

Populationsdynamik des *Cydia pomonella* Granulovirus

D i s s e r t a t i o n
zur Erlangung des Grades
“Doktor der Naturwissenschaften”

am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität
in Mainz

Susanne Barbara Steineke
geb. in London

Mainz, 2004

INHALTSVERZEICHNIS

1	ALLGEMEINE EINLEITUNG	1
1.1	Das System Apfelwickler – <i>Cydia pomonella</i> Granulovirus	1
1.1.1	Apfelwickler (<i>Cydia pomonella</i> L.)	1
1.1.2	Baculoviren	2
1.1.3	Populationsdynamik von Baculoviren.....	7
1.1.4	Zielsetzung und Aufbau der Arbeit.....	9
1.2	Exkurs: Literaturstudie des Apfelwicklers (<i>C. pomonella</i>).....	11
1.2.1	Natürliche Mortalität	11
1.2.2	Ontogenese	12
1.2.3	Reproduktion und Geschlechterverhältnis	14
1.2.4	Zeitpunkt der Apfelwicklerentwicklung	15
1.2.5	Weitere für die Populationsdynamik wesentliche Faktoren.....	15
1.2.6	Relevantes Verhalten für die horizontale Transmission von CpGV	16
2	BIOLOGISCHE CHARAKTERISIERUNG DES CPGV	18
2.1	Einleitung	18
2.2	Material und Methoden	18
2.2.1	Versuchsmaterial	18
2.2.1.1	CpGV.....	18
2.2.1.2	<i>C. pomonella</i>	20
2.2.2	DNA-Charakterisierung verschiedener CpGV-Isolate.....	21
2.2.3	Bestimmung der Virulenz mittels standardisierter Bioassays	22
2.2.3.1	Letaldosis.....	22
2.2.3.2	Letalkonzentration.....	23
2.2.3.3	Letalzeit	23
2.2.3.4	Statistische Auswertung	24
2.2.4	Quantifizierung der Virusausbeute.....	24
2.3	Ergebnisse und Diskussion.....	25
2.3.1	DNA-Charakterisierung verschiedener CpGV-Isolate.....	25
2.3.2	Virulenz des CpGV-M bzw. des CpGV-M1	27

2.3.2.1	Letaldosis.....	27
2.3.2.2	Letalkonzentration.....	28
2.3.2.3	Letalzeit.....	29
2.3.2.4	Temperaturabhängige Letalzeit.....	30
2.3.3	Infektionsdosisabhängiger Virengehalt in L1-Larven.....	31
3	HORIZONTALE TRANSMISSION DES CPGV IN EINEM MODELLSYSTEM	34
3.1	Einleitung.....	34
3.2	Material und Methoden.....	35
3.2.1	Virus, Insekten und Äpfel.....	35
3.2.2	Versuchsreihen mit appliziertem CpGV.....	35
3.2.3	Versuchsreihen mit virustoten Larven als Inokulum.....	37
3.2.4	Statistische Auswertung.....	37
3.3	Ergebnisse.....	38
3.3.1	Experimentelle Infektionsrate: Einfluss der Virusverteilung.....	38
3.3.2	Experimentelle Infektionsrate: Lage des Virusflecks.....	40
3.3.3	Experimentelle Infektionsrate: Larvenkadaver als Inokulum.....	41
3.3.4	Einbohrstellenpräferenz.....	42
3.4	Diskussion.....	43
4	FREILANDVERSUCH ZUR HORIZONTALER TRANSMISSION, INFEKTION SPÄTER LARVENSTADIEN UND VIRUS-INKTIVIERUNG	47
4.1	Einleitung.....	47
4.2	Material und Methoden.....	48
4.2.1	Virus und Insekt.....	48
4.2.2	Beschreibung der Versuchsparzelle.....	48
4.2.3	Versuchsdurchführung.....	50
4.2.4	Statistische Auswertung.....	53
4.3	Ergebnisse.....	54
4.3.1	Natürlich vorkommende Apfelwickler-Population.....	55
4.3.2	Horizontale Transmission.....	55
4.3.3	Virusinaktivierung.....	58
4.3.4	Infektion später Larvenstadien.....	60

4.4	Diskussion	62
5	MOLEKULARER NACHWEIS DES CPGV UND UNTERSUCHUNGEN ZUR VERTIKALEN TRANSMISSION DES CPGV UNTER KONTROLLIERTEN BEDINGUNGEN	67
5.1	Einleitung	67
5.2	Material und Methoden	69
5.2.1	Molekularbiologische Methoden.....	69
5.2.1.1	Gesamt-DNA-Isolierung (genomische und virale DNA) einzelner Larven.	69
5.2.1.2	Etablierung eines qualitativen PCR Nachweises.....	70
5.2.1.3	Etablierung eines quantitativen PCR Nachweises.....	72
5.2.2	Durchführung der Versuche zur vertikalen Transmission	73
5.3	Ergebnisse	75
5.3.1	CpGV-Nachweisgrenzen mittels PCR	75
5.3.2	Vertikale Transmission des CpGV.....	77
5.4	Diskussion	79
6	MATHEMATISCHE MODELLIERUNG DER POPULATIONSDYNAMIK DES CPGV	86
6.1	Einleitung	86
6.2	Material und Methoden	87
6.2.1	Simulation der Freilandversuche.....	87
6.2.2	Szenariosimulationen	89
6.3	Ergebnisse	92
6.3.1	Simulationen der Freilandversuche	92
6.3.2	Simulationen zur UV-Stabilität.....	93
6.3.3	Simulationen zur vertikalen Transmission in Kombination mit horizontaler Transmission	95
6.4	Diskussion	98
7	ALLGEMEINE DISKUSSION.....	102

ZUSAMMENFASSUNG	107
ANHANG	110
LITERATURVERZEICHNIS	122
VERÖFFENTLICHUNGEN	135

1 ALLGEMEINE EINLEITUNG

1.1 Das System Apfelwickler – *Cydia pomonella* Granulovirus

1.1.1 Apfelwickler (*Cydia pomonella* L.)

Der Apfelwickler, *Cydia pomonella*, gehört zu der Familie der Tortricidae (Ordnung: Lepidoptera) und ist ein weltweit vorkommender Schädling auf Apfel, Birne, Walnuss und in geringerem Maße auch auf Quitte, Aprikose, Pfirsich und Pflaume. Bei Äpfeln zählt er zu den bedeutendsten Schädlingen und kann, unbehandelt, innerhalb einer Saison eine komplette Apfelernte zerstören. Eine Beschreibung des Apfelwicklers wurde erstmals 1635 von dem Niederländer Jean Goedaert veröffentlicht (Butt, 1975). Je nach Klima entwickeln sich ein bis vier Apfelwicklergenerationen pro Jahr. In den wärmeren Gegenden Mittel- und Südeuropas treten meist zwei Generationen auf, wobei die zweite Generation den größeren Schaden verursacht, da sie die fast reifen Äpfel befällt. Im Allgemeinen kann beim Apfel nur sehr wenig Schaden toleriert werden, denn auch bei oberflächlich abgestopptem Fraß einer einzigen Larve ist ein Apfel nur noch für die Versaftung zu verwenden.

In Deutschland sind verschiedene Präparate zur chemischen Bekämpfung des Apfelwicklers zugelassen (Tab. 1.1). An biotechnologischen Verfahren stehen RAK 3, RAK 3 + 4 (BASF) und CheckMate CM (C.F. Spiess & Sohn GmbH & Co.) für die Pheromon-Verwirrungsmethode zur Verfügung. Bei dieser Methode, bei der die Paarung verhindert wird, werden Dispenser mit Pheromon in regelmäßigen Abständen (300-500 Ampullen pro Hektar) aufgehängt. Immer häufiger wurde in den letzten Jahren ein Baculoviruspräparat, das Apfelwicklergranulovirus (*Cydia pomonella* Granulovirus, CpGV), als biologisches Bekämpfungsmittel im ökologischen Anbau, aber auch im integrierten Pflanzenschutz oder in Gebieten mit vielfacher Resistenz eingesetzt. Gegenüber den herkömmlichen Pflanzenschutzmitteln hat es den Vorteil, dass es gezielt den Apfelwickler tötet, aber die Nützlinge verschont. Allerdings ist es durch seine aufwendige Produktion auch kostenintensiver.

Tab. 1.1: Übersicht der Präparate zur chemischen Bekämpfung des Apfelwicklers in Deutschland; ¹ sind nicht mehr zugelassen (Dimilin 80 WG seit 31.12.2000; Insegar seit 31.12.2001; ME 605 und Baythroid 50 seit 31.12.2003); ² sind seit 2003 in Deutschland zugelassen (aktuelle Zulassungsdaten - Stand vom 13.02.04 - Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit).

Wirkstoffgruppe	Präparat	Wirkstoff	Wirkungsweise
Pyrethroidester + Pheromon	Appeal	Cyfluthrin + Codlemone	Neurotoxin + Sexuallockstoff
Pyrethroidester	Baythroid 50 ¹	Cyfluthrin	Neurotoxin, wirkt über Kontakt und Fraß
Harnstoffderivat	Dimilin 80 WG ¹	Diflubenzuron	Häutungshemmer, wirkt auf Eier und Larven
Carbamat	Insegar ¹	Fenoxycarb	Juvenilhormon, verhindert Wechsel von einem zum nächsten Entwicklungsstadium, wirkt auf Eier und Larven (L 5)
Diazyl-hydrazin	Mimic	Tebufenozid	Häutungsbeschleuniger, wirkt nur auf Larven
Phosphorsäure-ester	ME 605 ¹	Parathion – methyl	Cholinesterasehemmer, greift in das Nervensystem ein, wirkt nur auf Larven
Benzoylhydrazin/ Hydroxyecdysone	Runner ²	Methoxyfenozone	Wachstumsbeschleuniger, leitet Häutungsprozess auf zellulärer Ebene innerhalb weniger Minuten ein, verhindert weitere Häutung, Larve verhungert
Oxadiazin	Steward ²	Indoxacarb	Neurotoxin, wirkt gegen alle Larvenstadien über Kontakt und Fraß, lähmt

1.1.2 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 im biologischen und integrierten Pflanzenschutz zunehmend an Bedeutung gewinnen. Bis heute wurden mehr als 600 verschiedene Baculovirus-Isolate beschrieben, die überwiegend aus den Insektenordnungen Lepidoptera, Diptera und Hymenoptera isoliert wurden (Murphy *et al.*, 1995). Man schätzt, dass ca. 30% aller land- und forstwirtschaftlichen Schadinsekten effizient durch Baculoviren kontrolliert werden könnten (Falcon, 1978).

Baculovirusmorphologie

Eine herausragende morphologische Eigenschaft von Baculoviren ist die Bildung eines Einschlusskörpers (*occlusion body*, OB), der es den Viren erlaubt, auch außerhalb des Wirtes ihre biologische Aktivität über längere Zeit zu bewahren. Das Überdauern 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 ihres Einschlusskörpers werden Baculoviren in zwei Gattungen unterteilt, die Nukleopolyhedroviren (NPV) und Granuloviren (GV) (van Regenmortel *et al.*, 2000).

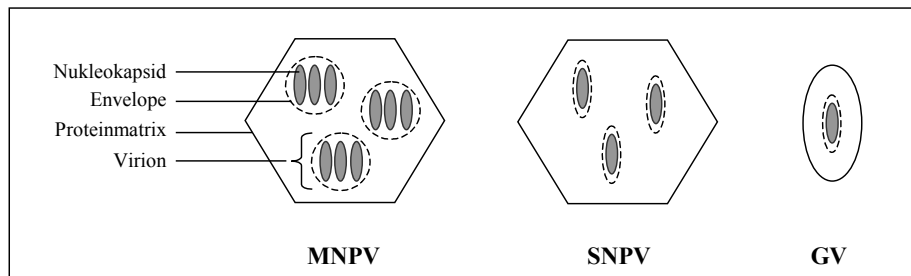


Abb. 1.1: Schematische Darstellung der *occlusion bodies* (OB) von MNPVs, SNPVs und GVs. Virionen bestehen aus einem (SNPV, GV) oder mehreren Nukleokapsiden (MNPV). Die Polyederproteinmatrix schließt mehrere Virionen ein während die Granulinmatrix lediglich ein einziges Virion einschließt.

Nukleopolyhedroviren bilden polyederförmige Einschlusskörper mit 0,15-15µm Durchmesser, die jeweils bis zu mehrere hundert Virionen enthalten können. Die Virionen können jeweils ein einziges Nukleokapsid (*single nucleopolyhedrovirus*, SNPV) oder mehrere Nukleokapside (*multiple nucleopolyhedrovirus*, MNPV) in einer *envelope* enthalten (Abb. 1.1). Das *Autographa californica* Multiple Nucleopolyhedrovirus (AcMNPV) ist das bekannteste Beispiel der Typusart der Nukleopolyhedroviren (Abb. 1.2).

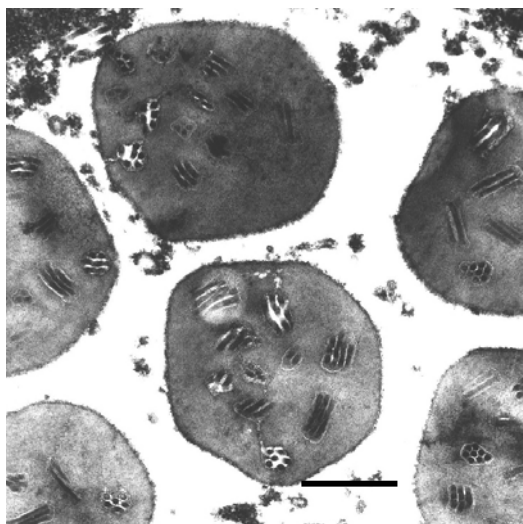


Abb. 1.2: Einschlusskörper eines Nukleopolyhedrovirus (MNPV) (Balken = 500 nm). EM-Aufnahme Dr. A. Huger, BBA Darmstadt

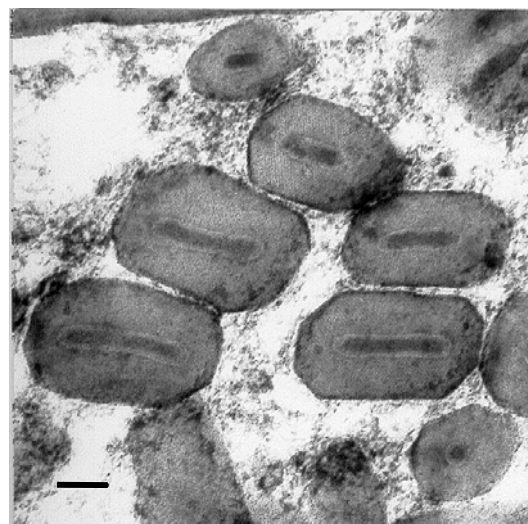


Abb. 1.3: Einschlusskörper des *Cydia pomonella* Granulovirus (CpGV) (Balken = 100 nm). EM-Aufnahme Dr. A. Huger, BBA Darmstadt

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, das aus einem einzigen Nukleokapsid (in seltenen Fällen auch zwei bis drei Nukleokapside) in einer *envelope* besteht (Abb. 1.3). Ein Beispiel für die Typusart der Granuloviren ist das *Cydia pomonella* Granulovirus (CpGV) (van Regenmortel *et al.*, 2000).

Baculovirusreplikation

Der Infektions- und Replikationszyklus von Baculoviren wurde besonders intensiv am AcMNPV untersucht und ist schematisch in Abb. 1.4 dargestellt. Die AcMNPV-Replikation dient als Modell für die übrigen Baculoviren (Granados & Williams, 1986; Federici, 1997). Die Infektion beginnt mit der peroralen Aufnahme der Einschlusskörper (OBs) durch die Wirtslarve während des Fraßes ((1) in Abb. 1.4). 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 DNA-Genom enthalten, werden in den Zellen zum Zellkern transportiert. An der Kernmembran bzw. an den Kernporen werden die Nukleokapside zerlegt (uncoating) und die virale DNA in den Zellkern entlassen, wo sie transkribiert und repliziert wird (5). Aus einem ersten Replikationszyklus geht eine neue Generation von Viren hervor, die im Zellkern zusammengebaut werden.

Die neu synthetisierten Nukleokapside 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, das sich scheinbar nicht von den Nukleokapsiden der ODVs unterscheidet. Allerdings unterscheidet sich die Zusammensetzung der *envelopes* dieser beiden Virusphänotypen. Die BVs werden mit der Hämolymphe oder dem trachealen System in andere Organe der Insektenlarven transportiert (Engelhard *et al.*, 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

$10^7 - 10^9$ 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 einer NPV-Infektion intakt bleibt, sondern bereits zu einem sehr frühen Zeitpunkt dissoziiert (Federici, 1997).

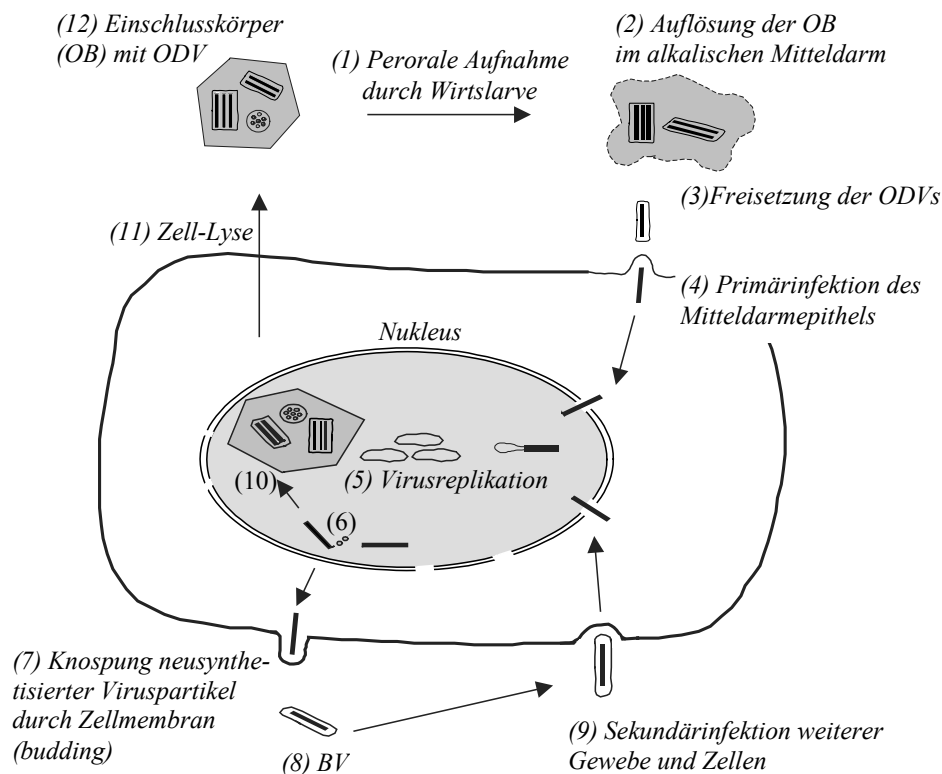


Abb. 1.4: Schematischer Replikationszyklus eines Nukleopolyhedrovirus. Die Beschreibung der Einzelschritte ist dem Text zu entnehmen (Jehle, 2000).

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 das Gewebe bzw. für kultivierte Zellen infektiös, außerhalb des Wirtes sind sie nicht stabil und nur für die Sekundärinfektion und die Verbreitung der Infektion innerhalb der Insektenlarve verantwortlich (Federici, 1997).

Baculoviren im Pflanzenschutz

Die Attraktivität von Baculoviren 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). Damit sind Baculoviren die selektivsten Insektizide, die sich gegenwärtig auf dem Markt befinden. Die hohe Selektivität lässt Baculoviren als ideales Kontrollinstrument 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 (Jehle, 1997). 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 (Huber, 1986). 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 besonders junge Larvenstadien (L1 oder L2) behandelt 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 (Federici, 1997). 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 akzeptabel. Der mögliche langfristige Effekt einer Baculovirusapplikation in Form einer nachhaltigen Populationsreduktion der Zielorganismen tritt heute wieder mehr in den Vordergrund, wie z.B. beim CpGV (Kienzle *et al.*, 2003a, 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. 1.2).

Tab. 1.2: 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> (Gemüseעule)	NPV	SPOD-X Brinkmann B.V.	NL, 12/93

1.1.3 Populationsdynamik von Baculoviren

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). Wesentliche Gesichtspunkte mit weitreichenden Folgen für die Populationsdynamik der Viren sind die Lebensweise und die trophischen Eigenschaften der Wirtsinsekten. Bei den Wirtsinsekten können zwei Trophie-Typen unterschiedene 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 Massenaufreten zeigen, das dazu führt, dass ein in der Insektenpopulation vorhandenes Pathogen relativ leicht 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 Insektenpopulationen auf Grund einer Pathogeninfektion, wie z.B. Baculoviren, spontan zusammenbrechen können (Miller, 1996).

Verdeckt fressende Minierer hingegen bohren sich in die Fraßpflanze ein und entwickeln sich dann abgeschirmt von der Außenwelt an einem relativ geschützten Ort. Diese Insekten sind häufig 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 generell nicht mehr verlässt (Ferro & Harwood, 1973). Das bedeutet, dass die Larve nur in der kurzen Zeitspanne, während der sie sich auf der Fruchtoberfläche befindet, durch perorale Infektion das für sie spezifische Pathogen aufnehmen kann. Beim Apfelwickler erstreckt sich diese Zeitspanne auf das erste (L1) maximal noch auf das frühe zweite (L2) Larvenstadium. Da *C. pomonella* Larven auf Äpfeln überwiegend einzeln vorkommen, ist die Wahrscheinlichkeit einer horizontalen Transmission im Vergleich zum offenen Blattfresser deutlich herabgesetzt. Um in einer Wirtspopulation persistieren zu können, erscheint eine vertikale Transmissionsstrategie (die Übertragung des Pathogens von einer Wirtsgeneration in die nächste) bei einem solchen Wirtsinsekt evolutionär erfolgversprechender.

Da die Viren nicht ohne ihren Wirt existieren können, wird die Populationsdynamik von Baculoviren im Wesentlichen durch die Interaktion zwischen Virus und Insekt geprägt (Abb. 1.5). 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 (Bianchi, 2001). Verdeckt fressende Minierer und ihre entsprechenden Pathogene, wie z. B. das Apfel/Apfelwickler/CpGV-System wurden hingegen bisher bei der Beschreibung der Populationsdynamik nicht berücksichtigt. Eben dieses System ist für die Pflanzenschutzmittelzulassung des CpGV von großer praktischer Bedeutung. Des Weiteren kann das System Apfel/*C. pomonella*/CpGV auch als Modell für andere Systeme mit minierenden Insekten, wie z.B. dem System Baumwolle/*Helicoverpa armigera*/HaSNPV, dienen.

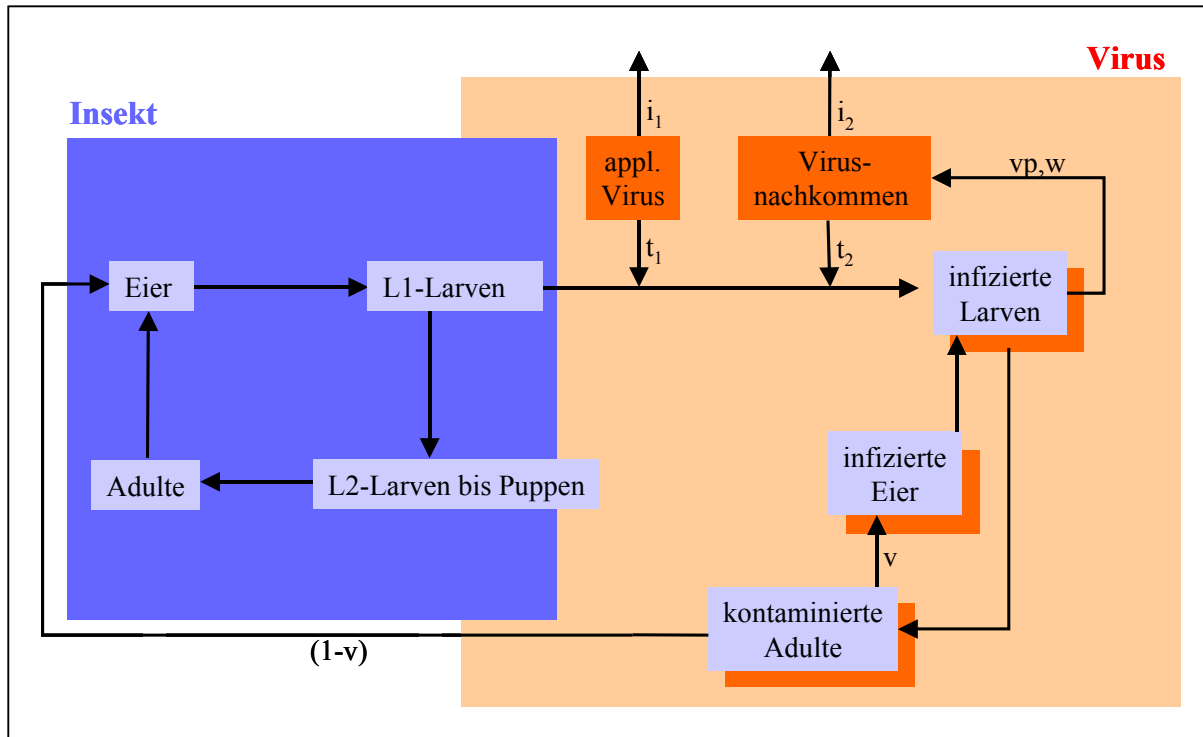


Abb. 1.5: Vereinfachte Darstellung der CpGV-Apfelwickler-Interaktionen mit t_1 (Infektionsrate), t_2 (horizontale Transmissionsrate), vp (Virus Produktionsrate), w (Wirkgeschwindigkeit), $i_{1,2}$ (Inaktivierungsrate) und v (vertikale Transmissionsrate) (Steineke *et al.*, 2002).

1.1.4 Zielsetzung und Aufbau der Arbeit

CpGV wurde 1964 aus *C. pomonella* Larven isoliert (Tanada, 1964). Es ist für diesen Wirt extrem virulent. Ein bis wenige Einschlusskörper sind ausreichend, um bei einer L1-Larve eine Infektion auszulösen (Tab. 2.1). Umfangreiche Infektionsversuche ergaben, dass dieses Virus ein sehr enges Wirtsspektrum besitzt. Es infiziert ausschließlich Lepidopteren der Familie Tortricidae. Neben *C. pomonella* können auch *Grapholita molesta* (Falcon *et al.*, 1968), *Rhyacionia buoliana* (Huber & Dickler, 1977), *R. frustrana* (Stephen *et al.*, 1982), *Cydia nigricana* (Payne, 1981), *Cryptophlebia leucotreta* (Fritsch, 1989), *Archips argyrospila* und in geringem Maße auch *Choristoneura rosaceana* (Eastwell *et al.*, 1999) infiziert werden. Diese Eigenschaften machen es zu einem wirkungsvollen Insektizid, das bereits seit mehreren Jahren im Obstbau zugelassen ist. Da das CpGV, wie andere Baculoviren auch, rasch durch UV-Strahlung inaktiviert wird, kann der Apfelwickler nur mit wiederholten Spritzungen des Viruspräparates zum Zeitpunkt der Eiablage effektiv bekämpft werden. Von den Herstellern wird deshalb empfohlen alle ein bis zwei Wochen 10^{13} OB pro Hektar zu spritzen. Der Schaden kann durch CpGV-Applikation zwischen 70 und 90% reduziert werden (Cross *et al.*,

1999), wobei die Populationsreduktion meist noch größer ist (Huber & Dickler, 1976). 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 die Aufrechterhaltung des Virus wurde die direkte Transmission betrachtet, da eine indirekte Transmission über verschiedenste Vektoren (z.B. Arthropoden oder Vögel) wesentlich komplexer und nur schwierig quantifizierbar ist. Für die direkte Transmission gibt es drei Formen: horizontale Transmission, vertikale Transmission und die Transmission aus einem Reservoir in der Umwelt. Die horizontale Transmission eines Pathogens ist zu einem gewissen Grade von der Wirtsdichte abhängig, da das Pathogen durch Kontakt von einem infizierten auf ein nicht infiziertes Tier übertragen wird. Horizontale Transmission von Baculoviren wurde bisher bei Insekten mit einer relativ hohen Wirtsdichte beschrieben (Hails *et al.*, 2002; Beisner & Myers, 1999; D'Amico *et al.*, 1996; Dwyer, 1991, 1992). Bei einer vertikalen Transmission hingegen wird das Pathogen über die Elterntiere auf die Nachkommen weitergegeben und ist somit unabhängig von der Wirtsdichte. Vertikale Transmission wurde bereits für mehrere NPVs (Kukan, 1999) und einige GVs (Burden *et al.*, 2002; Easwaramoorthy & Jayaraj, 1989) beschrieben. Obwohl häufig vertikale Transmission beim CpGV vermutet wird, konnte sie beim CpGV in Laboruntersuchungen weder eindeutig bewiesen noch widerlegt werden (Etzel & Falcon, 1976). Dennoch wies eine natürliche Population des Apfelwicklers in Kanada einen hohen Anteil an Larven auf, die in einer PCR Analyse positiv für das CpGV testeten (Eastwell *et al.*, 1999). Ein Umweltreservoir wurde in dieser Arbeit nicht näher betrachtet. Vermutlich sammelt sich das CpGV besonders am Ende der Wachstumsperiode im Boden an, wo es keine offensichtlichen Infektionsmöglichkeiten gibt. Dass das Virus in ausreichender Menge durch Wind oder Tiere wieder dorthin auf den Baum gelangt wo sich die Larven infizieren können, erscheint in erster Annäherung auch wenig wahrscheinlich.

In der vorliegenden Arbeit wurden hauptsächlich die horizontale und vertikale Transmission untersucht, weil diese für die Existenz des Virus am wichtigsten erschienen. Besonders interessant, aber widersprüchlich ist die Tatsache, dass das CpGV für den Apfelwickler extrem virulent ist, 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 CpGV. Die Arbeit betrachtet die für die Populationsdynamik notwendigsten Parameter und gliedert sich in die Charakterisierung des Virus mittels DNA-Restriktionsendonukleasen-Verdaus, Bestimmungen der Virulenz und der Virusnachkommenschaft (Kap. 2), Untersuchungen zur horizontalen Transmission im Labor

und Freiland (Kap. 3 und 4) sowie Untersuchungen erweiterter Infektionsmechanismen im Freiland (Kap. 4). Ferner wurde die vertikale Transmission im Labor unter anderem mit einem DNA-Nachweis untersucht (Kap. 5). Die ermittelten Parameter wurden zusammen mit Werten aus der Literatur (Kap. 1) in ein mathematisches Modell integriert (Kap. 6). Es folgt eine abschließende Diskussion (Kap. 7).

1.2 Exkurs: Literaturstudie des Apfelwicklers (*C. pomonella*)

Eine sehr wichtige Komponente der CpGV-Populationsdynamik ist die Populationsdynamik seines Wirtes. Sie ist ohne ein Verständnis der Biologie des Apfelwicklers nicht möglich. Im folgenden Abschnitt werden deshalb verschiedene Erkenntnisse mit bereits quantifizierten Parametern zusammengefasst. Generell beginnt der Apfelwicklerflug im Mai. 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, um sich in die Frucht zu bohren. In einer kleinen Kammer unterhalb der Schale erfolgt die Häutung zum zweiten Larvenstadium (Ferro & Harwood, 1973). Die weitere Entwicklung der Larve findet innerhalb der Frucht statt. Die Larve frisst einen Gang zum Kerngehäuse und verlässt die Frucht erst im L5-Stadium. Diese L5-Larve sucht sich einen geschützten Verpuppungsort am Stamm oder auch im Boden. Nach dem Puppenschlupf beginnt eine neue Generation. In den wärmeren Anbaugebieten Deutschlands entwickeln sich bis zu zwei Apfelwicklergenerationen pro Jahr (Huber & Dickler, 1977). Der Apfelwickler überwintert als Diapauselarve (L5).

