamtvirusmenge auf den Pflanzen berücksichtigt.

Bei Biotests in denen die Blätter den Larven direkt angeboten werden, müssen gleichgroße Blattrondelle verwendet werden, die so groß sind, dass sie von der Testlarve innerhalb der vorgesehenen Versuchsdauer komplett verzehrt werden. Um bei diesen Biotests eine Virusquantifizierung zu ermöglichen, müssen vorab Eich-Biotests mit Blattrondellen durchgeführt werden, die mit definierten Virusmengen kontaminiert werden. Hierzu eignen sich fünf verschieden konzentrierte Virussuspensionen. Die mit Hilfe der Probit-Analyse erstellten Dosis-Wirkungskurven liefern LC₅₀-Werte und die Parameter

der Geradengleichung, die wie bereits beschrieben zur Berechnung von unbekannten Virusmengen herangezogen werden.

5.2 Virus-Nachweis mittels PCR (Polymerase-Ketten-Reaktion)

Zur Detektion von CpGV in Umweltkompartimenten wurde ein DNA-Nachweisverfahren etabliert, das auf der PCR beruht. Zu Beginn der Arbeiten lag lediglich die Sequenz für das CpGV-Ganulingen vor (Crook *et al.*, 1997). Die für die PCR verwendeten Primerpaare basierten deshalb auf der Granulinsequenz (siehe Tab. 5.2 für die Primersequenz). Mittlerweile ist die komplette Sequenz des CpGV bekannt (Luque *et al.*, 2001), so dass heute PCR-Nachweise von weiteren CpGV-spezifischen Sequenzen etabliert werden könnten. Bei PCR-Nachweisen von CpGV in Larven-, Boden- und Pflanzenproben wurden die Primerpaare PRCP1 und nestedPRCP1 verwendet.

Tab. 5.2: Beschreibung der verwendeten PCR Primer.

Primer	Sequenz	Produktlänge
PRCP1U	5'-GAA TAC GGC ACC AGA TAC AC-3'	1210 bp
PRCP1L	5'-AGA TGA TGA TTT AGA CAA CTT AG-3'	
nestedPRCP1U	5'-GGC CCG GCA AGA ATG TAA GAA TCA-3'	422 bp
nestedPRCP1L	5'-GTA GGG CCA CAG CAC ATC GTC AAA-3'	

Reaktionszusammensetzung und Programme für die PCR der jeweiligen Primerpaare:

Reagenz	Endkonzentration
PCR-Puffer (Gibco LifeTechnologies)	1 x
dNTP mix	je 0,2 mM
MgCl ₂	2,5 mM (PRCP1 Primer) bzw. 1,5 mM nested Primer
Primer-Mix	je 0,5 mM
Template DNA	—

Reagenz	Endkonzentration
Taq DNA Polymerase (Gibco Life Technologies)	1,25 units
autoklaviertes destilliertes Wasser	auf 50µl auffüllen

Primerpaar PRCP1:

① 2 min 94°C, ② 1 min 94°C, ③ 0,45 min 52°C, ④ 0,45 min 72°C, ⑤ 5 min 72°C; 35 Zyklen ②-⑤

Primerpaar nested PRCP1:

① 2 min 94°C, ② 1 min 94°C, ③ 1 min 60°C, ④ 0,30 min 72°C, ⑤ 7 min 72°C; 30 Zyklen ②-⑤

(①,② Denaturierung; ③ Primer-Bindung, ④,⑤ Kettenverlängerung)

Nachweis von CpGV in Larven

Mit dem Primerpaar PRCP1 und 0,25 µg genomischer *C. pomonella*-DNA als Hintergrund lag die Nachweisgrenze einer PCR bei 1×10^3 Viruspartikeln. Diese Nachweisgrenze blieb bestehen, wenn die PCR mit CpGV-Einschlusskörpern statt mit der bekannten Menge an aufgereinigter CpGV-DNA, durchgeführt wurde. Da diese Nachweisgrenze für eine latente Infektion noch immer zu hoch erschien, wurde eine auf dem Nachweis des Granulin-Gens basierende nested PCR etabliert. Das Primerpaar der nested PCR liegt innerhalb der bereits amplifizierten Granulinsequenz (Abb. 5.2) und erzeugt in einer zweiten Reaktion ein PCR-Produkt mit einer Länge von 422 bp. Für die nested PCR wurden Primer mit einer höheren Schmelztemperatur gewählt, so dass die Primer der Primärreaktion die zweite Reaktion nicht beeinträchtigte. Die Nachweisgrenzen der beiden Reaktionen wurden bestimmt, indem unterschiedliche Mengen von Virus-DNA der Insekten-DNA zugefügt wurden. Mit Hilfe der eingesetzten DNA-Menge und der Virusgenomlänge konnte die in den PCR-Ansätzen enthaltene Anzahl viraler Genome berechnet werden. Bei der nested PCR lag die Nachweisgrenze von CpGV-DNA und auch CpGV-Einschlusskörpern bei 10 Viruspartikeln. Der Nachweis mit der nested PCR ist jedoch so empfindlich, dass auch in nicht infizierten *C. pomonella*-Larven ein Virus spezifisches Signal erhalten wurde, was auf eine latente Infektion

oder eine mögliche Kontamination schließen ließ. Die Bestimmung der Nachweisgrenzen wurde deshalb mit genomischer DNA, die aus dem für CpGV weniger suszeptiblen Insekt *Cryptophlebia leucotreta* stammte, durchgeführt.

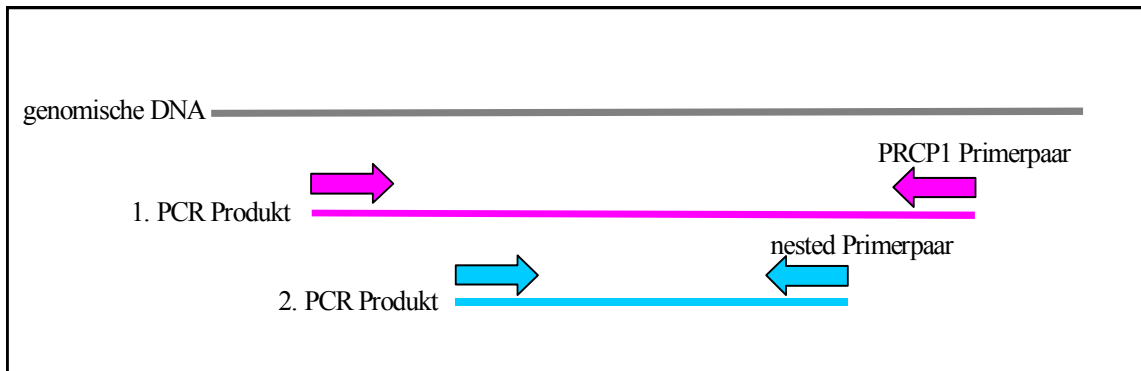


Abb. 5.2: Schematische Darstellung der nested PCR.

In den bisher beschriebenen Versuchen wurde die DNA mit einem Phenolisierungsprotokoll isoliert, doch erwies sich dieses Verfahren für große Probenmengen als zu arbeitsaufwändig. Eastwell *et al.* (1999) verwendeten in ihrer Arbeit eine einfachere, schnellere Methode in der sie die Larve mörsern, in Detergens und NaOH kochen, neutralisieren und abzentrifugieren. Mit einem hundertstel dieser Lösung als Hintergrund in einer PCR mit dem Primerpaar PRCP1, lag die Nachweisgrenze bei 1×10^4 Einschusskörpern. Die Nachweisgrenze der nested PCR lag ebenso wie bei dem Phenolisierungsprotokoll bei 10 Einschusskörpern.

Um eventuelle Verluste bei dieser Methode besser abschätzen zu können, wurden drei *C. leucotreta*-Larven unterschiedliche Mengen an CpGV (5×10^3 , 5×10^4 , 5×10^5) zugefügt und anschließend die DNA nach Eastwell *et al.* (1999) isoliert. Dabei konnten in der ersten PCR mit dem PRCP1 Primerpaar 5×10^4 OB in einer Larve, nicht aber 5×10^3 OB nachgewiesen werden (Abb. 5.3). Hingegen konnte in der nested PCR bei allen drei Konzentrationen CpGV nachgewiesen werden (Abb. 5.4). Die Verluste scheinen somit

sehr gering zu sein. Mit Hilfe dieses vereinfachten DNA Isolierungsprotokolls und der hoch empfindlichen nested PCR können die Larvenproben aus den Versuchen zur vertikalen Transmission rasch und sensitiv analysiert werden.

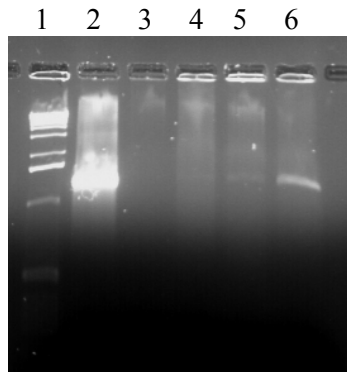


Abb. 5.3: PCR mit dem PRCP1 Primerpaar. 1) 1 kb Ladder, 2) positiv Kontrolle, 3) H₂O Kontrolle, 4) Larve mit 5×10^3 OB CpGV, 5) Larve mit 5×10^4 OB CpGV, 6) Larve mit 5×10^5 OB CpGV.

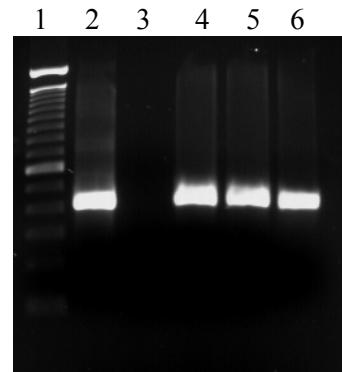


Abb. 5.4: PCR mit dem nested Primerpaar. 1) 100 bp Ladder, 2) positiv Kontrolle, 3) H₂O Kontrolle, 4) Larve mit 5×10^3 OB CpGV, 5) Larve mit 5×10^4 OB CpGV, 6) Larve mit 5×10^5 OB CpGV.

Nachweis von CpGV in Umweltproben

Um die Nachweisgrenze der PCR-Reaktionen mit reinem CpGV zu überprüfen, wurde zunächst mit einer CpGV-DNA-Lösung eine Verdünnungsreihe erstellt. Mit dieser Verdünnungsreihe konnten in der Ausgangs-PCR eine Nachweisgrenze von 640 fg/Reaktion, und in der nested PCR eine Nachweisgrenze von 64 fg/Reaktion erreicht werden.

Ähnlich wurde später die Sensitivität der PCR mit isolierter DNA aus Umweltproben getestet. Hierfür wurden acht Verdünnungen (10^0 - unverdünnt, entspricht $2,2 \times 10^{13}$ OB/l - bis 10^{-7} - entspricht $2,2 \times 10^6$ OB/l) des CpGV-Insektizids, Granupom®, mit Boden- und Pflanzenproben vermischt („Spiken“). Die Boden- und Pflanzenproben wurden von einer beliebigen Wiese gesammelt. Der Erdboden wurde von der oberen Bodenschicht abgetragen, wobei darauf geachtet wurde, dass der pflanzliche Material-

anteil möglichst gering war. Anschließend wurde der Boden gesiebt, um ihn besser mischen und portionieren zu können. Das Pflanzenmaterial wurde an der gleichen Stelle wie der Erdboden gesammelt und in kurze Stücke zerschnitten, um ebenfalls die Mischung und Portionierung zu erleichtern. Jeweils 1 g Boden- und Pflanzenmaterial wurde mit 200 µl Virus-Lösung ($4,4 \times 10^9$ OB) gründlich vermischt.

Um den eventuellen Einfluss einer (zeitabhängigen) Adsorption der Viruspartikel an Boden- oder Pflanzenmaterial zu ermitteln, wurde die Mischung unterschiedliche Zeiten vor der Isolierungsprozedur inkubiert. Nach 1 Stunde und 24 Stunden Inkubation bei Raumtemperatur wurde die DNA mittels des „*UltraClean Soil DNA Kit*“ (MO BIO Laboratories, Inc.) aus den Proben eluiert. Von 1 g Material wurden 0,25 g in die DNA-Isolierung eingesetzt. Die genaue Vorgehensweise ist im Protokoll des Kits beschrieben. Das Elutionsvolumen betrug 50 µl, so dass die theoretische Viruskonzentration im Eluat jener der zugemischten Virus-Lösung entsprach. Von den Eluaten wurden zunächst unter Verwendung von 1 µl Template-DNA in einer PCR mit dem PRCP1 Primerpaar keine Produktbanden in einem mit Ethidium-Bromid gefärbten Agarose-Gel nachgewiesen. Die Eluate wurden daher 1:10 verdünnt in die Ausgangs-PCR eingesetzt, um mögliche Hemmstoffe der PCR in der Präparation zu verdünnen. Gleichzeitig wurde zur Senkung der Nachweisgrenze eine nested PCR durchgeführt. Dazu wurde 1 µl PCR-Produkt aus der Ausgangs-PCR (PRCP1-Primer) als Template-DNA in die nested PCR eingesetzt.

Tab. 5.3: Nachweisgrenzen vom CpGV in Boden- und Pflanzenproben mittels PCR.

Proben- material	Adsorptions- zeit (h)	Nachweisgrenze (in OB CpGV pro Reaktion)	
		PRCP1 PCR	nested PCR
Boden	1	$2,2 \times 10^2$	$2,2 \times 10^1$
Boden	24	$2,2 \times 10^3$	$2,2 \times 10^2$
Pflanzen	1	$2,2 \times 10^3$	$2,2 \times 10^3$
Pflanzen	24	$2,2 \times 10^3$	$2,2 \times 10^4$

Die beim *Spiken* von Umweltmedien erreichten Nachweisempfindlichkeiten (Tab. 5.3) sind befriedigend, könnten aber möglicherweise durch Protokollvariation (speziell für Pflanzenmaterial) noch verbessert werden. Eine Quantifizierung der Anzahl vorhandener Ziel-Moleküle in unbekannt exponierten Proben ist derzeit über den Vergleich mit *gespikten* Proben nur annäherungsweise möglich. Diese müssten unexponiert, aber möglichst identisch mit dem analysierten Probenmaterial sein. Wenn die vorliegende Probe selbst *gespikt* werden soll, so muss das mit einer Virusvariante mit spezieller Zielsequenz für den DNA-Nachweis durch PCR geschehen. Die PCRs für beide Zielsequenzen sollten mit identischer Kinetik verlaufen. Erst unter diesen Voraussetzungen ist auch an einen Einsatz einer aufwändigeren quantitativen PCR zu denken. Inwieweit es sinnvoll ist, für die Korrelation zwischen DNA-Zielsequenz / Viruspartikel durch Experimente eine empirische Basis zu erstellen, hängt von der jeweiligen experimentellen Fragestellung ab. Zu bedenken ist, dass etwa bei Virus-Inaktivierung diese Korrelation selbst starker Veränderung unterliegen kann. Beim experimentellen Einsatz mehrerer Virus-Varianten ließe sich das Konzentrationsverhältnis bei Anwendung einer solchen gemischten PCR relativ problemlos und ohne Kalibrierung durch *Spiken* ermitteln. Wenn keine unterschiedliche Inaktivierung der Virusvarianten unterstellt wird, träte hier auch das Problem der Interpretation des Zielsequenzen-Nachweises hinsichtlich der dem Nachweis zugrunde liegenden infektiösen Viruspartikel nicht auf. Für die Analyse von Endpunkten von Experimenten mit unterschiedlichen Virusvarianten und die Überprüfung von Modellierungsergebnissen könnte dies ein geeignetes Monitoring-Verfahren darstellen.

6 Das Modell GRANULO

6.1 Zielsetzung

Die Zielsetzung des Modells GRANULO besteht hauptsächlich im Studium der Auswirkungen von veränderten Viruseigenschaften (wie z.B. durch genetische Veränderung) auf das quantitative Verhalten des Virus aufgrund seines Wirtes im System und der speziellen Wechselwirkungen zwischen Virus (CpGV) und Wirt (Apfelwickler). Das Modell bietet den Vorteil, dass Veränderungen in den Viruseigenschaften hinsichtlich ihrer Auswirkungen auf das Wirt-Parasit-System geprüft werden können, ohne zunächst Viren mit solchen Eigenschaften labortechnisch herstellen zu müssen. Es ermöglicht somit, entsprechend zahlreiche Szenariorechnungen vorausgesetzt, mögliche Auswirkungen einer gentechnischen Veränderung auf die Populationsdynamik des Virus und des Wirtes abzuschätzen. Die Möglichkeit einer Einschätzung der langfristigen Persistenz und Etablierung eines veränderten Virus kann als Beitrag zu einer vorsorglichen Sicherheitsbeurteilung veränderter CpGV (und mit der Möglichkeit einer Modellvariation auch anderer Viren) angesehen werden.

Eine wichtige Voraussetzung für die Umsetzung dieser Zielstellung ist, dass der Modellnutzer die Möglichkeit erhält, alle den Virus beschreibenden Eigenschaften und Parameter in willkürlicher Weise einzustellen bzw. zu variieren. Diese Forderung wurde in GRANULO integriert und umgesetzt.

6.2 Modellbeschreibung

6.2.1 Allgemeine Angaben

GRANULO ist ein deterministisches und diskretes Modell. Das heißt, alle betrachteten populationsdynamischen Prozesse werden durch ihre Einflussfaktoren genau bestimmt und sind exakt berechenbar (deterministisch). Abundanz- bzw. Zustandsänderungen werden taktweise (zeitdiskret) bilanziert. Als Taktzeit des Modells wurde 1 Tag ausge-

wählt. Als Raumbezug wird 1 m² Blattoberfläche eines beliebigen Apfelbaumes angenommen. Als abiotische Einflussfaktoren auf das System wurden Temperatur (Stundenwerte, °C), Niederschlag (Tagessumme, $\frac{1}{10}$ mm) und Sonnenscheindauer (h/Tag) berücksichtigt.

