

TEXTE 63/02

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

Susanne Steineke
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

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

Baculoviren sind natürlich vorkommende insektenpathogene Viren, die die Larvenstadien von Insekten befallen können. Auf Grund ihrer hohen Virulenz und Spezifität für ihre jeweiligen Wirtsarten und der daraus resultierenden Unbedenklichkeit für Nicht-Zielorganismen sind sie als hoch-selektive Bioinsektizide zur Kontrolle von Schadlepidopteren geeignet. Auf Baculoviren basierende Insektizide haben allerdings den Nachteil, dass sie im Vergleich zu chemischen Insektiziden relativ langsam wirken und einige Tage benötigen, bis ein Fraßstop und der Tod der Ziel-Organismen eintritt. Um die Wirkgeschwindigkeit der Viren zu beschleunigen, wurden Baculoviren in der Vergangenheit gentechnisch verändert. Mögliche Risiken einer Anwendung gentechnisch veränderter Baculoviren liegen in einer ungewollten Etablierung eines rekombinanten Baculovirusinsektizides oder dem horizontalen Transfer der eingeführten genetischen Information in andere Baculoviren. Für die Abschätzung mittel- oder langfristiger ökologischer Konsequenzen rekombinanter Viren ist eine hinreichende Kenntnis ihrer biologischen Eigenschaften und Populationsdynamik wichtig.

Am Beispiel des zu den Baculoviren gehörenden Apfelwicklergranulovirus (*Cydia pomonella* Granulovirus, CpGV) wurden im Rahmen dieses Projektes verschiedene Parameter analysiert und quantitativ bestimmt, mit deren Hilfe die Populationsdynamik des CpGV mathematisch beschrieben werden kann. Das CpGV ist seit mehreren Jahren in Bundesrepublik Deutschland und anderen Ländern der EU zur Bekämpfung des Apfelwicklers (*Cydia pomonella*), dem bedeutendsten Schädling im Obstbau, zugelassen.

Als populationsdynamische Parameter des CpGV wurden dessen Virulenz, der Umfang an Virusnachkommen, die UV-Inaktivierungsrate, sowie die horizontale und vertikale Transmissionsrate quantitativ erfasst. Zur Bestimmung der Virulenz der Viren wurden die mittlere Letalkonzentration und mittlere Letalzeit für Eilarven in standardisierten

Biotests auf semi-synthetischen Nährmedium ermittelt. Die mittlere Letalkonzentration wurde über eine Regression der Mortalitäten infizierter Larven bei verschiedenen CpGV-Konzentrationen berechnet. Ähnlich wurde auch die mittlere Letalzeit über eine Dosis-Wirkungs-Beziehung bestimmt. Da die Replikationsgeschwindigkeit der Viren und somit der Tod der Insekten temperaturabhängig ist, wurde die Bestimmung der mittleren Letalzeit zusätzlich bei verschiedenen Temperaturen durchgeführt. Dabei ergab sich bei einer LC_{95} und einer für das Freiland relevanten Temperatur von 22°C eine mittlere Letalzeit von 230 Stunden. Bei höheren Temperaturen von 24°C bzw. 26°C verkürzte sich diese auf 201 bzw. 190 Stunden.

Die Bestimmung der Menge der Virusnachkommen je infizierter Larve wurde anhand von Eilarven (L1) durchgeführt, da unter Feldbedingungen hauptsächlich das erste Larvenstadium von einer CpGV-Applikation betroffen ist. Infektionsversuche von L1-Larven mit unterschiedlichen CpGV-Dosen, zeigten eine negative Korrelation zwischen der Infektionsdosis und der Anzahl an Virusnachkommen je infizierter Larve, was wahrscheinlich mit einem schnelleren Tod der infizierten Larven bei hohen Infektionsdosen zusammenhängt.