Die Populationsdynamik des Apfelwicklers setzt sich im Wesentlichen aus der natürlichen Mortalitätsrate (Mortalität, die nicht CpGV-bedingt ist), der temperaturabhängigen Entwicklungsrate und der Reproduktionsrate zusammen. Die Literatur des letzten Jahrhunderts birgt eine Fülle an Erkenntnissen über den Apfelwickler. Im folgenden Abschnitt sind daher insbesondere die Daten, die für die Interaktion mit dem CpGV von Bedeutung sind, zusammengefasst.

1.2.1 Natürliche Mortalität

Wie in Tab. 1.3 dargestellt ist, unterscheiden sich die natürlichen Mortalitätsraten von *C. pomonella* z.T. erheblich von Studie zu Studie. Dieses liegt zum einen an unterschiedlichen

geographischen Lagen und klimatischen Bedingungen, zum anderen am Auftreten von unterschiedlichen biologischen Gegenspielern (Räuber, Parasiten).

Tab. 1.3: 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> , 1973
	19 ⁴	Feld	N. Amerika	Ferro <i>et al.</i> , 1973
	29 ⁴	Labor	N. Amerika	Ferro <i>et al.</i> , 1973
	17 ⁴	Labor	N. Amerika	Ferro <i>et al.</i> , 1973
	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	MacLellan, 1962
	55,4 ^{1,3b,5}	Feld	Kanada	MacLellan, 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	MacLellan, 1977 (9 Jahre)
	14-30 ^{1b}	Feld	N. Amerika	Jaynes & Marucci, 1947
94 ¹	Feld	Kanada	MacLellan, 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.

1.2.2 Ontogenese

Die Entwicklungsgeschwindigkeit ist bei Insekten stark temperaturabhängig. Die Embryonalentwicklung im Freiland dauert bei 12°C 26 Tage, bei etwa 26°C sind es 6 Tage

(Andermatt *et al.*, 1988). In Laborversuchen konnte gezeigt werden, 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. 1.6). Dabei wurde die maximale Entwicklungsrate bereits bei 26°C erreicht. In einer Studie von Pitcairn *et al.* (1991), in der die Entwicklungszeiten von Eiern, Larven und Puppen bei verschiedenen Temperaturen gemessen wurden, verlief die Entwicklung der Larven bei Temperaturen bis zu 25,6°C ähnlich wie den in Abb. 1.6 dargestellten Daten und betrug bei 25,6°C beispielsweise $17,14 \pm 0,53$ Tage. Doch wurde in dieser Studie bei höheren Temperaturen keine stagnierende, sondern eine kürzer werdende Entwicklungsdauer beobachtet, 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, wenn auch etwas langsamer, weiterentwickeln.

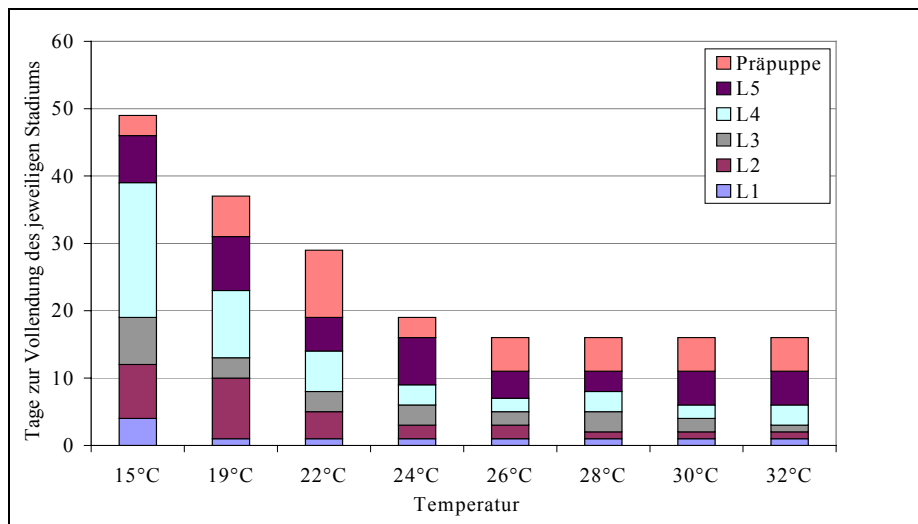


Abb. 1.6: Entwicklungsdauer der einzelnen Larvenstadien von *C. pomonella*. Angegeben ist die Dauer in der 50% der Tiere das entsprechende Stadium erreicht hatten. Die Daten wurden von Dr. E. Fritsch und Dr. K. Undorf-Spahn erhoben (Steineke *et al.*, 2002).

Entwicklungsraten werden häufig in Gradtagen angegeben (siehe Tab. 1.4). Dies hat den Vorteil, dass Ergebnisse die unter Wechseltemperaturen und zu unterschiedlichen Witterungsbedingungen ermittelt wurden, besser miteinander verglichen werden können. Die für die Entwicklungsberechnungen notwendigen Gradtage setzen sich bei *C. pomonella* folgendermaßen zusammen (Glenn, 1922)

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

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). Um die Entwicklung der Larven unter Freilandbedingungen noch genauer zu beschreiben, könnten außerdem die mikroklimatischen Effekte im Apfelbaum bzw. im Apfel berücksichtigt werden (Gold *et al.*, 1987).

Tab. 1.4: 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, 1990
L3	33,18	(28,32-38,04)	Setyobudi, 1990
L4	21,20	(17,50-24,80)	Setyobudi, 1990
L5	124,24	(115,2-132,96)	Setyobudi, 1990
Puppe	222,2		Pickel <i>et al.</i> , 1986
Puppe	152,30	(147,43-157,17)	Setyobudi, 1990

1.2.3 Reproduktion und Geschlechterverhältnis

Für die Reproduktionsrate wird hauptsächlich die Legeleistung der Weibchen berücksichtigt (Tab. 1.5), wobei diese Legeleistung durch Wetterverhältnisse, Populationsdichte und Geschlechterverhältnis beeinflusst werden kann (siehe Tab. 1.8). Üblich ist ein 1:1 Geschlechterverhältnis für den Apfelwickler (Hall, 1929; MacLellan, 1977; Geier & Briese, 1978; Glen *et al.*, 1981). Jedoch kann sich dieses Verhältnis in Abhängigkeit mit der Falterdichte verschieben (MacLellan, 1972).

Tab. 1.5: Die Legeleistung der Weibchen (Eier pro Weibchen) mit Standardabweichung (SD) und Standardfehler (SE). Daten aus der CMISS Datenbank, (n = Anzahl der Studien).

	Labor	Freiland
Mittelwert	88,24	46,70
SD	58,32	18,24
SE	14,6	3,9
n	17	23

1.2.4 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. 1.6 zeigt ein Beispiel für die Schlupfzeitpunkte in einem wärmeren deutschen Gebiet mit zwei Apfelwickler Generationen.

Tab. 1.6: Berechnete Schlupfzeitpunkte von Apfelwicklerlarven in klimatisch 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.

1.2.5 Weitere für die Populationsdynamik wesentliche Faktoren

In der Literatur ist eine Vielzahl von biologischen Parametern des Apfelwicklers beschrieben, die für ein Modell wie GRANULO (Kap. 6) jedoch zu speziell sind. Dennoch sind einige in Tab. 1.7 und Tab. 1.8 aufgelistet, um Abweichungen, die durch ein vereinfachtes Modell entstehen können, besser zu erklären.

Tab. 1.7: Zusammenfassung der Orte der Eiablage für die 1. und 2. Generation von *C. pomonella*.

Gen.	Abgelegte Eier (%)					Ast	Referenz
	Blatt		Frucht				
	Oberseite	Unterseite	Stielgrube	Kelchgrube	Sonstig		
1.	51-57	26-40	2-4	0-1	7-10	—	Blago & Dickler, 1990
2.	28	23-34	25	6-8	5-19	—	Blago & Dickler, 1990
1.	45	27	6			22	Audemard, 1976
2.	25	27	20			28	Audemard, 1976
	53	30	16			—	MacLellan, 1962

Tab. 1.8: 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. 1.7	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
Winter-Mortalität	<i>Dichteabhängigkeit</i> : die Wintermortalität ist bei Diapauselarven z. T. erheblich und wird als abhängig von der Apfelwicklerdichte beschrieben (1), hängt lediglich von der Anzahl sicherer Kokonunterschlüpfe ab (2)	(1) MacLellan, 1977 (2) Geier, 1961

1.2.6 Relevantes Verhalten für die horizontale Transmission von CpGV

Existiert eine horizontale Transmission des CpGV, dann ist sie stark vom Verhalten der Apfelwicklerlarven abhängig, denn eine horizontale Transmission beruht auf Kontakten zwischen den Wirten. Da mit Baculoviren infizierte Larven nach ihrem Tod lysieren, kann sich eine gesunde Larve bei Treffen auf einen Larvenkadaver infizieren. In Tab. 1.9 sind mögliche Infektionsquellen und die für eine horizontale Übertragung des Virus relevanten Daten in Tabellenform zusammengefasst. Ausschlaggebend ist vor allem die Wirtsdichte. Da die Falter ihre Eier einzeln ablegen (z.B. Borden, 1931) und ein befallener Apfel meistens nur eine Larve aufweist, erscheint eine horizontale Transmission nahezu unmöglich. Allerdings

gibt es auch sehr genaue Beobachtungen zur Anzahl von Larven auf einem Apfel, einer möglichen Bevorzugung bereits besiedelter Äpfel sowie auch eine Bevorzugung bestimmter Stellen auf einem Apfel (Tab. 1.7 und Tab. 1.9). Damit schaffen diese Verhaltenseigenschaften die Voraussetzungen für eine mögliche horizontale Transmission.

Tab. 1.9: 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 Gras 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 Frucht und Blatt bzw. 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 Fruchtart, Region und 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.	MacLellan, 1962
	Besiedlung von Äpfeln	<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)

2 BIOLOGISCHE CHARAKTERISIERUNG DES CPGV

2.1 Einleitung

Biologische Eigenschaften, die für die Populationsdynamik eines Baculovirus relevant sind, sind wie bereits in Kap. 1.1.3 (Abb. 1.5) erwähnt sein Potential zu infizieren und zu reproduzieren (Virulenz), seine Produktivität (Anzahl der Virusnachkommen) und seine Persistenz (biologische Aktivität). Um CpGV-Varianten mit unterschiedlichen biologischen Eigenschaften miteinander vergleichen zu können, wurden zunächst drei aus Georgien stammende Isolate auf DNA Basis näher charakterisiert. Anschließend wurde die Virulenz in verschiedenen Bioassays bestimmt. 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 virusbedingte Mortalitätsrate bzw. Endmortalität innerhalb einer befallenen Population.

2.2 Material und Methoden

2.2.1 Versuchsmaterial

2.2.1.1 CpGV

Herkunft

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). Zwei *in vivo* klonierte Genotypen, das CpGV-M1 (Crook *et al.*, 1997) und das CpGV-R1, wurden freundlicherweise von Dr. D. Winstanley (Horticulture Research International, Wellesbourne, U.K.) zur Verfügung gestellt. Mit

Ausnahme der Versuche zur Bestimmung der mittleren Letalkonzentration und –zeit, welche an der BBA-Darmstadt mit CpGV-M durchgeführt wurden, wurde auch für die in den anschließenden Kapiteln beschriebenen Versuche der Genotyp CpGV-M1 verwendet. Dieser Genotyp stammt aus *in vivo* Klonierungen des CpGV-M und scheint sich aufgrund von Verdauungsmustern mit verschiedenen DNA-Restriktionsendonukleasen nicht von CpGV-M zu unterscheiden (Crook *et al.*, 1997). Seine Genomsequenz ist vollständig bekannt (Luque *et al.*, 2001).

Produktion und Aufreinigung

Um im Rahmen dieser Untersuchungen eine möglichst große Ausbeute an Viren zu erhalten (vgl. Kap. 2.3.3), erfolgten die notwendigen Virusvermehrungen in L5-Larven des Apfelwicklers. Frisch gehäutete Larven wurden mit der sogenannten *diet-plug* Methode infiziert. Die ca. 2 mm³ großen Mediumblöckchen wurden oberflächlich mit 1000 OB benetzt. Nach ca. 16 h wurde denjenigen Larven, die dieses Mediumblöckchen komplett gefressen hatten, für die restliche Entwicklung ausreichend Medium verabreicht. Nach einer Inkubationszeit von 5 bis 6 Tagen wurden die virustoten Larven täglich abgesammelt, indem sie mit einer Pinzette an der Kopfkapsel angehoben wurden. Die Virose zeichnet sich durch ein weißliches Anschwellen des Körpers mit einer fortschreitenden Melanisierung aus. Die abgesammelten Larven wurden bis zur Aufreinigung bei –20°C gelagert.

Aus den im gefrorenen Zustand gepoolten Larvenkadavern wurden die OB über mehrere Reinigungsschritte isoliert. Zunächst wurden die virösen Larven in einer SDS-Lösung (0,5% w/v) gemörsert, die Suspension über Mull filtriert und über mehrere Zentrifugationsschritte aufgereinigt. Um gröbere Larvenverunreinigungen zu entfernen, wurde das Filtrat kurz anzentrifugiert (15 s, 3000 x g, Festwinkelrotor). Der Überstand wurde in ein neues Zentrifugengefäß überführt, um die OB zu pelletieren (30 min, 17 000 x g, Festwinkelrotor). Der so erhaltene Überstand wurde verworfen, die pelletierten OB in einer geringen Menge bidestilliertem Wasser aufgenommen und schließlich über einen kontinuierlichen Glyceringradienten (20 – 80% v/v) aufgereinigt (40 min bei 12 000 x g, Beckmann Ultrazentrifuge, Swing-out Rotor SW 28). Die OB-Bande konnte bei ca. 55-60% Glycerin entnommen werden. Um das Glycerin zu entfernen, wurde die entnommene Virusbande in SDS (0,1% w/v) resuspendiert und in zwei Waschschritten pelletiert (10 000 x g, 30 min, Festwinkelrotor). Schließlich wurden die aufgereinigten OB in einer geringen Menge bidestilliertem Wasser aufgenommen.

Der Virustiter wurde durch viermaliges Auszählen unter Dunkelfeldbedingungen in einer Petroff-Hauser-Zählkammer mit 0,01 mm Tiefe bestimmt. Die Virussuspension wurde aliquotiert bei -20°C gelagert. Da das Virus durch wiederholtes Einfrieren und Auftauen an Aktivität verliert, wurde für die Versuche jeweils nur das benötigte Aliquot aufgetaut. Die durch das Einfrieren bedingte Virusaggregation wurde durch einige Sekunden im Ultraschallbad wieder aufgehoben.

2.2.1.2 *C. pomonella*

Herkunft und Zuchtbedingungen

Die für die Laboruntersuchungen 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 (siehe Tab. 2.1, Ivaldi-Sender, 1974; auch in Bathon *et al.*, 1991 beschrieben), wie es in leicht modifizierter Zusammensetzung auch für Bioassays Verwendung findet (Kap. 2.2.3.2). Um zu verhindern, dass die gesamte Zucht durch mögliche Kontaminationen mit dem CpGV beeinträchtigt wird, wurden die Larven bei der BBA-Darmstadt einzeln in ca. 8 cm^3 großen Döschen gehalten, die mit Nährmedium ausgefüllt waren. Alle Entwicklungsstadien wurden in einem klimatisierten Raum bei 26°C , 70% relativer Luftfeuchte und einer 16 h Licht : 8 h Dunkel Photoperiode 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, da die Falter bevorzugt ihre Eier an glatten Oberflächen ablegen (vgl. Bathon *et al.*, 1991). Als Nahrung wurde den Faltern Wasser über ein befeuchtetes Filterpapier angeboten. Die Apfelwickler-Zucht erfolgte im Wesentlichen nach der von Bathon (1981) beschriebenen Methode. Die Eier wurden für die Versuche mit Formoldampf sterilisiert (6 h, 3 Tropfen 5%-iges Formaldehyd auf einem Filterpapier im Deckel eines verschlossenen Plastikbechers).

Tab. 2.1: Zusammensetzung des semi-synthetischen Nährmediums nach Ivaldi-Sender, 1974. Agar Pulver wurde mit Wasser zum Kochen gebracht. Anschließend wurden Maismehl, Weizenkeime, Bierhefe und die in Ethanol gelösten Nipagin und Benzoesäure hinzugegeben und gut gemischt. Die in Wasser gelöste Ascorbinsäure wurde erst ab einer Temperatur von 60 - 70°C hinzugegeben.

Zutaten	Menge
Wasser	800 ml
Agar Pulver	20 g
Maismehl	50 g
Weizenkeime	50 g
Bierhefe	50 g
Ascorbinsäure	6 g
Benzoesäure	2 g
Nipagin	2 g

2.2.2 DNA-Charakterisierung verschiedener CpGV-Isolate

Nach der Virusvermehrung und Aufreinigung der OB, wurde das Viruspellet in 500 µl Na₂CO₃ (50 mM) gelöst um die Virionen freizusetzen. Damit die in Lösung vorhandenen Proteine in der anschließenden Phenolextraktion entfernt werden konnten, wurde der pH-Wert der klaren Suspension anschließend durch Zugabe von HCl (1 M) wieder auf pH 8,0 eingestellt. Durch die Zugabe von SDS-Lösung (10% w/v) auf eine Endkonzentration von 1% und anschließender Inkubation (30 min) bei 37°C wurden zunächst die Virionen disintegriert. Die DNA wurde zweimal mit TE-saturiertem Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1 v/v/v) und einmal in Chloroform:Isoamylalkohol (24:1 v/v) extrahiert. Zum Fällen der DNA wurde 0,1faches Volumen Na-Acetat (3 M, pH 5,2) und 2,5faches Volumen Ethanol (96%) zugegeben und 20 min bei -20°C gekühlt. Die DNA wurde pelletiert (10 min bei 12 000 x g, Eppendorf 5417C), anschließend in Ethanol (70%) gewaschen und nochmals pelletiert. Das getrocknete DNA-Pellet wurde in 20 µl TE-Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 1 mM EDTA) oder sterilem Wasser aufgenommen. Die gereinigte DNA-Lösung wurde bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

Für die Verdauung der DNA-Proben wurden DNA-Restriktionsendonukleasen *EcoRI*, *PstI* und *XhoI* (Gibco/BLR) verwendet, wobei die vom Hersteller für jedes Enzym empfohlenen Reaktionsbedingungen beachtet wurden. Im Verdauungsansatz wurden 600 ng DNA mit jeweils 15 Units Enzym im Wasserbad inkubiert (2 h, 37°C). Anschließend wurde die Endonukleaseaktivität durch Zugabe von Ladepuffer (6x Ladepuffer: Bromphenolblau (0,25% w/v), Saccharose (40% w/v) in bidestilliertem Wasser) oder durch Einfrieren gestoppt. Die elektrophoretische Auftrennung der fragmentierten DNA erfolgte in 0,8 % TAE-

Agarosegelen (10x TAE-Lösung: 242 g TRIS, 57,1 ml Eisessig, 20 ml EDTA (1 M, pH 8,0) auf 1 l angesetzt). Als Längenstandard dienten *HindIII*-Fragmente von *lambda*-DNA. Der Elektrophoreselauf wurde über Nacht bei einer Spannung von 30 V und einer Stromstärke von 10 mA bei Raumtemperatur durchgeführt. Nach dem Elektrophoreselauf wurde das Gel zunächst 30 min lang in einer Ethidiumbromid-Lösung (0,5 µg/ml) gefärbt und anschließend 10 min lang in Wasser entfärbt, ehe es auf einem UV-Transilluminator fotografiert wurde (Intas gel documentation system).

2.2.3 Bestimmung der Virulenz mittels standardisierter Bioassays

Die Virulenz der Viren wurde durch Bestimmung der mittleren Letaldosis (LD₅₀) bzw. Letalkonzentration (LC₅₀) und mittleren Letalzeit (LT₅₀) mittels Bioassays parametrisiert. Hierzu wurden L1-Larven unter standardisierten Bedingungen mit einer bekannten Virusdosis bzw. Viruskonzentration im Medium infiziert und die Wirkung über eine Probit bzw. Logit-Analyse bestimmt. Die Bestimmungen und Analyse der mittleren Letalkonzentration und -zeit wurden von Dr. K. Undorf-Spahn und Dr. E. Fritsch am Institut für biologischen Pflanzenschutz der Biologischen Bundesanstalt in Darmstadt durchgeführt.

2.2.3.1 Letaldosis

Eine mittlere Letaldosis (LD₅₀) kann über die sogenannte *droplet-feeding* Methode (Hughes & Wood, 1981; Kadir *et al.*, 1999) oder über oberflächlich kontaminierte Mediumblöckchen bestimmt werden. Bei den kleinen Eilarven (L1-Stadium) eignet sich allerdings nur die *droplet-feeding* Methode, da es nicht möglich ist Mediumblöckchen zu verfüttern, die klein genug sind, dass Eilarven sie in einem relativ kurzem Zeitraum vollständig zu sich nehmen. Bei der *droplet-feeding* Methode wurde die verabreichte Virussuspension mit blauer Lebensmittelfarbe (8%) hergestellt, um eine Aufnahme im Larvendarm sichtbar zu machen. 2 µl Tropfen der Suspension wurden in Form eines Kreises (Ø ~1,5 cm) auf ein Stückchen Parafilm (4 cm x 4 cm) in eine Petrischale pipettiert. 20 bis 30 Eilarven wurden mit einem Pinsel in die Mitte des Kreises gesetzt. Nach 10-15 min wurden Larven mit einem blau angefärbten Darm in Mikrotiterplatten überführt, bei denen mindestens ein Tag zuvor die Vertiefungen zu zwei Dritteln mit semi-synthetischen Nährmedium gefüllt wurden. Die verabreichte Dosis berechnet sich aus der Viruskonzentration und dem Volumen, das eine Larve durchschnittlich trinkt. Aus der Arbeit von Chowdhury (1992) ist bekannt, dass *C. pomonella* Eilarven bei einem solchen Versuch $6,8 \pm 2,4$ nl Flüssigkeit aufnehmen. Zur

Ermittlung der mittleren Letaldosis wurden folgende 5 OB-Konzentrationen verwendet: 2, 10, 20, 100, 200 OB/L1-Larve. Kontrolltieren wurde die Lebensmittelfarbe (8%) ohne Virus verfüttert. Die Mikrotiterplatten wurden mit Frischhaltefolie, Glasobjektträgern und Gummibändern verschlossen und bei 26°C bei einer 16 h Licht: 8 h Dunkel Photoperiode inkubiert. Am Tag nach der Infektion wurde die Anzahl der Larven notiert, die das Umsetzen nicht überlebt hatten. Eindeutiges Zeichen hierfür war keine Bewegung beim Antippen der Kopfkapsel mit einer Präpariernadel. Hierzu wurde die Folie durchstoßen. Die virusbedingte Mortalität wurde nach sieben (1. Wiederholung) bzw. acht Tagen (2. Wiederholung) registriert.

2.2.3.2 Letalkonzentration

Die mittlere Letalkonzentration wurde mit dem von Huber (1981) standardisiertem Bioassay-System ermittelt, bei dem frisch geschlüpfte Eilarven (L1) über mit CpGV kontaminiertes Futter infiziert wurden. Um eine thermische Inaktivierung der Viren zu verhindern, wurde das Zuchtmedium von Ivaldi-Sender (1974) so abgewandelt, dass es sich bei einer Temperatur von 40°C noch ausgießen ließ. Veränderte Mengen der Zutaten im Vergleich zu Tab. 2.1 waren 8 g Agar und je 60 g Maisgries, Weizenkeime und Bierhefe. Die OB wurden bei einer Temperatur von 40-45°C in das frisch zubereitete Nährmedium gemischt. Die mit Medium gefüllten Rasterschalen mit je 50 Quadraten blieben über Nacht zum Ausdünsten offen stehen. Anschließend wurde jedes Quadrat mit einer frisch geschlüpfen Eilarve besetzt. Als Kontrolle diente eine Rasterschale mit virusfreiem Nährmedium. Die verschlossenen Schalen wurden bei 26°C bei einer 16 h Licht: 8 h Dunkel Photoperiode inkubiert. Nach 6 Tagen wurde die virusbedingte Mortalität registriert.

2.2.3.3 Letalzeit

Die mittlere Letalzeit wurde ebenfalls mit dem von Huber (1981) standardisierten Bioassay-System ermittelt, bei dem frischgeschlüpfte Eilarven (L1) über mit CpGV-kontaminiertes Futter infiziert wurden. In einem ersten Versuch wurde die mittlere Letalzeit für verschiedene OB-Konzentrationen (2500, 5000, 10000 und 20000 OB pro ml Medium) bestimmt. Als Kontrolle diente OB-freies Medium. Da sich im Freiland die Apfelwickler-Larven im Allgemeinen während des kurzzeitigen Oberflächenfraßes infizieren, wurden die Tiere im Laborversuch nur 24 h viruskontaminierter Nahrung ausgesetzt. Anschließend wurden sie (100 Larven pro Variante) auf virusfreies Medium umgesetzt und in Einzelhaltung bei einer

16 h Licht: 8 h Dunkel Photoperiode weiter inkubiert. Die virusbedingte Mortalität wurde im Abstand von 2 Tagen bis zur Verpuppung registriert.

In einem zweiten Versuch wurde die Letalzeit bei unterschiedlichen Temperaturen bestimmt. Für jede Temperatur wurden 500 *C. pomonella* Eilarven bis zur Verpuppung kontinuierlich auf viruskontaminiertem Nährmedium (5000 OB/ml = LC₉₅ bei 26°C) gehalten. Die virusbedingte Mortalität wurde im Abstand von 2 Tagen bis zur Verpuppung registriert. Zu jedem der 10 Auswertungszeitpunkte wurden hierfür 50 Tiere je Temperaturvariante beobachtet.

2.2.3.4 Statistische Auswertung

Als klassische Methode zur Berechnung der mittleren Letaldosis (LD₅₀), -konzentration (LC₅₀) und -zeit (LT₅₀) diente die Probit-Analyse nach Finney (1971), die auf dem Maximum-Likelihood-Prinzip basiert. Die Berechnungen erfolgten mit dem SAS Software Package (SAS Institute, 2001) für die LD₅₀ und der PC-Software MLP 3.08 (NAG, Lawes Agricultural Trust, Rothamsted Experimental Station, 1987) für die LC₅₀ und LT₅₀. Für die Berechnung der LT₅₀ bei unterschiedlichen Infektionskonzentrationen, die unterschiedliche Endmortalitäten zur Folge hatten (Tab. 2.4), konnten die Obergrenzen für die Larvensterblichkeit vorgegeben werden, sodass nur die gestorbenen Versuchstiere für die Auswertung herangezogen wurden.

2.2.4 Quantifizierung der Virusausbeute

Frisch geschlüpfte Eilarven wurden über die *droplet-feeding*-Methode (vgl. 2.1.3.1) mit unterschiedlichen Infektionsdosen inokuliert. Die Larven wurden anschließend auf Zucht-Medium gehalten. Tote Larven wurden abgesammelt, zerrieben und in Wasser aufgenommen. Der Virusgehalt wurde in einer Petroff-Hauser-Zählkammer im Lichtmikroskop unter Dunkelfeldbedingungen ausgezählt. Für die statistische Auswertung wurden die Daten log-transformiert und einer Varianzanalyse unterworfen (GLM procedure, SAS Institute, 2001). Ein multipler Mittelwertvergleich erfolgte über den Test nach Scheffe.

Um die Identität der ausgezählten Virusnachkommen zu bestätigen, wurde ein Abschnitt des CpGV-Granulins mittels PCR unter Standardbedingungen (Kap. 5.2.1.2) mit den Primerpaaren 5'- TCA GCT CAA CGC TCA ACT C und 5'- GAC AAA TTG TCA GTT

CAC TAG T, Taq DNA Polymerase (Gibco/BLR), 2,5 mM MgCl₂ und 1 µl Virussuspension als Template durchgeführt. Die Virussuspension wurde so verdünnt, dass die ursprüngliche Inokulationsdosis deutlich unterhalb und die ausgezählten OB nahe der Nachweisgrenze von 1 x 10³ OB pro Reaktion lagen. Ein PCR-Produkt würde deshalb auf repliziertes CpGV hindeuten. Nach der Amplifikation (35 Zyklen: 1 min bei 94°C, 45 s bei 52°C und 45 s bei 72°C, Appligene Crocodile III Cycler) wurden je 20 µl der PCR Produkte in einer Gelelektrophorese in 1% Agarose aufgetrennt und mit Ethidiumbromid angefärbt. Die PCR enthielt eine Positivkontrolle (CpGV-DNA) und eine Negativkontrolle (steriles Wasser).

2.3 Ergebnisse und Diskussion

2.3.1 DNA-Charakterisierung verschiedener CpGV-Isolate

Drei aus Georgien stammende CpGV-Isolate (LB1, LB2 und LB3) wurden mit einem *in vivo* klonierten Genotypen des mexikanischen CpGV-Isolats (M1) und einem *in vivo* klonierten Genotypen eines russischen CpGV-Isolats (R1) durch DNA-Restriktionsendonukleasen-Verdau mit *XhoI* verglichen. Der Genotyp R1 unterscheidet sich von M1 durch das Wegfallen einer *XhoI*-Schnittstelle und der dadurch verursachten Fusion der Fragmente *XhoI*-F und -J. Außerdem zeichnen sich verschiedene R-Genotypen durch eine 2,45 kb Deletion innerhalb von *XhoI*-I aus, das in einem 2,4 kb großen *XhoI*-I' resultiert (Crook *et al.*, 1985). Der *XhoI*-Verdau der georgischen Isolate ist in Abb. 2.1 dargestellt. Bei LB1 handelte es sich offensichtlich um einen Mischgenotypus, der ein submolares I-Fragment wie M1 und ein submolares I'-Fragment wie R1 besaß. Außerdem besaß LB1 die *XhoI*-F/J-Schnittstelle. LB2 ähnelte dem R1- Genotypen, indem es ein I'-Fragment mit der 2,45 kb Deletion hatte. Andererseits besaß auch dieses Isolat wie M1 die F/J-Schnittstelle. LB3 gleicht im *XhoI*-Verdau dem M1. Der *EcoRI*-Verdau konnte nur mit LB2 erfolgreich durchgeführt werden (Abb. 2.2). LB2 zeigte bei diesem Verdau ein Bandenmuster äquivalent zu R3, bei dem die Fragmente D und E miteinander fusioniert sind und das Fragment C um die bereits erwähnten 2,45 kb kürzer ist. Die georgischen Isolate LB1 – LB3, deren Restriktionskarten in Abb. 2.3 dargestellt sind, konnten somit als Intermediär-Typen von CpGV-M und CpGV-R interpretiert werden.

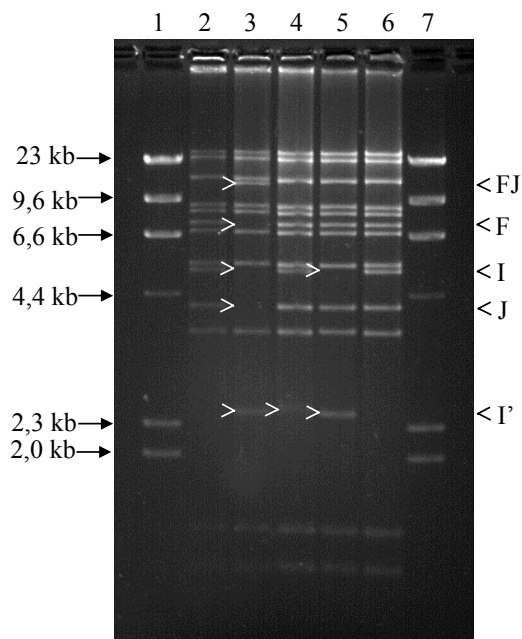


Abb. 2.1: Restriktionsendonukleaseverdau von verschiedenen CpGV-Genotypen und -Isolaten mit *Xho*I. 1) und 7) λ *Hind*III als Größenstandard, 2) CpGV-M1, 3) CpGV-R1, 4) CpGV-LB1, 5) CpGV-LB2, 6) CpGV-LB3. Buchstaben am rechten Rand bezeichnen die jeweiligen Fragmente.