Für die Simulation der Populationsdynamik wurden (wie bei Insektenmodellierungen üblich) die Prozesse Immigration, Reproduktion, Ontogenese und Mortalität berücksichtigt. Um den unterschiedlichen Entwicklungs- bzw. Alterszustand der einzelnen Individuen in den verschiedenen Kompartimenten berücksichtigen zu können, wurden alle Einzelindividuen, die am gleichen Tag zum aktuellen Kompartiment übergewechselt sind, in einer Altersklasse zusammengefasst und somit für jedes Apfelwickler-Kompartiment eine Altersklassenstruktur aufgebaut. Insofern unterscheidet sich dieses Modell nicht von anderen populationsdynamischen Modellen von Insekten.

Als Besonderheit im System CpGV/Apfelwickler muss für jedes Insekt zusätzlich zum Zustand *Alter* auch der Zustand *Gesundheit* betrachtet werden. Letzterer ist eine ja/nein bzw. 0/1-Größe. Eine Larve kann gesund und virusfrei oder virusinfiziert bzw. viruskontaminiert sein. Zusätzlich werden für die Abbildung der Wechselwirkungen zwischen Virus und Wirt die Prozesse *Infektion von L1-Larven* und *Virus-bedingte Mortalität der Larven* sowie die *Virusfreisetzung aus abgestorbenen Larven* verbunden mit der *horizontalen Transmission* und *Fortschreibung des Krankheitszustandes (=vertikale Transmission)* betrachtet. Ein weiterer virusspezifischer Parameter ist die sich täglich ändernde Virusabundanz, die durch eine Virusausbringung, Virusfreisetzung aus infizierten Kadavern bzw. Virusinaktivierung durch UV-Strahlung bedingt ist. Die Struktur des Modells ist in Abb. 6.1 umfassend dargestellt.

Die Art und Weise der Datengewinnung für die Parametrisierung der abzubildenden Prozesse wurde bereits in den vorangegangenen Kapiteln ausführlich dargestellt und diskutiert. Die entsprechenden Werte sind also vorwiegend aus Literaturdaten und eigenen Versuchsergebnissen abgeleitet worden. Im Weiteren wird darauf nicht mehr explizit eingegangen.

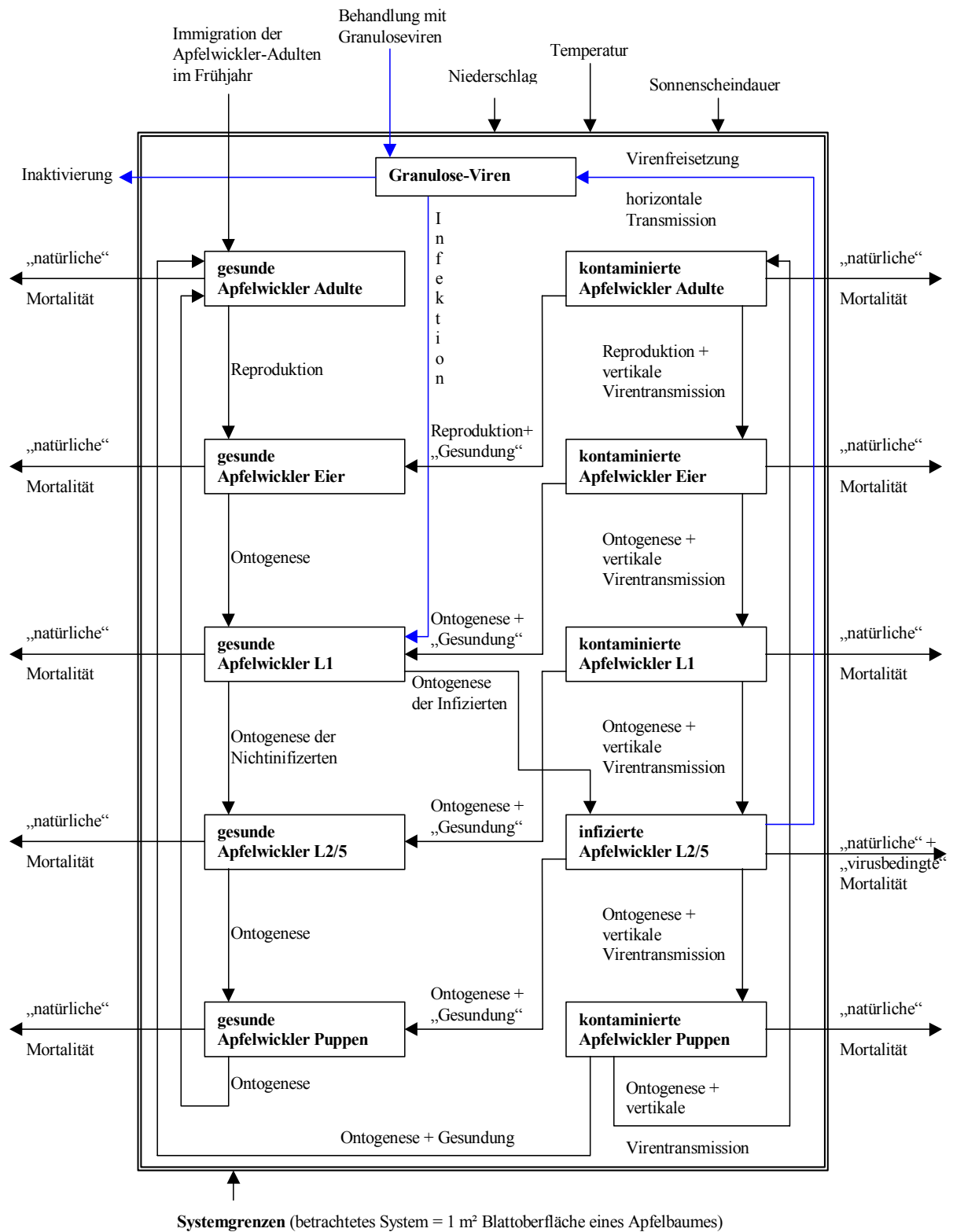


Abb. 6.1: Grobstruktur des Modells GRANULO

6.2.2 Voraussetzungen für den Simulationsbeginn

Das Programm GRANULO startet mit dem Beginn der Eiablage der Apfelwicklerweibchen und endet an dem vom Nutzer vorgegebenen Termin (spätestens am 31.10. eines bestimmten Jahres). Eine Abbildung der Überwinterungsprozesse ist nicht vorgesehen. Außerdem wird vorausgesetzt, dass sich zu Simulationsbeginn keine Viren im System befinden. Die Anzahl der sich zu Simulationsbeginn im System befindlichen Apfelwickler-Adulten bestimmt der Programmnutzer per Eingabe. Granuloviren gelangen vorwiegend durch menschliche Aktivitäten (Pflanzenschutzmittel-Applikation) ins System. Deshalb muss der Nutzer auch alle während des Simulationszeitraumes durchgeführten CpGV-Applikationen dem Modell als Inputfaktor mitteilen.

6.2.3 Abgebildete Prozesse

Das betrachtete System gliedert sich in fünf Kompartimente für verschiedene Entwicklungsstadien des Apfelwicklers und das CpGV-Kompartiment. Die Kompartimente sind untereinander mit den sich aus biologischen Aspekten ergebenden Stoff- und Informationsflüssen verbunden.

6.2.3.1 Immigration der Apfelwickler-Adulten (Bestimmung des Simulationsstartes)

Die Simulation beginnt mit der Eiablage der Weibchen. Dieser Termin kann zum einen durch entsprechende Beobachtungen festgestellt werden und für retrospektive Simulationsrechnungen durch den Nutzer über den Eingabedialog für Anfangswerte dem Programm mitgeteilt werden. Ist dies nicht der Fall, berechnet GRANULO den Simulationsstart (= Eiablagebeginn) nach der Temperatursummenformel von Gottwald (1996) selbst. Beginnend ab 1. März werden die Gradstunden über der Schwelle 10°C addiert. Der Tag, an dem die Gradstundensumme den Wert 5700 erreicht, wird als Simulationsstart definiert. Die *Start-Abundanz* der Apfelwickler-Adulten wird dagegen grundsätzlich vom Nutzer als Eingabewert abgefragt. Das Verhältnis Männchen zu Weibchen ist als Parameterwert vom Nutzer einstellbar (Tab. 6.1).

6.2.3.2 *Apfelwickler-Reproduktion (Eiablage)*

Die Anzahl abgelegter Eier am aktuellen Tag wird in grober Anlehnung an Blago (1992) in Abhängigkeit von der Temperatur um 19.00 Uhr berechnet. Die Verteilung der Eiablage wird dabei wie folgt abgebildet:

temp(19.00 Uhr)	$< 16^{\circ}\text{C} \rightarrow$ keine Eiablage
temp(19.00 Uhr)	$= 16^{\circ}\text{C} \rightarrow 4$ Eier / Weibchen / Tag
temp(19.00 Uhr)	$\geq 24^{\circ}\text{C} \rightarrow 8$ Eier / Weibchen / Tag
temp(19.00 Uhr)	$16^{\circ}\text{C} < x < 24^{\circ}\text{C} \rightarrow$ lineare Interpolation.

Die Gesamtablageleistung pro Weibchen ist als Parameterwert vom Nutzer beeinflussbar (Tab. 6.1). Außerdem wird angenommen, dass gesunde, virusfreie und CpGV kontaminierte Weibchen gleichermaßen Eier ablegen, also keine Unterschiede im Eiablageverhalten und in Eilegeleistung aufweisen. Allerdings kann als Parameter eingestellt werden, wie groß der Anteil kontaminierter Eier ist, der von kontaminierten Weibchen abgelegt wird (Tab. 6.1).

6.2.3.3 *Ontogenese des Apfelwicklers*

Die Ontogenese von Insekten ist im Allgemeinen relativ gut untersucht. In zahlreichen Laborversuchen wurde unter Konstanttemperaturen die zugehörige Entwicklungsdauer einzelner Insektenstadien ermittelt. Um diese Ergebnisse für die Berechnung der Ontogenese unter Wechseltemperaturen zu nutzen, wird in diskreten Simulationsmodellen in der Regel der inverse Wert der Entwicklungsdauer, als der Entwicklungsfortschritt pro Zeiteinheit verwendet. Das folgende Beispiel soll das verdeutlichen:

Temperatur [°C]	Entwicklungsdauer des Stadiums [d]	Entwicklungsfortschritt pro Tag [1/d]
15	20	0,05
19	10	0,17
22	6	0,17
26	2	0,5

Dies bedeutet zum Beispiel, dass ein Tier, das bei 15°C 20 Tage für das Durchlaufen des betrachteten Stadiums benötigt, an einem Tag also $\frac{1}{20} = 0,05$ (bzw. 5%) dieser Entwicklung vollzieht. Natürlich kann man diese Betrachtung auf jede andere Zeiteinheit, z.B. Entwicklungsfortschritt pro Stunde, übertragen. Im Modell besitzt jedes Individuum, genauer gesagt jede Altersklasse eines Kompartiments, einen definierten Entwicklungszustand, der den Anteil der in diesem Kompartiment bereits durchlaufenen Entwicklung beschreibt. Diese Zahl liegt immer zwischen 0 (beim Neu-Eintritt in das Kompartiment) und 1 (Entwicklung beendet; Übertritt zum nächsten Kompartiment).

Analog wird auch der Alterungsprozess von Adulten betrachtet. *Alterszustand = 1* bei Adulten bedeutet, dass das Tier sein maximales Lebensalter erreicht hat und aus dem System ausscheidet. Für die Berechnung der Ontogenese im Kompartiment L1-Larven wurde allerdings eine Ausnahme formuliert. Auf der Basis der Ergebnisse von Kap. 4.2.1 wurde die einfache Annahme gemacht, dass L1-Larven grundsätzlich einen Tag alt werden und dann in das L2-Stadium übergehen.

6.2.3.4 Mortalität

Bei der Berechnung der Mortalität in den einzelnen Kompartimenten wird grundsätzlich unterschieden zwischen natürlicher Mortalität (mögliche Ursachen sind alles außer Virusbefall, so z.B. Vogelfraß, Starkniederschlag, Krankheiten, usw.) und virusbedingter Mortalität. Das Modell ist so konzipiert, dass nur Individuen des Kompartiments L2-L5

an einer CpGV-Infektion sterben. Alle übrigen Kompartimente (Puppen, Adulte, L1, Eier) sterben nicht infektionsbedingt, selbst wenn sie virusbelastet sind. Infizierte L1-Larven gehen vor ihrem Tod in das L2-Stadium über.

Bezüglich der natürlichen Mortalität wird für alle Kompartimente eine Gesamtmortalitätsrate für das jeweilig betrachtete Entwicklungsstadium als Parameter angegeben (Tab. 6.1). Diese Werte können vom Nutzer jederzeit entsprechend seines Erkenntnisstandes variiert werden. Die aktuell tägliche natürliche Mortalitätsrate ergibt sich aus dem Produkt von Entwicklungsfortschritt pro Tag und Gesamtsterberate des Kompartiments.

Die Berechnung der aktuell täglichen virusbedingten Mortalität für infizierte L2-L5 ist etwas komplexer. Sie basiert neben dem Entwicklungsfortschritt pro Tag für L2-L5 auf den beiden als Viruseigenschaften deklarierten Parametern Wirkgeschwindigkeit und Virulenz (Tab. 6.1). Der Parameter Wirkgeschwindigkeit ist leicht im Labor zu ermitteln. Er entspricht der in entsprechenden Versuchen festgestellten ST_{50} bezogen auf alle bis zur Verpuppung virusbedingt gestorbenen Larven. Allerdings wurde in Laborexperimenten festgestellt, dass sich die Wirkgeschwindigkeit (gemessen in Tagen bzw. Stunden) in Abhängigkeit von der Temperatur ändert (Kap. 3.1.3). Bezogen auf den sich gleichfalls mit der Temperatur ändernden Entwicklungszustand der L2-L5-Larven ergab sich aber eine nur sehr geringe Schwankungsbreite um den Wert 0,5. Deshalb wird der Parameter Wirkgeschwindigkeit bezogen auf den Entwicklungszustand der L2-L5-Larven angegeben. Die Mortalitätsrate infizierter Larven, die sich bis zum Beginn der Verpuppung ergeben hat, wird im Modell als Virulenz bezeichnet; also:

$$\text{Virulenz} = \frac{\text{Anzahl virusbedingt gestorbener Larven (AvgL)}}{\text{Anzahl infizierter Larven}} \quad \text{bzw.}$$

$$\text{Virulenz} \approx \frac{\text{AvgL}}{\text{AvgL} + \text{Anzahl kontaminierter Puppen.}}$$

6.2.3.5 Infektion

Die Infektion einer Larve erfolgt durch die Aufnahme der viralen Einschlusskörper mit der Nahrung und durch die anschließende Infektion der Mitteldarmepithelzellen durch wenigstens ein Virion. Aufgrund der biologischen Besonderheit, dass die Larven des Apfelwicklers bereits ab dem L2-Stadium in einem Bohrloch im Apfel leben, wurde zunächst angenommen, dass sich nur L1-Larven durch Frucht- und möglicherweise Blattfraß mit Viren infizieren können. Diese Annahme wurde im Freilandversuch widerlegt (siehe Kap. 3.1.6.2) und muss in einer zukünftigen Version des Modells korrigiert werden. Solange sich im System keine Virusflecke (durch Viren-Infektion getötete und zerflossene Larven) befinden, berechnet sich die Anzahl der von einer L1-Larve aufgenommenen Viren (zav) ausschließlich wie folgt:

$$zav = a * \text{Virenanzahl}$$

mit

Virenanzahl: Anzahl der durch Spritzung gleichmäßig im System verteilten Viren;
bezogen auf 1 m²

a: Parameter *Faktor für Virenaufnahme*

Der Prozentsatz sich infizierender Larven hängt von der Anzahl aufgenommenen Viruspartikel (zav) und von der Viruseigenschaft *Infektiösität* (wie alle anderen Viruseigenschaften ebenfalls als Parameter vom Nutzer einstellbar; Tab.6.1) ab. Unter Infektiösität wird im Modell die Wahrscheinlichkeit verstanden, mit der ein aufgenommenes Viruspartikel die Larve über die Mitteldarmepithelzellen infiziert und so die Voraussetzung für seine eigene Replikation schafft. Diese wird über eine LC_{50} bzw. LD_{50} parametrisiert.

Dagegen wird bei der Begegnung einer L1-Larve mit einem virustoten Larvenkadaver (=Virusfleck) die Virenaufnahme gar nicht berechnet, sondern es wird sofort eine dadurch bedingte Infektion angenommen. Die Wahrscheinlichkeit im Leben einer L1-Larve einen Virusfleck zu treffen, hängt natürlich von der Anzahl der vorhandenen Vi-

rusflecke ab und wird zusätzlich durch den Parameter *Faktor für Begegnung mit Virenflecken* variiert.

6.2.3.6 Horizontale Transmission

Durch die horizontale Transmission (vgl. Kap. 3.1.6.1) wird eine Infektion über die Virusnachkommen von infizierten Larven initiiert. Dem Modell liegt die Annahme zu Grunde, dass sich nur L1-Larven an der Apfeloberfläche durch Kontakt mit Virusflecken über eine horizontale Transmission infizieren. Wie stark dieser Prozess zum Befall der Apfelwicklerpopulation beiträgt, hängt unter anderem davon ab, wie hoch der Anteil der an der Apfeloberfläche sterbenden infektiösen Larvenkadavern (Tab. 6.1) ist und wie viele Virusflecken dementsprechend entstehen.