Bei der Bestimmung der UV-Inaktivierung des CpGV wurde Bezug zu älteren Arbeiten genommen und zusätzlich ein Freilandversuch unter praxisnahen Bedingungen durchgeführt. Dabei hat sich gezeigt, dass die unterschiedlichen Versuchsmethoden sehr abweichende Ergebnisse lieferten. Wurden in Versuchen den Larven viruskontaminierte Blattscheiben angeboten, die dem Sonnenlicht exponiert waren, so lag die Halbwertszeit der Virusaktivität bei durchschnittlich 17 Sonnenstunden. Wurden ähnliche Tests mit ganzen Äpfeln durchgeführt, dann wurde eine Halbwertszeit von 52 Sonnenstunden ermittelt.

Eine horizontale und vertikale Transmission des Virus innerhalb der Insektenpopulation sind in Bezug auf mögliche Mechanismen der Etablierung des Virus in der Umwelt von besonderer Bedeutung. Eine horizontale Transmission wird durch den physischen

Kontakt zwischen Wirten erreicht; bei einer vertikalen Transmission wird die Infektion an die Nachkommen weitergegeben.

Um die Wahrscheinlichkeit der horizontalen Transmission zu quantifizieren, wurde ein Modellsystem mit "losen" Äpfeln etabliert, in dem verschiedenen Szenarien der möglichen horizontalen Transmission unter definierten Laborbedingungen getestet wurden. In Versuchsserien, in denen ein Virusfleck korrespondierend der produzierten Virusmenge einer Eilarve 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 an einer Virusinfektion gestorbener Larvenkadaver als Inokulum verwendet, so lag die Mortalitätsrate aufgesetzter Larven bei über 40%. Diese beobachtete hohe horizontale Transmissionsrate konnte mit dem Verhalten der Larven erklärt werden. Denn diese zeigten eine deutliche Einbohrpräferenz für den Stielansatz bzw. den Kelch, wodurch die Wahrscheinlichkeit des Zusammentreffens eines an einer Infektion zu Grunde gegangenen Larvenkadavers und einer gesunden Larve um ein Vielfaches zunimmt.

In einem nächsten Schritt wurde getestet, inwieweit sich diese Beobachtungen auf das Freiland übertragen ließen. Hierzu wurden in einem Freilandversuch (1) die Persistenz des CpGV, (2) die horizontale Transmission und (3) die Möglichkeit der Infektion spätere Larvenstadien untersucht. CpGV wurde einmalig mit einer konventionellen Feldspritze appliziert, danach Eilarven des Apfelwicklers zu verschiedenen Zeitpunkten einzeln auf Äpfel gesetzt. Für die Auswertung wurden Äpfel geerntet und die überlebenden Larven quantifiziert.

Die Überlebensrate von Larven, die 4 Wochen nach der CpGV-Applikation auf die Äpfel gesetzt wurden, lag bei 18%, während die Überlebensrate bei unbehandelter Kontrolle 23% bzw. 27% war. Nochmals niedriger war die Überlebensrate bei Larven, die virusinfizierten Larvenkadavern als zusätzliche Infektionsquelle ausgesetzt waren, was in der Tendenz auf das mögliche Auftreten einer horizontalen Transmission im Freiland hinweist. Weiterhin konnte festgestellt werden, dass die Mortalität von späteren

Larvenstadien in Äpfeln, die 14 Tage Zeit hatten, sich in die Äpfel einzubohren, bevor eine CpGV-Applikation durchgeführt wurde, ebenso hoch war wie bei Larven, die sich im L1-Stadium auf der Apfeloberfläche infizierten. Aufgrund des höheren Alters jener Larven war der Fraßschaden an befallenen Äpfeln jedoch wesentlich größer und vergleichbar mit dem Fraßschaden einer unbehandelten Kontrolle.