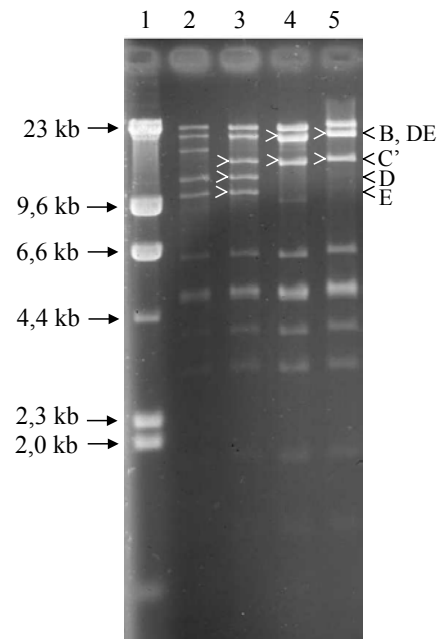


Abb. 2.2: Restriktionsendonukleaseverdau von verschiedenen CpGV-Genotypen und -Isolaten mit *Eco*RI. 1) λ *Hind*III als Größenstandard 2) CpGV-M1, 3) CpGV-R1, 4) CpGV-R3 5) CpGV-LB2. Buchstaben am rechten Rand bezeichnen die jeweiligen Fragmente.

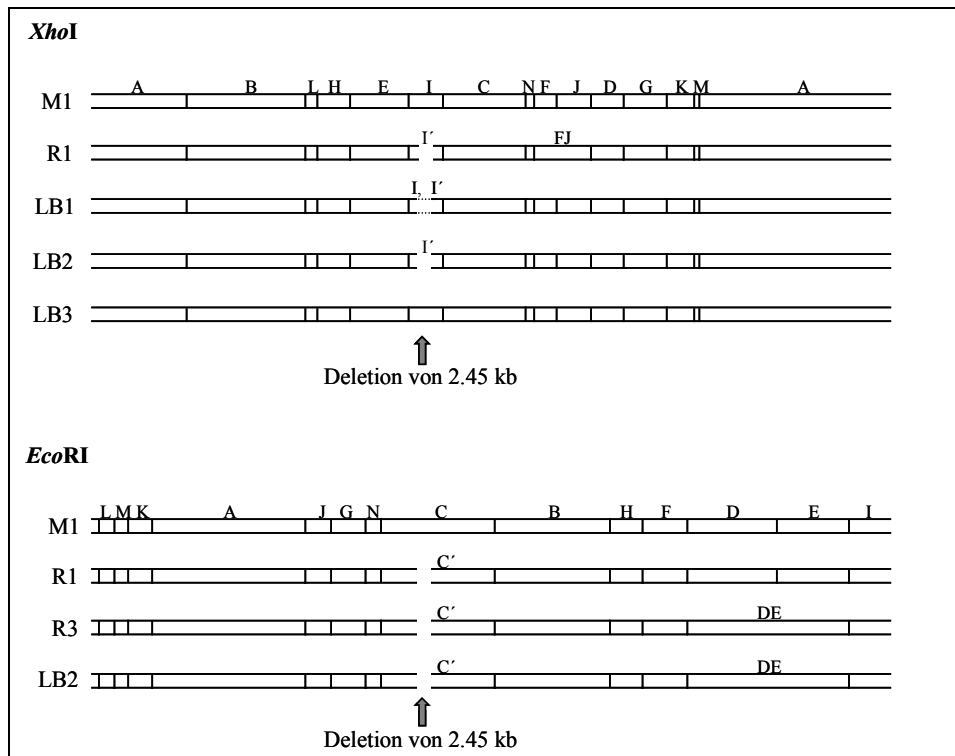


Abb. 2.3: Nach Crook *et al.* (1997) abgeleitete Restriktionskarten für die Isolate CpGV-LB1, CpGV-LB2 und CpGV-LB3.

Aus Bioassays war bekannt, dass die russischen Isolate keine signifikant unterschiedliche mittlere Letalkonzentration gegenüber *C. pomonella* Eilarven hatten (Crook *et al.*, 1985) und auch nur eine um sechs Stunden verlängerte mittlere Letalzeit (Wormleaton, 2000). Im Hinblick auf die Untersuchungen zur Populationsdynamik erschienen diese Unterschiede als zu gering, als dass eine weitere molekulare und biologische Charakterisierung dieser Genotypen lohnenswert erschien. Aus diesem Grund wurde auf weitere Charakterisierung der Genotypen verzichtet und nur CpGV-M1 in weiteren Versuchen verwendet.

2.3.2 Virulenz des CpGV-M bzw. des CpGV-M1

Die Virulenz eines Pathogens setzt sich aus seiner wirksamen Dosis (über LD₅₀ und LC₅₀ parametrisiert) und seiner Wirkgeschwindigkeit (über LT₅₀ parametrisiert) zusammen.

2.3.2.1 Letaldosis

Das vermehrte CpGV-M1, das in den Laborversuchen zur horizontalen und vertikalen Transmission eingesetzt wurde, besaß für Eilarven (L1) eine mittlere Letaldosis (LD₅₀) von 1,3 OB mit 95% Vertrauensgrenzen von 0,5 bis 2,2 (je 2 Versuchswiederholungen; χ^2 ist signifikant bei $p < 0,0001$). Das formulierte CpGV-Präparat Granupom, das im Freilandversuch verwendet wurde, hatte eine LD₅₀ von 0,6 OB mit 95% Vertrauensgrenzen von 0 bis 4,6 OB (Tab. 2.2; je 2 Versuchswiederholungen; χ^2 ist signifikant bei $p < 0,01$). Die Analyse der Daten für das CpGV-M1 erfolgte über eine logistische Verteilung, während für die Analyse der Granupom-bedingten Mortalitäten eine Gompertz-Verteilung angenommen wurde.

Tab. 2.2: Mittlere Letaldosis (LD₅₀) für *C. pomonella* L1-Larven, die mit CpGV-M1 infiziert wurden. Die Kontrolltiere in beiden Wiederholungen hatten eine Überlebensrate von 100%.

	LD ₅₀	Steigung	95% Vertrauensgrenzen	
			untere	obere
CpGV-M1	1,3	1,04	0,5	2,2
Granupom	0,6	2,69	0	4,6

Um eine möglichst hohe Genauigkeit bei der Schätzung der LD₅₀ zu erzielen, sind Infektionsversuche mit verschiedenen Virusdosen um den Bereich der zu erwartenden LD₅₀ notwendig. Eine exakte Bestimmung ist bei einer LD₅₀ von nur 1 bis 2 OB aufgrund von

Pipettiergenauigkeiten und der Variabilität in der Menge der Nahrungsaufnahme technisch kaum durchführbar. Ehe die LD₅₀ über *droplet feeding* ermittelt wurde, wurde sie theoretisch geschätzt. Hierbei leiteten Crook *et al.* (1984, 1985) eine LD₅₀ von 1 bis 2 OB bzw. 3 OB her, während Keller (1973) mit Hilfe seiner Bioassays auf Apfelrondellen mit und ohne applizierten Netzmittel eine LD₅₀ von 28 bzw. 46 OB/Eilarve herleitete. Mit einer LD₅₀ von 0,6 OB für das Granupom und einer LD₅₀ von 1,3 OB für das vermehrte CpGV-M1, lagen die Werte eher im unteren Bereich der bisher veröffentlichten Daten und stimmen der hergeleiteten LD₅₀ von Crook *et al.* (1984, 1985) und dem über die *droplet feeding* Methode ermittelten Wert von Dr. D. Winstanley (pers. Mitt.) überein (Tab. 2.3). Die LD₅₀ von L5-Larven ist erwartungsgemäß höher und liegt im Bereich von 10 bis 92 OB (Tab. 2.3).

Tab. 2.3: 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)
1,4	Winstanley (pers. Mitt.)	10	Winstanley (pers. Mitt.)
46	ohne Netzmittel, Keller (1973)		
28	mit Netzmittel, Keller (1973)		

2.3.2.2 Letalkonzentration

Einfacher als die Bestimmung der LD₅₀ ist bei L1-Larven die Bestimmung der LC₅₀. Da hier mit wesentlich höheren Konzentrationen gearbeitet wird, lässt sich der Konzentrationsbereich der mittleren Letalkonzentration besser abdecken als bei der LD₅₀. Die ermittelte LC₅₀ von $2,56 \times 10^3$ OB/ml Nährmedium stimmte mit den von Fritsch (1989) und Crook *et al.* (1984, 1985) angegebenen Daten überein, die nach vergleichbarer Methode bestimmt wurden (Tab. 2.4). Der relativ steile Verlauf der Probit-Regressionsgeraden, die bereits von Fritsch (1989) mit Larven des gleichen Zuchtstamms ermittelt wurde, lässt auf eine große Homogenität der Versuchstiere schließen. Die vorliegenden LC₅₀-Daten sind ein Maß für die biologische Aktivität des CpGV und können dem Vergleich mit LC₅₀-Werten anderer Studien dienen. Sie sagen jedoch nichts über die tatsächlich wirksame Virusdosis aus, da diese von der Fraßaktivität und dem Fraßvolumen der Larven abhängig ist.

Tab. 2.4: Übersicht über die in Bioassays auf semi-synthetischen 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	E. Fritsch & K. Undorf-Spahn (pers. Mitt.)
$2,73 \times 10^3$	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)

2.3.2.3 Letalzeit

Bei der Virogenese werden die Wirtslarven erst relativ spät durch die mit der Replikation verbundene Lysis lebenswichtiger Organe abgetötet. Die Virulenz 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 inokulierten Testtiere sterben.

Tab. 2.5: 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) (E. Fritsch & K. Undorf-Spahn, pers. Mitt.). SD = Standardabweichung.

Virus-Konzentration [OB/ml Medium]	Endmortalität [%]	LT_{50} [h]	Steigung (SD)
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 in Tab. 2.4 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass die ermittelten mittleren Letalzeiten in dem gewählten Bereich relativ unabhängig von den eingesetzten Viruskonzentrationen waren. Die aus allen Konzentrationsvarianten errechnete durchschnittliche LT_{50} betrug 108,5 h (4,5 Tage). Die virusbedingten Endmortalitäten erhöhten sich mit ansteigender Inokulationskonzentration auf 34%, 57% bzw. 85% der Testlarven. Konstante Letalzeiten bei unterschiedlichen Infektionsdosen wurden auch von Hernandez-Crespo *et al.* (2001) bei

Autographa californica und *Trichoplusia ni* in Zusammenhang mit dem AcMNPV festgestellt. Huber & Hughes (1984) begründeten diese Beobachtungen mit der *single particle theory*. Mit dieser Theorie kann davon ausgegangen werden, dass sich Versuchstiere bei niedrigen Viruskonzentrationen zunächst mit nur einem oder wenigen Viruspartikeln infizieren. Damit wird, unabhängig von der angebotenen Viruskonzentration, die Infektion einer Larve durch eine ähnlich wirksame Dosis ausgelöst. Erst bei sehr hohen Viruskonzentrationen (z.B. ab einer LD₉₀ bei *Lymantria dispar*) kommt es zu einer gleichzeitigen Infektion durch mehrere Viruspartikel. Dies bedeutet, dass die Virusreplikation in mehreren Zellen des larvalen Mitteldarms gleichzeitig beginnen kann, sich die Virose in der Larve schneller ausbreitet und die Larve schneller stirbt. In allen Versuchen zeigte sich darüber hinaus, dass vor dem dritten Versuchstag keine an einer Virose gestorbenen Larven auftraten. In Pathogenitätstests mit Apfelrondellen kam Keller (1973) für das CpGV-M zu vergleichbaren Resultaten. Erste viröse Larven wurden am vierten Tag beobachtet, ebenfalls unabhängig von der verabreichten Viruskonzentration. Allerdings lag die mittlere Letalzeit der Apfelwicklerlarven zwischen bei 5,48 bis 6,0 Tagen etwas höher.

2.3.2.4 Temperaturabhängige Letalzeit

Das Ziel der Untersuchungen war es, die Replikationsfähigkeit und Wirkgeschwindigkeit des CpGV bei unterschiedlichen Temperaturen zu beschreiben. Im Unterschied zum vorher beschriebenen Versuch, bei dem die Larven nur 24 h viruskontaminierter Nahrung ausgesetzt waren, wurden die Larven hier konstant auf viruskontaminiertem Nährmedium gehalten, wodurch bei der gleichen OB-Konzentration eine wesentlich höhere Endmortalität resultierte. Bei 5000 OB/ ml Medium (entspricht einer LD₉₅ bei 26°C), nahmen die LT₅₀-Werte mit zunehmender Temperatur ab und zwar von 467 h bei 19°C auf 172 h bei 30°C (Tab. 2.6). Erst ab 32°C stieg die LT₅₀ wieder auf 298 h an. Die Probitgeraden für 19°C und 32°C wiesen eine geringere Steigung als die Geraden für die übrigen Temperaturen auf, die nahezu parallel verliefen. Obwohl alle Testlarven mit der gleichen Viruskonzentration infiziert wurden, nahm die Endmortalität 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%. Die höhere LT₅₀ im Vergleich zu dem unter Kap. 2.3.2.3 beschriebenen Versuch, hängt vermutlich damit zusammen, dass die letale Dosis nicht zeitgleich, stattdessen aber über einen längeren Zeitraum aufgenommen wurde.

Tab. 2.6: Mittlere Letalzeiten (LT_{50}) für Eilarven von *C. pomonella* bei 5000 OB/ml Medium (entspricht einer LD_{95} bei 26°C) und unterschiedlichen Temperaturen. Die Larven wurden bis zur Verpuppung auf viruskontaminierter Nahrung gehalten (E. Fritsch & K. Undorf-Spahn, pers. Mitt.). SE = Standardfehler.

Temperatur [°C]	End-mortalität [%]	LT_{50} [h]	95% Vertrauensgrenzen	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% Niveau) nicht signifikant im Vergleich zum Standard-Bioassay bei 26°C.

Im Hinblick auf die Wirkgeschwindigkeit scheint der Temperaturbereich zwischen 24°C und 28°C optimal für die Entwicklung der Virose zu sein. Bei niedrigeren als auch bei höheren Temperaturen ist die Wirkgeschwindigkeit deutlich reduziert. Bei 19°C ist die gesamte Entwicklung der Larven verlangsamt (Abb. 1.6) und die längere Letalzeit lässt sich vermutlich auf die larvale Physiologie zurückführen. Die Verringerung der Larvensterblichkeit bei 30°C und 32°C deutet auf eine Hemmung der Primärinfektion bzw. der Virusreplikation bei diesen Temperaturen hin, denn die Larven entwickeln sich bei diesen Temperaturen normal. Ein Anstieg der LT_{50} des CpGV bei Temperaturen über 30°C und eine Zunahme der Resistenz der Apfelwicklerlarven gegenüber den Viren wurden auch von Keller (1973) beobachtet. Auch andere Baculovirus-Wirt-Systeme weisen in diesem Temperaturbereich einen Rückgang der Mortalität auf (z.B. Boucias *et al.*, 1980), was aber nicht bedeutet, dass dies die Regel ist. Zum Teil wurde bei Baculovirus-Wirt-Systemen keine Resistenz (z.B. Ribeiro & Pavan, 1994) oder eine Resistenz erst ab Temperaturen von 40°C beobachtet (z.B. Stairs, 1978). Dabei schien in letzterer Studie nicht die Primärinfektion, sondern die Replikation gehemmt zu werden.

2.3.3 Infektionsdosisabhängiger Virengehalt in L1-Larven

Aus der Literatur war bekannt, dass *C. pomonella* Larven im L5-Stadium von 9×10^9 bis zu 10^{11} Virusnachkommen produzieren (Glen & Payne, 1984; Keller, 1973), während Larven im L4-Stadium 10- bis 15mal weniger produzieren (Keller, 1973). In erster Annäherung wurde

angenommen, dass die Anzahl an Virusnachkommen mit der Körpergröße der Larve korreliert. Grob geschätzt hat eine an Virose verstorbene L1-Larve ein Volumen von $0,14 \text{ mm}^3$ und eine L5-Larve ein Volumen von 90 mm^3 (für die Volumenberechnung wurde die Larve als Zylinder behandelt). So betrachtet, wäre die Menge der Nachkommenschaft von Eilarven entsprechend ihrer Körpergröße um einen Faktor 640 kleiner als bei den L5-Larven. Wenn L5-Larven durchschnittlich 10^{10} bis 10^{11} Virusnachkommen produzieren, dann könnten L1-Larven $1,6 \times 10^7$ bis $1,6 \times 10^8$ Virusnachkommen produzieren. Zusätzlich wurde angenommen, dass Larven, die mit einer höheren Dosis infiziert wurden, schneller sterben und somit eventuell weniger Virusnachkommen produzieren. Die Dosis-abhängige Bestimmung der CpGV-Nachkommen infizierter Eilarven ist in Abb. 2.4 dargestellt. Mit einer PCR analysierte Stichproben ausgezählter OB bestätigten, dass es sich bei den ausgezählten OB um CpGV handelte. Wurden beispielsweise die Nachkommen einer Inokulationsdosis von 5000 OB auf $\sim 1 \times 10^4$ OB je PCR-Ansatz verdünnt, sodass nur 0,5 OB der ursprünglichen Inokulationsdosis je PCR-Ansatz vorhanden waren, bestätigte ein 1223 bp langes Produkt, dass repliziertes CpGV und keine inokulierten OB oder Bakterien ausgezählt wurden (Abb. 2.5). Bei einer Dosis von 100 OB wurden durchschnittlich $3,5 \times 10^8$ OB/Eilarve und bei 500 OB wurden $6,4 \times 10^7$ OB/Eilarve gebildet. Einen signifikanten Unterschied gab es bei einer Dosis von 5000 OB, bei der nur $2,2 \times 10^6$ OB/Eilarve 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.

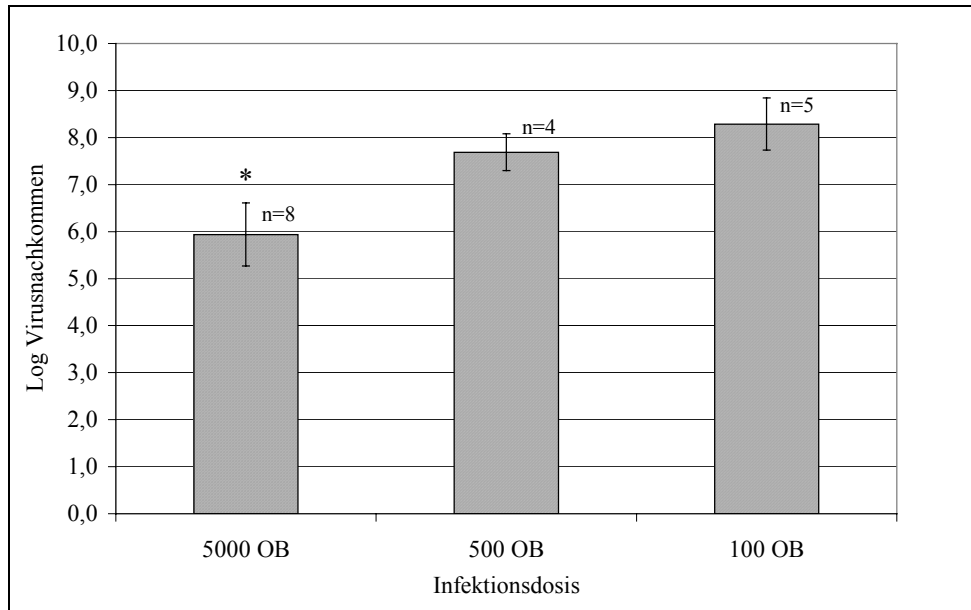


Abb. 2.4: Anzahl der Virusnachkommen von Larven, die als frischgeschlüpfte Eilarven mit unterschiedlichen Dosen CpGV infiziert wurden. Es wurden je vier Verdünnungen einer Larvensuspension mikroskopisch ausgezählt. Die Anzahl der Nachkommen bei einer Dosis von 5000 OB unterscheidet sich signifikant (*) von denen der anderen beiden Dosen (Scheffé's Test, $p < 0,01$).

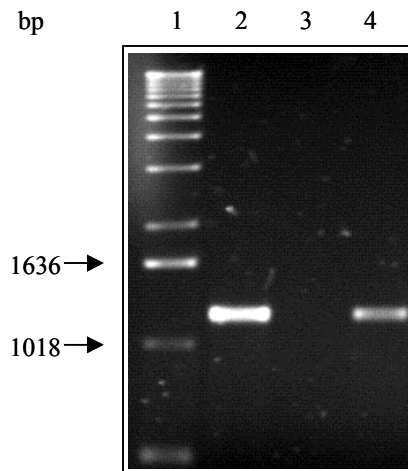


Abb. 2.5: PCR-Analyse ausgezählter OB zur Identifikation des CpGV: 1, 1 kb Ladder (GIBCO/BLR); 2, CpGV DNA als Positivkontrolle (Produktgröße 1223bp); 3 steriles Wasser als Negativkontrolle; 4 ausgezählte OBs, die auf $\sim 1 \times 10^4$ OB/PCR verdünnt wurden; bei dieser Verdünnung waren 0,5 OB des inokulierten CpGV je PCR-Ansatz vorhanden, bp = Basenpaare.

3 HORIZONTALE TRANSMISSION DES CPGV IN EINEM MODELLSYSTEM

3.1 Einleitung

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, doch sind diese Szenarien nur sehr schwierig quantifizierbar. Apfelwickler-Eier werden einzeln abgelegt (Borden, 1931) und es entwickelt sich in der Regel nur eine Larve pro Apfel. Die Wahrscheinlichkeit, dass sich zwei Larven begegnen 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 und im Boden, nicht bis zur nächsten Saison auf dem Baum halten kann. Wegen dieser Überlegungen wurde die horizontale Transmission für das CpGV bisher weitgehend außer Acht gelassen.

Um quantitative Aussagen über die Wahrscheinlichkeit einer horizontalen Transmission des CpGV treffen zu können, wurden gezielte Experimente in einem Modellsystem mit losen Äpfeln durchgeführt. Hierbei 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 innerhalb von ein bis zweieinhalb Stunden in den Apfel (Geier, 1963), 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 (Falcon *et al.*, 1968) und hinterlassen dort bis zu $3,5 \times 10^8$ OB (Kap. 2.3.3), die wiederum als Infektionsquelle für weitere Larven dienen könnten. Für eine horizontale Transmission auf der Oberfläche spricht zudem eine relativ große 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. Außerdem hat Washburn (1893) beobachtet, dass sich mehrere Eier auf einem Apfel befinden konnten und auch Eier auf befallenen Früchten abgelegt wurden.

Zusätzlich zu Versuchen mit applizierten Virusflecken fand hier ein Versuch mit dem *seeder / tracer* Ansatz Verwendung, den bereits andere Autoren erfolgreich eingesetzt haben um Untersuchungen zur horizontalen Transmission möglichst naturnah durchzuführen (Hails *et al.*, 2002, Reeson *et al.*, 2000; D'Amico *et al.*, 1996; Dwyer 1991, 1992; Vasconcelos *et al.*, 1996; Goulson *et al.*, 1995; Young *et al.*, 1987). Die *seeder* Larven werden experimentell mit dem Virus inokuliert und dienen nach ihrem Tod selbst als Virus-Inokulum. Nicht-infizierte *tracer* Larven werden anschließend in das System gebracht um eine mögliche Infektionsquelle aufzuspüren. Beide Ansätze haben ihre Vorzüge. Mit applizierten Virusflecken lassen sich einzelne Faktoren (z.B. Verbreitung oder Lage der Virusquelle) präzisieren, wohingegen im *seeder/tracer* Versuch nur das Gesamtbild betrachtet wird, aber das Verhalten der Larven mit einbezogen wird.

3.2 Material und Methoden

3.2.1 Virus, Insekten und Äpfel

Die Versuchsreihen zur horizontalen Transmission wurden mit CpGV-M1 und *C. pomonella* L1-Larven durchgeführt. Beide werden in Kap. 2.2.1 ausführlich beschrieben. Verwendet wurden außerdem reife Äpfel verschiedener Sorten und einer Versuchskreuzung (Elstar, Jonagold, Braeburn und HER123T), die einen Durchmesser von etwa 6 cm hatten.

3.2.2 Versuchsreihen mit appliziertem CpGV

Die Versuchsreihen wurden mit losen Äpfeln in Plastikbechern durchgeführt. In der ersten Versuchsreihe wurde die gleiche Virusmenge jeweils (1) auf einem punktuellen Fleck, (2) auf einer kreisförmigen Fläche von 7 cm² und (3) auf dem gesamten Apfel aufgetragen. Für den Virusfleck wurden 2 µl der Virussuspension aufpipettiert, für die kleine Fläche wurde der Apfel in ein Stück Plastikfolie mit einer 7 cm² großen kreisrunden Aussparung gehüllt und mit



Abb. 3.1: CpGV-Applikation auf einer Fläche von 7 cm².

Virus suspension bespritzt (Abb. 3.1). Für die Virusapplikation auf der gesamten Apfeloberfläche wurde der Apfel dreimal seitlich und einmal von unten benetzt. In dieser ersten Versuchsreihe wurde das Virus seitlich auf den Apfel aufgetragen. In einer weiteren Versuchsreihe wurde Virus punktuell in der Stielgrube aufgetragen. Um festzustellen, ob die Virusmenge ebenfalls einen Einfluss auf die Infektionswahrscheinlichkeit hat, wurde das Virus in drei verschiedenen Konzentrationen appliziert (siehe Abb. 3.2). Die so behandelten Äpfel wurden in verschließbare Plastikbecher (Fa. Wächter & Co.; Volumen: 375 cm³; Höhe: 74 mm) platziert. Nachdem die Virussuspension angetrocknet war, wurde jeweils eine frischgeschlüpfte *C. pomonella*-Eilarve (L1) auf einen Apfel gesetzt und der Plastikbecher verschlossen. Einzelne Eilarven auf unbehandelten Äpfeln dienten als Kontrolle. Die Bestimmung der Überlebensrate 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.

Die Versuche fanden in einer Klimakammer bei 22°C und einer 14 h Licht: 10 h Dunkel Photoperiode statt. Um Mortalitätsraten für die Auswertung zu erhalten, wurden die Überlebensraten in jeder Wiederholung eines Versuchs mit einer parallel durchgeführten unbehandelten Kontrolle korrigiert (Abbott, 1925).

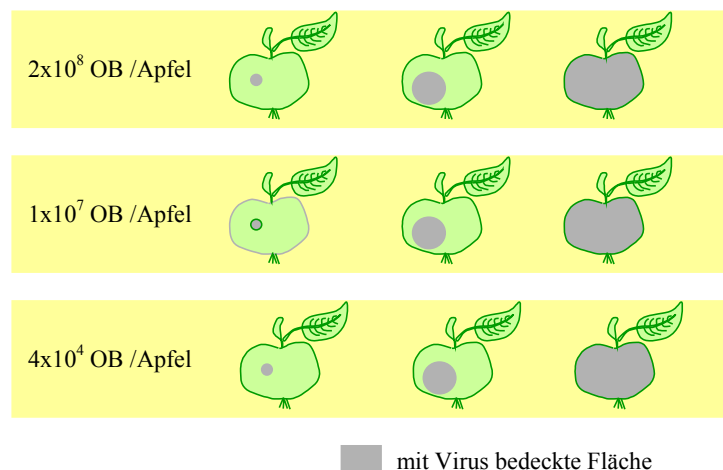


Abb. 3.2: Schematischer Versuchsaufbau.

3.2.3 Versuchsreihen mit virustoten Larven als Inokulum

In ähnlicher Weise wurde ein Versuch durchgeführt, bei dem virustote Larvenkadaver (*seeder*) als Inokulum dienten. Hierfür wurden frischgeschlüpfte Eilarven mit einer hohen Dosis an CpGV (5000 OB bzw. 150 OB je Larve, beide entsprechen >LD 99) über die *droplet-feeding* Methode (siehe Kap. 2.1.3.1) infiziert, auf Äpfel gesetzt und sieben Tage bei Raumtemperatur gehalten. Beim Durchführen der Inokulation mit 150 OB, wurden die Larven nach dem *droplet feeding* außerdem mit Wasser gespült, um eine äußere Virus-Kontamination der Larven möglichst auszuschließen. Um sicherzustellen, dass die Larven nach den sieben Tagen an der Virose zugrunde gegangen waren, dienten 50 gleichermaßen infizierte Larven auf semi-synthetischen Nährmedium als Mortalitätskontrolle. Die Transmissionsrate wurde bestimmt, indem auf jeden Apfel anschließend eine gesunde *tracer* Eilarve gesetzt wurde und deren Überlebensrate nach drei Wochen bonitiert wurde. Einzelne Eilarven auf unbehandelten Äpfeln dienten als Kontrolle.

Die Versuche fanden in einer Klimakammer bei 22°C und einer 14 h Licht: 10 h Dunkel Photoperiode statt. Um Mortalitätsraten für die Auswertung zu erhalten, wurden die Überlebensraten in jeder Wiederholung eines Versuchs mit einer parallel durchgeführten unbehandelten Kontrolle korrigiert (Abbott, 1925).

3.2.4 Statistische Auswertung

Für die Auswertung der Mortalitätsraten bei appliziertem CpGV wurden die Daten einer Arcsinus- und Wurzeltransformation unterzogen. Für die Auswertung der Mortalitätsraten bei Kadavern als Inokulum wurden sie nicht transformiert. Mittelwerte wurden in einer Varianzanalyse unterschieden (GLM procedure, SAS Institute, 2001) und der multiple Mittelwertvergleich mittels Tukey's Studentized Range Test durchgeführt. Mittelwerte mit dem gleichen Buchstaben unterscheiden sich bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ statistisch nicht von einander.

3.3 Ergebnisse

3.3.1 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 entsprechend der produzierten Virusmenge einer Eilarve auf Äpfel appliziert wurden. Dabei sollte der Virusfleck einen an einer Virose gestorbenen Larvenkadaver imitieren, die kleine Fläche die gleiche Menge Virusnachkommen, die durch Regen verteilt wurde und die vollständige Benetzung eine Spritzbehandlung. Damit die Menge an aufgesprühtem Virus abgeschätzt werden konnte, wurde zu Beginn ein 64 cm² großes Stück Plastikfolie mit einem Handsprüher mit Wasser benetzt und anschließend gewogen. Die Gewichtszunahme von zehn Messungen ergab 0,0380 g ± 0,0130 g. Die daraus berechnete Wassermenge von 0,6 ± 0,2 µl pro cm² wurde im Versuch für die Berechnung der Virusmenge in der kleinen Fläche (7 cm²) oder auf dem ganzen Apfel (bei einem Durchmesser von 6 cm ungefähr 113 cm²) verwendet.

Außerdem war es für die Versuche zur horizontalen Transmission wichtig zu wissen, wie viele Larven sich auf einem Apfel entwickeln konnten. Dieser Vorversuch zeigte, dass bei extrem unrealistischen Dichten von zehn Larven pro Apfel zwar ein relativ großer Anteil der Larven überlebte (46 ± 14%, Tab. 3.1), doch die meisten dieser Larven sehr klein und unterentwickelt waren. Generell konnten nur eine, gelegentlich auch zwei, manchmal drei L4- und L5-Larven im Kerngehäuse gefunden werden. Die Überlebensraten in diesem Versuch waren im Allgemeinen höher als die von Jackson (1982) in Tab. 1.9 dargestellten Überlebensraten bei höheren Dichten.