6.2.3.7 Vertikale Transmission

Vertikale Transmission setzt voraus, dass nicht alle mit Viren infizierten Larven an einer Infektion sterben und dass einzelne Individuen trotz Wechsel ins nächste Kompartiment latent Virusträger bleiben. Hierfür wird im Modell der Begriff *kontaminiert* verwendet. Im Modell wird die vertikale Transmission beim Übergang von L2-L5 zu Puppen, beim Übergang von Puppen zu Adulten, bei der Reproduktion und beim Übergang von Eiern zu L1 betrachtet. Mit dem Parameter *Faktor für vertikale Transmission* kann der Nutzer für diese Übergänge definieren, welcher Anteil der kontaminierten Tiere auch im neuen Kompartiment kontaminiert bleibt. Werden alle diese Parameter auf 0 gesetzt, so bedeutet dies, dass keine vertikale Transmission stattfindet.

6.2.3.8 Inaktivierung von Viren

Die Berechnung der UV-abhängigen Inaktivierung der durch Applikation eingetragenen Viren erfolgt über den Parameter *Sonnenscheindauer*. Es wurde folgende Relation definiert:

pro Stunde Sonnenschein → Inaktivierung von 3% der vorhandenen Viren.

Tab. 6.1: Vom Modell-Nutzer einstellbare Parameter (Dateiname in Klammern).

ANFANGSBELEGUNG (granulo.anf)	
Beginn Eiablage	0
Termin für die Eiablage (TT.MM.)	01.06.
Simulationsende (TT.MM.).	20.09
Anzahl Apfelwickler-Adulten pro m ² Blattoberfläche in einer Baumkrone	6
BEHANDLUNGEN (ausbring.par)	
Anzahl ausgebrachter Viren pro Behandlung	2.000.000
APFELWICKLER ADULTEN (aw_adult.par)	
Geschlechterverhältnis (Weibchen-Anteil)	0,5
Anzahl Eier pro Weibchen	80
Anteil infizierter Eier an Gesamtlegeleistung infizierter Weibchen	0
natürliche Mortalitätsrate während des Adulten-Stadiums	0,04
APFELWICKLER EIER (aw_eier.par)	
natürliche Mortalitätsrate im Ei-Stadium	0,2
Faktor für transstadiale Transmission beim Übergang "Eier zu L1"	0
APFELWICKLERLARVEN-L1 (aw_l1.par)	
natürliche Mortalitätsrate im L1-Stadium	0,1
Faktor in Berechnungsfunktion "Virenaufnahme"	0,0002
Faktor für "Begegnung mit Virusflecken"	0,1
Faktor für transstadiale Transmission beim Übergang "L1 zu L2"	1
APFELWICKLER-LARVEN L2-L5 (aw_l24.par)	
natürliche Mortalitätsrate im L2- bis L5-Stadium	0,1
Anteil der außerhalb des Apfel sterbenden infektiösen Larven	0,5
Faktor für transstadiale Transmission beim Übergang "Larven zu Puppen"	0
APFELWICKLER-PUPPEN (aw_puppe.par)	
natürliche Mortalitätsrate im Puppen-Stadium	0,02
Faktor für transstadiale Transmission beim Übergang "Puppen zu Adulten"	0
GRANULOVIREN (cpgv.par)	
Infektiosität (Wahrscheinlichkeit für Infektion des Mitteldarmepithels)	0,15
Wirkgeschwindigkeit (LT ₅₀); bezogen auf Entwicklungszustand L2 bis L5	0,5
Virulenz (Mort.-Rate bis zur Verpuppung der L5)	0,95
UV-Empfindlichkeit des Virus (% Inaktivierung pro Sonnenstunde)	3
1.Grund für "Flecken-Inaktivierung" (Summe Sonnenscheinstunden [h])	100
2.Grund für "Flecken-Inaktivierung" (Starkregen [1/10mm])	100

Dagegen wird das Verschwinden von Virusflecken in Abhängigkeit von einer kumulierten Sonnenscheindauer und von eventuellen stärkeren Tagesniederschlägen berechnet.

Ein Virusfleck gilt als inaktiviert bzw. nicht mehr vorhanden, wenn es seit dessen Erscheinen mindestens 100 Sonnenstunden gegeben hat (Tab. 6.1). Weiterhin wird ein Verlust von Virusflecken durch ein niederschlagbedingtes Abspülen ermittelt. Diese Funktion setzt bei einer täglichen Niederschlagssumme von 5 mm ein. Bei einer Tages-Niederschlagssumme von 15 mm oder mehr wird im Modell angenommen, dass alle bis zu diesem Ereignis entstandenen Virusflecken verschwunden sind. Bei täglichen Niederschlagssummen zwischen 5 mm und 15 mm wird durch eine lineare Interpolation ein entsprechender Verlust der vorhandenen Virusflecken berechnet.

6.2.4 Output

Neben den ausführlichen Ergebnistabellen zur Abundanzdynamik der einzelnen Entwicklungsstadien des Apfelwicklers und zum Virenbesatz werden zusätzlich Übersichten zu den für die Simulation genutzten Wetterdaten, Inputwerten und den vom Nutzer einstellbaren Parametern in tabellarischer Form bereitgestellt. Zusätzlich werden auch Grafiken zum Abundanzverlauf der Insekten und Viren und des Witterungsverlaufs angeboten. Diese Grafiken entsprechen allen Anforderungen an eine moderne Nutzerschnittstelle; sie sind z.B. verschiebbar und vergrößerbar.

6.3 Sensitivitätsanalyse

Die zum Programm GRANULO durchgeführte Sensitivitätsanalyse zielte auf die Identifikation jener frei zugänglichen Parameter (vgl. Tab. 6.2), deren Variation zu besonders gravierenden Änderungen der Modellergebnisse führt. Insbesondere sollte untersucht werden, welche Änderungen der Viruseigenschaften zu besonders großen Änderungen in der Populationsdynamik der Apfelwickler führt. Andererseits können aus dieser Analyse auch Schlussfolgerungen gezogen werden, welche besonders sensiblen Parameter in weiteren wissenschaftlichen Untersuchungen mit größerer Genauigkeit bestimmt werden sollten.

In entsprechenden Szenariorechnungen wurde jeweils ein Parameter gegenüber der Standardvariante (= Vergleichsvariante) geändert und die Auswirkung dieser Änderung auf die Vergleichskriterien *Maximalabundanzwert L2-L5*, *Abundanzintegral L2-L5*, *Termin für Maximalabundanzwert* und *Dauer für Starkbefall* ($\text{Abundanz} \geq 0,8 * \text{Maximalabundanzwert}$) bewertet. Die *Maximalabundanz* oder auch der Zeitpunkt der maximalen Befallsstärke (1 Tag) ist für viele Bekämpfungsmaßnahmen ebenso wie das *Abundanzintegral* von Bedeutung. Letzteres drückt aus, wie lang und wie stark ein Befall ist. Die *Dauer für Starkbefall* ist dem *Abundanzintegral* sehr ähnlich, berücksichtigt jedoch nur die Zeit in der der Befall 80% des Maximums erreicht. Die genannten Vergleichskriterien beziehen sich jeweils auf die erste Apfelwicklergeneration. Die Einzelergebnisse dieser Szenariorechnungen sind in Tab. 6.2 dargestellt. Sensitivitätsanalysen zu Auswirkungen der horizontalen und vertikalen Transmission wurden bisher nicht durchgeführt.

6.3.1 Veränderungen bzgl. des Maximalabundanzwertes von L2-L5

Sehr starke Veränderungen für den Maximalabundanzwert ergeben sich durch die Variation des Anfangswertes für die Anzahl Apfelwickler pro m². Bei Erhöhung bzw. Verringerung dieses Anfangswertes um 50% gegenüber der Standardvariante ergeben sich ähnliche Veränderungen für den Maximalabundanzwert von L2-L5 (+ 80%, - 50%). Dies ist ziemlich problematisch für eine exakte Abbildung des Abundanzverlaufes (insbesondere der Höhe des Abundanzverlaufes), weil gerade der Anfangswert für die Anzahl Apfelwickler pro m² in der Praxis äußerst schwer zu bestimmen ist.

Ähnlich hohe Veränderungen ergeben sich allerdings auch bei der Variation des Parameters *maximale Anzahl Eier pro Weibchen* und *Geschlechterverhältnis* (Weibchen-Anteil). Die Veränderung der Maximalzahl *Eier pro Weibchen* um $\pm 50\%$ führt zu analogen Änderungen bei dem Maximalabundanzwert von L2-L5. Eine Verschiebung des Weibchenanteils von 50% in der Standardvariante auf 70% bzw. auf 30% bewirkt eine Erhöhung des Maximalabundanzwertes auf 161% bzw. eine Verringerung auf 59%. Im Gegensatz zum Anfangswert für die Anzahl Apfelwickler pro m², sind die hier erwähn-

ten Parameter allerdings besser bestimmbar. Eine Erhöhung des Maximalabundanzwertes von L2-L5 auf mehr als 120% des Wertes aus der Standardvariante konnte auch beobachtet werden, wenn Parameter, die im Zusammenhang mit der Infektion von L1-Larven durch Viren stehen, entsprechend verändert wurden:

<u>Art der Parametervariation</u>	<u>Erreichte Prozentzahl für Maximalabundanzwert</u>
keine Virusaufnahme durch L1	144 %
auf 1/10 gesenkte Virusaufnahme durch L1	128%
Verringerung der ausgebrachten Virusdosis auf 1/10	128%
Verringerung der Virulenz auf 50%	121%
Erhöhung der Virusinaktivierungsrate auf 5%	133%

Schließlich führt auch die Erniedrigung der natürlichen Eimortalität auf 5 % (Standardwert 20 %) zu einer Erhöhung des Maximalabundanzwertes von L2-L5 auf 128%, was aber durchaus innerhalb des Erwartungsbereiches liegt. Derzeit kann allerdings nicht erklärt werden, weshalb eine Erhöhung des Parameters *Anteil der außerhalb des Apfel sterbenden infektiösen Larven* zu einer Erhöhung des Maximalabundanzwertes führt.

Deutliche Erniedrigungen des Maximalabundanzwertes von L2-L5 auf unter 90% des Wertes für die Standardvariante konnten dagegen außer in den bereits genannten Fällen nur durch eine Verdopplung der natürlichen Mortalitätsraten für Apfelwicklereier und Junglarven (L1) und durch die Senkung der Virusinaktivierungsrate auf 1% erreicht werden.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Sensitivitätsanalyse zum Modell GRANULO hinsichtlich des Vergleichskriteriums *Maximalabundanzwert L2-L5* die von den Modellentwicklern erwarteten Zusammenhänge auch quantitativ bestätigte. Festzuhalten ist der große Einfluss des Parameters *UV-Empfindlichkeit des Virus* (% Inaktivierung pro Sonnenstunde). Um diesen empfindlichen Parameterwert zu festigen,

wäre aus Sicht der Modellentwicklung noch eine verstärkte Forschungsarbeit erforderlich.

Dass die Variation der Viruseigenschaften Infektiösität, Wirkgeschwindigkeit und Virulenz dagegen wenig Änderungen bzgl. des Vergleichskriteriums bewirkte, liegt vor allem an der Tatsache, dass der Maximalabundanzwert L2-L5 sowohl die gesunden als auch die mit Viren infizierten, aber noch nicht gestorbenen Apfelwicklerlarven umfasst und dass dieser Wert zu einem relativ frühen Zeitpunkt dieses Entwicklungsstadiums erreicht wird. Eine Sensitivitätsanalyse, die gesunde und infizierte L2-L5 gesondert betrachtet, konnte im Rahmen des Projektes aus Zeitgründen nicht durchgeführt werden.

Tab. 6.2: Parameteränderungen für Sensitivitätsanalyse.

Veränderter Parameter	variierter Wert	Abundanz- maximum	Abundanz- integral	Start Maxima- labundanz	Dauer [Tage]
Standardmodell		105	1706	178	8
natürliche Mortalitätsrate im L2- bis L5-Stadium	0,2	100	1588	178	8
natürliche Mortalitätsrate im L2- bis L5-Stadium	0,3	94	1490	178	8
natürliche Mortalitätsrate im L2- bis L5-Stadium	0,05	108	1775	178	9
Anteil außerhalb sterbender Larven	0,8	132	2089	179	8
Anteil außerhalb sterbender Larven	0,2	107	1977	178	9
Geschlechterverhältnis (Weibchen-Anteil)	0,7	169	2697	179	7
Geschlechterverhältnis (Weibchen-Anteil)	0,3	62	1087	178	9
Anzahl Eier pro Weibchen	120	158	3018	180	11
Anzahl Eier pro Weibchen	40	54	816	173	10
natürliche Mortalitätsrate im Adulten-Stadium	0,06	105	1706	178	8
natürliche Mortalitätsrate im Adulten-Stadium	0,1	105	1706	178	8
natürliche Mortalitätsrate im Adulten-Stadium	0,02	105	1706	178	8
natürliche Mortalitätsrate im Ei-Stadium	0,4	74	1248	178	8
natürliche Mortalitätsrate im Ei-Stadium	0,05	134	2153	178	8
Anzahl Apfelwickler-Adulten pro m ²	9	189	3014	179	8
Anzahl Apfelwickler-Adulten pro m ²	3	53	947	178	9

Veränderter Parameter	variierter Wert	Abundanz-maximum	Abundanz-integral	Start Maximalabundanz	Dauer [Tage]
natürliche Mortalitätsrate im L1-Stadium	0,2	91	1496	178	8
natürliche Mortalitätsrate im L1-Stadium	0,01	119	1925	178	8
Faktor in Berechnungsfunktion "Virenenaufnahme"	0,00002	134	2379	179	9
Faktor in Berechnungsfunktion "Virenenaufnahme"	0	151	2770	179	10
Faktor in Berechnungsfunktion "Virenenaufnahme"	0,002	99	1560	178	8
natürliche Mortalitätsrate im Puppen-Stadium	0,05	105	1706	178	8
natürliche Mortalitätsrate im Puppen-Stadium	0,1	105	1706	178	8
natürliche Mortalitätsrate im Puppen-Stadium	0,01	105	1706	178	8
Anzahl ausgebrachter Viren pro Behandlung	20000000	98	1538	178	8
Anzahl ausgebrachter Viren pro Behandlung	200000	134	2380	179	9
Infektiösität	0,2	104	1690	178	8
Infektiösität	0,3	104	1668	178	8
Infektiösität	0,05	114	1902	178	9
Infektiösität	0,1	106	1740	178	9
Wirkgeschwindigkeit (LT 50)	0,6	108	1794	178	9
Wirkgeschwindigkeit (LT 50)	0,7	113	1941	178	9
Wirkgeschwindigkeit (LT 50)	0,3	105	1670	178	9
Wirkgeschwindigkeit (LT 50)	0,4	104	1657	178	8
Virulenz	1	104	1663	178	8
Virulenz	0,5	127	2323	178	10
Virulenz	0,7	115	2012	178	9
UV-Empfindlichkeit des Virus	4	118	2006	178	10
UV-Empfindlichkeit des Virus	5	140	2532	179	9
UV-Empfindlichkeit des Virus	1	91	1410	178	8
UV-Empfindlichkeit des Virus	2	96	1515	178	8
Summe Sonnenscheinstunden [h]	150	105	1711	178	8
Summe Sonnenscheinstunden [h]	50	101	1721	178	8
Starkregen [1/10mm]	150	105	1706	178	8
Starkregen [1/10mm]	50	105	1706	178	8

6.3.2 Veränderungen bzgl. des Abundanzintegrals von L2-L5

Bezüglich des Vergleichskriteriums *Abundanzintegral von L2-L5* lassen sich ähnliche Aussagen wie im Kap. 6.3.1. treffen. Bei Erhöhung bzw. Verringerung des Anfangswertes für die Anzahl Apfelwickler pro m² um 50% gegenüber der Standardvariante erge-

ben sich hier Veränderungen für das Abundanzintegral von + 77% und - 45%. Ähnlich hohe Veränderungen werden ebenfalls bei der Variation des Parameters *maximale Anzahl Eier pro Weibchen* und *Geschlechterverhältnis* (Weibchen-Anteil) erzielt. Die Veränderung der Maximalzahl *Eier pro Weibchen* um $\pm 50\%$ führt zu Änderungen von + 77% und – 52% bei dem Abundanzintegral L2-L5. Eine Verschiebung des Weibchenanteils von 50% in der Standardvariante auf 70% bzw. auf 30% bewirkt eine Erhöhung des Abundanzintegrals auf 158% bzw. eine Verringerung auf 64%. Eine Erhöhung des Abundanzintegrals von L2-L5 auf diesmal mehr als 135% des Wertes aus der Standardvariante konnte erneut beobachtet werden, wenn Parameter, die im Zusammenhang mit der Infektion von L1-Larven durch Viren stehen, entsprechend verändert wurden:

<u>Art der Parametervariation</u>	<u>erreichte Prozentzahl für Abundanzintegral</u>
keine Virusaufnahme durch L1	162%
auf 1/10 gesenkte Virusaufnahme durch L1	140%
Verringerung der ausgebrachten Virusdosis auf 1/10	140%
Verringerung der Virulenz auf 50%	136%
Erhöhung der Virusinaktivierungsrate auf 5%	140%

Das heißt, gleiche Änderungsraten für die genannten infektionsbeeinflussenden Parameter bewirken höhere Änderungsraten für das Kriterium *Abundanzintegral* als für das Kriterium *Maximalabundanzwert*, was wiederum den Erwartungen der Modellentwickler entspricht. Schließlich führt auch die Senkung der natürlichen Ei-Mortalität auf 5% (Standardwert 20 %) zu einer Erhöhung des Abundanzintegrals für L2-L5 auf 126%. Unerklärt bleibt dagegen auch an dieser Stelle die Reaktion des Modells auf eine Erhöhung des Parameters *Anteil der außerhalb des Apfel sterbenden infektiösen Larven*.