Eine weitere Möglichkeit der Etablierung kann durch eine Virusübertragung auf die Nachkommen stattfinden. Die vertikale Transmission wurde untersucht, indem Larven im L5-Stadium mit einer LD₅₀ infiziert wurden. Bei überlebenden Larven wurde angenommen, dass diese subletal infiziert waren und potentiell in der Lage waren, die Infektion an ihre Nachkommen weiterzugeben. Um feststellen zu können, ob die Infektion durch die Männchen oder durch die Weibchen übertragen werden kann, wurden subletal infizierte Männchen mit unbehandelten Weibchen und subletal infizierte Weibchen mit unbehandelten Männchen gepaart. Danach wurde die Mortalität der Nachkommen bestimmt und mit der Mortalitätsrate von Nachkommen aus einer Kreuzung unbehandelter Männchen mit unbehandelten Weibchen verglichen. Dabei stellte sich heraus, dass sich die Mortalitätsrate der Nachkommen von subletal infizierten Männchen nicht von der Mortalitätsrate der Kontrolle unterschied (28% bei n= 80 bzw. 27% bei n= 253). Die Mortalitätsrate der Nachkommen subletal infizierter Weibchen war jedoch höher (44% bei n=86). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass eine Infektion durch subletal infizierte Weibchen vertikal in die nächste Generation übertragen werden kann, was noch zusätzlich durch PCR-Analysen der Nachkommen hinsichtlich des Vorkommens des CpGV überprüft werden soll. Sollten die PCR-Analysen bestätigen, dass eine Übertragung über subletal infizierte Tiere erfolgen kann, bedeutet dies, dass in der Folgegeneration des Apfelwicklers eine zusätzliche Wirkung des CpGV durch vertikale Transmission auftreten kann. Hierin wäre auch ein potentieller Mechanismus für eine dauerhafte Etablierung eines gentechnisch veränderten Virus zu sehen.

Im Rahmen des Projektes war geplant, auch gentechnisch veränderte *egt*-Deletionsmutanten mit natürlichen Wildtyp-Viren zu vergleichen. Das *egt*-Gen kodiert für das Enzym Ecdysteroid-UDP-Glycosyltransferase (EGT), welches während der

Virusinfektion mit dem Häutungsstoffwechsel der Larven interagiert. Durch die Expression des EGT wird die Häutung der befallenen Larven verzögert oder ganz unterbunden. Dadurch werden infizierte Larven größer als nicht infizierte Larven und können somit mehr Virusnachkommen produzieren. Vom Beispiel einer *egt*-Deletionsmutante des *Autographa californica* MNPV (AcMNPV) war bekannt, dass diese gentechnisch hergestellte Deletionsmutante eine deutlich schnellere Wirkung und eine signifikant verringerte Virusproduktion in Larven von *Trichoplusia ni* besaßen als das entsprechende Wildtyp-AcMNPV.

Für das CpGV wurde im Verlauf des Projektes von anderen Arbeitsgruppen festgestellt, dass sich deren *egt*-Deletionsmutante hinsichtlich ihrer Wirkgeschwindigkeit gegenüber den ersten vier Larvenstadien des Apfelwicklers nicht vom Parentalvirus CpGV-M1 unterschied. Da besonders das erste und zweite Larvenstadium in der Praxis vom CpGV betroffen sind, wurde diese Mutante daher in der Modellierung nicht weiter berücksichtigt. Ähnlich wie beim CpGV konnte kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der biologischen Eigenschaften einer *egt*-Deletionsmutante des AcMNPV gegenüber Eilarven von *Spodoptera exigua* und *Helicoverpa armigera* gefunden werden. Diese Ergebnisse unterstreichen, dass die biologischen Eigenschaften von Baculovirus-*egt*-Deletionsmutanten für jedes Virus und jede Insektenart bzw. jedes Larvenstadium individuell getestet werden müssen und die *egt*-Deletion kein generelles molekulares Modell zur Beschleunigung der Wirkgeschwindigkeit von Baculoviren darstellt.