Tab. 3.1: Anteil der überlebenden Larven (%) bei unterschiedlich dichter Besiedlung. Hierfür wurden 1-10 frisch geschlüpfte Eilarven auf jeweils einen Apfel gesetzt und deren Überlebensrate nach 3 Wochen ausgewertet. SD = Standardabweichung, n = Stichprobenumfang

Anzahl Larven pro Apfel	Überlebende (%) ± SD	n
10	46 ± 14	14
5	56 ± 17	16
3	62 ± 28	21
2	80 ± 28	15
1	81 ± 40	21

Die Versuche zum Einfluss der Virusverteilung wurden mit reifen Äpfeln der Sorte 'Elstar' durchgeführt und zeigten, dass punktuell aufgetragenes Virus nur eine vernachlässigbare Mortalität hervorruft (Abb. 3.3), die sich nicht von den unbehandelten Kontrollen unterscheidet (Dunnett's Test, $p < 0,05$). Die kleine Virusfläche hatte insbesondere bei der höchsten Konzentration tendenziell eine etwas höhere Mortalitätsrate als die Virusflecken, allerdings unterschieden sie sich in keinem Fall signifikant von den Mortalitätsraten bei denen das Virus punktförmig aufgetragen war (Tukey's Test, $p < 0,05$). Wie erwartet, war die Mortalitätsrate bei der kompletten Benetzung eindeutig am höchsten. Bei allen Konzentrationen der vollständigen Benetzung ergab sich in der Mortalitätsrate ein signifikanter Unterschied zum punktförmig applizierten Virus und auch den beiden niedrigen Konzentrationen der kleinen Virusfläche. Außerdem stellte sich heraus, dass die Virusmenge bei der kompletten Benetzung einen Einfluß auf die Mortalitätsrate hatte. Im Vergleich zu 4×10^4 OB, verursachten 2×10^8 OB und 1×10^7 OB eine signifikant höhere Mortalität. Tendenziell war dies auch bei der kleinen Virusfläche zu erkennen.

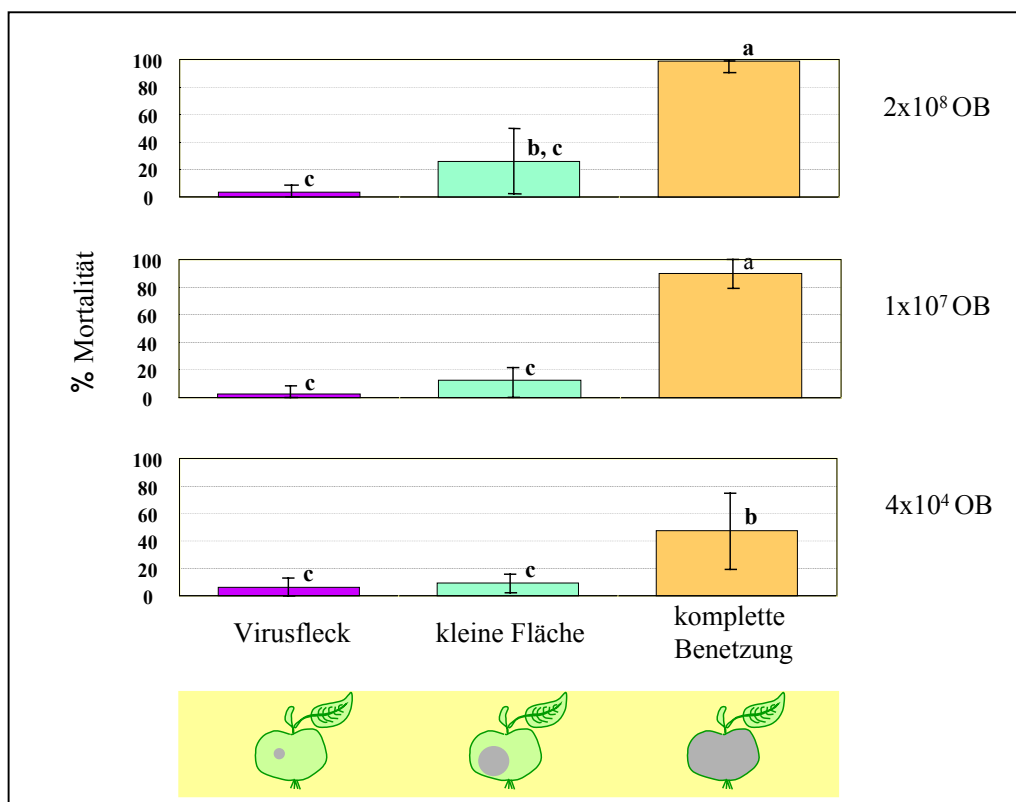


Abb. 3.3: Prozentuale Mortalität (und Standardabweichung) in Bioassays mit oberflächlich aufgetragenem CpGV. In diesem Versuch wurden verschiedene Virusmengen punktuell, auf eine 7 cm^2 Fläche oder auf die gesamte Apfeloberfläche aufgetragen. Die Mortalitätsraten wurden gegen eine unbehandelte Kontrolle nach Abbott (1925) korrigiert und einer Varianzanalyse unterworfen. Gleiche Buchstaben unterscheiden sich bei einer Wahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ (Tukey's Test) nicht voneinander; $n=20$ je Versuchsglied; 4 Wiederholungen; mittlere Überlebensrate der unbehandelten Kontrolle = $94 \pm 5\%$.

3.3.2 Experimentelle Infektionsrate: Lage des Virusflecks

Um eine mögliche Abhängigkeit zwischen der Position eines Virusflecks (bzw. einer toten Larve) und der Infektionsrate zu prüfen, wurde das Virus in der Nähe des Stielansatzes punktuell aufgetragen. Für einen Vergleich der Mortalitätsraten, die durch unterschiedliche Positionen der Virusflecken hervorgerufen wurden, wurde der vorangegangene Versuch in die Auswertung mit einbezogen. Die Ergebnisse sind in Abb. 3.4 dargestellt und zeigen, dass eine starke Abhängigkeit zwischen der Position des Virusflecks und der Mortalitätsrate festzustellen war. Larven auf Äpfeln bei denen sich das Virus in der Stielgrube befand, hatten eine durchschnittliche Mortalität von 34% bis 46%, wobei sich alle drei Konzentrationen signifikant von den beiden höheren Konzentrationen des seitlich applizierten Virus unterschieden ($p < 0,05$; 2-faktorielle Varianzanalyse mit Behandlung und Wiederholung als Faktoren, Tukey's Test für einen multiplen Mittelwertvergleich). Lediglich die Mortalitätsrate aufgrund der niedrigsten Konzentration des seitlich applizierten Virusflecks ließ sich statistisch nicht abgrenzen. Ein Konzentrationseffekt war bei beiden Positionen nicht erkennbar.

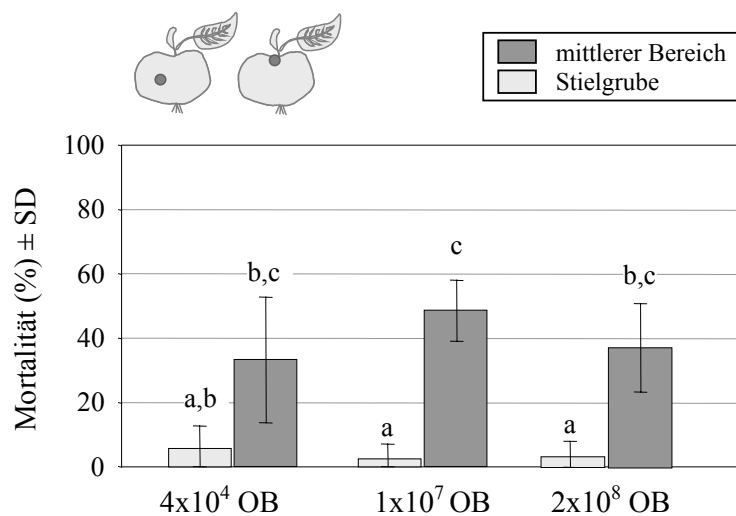


Abb. 3.4: Einfluss der Lage des Virusflecks auf die Mortalität von Eilarven von *C. pomonella*. Die erhaltenen Mortalitätsraten wurden nach Abbott (1925) korrigiert und einer Varianzanalyse unterworfen (2-faktorielle Varianzanalyse mit Behandlung und Wiederholung als Faktoren und Tukey's Test für einen multiplen Mittelwertvergleich). Signifikante Unterschiede werden durch unterschiedliche Buchstaben gekennzeichnet ($p < 0,05$). $n=18-20$ je Versuchsglied; 3-4 Wiederholungen; mittlere Überlebensrate der unbehandelten Kontrolle, die parallel zu der CpGV-Stielgruben-Applikation durchgeführt wurde, war $84 \pm 9\%$. SD = Standardabweichung.

3.3.3 Experimentelle Infektionsrate: Larvenkadaver als Inokulum

In einem natürlicheren Versuchsansatz dienten virustote Larven, sogenannte *seeder* Larven, als Inokulum für die später aufgesetzten *tracer* Larven. Im Gegensatz zu den bisherigen Versuchen befand sich das Virus bei diesem Ansatz nicht unmittelbar an der Oberfläche, da sich die Larven noch bis zu ihrem Tod in den Apfel fraßen. Der Versuch wurde in zwei Versuchsgruppen mit ein oder drei infizierten Larven, die mit einer hohen oder niedrigen Virusdosis infiziert worden waren, gegliedert. Je nach Anzahl der primär infizierten *seeder* Larven, schwankte die Mortalität der Sekundärinfizierten *tracers* zwischen 40-75% (Abb. 3.5). Die Inokulationsdosis der *seeder* Larven hatte statistisch keine Auswirkung auf die Infektionsrate der *tracer* Larven ($p < 0,05$; Abb. 3.5), was zum Ausdruck bringt, dass die Menge an Virusnachkommen für die Infektionswahrscheinlichkeit unerheblich ist.

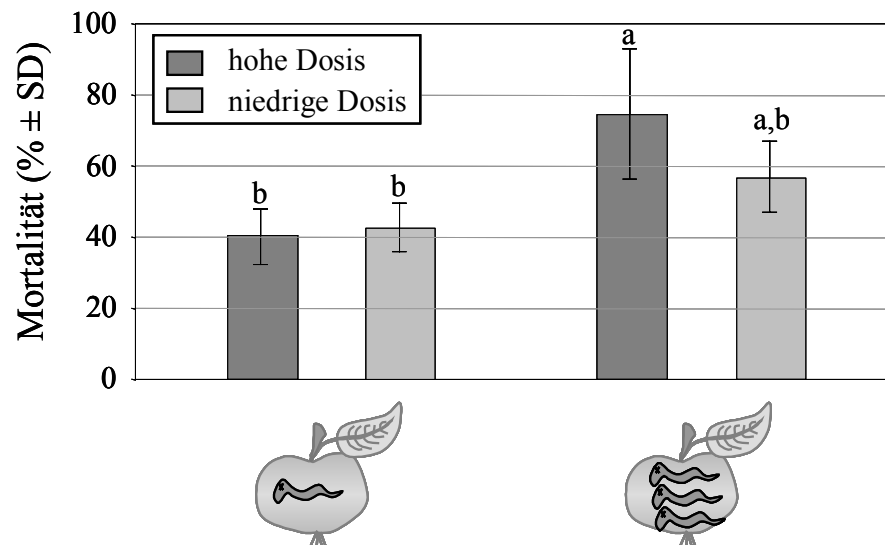


Abb. 3.5: Horizontale Transmission bzw. Mortalität der *tracer* Larven auf losen Äpfeln in Abhängigkeit der unterschiedlichen Infektionsdosen und der Anzahl an primär infizierten *seeder* Larven. Die Prozent Mortalitäten wurden nach Abbott (1925) gegen eine unbehandelte Kontrolle korrigiert und einer Varianzanalyse unterworfen (2-faktorielle Varianzanalyse mit Behandlung und Wiederholung als Faktoren und Tukey's Test für einen multiplen Mittelwertvergleich). Signifikante Unterschiede werden durch unterschiedliche Buchstaben gekennzeichnet ($p < 0,05$, Tukey's Test). $n=20$ je Versuchsglied; 4 Wiederholungen; mittlere Überlebensrate der unbehandelten Kontrolle = 91 ± 8 % (5000 OB Inokulationsdosis) und 84 ± 9 % (150 OB Inokulationsdosis). Verwendet wurden Äpfel der Sorte 'Braeburn' (alle 4 Wdh. bei einer Kadaverinfektionsdosis von 5000 OB sowie eine Wdh. bei einer Kadaverinfektionsdosis von 150 OB) und HER123T-Äpfel (3 Wdh. bei einer Kadaverinfektionsdosis von 150 OB). Die erwartete Anzahl an Virusnachkommen bei einer Inokulationsdosis von 5000 OB ist $2,2 \times 10^6$ OB bzw $3,3 \times 10^8$ OB bei einer Inokulationsdosis von 100 OB. SD = Standardabweichung.

3.3.4 Einbohrstellenpräferenz

In allen bisher beschriebenen Versuchen an losen Äpfeln wurden die Orte der Einbohrstellen der Larven notiert. Hierfür wurde ein Apfel in fünf Bereiche unterteilt, die in Abb. 3.6 beschrieben sind. Abb. 3.7 und Tab. 3.2 zeigen, dass die Häufigkeitsverteilung der Fraßstellen nicht mit dem jeweiligen Flächenanteil der Apfeloberfläche korrelierte. Vielmehr hatten die Larven bevorzugte Fraßstellen. Obwohl bezüglich der Fraßstellenpräferenz zum Teil deutliche Unterschiede zwischen den vier verwendeten Sorten bestanden, fällt auf, dass verhältnismäßig viele Einbohrungen an Stiel und Kelch waren, beides relativ kleine und begrenzte Flächen. Besonders die Stielgrube, die weniger als 1% der Oberfläche des Apfels einnimmt, war bei allen Sorten der Ort mit der anteilig höchsten Präferenz. Hier fraßen je nach Sorte 25 - 63% der Larven an (Tab. 3.2)

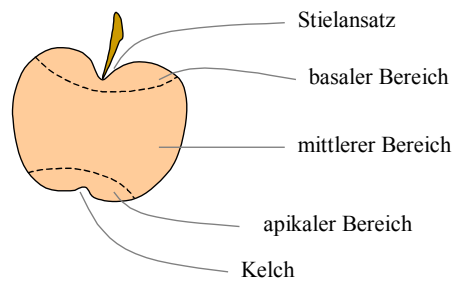


Abb. 3.6: Unterteilung der Apfeloberfläche in fünf ungleich große Bereiche zur Bonitierung der Einbohrstellen der *C. pomonella* Larven.

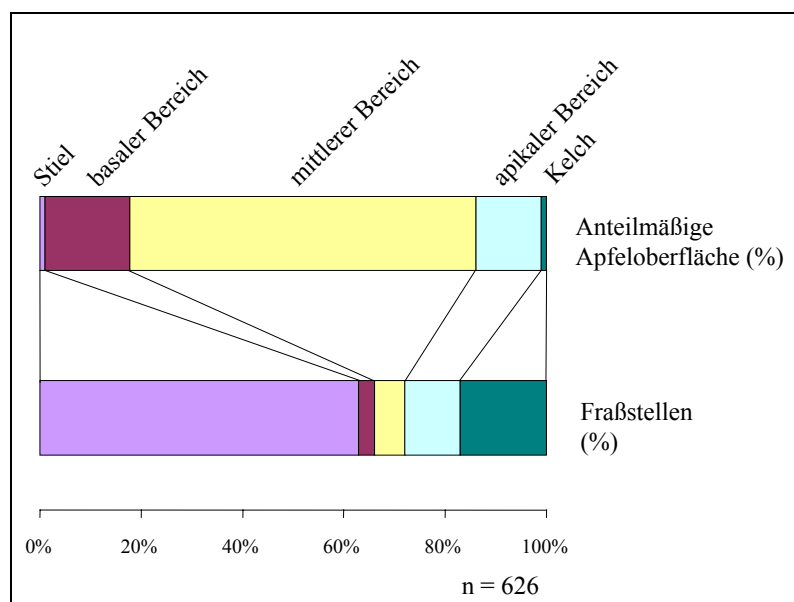


Abb. 3.7: Fraßstellenanteil (%) im Vergleich zu der dazugehörigen anteilmäßigen Apfeloberfläche. Dargestellt am Beispiel der Sorte ‚Elstar‘.

Tab. 3.2: Fraßstellenanteil (%) im Vergleich zu der dazugehörigen anteilmäßigen Apfeloberfläche. Die bevorzugten Fraßorte unterscheiden sich bei verschiedenen Sorten.

Fraßort	Flächenanteil (%)	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

3.4 Diskussion

Für die horizontale Transmission ist es notwendig, dass eine nicht infizierte Larve auf einen virösen Larvenkadaver trifft und sich infiziert. Dies scheint zunächst unwahrscheinlich, da sich bekanntlich meist nur eine *C. pomonella* Larve pro Apfel entwickelt. Allerdings wurde auch beobachtet, dass die weiblichen Falter Eier auf bereits besetzten Äpfeln ablegten (Washburn, 1893, Tab. 1.8) und sich gelegentlich ebenso zwei oder drei Larven pro Apfel entwickelten (z.B. Garlick, 1948; siehe auch Tab. 1.9). Wahrscheinlich ist die Möglichkeit, dass ein weiteres Ei auf einem Apfel abgelegt wird, auf dem sich der Larvenkadaver einer jungen Larve mit nur wenig Schaden am Apfel befindet. Unterstützt wird diese Annahme durch die Tatsache, dass infestierete Äpfel in den ersten Tagen größere Mengen an flüchtigen Substanzen, unter anderem auch das Terpen α -Farnesen, absondern als gesunde Äpfel (Hern & Dorn, 2001) und insbesondere dieses α -Farnesen die weiblichen Falter zur Eiablage stimuliert und auch frischgeschlüpfte L1-Larven anlockt (Wearing & Hutchins, 1973; Landolt *et al.*, 2000). Deshalb gibt es im Freiland, trotz der gängigen Beobachtung von nur einer Larve im älteren Stadium je Apfel, ausreichend Voraussetzungen, die einen Versuchsansatz mit zwei Larven bzw. einem Larvenkadaver oder Virusfleck und einer gesunden Larve je Apfel rechtfertigen.

In Modellexperimenten mit appliziertem CpGV, in denen zunächst der Einfluss von Position, Flächen- und Mengenausmaß des Inokulums auf die Mortalität der Larven getestet wurde, stellte sich heraus, dass die Position des Inokulums wichtigstes Kriterium für eine erfolgreiche Infektion waren. Flächen- und Mengenausmaß spielten hierbei nur eine untergeordnete Rolle. Ein Virusfleck entsprechend der produzierten Virusmenge einer

Eilarve, der seitlich auf den Apfel appliziert wurde, rief bei den aufgesetzten Apfelwicklerlarven lediglich eine geringe Mortalität von 3 - 6% hervor, während die Mortalität bei einem Virusfleck in der Stielgrube auf 34 - 46% stieg. Aus der im Modellsystem beobachteten Fraßstellenpräferenz der *C. pomonella*-Larven (siehe Kap. 3.3.4) konnte *a posteriori* die Hypothese aufgestellt werden, dass die Nichtgleichverteilung der bevorzugten Fraßstellen am Apfel die Wahrscheinlichkeit möglicher Kontakte zwischen Larven und simulierten Larvenkadavern auf der Apfeloberfläche beeinflusst. Denn für die Wahrscheinlichkeit des Zusammentreffens 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 Aufenthaltshäufigkeit über die Apfeloberfläche gleich verteilt oder aufgrund biologischer Präferenzen an bestimmten Stellen, wie z.B. den Stielansatz, besonders hoch ist.

Auch andere Autoren erwähnen eine Einbohrstellenpräferenz in Stielgrube und Kelch für *C. pomonella* Larven im Freiland. 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) stellte fest, dass die Fraßstellen-Präferenz mit der Apfelsorte, den Witterungsbedingungen und möglicherweise noch weiteren Faktoren zusammenhängt. Außerdem wurde in den vorliegenden 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 Hall (1929) und Audemard (1976) überein, nach denen sich Larven auch häufig an Berührungspunkten zwischen zwei Äpfeln oder Blatt und Apfel in den Apfel bohrten. Obwohl ein geringer Teil der Fraßstellen im apikalen Bereich ein Artefakt der durchgeführten Modellversuche darstellen könnte, wurden sie nicht weiter berücksichtigt, da für den Modellversuch die Fraßstellen am Stielansatz die größte Bedeutung hatte. Zudem wurde in einem Vergleich zwischen hängenden und aufliegenden Äpfeln kein Unterschied in dem Anteil der Fraßstellen im apikalen Bereich festgestellt (Dr. D. Winstanley, pers. Mitt.). Die Präferenz von Stielgrube, Kelch und Berührungspunkten bietet mit ihren sehr kleinen, begrenzten Flächen eine relativ hohe Wahrscheinlichkeit, dass an diesen Stellen zwei Larven aufeinander treffen.

Anhand der beobachteten Fraßstellenpräferenz und dem Einfluss der Position des Inokulums auf die Mortalitätsrate wurde deutlich, dass die Wahrscheinlichkeit relativ groß war, dass sich zwei Larven am gleichen Ort in den Apfel bohrten. Unter der Voraussetzung, dass die virösen

Larven in der Nähe ihres Bohrlochs sterben, könnte die beobachtete Fraßstellenpräferenz 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. Das *seeder / tracer* Experiment bestätigte, dass sich eine gesunde Larve zu 40% an einem auf dem gleichen Apfel befindlichen virösen Larvenkadaver infizieren kann. Die hohe Effizienz der horizontalen Transmission in diesem Versuch könnte damit zusammenhängen, dass sich die Larven nicht ausschließlich beim Einbohren infizierten. Ballard *et al.* (2000) beobachteten, dass *C. pomonella* Larven sich infizierten, nachdem sie einige Minuten über ein mit CpGV behandeltes Blattstück liefen. Möglicherweise infizierten sie sich in diesem Fall über Naschfraß oder nahmen die anhaftenden OB später peroral auf. Außerdem könnte Kannibalismus, der in verschiedenen Insektengattungen beobachtet wurde (Watanabe, 1987) und auch für *C. pomonella* dokumentiert wurde (Putman, 1963), erheblich zu einer Infektionsübertragung beitragen.

Die Versuche mit appliziertem CpGV-Inokulum sowie die *seeder / tracer* Experimente haben außerdem gezeigt, dass die Infektionswahrscheinlichkeit bei punktuell vorkommenden Virus unabhängig von der Virusmenge ist. Kadaver mit einer erwarteten ~100fach höheren Virusausbeute riefen keine höhere Mortalität bei den *tracer* Larven hervor. Auch Hails *et al.* (2002) konnten in einem Freilandexperiment mit AcMNPV und zwei Kohlschädlingen keine veränderte Mortalitätsrate nachweisen, wenn Kadaver mit unterschiedlich großer Virusausbeute als Inokulum dienten. Die Beobachtung, dass bei einer über Larvenkadaver vermittelten horizontalen Transmission die Virusmenge in den Kadavern keine Relevanz hatte, deutet auf eine untergeordnete Rolle der UV-Inaktivierung der Viren für die horizontale Transmission hin. Erklären lässt sich dies dadurch, dass ein Larvenkadaver bis zu $3,5 \times 10^8$ (Kap. 2.3.3), also extrem große Mengen an Virus in einem kleinen Volumen produziert. Selbst wenn diese Mengen durch UV-Inaktivierung auf ein hundertstel oder tausendstel reduziert würden, wären noch immer 10^5 bis 10^6 Viren vorhanden, also das $10^4 - 10^6$ fache einer mittleren Letaldosis bei Eilarven (Kap. 2.3.2.1, Tab. 2.2 und Tab. 2.3). Die Versuchsergebnisse haben deutlich gemacht, dass entscheidend ist, ob eine Larve auf das Virusinokulum trifft. Die Menge ist dabei unwesentlich.

Die beschriebenen Laborversuche haben Szenarien dargestellt, unter denen eine horizontale Transmission im System CpGV/*Cydia pomonella* stattfinden kann. Sie haben gezeigt, dass auch bei einem minierenden Fraßschädling, wie *C. pomonella*, ein Kontakt zwischen Larven

möglich ist. Dieser Kontakt, durch den das Virus bei nur zwei Larven pro Apfel effizient übertragen wurde, wurde durch eine eindeutige Präferenz der Einbohrstellen ermöglicht.

4 FREILANDVERSUCH ZUR HORIZONTALEN TRANSMISSION, INFEKTION SPÄTER LARVENSTADIEN UND VIRUS-INAKTIVIERUNG

4.1 Einleitung

Die Befallsreduktion aufgrund regelmäßiger CpGV-Behandlungen ist umfangreich beschrieben (Keller, 1973; Huber & Dickler, 1975; Sheppard & Stairs, 1976; Glen & Payne, 1984; Charmillot, 1989). Die Wirksamkeit des CpGV wird hauptsächlich aufgrund rascher Inaktivierung durch Sonnenlicht eingeschränkt, weshalb CpGV-Präparate in Abständen von ca. 2 Wochen appliziert werden. Für die Inaktivierung ist im Wesentlichen die UV-Strahlung, die 1% der Gesamtstrahlung ausmacht, verantwortlich (Jaques, 1977; Krieg *et al.*, 1981). Eine thermische Inaktivierung findet erst ab 70°C statt (Fritsch & Huber, 1985). In Freilandversuchen konnten Fritsch & Huber (1989) eine Halbwertszeit von 2 Tagen bzw. 14,4 Sonnenstunden bei sonniger Witterung und eine Halbwertszeit von etwa einer Woche bzw. 20 Sonnenstunden bei bewölktem Himmel feststellen. Eine CpGV-Applikation zielt auf die frischgeschlüpften Eilarven des Apfelwicklers (Jaques *et al.*, 1981). Die meisten Larven verbringen mindestens 10 min auf den Blättern, ehe sie die Frucht erreichen (Glen & Clark, 1985). Nachdem sie wenige Minuten bis zwei Stunden eine geeignete Einbohrstelle suchen, dauert es weitere ein bis zweieinhalb Stunden, bis sich die Larven durch die Schale gefressen haben (Geier, 1963). Das Zeitfenster für eine erfolgreiche Bekämpfung ist daher sehr klein, obwohl sich *C. pomonella* Eilarven auch beim Naschfraß vor dem Einbohren infizieren können (Ballard *et al.*, 2000).

In jüngerer Zeit wurde beobachtet, dass CpGV als Bio-Insektizid auch bei relativ unregelmäßiger Spritzung geringerer Dosen erstaunlich effektiv ist (Kienzle *et al.*, 2003a). Die beschriebenen Modellexperimente an losen Äpfeln (Kap. 3) deuten darauf hin, dass die horizontale Transmission eine zusätzliche Wirksamkeitskomponente des CpGV darstellen könnte. Möglicherweise lässt sich die Effektivität des CpGV auch durch bisher noch nicht bekannte Infektionsmechanismen erklären. 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 unter Feldbedingungen 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. Aufgrund von Laborversuchen (siehe Kap. 3) wurde die Hypothese aufgestellt, dass sich viele Larven in der Stielgrube infizierten und das Virus dort möglicherweise weniger der UV-Strahlung ausgesetzt war und dadurch länger aktiv blieb. Die Virusinaktivierung von CpGV in der Stielgrube wurde deshalb mit ganzflächig appliziertem CpGV verglichen. Als letztes Ziel sollten die erhobenen Daten dieses Freilandversuches zu einer vorläufigen Modellverifizierung (Kap. 6) herangezogen werden.

4.2 Material und Methoden

4.2.1 Virus und Insekt

Für die Versuche wurde das im Handel erhältliche CpGV-Insektizid, Granupom® (Fa. Probis) verwendet, das eine formulierte Form des CpGV-M darstellt.

Die Insekteneier bzw. Larven für die Freilandversuche wurden aus einer kommerziellen Zucht (Fa. Biocontrol, Schweiz) bezogen. Die Eier wurden nicht mit Formaldehyddampf behandelt, aber wie vorher beschrieben bei 26°C und 70% relativer Luftfeuchte 2 – 3 Tage bis zum Schlupf inkubiert.

4.2.2 Beschreibung der Versuchsparzelle

Der Freilandversuch wurde im Sommer 2001 in der Versuchsanlage „Nussacker“ der SLFA-Neustadt durchgeführt. Die 1997 angelegte Versuchsparzelle mit Bäumen der Sorte 'Braeburn' auf einer M9-Unterlage hatte im vorangegangenen Jahr einen geringen Apfelwicklerbefall von ca. 3%. Die 320 Bäume waren in 5 Reihen von jeweils 64 Bäumen gepflanzt. Im Osten und Westen schlossen Pflanzungen weiterer Apfelsorten an die Versuchsparzelle an, im Norden befanden sich Aprikosenbäume und im Süden ein freies Feld. Die Parzelle wurde in vier Blöcke unterteilt von denen zwei Blöcke (1 und 3) einmalig mit dem handelsüblichen CpGV-Insektizid Granupom® behandelt wurden (siehe Abb. 4.1). Bäume der unbehandelten Blöcke (2 und 4) dienten als Kontrollen. In den Behandlungs- oder Kontrollgruppen wurden je 8 Bäume zufällig in den entsprechenden Blöcken ausgewählt (die einzelnen Bäume sind in Abb. 4.1 dargestellt) und später unterschiedlich mit Larven bestückt.

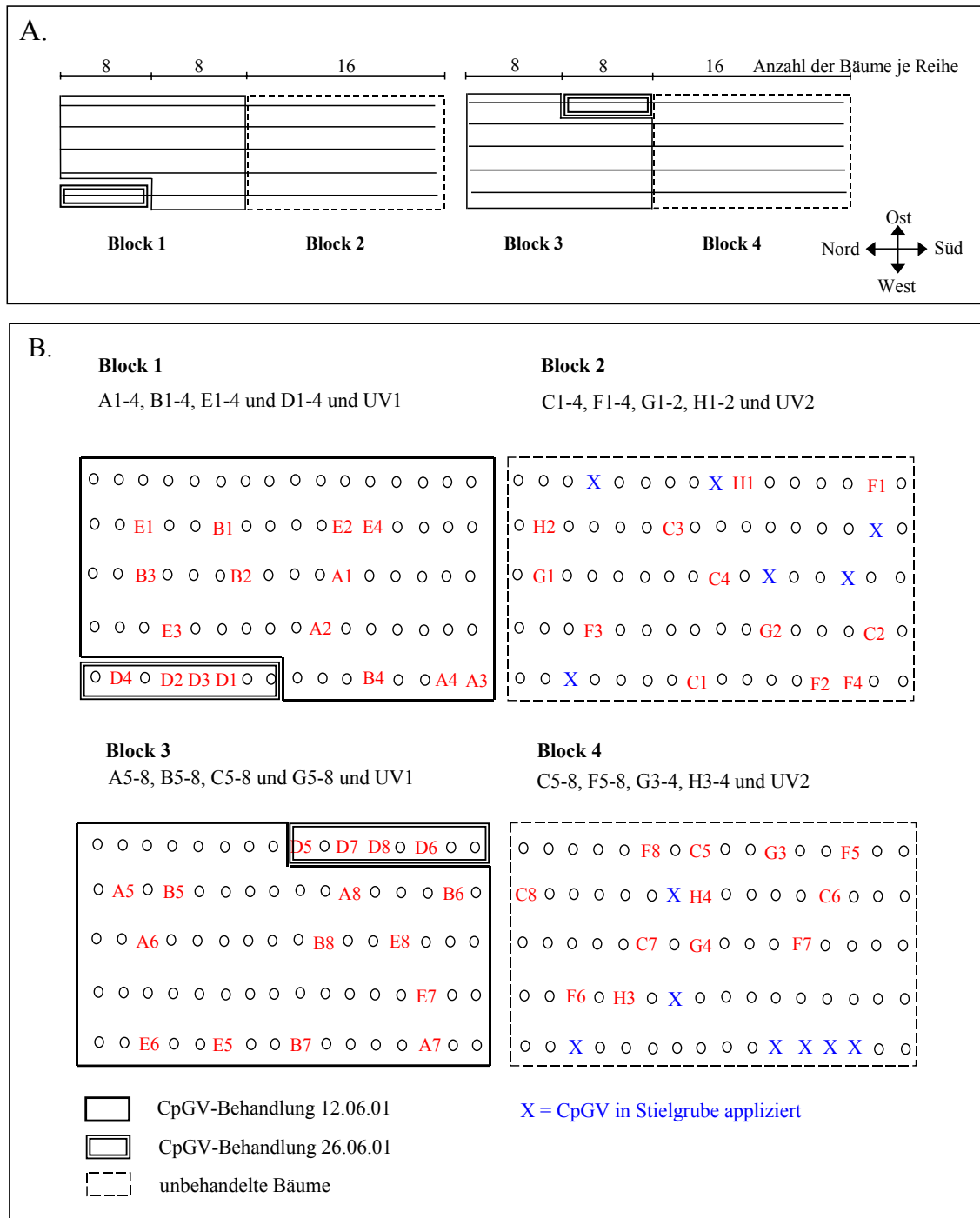


Abb. 4.1: A. Übersicht des Versuchsfeldes im „Nussacker“ der SLFA, Neustadt/Weinstr. B. Lageplan der einzelnen Bäume in der Versuchsparzelle. Das Versuchsfeld bestand aus 5 Reihen mit je 64 Apfelbäumen der Sorte 'Braeburn' (M9 Unterlage, 1997). Das Feld wurde in 4 Blöcke unterteilt, in denen die Bäume der jeweiligen Gruppen (A-H) zufällig ausgewählt wurden. Blöcke 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 (Schlachtner Druckluft und Holder Gebläse). Blöcke 2 und 4 blieben unbehandelt. Die 16 ausgesparten Bäume in Blöcken 1 und 3 wurden am 26.06.01 mit CpGV behandelt. Bei den mit X markierten Bäumen, wurde für den Versuch zur Virusinaktivierung (UV 2) CpGV in die Stielgrube appliziert. Weitere Erklärungen befinden sich im Text.