Deutliche Senkungen des Abundanzintegrals von L2-L5 auf unter 90% des Wertes für die Standardvariante konnten dagegen (ähnlich wie in 6.3.1.) außer in den bereits genannten Fällen nur durch eine Verdoppelung der natürlichen Mortalitätsraten für Apfelwickler-Eier und L1-Larven, eine Verdreifachung der natürlichen Mortalitätsrate für

L2-L5-Larven und durch die Senkung der Virusinaktivierungsrate auf 1% bzw. 2% erreicht werden.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Sensitivitätsanalyse zum Modell GRANULO hinsichtlich des Vergleichskriteriums *Abundanzintegral L2-L5* die Schlussfolgerungen aus dem vorhergehenden Abschnitt umfassend bestätigt.

6.3.3 Veränderungen bzgl. der zeitlichen Kriterien für das Starkauftreten von L2-L5

Die Vergleichskriterien *Termin für Maximalabundanzwert von L2-L5* und *Dauer für Starkbefall* ($\text{Abundanz} \geq 0,8 * \text{Maximalabundanzwert}$) wurden durch die für die Sensitivitätsanalyse durchgeführten Parameteränderungen kaum beeinflusst. Lediglich die Variation der maximalen Anzahl von Eiern pro Weibchen um $\pm 50 \%$ führte zu erwähnenswerten Effekten (vgl. Tab. 6.2).

7 Simulationen

7.1 *Simulationen der Freilandversuche*

Mit den aus den Freilandversuchen gewonnenen Daten (Kap. 3.1.6.2) wurden Simulationen für eine vorläufige Modellverifizierung durchgeführt. In den Versuchen wurden die Überlebensraten von Larven bei unterschiedlichen Wetterbedingungen und unterschiedlichen Virusapplikationen erhalten (Tab. 3.11), die mit den Modellsimulationen verglichen werden konnten. Außerdem war durch den bekannten Zeitpunkt der L1-Applikation und Apfelernte die Entwicklungsdauer der Larven bekannt (Tab. 3.11), die mit der Entwicklungsdauer im Modell verglichen werden konnte.

Für die Parameterwerte der Insekten wie das Geschlechterverhältnis und die Mortalitätsraten der jeweiligen Entwicklungsstadien, wurden Werte aus der Literatur herangezogen (in Kap. 4.2.2 und 4.1.1 beschrieben). Parameterwerte der Viren (Infektiösität, Wirkgeschwindigkeit, UV-Inaktivierung) orientieren sich an den aus Labor- und Freilandversuchen erhaltenen Werten. Auch der Umfang der Virusbehandlung wurde beispielsweise aus der Aufwandmenge des CpGV im Freilandversuch berechnet. Alle verwendeten Parameter sind in Tab. 7.1 zusammengefasst.

Für die vorläufige Verifizierung des Modells wurden die Versuchsgruppen Kontrolle-1, Kontrolle-2, CpGV-1 und CpGV-2 herangezogen. Bei den Kontrollgruppen handelt es sich L1-Larven, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten (Kontrolle-1 am 13.06.01 und Kontrolle-2 am 09.07.01) auf Äpfel unbehandelter Bäume appliziert wurden. Diese Simulation konnte daher bei leicht unterschiedlichen Wetterbedingungen durchgeführt werden. Für die Gruppe CpGV-1 wurde, wie im Freilandversuch, eine Virusbehandlung in handelsüblicher Menge zum Zeitpunkt der Larvenapplikation (13.06.01) simuliert.

Tab. 7.1: Parameterwerte für die Simulationen der Freilandversuche.

ANFANGSBELEGUNG	
Termin für die L1-Applikation (TT.MM.)	13.06./09.07.
Simulationsende (TT.MM.).	10.09
Anzahl L1-Larven pro m ² Blattoberfläche in einer Baumkrone	55
BEHANDLUNGEN	
Anzahl ausgebrachter Viren pro Behandlung	800.000.00(0)
Termin für die CpGV-Behandlung	13.06/09.07
Wetterstation: Karlsruhe 2001	
APFELWICKLER ADULTEN	
Geschlechterverhältnis (Weibchen-Anteil)	0,5
Anzahl Eier pro Weibchen	50
Anteil infizierter Eier an Gesamtlegeleistung infizierter Weibchen	0
natürliche Mortalitätsrate während des Adulten-Stadiums	0,04
APFELWICKLER EIER	
natürliche Mortalitätsrate im Ei-Stadium	0,2
Faktor für transstadiale Transmission beim Übergang "Eier zu L1"	0
APFELWICKLERLARVEN-L1	
natürliche Mortalitätsrate im L1-Stadium	0,5
Faktor in Berechnungsfunktion "Virenaufnahme"	0,0000000125
Faktor für "Begegnung mit Virusflecken"	0
Faktor für transstadiale Transmission beim Übergang "L1 zu L2"	1
APFELWICKLER-LARVEN L2-L5	
natürliche Mortalitätsrate im L2- bis L5-Stadium	0,5
Anteil der außerhalb des Apfel sterbenden infektiösen Larven	0,5
Faktor für transstadiale Transmission beim Übergang "Larven zu Puppen"	0
APFELWICKLER-PUPPEN	
natürliche Mortalitätsrate im Puppen-Stadium	0,02
Faktor für transstadiale Transmission beim Übergang "Puppen zu Adulten"	0
GRANULOVIREN	
Infektiösität (Wahrscheinlichkeit für Infektion des Mitteldarmepithels)	0,13
Wirkgeschwindigkeit (LT ₅₀); bezogen auf Entwicklungszustand L2 bis L5	0,5
Virulenz (Mort.-Rate bis zur Verpuppung der L5)	0,95
UV-Empfindlichkeit des Virus (% Inaktivierung pro Sonnenstunde)	1
1.Grund für "Flecken-Inaktivierung" (Summe Sonnenscheinstunden [h])	100
2.Grund für "Flecken-Inaktivierung" (Starkregen [1/10mm])	100

Hingegen wurde bei CpGV-2 das Virus mit der im parallel zum Freilandversuch gemessenen Inaktivierungsrate (Kap. 3.1.5) bis zum 09.07.01 inaktiviert, ehe die Larvenentwicklung simuliert wurde. Da eine Simulation immer nur mit der Eiablage oder einer Larvenapplikation beginnen kann, wurde diese Verifizierung in zwei hintereinandergeschalteten Simulationen durchgeführt. Die erste Simulation diente dabei nur dazu, die Menge an verbleibenden aktiven Viren nach etwa vier Wochen UV-Inaktivierung zu bestimmen.

Zwei der Versuchsgruppen (V1-ÄL und V2-HT) konnten aufgrund der Modellstruktur nicht simuliert werden. In der Versuchsgruppe V1-ÄL infizierten sich im Freiland Larven im L2- bis möglicherweise L3-Stadium. Bislang ist in GRANULO jedoch vorgesehen, dass sich nur Larven im L1-Stadium mit dem Virus infizieren können. Die Versuchsgruppe V2-HT wiederum setzt voraus, dass L1-Larven zu zwei verschiedenen Zeitpunkten ausgebracht werden. Zur Zeit ist es im Modell allerdings nur möglich, L1-Larven zu einem Zeitpunkt auszubringen. Auf dieses Szenario zur Verifizierung der horizontalen Transmission musste daher ebenfalls verzichtet werden.

Im Modell lässt sich nicht zwischen den Stadien L2 bis L5 differenzieren. Um die Modellsimulationen dennoch mit den Daten aus den Freilandversuchen vergleichen zu können, wurde auf die Überlebensrate der Puppen im Modell zurückgegriffen. Damit sich die Überlebensraten der Puppen (Berechnung) denen der L4-L5 Larven (Beobachtung) ähneln, wurden die Mortalitätsraten der L2-L5 Larven im Modell leicht reduziert. Grundsätzlich setzt sich die Mortalitätsrate der L2-L5 Larven aus zwei Werten zusammen. Zum einen beinhaltet sie die Mortalitätsrate der L2-L5, die sich im Apfel entwickeln, zum anderen aber auch die Mortalitätsrate der L5 Larven, die den Apfel verlassen und ein Versteck zum Verpuppen aufsuchen. Für die hier beschriebenen Simulationen wurde ausschließlich die Mortalitätsrate für die Larvenstadien im Apfel verwendet, um beim Puppenstadium (Berechnung) eine vergleichbare Überlebensrate zu erhalten.

Tab. 7.2: Ein Vergleich zwischen den Überlebensraten aus den Freilandversuchen und dem Modell ($\pm$ Standardabweichung, SD).

Versuchsgruppe	% überlebende Larven ($\pm$ SD)	
	Beobachtung	Berechnung
Kontrolle-1	26,6 ($\pm$ 8,9)	25,5
Kontrolle-2	23,2 ($\pm$ 8,9)	23,6
CpGV-1	6,8 ($\pm$ 3,9)	3,6
CpGV-2	18,2 ($\pm$ 4,7)	21,8

Tab. 7.3: Ein Vergleich der Entwicklungsdauer im Freiland und im Modell. In den Freilandversuchen wurde die Überlebensrate bei Larven bestimmt, die sich größtenteils im L4- bis L5-Stadium befanden. Da im Modell nicht zwischen L2 und L5 differenziert werden kann, wurde hier der Beginn des Puppenstadiums betrachtet.

Versuchsgruppe	Dauer bis zum jeweiligen Entwicklungsstadium	
	Beobachtung (L4-L5)	Berechnung (Puppe)
Kontrolle-1	29 Tage	20 Tage
Kontrolle-2	24 Tage	19 Tage
CpGV-1	29 Tage	20 Tage
CpGV-2	24 Tage	19 Tage

Bei allen vier Modellsimulationen zeigte sich eine sehr gute Übereinstimmung der Überlebensraten zwischen den Freilandbeobachtungen und der Modellrechnung (Tab. 7.2), doch war die Entwicklungsdauer im Modell jeweils schneller als im Freiland (Tab. 7.3). Um den Zeitpunkt einer zweiten Generation simulieren zu können, müsste die Entwicklungsrate der Insekten in Zukunft überarbeitet werden.

7.2 Simulationen mit veränderten Parameterwerten

Das Modell GRANULO erlaubt, verschiedene Szenarien zu berechnen und den möglichen Einfluss der Veränderungen biologischer Eigenschaften der Viren auf die Populationsdynamik der Viren bzw. des Wirtes simulativ darzustellen. An zwei konkreten Beispielen, der UV-Stabilität und der Wirkgeschwindigkeit der Viren, soll dies im Folgenden dargestellt werden.

7.2.1 Simulationen zur UV-Stabilität

Die relativ rasche UV-Inaktivierung gilt als eine der stärksten Limitierungen der Wirkung von Baculoviren im Freiland, da sie die Ursache für die Notwendigkeit häufiger Virus-Applikationen und somit auch ein bedeutenden Kostenfaktor darstellt. Andererseits stellt die UV-Inaktivierung den größten Virus-*Sink* dar, der wesentlich zur Eliminierung bzw. biologischen Inaktivierung der ausgebrachten Viren in der Umwelt beiträgt. Daher ist sie auch für die Betrachtung der Risikoabschätzung gentechnisch veränderter Viren von großem Interesse.

In Tab. 7.4 sind die Standardparameter, die bei den Simulationsrechnungen der UV-Inaktivierung verwendet wurden, dargestellt. Die Simulationsrechnungen wurden für vier verschiedene Inaktivierungsraten, nämlich 0,3%, 0,5%, 3% und 5% durchgeführt (Abb. 7.1 - 7.4). Diese Werte orientieren sich einerseits an den abweichenden experimentell ermittelten Inaktivierungsraten (vgl. Kap. 3.1.5) und sollen andererseits das mögliche Systemverhalten bei einem weitergehenden UV-Schutz durch biotechnologische bzw. verfahrenstechnologische Maßnahmen analysieren. Die restlichen Parameterannahmen wurden wie bereits beschrieben (Kap. 7.1), der Literatur, Labor- und Freilandversuchen entnommen.

Tab. 7.4: Verwendete Parameterwerte für die Simulation verschiedener UV-Inaktivierungsraten.

ANFANGSBELEGUNG	
Termin für die Eiablage (TT.MM.)	13.06.
Simulationsende (TT.MM.)	10.09
Anzahl Apfelwickler-Adulten pro m ² Blattoberfläche in einer Baumkrone	4
BEHANDLUNGEN	
Anzahl ausgebrachter Viren pro Behandlung	800.000.000
Termin für die CpGV-Behandlung	24.06.
Wetterstation: Karlsruhe 2001	
APFELWICKLER ADULTEN	
Geschlechterverhältnis (Weibchen-Anteil)	0,5
Anzahl Eier pro Weibchen	50
Anteil infizierter Eier an Gesamtlegeleistung infizierter Weibchen	0
natürliche Mortalitätsrate während des Adulten-Stadiums	0,04
APFELWICKLER EIER	
natürliche Mortalitätsrate im Ei-Stadium	0,2
Faktor für transstadiale Transmission beim Übergang "Eier zu L1"	0
APFELWICKLERLARVEN-L1	
natürliche Mortalitätsrate im L1-Stadium	0,5
Faktor in Berechnungsfunktion "Virusaufnahme"	0,0000000125
Faktor für "Begegnung mit Virenflecken"	0
Faktor für transstadiale Transmission beim Übergang "L1 zu L2"	1
APFELWICKLER-LARVEN L2-L5	
natürliche Mortalitätsrate im L2- bis L5-Stadium	0,65
Anteil der außerhalb des Apfel sterbenden infektiösen Larven	0,5
Faktor für transstadiale Transmission beim Übergang "Larven zu Puppen"	0
APFELWICKLER-PUPPEN	
natürliche Mortalitätsrate im Puppen-Stadium	0,02
Faktor für transstadiale Transmission beim Übergang "Puppen zu Adulten"	0
GRANULOVIREN	
Infektiösität (Wahrscheinlichkeit für Infektion des Mitteldarmepithels)	0,13
Wirkgeschwindigkeit (LT ₅₀); bezogen auf Entwicklungszustand L2 bis L5	0,5
Virulenz (Mort.-Rate bis zur Verpuppung der L5)	0,95
UV-Empfindlichkeit des Virus (% Inaktivierung pro Sonnenstunde)	variiert
1.Grund für "Flecken-Inaktivierung" (Summe Sonnenscheinstunden [h])	100
2.Grund für "Flecken-Inaktivierung" (Starkregen [1/10mm])	100

Wie den Abb. 7.1 – 7.4 zu entnehmen ist, sinkt nach einmaliger Applikation des Virus die Anzahl der infizierten Larven mit zunehmender Inaktivierungsrate erwartungsgemäß (vgl. Kurven „infizierte Larven“). Aus der Kurven „gesunde Larven“ wird andererseits deutlich wie groß der quantitative Einfluss der UV-Inaktivierung auf die Abundanz der zweiten Generation im Hochsommer (nach dem 11.08) ist. Durch einen verbesserten UV-Schutz könnte demnach die direkte Wirkung auf die erste Generation und eine indirekte Wirkung auf die zweite Generation erzielt werden. Eine Etablierung des Virus in der Wicklerpopulation ist entsprechend der Modellrechnung nur bei den beiden niedrigsten UV-Inaktivierungsraten (0,3% und 0,5%) rechnerisch darstellbar, da bei diesen beiden Modellvarianten auch in der zweiten Generation virusinfizierte Larven auftreten.

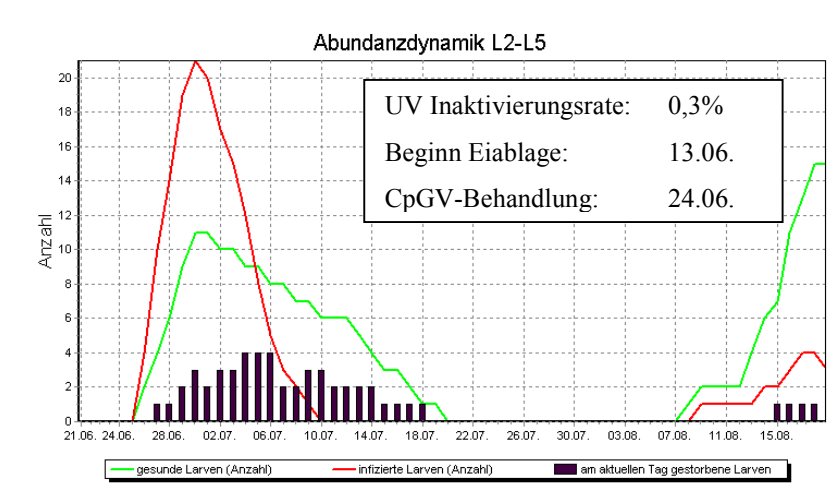


Abb. 7.1: Simulation der L2-L5 Abundanzen bei einer UV-Inaktivierungsrate von 0,3 %.