Da die Populationsdynamik des CpGV aufs engste mit der Populationsdynamik seines Wirtes, dem Apfelwickler, zusammenhängt, wurde dessen Populationsdynamik bei der Modellierung mit berücksichtigt und integriert. Die hierzu notwendigen Parameter wurden aus der umfangreichen Literatur zur Biologie und Phänologie des Apfelwicklers entnommen oder in eigenen Versuchen erhoben, wie z.B. der Einfluss der Temperatur auf die Entwicklungsraten der Apfelwicklerlarven oder die virusbedingten Letalzeiten der Larven. Letztlich wurden alle Parameter, die die CpGV-Apfelwickler-Beziehung beschreiben, zu einem mathematischen Modell, welches den Namen GRANULO trägt, integriert. Nach einer Sensitivitätsanalyse wurde GRANULO mit Daten aus den

Freilandversuchen teilweise verifiziert. Durch Modifikation der Virusparameter im Modell konnte anschließend der Einfluss veränderter biologischer Eigenschaften der Viren in Simulationen theoretisch erprobt werden. Die Simulationen haben gezeigt, dass die Veränderung der Wirkgeschwindigkeit keinen signifikanten Einfluss auf die Populationsdynamik des Virus bzw. des Apfelwicklers hat. Andererseits haben Modellrechnungen mit einer erhöhten UV-Stabilität des Virus gezeigt, dass die UV-Inaktivierung der limitierende Faktor einer persistenten Wirkung ist. Mit Hilfe des Modells ist die Möglichkeit gegeben, nicht nur die mögliche Auswirkung einer gentechnischen Veränderung des CpGV simulativ zu untersuchen, sondern auch in Umkehrung zu errechnen, wie stark eine biologische Veränderung der Viruseigenschaften sein müsste, damit ein Effekt auf die Population des Wirtes sichtbar wird.

Es muss festgehalten werden, dass das beschriebene Modell nur eine erste Annäherung an die quantitative Erfassung und Modellierung der Populationsdynamik des Systems CpGV-Apfelwickler ist. Zwar konnten die erhobenen Daten der Freilandversuche sehr gut durch das Modell beschrieben werden. Dennoch ist das im Modell dargestellte System stark vereinfacht und bedarf einer weitergehenden Verifizierung und Validierung. Daher können Risikoszenarien gentechnisch veränderter Viren zwar durch das Modell in gewisser Hinsicht simuliert werden, eine adäquate Risikoforschung, welche die stufenweise Untersuchung der in Labor-, Mikrokosmos- und begrenzten Freilandversuchen genetisch veränderter Viren beinhaltet muss, kann es nicht ersetzen. Insofern ist es allenfalls als ein zusätzliches Hilfsinstrument zu betrachten. Andererseits erlaubt das Modell, die Modifikationen in der CpGV-Anwendung (z.B. in der Applikationsmenge oder dem Applikationszeitpunkt) hinsichtlich ihrer Wirkung auf die Abundanz des Apfelwicklers zu untersuchen. Damit kann das Modell GRANULO durch die bestehende Integration der Populationsdynamik des Apfelwicklers auch einen wertvollen Beitrag zur Optimierung von Kontrollstrategien des Apfelwicklers mittels natürlichem CpGV leisten

Summary Report of the F&E project no. 298 89 418

Mathematical modelling of the population dynamics of genetically modified microorganisms using baculoviruses as example

Baculoviruses are naturally occurring insect pathogens that infect the larval stages of certain Lepidopteran species. Due to their high virulence and specificity for their respective hosts, they have been developed as bio-insecticides. A disadvantage of their use is the relatively slow speed of action compared to chemical insecticides. After being ingested, the virus needs several days to replicate before it kills the larva. In order to improve their effectiveness as biological control agents, viruses featuring a faster speed of kill have been genetically engineered. Possible risks of a release of these recombinant viruses include their un deliberate establishment as well as the horizontal transfer of the newly introduced genetic information into other baculoviruses. In order to assess long-term ecological consequences of recombinant viruses, their biological traits and forces that drive the population dynamics need to be understood.