Im Verlauf des Versuchs wurden die Bäume außerdem gegen Mehltau, Schorf und Läuse behandelt (Tab. 4.1). Da auf andere Insektizide verzichtet wurde, wurde der natürlich vorkommende Apfelwicklerbefall weitestgehend durch die Verwirrungstechnik unterdrückt. Für die Verwirrungstechnik, die die Paarung der Apfelwickler unterbindet, wurden Pheromondispenser mit dem Lockstoff der Apfelwicklerweibchen (RAK 3, BASF) in regelmäßigen Abständen ausgebracht (300-500 Ampullen pro Hektar).

Tab. 4.1: Routinemäßig durchgeführte Spritzungen in der Versuchsparzelle.

Datum		Spritzmittel
26.03.01	Schorf/Mehltau	Delan 0,05%, Scala 0,075%, Schwefel 0,5%
09.04.01		Dithane Ultra 0,2%, Chorus 0,03%
17.04.01		Dithane 0,2%
27.04.01		Delan 0,05%
08.05.01	Blattläuse	Primor 0,05%
15.05.01	Schorf/Mehltau	Discus 0,0125%, Malvin 0,12%
	Läuse	Confidor 0,01%
29.05.01	Schorf/Mehltau	Discus 0,0125%, Vision 0,1%
13.06.01		Discus 0,0125%, Bayfidan 0,05%
29.06.01		Dithane 0,2%, Saprol 0,15%
17.07.01		Discus 0,0125%, Bayfidan 0,05%
10.08.01		Malvin 0,12%, Bayfidan 0,05%, Kiron 0,15%
24.09.01		Euparen 0,15%

4.2.3 Versuchsdurchführung

Der Freilandversuch bestand aus zwei Telexperimenten. Mit dem ersten Telexperiment (Exp. 1) wurde die horizontale Transmission im Freiland untersucht und mit dem zweiten (Exp. 2) die Möglichkeit einer Infektion älterer Larvenstadien, die sich bereits in den Apfel gefressen hatten. Parallel wurde außerdem die UV-Inaktivierung untersucht. Der zeitliche Ablauf des Versuchs ist in Tab. 4.2 schematisch dargestellt. Am 12. Juni wurden zwei Blöcke (1 und 3) mit Ausnahme von acht Bäumen mit $1,3 \times 10^{13}$ OB / ha behandelt (Granupom) (Aufwandmenge: 520 l / ha). Die acht ausgesparten Bäume der beiden Blocks wurden am 26. Juni ebenfalls einmalig mit der gleichen Konzentration des CpGV-Präparats behandelt. Appliziert wurde mit dem Sprühgerät Schlachtner Druckluft und Holder Gebläse mit fünf Düsen des Typs DG 8003 VS und einer Fahrtgeschwindigkeit von 1,0 m/s am 12. Juni bzw. 0,5 m/s am 26. Juni. Eine Trennwand gewährleistete, dass Bäume in benachbarten Reihen nicht behandelt wurden. Dies war besonders bei den acht ausgesparten Bäumen der Blöcke 1 und 3 wichtig, deren Behandlung erst später stattfand.

Am Tag nach der ersten CpGV-Behandlung wurden über 2000 Apfelwicklereilarven mit Pinseln auf die Äpfel gebracht. Dabei wurde auf jeden Apfel eines Baumes eine Eilarve gesetzt. Bestückte Äpfel wurden mit einem kleinen farbigen Aufkleber markiert (Abb. 4.2). Über 1600 Larven der zweiten Larvencharge wurden in gleicher Weise nach 27 Tagen (entsprach 254 Sonnenstunden) auf die Äpfel gesetzt. Das Wetter während des Versuchs war relativ warm und trocken (Abb. 4.4). Trockene



Abb. 4.2: Frisch applizierte Eilarve; ca. 1,5mal vergrößert.

Witterung an den Tagen der Larvenapplikation bedeutete einerseits, dass das applizierte Virus nicht abgewaschen wurde und andererseits, dass die Larven gute Bedingungen hatten sich zu etablieren. Die Erntezeitpunkte wurden so gewählt, dass sich der überwiegende Teil der überlebenden Larven im L5-Stadium befand. Die Äpfel wurden bei der Ernte einzeln in Plastiktüten eingeschlossen, um zu verhindern, dass Larven entkommen konnten. Sie wurden bis zur Auswertung bei 4°C gelagert. Um auch Larven zu erfassen, die sich schneller entwickelt hatten, wurden eine Woche vor den Ernteterminen Wellpappringe an den Baumstämmen angebracht und 5 - 7 Tage 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 (> 4 mm, aber nicht bis zum Kern) und das Vordringen zum Kerngehäuse (Kernfraß). Bei Oberflächen- und etwas tieferem Fraß wurde außerdem der Ort der Einbohrstelle notiert. Hierfür wurde die Klassifizierung entsprechend Abb. 3.6 verwendet. Für die Auswertung der Daten wurden der Anteil überlebender Larven und der Anteil Kernfraß über die Gesamtanzahl aller Äpfel eines Baumes errechnet. Die Bonitur der einzelnen Äpfel wurde in randomisierter Reihenfolge durchgeführt, wobei die Boniturfelder weder Herkunft noch Inhalt der Versuchsglieder kannten.

Experiment 1: Horizontale Transmission

Am Tag nach der CpGV-Applikation wurde die erste Larvencharge auf die Äpfel gesetzt (Tab. 4.2). Die zweite Larvencharge wurde ausgebracht, nachdem die infizierten Larven der ersten Charge gestorben waren und entsprechend dem damaligen Kenntnisstand ausreichend Sonneneinstrahlung geherrscht hatte, um das ursprünglich applizierte CpGV zu 99,996% zu inaktivieren (Fritsch & Huber, 1989). Die zweite Larvencharge sollte sich daher nur an Viren aus Kadavern, nicht jedoch an der ursprünglichen CpGV-Applikation infizieren. Als Kontrollen zu diesem Versuch dienten (1) die Gruppe B zur Überprüfung der tatsächlich

stattgefundenen UV-Inaktivierung, bei der die Restaktivität des CpGV nach vier Wochen bestimmt wurde, (2) die Gruppen C und F, in denen die Überlebensraten bzw. der Schaden der jeweiligen unbehandelten Kontrolllarven bestimmt wurden und (3) Gruppe E, mit der der Schaden durch die behandelte erste Larvencharge abgegrenzt werden konnte.

Tab. 4.2: Schema und Zeitplan zum Aufbau der Freilandversuche. Für die Versuchsglieder (= Gruppen) A, B und E wurden je 4 Bäume in Block 1 und 4 Bäume in Block 3 ausgewählt. Für die Gruppen C und F wurden je 4 Bäume in Block 2 und 4 Bäume in Block 4 ausgewählt. Für die Gruppe D wurden 4 der ursprünglich ausgesparten Bäume in Block 1 und weitere 4 der ursprünglich ausgesparten Bäume in Block 3 ausgewählt. Für die Gruppen G und H wurden jeweils 2 Bäume in Block 2 und weitere 2 Bäume in Block 4 ausgewählt. CpGV=CpGV-Applikation; L1=Eilarvenapplikation; die für Exp. 1 bzw. Exp. 2 notwendigen Versuchsglieder sind mit X markiert.

Datum	Gruppe							
	A	B	C	D	E	F	G	H
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
Exp. 1: Horizontale Transmission	X	X	X		X	X		X
Exp. 2: Infektion älterer Stadien				X	X	X	X	
Bäume je Gruppe	8	8	8	8	8	8	4	4
Äpfel je Baum ± SD	71,5±13,7	74,3±24,5	62,1±18,0	70,5±14,9	65,1±11,6	68,3±17,3	47,0±3,8	38,5±3,7

Virusinaktivierung

Als zusätzliche Referenz für den Versuch zur horizontalen Transmission und um zu testen, ob das CpGV in der Stielgrube vor UV-Strahlung geschützt war, wurde die Inaktivierungsrate von ganzflächig bzw. in der Stielgrube appliziertem CpGV bestimmt. Hierfür wurden am 12.06.01 bei 13 Bäumen der unbehandelten Kontrollparzellen (Block 2 und 4, Abb. 4.1) 2 µl verdünntes Granupom® (Konzentration 2×10^4 OB/µl) punktuell in die Stielgrube aufgetragen (CpGV-Stielapplikation). Um die verbleibende Aktivität des CpGV in Bioassays zu bestimmen, wurden nach der CpGV-Stielapplikation in Blöcken 2 und 4 und der einmaligen CpGV-Normalapplikation am 12.06.01 in Blöcken 1 und 3, jeweils 50 Äpfel der beiden CpGV applizierten Gruppen und 50 Äpfel der unbehandelten Kontrolle zu zehn unterschiedlichen Zeitpunkten geerntet (Tab. 4.3).

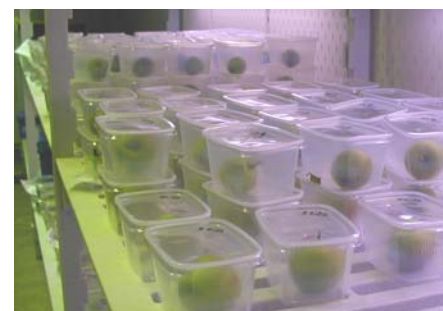


Abb. 4.3: Inkubation des Bioassays.

Die Äpfel wurden ausschließlich von Bäumen entfernt, die weder für Exp. 1 noch für Exp. 2 verwendet wurden. Bis zur Durchführung des Bioassays wurden die Äpfel bei 4°C gelagert. Für den Bioassay wurde je eine Eilarve auf einen Apfel in einen verschließbaren Becher gesetzt (Abb. 4.3) und die Mortalität nach drei Wochen bestimmt. Der Test wurde bei 22°C und einer 14 h Licht : 10 h Dunkel Photoperiode durchgeführt.

Tab. 4.3: Übersicht der Termine für die Probenentnahmen zur Bestimmung der UV-Inaktivierung.

Zeitraum nach CpGV-Applikation am 12.06.01			
Datum, Uhrzeit	Σ Tage	Σ Sonnenstunden [h]	Σ Gesamteinstrahlung [kW/m²]
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

Experiment 2: Infektion älterer Larvenstadien

Für diesen Versuch wurden Bäume der Gruppe D, erst nachdem sich die Larven zwei Wochen lang in die Äpfel gefressen hatten, mit CpGV behandelt. Aus eigenen Beobachtungen war bekannt, dass die Larven zu diesem Zeitpunkt ihre Kammer unter der Schale verlassen hatten und sich bereits in Richtung Kerngehäuse bohrten. Die Schadens- und Überlebensrate sollte mit Gruppe E, bei der frischgeschlüpfte L1-Larven mit CpGV behandelt wurden, verglichen werden. Die unbehandelte Gruppe F diente als Kontrolle für die nicht virusbedingte Mortalität der applizierten Larven. Die relative Überlebensrate wurde berechnet, indem die Anzahl der überlebenden Larven durch die Gesamtzahl der Äpfel dividiert wurde.

4.2.4 Statistische Auswertung

Für die Auswertung der horizontalen Transmission wurden die Daten einer Arcsinus- und Wurzeltransformation unterzogen. Für die Auswertung der Infektion später Larvenstadien wurden sie Log-transformiert. Mittelwerte wurden in einer Varianzanalyse unterschieden (GLM procedure, SAS Institute, 2001) und der multiple Mittelwertvergleich mittels Tukey's

Studentized Range Test durchgeführt. Mittelwerte mit dem gleichen Buchstaben unterscheiden sich bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ statistisch nicht von einander. Für die Bestimmung der Inaktivierungsrate wurde eine exponentielle Regression der nach Abbott (1925) korrigierten Mortalitäten durchgeführt bei der die Parameter b_0 und b_1 für $y = b_0 \cdot \exp(-b_1 \cdot x)$ geschätzt wurden (StatSoft Inc., 1999).

4.3 Ergebnisse

Der Freilandversuch zur Untersuchung der horizontalen Transmission des CpGV und die mögliche Infektion späterer Larvenstadien wurde vom 13.06.01 bis 10.08.01 durchgeführt. In dieser Zeit herrschten überwiegend trockene, sommerliche Wetterbedingungen (Abb. 4.4). Der bonitierte Schaden und die beim Aufschneiden der Äpfel erhaltene Überlebensrate der Larven sind in Tab. 4.4 dargestellt. Beim Aufschneiden wurden häufig Ameisen in tiefen Aushöhlungen (Kernfraß) der Äpfel gefunden. Diese Aushöhlungen sind mit anderen in der Rubrik *Kernfraß ohne Larven* (Tab. 4.4) repräsentiert. Bei einem Vergleich der Einbohrstellenpräferenz zeigte sich, dass vom bonitierten oberflächlichen Fraß (< 4 mm) sich 36% im Kelch und 3% in der Stielgrube befand. Einundsechzig Prozent verteilten sich auf die restliche Oberfläche des Apfels ($n = 2400$).

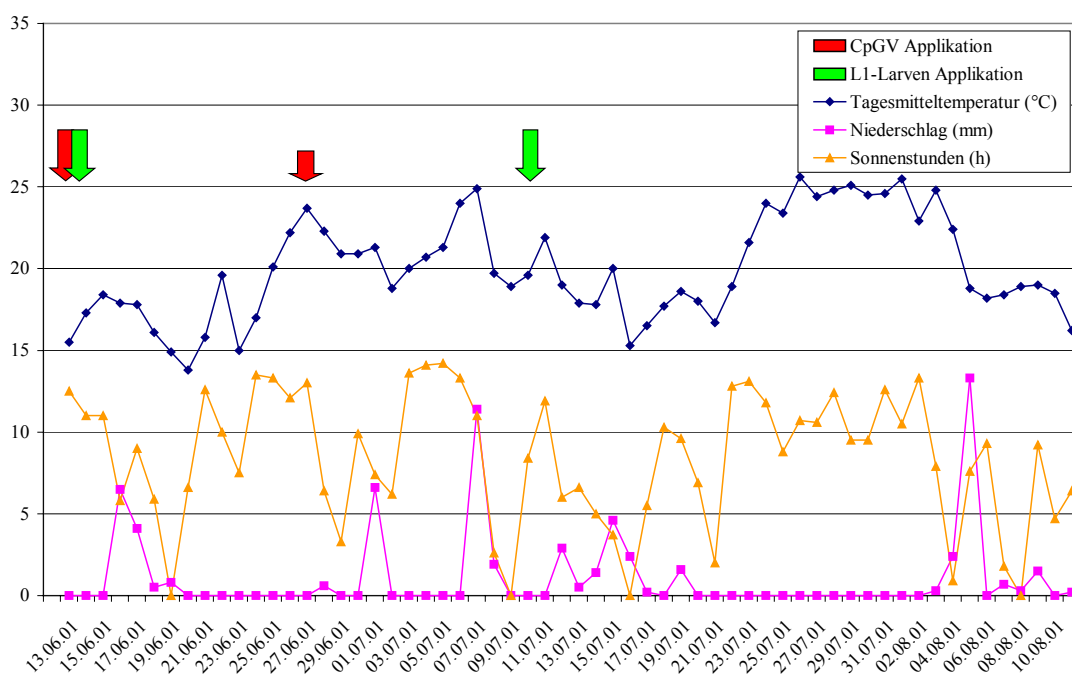


Abb. 4.4: Wetterdaten, CpGV- und Larvenapplikation für den Freilandversuch.

Tab. 4.4: Bonitur des Freilandversuches, angegeben in relativen Werten (%) und deren Standardabweichung, bezogen auf die Gesamtzahl der Äpfel. Oberflächenfraß ist definiert als < 4mm, tieferer Fraß als > 4 mm und Kernfraß als Fraß bis ins Kerngehäuse.

Gruppe	Angefressene Äpfel	Überlebende Larven	Oberflächenfraß	Tieferer Fraß	Kernfraß	Kernfraß ohne Larven	Tote Larven in L3-L5
A	87,1±9,1	15,6±8,2	92,9±21,0*		30,2±13,6	17,8±8,8	0,2±0,6
B	73,5±6,7	18,2±4,7	64,0±10,2*		25,3±5,4	9,9±4,0	0,6±0,9
C	72,3±7,8	23,2±8,9	59,7±6,9*		30,0±10,3	8,7±6,3	1,6±1,5
D	73,5±6,7	7,7±3,3	39,1±12,2	20,0±7,6	18,1±8,0	9,1±4,6	8,6±3,7
E	66,7±11,4	6,8±3,9	50,9±13,1	14,4±8,0	7,9±2,9	3,4±1,9	3,7±3,5
F	64,7±8,7	26,6±8,9	26,0±10,4	11,8±4,1	29,3±9,7	6,9±4,5	3,6±2,0
G	10,8±4,6	1,6±1,1	8,8±6,8	2,2±0,0	1,5±1,9	0,5±1,0	0,5±1,0
H	13,9±6,8	0	13,9±6,8*		0	0	0

* Keine Unterscheidung in Oberflächenfraß und tieferem Fraß.

4.3.1 Natürlich vorkommende Apfelwickler-Population

Um den Befall der natürlich vorkommenden Apfelwicklerpopulation abschätzen zu können, wurden zu beiden Erntezeitpunkten die Äpfel von je vier Bäumen in den Gruppen G und H, denen weder Larven noch CpGV appliziert worden war, geerntet. Zum ersten Erntezeitpunkt konnten 1,6% lebende Larven und 1,5% Kernfraß (n=188 Äpfel) festgestellt werden. Zum zweiten Erntezeitpunkt wurden keine überlebenden Larven und kein Kernfraß beobachtet (n=154 Äpfel). Bezieht man auch den oberflächlichen Schaden mit ein, hatten $12,4 \pm 5,6\%$ der nicht behandelten Äpfel in den Gruppen G und H Zeichen von Apfelwicklerschäden im Vergleich zu $69,9 \pm 8,5\%$ der Äpfel von Bäumen mit applizierten Larven (Gruppen B bis F, da Gruppe A mit 2 Larvenapplikationen mehr beschädigte Äpfel aufwies). Zur weiteren Betrachtung der Ergebnisse wurden hauptsächlich die überlebenden Larven und der Kernfraß herangezogen. Hierbei wurde die Hintergrund-Apfelwicklerpopulation als vernachlässigbar angesehen, da sie mit 1,6% lebenden Larven bzw. 1,5% Kernfraß die Ergebnisse nicht beeinflussen würde.

4.3.2 Horizontale Transmission

In Anlehnung an die Laborversuche (Kap. 3) sollte in diesem Versuch in der Gruppe A die Übertragung einer Infektion der ersten Larvencharge auf die zweite untersucht werden. Allerdings wurden wegen des Versuchsumfanges für die erste Larvencharge keine primär infizierten *seeder* Larven verwendet, sondern Larven, die sich an zuvor appliziertem CpGV hätten infizieren sollen.

Da der Schaden in der Gruppe A bedingt durch die zwei Larvenapplikationen höher ausfiel als in den anderen Gruppen, konnten nicht ausschließlich die angefressenen Äpfel zur Bestimmung der Überlebensraten herangezogen werden. Die relativen Überlebensraten wurden deshalb dadurch bestimmt, indem die Anzahl der überlebenden Larven durch die Anzahl aller Äpfel eines Baumes geteilt wurde. Auf diese Weise wurden die Gruppen A, B und die unbehandelte Kontrolle C miteinander verglichen. Da in den Wellpappringen weder L5-Larven noch Puppen gefunden wurden, wurde die Überlebensrate ausschließlich mit den in den Äpfeln gefundenen Larven berechnet. Wie in Abb. 4.5 dargestellt, waren in der Versuchsgruppe A im Mittel eine geringere Anzahl überlebender Larven zu erkennen verglichen mit Gruppe B sowie der unbehandelten Kontrollgruppe C. Außerdem fand sich im Mittel eine geringere Anzahl überlebender Larven in Gruppe B gegenüber Gruppe C, was darauf hindeutete, dass das applizierte CpGV nicht vollständig inaktiviert worden war. Allerdings konnten die beobachteten Unterschiede in einer Varianzanalyse statistisch nicht abgesichert werden ($p < 0,05$). Der Versuch erlaubt jedoch, 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, denn es konnte anhand der überlebenden Larven verglichen mit der Kontrolle noch ein Wirkungsgrad von 21,6% gemessen werden. Dieser Befund deckt sich nicht mit den Daten von Fritsch & Huber (1989) (siehe auch Kap. 4.1), nach denen 254 h Sonneneinstrahlung eine Restaktivität von lediglich 0,0004% erwarten ließ.
- (2) Der Wirkungsgrad der Gruppe A gegenüber der Kontrollgruppe C lag bei 32,6% und war damit ein Drittel höher als in der Gruppe B, die keine Larvenkadaver aus der ersten Larvencharge hatte.

Die beobachteten Tendenzen wurden anhand von überlebenden Larven beschrieben. Auch beim Kernfraß machte sich die Persistenz vom CpGV bemerkbar (Abb. 4.6). Der Wirkungsgrad des vier Wochen zuvor gespritzten CpGV (Gruppe B) lag bei immerhin 15,8% gegenüber der Gruppe C. Der Schaden der Gruppe A fiel in diesem Fall sehr hoch aus und ließ sich nicht mit dem der Gruppen B und C vergleichen, da hier nicht zwischen dem Schaden durch die erste und die zweite Larvencharge unterschieden werden konnte.

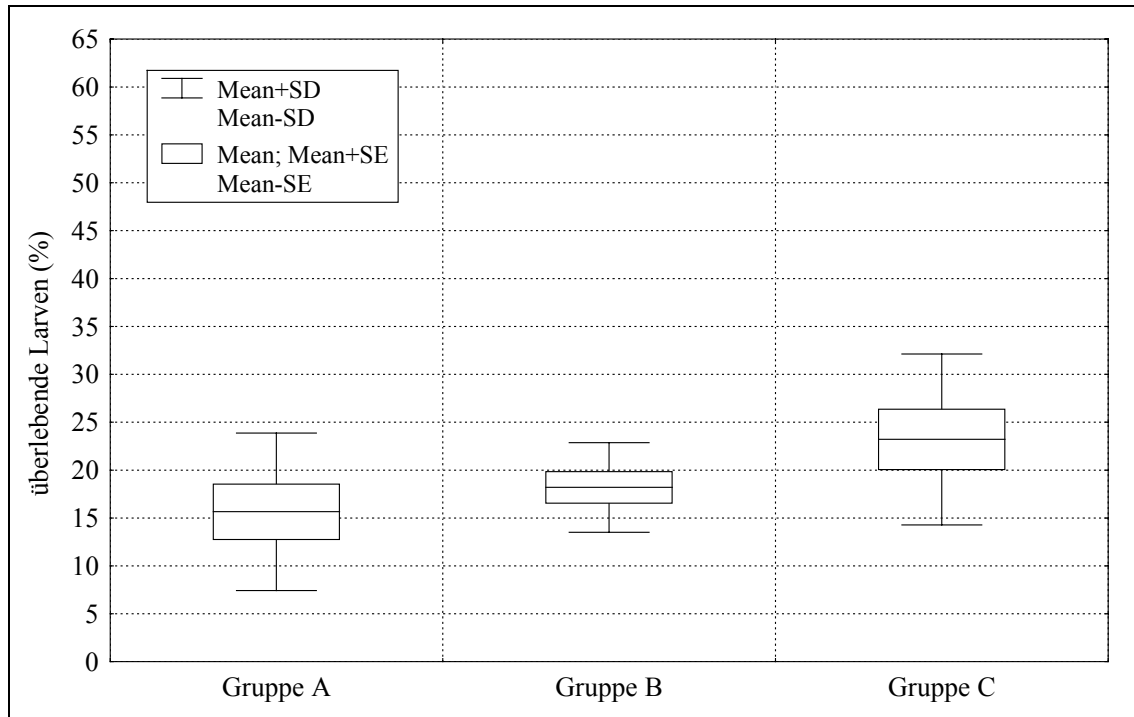


Abb. 4.5: Bestimmung der horizontalen Transmission von CpGV im Freiland. Dargestellt sind die Überlebensraten (%) der Versuchsgruppen A (CpGV Restaktivität und horizontale Transmission), B (CpGV Restaktivität) und C (unbehandelte Kontrolle). Mean = Mittelwert, SE = Standardfehler, SD = Standardabweichung (n=ca. 70 Äpfel; 8 Wdh.).

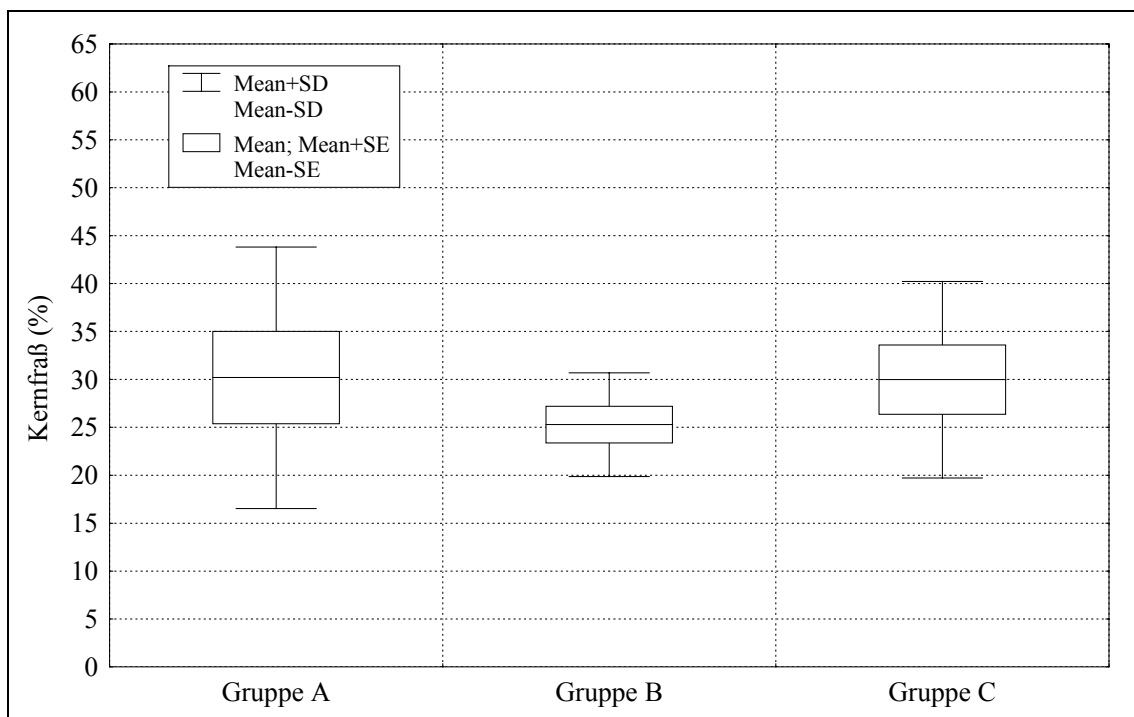


Abb. 4.6: Bestimmung der horizontalen Transmission von CpGV im Freiland. Dargestellt ist der Kernfraß (%) der Versuchsgruppen A (CpGV Restaktivität und horizontale Transmission), B (CpGV Restaktivität) und C (unbehandelte Kontrolle). Mean = Mittelwert, SE = Standardfehler, SD = Standardabweichung (n=ca. 70 Äpfel; 8 Wdh.).

Weiterhin konnte dadurch, dass sich der Schaden der Gruppe A aus dem Schaden zweier Larvenchargen zusammensetzte, auch getestet werden, wie hoch der Schaden in Gruppe A hätte ausfallen müssen, wenn keine horizontale Transmission stattgefunden hätte. Diese Werte konnten anhand des Kernfraßes und des Gesamtschadens (Anteil der angefressenen Äpfel) der Gruppen E und B berechnet werden und mit den tatsächlich beobachteten Werten verglichen werden (Tab. 4.5). Dabei zeigte sich, dass sich die tatsächlichen und geschätzten Werte kaum voneinander unterschieden und der Schaden trotz horizontaler Transmission nicht geringer ausfiel.

Tab. 4.5: Beobachtete und geschätzte Schadensraten (%) mit 95% Konfidenzintervallen für die Gruppe A. Die zu erwartenden Schadensraten wurden ermittelt unter der Annahme, dass keine horizontale Transmission stattgefunden hatte. Die geschätzten Schadensraten wurden mittels Bonferroni-Methode bestimmt. Verwendet wurde folgende Gleichung: Schaden Gruppe A = $1 - (1 - \text{Schaden Gruppe E}) (1 - \text{Schaden Gruppe B})$. Die 95%-Konfidenzintervalle der geschätzten Werte wurden durch Multiplikation der unteren und oberen Grenzen der 97,5%-Konfidenzintervalle der beobachteten Werte für die Gruppen E und B berechnet.

	Beobachtete Schadensrate	Geschätzte Schadensrate
Kernfraß	30,2 (18,8 – 41,6)	31,2 (23,8 – 38,2)
Gesamtschaden (bzw. angefressene Äpfel)	87,1 (79,5 – 94,7)	91,2 (85,1 – 95,7)

4.3.3 Virusinaktivierung

Die Aktivität des einmalig applizierten CpGV wurde gemessen, indem je 50 Äpfel der Gruppen *CpGV-Normalapplikation (ganzflächig)*, *CpGV-Stielapplikation* und *unbehandelte Kontrolle* in unterschiedlichen Abständen nach der Applikation geerntet wurden und im Labor je einer Larve angeboten wurden. Hierbei ließ sich beim ganzflächig applizierten CpGV (Normalapplikation) eine deutliche Aktivitätsabnahme erkennen. Mit CpGV behandelte Äpfel, die nach unterschiedlich langer Sonnenexposition geerntet wurden, riefen eine exponentiell abnehmende Mortalität der anschließend aufgesetzten Larven hervor (Abb. 4.7A). Diese Aktivitätsabnahme kann durch folgende angepasste Gleichung mit einer erklärten Varianz von 89,0% beschrieben werden

$$\% \text{ Mortalität} = 76,1132 \cdot \exp(-0,013291 \cdot \text{Sonnenscheindauer}).$$

Die berechnete Halbwertszeit lag somit bei 52,2 Sonnenstunden und die Inaktivierungsrate bei 0,01. Der achte Erntezeitpunkt (C8) wurde in dieser Berechnung nicht berücksichtigt, da die hohe Mortalität von 29% nach 272 Sonnenstunden als Ausreißer betrachtet wurde.