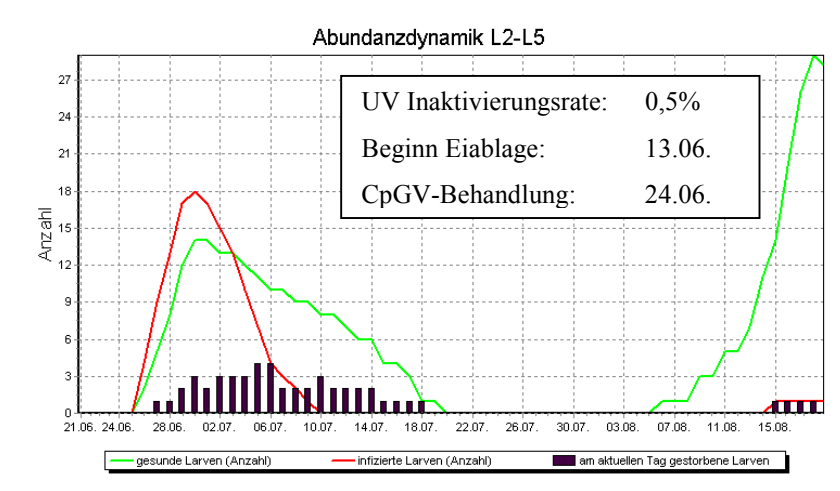


Abb. 7.2: Simulation der L2-L5 Abundanzen bei einer UV-Inaktivierungsrate von 0,5 %.

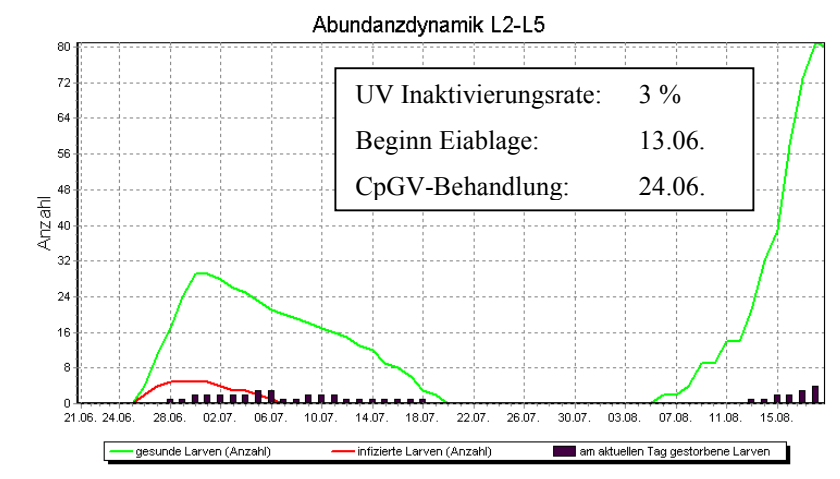


Abb. 7.3: Simulation der L2-L5 Abundanzen bei einer UV-Inaktivierungsrate von 3 %.

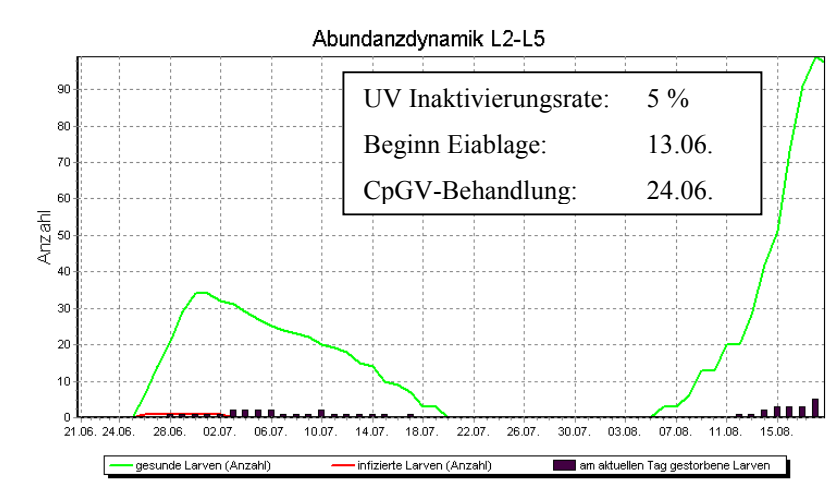


Abb. 7.4: Simulation der L2-L5 Abundanzen bei einer UV-Inaktivierungsrate von 5 %.

7.2.2 Simulation unterschiedlicher Wirkgeschwindigkeiten

Da die Beschleunigung der Wirkgeschwindigkeit eines der primären Ziele der gentechnischen Verbesserung von Baculovireninsektiziden ist, wurde die Auswirkung der im Modell verwendeten Standardwirkgeschwindigkeit von 0,5 mit einer um ca. 40% schnelleren Wirkung (Wirkgeschwindigkeit 0,3) verglichen. Die übrigen Parameter wurden konstant gehalten (Tab. 7.5.).

Wie die Simulationen zeigen (Abb. 7.5 – 7.79), gibt es so gut wie keine unmittelbare Auswirkung auf die Anzahl der gesunden und infizierten Larven. Lediglich der Zeitpunkt, wann die Larven sterben, verschiebt sich um ca. zwei Tage. Entsprechend gering ist auch die Auswirkung auf die Populationsdynamik des Wirtes. So bedeutend die Wirkgeschwindigkeit der Viren für die Reduktion des Fraßschadens ist, für die Abundanz des Apfelwicklers ist es letztendlich egal, ob die Larven einen Tag früher oder später sterben. Entscheidend für die Wirtsdynamik ist lediglich, wie viele der Larven infiziert werden. Interessanterweise errechnet das Modell aber einen Unterschied der Wirtsdichte in der zweiten Generation. Hier ist die Anzahl der lebenden Larven bei der langsameren Wirkung etwa doppelt so groß. (Abb. 7.5 und Abb. 7.6). Dieser Unterschied wird bereits bei der Betrachtung der gesunden Adulten und abgelegten Eier deutlich, die beim langsameren Virus ebenfalls erhöht sind (Abb. 7.7 und Abb. 7.8). Dieses Modellergebnis ist biologisch derzeit nicht ganz erklärbar, da im Modell davon ausgegangen wird, dass sich infizierte Larven nicht weiter entwickeln und nicht weiter vermehren können. Ausschlaggebend sollte hier allein die Tatsache sein, dass sich eine Larve infiziert, nicht aber wie schnell die Larve an der Infektion stirbt. Ob es sich hierbei um einen modellimmanenten Artefakt handelt oder ob dieser Effekt tatsächlich auftreten kann, muss in zukünftigen Validierungsexperimenten geklärt werden.

Für die Populationsdynamik des Virus spielt aus den oben genannten Gründen die Beschleunigung der Wirkgeschwindigkeit ebenfalls keine Rolle. Allerdings sind im Modell weder die eventuelle geringere Anzahl an Virusnachkommen bei schneller wirkenden Viren noch eine mögliche veränderte Konkurrenzfähigkeit gegenüber einem unver-

änderten Virus berücksichtigt. Bei einer weiteren Modifizierung des Modells wäre es wünschenswert, diese beiden Modifikationen in das Programm zu implementieren.

Tab. 7.5: Verwendete Parameterwerte für die Simulation verschiedener Wirkgeschwindigkeiten.

ANFANGSBELEGUNG	
Termin für die L1-Applikation (TT.MM.)	13.06.
Simulationsende (TT.MM.).	10.09
Anzahl L1-Larven pro m ² Blattoberfläche in einer Baumkrone	55
BEHANDLUNGEN	
Anzahl ausgebrachter Viren pro Behandlung	800.000.000
Termin für die CpGV-Behandlung	13.06.
Wetterstation: Karlsruhe 2001	
APFELWICKLER ADULTEN	
Geschlechterverhältnis (Weibchen-Anteil)	0,5
Anzahl Eier pro Weibchen	50
Anteil infizierter Eier an Gesamtlegeleistung infizierter Weibchen	0
natürliche Mortalitätsrate während des Adulten-Stadiums	0,04
APFELWICKLER EIER	
natürliche Mortalitätsrate im Ei-Stadium	0,2
Faktor für transstadiale Transmission beim Übergang "Eier zu L1"	0
APFELWICKLERLARVEN-L1	
natürliche Mortalitätsrate im L1-Stadium	0,5
Faktor in Berechnungsfunktion "Virusaufnahme"	0,0000000125
Faktor für "Begegnung mit Virenflecken"	0
Faktor für transstadiale Transmission beim Übergang "L1 zu L2"	1
APFELWICKLER-LARVEN L2-L5	
natürliche Mortalitätsrate im L2- bis L5-Stadium	0,65
Anteil der außerhalb des Apfel sterbenden infektiösen Larven	0,5
Faktor für transstadiale Transmission beim Übergang "Larven zu Puppen"	0
APFELWICKLER-PUPPEN	
natürliche Mortalitätsrate im Puppen-Stadium	0,02
Faktor für transstadiale Transmission beim Übergang "Puppen zu Adulten"	0
GRANULOVIREN	
Infektiösität (Wahrscheinlichkeit für Infektion des Mitteldarmepithels)	0,13
Wirkgeschwindigkeit (LT ₅₀); bezogen auf Entwicklungszustand L2 bis L5	variiert
Virulenz (Mort.-Rate bis zur Verpuppung der L5)	0,95
UV-Empfindlichkeit des Virus (% Inaktivierung pro Sonnenstunde)	0,7
1.Grund für "Flecken-Inaktivierung" (Summe Sonnenscheinstunden [h])	100
2.Grund für "Flecken-Inaktivierung" (Starkregen [1/10mm])	100

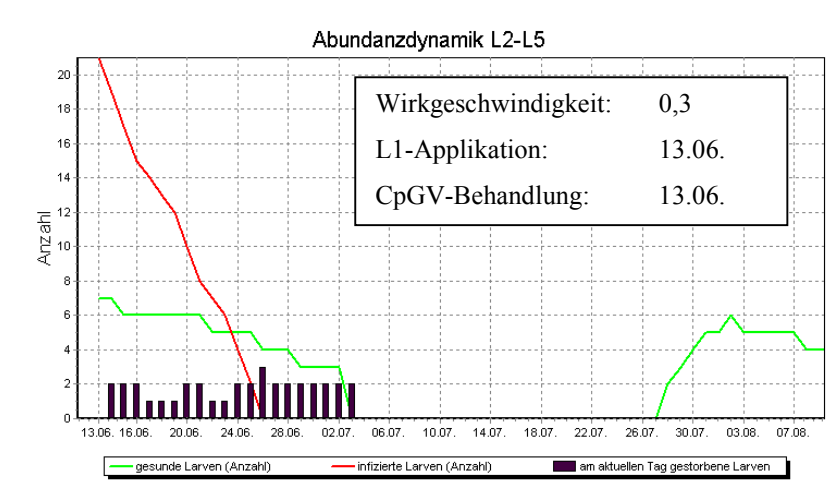


Abb. 7.5: Simulation der Abundanzdynamik von L2-L5 Larven bei einer CpGV-Wirkgeschwindigkeit von 0,3.

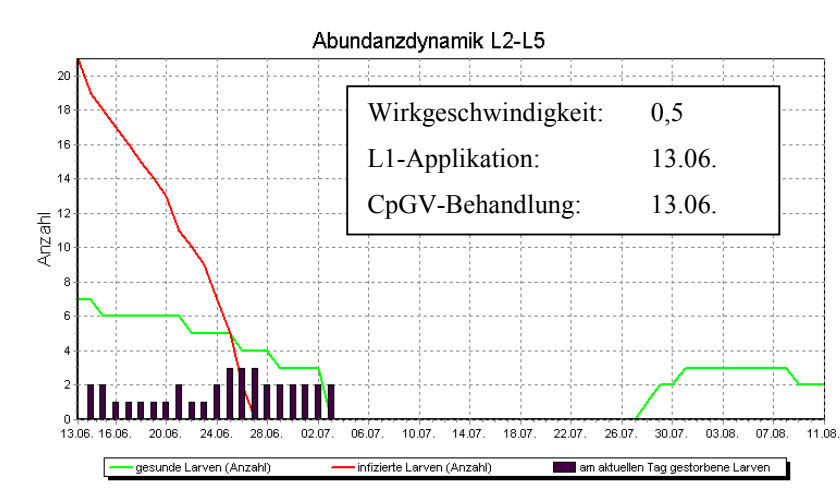


Abb. 7.6: Simulation der Abundanzdynamik von L2-L5 Larven bei einer CpGV-Wirkgeschwindigkeit von 0,5.

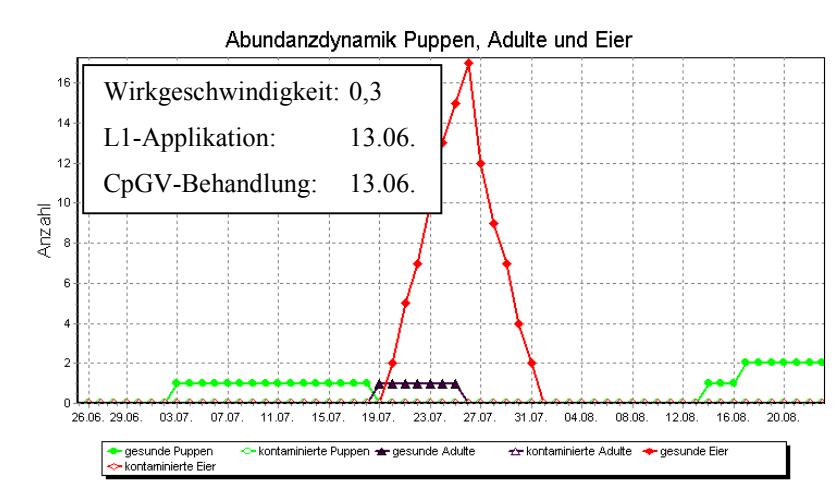


Abb. 7.7: Simulation der Abundanzdynamik von Puppen, Adulten und Eiern bei einer CpGV-Wirkgeschwindigkeit von 0,3.

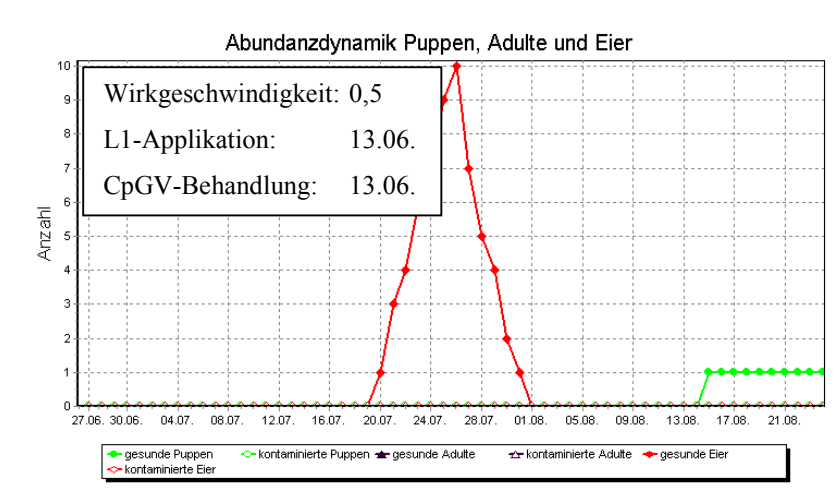


Abb. 7.8: Simulation der Abundanzdynamik von Puppen, Adulten und Eiern bei einer CpGV-Wirkgeschwindigkeit von 0,5.

8 Abschließende Betrachtung

Mit der Modellierung der Populationsdynamik des Systems Apfelwickler/CpGV wurde ein neuer Weg zur qualitativen und quantitativen Darstellung der Interaktion zwischen dem Apfelwickler und dem als Bioinsektizid eingesetzten Apfelwicklergranulovirus eingeschlagen. Ausgehend von einem qualitativen Modell, das die einzelnen Prozesse der Interaktion zwischen Insekt und Virus beschreibt, wurden die diesen Prozessen zu Grunde liegenden Parameter durch Labor-, Modell- und Freilandversuchen quantitativ bestimmt bzw. aus vorhandenen Literaturdaten sublimiert und in ein mathematisches Modell integriert, das diese Interaktion auch quantitativ beschreibt und im Zeitablauf simulieren kann. Damit wurde eine wesentliche Grundlage geschaffen, die Populationsdynamik des CpGV besser zu verstehen und wertvolle quantitative Aussagen zur Populationsdynamik dieses Virus und seines Insektenwirtes zu erhalten. Das vorliegende Modell versteht sich als eine Grundlage, das die Basisdaten zur Populationsdynamik des Systems Apfelwickler/CpGV bereitstellt und damit in der Lage ist, Vorhersagen zur Abundanzdynamik von Wirt und Virus zu leisten. Unter Berücksichtigung der spezifischen biologischen Daten anderer Insekten bzw. Baculoviren kann dieses Modell auch eine Basis für die Modellierung weiterer Insekt-Baculovirus-Interaktionen darstellen, bei denen die Larven verdeckt fressen (Tab. 1.4) und damit nur für kurze Zeit dem Virus exponiert sind.

In Hinblick auf das zur Zeit in der Pflanzenschutzpraxis eingesetzte natürlich vorkommende CpGV-Isolat sowie auf mögliche gentechnisch veränderte CpGV-Varianten, ist es das Ziel dieses Modells, die Abundanz und damit auch die Wahrscheinlichkeit einer Persistenz eines bestimmten Virus-Genotyps in einer Apfelwicklerpopulation abzuschätzen und somit eventuell Vorhersagen über die Möglichkeit einer Etablierung eines bestimmten Virus-Genotyps in der Umwelt zu treffen. In der bestehenden Version des Modells konnte der Gesichtspunkt der Konkurrenz bei einer unterschiedlichen Fitness von zwei Virus-Genotypen nicht berücksichtigt werden, obwohl diese für deren jeweilige Etablierungswahrscheinlichkeit sicherlich eine große Bedeutung hat.

Zwar wurde mittels einer umfangreichen Sensitivitätsanalyse das Modellverhalten hinsichtlich seiner Stabilität und Plastizität überprüft, doch konnte eine umfassende Validierung des Modells innerhalb des Projektzeitraumes noch nicht geleistet werden. Erste Modellverifizierungen, die anhand der erhobenen Freilanddaten zur Bestimmung der horizontalen Transmission und Persistenz des CpGV durchgeführt wurden, ergaben jedoch eine sehr gute Übereinstimmung zwischen den beobachteten Werten und den Simulationswerten (Kap. 7.1). Dies lässt auf eine sehr gute Modellperformance schließen.