In order to examine the processes important for the population dynamics, the current project focussed on the granulovirus of the codling moth (*Cydia pomonella* granulovirus, CpGV). CpGV has been registered for the control of the codling moth in Germany and other countries of the EU. Before being able to describe the population dynamics in mathematical terms, it was necessary to analyse and quantify the important parameters. Among these parameters were the virulence of the virus, its inactivation rate, the production rate of virus progeny, both the horizontal and vertical transmission rate as well as parameters essential to the host population dynamics.

To be able to express the virulence, the median lethal concentration and median lethal time for neonate codling moth larvae were determined in standardised bioassays on semi-artificial diet. Both the median lethal concentration and median lethal time were calculated by means of a regression of the larval mortality at different viral doses. Because the replication rate of the virus is temperature dependent, the median lethal time

was determined at different temperatures ranging from 19°C to 32°C. Using an LC₉₅ in this experiment, the median lethal time at 22°C, a temperature relevant to field conditions, was found to be 230 hours. At 24°C and 26°C, however, this median lethal time could be reduced further to 201 and 190 days, respectively.

The virus yield was determined for larvae infected as neonates, because generally only the first instar is infected with sprayed CpGV in the field. The amount of virus progeny was found to be negatively correlated to the infection dose, i. e. a higher yield of virus progeny is produced at lower infection doses. This is due to the fact that a higher dose kills faster, leaving the virus less time for replication.

Data on the UV inactivation rate for CpGV was taken from previous work and compared with the inactivation rate obtained in one of the current field experiments. It turned out that the different experimental approaches yielded different results for the inactivation rate. In previous experiments leaf fragments exposed to sunlight were offered to larvae in a bioassay, whilst whole apples exposed to sunlight were offered to larvae in the current experiment. The resulting half-life of 52 hours of sunshine (whole apples) is considerably higher than the previously obtained half-life of 17 hours of sunshine (leaf fragments).

Both the horizontal and vertical transmission of the pathogen within an insect population are important when mechanisms for its persistence are considered. Horizontal transmission is achieved through physical contact between the hosts, whereas in vertical transmission an infection is passed on to the offspring.

In order to quantify the probability for horizontal transmission, a model system using detached apples was set up to test various scenarios under laboratory conditions. In a series of experiments a drop of virus suspension that contained an amount of virus, which corresponded to the virus yield of a young larva, was applied to the apple's surface as the source of infection. Larvae exposed to these apples had a relatively low mortality of 3.5 ± 4.7 %. However, when using larval cadavers as a source of infection, horizontal transmission was found to be as high as 40%. This observation could be explained with the larval behaviour. Larvae exhibited a feeding preference near the stalk and in the

calyx, thus greatly increasing the probability of coming into contact with a larval cadaver of an infected larva that fed at the same site.

A field experiment was set up to test whether the same applied under natural conditions. In this field experiment (1) the persistence of CpGV (2) horizontal transmission and (3) the possibility of infecting later instars were investigated. In order to work with a sufficient host density under defined conditions in the field, all larvae were applied to the apples as neonates and subsequently subjected to different treatments. Their survival was determined after four weeks by harvesting the apples and extracting the surviving larvae.

At 18%, the survival rate of larvae that had been placed on apples four weeks after the virus application was slightly lower than that of the untreated controls (23% and 27%), suggesting a longer persistence of CpGV than had been anticipated from previously published data. The larval survival rate was even lower, when larvae were additionally exposed to virus killed cadavers, which indicates that horizontal transmission may have taken place. In a further experiment, substantial virus related mortality was observed in larvae that were allowed to feed on apples for 14 days prior to the CpGV treatment. The mortality in this group was as high as the mortality of larvae that were treated with CpGV in the 1st instar stage, although there was more damage due to the increased age of the dying larvae. This finding shows that later instars can also be controlled effectively by CpGV, but that fruit damage cannot be prevented.