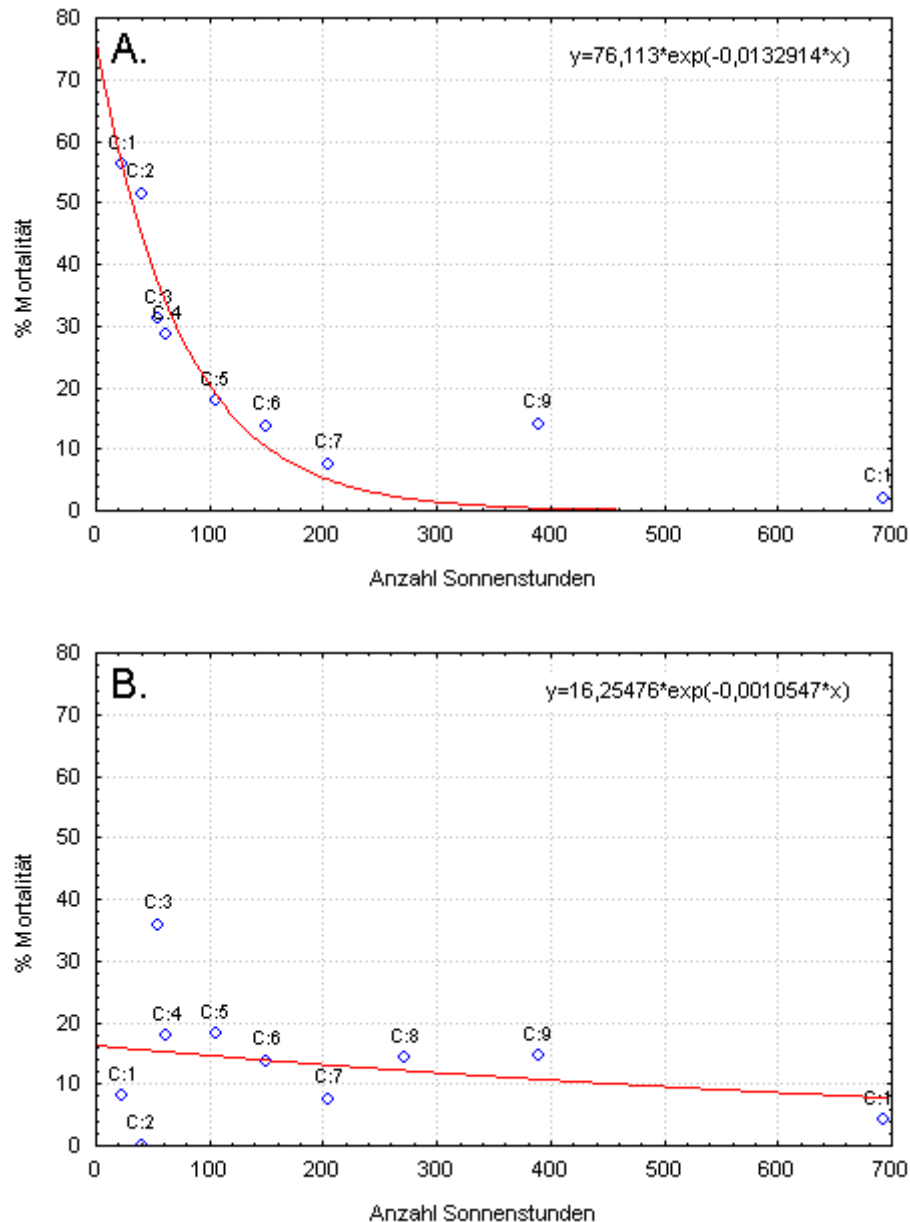


Abb. 4.7: UV-Inaktivierung des CpGV aus einem Freilandversuch. Das CpGV wurde entweder durch A. eine Normalapplikation ganzflächig aufgebracht oder B. in die Stielgrube des Apfels aufgetragen. Die im Bioassay erhaltenen Mortalitäten wurden gegen die Kontrollgruppe korrigiert (Abbott, 1925); $n = 50$. Die hohe Mortalität des ganzflächig applizierten 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 zum ganzflächig applizierten CpGV, ließ sich bei dem punktuell in der Stielgrube aufgetragenem Virus keine exponentiell verlaufende Abnahme der Virusaktivität erkennen. Aus früheren Laborversuchen (Kap. 3.3.4) war zu erwarten, dass viele der Larven die Äpfel in der Nähe des Stielansatzes anfressen würden. Die Vermutung, dass das CpGV in

der Stielgrube weniger der UV-Strahlung ausgesetzt wurde und länger aktiv blieb, konnte jedoch nicht eindeutig bestätigt werden, da an dieser Stelle nur etwa 14% der Larven ($n = 241$) in den Apfel fraßen. Es hatte keine vergleichbare hohe Mortalität zu frühen Erntezeitpunkten und ebenso keine vergleichbare starke Abnahme zu späteren Zeitpunkten stattgefunden. Annäherungsweise nahm die Inaktivierung einen eher linearen Verlauf. Wurde jedoch, wie für eine UV-Inaktivierung von Baculoviren üblich, eine exponentielle Anpassung verwendet, konnte eine Inaktivierungsrate von 0,001 und eine Halbwertszeit von 657,2 Sonnenstunden errechnet werden (Abb. 4.7 B.), was eine sehr geringe Abnahme der Virusaktivität in der Stielgrube andeutet.

4.3.4 Infektion später Larvenstadien

Das zweite Telexperiment (Exp. 2) wurde durchgeführt, um zu testen, ob sich auch spätere Larvenstadien mit dem gespritzten CpGV infizieren konnten. In den Wellpappringen wurden in den einzelnen Gruppen lediglich 1 bis 2 Larven bzw. Puppen gefunden. Diese Zahl war so gering, dass sie in der Auswertung der Überlebenden vernachlässigt wurde, zumal auch in der Hintergrundkontrolle (Gruppe G) eine Puppe gefunden wurde und diese Tiere möglicherweise der natürlichen Apfelwicklerpopulation entstammten.

Wie in Abb. 4.9 dargestellt, war die Mortalität der Gruppe D, bei der eine CpGV-Applikation erst 2 Wochen nach der Infestation mit L1-Larven stattgefunden hatte, ebenso hoch wie in der Gruppe E, bei der die Äpfel einen Tag vor Ausbringen der L1-Larven behandelt worden waren. Zwischen den Gruppen D und E war in einer Varianzanalyse bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ kein signifikanter Unterschied der mittleren Überlebensraten feststellbar. Beide unterschieden sich signifikant von der Kontrollgruppe F. Dies bedeutet, dass das CpGV auch auf ältere Larven, die sich bereits innerhalb des Apfels befanden, eine Wirkung ausübte. Dagegen gab es bzgl. des Schadens, ausgedrückt als Anteil der Äpfel mit Kernfraß, einen deutlichen Unterschied zwischen den beiden Gruppen D und E (Abb. 4.10). Hier war der Kernfraß bei den älteren behandelten Larven signifikant größer ($p < 0,05$) als bei den behandelten L1-Larven und war im Vergleich zu der unbehandelten Gruppe F in der Tendenz etwas geringer, jedoch statistisch nicht signifikant. Das bedeutet, dass die Population älterer Larvenstadien durch eine

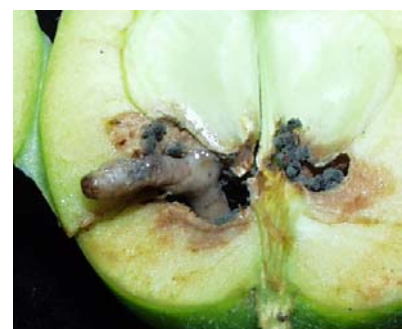


Abb. 4.8: Virustote *C. pomonella* Larve im L5-Stadium.

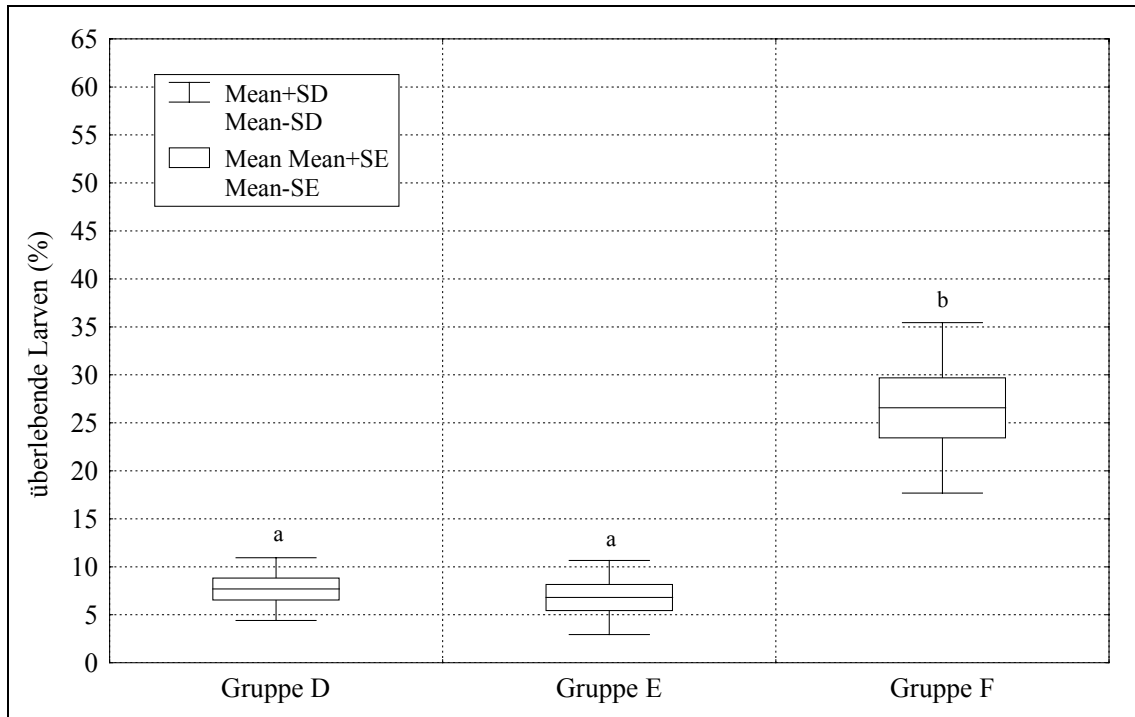


Abb. 4.9: Bestimmung der Wirkung des CpGV auf L1- und ältere Larven im Freiland. Dargestellt sind die Überlebensraten (%) der Versuchsgruppen D (ältere Larven), E (L1-Larven) und F (unbehandelte Kontrolle). Mean = Mittelwert, SE = Standardfehler, SD = Standardabweichung (n=ca. 70 Äpfel; 8 Wdh.). Gleiche Buchstaben unterscheiden sich nicht signifikant voneinander ($p > 0,05$).

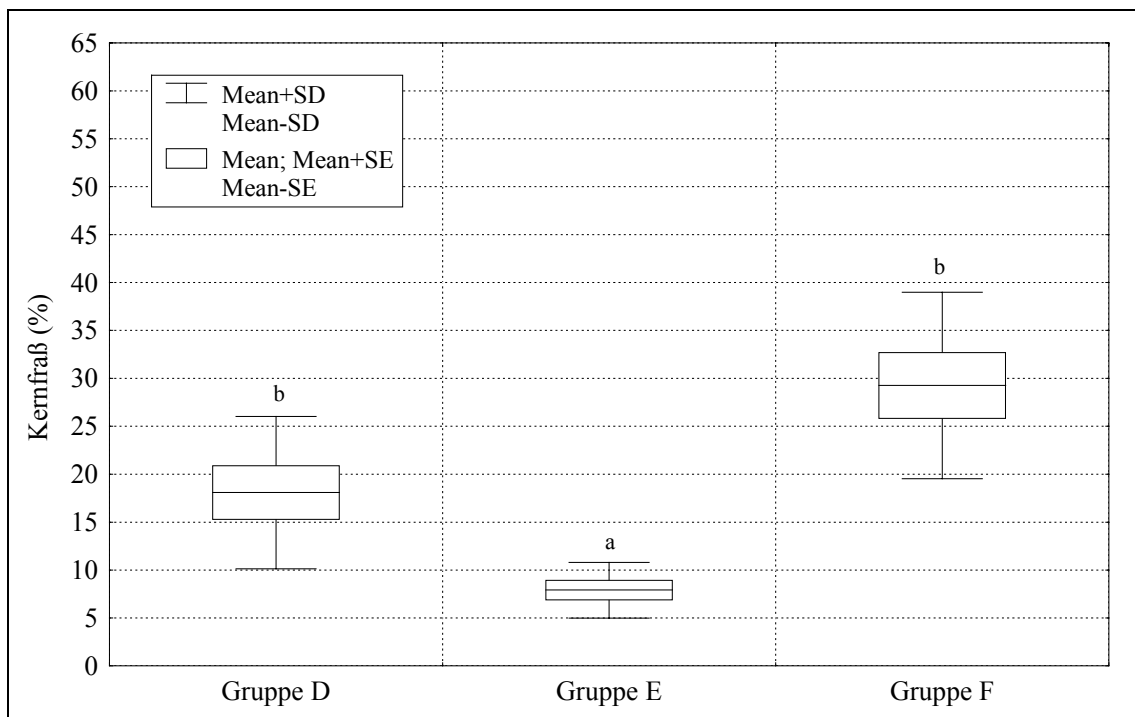


Abb. 4.10: Bestimmung der Wirkung des CpGV auf L1- und ältere Larven im Freiland. Dargestellt ist der Kernfraß (%) der Versuchsgruppen D (ältere Larven), E (L1-Larven) und F (unbehandelte Kontrolle). Mean = Mittelwert, SE = Standardfehler, SD = Standardabweichung (n=ca. 70 Äpfel; 8 Wdh.). Gleiche Buchstaben unterscheiden sich nicht signifikant voneinander ($p > 0,05$).

CpGV-Applikation in gleichem Maße reduziert wurde wie die L1-Larven, dass der Schaden aber fast so groß war wie auf unbehandelten Flächen. Abb. 4.8 zeigt dies exemplarisch: Die Larve stirbt zwar im L5-Stadium an der Virusinfektion, hinterlässt aber eine unbrauchbare Frucht.

4.4 Diskussion

Der Kontakt einer nicht infizierten Larve mit einer virustoten Larve führte in Laborversuchen zu einer relativ hohen horizontalen Transmissionsrate von ~40% (Kap. 3). Um dies in Freilandversuchen zu überprüfen und einen Vergleich möglich zu machen, wurde der Freilandversuch ähnlich angelegt. Dadurch, dass Äpfel individuell mit frischgeschlüpften Larven bestückt wurden, sollte außerdem eine möglichst gleichmäßige Verteilung und große Dichte der Larven erreicht werden. Aufgrund der sehr hohen natürlichen Mortalität (vgl. Gruppe C und F) war die Gesamtdichte jedoch wesentlich geringer als im Laborversuch. Daraus resultierte, dass virustote Larven wahrscheinlich nur auf einem geringen Teil der Äpfel vorhanden waren. Der Apfelanteil, auf dem Larvenkadaver vorkamen, kann folgendermaßen geschätzt werden. Bei einer 100%-igen Infektionschance konnten auf maximal 27% der Äpfel virustote Larven vorkommen (Gruppe F). Da die Gruppe E aber zeigte, dass auch bei einer CpGV-Behandlung einige Larven überlebten, fiel die Anzahl an potentiellen virustoten Larven somit noch geringer aus. Der Anteil der Äpfel, der in Gruppe A mit virustoten Larven besetzt war, ließ sich anhand der Schadensraten von Gruppe E und F *a posteriori* abschätzen. Diese beiden Gruppen hatten in etwa den gleichen Gesamtschaden und unterschieden sich hauptsächlich im Kern- und oberflächlichen Fraß. Die Schadensrate des tieferen Fraßes war in beiden Gruppen ähnlich (Tab. 4.4). Der Unterschied im Kernfraß der Gruppen E und F lag bei ~ 20% und repräsentiert das quantitative Vorkommen der Kadaver.

Nachdem nur bei ~20% der Äpfel Larvenkadaver vorkamen und zur zweiten Larvenapplikation auch nur ~27% der Äpfel mit gesunden Larven besetzt waren, lag die Wahrscheinlichkeit, dass eine virustote Larve und eine gesunde Larve auf dem gleichen Apfel vorkamen, somit bei 5% ($=0,20 \times 0,27 \times 100$). Wenn, analog zum Laborversuch, ~40% dieser Larven über eine horizontale Transmission infiziert werden, findet eine horizontale Transmission in diesem Freilandversuch auf nur 2% ($=0,05 \times 0,40 \times 100$) der Äpfel statt. Diese Betrachtung erklärt, weshalb unter Freilandbedingungen kein eindeutiger Effekt einer

horizontalen Transmission zugeordnet werden konnte. Das verdeutlicht außerdem, dass eine horizontale Transmission nur bei einer sehr hohen Wirtsdichte, wie sie beispielsweise in unbehandelten Apfelanlagen vorkommt, erreicht werden kann.

Zwei schwierig kontrollierbare Faktoren hatten in den Versuchen dazu beigetragen, die Aussagen über die horizontale Transmission abzuschwächen. Zum einen war dies die bereits erwähnte hohe natürliche Mortalität der Larven, zum anderen aber auch die längere Persistenz des CpGV. Die hohe Mortalität könnte verschiedene Ursachen haben. Larven in diesem Versuch stammten aus den konstanten Bedingungen einer Zucht und waren möglicherweise im Vergleich zu einer natürlich vorkommenden Apfelwicklerpopulation empfindlicher gegenüber wechselnden Witterungsbedingungen. Die beobachtete natürliche Mortalität lag im Bereich der Mortalität anderer Freilanduntersuchungen (10% bis 72% Mortalität für L1 und 43% bis 68% für L2-L5; Ferro *et al.*, 1975; MacLellan, 1962; MacLellan, 1977; Hagley, 1972b; Hall, 1934, Wearing, 1979; siehe auch Kap. 2). Nach MacLellan (1977) wird die Mortalität der Larven im L1-Stadium größtenteils durch Räuber und Wetter verursacht, während Hagley (1972a) Regen als Hauptursache erwähnt. Es ist denkbar, dass der leichte Niederschlag zwei bis drei Tage nach der ersten Larvenapplikation und zwei und fünf Tage nach der zweiten Larvenapplikation (Abb. 4.4) zu der hohen Mortalität beigetragen hat. Zusätzlich könnten Ameisen die Larven bereits zu Beginn des Versuchs dezimiert haben, denn es konnte beobachtet werden, dass Ameisen einige der frisch applizierten Eilarven fraßen. Larven bis zum zweiten Stadium hätten ebenso von diesen Räubern betroffen sein können.

Außerdem wurde die Untersuchung der horizontalen Transmission durch die unerwartet lange Persistenz des CpGV beeinträchtigt (Abb. 4.5 und 4.6, Gruppe B), welche auch in der Versuchsgruppe zur horizontalen Transmission (Gruppe A) ähnliche Mortalitäten verursachte. Bisher veröffentlichte Halbwertszeiten des CpGV liegen zwischen zwei (Jaques *et al.*, 1987; Fritsch & Huber, 1989) und 25 Tagen (Glen & Payne, 1984). Die bisherigen Studien wurden bei unterschiedlichen klimatischen Bedingungen und mit unterschiedlichen Bioassay-Methoden durchgeführt, wobei die Halbwertszeit häufig nicht mit dem Wetter (z.B. Sonnenstunden, Gesamteinstrahlung, Niederschlag) korreliert wurde. Da für die Untersuchungen von Huber & Fritsch (1989) sehr detaillierte Angaben vorlagen und diese außerdem bei sehr ähnlichen klimatischen Bedingungen durchgeführt wurden, wurden diese Daten zur Kalkulation der CpGV-Inaktivierung im Versuch und damit zur Wahl des Zeitpunktes der zweiten Larvenapplikation verwendet. Bei der parallel zum Versuch gemessenen UV-Inaktivierung wurde eine niedrigere Inaktivierungsrate von 0,01 mit einer

Halbwertszeit von 52 Sonnenstunden festgestellt. Damit war zum Zeitpunkt der zweiten Larvenapplikation nicht das gesamte CpGV inaktiviert. Es ist wahrscheinlich, dass die abweichenden Inaktivierungsraten mit unterschiedlichen Versuchsmethoden zusammenhängen. Fritsch & Huber (1989) ermittelten Inaktivierungsraten von 0,03 und 0,05 in Bioassays mit sonnenexponierten Blattscheiben, während im vorliegenden Versuch sonnenexponierte Äpfel im Bioassay verwendet wurden. Larven können das Virus bereits über Naschfraß vor dem eigentlichen Einbohren aufnehmen (Ballard *et al.*, 2000), deshalb bietet ein Apfel mehr Oberfläche, mit mehr Viren und somit auch eine größere Infektionswahrscheinlichkeit. Außerdem kommt diese Form des Bioassays der Situation im Freiland relativ nah, da das Virus zum Beispiel in Kelch oder Stielgrube länger persistieren könnte. Experiment 1 zeigt, dass Gruppe B immerhin eine virusbedingte Mortalität von 21,6% besaß (Abbott, 1925). Da hiermit keine >99% CpGV-Inaktivierung nach 254 Sonnenstunden bestätigt werden konnte, weist dies darauf hin, dass die tatsächliche Inaktivierung im Freiland niedriger ausfiel als nach Fritsch & Huber (1989) zu erwarten war. Doch scheint auch die Inaktivierung, die mittels Apfel-Bioassay ermittelt wurde, zu hoch zu sein (vgl. 96,6 % Inaktivierung nach 254 Sonnenstunden bei einer Inaktivierungsrate von 0,01). Somit bietet der Apfel-Bioassay zwar ein zuverlässigeres, aber kein absolut akkurates Modell. Vermutungen, dass vom Sonnenlicht geschützte Stellen von Larven als Fraßorte bevorzugt werden, konnten durch den zweiten UV-Versuch vorerst nicht bestätigt werden. Die Mortalität auf Äpfeln, auf denen das CpGV in der Stielgrube appliziert worden war, war entgegen den Erwartungen stets niedrig. Eine mögliche Ursache könnte eine andere Präferenz der Einbohrstellen sein. Im Vergleich zu den Laborversuchen, in denen reife Äpfel verwendet wurden, wurden wie bei Experimente 1 und 2 (Horizontale Transmission und Infektion später Larvenstadien), die Inaktivierungsversuche an unreifen Äpfeln durchgeführt.

In den Laborversuchen wurde die hohe Effizienz der horizontalen Transmission in Zusammenhang mit bevorzugten Einbohrstellen gebracht (Kap. 3.3.4). Auch im Freiland konnte eine Präferenz der Einbohrstellen beobachtet werden, wenngleich der hohe Anteil im Bereich der Stielgrube nicht bestätigt werden konnte. Auf den unreifen Äpfeln im Freilandversuch konnte eine Präferenz für den Kelch beobachtet werden (Kap. 4.3), die in der Größenordnung der Stielpräferenz in den Laborversuchen entsprach. Der Kelch ist, ähnlich wie der Stielansatz, eine sehr kleine definierte Stelle, die die horizontale Transmission ebenfalls begünstigen könnte. Wie in Kap. 3.4 bereits diskutiert, konnten auch andere Autoren bei verschiedenen Apfelsorten im Freiland eine Präferenz für den Kelch beobachten. Außerdem sind auch viele Einbohrstellen an Berührungspunkten zwischen zwei Äpfeln oder zwischen Blatt und Apfel zu finden (Hall, 1929; Audemard, 1976), wodurch viele der

Fraßstellen, die seitlich auf dem Apfel beobachtet wurden, ähnlich wie Stielgrube und Kelch als sehr kleine definierte Stellen gelten könnten.

Der Freilandversuch wurde angelegt, um *eine* mögliche Form der horizontalen Transmission und zwar die Transmission zwischen frühen Larvenstadien zu untersuchen. Horizontale Transmission unter älteren Larvenstadien oder einer Ausbreitung des Infektionsmaterials durch Vektoren wurden dabei nicht betrachtet. Auch wurden Faktoren, wie z.B. das Eiablageverhalten der weiblichen Falter (siehe Kap. 3.4), in diesem Versuch nicht berücksichtigt.

Der Versuch zur Infektion älterer Larvenstadien hat gezeigt, dass das CpGV eine Apfelwicklerpopulation effektiv reduzieren konnte, auch wenn die Applikation zu einem Zeitpunkt erfolgte, nachdem sich die Larven in den Apfel gebohrt hatten. Bisher haben nur Sheppard & Stairs (1976) und Huber & Dickler (1977) angedeutet, dass auch spätere Larvenstadien des Apfelwicklers im Freiland durch eine Applikation infiziert werden könnten. Doch im Gegensatz zu dem hier beschriebenen Versuch basieren ihre Schlussfolgerungen lediglich auf der Beobachtung virustoter älterer Larven in den Äpfeln (Sheppard & Stairs, 1976) bzw. einer höheren Mortalitäts- als Schadensrate nach CpGV-Applikationen (Huber & Dickler, 1977), ohne das Szenario explizit zu testen. Im vorliegenden Freilandversuch hätten die meisten Larven im Alter von 13 Tagen das L3-Stadium erreicht haben müssen. Dies würde bedeuten, dass sie bis zum Kerngehäuse vorgedrungen waren und keinen Kontakt mehr zur Apfeloberfläche hatten (Ferro & Harwood, 1973; R. Zelger pers. Mitt.). Die Annahme, dass ein Teil der Larven nach 13 Tagen das L3-Stadium noch nicht erreicht hatte und sich noch nahe der Apfeloberfläche befand, würde nicht die hohe Mortalität erklären, die vergleichbar war mit der Mortalität von Larven, die nach dem Schlupf behandelt wurden. Da die Infektion der späten Larvenstadien außerdem keine wesentliche Reduktion des Fraßschadens brachte, lassen die Daten somit den Schluss zu, dass sich auch diejenigen Larvenstadien mit dem applizierten CpGV infizierten, die sich bereits im Apfelinnern befanden. Dieser eindeutige Befund steht im Widerspruch zu bisherigen Annahmen, dass der Apfelwickler nur in der kurzen Zeitspanne zwischen Larvenschlupf und dem Einbohren in die Frucht mit appliziertem CpGV infiziert werden kann (z.B. Brassel & Benz, 1979). Die Beobachtung von Glen & Clark (1985), dass Larven im L3-Stadium gelegentlich ein neues Einbohrloch fressen, kann nicht allein die hohe Mortalität im vorliegenden Versuch erklären. Wahrscheinlicher ist, dass der leichte Niederschlag kurz nach der CpGV-Applikation die Larven angeregt haben könnte ihren Einbohrgang zu verlassen (MacLellan, 1962) oder das Virus in den Einbohrgang gespült hat. Besonders bei Einbohrstellen im Kelch konnte

beobachtet werden, dass sich L3-Larven noch im Einbohrgang und nicht wie bei anderen Einbohrstellen bereits im Kerngehäuse befanden (R. Zelger, pers. Mitt). Außerdem sind bei einem ergiebigen Regen vor allem die Einbohrungen im Kelchbereich regelmäßig überflutet (R. Zelger, pers. Mitt).

In Zusammenhang mit der horizontalen Transmission wäre es interessant, auch eine Transmission zwischen späteren Larvenstadien zu betrachten. Im Allgemeinen wird vorausgesetzt, dass infestierete Äpfel natürlich ausgedünnt werden (Jaques *et al.*, 1981). Eine solche Ausdünnung würde eine horizontale Transmission verhindern. In diesem Freilandversuch kam eine natürliche Ausdünnung jedoch nur bei sehr wenigen befallenen Äpfeln vor. Bei älteren Larven wäre ein Kontakt zwischen zwei Larven sehr wahrscheinlich, da sich alle Apfelwicklerlarven zum Kerngehäuse und zu den Apfelsamen fressen. Larven, die im L4- und L5-Stadium sterben, sterben häufig noch im Kerngehäuse (eigene Beobachtung) und hinterlassen dort massenweise Virusnachkommen. Bei zukünftigen Betrachtungen der horizontalen Transmission sollte auch dieses Szenario berücksichtigt werden.

Der Freilandversuch konnte zeigen, dass eine horizontale Transmission im pflanzenschützerischen Sinne keinen Beitrag zur Effizienz des CpGV leistete. In kontrollierten Apfelanlagen trägt sie weder zur Populationsreduktion noch zur Verringerung des Schadens bei. Dies schließt nicht aus, dass sie eine Rolle beim evolutionären Überleben des Virus spielt. Im Gegensatz dazu konnten zwei Faktoren die Wirksamkeit des biologischen Schädlingsbekämpfungsmittels nachweislich beeinflussen. Das CpGV persistierte länger als bisher beschrieben und auch ältere Larvenstadien konnten mit appliziertem CpGV erfolgreich getötet werden. Es wäre zu untersuchen, inwiefern eine Kombination von chemischen Insektiziden in Verbindung mit einem Baculoviruspräparat im konventionellen Apfelanbau zu einer Wirkungssteigerung führen könnte. Das Baculoviruspräparat könnte hierbei durch Populationsreduktion und Resistenzvermeidung zu einem nachhaltigen Pflanzenschutz beitragen.

5 MOLEKULARER NACHWEIS DES CPGV UND UNTERSUCHUNGEN ZUR VERTIKALEN TRANSMISSION DES CPGV UNTER KONTROLLIERTEN BEDINGUNGEN

5.1 Einleitung

Ein Pathogen, wie z.B. das CpGV, das sich nur in seinem Wirt vermehren kann, ist darauf angewiesen, von Wirt zu Wirt übertragen zu werden. Die horizontale und vertikale Transmission zählen dabei zu den wichtigsten Übertragungsstrategien. In den vorangegangenen Versuchen konnte eine effiziente horizontale Transmission im Labor nachgewiesen werden (Kap. 3), die aber unter Freilandbedingungen nur bei sehr großen Wirtsdichten eine Rolle spielt (Kap. 4).

Bei einer vertikalen Transmission handelt es sich um ein Übertragen eines Erregers von Elterntieren auf ihre Nachkommen. Die vertikale Transmission ermöglicht einem Pathogen bei saisonalem Vorkommen des Wirtes und einer relativ niedrigen Dichte der Wirtspopulation fortzubestehen, was bei einer ausschließlich horizontalen Transmission ausgeschlossen wäre (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 wie Baculoviren können *transovum*, d.h. äußerlich auf der Ei-Schale, oder *transovarial*, d.h. im Ei-Innern übertragen werden. Eine vertikale Transmission wurde bei einigen NPVs (Kukan, 1999) und GVs (Burden *et al.*, 2002; Easwaramoorthy & Jayaraj, 1989) beobachtet.

In Apfelwickleraufzuchten treten auch bei strengen Hygienemaßnahmen immer wieder viröse Larven auf. Obwohl das CpGV eine sehr hohe Virulenz für alle fünf Larvenstadien des Apfelwicklers besitzt, wurde eine vertikale Transmission vermutet, die jedoch bisher nicht nachgewiesen werden konnte. Um eine Infektion an die Nachkommen übertragen zu können, muss das Elterntier subletal infiziert sein. Eine solche subletale Infektion könnte sich als latente oder persistente Infektion äußern. Bei einer latenten Infektion geht man von einer nicht replikativen Form des Virus aus, bei der sich das genetische Material beispielsweise in das Wirtszellgenom ähnlich wie beim Hepatitis-B-Virus integrieren könnte (Howard, 1986) oder wie beim Herpes-Simplex-Virus im Ruhezustand als eigenständiges genetisches Material im Zellkern vorhanden wäre (Mellerik & Fraser, 1987). Bei einer persistenten Infektion findet eine Bildung von Virusproteinen auf einem sehr niedrigen Niveau statt. Beispiele hierfür sind

das Masern-Virus (Cattaneo *et al.*, 1988) und das Baculovirus, *Mamestra brassicae* NPV (Hughes *et al.*, 1997). Bisher wurde spekuliert, dass diese latenten und persistenten Infektionsformen unter bestimmten Bedingungen wie Stress durch z.B. zu hohe Populationsdichte, extreme Temperaturen oder Nahrungsknappheit zum Ausbruch der akuten Infektion führen können (Tanada & Fuxa, 1987). Einige Autoren konnten latente bzw. persistente Infektionen auch durch Inokulationen mit einer anderen Baculovirusart aktivieren (Hughes *et al.*, 1997; Burden *et al.*, 2003; Cooper *et al.*, 2003).