Eine weitergehende Modellvalidierung wäre der natürliche und notwendige nächste Schritt, um die Genauigkeit der getroffenen Modellaussagen zu prüfen und möglicherweise vorhandene Schwachstellen auszumerzen. Dennoch bieten die umfangreichen Untersuchungen und viele der für das System Apfelwickler/CpGV erstmals erhobenen biologischen Parameter eine wertvolle Datengrundlage und in ihrer Integration zu einem mathematischen Modell auch ein Analysewerkzeug, das qualitative und semi-quantitative Vorhersagen zum möglichen Verhalten von CpGV mit veränderten biologischen Eigenschaften erlaubt.

Im Folgenden sollen nochmals die einzelnen Parameter hinsichtlich ihres Modellverhaltens und der Bedeutung für die Populationsdynamik des CpGV und von Baculoviren im Einzelnen betrachtet werden.

UV-Inaktivierung

Die Stabilität der Viren in der Umwelt hängt im Allgemeinen von den physikochemischen Eigenschaften des Einschusskörpers, der Virionen und der viralen DNA ab. Ein wesentlicher Faktor, der reduzierend auf die Aktivität der Viren wirkt, ist die Inaktivierung mittels UV-Licht. In Modellexperimenten konnte gezeigt werden, dass die UV-Inaktivierung in Abhängigkeit von der Dauer und Intensität der Sonneneinstrahlung sehr schnell und umfassend sein kann. Andererseits gaben die unter natürlichen Feldbedingungen angestellten Versuche Hinweise darauf, dass die biologische Aktivität der

Viren möglicherweise länger im System erhalten bleibt, als durch die reinen Inaktivierungsversuche auf Blattoberflächen vorhergesagt wurde. Dies könnte damit zusammenhängen, dass sich das Virus-Insektizid bei der Spritzung an relativ geschützten Orten, wie z. B. Borkenritzen, Blattachseln, Kelch- und Stielgrube der Äpfel, oder Berührungsflächen von Blättern und Äpfeln oder Äpfeln und Äpfeln sammelt und dort im Vergleich zur Blattoberfläche einer relativ geringen direkten UV-Strahlung ausgesetzt ist.

Für die Betrachtung der Persistenz und der Populationsdynamik des Virus ist die UV-Inaktivierung von enormer Bedeutung, da sie neben der Auswaschung durch Regen den wesentlichen *Sink* für das Virus im System darstellt. Da in Hinblick auf eine gentechnische Veränderung die physiko-chemischen Eigenschaften der Viren in der Regel kaum betroffen sein sollten, spielt dies für den Vergleich zwischen natürlichen und gentechnisch veränderten CpGV und Baculoviren im Allgemeinen, nur eine untergeordnete Rolle.

Virulenz

Die Virulenz des Virus umfasst alle Faktoren und Eigenschaften, welche den Grad und die Schwere der Krankheitsetablierung auf der Ebene des Individuums und der Population beschreiben. Biologische Eigenschaften des Wirt/Virus-Systems, die in Bezug zur Virulenz stehen, sind (1) Anzahl der Viren, die für die Etablierung der Infektion notwendig ist und mittels LC_{50} oder LD_{50} parametrisiert werden kann, (2) die Wirkgeschwindigkeit, die als LT_{50} bzw. ST_{50} ausgedrückt werden kann und (3) die Endmortalität innerhalb einer befallenen Population. Die Erhöhung der Wirkgeschwindigkeit und die Erhöhung der Virulenz der Viren gegenüber älteren Larvenstadien werden als primäre Ziele jeder Selektion wirksamerer Genotypen bzw. der Herstellung gentechnisch veränderter Rekombinanten betrachtet. Aus dem Virus/Wirt-System AcMNPV/*S. frugiperda* und vielen anderen Wirt/Virus-Kombinationen ist bekannt, dass sich eine Erhöhung der Wirkgeschwindigkeit in der Regel negativ auf die Höhe der Produktion an Virusnachkommen pro Insektenlarve auswirkt. Dies wurde sowohl für Toxin-exprimierende Rekombinanten als auch für Baculoviren mit einer *egt*-Deletion beobachtet. Entgegen der ursprünglichen Annahme zeigten die in dieser Studie in Betracht ge-

zogene CpGV-*egt*(-)- und AcMNPV-*egt*(-)-Rekombinante keine Veränderung der Wirkgeschwindigkeit gegenüber den Ziellarvenstadien (Winstanley, pers. Mitt., vgl. Kap. 3.2.2). In den Untersuchungen zur Aktivität von AcMNPV/RM1 gegenüber *S. exigua* und *H. armigera* konnte weder eine Wirkbeschleunigung noch eine Reduktion der Virusnachkommen festgestellt werden. Diese und die Beobachtungen aus jüngeren Studien (Bianchi *et al.*, 2000, Slavicek *et al.*, 1999) haben gezeigt, dass die *egt*-Deletion keine generelle Strategie ist, die Wirkgeschwindigkeit des Virus zu erhöhen. Vielmehr scheint diese von der jeweiligen Virus/Wirtkombination und vom betrachteten Larvenstadium abhängig zu sein. Beispielsweise wurde sowohl für die *egt*-Deletionsmutanten von CpGV wie für das LdMNPV gefunden, dass diese gentechnische Veränderung nur die Wirksamkeit gegenüber dem L5-Larvenstadium beeinflusst (Winstanley, pers. Mitt., Slavicek *et al.*, 1999).

Von größerer Bedeutung hingegen ist die Beobachtung, dass das CpGV entgegen bisherigen Annahmen unter Feldbedingungen eine gute Wirkung auf ältere Larvenstadien (L2-L5) zeigt. Offensichtlich infizieren sich diese Altstadien noch, nachdem sie sich bereits in den Apfel eingebohrert haben. Wie in Kap. 3.1.6.2 gezeigt, wird durch die Wirkung auf ältere Larvenstadien der Fruchtschaden nicht vermieden. Da jedoch die Wirkung auf ältere Larvenstadien zu ähnlichen Endmortalitäten wie die Infektion von L1-Larven führt, hat diese Wirkung für die weitere Populationsentwicklung des Apfelwicklers eine signifikante Bedeutung. Die Wirkung auf Altlarven könnte auch ein Grund für die beobachtete positive Regulierung von Apfelwicklerpopulationen in Gebieten sein, wo CpGV-Präparate kommerziell eingesetzt werden (Kienzle *et al.*, 2001).

Zudem produzieren ältere Larven 100-1000mal mehr Viren als infizierte L1-Larven (Kap. 3.1.4), so dass in der Infektion älterer Larvenstadien ein bedeutendes Reservoir für die Produktion von Virusnachkommen gesehen werden muss. Bei gentechnisch veränderten CpGV, die eine schnellere Wirkung und eine damit einhergehende Reduktion der Virusnachkommen insbesondere bei älteren Larvenstadien aufweisen, würde diese Eigenschaft zu einer deutlichen Reduktion der in der Apfelwicklerpopulation neu produzierten Virusnachkommen führen.

Horizontale Transmission

Im Rahmen der Untersuchungen wurde ferner festgestellt, dass bei L1-Larven eine horizontale Übertragung des CpGV stattfinden kann. Zum einen kann diese Übertragung zu einer verbesserten und vor allem einer länger anhaltenden Wirkung des CpGVs beitragen. Zum anderen muss sie auch bei der Risikobewertung gentechnisch veränderter Viren mit evaluiert werden, weil diese Form der Transmission für Persistenz und Etablierung in der Umwelt von großer Bedeutung ist. Sofern sich das Verhalten der Larven nicht verändert, dürfte sich die Transmissionsrate für gentechnisch veränderte Viren nicht wesentlich von den untersuchten Wildtyp-Viren unterscheiden, denn es konnte gezeigt werden, dass das Vorhandensein eines Kadavers wichtig ist, weniger aber, wie viele Einschlusskörper in diesem Kadaver enthalten sind. Untersucht wurde noch nicht, inwieweit eine Infektion in älteren Larvenstadien an andere Larven weitergegeben werden kann. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass auch im Apfelinnern oder anschließend am Verpuppungsort eine Übertragung stattfinden kann. Daher muss festgehalten werden, dass die horizontale Transmission, besonders bei einer entsprechend hohen Wirtsdichte, eine erhebliche Rolle spielen kann.

Vertikale Transmission

Eine weitere Möglichkeit der Etablierung kann durch eine Virusübertragung auf die Nachkommen stattfinden. Im Rahmen dieser Arbeit konnte festgestellt werden, dass eine Übertragung wahrscheinlich über subletal infizierte Weibchen erfolgen kann. Dies bedeutet natürlich auch hier, dass in der Folgeinsektengeneration eine zusätzliche Wirkung des CpGV auftreten kann und dass auch diese Form der Übertragung möglicherweise zu einer dauerhaften Etablierung eines gentechnisch veränderten Virus beitragen kann. Da über den Mechanismus der vertikalen Transmission beim CpGV nichts bekannt ist, kann im Gegensatz zur horizontalen Transmission, über den Einfluss einer gentechnischen Veränderung eines Virus auf seine vertikale Transmission keine Aussage getroffen werden.

Die Existenz jedes Virus ist der sichere Hinweis auf das Vorliegen einer erfolgreichen Überlebensstrategie. Anders als in anderen Insektenpopulationen, wie z.B. bei den

Forstschädlingen *Lymantria dispar* (Dwyer *et al.*, 1997) und *Panolis flammea* (Entwistle *et al.*, 1993), treten beim Apfelwickler keine Baculovirus-bedingten Epizootien auf. Hierfür reicht die Populationsdichte des Apfelwicklers in einer Anlage nicht aus. Eine Apfelwicklerpopulation wird vermutlich durch andere Faktoren wie z. B. Räuber und die Anzahl der Verpuppungsverstecke reguliert (Geier, 1961). Das saisonale Vorkommen des Apfelwicklers eignet sich nicht für eine ausschließlich horizontale Transmission, während die vertikale Transmission grundsätzlich durch die hohe Virulenz des Virus benachteiligt wird. Aufgrund dieser Überlegungen ist nicht auszuschließen, dass möglicherweise weitere Insektenarten als alternative Wirte des CpGV eine Rolle bei der Etablierung in der Umwelt spielen. Beispielsweise sind *Choristoneura rosaceana* und *Archips argyrospila*, die ebenfalls in Apfelanlagen vorkommen können, wesentlich unempfindlicher gegenüber dem CpGV (Eastwell *et al.*, 1999). Persistenz und Vermehrung in solchen Wirten könnten einen wesentlichen Beitrag zur Populationsdynamik des Virus leisten. Bei der Betrachtung der Etablierungsfähigkeit von gentechnisch veränderten CpGV wären dann auch diese alternativen Wirte mit einzubeziehen. Bei anderen Baculoviren konnte beobachtet werden, dass sie durch Regen (D'Amico & Elkinton, 1995; Kaupp, 1981) und Räuber, wie z.B. Vögel, verbreitet wurden (Entwistle *et al.*, 1993). Außerdem können *C. pomonella*-Falter erhebliche Strecken zurücklegen (Schuhmacher *et al.*, 1997). Sie könnten so durch eine Emigration bzw. Immigration von subletal infizierten Tieren ebenfalls zur Verbreitung des Virus in andere Gebiete beitragen. Bei der Betrachtung der Etablierungswahrscheinlichkeit müsste also ein wesentlich breiterer Ansatz verfolgt werden.

Die im Rahmen der Modellierung erhobenen Daten zur Virusproduktion in infizierten Larven, zur UV-Inaktivierung und biologischen Persistenz und zur horizontalen und vertikalen Transmission deuten insgesamt darauf hin, dass das Fortbestehen eines pathogenen Virus in der Population auch bei einem Wirt, der wie z. B. der Apfelwickler verdeckt minierend frisst und in relativ geringen Dichten vorhanden ist, durch angepasste Eigenschaften gesichert werden kann. Inwiefern diese Beziehung allein zu einer dauerhaften Etablierung führen kann, muss in weiteren Untersuchungen geklärt werden.

Ein gentechnisch verändertes Virus wäre nur aus der Population zu eliminieren, wenn seine biologischen Eigenschaften in mindestens einem der für Etablierung entscheidenden Eigenschaften von Transmission, Replikation und Persistenz nachteilig signifikant verändert wäre. Für die Risikoabschätzung gentechnisch veränderter Viren bedeutet dies, dass die biologische Sicherheit der Viren nicht allein in der mangelnden Konkurrenzkraft oder einem Selektionsnachteil gegenüber Wildtypviren begründet sein kann, sondern auf Grund ihres prognostizierten Etablierungspotenzials allein auf der Basis der veränderten genetischen Eigenschaft und des damit verbundenen biologischen Verhaltens bemessen werden darf.

Das erstellte Modell zur Populationsdynamik des Apfelwickler-CpGV-System ist als Werkzeug geeignet, um die Einflüsse der CpGV-Applikation, des Zeitpunktes der Applikation und der ausgebrachten Virusmenge auf die Kontrolle des Apfelwicklers analytisch zu untersuchen. Viele dieser Aspekte nehmen direkten Bezug zur aktuellen Pflanzenschutzpraxis, in der CpGV als eines der wenigen zugelassenen Mittel zur Kontrolle des Apfelwicklers eingesetzt wird. Ein modellgestützter, optimierter Einsatz des CpGV im Pflanzenschutz könnte somit dazu beitragen, den direkten Wirkungsgrad einer Virus-Applikation zu erhöhen und den bestmöglichen Einfluss auf die Populationsdynamik des Apfelwicklers zu ermitteln. Damit kann das Modell über die Fragestellung der Risikoabschätzung gentechnisch veränderter Baculoviren hinaus, auch einen wertvollen Beitrag zum besseren Einsatz und zur optimaleren Gestaltung bestehende Kontrollstrategien des Apfelwicklers leisten.

9 Zusammenfassungen

Zusammenfassung

Baculoviren werden zunehmend als selektive und umweltfreundliche Bioinsektizide zur biologischen Kontrolle von Schadinsekten verwendet. Die Methoden der Gentechnologie haben in jüngster Zeit zusätzlich die Möglichkeit erschaffen, deren genetische und damit auch insektizide Eigenschaften zu verändern. Eine Abschätzung mittel- und langfristiger ökologischer Konsequenzen des Einsatzes natürlicher und gentechnisch veränderter Viren ist nur bei hinreichender Kenntnis ihrer biologischen Eigenschaften in der Umwelt und der daraus resultierenden Abundanzdynamik in der Population der Wirtsinsekten möglich.

Im Rahmen dieses Projektes wurden verschiedene Parameter quantifiziert, mit deren Hilfe die Populationsdynamik des Apfelwicklergranulovirus (CpGV) mathematisch beschrieben werden kann. Hierfür wurden die Virulenz (mittlere Letalkonzentration, Wirkgeschwindigkeit), Menge der Virusnachkommen, UV-Inaktivierung der Viren, horizontale Transmission und vertikale Transmission in Labor- und Freilandexperimenten quantitativ erfasst. Relevante Parameter, welche die Dynamik der Wirtspopulation (Apfelwickler: *Cydia pomonella*) beschreiben, wurden der Literatur entnommen oder in Laborexperimenten bestimmt. Für die sich gegenseitig beeinflussenden Populationsdynamiken des Systems CpGV-Apfelwickler wurde das deterministische mathematische Modell GRANULO programmiert, in das die erhobenen Parameter eingeflossen sind. Das Modell erlaubt die Simulation der Populationsdynamiken von Wirt und Virus unter verschiedenen Bedingungen. Durch Verändern der Viruseigenschaften (Parameter) im Modell kann der mögliche Effekt der genetischen Veränderung auf die Populationsdynamiken von Wirt und Virus simuliert werden. Die Modellierung und ihre Überprüfung sollen zu einer Abschätzung der Prognosesicherheit für die Populationsdynamik veränderter Viren in der natürlichen Umwelt eingesetzt werden. Damit wird die Einschätzung möglicher Risiken bei dem Einsatz gentechnisch veränderter Baculoviren in der Umwelt

verbessert. Weiterhin soll das Modell zur präziseren Planung biologischer Bekämpfungsstrategien mit natürlichen Baculoviren beitragen.

Summary

Baculoviruses are increasingly being used as selective and environmentally friendly bio-insecticides. With the advent of genetic engineering, it has become possible to modify their genetic information for improved insecticidal properties. Before releasing a recombinant baculovirus, it is necessary to assess the long-term ecological consequences. This can only be accomplished by understanding the biological traits and forces that drive the population dynamics of the virus.

This project focussed on the analysis and quantification of parameters that are important in describing the population dynamics of the codling moth granulovirus (CpGV) in mathematical terms. Parameters, such as the virulence of the virus (median lethal concentration and median lethal time), its inactivation rate, the production rate of virus progeny and both the horizontal and vertical transmission rate, were quantified in laboratory and field experiments. Parameters essential to the host population dynamics of the codling moth, *Cydia pomonella*, (mortality rate, developmental rate, reproduction rate) were largely extracted from previously published articles. A mathematical model that integrated all parameters was developed for the two interacting systems of CpGV and the codling moth. With this model, the population dynamics of CpGV and the codling moth can be simulated under various conditions. Simulations for a genetically modified CpGV can be generated by varying the virus parameters in the model. The purpose of the model is to help assess the risks of a recombinant virus by forecasting its fate in the field and also to aid a more precise planning of the control strategies using a naturally occurring baculovirus.