Persistence of virus in the field can also be achieved by vertical transmission. In order to study vertical transmission, 5th instar larvae were infected with an LD₅₀. Surviving larvae were considered to be sublethally infected and were reared to the adult stage. These sublethally infected insects could potentially transmit the virus to their offspring. By pairing sublethally infected males with untreated females and sublethally infected females with untreated males it was possible to determine if one or both sexes could transmit the virus. The offspring of untreated males and females served as control. After the eggs were laid, the mortality of all offspring was determined. Results show that the mortality rate of the offspring of sublethally infected males (28%, n=80) did not differ

from the offspring of the untreated control animals (27%, n=253). In contrast, the mortality rate of the offspring of sublethally infected females was higher (44%, n=86). This suggests that the virus is transmitted vertically via females, a finding that should also be corroborated by PCR analysis. This suggests that vertical transmission may also contribute to the persistence of a genetically modified virus in the field.

The current project included a comparison between genetically modified *egt*-mutants and the wild-type viruses. The deleted *egt*-gene codes for the enzyme ecdysteroid-UDP-glycosyltransferase (EGT), an enzyme that is linked to the moulting metabolism of larvae. By expressing EGT, the larval moult is delayed. Infected larvae thus grow larger than uninfected larvae and are able to produce more virus offspring. It was known that the *egt* deletion mutant of *Autographa californica* MNPV (AcMNPV) had a faster speed of kill and a significantly lower virus production in *Trichoplusia ni* larvae when compared with the wild-type virus. However, in the course of this project another research group showed that a recombinant CpGV *egt*-deletion mutant did not differ from its parental virus in terms of its speed of kill in the first four larval stages of *C. pomonella*. Because generally only the first and second instars of *C. pomonella* are exposed to the virus in the field, this deletion mutant was not considered further in the modelling approach. Similarly, no significant difference could be found in the biological traits of the *egt*-mutant of AcMNPV in neonate larvae of *Spodoptera exigua* and *Helicoverpa armigera*. These results further underline the fact, that the biological traits of baculovirus *egt*-deletion mutants have to be tested individually for every insect species and every larval instar. They show that the *egt* deletion cannot be regarded as a general molecular model for a baculovirus with a faster speed of kill.

Because the population dynamics of CpGV are closely linked to the population dynamics of its host, the insect dynamics were included in the model. Aside from the temperature dependent developmental rate of codling moth larvae, which was obtained as part of the experiment on lethal times at different temperatures, all information relevant to the host population dynamics were taken from the literature. Lastly all parameters were integrated to a mathematical model, named GRANULO. Additionally to a sensitivity analysis,

GRANULO was partially verified with data obtained in field experiments described in this study. Simulations for a genetically modified CpGV were generated by varying the virus characteristics in the model. They showed that an increased speed of kill had no significant influence on the population dynamics of the codling moth. Yet, model simulations for a higher UV stability showed that this is a limiting factor for a persistent effect of the virus.

In addition to simulating the effect of a genetically modified CpGV, this model can also do the reverse. It can calculate with what magnitude a biological trait has to be altered in order to have an effect on the host population.

Finally, it needs to be pointed out that the model GRANULO is only a first approach in the quantitative description and simulation of the population dynamics of the system 'CpGV - codling moth'. Although the data obtained in the field experiment matched simulations well, the system portrayed by the model is oversimplified and needs further verification and validation. To a certain degree the model can simulate scenarios of genetically engineered viruses, but it can never replace laboratory, microcosm and field experiments which are necessary for an adequate risk assessment. On the other hand, the model can investigate the effects of modifications in the applied pest control (such as concentration and timing of CpGV spray) on the codling moth population. It can thus aid the design of efficient control strategies of the codling moth using CpGV.