Etzel & Falcon (1976) untersuchten die vertikale Transmission des CpGV histologisch und mit Bioassays und kamen zu dem Schluss, dass das Virus nicht *transovarial* d.h. in den Eiern übertragen wurde. Eine *transovum* Transmission konnte jedoch nicht ausgeschlossen werden. In dieser Studie testeten sie Apfelwickler-Eier aus ihrer eigenen und einer fremden Zucht, wobei die Eier aus der fremden Zucht auf der Ei-Schale anscheinend mit Viruspartikeln kontaminiert waren. Im 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 das Virus mit einer fluoreszierenden Antikörperfärbung in den Fettkörpern und in der Epidermis eines weiblichen Falters, nicht aber im Reproduktionsgewebe, nachgewiesen werden. In anschließend durchgeführten Bioassays mit der F-1 Generation von subletal infizierten Insekten starb nur 1 der 144 Larven an der Virusinfektion. Wenn auch diese Untersuchungen die vertikale Transmission nicht eindeutig bekräftigen, lassen sie den Schluss zu, dass das CpGV auf der Ei-Schale übertragen werden könnte. Dem widerspricht allerdings die Arbeit von Glen & Clark (1985), die in ihren Versuchen feststellten, dass aus mit CpGV bespritzten Eiern ebenso viele Larven schlüpften und überlebten wie Larven, die im Ei-Stadium mit Wasser behandelt wurden. Die jungen Larven schienen sich erst später durch Naschfraß an Blättern und Früchten zu infizieren. Jüngst konnte außerdem gezeigt werden, dass eine nicht apparente CpGV-Infektion durch thermischen Stress zum Ausbruch gebracht werden konnte (Quénin & Laur, 2003). Die Autoren deuten dies als Zeichen für eine latente Infektion.

Ziel der vorliegenden Untersuchungen war es, die vertikale Transmission mittels der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) nachzuweisen und mit den aus Bioassays erhaltenen Mortalitätsraten zu vergleichen. In einem umfangreichen Versuch wurden die Nachkommen von Larven, die eine Inokulation überlebt hatten, auf das Vorhandensein von CpGV getestet. Die PCR ist ein weitaus sensitiverer Nachweis, der im Gegensatz zu immunologischen Färbungen (Etzel & Falcon, 1976) nicht voraussetzt, die Form zu kennen, in der das Virus

vorliegt. Ähnlich wie ein immunologischer Nachweis bietet die PCR den Vorteil auch asymptomatische Larven zu erkennen.

5.2 Material und Methoden

5.2.1 Molekularbiologische Methoden

5.2.1.1 Gesamt-DNA-Isolierung (genomische und virale DNA) einzelner Larven

Genomische Insekten-DNA wurde mit drei verschiedenen Methoden isoliert. (1) Für das Phenolisierungsprotokoll wurden die Larven zunächst in 200 µl Extraktionspuffer (10 mM Tris, pH 8,0; 100 mM EDTA, pH 8,0; 0,5% SDS) mit einem sterilen Mikropistill homogenisiert. Anschließend wurden 20 µl Proteinase K (1 mg/ml) zugefügt und 60 min bei 37°C inkubiert. Um schließlich die OB aufzulösen, wurden 20 µl Na₂CO₃ (1 M) zugegeben und das Gefäß so lange invertiert bis die Lösung klar erschien. Eine 15 - 30 min Inkubation bei 37°C unterstützte das Auflösen der OB. Durch Zugabe von HCl (1 N) wurde die Lösung wieder auf pH 8,0 eingestellt. Die Lösung wurde 2 - 3 mal mit Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1 v/v/v) und einmal mit Chloroform:Isoamylalkohol (24:1 v/v) extrahiert. Zum Fällern der DNA in wässriger Lösung wurden 20 µl NaAc (3 M, pH 5,2) und 400 µl Ethanol (96%) zugegeben. Die DNA wurde zweimal in Ethanol (70%) gewaschen, getrocknet und in 20 µl sterilem Wasser oder TE-Puffer gelöst. Bei älteren Larven wurden außerdem 2 µl RNase A (1 mg/ml) zugefügt und die Lösung 30 min bei 37°C inkubiert, um die RNA zu entfernen. Anschließend wurde die DNA wieder wie oben beschrieben mit Ethanol gefällt, gewaschen und in 20 µl sterilem Wasser oder TE-Puffer gelöst. Für die PCR wurde 1 µl der DNA-Lösung als Template eingesetzt.

(2) Für die von Eastwell *et al.* (1999) beschriebene Methode wurde eine Larve zunächst in 80 µl Triton X 100 (0,1%) mit einem sterilen Mikropistill gemörsert, mit 20 µl NaOH (0,4 M) versetzt, 6 min in ein kochendes Wasserbad gelegt und auf Eis gekühlt. Anschließend wurde die Lösung durch Zugabe von 10 µl Tris HCl (1 M, pH 7,5) neutralisiert und die groben, verunreinigenden Partikel durch Zentrifugieren (3 min bei 12 000 x g, Eppendorf 5417C) pelletiert. Ein Mikroliter des Überstandes diente als Template für die PCR.

(3) Die Vorgehensweise für die DNA Isolierung mit dem DNeasy Tissue Kit (Qiagen) entsprach der Anleitung des Herstellers. Je eine Larve wurde in 720 µl ATL Lysisbuffer mit einem sterilen Mikropistill homogenisiert. Um die Säule später nicht zu überladen, wurde die DNA von nur 190 µl des Homogenisats, entspricht in etwa einer viertel Larve, isoliert. In weiteren Schritten wurden 20 µl Proteinase K (20 mg/ml, Kit, 3 h bei 55°C) und bei den größeren L4- und L5-Larven bzw. Puppen zusätzlich 4 µl RNase A (100 mg/ml, 2 min bei Raumtemperatur) zugefügt. Anschließend wurden 200 µl AL Puffer (10 min bei 70°C) und 200 µl Ethanol (96%) zugegeben, die Minisäule beladen und zentrifugiert (1 min bei 6000 x g). Mit je 500 µl AW1 Puffer (1 min bei 6000 x g) und AW2 Puffern (3 min bei 12 000 x g) wurde die Säule gewaschen, ehe die DNA in zwei Zentrifugationsschritten in 400 µl AE Puffer oder sterilem Wasser eluiert wurde (1 min bei 6000 x g). 30 µl der 400 µl DNA-Lösung dienten als Template für die PCR.

5.2.1.2 Etablierung eines qualitativen PCR Nachweises

Die für die PCR verwendeten Primerpaare basierten auf der Granulinsequenz (Crook *et al.*, 1997). Bei PCR-Nachweisen von CpGV in Larvenproben wurden die Primerpaare PRCP1 und nestedPRCP1 verwendet (Tab. 5.1). Die Amplifikation wurde mit der in Tab. 5.2 dargestellten Reaktionszusammensetzung durchgeführt. Die PCR Analysen mit nach (1) und (2) isolierten DNA-Präparationen wurden mit dem Crocodile III Thermocycler (Appligene) durchgeführt. Für die nach (3) isolierte DNA wurde der Mastercycler (Eppendorf) verwendet.

Tab. 5.1: Beschreibung der verwendeten PCR Primer.

Primer	Sequenz	Produktlänge
PRCP1U*	5'-GAA TAC GGC ACC AGA TAC AC-3'	1223 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'	

* nach Jehle, 1994

Tab. 5.2: Reaktionszusammensetzung und Bedingungen für die PCR.

Reagenz	Endkonzentration
PCR-Puffer (Gibco/BLR)	1 x
DNTP mix (Promega)	je 0,2 mM
MgCl ₂ (Gibco/BLR)	2,5 mM (PRCP1 Primerpaar) bzw. 1,5 mM (nestedPRCP1 Primerpaar)
Primer-Mix (Gibco/BLR, MWG-Biotech AG.)	je 0,25 µM
Template DNA	1-30 µl
Taq DNA Polymerase (Gibco/BLR)	1,25 units
autoklaviertes destilliertes Wasser	auf 50µl auffüllen

* Mit dem Primerpaar PRCP1 erfolgte die Amplifikation bei 2 min Denaturierung bei 94°C; 35 Zyklen (1 min Denaturierung bei 94°C, 0,45 min Primer-Bindung bei 54°C, 0,45 min Kettenverlängerung bei 72°C) und 5 min Kettenverlängerung bei 72°C und mit dem Primerpaar nested PRCP1 bei 2 min Denaturierung bei 94 °C; 30 Zyklen (1 min Denaturierung bei 94°C, 1 min Primer-Bindung bei 60°C bzw. 68°C, 0,30 min Kettenverlängerung bei 72°C); 7 min Kettenverlängerung bei 72°C.

Das Primerpaar der nested PCR liegt innerhalb der bereits amplifizierten Granulinsequenz (Abb. 5.1) 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 beeinträchtigten. In der nested PCR wurde jeweils 1 µl des PCR-Produktes der vorangegangenen PCR verwendet. Die Nachweisgrenzen beider Reaktionen wurden bestimmt, indem isolierter DNA aus nicht infizierten Insekten unterschiedliche Mengen von CpGV-DNA oder CpGV- OB zugefügt wurden. Mit Hilfe der DNA-Konzentration (Eppendorf BioPhotometer) und der Virusgenomlänge (123,5 kb; Luque *et al.*, 2001) wurde die eingesetzte DNA-Menge in die Anzahl viraler Moleküle bzw. Genome umgerechnet.

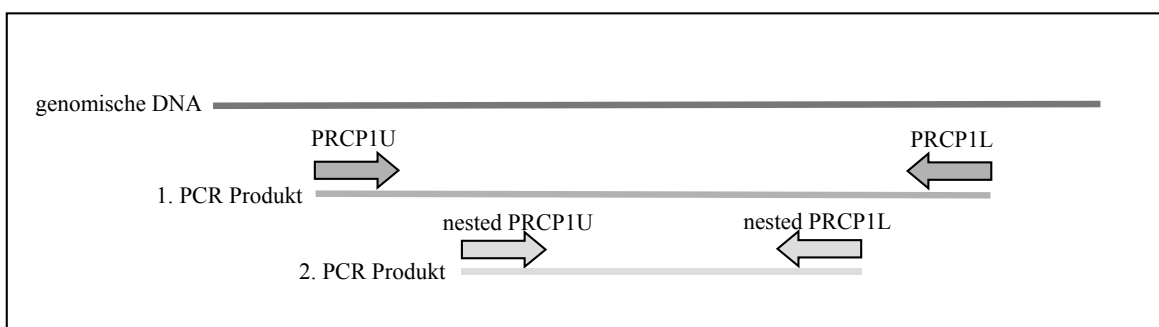


Abb. 5.1: Schematische Darstellung der nested PCR.

Die elektrophoretische Größenauftrennung der DNA-Fragmente erfolgte in horizontalen 1% (PRCP1 PCR Produkte) bzw. 1,5% (nestedPRCP1 PCR Produkte) TBE-Agarosegelen (10x TBE-Lösung: 108 g TRIS, 55 g Borsäure, 20 ml EDTA (1 M, pH 8,0) auf 1 l angesetzt). Als Längenstandard dienten 1 kb bzw 100 bp DNA Ladder (Gibco/BRL). Das Gel wurde mit dem mit Ladepuffer (6x Ladepuffer: Bromphenolblau (0,25%), Saccharose (40% w/v) in bidestilliertem Wasser) versetzten DNA Proben beladen. Der Elektrophoreselauf wurde bei einer Spannung von 90 Volt mit maximaler Stromstärke bei Raumtemperatur durchgeführt. Nach dem Elektrophoreselauf wurde das Gel zunächst 30 min lang in einer Ethidiumbromid-Lösung (0,5 µg/ml) gefärbt und anschließend 10 min lang in Wasser entfärbt, ehe es auf einem UV-Transilluminator fotografiert wurde (Intas gel documentation system).

5.2.1.3 Etablierung eines quantitativen PCR Nachweises

Quantifizierung der CpGV-DNA in Larven wurde mittels *real time* PCR (DNA Opticon™ System, MJ Research) durchgeführt. Für die Reaktionen wurden 25 µl des QuantiTect SYBR green Kit (Qiagen) und je 5 mM des nested PRCP1 Primerpaares verwendet. QuantiTect SYBR green ist eine speziell für *real time* PCR optimierte Zusammensetzung von SYBR green 1, HotStarTaq DNA Polymerase, dNTPs, Puffer und MgCl₂. Als Standard, bei dem die Amplifikationskinetik den zu messenden Proben möglichst ähnlich sein sollte, wurden fünf Verdünnungen gereinigter CpGV-DNA mit 200 ng genomischer DNA aus *Cryptophlebia leucotreta* als Hintergrund verwendet. Als Template für die zu quantifizierenden Proben dienten 15 µl der insgesamt 200 µl mittels DNEasy Kit (Qiagen) isolierten DNA-Lösung. Dies entsprach 45-120 ng DNA. Die 50 µl Reaktionen wurden in 0,2 ml low-profile strip tubes durchgeführt. Für die Amplifikation und anschließende Schmelzkurvenanalyse wurde folgendes Programm verwendet:

1. incubate at 95°C for 15'00,
2. incubate at 95°C for 0'30,
3. incubate at 68°C for 0'30,
4. incubate at 72°C for 0'30,
5. plate read,
6. go to line 2 for 49 times more
7. incubate at 72°C for 7'00
8. Perform melting curve form 50°C to 95°C: read every 0.5°C: hold for 0'10 between reads,
9. incubate at 10°C for forever
10. end

Die anschließende Datenanalyse wurde mit der Opticon Monitor™ Software durchgeführt.

5.2.2 Durchführung der Versuche zur vertikalen Transmission

Viren und Insekten

Als Virusinokulum diente das CpGV, das wie in Kap. 2.2.1.1 vermehrt und aufgereinigt wurde. Die Insekten stammten aus der Zucht der Staatlichen Lehr- und Forschungsanstalt, die 2001 mit *C. pomonella* Eiern der Firma Biocontrol (Andermatt, Schweiz) begonnen wurde. Die Zucht erfolgte unter gleichen wie in Kap. 2.2.1.2 beschriebenen Bedingungen, ausgenommen, dass für die Aufzucht der Larven Rasterschalen mit ca. 3 cm³ großen Rastern statt der ca. 8 cm³ großen Döschen verwendet wurden und die Zylinder für die Eiablage komplett mit Plastikfolie ausgekleidet waren.

Versuchsaufbau

Um jegliche Kontamination mit dem CpGV zu vermeiden, wurden autoklavierbares Material und Instrumente bzw. Einwegmaterial verwendet. Kontrolltiere, sowie Adulttiere und Eier wurden getrennt von jeglichem infektiösen Material gehalten. Zusätzlich wurden zu Beginn des Versuchs die Insekten-Eier nach der Ablage mit Formaldehyddampf behandelt (6 h, 3 Tropfen 5%-iges Formaldehyd auf einem Filterpapier im Deckel eines verschlossenen Plastikbechers), um eventuell vorhandene Viren auf der Ei-Schale zu inaktivieren. Diese Methode hatte sich auch in Bioassays bewährt, um eine möglichst hohe Überlebensrate bei den Kontrolltieren zu erreichen (siehe Kap. 2.2.3.1 sowie Kap. 3.3.1-3.3.3). Die Insekten wurden außerdem im Puppenstadium desinfiziert, indem sie erst einige Sekunden in Ethanol (70%) geschwenkt wurden, anschließend in Wasser gespült und an der Luft getrocknet wurden.

Um systematische Fehler zu minimieren, wurden Eier aus derselben Eiablage für die Kontroll- und Versuchsgruppe verwendet. Die Anzahl der für den Versuch zur Verfügung stehenden Tiere war somit zum einen durch die Größe der Zucht bedingt, zum anderen aber auch durch den Arbeitsaufwand der durchzuführenden Inokulation begrenzt. Zerschnittene Eiblättchen eines Ablagezylinders wurden randomisiert und bis zum Schlupf bei 26°C und 60% Luftfeuchte gehalten. Die daraus geschlüpften Larven wurden anschließend auf semi-synthetischem Medium bei 26°C und 60% Luftfeuchte herangezogen. Um Larven mit einer subletalen Infektion zu erhalten, wurden ~ 575 Larven im frühen L5-Stadium mit 50 CpGV OB pro Larve (entspricht einer LD₅₀) über die *diet-plug* Methode 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 dem Virus komplett gefressen hatten. Diese Larven erhielten ausreichend Futter für ihre weitere Entwicklung. Kontrolltiere blieben unbehandelt. Puppen aus den überlebenden, inokulierten und den Kontrolllarven wurden abgesammelt und bei 10°C gehalten, bis sich alle Larven verpuppt hatten. Da sich *C. pomonella* erst bei Temperaturen über 10°C entwickeln kann (Pitcairn *et al.*, 1991), wurde so die weitere Entwicklung der Puppen gebremst. Anschließend wurden sie je nach Geschlecht getrennt, desinfiziert und in getrennten Schlupfkäfigen bei Raumtemperatur aufbewahrt. Ein Teil der Puppen wurde für eine spätere PCR-Analyse bei -20°C gelagert. Nach Falterschlupf wurden sie in folgenden Paarungskombinationen zusammengeführt:

1. *unbehandelte* ♂ x *unbehandelte* ♀ (Kontrolle)
2. *subletale* ♂ x *unbehandelte* ♀
3. *unbehandelte* ♂ x *subletale* ♀

Je nach Falterschlupf wurden 4 - 15 Falter in einen mit Filterpapier ausgekleideten Plexiglas-Paarungskäfig gesetzt und bei 26°C und 70% relativer Luftfeuchte gehalten. Die Eier wurden auf Plastikblättchen abgelegt und alle zwei bis drei Tage abgesammelt. In diesem Schritt wurde auf eine Formaldehydbehandlung der Eier verzichtet, da nicht bekannt war ob eine Übertragung des CpGV auf der Ei-Schale stattfinden kann. Die Eier wurden bei 26°C und 70% relativer Luftfeuchte inkubiert. Nach dem Schlupf wurde ein Teil der Eilarven jedes Eiablageblättchens für eine spätere PCR Analyse bei -20°C gelagert. Der andere Teil wurde verwendet um die Mortalität der Nachkommen der verschiedenen Paarungsvarianten zu bestimmen.

Für die Mortalitätsbestimmung wurden die Larven in mit Nährmedium gefüllten Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen herangezogen. Bonitiert wurde zu zwei Zeitpunkten. Nach ein bis zwei Tagen wurde festgestellt, welcher Anteil der Larven das Umsetzen nicht überlebt hatte. Nach 16 Tagen, als die Larven im L4- oder L5-Stadium waren, wurde die virusbedingte Mortalität bestimmt. Larven, die bereits durch das Umsetzen gestorben waren, wurden nicht in die eigentliche Mortalitätsbestimmung mit einbezogen.

Die für die PCR bestimmten Larven wurden einzeln oder gepoolt (á 10 Larven) bei -20°C gelagert. Die DNA wurde mittels DNeasy Tissue Kit (Qiagen; Methode 3, Kap. 5.2.1.1) isoliert. Eine einfache PCR wurde mit den nestedPRCP1 Primern (keine nested PCR) entsprechend den in Kap. 5.2.1.2 beschriebenen Bedingungen, jedoch mit einer Annealingtemperatur von 68°C und 45 Zyklen, im Mastercycler (Eppendorf) durchgeführt. Es

wurden jeweils 20 µl (L4- bis L5-Larven und Puppen) bzw. 30 µl (einzelne oder gepoolte L1-Larven) gereinigte DNA in der PCR eingesetzt. Der anschließende Elektrophoreselauf folgte den ebenso bereits beschriebenen Bedingungen.

5.3 Ergebnisse

5.3.1 CpGV-Nachweisgrenzen mittels PCR

Die Nachweisgrenze der einfachen und der nested PCR wurde mit DNA-Präparationen, die entsprechend der drei beschriebenen DNA-Isolierungsmethoden präpariert wurden, ermittelt. Mit DNA, die mittels Phenolisierungsprotokoll gewonnen wurde, konnte mit dem Primerpaar PRCP1 und 250 ng genomischer *C. pomonella*-DNA als Hintergrund eine Nachweisgrenze von 1×10^3 Viruspartikeln in der einfachen PCR ermittelt werden. Diese Nachweisgrenze blieb bestehen, wenn die PCR mit CpGV-OB statt mit einer bekannten Menge an aufgereinigter CpGV-DNA durchgeführt wurde. Da diese Nachweisgrenze für eine subletale Infektion noch immer zu hoch erschien, wurde eine auf dem Nachweis des Granulin-Gens basierende nested PCR etabliert. Der Nachweis mit der nested PCR war jedoch so empfindlich, dass auch bei nicht infizierten *C. pomonella*-Larven ein Virus-spezifisches Signal ausgelöst wurde, was auf eine latente Infektion in der Zucht oder auf eine mögliche Kontamination während der DNA-Isolierung bzw. PCR schließen ließ. Ähnlich wurde auch bei dem für CpGV weniger suszeptiblen Insekt *Cryptophlebia leucotreta* CpGV in nicht infizierten Larven mit der nested PCR nachgewiesen. Von 10 DNA-Aliquots einer nicht infizierten *C. pomonella*-Larve ($\sim 0,25$ µg/PrimärPCR) waren in der nested PCR 2 Proben negativ. Von 9 DNA-Aliquots einer nicht infizierten *C. leucotreta*-Larve (0,98 µg/PrimärPCR) waren in der nested PCR 5 Proben negativ.

Wurde Larven-DNA als Hintergrund verwendet, die nach Eastwell *et al.* (1999) isoliert worden war, so lag die Nachweisgrenze in der PrimärPCR etwas höher. Mit 1 µl aus insgesamt ~ 200 µl DNA-Lösung einer *C. leucotreta*-Larve und dem Primerpaar PRCP1, lag die Nachweisgrenze bei 1×10^4 OB. Die Nachweisgrenze der nested PCR lag bei 10 OB. Diese Nachweisgrenze blieb bestehen, wenn 3 *C. leucotreta*-Larven (L5-Stadium) unterschiedliche Mengen an CpGV (5×10^3 , 5×10^4 , 5×10^5) zugefügt wurden und anschließend die DNA nach Eastwell *et al.* (1999) isoliert wurde. Dabei konnten in der ersten PCR mit dem PRCP1 Primerpaar 5×10^4 OB/Larve (entspricht 2500 OB/PCR Ansatz), nicht aber 5×10^3 OB/Larve

(entspricht 250 OB/PCR Ansatz) nachgewiesen werden (Abb. 5.2). Hingegen konnte in der nested PCR bei allen drei Konzentrationen das CpGV nachgewiesen werden (Abb. 5.3).

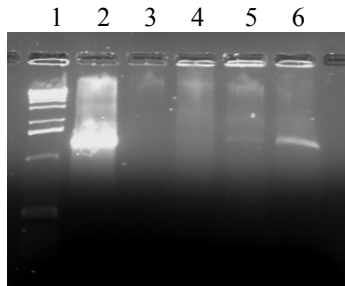


Abb. 5.2: PCR mit dem PRCP1 Primerpaar. 1) 1 kb Ladder, 2) positiv Kontrolle, 3) H₂O Kontrolle, 4) Larve mit 5×10^3 OB CpGV, 5) Larve mit 5×10^4 OB CpGV, 6) Larve mit 5×10^5 OB CpGV.

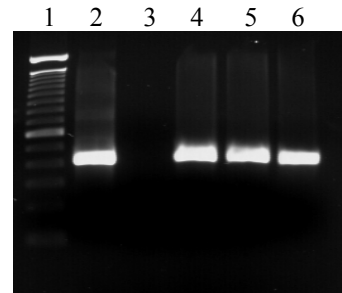


Abb. 5.3: Nested PCR mit dem nested Primerpaar. 1) 100 bp Ladder, 2) positiv Kontrolle, 3) H₂O Kontrolle, 4) Larve mit 5×10^3 OB CpGV, 5) Larve mit 5×10^4 OB CpGV, 6) Larve mit 5×10^5 OB CpGV.

Unter Verwendung des Qiagen-Kits konnte die Nachweisgrenze deutlich gesenkt werden und lag mit ~ 200 ng genomischer *C. pomonella* DNA als Hintergrund in einer einfachen PCR mit dem PRCP1 Primerpaar bei 10 OB. Das entspricht einer Nachweisgrenze von 800 OB pro Larve, die ausreichend niedrig war, um auf eine nested PCR verzichten zu können. In der quantitativen *real time* PCR, bei der es sinnvoll ist, mit kleineren Produkten zu arbeiten, konnte auch mit dem nestedPRCP1 Pimerpaar und CpGV-DNA als Template in einer einfachen PCR bei 45 Zyklen eine Nachweisgrenze von 10 CpGV-DNA Molekülen erreicht werden (Abb. 5.4).

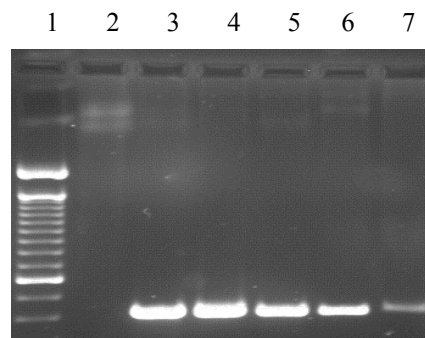


Abb. 5.4: Einfache PCR mit dem nested Primerpaar von einer CpGV DNA Verdünnungsreihe mit 200 ng genomischer *C. pomonella* DNA als Hintergrund. 1) 100 bp Ladder, 2) H₂O Kontrolle 3) 10^6 Moleküle, 4) 10^4 Moleküle, 5) 10^3 Moleküle, 6) 10^2 Moleküle, 7) 10 Moleküle. Es wurden 10 μ l eines 50 μ l PCR Ansatzes auf ein 1% TBE Gel aufgetragen.

5.3.2 Vertikale Transmission des CpGV

Um die Möglichkeit und das Ausmaß der vertikalen Transmission von CpGV im Apfelwickler abzuschätzen, wurde ein Versuch durchgeführt, bei dem die Nachkommen (F1-Generation) inokulierter *C. pomonella* Larven (F0-Generation) hinsichtlich ihrer Mortalität und des Vorkommens viraler DNA untersucht wurden. Bei den Überlebenden einer virusinokulierten F0-Generation wurde angenommen, dass zumindest ein Teil der Larven subletal infiziert war und diese nicht-invasive Infektion möglicherweise an die Nachkommen weitergegeben werden konnte.

F0-Generation

Um subletal infizierte Tiere zu erhalten, wurden ~575 frisch gehäutete L5-Larven mit einer LD₅₀ (50 OB / Larve) inokuliert. Von diesen inokulierten Larven verpuppten sich 106 (18%). In der Kontrollgruppe verpuppten sich 123 Tiere aus ~500 L1-Larven (25%), wobei sich die beiden Überlebensraten nicht miteinander vergleichen ließen, da bei den infizierten Tieren von L5-Larven und bei den Kontrolltieren von L1-Larven ausgegangen wurde. Die unerwartet hohe Mortalität in der Kontrollgruppe wurde dadurch verursacht, dass sich viele Larven nicht verpuppten, sondern sehr spät im L5-Stadium starben. Die Larven hatten keine Anzeichen einer Virose. Gegen Ende des L5-Stadiums erfolgte keine Nahrungsaufnahme mehr und die Tiere starben schließlich im Alter von ~4 Wochen. Die Ursache für diese untypische Entwicklung ist unklar.

Das Geschlechterverhältnis von Männchen zu Weibchen der überlebenden Kontrolltiere im Puppenstadium war 60:63 (also etwa 1:1), bei der experimentellen Gruppe der subletal infizierten Tiere war es 73:33 (also etwa 2:1). Anhand einer Stichprobe von Puppen wurde nachträglich außerdem festgestellt, dass einige der unbehandelten Kontrolltiere der Elterngeneration in der PCR Analyse positiv für das CpGV testeten (Tab. 5.3).

Tab. 5.3: PCR-Befund der F0-Generation (Puppen). n = Stichprobenumfang.

	CpGV positiv (%)	n
unbehandelt ♂	28	7
unbehandelt ♀	40	5
subletal ♂	57	30
subletal ♀	86	7

F1-Generation

Im Versuch wurden die Paarungskombinationen so gewählt, dass festgestellt werden konnte, welches Geschlecht in der Lage ist, die Infektion zu übertragen. Die anschließend durchgeführten Bioassays zeigten, dass die Mortalität der F1-Generation bei unbehandelten Männchen und Weibchen bzw. subletal infizierten Männchen 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 (Tab. 5.4). Die toten Larven hatten unterschiedliche Symptome. Ein Teil der toten Larven, sowohl bei den Nachkommen inokulierter Tiere als auch bei den Nachkommen unbehandelter Kontrolltiere, zeigte die typischen Symptome einer Virose: weiß, aufgedunsen und ein Zerfließen bei leichter Verletzung mit der Präpariernadel. Doch gab es auch tote L4- und L5-Larven, die ihre rosa Farbe beibehielten oder weiß aufgedunsene L3-Larven, die trotz Berührung intakt blieben.

Die parallel durchgeführten PCR-Analysen frischgeschlüpfter Larven, die sowohl asymptomatische Larven als auch Larven mit eventuell später auftretenden Symptomen enthielten, zeigten eine ähnliche Tendenz. Nachkommen der unbehandelten Kontrolle und Nachkommen subletal infizierter Männchen, bei denen 42% bzw. 49% positiv für das CpGV waren, unterschieden sich auch hier kaum (Tab. 5.4). Hingegen testeten deutlich mehr Nachkommen subletal infizierter Weibchen positiv für das CpGV.

Tab. 5.4: PCR-Befund und Mortalität der F1-Generation (L1-Larven) aus unterschiedlichen Paarungen der Elterntiere. n = Stichprobenumfang

Paarungen der F0-generation		F1-Generation			
♂	♀	CpGV positiv (%)	n	Mortalität (%)	n
unbehandelt	unbehandelt	42	59	27	253
subletal	unbehandelt	49	44	28	80
unbehandelt	subletal	67	52	44	86

Zusätzlich zu den qualitativen Aussagen über das Vorkommen des CpGV in L1-Larven wurden aus jeder Paarungskombination einige DNA-Proben in einer *real time* PCR quantitativ bewertet. Da es sich bei diesen Proben um gepoolte Larven handelte, bei denen jeweils DNA aus 10 Eilarven isoliert wurde, sind quantitative Aussagen für Einzellarven nicht möglich. Die Anzahl der viralen DNA Kopien wurde je PCR Ansatz mit 1/13 einer isolierten DNA-Probe bestimmt (Tab. 5.5). Bei 10 Nachkommen unbehandelter Tiere konnten bis zu

1000 Viren gemessen werden. Bei den Nachkommen subletaler Männchen waren es bis zu 100 Kopien und bei den Nachkommen subletaler Weibchen bis zu 25 000 Kopien. Schmelzkurvenanalysen bestätigten, dass es sich bei den amplifizierten und quantifizierten PCR Produkten um spezifische Produkte handelte.

Tab. 5.5: Anzahl der detektierten CpGV-Moleküle in Apfelwickler-Eilarven. DNA wurde aus 10 gepoolten Larven isoliert. Für die PCR wurde jeweils 1/13 der Lösung verwendet. Als Standard dienten fünf Verdünnungen gereinigter CpGV-DNA mit 200 ng genomischer *Cryptophlebia leucotreta* DNA als Hintergrund. Die Quantifizierung erfolgte bei einem Schwellenwert von 0,0045 Fluoreszenz, bei dem sich alle Reaktionen im exponentiellen Anstieg befanden. Eichkurve: $R^2=0,994$.