10 Literatur

Abbott, W. S. (1925). A method of computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of Economic Entomology* **18**, 265-267.

Andermatt, M., Mani, E., Wildbolz, T. & Luthy, P. (1988). Susceptibility of *Cydia pomonella* to *Bacillus thuringiensis* under laboratory and field conditions. *Entomologia Experimentalis Et Applicata* **49**, 291-295.

Anderson, R. M. & May, R. M. (1981). The population dynamics of microparasites and their invertebrate hosts. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London, B* **291**, 451-524.

Audemard, H. (1976). Étude demoecologique du carpocapse (*Laspeyresia pomonella* L.) en verger de pommiers de la basse vallée du Rhône: Possibilités d'organisation d'une lutte intégrée, Dissertation, Université de Tours, 365 pp.

Ballard, J., Ellis, D. J. & Payne, C. C. (2000). Uptake of granulovirus from the surface of apples and leaves by first instar larvae of the codling moth *Cydia pomonella* L. (Lepidoptera : Olethreutidae). *Biocontrol Science & Technology* **10**, 617-625.

Bathon, H. (1981). Zur Zucht des Apfelwicklers, *Laspeyresia pomonella* (L.) (Lep., Tortricidae), auf einem künstlichen Nährmedium. *Mitteilungen der deutschen Gesellschaft für angewandte Entomologie* **2**, 136-140.

Bianchi, F. J. J. A.; Snoeijng, I.; Van der Werf, W.; Mans, R. M. W.; Smits, P. H.; Vlak, J. M. (2000): Biological activity of SeMNPV, AcMNPV, and three AcMNPV deletion mutants against *Spodoptera exigua* larvae (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Invertebrate Pathology* **75**, 23-35.

Bianchi, F. J. J. A. (2001). Process-based modeling of the control of beet armyworm, *Spodoptera exigua*, with baculoviruses in greenhouse chrysanthemum. In *Department of Virology*, Wageningen University, 143 pp.

Bitton, G. (1980). Adsorption viruses to surfaces: Technological and ecological implications. In *Adsorption of Microorganisms to Surfaces*. Bitton, G.; Marshall, K. C. (Hrsg.), a Wiley-Interscience Publication John Wiley & Sohns, New York, Chichester, Brisbane, Toronto, 331-374.

- Black, B. C., Brennan, L. A., Dierks, P. M. & Gard, I. E. (1997).** Commercialization of baculovirus insecticides. In *The Baculoviruses*, pp. 341-387. Edited by L. K. Miller. New York: Plenum Press.
- Blago, N. (1992).** EURO-BUGOFF, ein Prognosemodell für die biologische und integrierte Bekämpfung des Apfelwicklers *Cydia pomonella* L. in Europa. Dissertation, Gießen.
- Blago, N. & Dickler, E. (1990).** Neue Methode zur Untersuchung der Ei-Phänologie des Apfelwicklers, *Cydia pomonella* L. (Lep., Tortricidae). *Journal of Applied Entomology* **109**, 98-104.
- Borden, A. D. (1931).** Some field observations on codling moth behavior. *Journal of Economic Entomology* **24**, 1137-1145.
- Bowers, R. G., Begon, M. & Hodgkinson, D. E. (1993).** Host-pathogen population cycles in forest insects? Lessons from simple models reconsidered. *Oikos* **67**, 529-538.
- Burden, J. P., Hails, R. S., Windass, J. D., Suner, M. M. & Cory, J. S. (2000).** Infectivity, speed of kill, and productivity of a baculovirus expressing the itch mite toxin txp-1 in second and fourth instar larvae of *Trichoplusia ni*. *Journal of Invertebrate Pathology* **75**, 226-236.
- Camponovo, F.; Benz, G. (1984).** Age-dependent tolerance to baculovirus in last larval instar of the codling moth, *Cydia pomonella* L., induced either for pupation or for diapause. *Experientia* **40**, 938-939.
- Cattaneo, R., Schmid, A., Eschle, D., Baczko, K., ter Meulen, V. & Billeter, M. A. (1988).** Biased hypermutation and other genetic changes in defective measles viruses in human brain infections. *Cell* **55**, 255-265.
- Charmillot, P. J. (1989).** Control of the codling moth *Cydia pomonella* L. by means of the granulosis virus. *Revue Suisse de Viticulture, d'Arboriculture et d'Horticulture* **21**, 43-47.
- Chen, X., Hu, Z., Jehle, J. A., Zhang, Y. & Vlak, J. M. (1997).** Analysis of the ecdysteroid UDP-glucosyltransferase gene of *Heliothis armigera* single-nucleocapsid baculovirus. *Virus Genes* **15**, 219-25.
- Chen, X. W., Sun, X. L., Hu, Z. H., Li, M., O'Reilly, D. R., Zuidema, D. & Vlak, J. M. (2000).** Genetic engineering of *Helicoverpa armigera* single-nucleocapsid nucleo-

polyhedrovirus as an improved pesticide. *Journal of Invertebrate Pathology* **76**, 140-146.

Codling Moth Information Support System (CMISS).

<http://www.ippc.orst.edu/CodlingMoth/modeling/index.html>

Cory, J. S., Hirst, M. L., Williams, T., Hails, R. S., Goulson, D., Green, B. M., Carty, T. M., Possee, R. D., Cayley, P. J., Bishop, D. H. L. (1994). Field trial of a genetically improved baculovirus insecticide. *Nature* **370**, 138-140.

Cory, J. S. & Hails, R. S. (1997). The ecology and biosafety of baculoviruses. *Current Opinion in Biotechnology* **8**, 323-327.

Cory, J. S., Hails, R. S. & Sait, S. M. (1997). Baculovirus ecology. In *The Baculoviruses*, pp. 301-339. Edited by L. K. Miller. New York: Plenum Press.

Cory, J. S. (2000). Assessing the risks of releasing genetically modified virus insecticides: progress to date. *Crop Protection* **19**, 779-785.

Coutin, R. (1959). La pénétration des larves de *Laspeyresia pomonella* L. dans les fruits des Pomacées. *Bull. Soc. Entomol. Fr.* **64**, 100-105.

Crook, N.E.; Payne, C.C.; Richards, M.G.; Spencer, R.; Morgan, C.F. (1984). Granulosis virus of the codling moth, *Cydia pomonella*. *Annual Report of the GCRI* 1984, 93-99.

Crook, N.E., Spencer, R.A., Payne, C.C., Leisy, D.J. (1985). Variation in *Cydia pomonella* granulosis virus isolates and physical maps of the DNA from three variants. *Journal of General Virology* **66**, 2423-2430.

Crook, N. E., James, J. D., Smith, I. R. L. & Winstanley, D. (1997). Comprehensive physical map of the *Cydia pomonella* granulovirus genome and sequence analysis of the granulin gene region. *Journal of General Virology* **78**, 965-974.

D'Amico, V. & Elkinton, J. S. (1995). Rainfall effects on transmission of gypsy moth (Lepidoptera: Lymandriidae) nuclear polyhedrosis virus. *Environmental Entomology* **24**, 1144-1149.

D'Amico, V., Elkinton, J. S., Dwyer, G. & Burand, J. P. (1996). Virus transmission in gypsy moths is not a simple mass action process. *Ecology* **77**, 201-206.

- Deseö, K. & Saringer, G. (1975).** Photoperiodic effect on fecundity of *Laspeyresia pomonella*, *Grapholitha funebrana*, *G. molesta*: the sensitive period. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **18**, 187-193.
- Deseö, K. V. (1973).** Side-effect of diapause inducing factors on the reproductive activity of some lepidopterous species. *Nat. New Biol.* **242**, 126-127.
- Dizer, H. (1988).** Adsorptions-und Transportverhalten von Viren bei Sandfiltration. Schr.-Reihe Verein WaBoLu 78, Gustav Fischer Verlag Stuttgart, 89-105.
- Dwyer, G. (1992).** On the spatial spread of insect pathogens: theory and experiment. *Ecology* **73**, 479-494.
- Dwyer, G., Dushoff, J., Elkinton, J. S. & Levin, S. A. (2000).** Pathogen-driven outbreaks in forest defoliators revisited: building models from experimental data. *American Naturalist* **156**, 105-120.
- Dwyer, G. & Elkinton, J. S. (1993).** Using simple models to predict virus epizootics in gypsy moth populations. *Journal of Animal Ecology* **62**, 1-11.
- Dwyer, G., Elkinton, J. S. & Buonaccorsi, J. P. (1997).** Host heterogeneity in susceptibility and disease dynamics: tests of a mathematical model. *American Naturalist* **150**, 685-707.
- Eastwell, K. C., Cossentine, J. E. & Bernardy, M. G. (1999).** Characterisation of *Cydia pomonella* granulovirus from codling moths in a laboratory colony and in orchards of British Colombia. *Annals of Applied Biology* **134**, 285-291.
- Easwaramoorthy, S. & Jayaraj, S. (1989).** Vertical transmission of granulosis virus of sugarcane shoot borer, *Chilo infuscatellus* Snell. *Tropical Pest Management* **35**, 352-353.
- El-Salamouny, S. (1998).** Increasing efficacy of nucleopolyhedroviruses, and a comparative study of an Egyptian isolate, PhD thesis, University of Cairo, 238 pp.
- Engelhard, E. K., Kam Morgan, L. N. W., Washburn, J. O. & Volkman, L. E. (1994).** The insect tracheal system: a conduit for the systemic spread of *Autographa californica* M nuclear polyhedrosis virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**, 3224-3227.

- Entwistle, P. F., Adams, P. H. W., Evans, H. F. (1977).** Epizootiology of a nuclear polyhedrosis virus in european spruce sawfly, *Gilpinia hercyniae*: birds as dispersal agents of the virus during winter. *Journal of Invertebrate Pathology* **30**, 473-487.
- Entwistle, P. F., Forkner, A. C., Green, B. M., Cory, J. S. (1993).** Avian dispersal of nuclear polyhedrosis viruses after induced epizootics in the pine beauty moth, *Panolis flammea* (Lepidoptera: Noctuidae). *Biological Control* **3**, 61-69.
- Etzel, L. K. & Falcon, L. A. (1976).** Studies of transovum and transstadial transmission of a granulosis virus of the codling moth. *Journal of Invertebrate Pathology* **27**, 13-26.
- Evans, H. F.; Bishop, J. M., Page, E. A. (1980):** Methods for the quantitative assessment of nuclear polyhedrosis virus in soil. *Journal of Invertebrate Pathology* **35**, 1-8.
- Falcon, L. A. (1978).** Economical and biological importance of baculoviruses as alternatives to chemical pesticides. In *Proc. Symp. Safety of Baculoviruses as biological Insecticides, Jülich 1978*, pp. 27-46. Edited by H. G. Miltenburger. Bonn: Bundesministerium für Forschung und Technologie.
- Federici, B. A. (1997).** Baculovirus Pathogenesis. In *The Baculoviruses*, pp. 33-59. Edited by L. K. Miller. New York: Plenum Press.
- Ferro, D. N. & Harwood, R. F. (1973).** Intraspecific larval competition by the codling moth, *Laspeyresia pomonella*. *Environmental Entomology* **2**, 783-789.
- Ferro, D. N., Sluss, R. R. & Bogyo, T. P. (1975).** Factors contributing to the biotic potential of the codling moth, *Laspeyresia pomonella* (L.), in Washington. *Environmental Entomology* **4**, 385-391.
- Finney, D. J. (1971).** Probit Analysis. Cambridge University Press, Cambridge 3rd edition.
- Fritsch, E. & Huber, J. (1985).** Inaktivierung von Apfelwickler-Granuloseviren durch UV-Strahlung und Temperatur. *Nachrichtenblatt Deutscher Pflanzenschutzdienst* **37**, 84-88.
- Fritsch, E. & Huber, J. (1989).** Comparative field persistence of granulosis viruses under tropical and European conditions. *WPRS/IOBC Bulletin* **XII/4**, 84-87.
- Fritsch, E. (1989).** Das Granulosevirus des Falschen Apfelwicklers, *Cryptophlebia leucotreta* (Meyrick). Dissertation, TH Darmstadt.

- Fuxa, J. R. & Richter, A. R. (1991).** Selection for an increased rate of vertical transmission of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) nuclear polyhedrosis virus. *Environmental Entomology* **20**, 603-609.
- Garlick, W. G. (1948).** A five-year study of codling moth larval habits and adult emergence. *Sci. Agric.* **28**, 273-292.
- Geier, P. (1963).** The life history of the codling moth, *Cydia pomonella* (L.) (Lepidoptera: Tortricidae) in the Australian Capital Territory. *Australian Journal of Zoology* **11**, 323-367.
- Geier, P. W. (1961).** Numerical regulation of populations of codling moth, *Cydia pomonella* (L.). *Nature, Lond.* **190**, 561-562.
- Geier, P. W. & Briese, D. T. (1978).** The demographic performance of a laboratory strain of codling moth, *Cydia pomonella* (Lepidoptera: Tortricidae). *Journal of Applied Ecology* **15**, 679-696.
- Geier, P. W. & Oswald, L. T. (1977).** The light-brown apple moth, *Epiphyas postvittana* (Walker): 1. Effects associated with contamination by a nuclear polyhedrosis virus on the demographic performance of a laboratory strain. *Australian Journal of Ecology* **2**, 2-29.
- Glen, D. M. & Clark, J. (1985).** Death of *Cydia pomonella* larvae and damage to apple fruit, after field application of codling moth granulosis virus. *Entomologia experimentalis et applicata* **38**, 93-96.
- Glen, D. M., Milsom, N. F. & Wiltshire, C. W. (1981).** The effect of predation by blue tits (*Parus caeruleus*) on the sex-ratio of codling moth (*Cydia pomonella*). *Journal of Applied Ecology* **18**, 133-140.
- Glen, D. M. & Payne, C. C. (1984).** Production and field evaluation of codling moth granulosis virus for control of *Cydia pomonella* in the United Kingdom. *Annals of Applied Biology* **104**, 87-98.
- Glenn, P. A. (1922).** Codling moth investigations of the State Entomologist's office. *Bulletin of the Illinois Natural History Survey* **14**, 219-289.
- Gold, H. J., Kendall, W. L. & Shaffer, P. L. (1987).** Nonlinearity and the effects of microclimatic variability on a codling moth population (*Cydia pomonella*) a sensitivity simulation. *Ecological Modelling* **37**, 139-154.

- Gottwald, R. (1996).** Prognose der Phänologie wichtiger Schadorganismen im Apfelbau mit Hilfe von Temperatursummen. *Gesunde Pflanze* **4**, 140-146.
- Goulson, D. & Cory, J. S. (1995).** Sublethal effects of baculovirus in the cabbage moth, *Mamestra brassicae*. *Biological Control* **5**, 361-367.
- Granados, R. R. & Williams, K. A. (1986).** In vivo infection and replication of baculoviruses. In *The Biology of Baculoviruses, Vol.I, Biological Properties and Molecular Biology*, pp. 89-108. Edited by R. R. Granados & B. A. Federici. Boca Raton, Florida: CRC Press.
- Gröner, A. (1986).** Specificity and safety of baculoviruses. In *The Biology of Baculoviruses*, pp. 177-202. Edited by R. R. Granados & B. A. Federici. Boca Raton, Florida: CRC Press.
- Hagley, E. A. C. (1972a).** Effect of rainfall on the survival and establishment of codling moth larvae [*Laspeyresia pomonella*]. *Environmental Entomology* **1**, 446-447.
- Hagley, E. A. C. (1972b).** Observations on codling moth longevity and egg hatchability. *Entomops* **1**, 123-125.
- Hall, J. A. (1929).** Six years' study of the life history and habits of the codling moth (*Carpocapsa pomonella* L.). *Ontario Entomological Society of Annual Report* **59**, 96-105.
- Hall, J. A. (1934).** Observations on the behaviour of newly hatched codling moth larvae. *Canadian Entomologist* **67**, 100-102.
- Harvey, J. P. & Volkman, L. E. (1983).** Biochemical and biological variation of *Cydia pomonella* (codling moth) granulosis virus. *Virology* **124**, 21-34.
- Hathaway, D. O., Butt, B. A. & Lydin, L. V. (1970).** Reduction of sexual aggressiveness of male codling moths treated with tepa or gamma irradiation. *Journal of Economic Entomology* **63**, 1881-1883.
- Hathaway, D. O., Clift, A. E. & Butt, B. A. (1971).** Development and fecundity of codling moths reared on artificial diets or immature apples. *Journal of Economic Entomology* **64**, 1088-1090.
- Hern, A. & Dorn, S. (2001).** Induced emissions of apple fruit volatiles by the codling moth: changing patterns with different time periods after infestation and different larval instars. *Phytochemistry* **57**, 409-416.

- Hoerner, J. L. (1925).** Notes on codling moth larvae. *Journal of Economic Entomology* **18**, 423-424.
- Hofmann, C., Huser, A., Lehnert, W., Sandig, V., Jennings, G., Rudolph, M., Brand, K. & Strauss, M. (1998).** Baculovirus-based vectors for gene delivery into liver cells. *Eurocancer* **98**, 257-258.
- Hofmann, C., Sandig, V., Kirillova, I., Jennings, G., Rudolph, M., Schlag, P. & Strauss, M. (1995).** Hepatocyte-specific binding of L/S-HBV particles expressed in insect cells. *Biol Chem Hoppe Seyler* **376**, 173-178.
- Howard, C. R. (1986).** The biology of hepadnaviruses. *Journal of General Virology* **67**, 1215-1235.
- Howard, L. O. (1887).** The codling moth. , 88-115.
- Howell, J. F. & Neven, L. G. (2000).** Physiological development time and zero development temperature of the codling moth (Lepidoptera : Tortricidae). *Environmental Entomology* **29**, 766-772.
- Hu, Z.H. and Vlak, J.M. (1997)** Engineering of biosafe baculoviruses with improved insecticidal properties: development and prospects. *Virologica Sinica* **12**, 14-25.
- Huber, J. & Dickler, E. (1975).** Field tests on the control of the codling moth, *Laspeyresia pomonella* (L.), with granulosis virus. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz* **82**, 540-546.
- Huber, J. (1981).** Apfelwickler-Granulosevirus: Produktion und Biotests. *Mitteilungen der deutschen Gesellschaft für allgemeine angewandte Entomologie* **2**, 141-145.
- Huber, J. & Hughes, P. R. (1984).** Quantitative bioassay in insect pathology. *Bulletin of the Entomological Society of America* **30**, 31-34.
- Hughes, D. S., Possee, R. D. & King, L. A. (1997).** Evidence for the presence of a low-level, persistent baculovirus infection of *Mamestra brassicae* insects. *J Gen Virol* **78**, 1801-5.
- Hughes, P. R. & Wood, H. A. (1981).** A synchronous peroral technique for the bioassay of insect viruses. *Journal of Invertebrate Pathology* **37**, 154-159.
- Hukuhara, A. (1987).** Demonstration of polyhedra inclusion bodies of a nuclear polyhedrosis virus in field soil by immunofluorescence microscopy. *Journal of Invertebrate Pathology* **49**, 130-132.

- Ivaldi-Sender, C. (1974).** Techniques simples pour élevage permanent de la tordeuse orientale, *Grapholita molesta* (Lep., Tortricidae), sur milieu artificiel. *Ann. Zool. Ecol. Anim.* **6**, 337-343.
- Jackson, D. M. (1982).** Searching behavior and survival of 1st-instar codling moths (*Cydia pomonella* (L) Lepidoptera, Olethreutidae. *Annals of the Entomological Society of America* **75**, 284-289.
- Jaques, R. P. (1971).** Microbial demonstration of polyhedra in soil. *Journal of Invertebrate Pathology* **18**, 162-164.
- Jaques, R.P. (1977).** Stability of entomopathogenic viruses. *Misc. Publications of the Entomological Society of America* **10 (3)**, 99-116.
- Jaynes, H. A. & Marucci, P. E. (1947).** Effect of artificial control practices on the parasites and predators of the codling moth. *Journal of Economic Entomology* **40**, 9-25.
- Jehle, J. A. (1997).** Bioinsektizide. *Nachr. Chem.Tech. Lab.* **45**, 384-386.
- Jehle, J. A., Fritsch, E. & Huber, J. (1993).** Aspects of the stability of the host-pathogen interaction of baculoviruses. In *Transgenic organisms*, pp. 175-191. Edited by K. Wöhrmann & J. Tomiuk. Basel/Schweiz: Birkhäuser Verlag.
- Jehle, J. A., Fritsch, E., Nickel, A., Huber, J. & Backhaus, H. (1995).** TCI4.7: a novel lepidopteran transposon found in *Cydia pomonella* granulosus virus. *Virology* **207**, 369-379.
- Jorgensen, C. D., Martinsen, M. E. & Westover, L. J. (1979).** Validating Michigan State University's codling moth *Laspeyresia pomonella* , pest of apple orchards model (MOTHMDL) in an arid environment: a test in Utah. *Great Lakes Entomol.* **12**, 203-212.
- Kadir, H. B. A., Payne, C. C., Crook, N. E., Fenlon, J. S. & Winstanley, D. (1999).** The comparative susceptibility of the Diamondback moth *Plutella xylostella* and some other major Lepidopteran pests of Brassica crops to a range of baculoviruses. *Biocontrol Science and Technology* **9**, 421-433.
- Kaupp, W. J. (1981).** Studies of the ecology of the nuclear polyhedrosis virus of the European pine sawfly, *Neodiprion sertifer*. PhD Thesis. University of Oxford, UK.

- Keller, S. (1973).** Mikrobiologische Bekämpfung des Apfelwicklers (*Laspeyresia pomonella* [L.]) (= *Carpocapsa pomonella*) mit spezifischem Granulosisvirus. *Zeitschrift für Angewandte Entomologie* **73**, 137-181.
- Kermack, W. O. & McKendrick, A. G. (1927).** A contribution to the mathematical theory of epidemics. *Proceedings of the Royal Society of London A* **115**, 700-721.
- Kienzle, J., Zebitz, C. P. W., Schulz, C. & Huber, J. (2001a).** Persistence of the biological effect of codling moth granulovirus in the orchard - a preliminary field trial. *IOBC*.
- Kienzle, J., Gernoth, H., Litterst, M., Zebitz, C. P. W. & Huber, J. (2001b).** Codling moth granulovirus - an efficient tool for codling moth control in IPM. *IOBC*.
- Krieg, A., Gröner, A., Huber, J.; Matter, M. (1980).** Über die Wirkung von mittel- und langwelligen UV-Strahlen (UVA + UVB) auf insektenpathogene Bakterien und Viren und deren Beeinflussung durch UV-Schutzmittel. *Nachrichtenblatt Deutscher Pflanzenschutzdienst* **32**, 100-106.
- Krieg, A., Gröner, A., Huber, J., Zimmermann, G. (1981).** Inaktivierung von verschiedenen Insektenpathogenen durch ultraviolette Strahlen. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten* **88**, 38-48.
- Lischke, H. (1992).** A model to simulate the population dynamics of the codling moth (*Cydia pomonella*): parameter estimation, validation and sensitivity analysis. *Acta Horticulturae* **313**, 331-338.
- Lopez Pila, J. M. & Pila, J. M. L. (1988).** Auswirkungen von Baculoviren auf Grund- und Trinkwassser. *Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt für Land und Forstwirtschaft Berlin Dahlem* No. **246**, 178-190.
- Luque, T., Finch, R., Crook, N., O'Reilly, D., R. & Winstanley, D. (2001).** The complete sequence of the *Cydia pomonella* granulovirus genome. *Journal of General Virology* **82**, 2531-2547.
- MacLellan, C. R. (1960).** Cocooning behaviour of overwintering codling moth larvae. *Canadian Entomologist* **92**, 469-479.
- MacLellan, C. R. (1962).** Mortality of codling moth eggs and young larvae in an integrated orchard. *Canadian Entomologist* **94**, 655-666.

- MacLellan, C. R. (1972).** Sex ratio in three stages of field collected codling moth. *Canadian Entomologist* **104**, 1661-1664.
- MacLellan, C. R. (1977).** Trends of codling moth (Lepidoptera:Olethreutidae) populations over 12 years on two cultivars in an insecticide free orchard. *Canadian Entomologist* **109**, 1555-1562.
- Melamed Madjar, V., Raccach, B. & Madjar, V. M. (1979).** The transstadial and vertical transmission of a granulosis virus from the corn borer *Sesamia nonagrioides*. *Journal of Invertebrate Pathology* **33**, 259-264.
- Mellerik, D. M. & Fraser, N. W. (1987).** Physical state of the latent herpes simplex virus genome in a mouse model system: evidence supporting an episomal state. *Virology* **158**, 265-275.
- Miller, L. K. (1995).** Genetically engineered insect virus pesticides: present and future. *Journal of Invertebrate Pathology* **65**, 211-216.
- Miller, L. K. (1997).** The Baculoviruses. In *The Viruses*. Edited by H. Fraenkel-Conrat & R. R. Wagner. New York: Plenum Press.
- Murphy, F. A., Fauquet, C. M., Bishop, D. H. L., Ghabrial, S. A., Jarvis, A. W., Martelli, G. P., Mayo, M. A. & Summers, M. D. (Eds.) (1995).** Virus Taxonomy - The Classification and Nomenclature of viruses: Sixth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. New York: Springer-Verlag.
- Murray, K. D., Shields, K. S., Burand, J. P. & Elkinton, J. S. (1991).** The effect of gypsy moth metamorphosis on the development of nuclear polyhedrosis virus infection. *Journal of Invertebrate Pathology* **57**, 352-361.
- Myers, J. H., Malakar, R. & Cory, J. S. (2000).** Sublethal nucleopolyhedrovirus infection effects on female pupal weight, egg mass size, and vertical transmission in gypsy moth (Lepidoptera : Lymantriidae). *Environmental Entomology* **29**, 1268-1272.
- Neelgund, Y. F. & Mathad, S. B. (1978).** Transmission of nuclear polyhedrosis virus in laboratory population of the armyworm, *Mythimna (Pseudaletia) separata*. *Journal of Invertebrate Pathology* **31**, 143-147.
- Nordin, G. L., Brown, G. C. & Jackson, D. M. (1990).** Vertical transmission of two baculoviruses infectious to the tobacco budworm, *Heliothis virescens* (F.) (Lepidoptera:

Noctuidae) using an autodissemination technique. *Journal of the Kansas Entomological Society* **63**, 393-398.

OECD (2002). Consensus Document on Information used in the Assessment of Environmental Applications involving Baculovirus. Series on Harmonization of Regulatory Oversight in Biotechnology, No. 20, OECD Environment, Health and Safety Publications.

O'Reilly, D. R. (1995). Baculovirus-encoded ecdysteroid UDP-glucosyltransferases. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **25**, 541-550.

O'Reilly, D. R. & Miller, L. K. (1989). A baculovirus blocks insect molting by producing ecdysteroid UDP- glucosyl transferase. *Science* **245**, 1110-1112.

O'Reilly, D. R. & Miller, L. K. (1991). Improvement of a baculovirus pesticide by deletion of the egt gene. *Bio Technology* **9**, 1086-1089.

Payne, C.C. (1981). The susceptibility of the pea moth, *Cydia nigricana* to infection by the granulosis virus of the codling moth, *Cydia pomonella*. *Journal of Invertebrate Pathology* **38**, 71-77.

Pickel, C. P., Bethell, R. S. & Coates, W. W. (1986). Codling moth management using degree-days. Location of study: California University of California Statewide IPM Project.

Pitcairn, M. J., Pickel, C., Falcon, L. A. & Zalom, F. G. (1991). Development and survivorship of *Cydia pomonella* (L) (Lepidoptera, Tortricidae) at 10 constant temperatures. *Pan-Pacific Entomologist* **67**, 189-194.

Putman, W. L. (1963). The codling moth, *Carpocapsa pomonella* (L.) (Lepidoptera: Tortricidae): a review with special reference to Ontario. *Proceedings of the Ontario Entomological Society* **93**, 22-60.

Reed, E.M. (1971). Factors affecting the status of a virus as a control agent for the potato moth, *Phthorimaea operculella* (Zell.) (Lep., Gelechiidae). *Bulletin of Entomological Research* **61**, 207-222.

Riedl, H. & Croft, B. A. (1978). The effects of photoperiod and effective temperatures on the seasonal phenology of the codling moth (*Laspeyresia pomonella*) (Lepidoptera: Tortricidae). *Canadian Entomologist* **110**, 455-477.

- Sait, S. M., Begon, M. & Thompson, D. J. (1994).** The effects of a sublethal baculovirus infection in the Indian meal moth, *Plodia interpunctella*. *Journal of Animal Ecology* **63**, 541-550.
- Sait, S. M., Liu, W. C., Thompson, D. J., Godfray, H. C. J. & Begon, M. (2000).** Invasion sequence affects predator-prey dynamics in a multi-species interaction. *Nature* **405**, 448-450.
- Schumacher, P., Weber, D. C., Hagger, C. & Dorn, S. (1997).** Heritability of flight distance for *Cydia pomonella*. *Entomologia Experimentalis Et Applicata* **85**, 169-175.
- Setyobudi, L. (1990).** Seasonality of codling moth, *Cydia pomonella* L., (Lepidoptera: Olethreutidae) in the Willamette valley of Oregon: Role of photoperiod and temperature, pp. 129: Oregon State University.
- Shapiro, M. & Robertson, J. L. (1987).** Yield and activity of gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae) nucleopolyhedrosis virus recovered from survivors of viral challenge. *Journal of Economic Entomology* **80**, 901-905.
- Sheppard, R. F. & Stairs, G. R. (1976).** Effects of dissemination of low dosage levels of a granulosis virus in populations of the codling moth. *Journal of Economic Entomology* **69**, 583-586.
- Simpson, C. B. (1903).** The codling moth, 105 pp.: U.S. Dept. Agric., Div. Ent.
- Slavicek, J. M., Popham, H. J. R. & Riegel, C. I. (1999).** Deletion of the *Lymantria dispar* multicapsid nucleopolyhedrovirus ecdysteroid UDP-glucosyl transferase gene enhances viral killing speed in the last instar of the gypsy moth. *Biological Control* **16**, 91-103.
- Smith, G. E., Summers, M. D. (1978).** Analysis of baculovirus genomes with restriction endonucleases. *Virology* **89**, 517-527.
- Smith, R. H. (1926).** The efficacy of lead arsenate in controlling the codling moth. *Hilgardia* **1**, 403-453.
- Smith, G. E., Summers, M. D. & Fraser, M. J. (1983).** Production of human beta interferon in insect cells infected with a baculovirus expression vector. *Molecular Cell Biology* **3**, 2156-2165.

- Smits, P. H. & Vlak, J. M. (1988).** Biological activity of *Spodoptera exigua* nuclear polyhedrosis virus against *S. exigua* larvae. *Journal of Invertebrate Pathology* **51**, 107-114.
- Summerland, S. A. & Steiner, L. F. (1943).** Codling moth oviposition and fate of the eggs. *Journal of Economic Entomology* **36**, 72-75.
- Thompson, C.G.; Scott, D.W.; Wickman, B.E. (1981).** Long-term persistence of nuclear polyhedrosis virus of the Douglas-fir tussock moth, *Orgyia pseudotsugata* (Lepidoptera: Lymantriidae) in forest soil. *Environmental Entomology* **10**, 254-255.
- Traynor, P. (1997).** <http://www.nbiap.vt.edu/news/1997/news97.jan>.
- Undorf, K. (1991):** Beitrag zur Risikoabschätzung bei der Freisetzung von gentechnisch veränderten Baculoviren, Dissertation, TH Darmstadt, 185 pp.
- Vail, P. V. & Hall, I. M. (1969).** The influence of infections of nuclear polyhedrosis virus on adult cabbage loopers and their progeny. *Journal of Invertebrate Pathology* **13**, 358-370.
- van Regenmortel, M. H. V., Fauquet, C. M., Bishop, D. H. L., Carstens, E. B., Estes, M. K., Lemon, S. M., Maniloff, J., Mayo, M. A., McGeoch, D. J., Pringle, C. R. & Wickner, R. B. (Eds.) (2000).** Virus Taxonomy - Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, pp. 1162. San Diego: Academic Press.
- Vargas-Osuna, E. & Santiago-Alvarez, C. (1988).** Differential response of male and female *Spodoptera littoralis* (Boisduval) (Lep., Noctuidae) individuals to a nuclear polyhedrosis virus. *ISSN 0044-2240, Verlag Paul Parey, Hamburg und Berlin*, 5 pp.
- Vasconcelos, S. D., Williams, T., Hails, R. S., Cory, J. S.(1996).** Prey selection and baculovirus dissemination by carabid predators of Lepidoptera. *Ecological Entomology* **21**, 98-104.
- Waldner, W. (1999).** Apfelwicklerabwehr 1998 - Empfehlungen für 1999. *Obstbau Weinbau*, 46-48.
- Washburn, F. L. (1893).** Report on work with the codling moth: Oregon Agric. Exp. Stn. Bull.
- Wearing, C. H. & Hutchins, R. F. (1973).** Alpha-Farnesene, a naturally occurring oviposition stimulant for the codling moth, *Laspeyresia pomonella*. *Journal of Insect Physiology* **19**, 1251-1256.

Wormleaton, S. L. & Winstanley, D. (2001). Phylogenetic analysis of conserved genes within the ecdysteroid UDP-glucosyltransferase gene region of the slow-killing *Adoxophyes orana* granulovirus. *Journal of General Virology* **82**, 2295-2305.

Young, S. Y. & Yearian, W. C. (1982). Nuclear polyhedrosis virus infection of *Pseudoplusia includens* (Lep.: Noctuidae) larvae: effect on post larval stages and transmission. *Entomophaga* **27**, 61-66.

Unser Dank gilt

Claudia Vogel, Sachgebiet Biotechnologischer Pflanzenschutz (SLFA Neustadt/Wstr.), für ihre engagierte Mithilfe bei einem Teil der Experimente.

Manfred Jutzi, Fachbereich Weinbau (SLFA Neustadt/Wstr.), für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung.

Uwe Harzer, Andreas Siegele, Ulrich Staub, Fachbereich Gartenbau (SLFA Neustadt/Wstr.), Jan Broad und Zhiying Wang, Sachgebiet Biotechnologischer Pflanzenschutz (SLFA Neustadt/Wstr.), für die Unterstützung bei der Anlage und Durchführung der Freilandversuche.

Martina Rothe, Institut für Mikrobiologie und biologische Sicherheit (BBA Braunschweig), für die Mitarbeit beim CpGV-Nachweis in Boden- und Pflanzenproben.

Ralf Neukampf, Institut für Folgenabschätzung im Pflanzenschutz (BBA Kleinmachnow), für die Programmierung der Windows-Oberfläche von GRANULO.

Eckhard Gabrys, Institut für biologischen Pflanzenschutz (BBA Darmstadt), für die Erhaltung der Apfelwicklerzucht und Bereitstellung der Apfelwickler-Eier.

Dr. Doreen Winstanley, Horticulture Research International, Warwick, England, für kontinuierliche Zusammenarbeit und Überlassung unveröffentlichter Daten.

Prof. Just Vlak, Department of Virology, Wageningen Agricultural University, Niederlande, für die Überlassung der *egt*-Deletions-Rekombinante AcMNPV/RM1.