Paarung der F0-Generation	Anzahl Virusmoleküle in der F1-Generation	
	je PCR Ansatz	je Gesamt-DNA-Probe
unbehandelt ♂ x subl. ♀	27, 29, 1938	351, 377, 25194
subl. ♂ x unbehandelt ♀	0, 9	0, 117
unbehandelt ♂ x unbehandelt ♀	80, 69, 1, 3	1040, 897, 13, 39

5.4 Diskussion

Viele Pathogene werden vertikal an die Nachkommen übertragen. Dazu muss ein Pathogen aber zunächst in der Lage sein, seinen Wirt subletal zu infizieren. Obwohl eine vertikale Transmission für das CpGV vermutet wurde (Biache *et al.*, 1999), spricht seine hohe Virulenz nicht für eine mögliche subletale Infektion. Untersuchungen bei anderen Baculoviren haben gezeigt, dass eine effiziente vertikale Transmission erreicht werden konnte, wenn Larven möglichst erst im L5-Stadium infiziert wurden (Kukan, 1999). In den vorliegenden Untersuchungen wurden deshalb L5-Larven mit einer LD₅₀ inokuliert. Bei den überlebenden Tieren wurde angenommen, dass zumindest ein Teil subletal infiziert war. Sie wurden bis zum Adultstadium herangezogen und gepaart. Anschließend wurde die Mortalität der Nachkommen bis zum L4-Stadium bestimmt. Außerdem wurde die DNA der L1-Larven auf das Vorkommen von CpGV überprüft. Hierfür wurde zunächst ein effizienter molekularer Nachweis etabliert.

Der für die vertikale Transmission notwendige molekulare Nachweis sollte vor allem eine niedrige Nachweisgrenze besitzen und eine schnelle Analyse der Proben ermöglichen. Eine einfache DNA-Isolierungsmethode in Kombination mit einer Standard-PCR schien deshalb die optimale Lösung darzustellen. Die verwendeten Primerpaare basierten auf der Granulinsequenz (Crook *et al.*, 1997), da zu Beginn der Arbeiten lediglich diese Sequenz für

das CpGV vorlag. Inzwischen ist die komplette Sequenz des CpGV-Genoms bekannt (Luque *et al.*, 2001), so dass heute PCR-Nachweise von weiteren CpGV-spezifischen Sequenzen etabliert werden könnten. Eine nested PCR, die mit einer über das Phenolisierungsprotokoll (1) isolierten DNA durchgeführt wurde, erwies sich als sehr sensitiv, aber auch als zu arbeitsaufwändig für einen großen Probenumfang. Bei einer DNA-Isolierung nach Eastwell *et al.* (1999) (2) waren zwar weniger Arbeitsschritte notwendig, doch musste auch hier auf eine nested PCR zurückgegriffen werden. Letztlich stellte sich heraus, dass für die über (3) das Qiagen Kit erhaltene DNA eine nested PCR unnötig war und diese Methode deshalb den schnellsten Durchsatz von Proben ermöglichte, ohne dabei auf die hohe Sensitivität von 10 OB pro 50 µl Reaktionsansatz zu verzichten. Da bislang die Effizienz und das Vorkommen von Baculoviren anhand von akuten Infektionen beurteilt wurde, bietet ein empfindlicher molekularer Nachweis gegenüber diesen gängigen Methoden den Vorteil auch asymptomatische Larven zu erkennen. Hierdurch ergeben sich neue Möglichkeiten für Untersuchungen zur Pathologie und Populationsdynamik des Virus, da untersucht werden kann, wie sich subletale Infektionen auf den Wirtsorgansimus bzw. seine Population auswirken können. Als Nachteil bleibt jedoch bestehen, dass auch mit diesem Nachweis keine lebenden Larven auf das Vorhandensein des Pathogens untersucht werden können.

F0-Generation

Mit den PCR-Analysen asymptomatischer Puppen in der F0-Generation lassen sich nur grobe Tendenzen beschreiben, da die Ergebnisse z.T. auf sehr geringen Stichprobenumfängen basieren. Dennoch lassen sich auch mit der geringen Datenmenge zwei Aspekte hervorheben. Die Tatsache, dass ein Teil der unbehandelten Kontrolltiere in der PCR positiv für das CpGV testeten, weist daraufhin, dass die Zucht nicht frei von CpGV war. Auch zeigen die PCR-Daten, dass nicht alle Larven, die eine Inokulation überlebten auch subletal infiziert waren. Bei den subletal inokulierten Männchen, bei denen ein ausreichend großer Stichprobenumfang zur Verfügung stand, waren 57 % der überlebenden Tiere positiv für das CpGV.

In der F0-Generation verschob sich das Geschlechterverhältnis von einem 1:1 Verhältnis bei den Kontrolltieren zu einem 2:1 Verhältnis zu Gunsten der Männchen bei den inokulierten Tieren. Dies zeigte dass, ähnlich wie bei *Spodoptera littoralis* (Santiago-Alvarez & Vargas-Osuna, 1986), mehr Männchen als Weibchen die Inokulation überlebten. Zusammen mit den Ergebnissen der PCR deutet dies darauf hin, dass sich die Männchen, zumindest im L5-Stadium, schlechter infizieren lassen. Obwohl *C. pomonella* Larven in den ersten 24 bis 48 Stunden nach ihrer Häutung zur L5-Larve eine deutlich geringere Infektionsdosis benötigen

als danach (Camponovo & Benz, 1984), ist nicht zu erwarten, dass der beobachtete Unterschied im entstandenen Geschlechterverhältnis mit einer schnelleren Entwicklung der Männchen zusammenhängt, denn Howell & Neven (2000) konnten in ihren Untersuchungen keinen signifikanten Unterschied in der Entwicklungsdauer zwischen *C. pomonella*-Männchen und Weibchen feststellen. Die Tatsache, dass weniger Weibchen als Männchen eine niedrige Infektionsdosis überleben, hat jedoch ein stark geschwächtes Wachstumspotential der Population zur Folge, da die Weibchen der eigentliche Vermehrungsfaktor einer Population sind. Sie legen im Freiland durchschnittlich 47 Eier ab (Tab. 1.5), von denen schließlich ca. 25% überleben (Tab. 1.3). Wäre es umgekehrt und würden mehr Weibchen die Infektion überleben, würde das Wachstumspotential der Population wesentlich geringer beeinflusst, da männliche Apfelwickler in der Lage sind, mehrere Weibchen zu begatten (Howell, 1991).

Die Folgen subletaler Infektionen, wie z.B. ein verändertes Geschlechterverhältnis der Überlebenden, können sich gravierend auf die Populationsdynamik des Wirtes auswirken und wurden bei verschiedenen Baculovirus-Wirt-Assoziationen beobachtet (Tab. 5.6). 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. Allerdings lassen sich die Ergebnisse nicht beliebig auf alle Insekt-Baculovirus-Beziehungen übertragen, da in diesen Arbeiten keine einheitlichen Ergebnisse für die verschiedenen Insekten- und Virenarten vorliegen. So konnten Goulson & Cory (1995) z.B. 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). Dennoch ist denkbar, dass Auswirkungen von subletalen Baculovirus-Infektionen einen enormen Beitrag zur Reduktion bzw. Schwächung einer Wirtspopulation leisten könnten.

Tab. 5.6: Eine Zusammenfassung der beobachteten subletalen Effekte bei verschiedenen Baculovirus-Insekt Beziehungen.

Virus	Untersuchte Eigenschaften	Veränderte Eigenschaften	Referenz
<i>Chilo inuscatellus</i> GV	Geschlechterverhältnis, Pigmentation der Puppen	Geschlechterverhältnis, Entwicklungsrate	Easwaramoorthy & Jayaraj, 1989
<i>Lacanobia oleracea</i> GV	Entwicklungsrate, Gewicht der Puppen, Geschlechterverhältnis, Lebenserwartung der Adulten, Fruchtbarkeit, Überlebensrate der L1-Larven	z.T. Entwicklungsrate, z.T. Gewicht der Puppen, Lebenserwartung der Adulten, Fruchtbarkeit	Matthews <i>et al.</i> , 2002
<i>Lymantria dispar</i> NPV	Gewicht der Puppen, Fruchtbarkeit, Gewicht der F1-Larven und F1-Puppen	Keine	Murrey <i>et al.</i> , 1991
<i>Lymantria dispar</i> NPV	Gewicht der Puppen, Fruchtbarkeit	Gewicht der Puppen, Fruchtbarkeit	Myers <i>et al.</i> , 2000
<i>Mamestra brassicae</i> NPV	Entwicklungsrate, Gewicht der Puppen, Geschlechterverhältnis, Fruchtbarkeit	Entwicklungsrate	Goulson & Cory, 1995
<i>Plodia interpunctella</i> GV	Entwicklungsrate, Gewicht der Puppen, Fruchtbarkeit	Entwicklungsrate, Fruchtbarkeit	Sait <i>et al.</i> , 1994
<i>Pseudoplusia includens</i> NPV	Gewicht der Puppen, Geschlechterverhältnis, Lebenserwartung der Adulten, Fruchtbarkeit	z.T. Fruchtbarkeit	Young & Yearian, 1982
<i>Sesamia nonagrioides</i> GV	Geschlechterverhältnis, Pigmentation der Puppen, Fruchtbarkeit	Geschlechterverhältnis, Pigmentation der Puppen, Fruchtbarkeit	Melemed-Madjar & Raccah, 1979
<i>Spodoptera littoralis</i> NPV	Anomalien der Larven bzw. Puppen, Entwicklungsrate, Lebenserwartung der Adulten, Fruchtbarkeit	Keine	Vargas-Osuna & Santiago-Alvarez, 1988

F1-Generation

In dem durchgeführten Versuch wurde die F1-Generation drei verschiedener Paarungsvarianten hinsichtlich der Mortalität und des Vorkommens von CpGV auf DNA-Basis untersucht. Dabei wurde zum einen eine im Vergleich zu anderen Bioassays erhebliche Mortalitätsrate (27% im Vergleich zu 0% in Kap. 2.3.2.1, Abb. 2.2 bzw. $6 \pm 5\%$, $16 \pm 9\%$ und $9 \pm 8\%$ in Kap. 3.3.1-3.3.3, Abb. 3.3-3.5) der unbehandelten Kontrolltiere festgestellt. Auch wurde bei 42% der Kontrolllarven CpGV in der DNA nachgewiesen. Die festgestellte Mortalität könnte zunächst mehrere Ursachen haben. Im Gegensatz zu den eben erwähnten Bioassays wurden die Eier nicht mit Formaldehyd behandelt und stammten aus einer anderen Zucht, der SLFA-Zucht. Die hohe Mortalität könnte mit dem Vorhandensein des CpGV in der Zucht zusammenhängen, hätte aber auch durch die Handhabung der Larven entstehen können.

Im Gegensatz zu den bisherigen Bioassays, bei denen hauptsächlich die agil erscheinenden Larven ausgewählt wurden, wurden in diesem Versuch alle geschlüpften Larven verwendet. Möglicherweise wurde die Mortalitätsrate hierdurch beeinflusst. Aufgrund der untypischen Symptome sowohl in der F0- als auch in der F1-Generation könnten außerdem noch unbekannte Ursachen, wie z.B. eine Infektion anderer Pathogene (Bakterien, Pilze oder Mikrosporidien), für die Mortalität verantwortlich sein. Das Vorhandensein viraler DNA in den PCR-Analysen lässt sich allerdings nur durch eine vertikale Transmission, die sich bereits in der Zucht etabliert hat, erklären. Eine mögliche Kontamination während des Versuchs kann weitgehend ausgeschlossen werden, da strengste Hygienemaßnahmen eingehalten wurden.

Durch einfache Berechnung kann geschätzt werden, wie sich das Vorhandensein viraler DNA quantitativ auf die Mortalitätsrate auswirkt. Wie bereits erwähnt, könnten für die beobachtete Mortalität mehrere Ursachen in Frage kommen. Um zu schätzen, welcher Anteil dieser Mortalität durch CpGV verursacht wurde, werden zwei Annahmen gemacht: (i) Die Höhe der Mortalitätsrate aufgrund unbekannter Ursachen sollte in allen drei Gruppen gleich sein. Nachdem die Mortalität in der Kontrollgruppe 27% beträgt, bedeutet dies auch, dass auch bei den Nachkommen subletal infizierter Tiere maximal 27% der Tiere aufgrund unbekannter Ursachen sterben könnten. (ii) Das Verhältnis der virusbedingten Mortalitätsrate in Bezug zu den CpGV-Trägern sollte in allen drei Gruppen nahezu gleich sein. Interessanterweise trifft beides zu, wenn die beobachtete Mortalität in allen Gruppen fast ausschließlich virusbedingt wäre. In der unbehandelten Kontrolle würden demnach 64% (= 27% Mortalität / 42% CpGV positiv in PCR * 100), bei den Nachkommen subletal infizierter Männchen 57% (= 28% Mortalität / 49% CpGV positiv in PCR * 100) und bei den Nachkommen subletal infizierter Weibchen 66% (= 44% Mortalität / 67% CpGV positiv in PCR * 100) der CpGV-Träger sterben.

Eine ausschließlich virusbedingte Mortalität in der unbehandelten Kontrolle deutet darauf hin, dass durch eine oberflächliche Desinfektion von Insekteneiern mittels einer Behandlung mit Formaldehyddampf (Bathon *et al.*, 1991) der Transmissionszyklus des CpGV zumindest zum Teil unterbrochen wird. Auch bei anderen Baculovirus-Wirt-Systemen konnte beobachtet werden, dass eine Oberflächendesinfektion das Infektionsvorkommen bei den Nachkommen zwar reduzierte, aber nicht vollständig eliminierte (z.B. Neelgund & Mathad, 1978; Fuxa & Richter, 1991). Eine *transovum* Transmission, bei der das Virus auf der Eioberfläche übertragen wird, würde sich auch mit den Erkenntnissen aus den Bioassays von Etzel & Falcon (1976) decken. Andererseits bleibt in diesem Zusammenhang unklar, warum Larven

aus CpGV behandelten Eiern in den Untersuchungen von Glen & Clark (1985) keine Virose entwickelten.

Die erhobenen Daten weisen darauf hin, dass das CpGV an die F1-Generation übertragen werden kann. Es stellt sich noch die Frage, ob wie bei *Spodoptera littoralis* (Vargas-Osuna & Santiago-Alvarez, 1988) beide Geschlechter in der Lage sind als Überträger für das Virus zu fungieren. In dem in diesem Kapitel beschriebenen Versuch unterschieden sich die Nachkommen subletal infizierter Weibchen in ihrer Mortalitätsrate und als CpGV-Träger von den anderen beiden Gruppen. Daher ist anzunehmen, dass eine subletale CpGV-Infektion von den Weibchen auf ihre Nachkommen übertragen wird. Diese Aussage wird auch nicht dadurch entkräftet, dass ein Teil der Kontrolliere CpGV-Träger war. Unter der Voraussetzung, dass sich im Versuch der Anteil von CpGV-Trägern von der Gruppe der unbehandelten Männchen über die Gruppen der unbehandelten Weibchen und subletal infizierten Männchen bis zu der Gruppe der subletal infizierten Weibchen steigert, lassen sich folgende Schlussfolgerungen ableiten: (i) Wären Männchen die Überträger, dann dürfte sich bei den Nachkommen die unbehandelte Kontrolle nicht von der Gruppe der subletal infizierten weiblichen Elterntiere unterscheiden. (ii) Wären Weibchen die Überträger, dann dürfte sich bei den Nachkommen die unbehandelte Kontrolle nicht von der Gruppe der subletal infizierten männlichen Elterntiere unterscheiden. (iii) Wären dagegen beide gleichwertige Überträger, dann müsste sich wie bei der Elterngeneration die Anzahl der CpGV-positiven Nachkommen von der Kontrolle, über die Gruppe der subletal infizierten Männchen bis hin zur Gruppe der subletal infizierten Weibchen steigern. Die Ergebnisse der F1-Generation deuten auf die Möglichkeit (ii) hin. Unter Berücksichtigung der sehr kleinen Stichproben von PCR-Analysen der F0-Generation als Anhaltspunkt, kann sogar spekuliert werden, dass subletal infizierte *C. pomonella* Weibchen das CpGV sehr effizient an ihre Nachkommen übertragen.

Bei der Quantifizierung der Anzahl von CpGV-DNA-Kopien wurden Proben verwendet, die die DNA von 10 *C. pomonella* Nachkommen enthielten. Da die Larven direkt nach ihrem Schlüpfen verwendet wurden, beinhalten diese Proben sowohl die asymptomatischen als auch die zukünftig symptomatischen Larven. Die Anzahl an Kopien viraler DNA innerhalb einer Paarungskombination könnte somit nicht nur mit einer unterschiedlich hohen Anzahl an infizierten Larven je DNA-Probe zusammenhängen, sondern auch zwischen den einzelnen Larven stark variieren. Die in Tab. 5.5 präsentierten Daten deuten daher nur grob an, dass es sich bei den Larven-Nachkommen um maximal wenige 100 CpGV-DNA-Kopien pro Larve handelt. Dieses Ergebnis lässt sich jedoch nur schwierig mit den Untersuchungen an anderen

Insekten vergleichen, denn die einzige bisher veröffentlichte quantitative Aussage über vertikal übertragene Baculoviren sind die 13 bis 20 Kopien eines latenten MbNPV pro Zelle im Fettkörper von L4-Larven bzw. einer Zelllinie von *Mamestra brassicae* (Hughes *et al.*, 1994). Da aber nicht wirklich bekannt ist, welches Gewebe und wie viele Zellen von *C. pomonella* bei einer nicht invasiven CpGV-Infektion betroffen sind, lassen sich die Ergebnisse für das MbNPV jedoch nicht auf das CpGV übertragen.

Die vertikale Transmission des CpGV konnte in dieser Arbeit weder eindeutig belegt noch widerlegt werden, doch deuten die einzelnen Experimente in ihrer Gesamtheit daraufhin, dass die Infektion über die Weibchen an die Nachkommen übertragen wird. Um genaue Aussagen machen zu können, wäre es essentiell Insekten ohne jegliches Vorkommen von latentem oder persistentem CpGV zu verwenden. Da der Apfelwickler sehr anfällig für das CpGV ist, ist auch bei strengen Hygiene-Maßnahmen nicht auszuschließen, dass das Virus in die Zucht gelangt, wenn in der Nähe mit CpGV gearbeitet wird. Selbst in natürlichen Apfelwicklerpopulationen, die nicht mit CpGV behandelt wurden, konnte in PCR-Analysen von Diapause- und aus Äpfeln extrahierten Larven ein CpGV-Vorkommen von 23 % (n = 271) festgestellt werden (Eastwell *et al.*, 1999). Obgleich ungünstig für den Versuch deutet das hohe Vorkommen von CpGV-DNA in der untersuchten Zucht darauf hin, dass sich die Infektion relativ stabil in ihren Wirten halten kann. Welche Mechanismen hierbei eine Rolle spielen und welche Faktoren schließlich eine akute Infektion auslösen, müsste ebenso wie das Ausmaß einer vertikalen Transmission untersucht werden. Da sich das Virus bis zu einem gewissen Grad in der Wirtspopulation halten kann, könnte es auch für die Praxis von Bedeutung sein diese Mechanismen zu kennen, um so die Anwendung des Virus mit mehr Verständnis der Populationsdynamik zu verbessern.

6 MATHEMATISCHE MODELLIERUNG DER POPULATIONSDYNAMIK DES CPGV

6.1 Einleitung

Die meisten mathematischen Modelle zur Populationsdynamik von Baculoviren basieren auf einem für Mikroparasiten entwickelten Modell 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 zusätzlich eine freilandbezogene Aussagekraft verschafft. Diese analytischen Modelle eignen sich hauptsächlich für theoretische Fragestellungen einer langfristigen Dynamik oder Stabilität von Virus-Insekt-Systemen. Im Gegensatz hierzu hat Bianchi (2001) in einem Modell über die biologische Bekämpfung von *S. exigua* mittels SeMNPV erfolgreich einen etwas anderen und sehr umfassenden Ansatz gewählt. Um Aussagen auf relativ kurze Sicht für ein sehr definiertes System machen zu können, verwendete er ein Simulationsmodell (BACSIM) mit einer Vielzahl an Parametern, wie z.B. stadienspezifische Entwicklungs-, Mobilitäts- und Mortalitätsraten, die im Gegensatz zu vielen Parametern analytischer Modelle jeweils eine biologische Bedeutung besitzen.

In Labor- und Freilanduntersuchungen wurden viele für die Populationsdynamik des CpGV relevante Parameter gewonnen (Kap. 2 bis 5). Mit Hilfe dieser Untersuchungen konnten einzelne Prozesse qualitativ und quantitativ beschrieben werden. Da die Populationsdynamik eines Virus jedoch auf das Engste mit der Populationsdynamik seines Wirtes verbunden ist, mussten zur Modellierung der Populationsdynamik des CpGV dessen Eigenschaften ebenso berücksichtigt werden. Alle diese Parameter wurden in einem deterministischen Simulationsmodell zusammengefügt, um nicht nur einzelne Prozesse, sondern die Populationsdynamik des CpGV zu beschreiben.

Das biologisch – gedankliche Grundgerüst des Modells wurde in einer Kooperation mit dem Institut für Folgenabschätzung an der Biologischen Bundesanstalt in Kleinmachnow in eine entsprechende mathematische Repräsentation und schließlich als Computer-Programm GRANULO umgesetzt. Die mathematische Umsetzung, sowie Programmierung und Sensitivitätsanalyse von GRANULO wurden von Dr. D. Rossberg durchgeführt. Das Modell wird im Anhang beschrieben.

6.2 Material und Methoden

6.2.1 Simulation der Freilandversuche

Für die Insektenparameter wie Mortalitätsrate der jeweiligen Entwicklungsstadien, Entwicklungsrate und Geschlechterverhältnis wurden Werte aus der Literatur herangezogen (Tab. 1.3, Abb. 1.6 und Kap. 1.2.3). Virenparameter (Infektiosität, Wirkgeschwindigkeit, UV-Inaktivierung) resultieren aus Labor- und Freilandversuchen. Auch der Umfang der Virusbehandlung wurde beispielsweise aus der Aufwandmenge des CpGV im Freilandversuch berechnet. Alle verwendeten Parameter sind in Tab. 6.1 zusammengefasst.

Für die vorläufige Verifizierung des Modells wurden die Versuchsgruppen F, C, E und B aus dem Freilandversuch (Kap. 4) herangezogen. Bei den Kontrollgruppen handelte es sich um L1-Larven, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten (Gruppe F am 13.06.01 und Gruppe C am 09.07.01) auf Äpfel unbehandelter Bäume appliziert wurden, weshalb zwei sehr ähnliche Simulationen durchgeführt werden konnten, die sich nur durch Wetterbedingungen unterschieden. Für die Gruppe E wurde, wie im Freilandversuch, eine Virusbehandlung in handelsüblicher Menge zum Zeitpunkt der Larvenapplikation (13.06.01) simuliert. Für die Gruppe B wurde vor der Simulation der Larvenentwicklung das Virus mit der im parallel zum Freilandversuch gemessenen Inaktivierungsrate (Kap. 4.3.3) bis zum 09.07.01 inaktiviert. Hierfür waren zwei hintereinandergeschalteten Simulationen notwendig, da eine Simulation immer nur mit der Eiablage oder einer Larvenapplikation beginnen kann. Die erste Simulation diente dabei nur dazu, die Menge an verbleibenden aktiven Viren nach etwa vier Wochen UV-Inaktivierung zu bestimmen.

Zwei der Versuchsgruppen (D und A) konnten auf Grund der Modellstruktur nicht simuliert werden. In der Versuchsgruppe D 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 A 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. Hierfür wurde die Mortalitätsrate der L2-L5 Larven im Modell folgendermaßen reduziert. Die Mortalitätsrate der L2-L5 Larven im Modell setzt sich aus der Mortalitätsrate der L2-L5, die sich im Apfel entwickeln, und der Mortalitätsrate der L5 Larven, die den Apfel verlassen und ein Versteck zum Verpuppen aufsuchen, zusammen. Für die hier beschriebenen Simulationen wurde ausschließlich die Mortalitätsrate der Larvenstadien im Apfel verwendet, um beim Puppenstadium (Modellberechnung) eine für L4-L5 Larven aus dem Feilandversuch vergleichbare Überlebensrate zu erhalten.

Tab. 6.1: 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 (bezogen auf m ² Blattoberfläche)	55
BEHANDLUNGEN	
Anzahl ausgebrachter Viren pro Behandlung (bezogen auf m ² Blattoberfläche)	800.000.000
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 der Gesamtlegeleistung kontaminierter 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	
Infektiosität (Wahrscheinlichkeit für Infektion des Mitteldarmepithels)	0,13
Wirkgeschwindigkeit (LT_{50}); bezogen auf Entwicklungszustand L2 bis L5	0,5
virusbedingte Mortalitätsrate (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

6.2.2 Szenariosimulationen

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. Dies wird an zwei konkreten Beispielen, der UV-Stabilität und der Transmission, deutlich gemacht.

In Tab. 6.2 sind die Standardparameter, die bei den Simulationsrechnungen der UV-Inaktivierung verwendet wurden, dargestellt. Für die vier Simulationen wurden UV-Inaktivierungsraten von 0,3%, 0,5%, 3% und 5% verwendet. Vertikale sowie horizontale Transmission wurden bei diesen Simulationen nicht berücksichtigt.

Die Standardparameter für die Simulationsrechnungen der vertikalen und horizontalen Transmission sind in Tab. 6.3 dargestellt. Für diese Simulationen wurde die Anzahl der Adulttiere pro Quadratmeter auf 20 angehoben. Um eine möglichst hohe vertikale Transmission zu erzielen, wurden die transstadiale Transmissionsrate in allen Stadienübergängen sowie der Anteil an infizierten Eiern maximiert. Die horizontale Transmission wurde mit Parameterwerten von 0,5 sowohl für die Begegnung mit Virusflecken als auch für den Anteil der außerhalb sterbenden infektiösen Larven simuliert. Die Szenariorechnungen wurden für eine virusbedingte Mortalitätsrate von 0,75, 0,3 und 0,4 und einer natürlichen Mortalitätsrate im L2-L5 Stadium von 0,15 und 0,5 durchgeführt.

Tab. 6.2: Verwendete Parameterwerte für die Simulation verschiedener UV-Inaktivierungsraten.

ANFANGSBELEGUNG	
Termin für die Eiablage (TT.MM.)	13.06.
Simulationsende (TT.MM.)	10.09.
Anzahl Apfelwickler-Adulte (bezogen auf m ² Blattoberfläche)	4
BEHANDLUNGEN	
Anzahl ausgebrachter Viren pro Behandlung (bezogen auf m ² Blattoberfläche)	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 der Gesamtlegeleistung kontaminierter Weibchen	0
natürliche Mortalitätsrate während des Adult-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 Virusflecken"	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	
Infektiosität (Wahrscheinlichkeit für Infektion des Mitteldarmepithels)	0,13
Wirkgeschwindigkeit (LT ₅₀); bezogen auf Entwicklungszustand L2 bis L5	0,5
virusbedingte Mortalitätsrate (Mort.-Rate bis zur Verpuppung der L5)	0,95
UV-Empfindlichkeit des Virus (% Inaktivierung pro Sonnenstunde)	0,3/0,5/3/5
1.Grund für "Flecken-Inaktivierung" (Summe Sonnenscheinstunden [h])	100
2.Grund für "Flecken-Inaktivierung" (Starkregen [1/10mm])	100

Tab. 6.3: Verwendete Parameterwerte für die Simulationen zur vertikalen und horizontalen Transmission.

ANFANGSBELEGUNG	
Termin für die Eiablage (TT.MM.)	13.06.
Simulationsende (TT.MM.)	20.09.
Anzahl Apfelwickler-Adulte (bezogen auf m ² Blattoberfläche)	20
BEHANDLUNGEN	
Anzahl ausgebrachter Viren pro Behandlung (bezogen auf m ² Blattoberfläche)	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 der Gesamtlegeleistung kontaminierter Weibchen	1
natürliche Mortalitätsrate während des Adult-Stadiums	0,04
APFELWICKLER EIER	
natürliche Mortalitätsrate im Ei-Stadium	0,2
Faktor für transstadiale Transmission beim Übergang "Eier zu L1"	1
APFELWICKLERLARVEN-L1	
natürliche Mortalitätsrate im L1-Stadium	0,5
Faktor in Berechnungsfunktion "Virusaufnahme"	0,0000000125
Faktor für "Begegnung mit Virusflecken"	0/0,5
Faktor für transstadiale Transmission beim Übergang "L1 zu L2"	1
APFELWICKLER-LARVEN L2-L5	
natürliche Mortalitätsrate im L2- bis L5-Stadium	0,15/0,5
Anteil der außerhalb des Apfels sterbenden infektiösen Larven	0,5
Faktor für transstadiale Transmission beim Übergang "Larven zu Puppen"	1
APFELWICKLER-PUPPEN	
natürliche Mortalitätsrate im Puppen-Stadium	0,02
Faktor für transstadiale Transmission beim Übergang "Puppen zu Adulten"	1
GRANULOVIREN	
Infektiosität (Wahrscheinlichkeit für Infektion des Mitteldarmepithels)	0,13
Wirkgeschwindigkeit (LT ₅₀); bezogen auf Entwicklungszustand L2 bis L5	0,5
Virusbedingte Mortalitätsrate (Mort.-Rate bis zur Verpuppung der L5)	0,75/0,3/0,4
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

6.3 Ergebnisse

6.3.1 Simulationen der Freilandversuche

Mit den aus den Freilandversuchen gewonnenen Daten (Kap. 4) wurden Simulationen für eine vorläufige Modellverifizierung durchgeführt. In den Versuchen wurden die Überlebensraten von Larven zu unterschiedlichen Zeitpunkten bzw. bei unterschiedlichen Wetterbedingungen und unterschiedlichen Virusapplikationen bonitiert (Tab. 6.4), die mit den Modellsimulationen verglichen werden konnten. Außerdem war durch den bekannten Zeitpunkt der L1-Applikation sowie der Apfelernte die Entwicklungsdauer der Larven bekannt, die mit der Entwicklungsdauer im Modell verglichen werden konnte.

Tab. 6.4: Für eine Modellverifizierung relevante Daten aus dem Freilandversuch.

Versuchsgruppe	Larven		Virus		Überlebensrate (%) \pm SD
	Datum der L1 Applikation	Datum bei Erreichen der Stadien L4-L5	Datum der Applikation	Anzahl der Sonnenstd. zw. Virus- und L1-Applikation	
F	13.06.01	12.07.01	—	—	26,6 \pm 8,9
C	09.07.01	02.08.01	—	—	23,2 \pm 8,9
E	13.06.01	12.07.01	12.06.01	0	6,8 \pm 3,9
B	09.07.01	02.08.01	12.06.01	233	18,2 \pm 4,7
D	13.06.01	12.07.01	26.06.01	0	7,7 \pm 3,3
A	09.07.01	02.08.01	12.06.01 + Kadaver	233	15,6 \pm 8,2

Bei allen vier Modellsimulationen zeigte sich eine sehr gute Übereinstimmung der Überlebensraten zwischen den Freilandbeobachtungen und der Modellrechnung (Tab. 6.5), doch war die Entwicklungsdauer im Modell jeweils schneller als im Freiland (Tab. 6.6). Um den Zeitpunkt einer zweiten Generation simulieren zu können, müsste die Entwicklungsrate der Insekten in Zukunft überarbeitet werden.

Tab. 6.5: Ein Vergleich zwischen den Überlebensraten aus den Freilandversuchen und dem Modell (\pm Standardabweichung, SD).

Versuchsgruppe	% überlebende Larven (\pm SD)	
	Beobachtung	Berechnung
F	26,6 (\pm 8,9)	25,5
C	23,2 (\pm 8,9)	23,6
E	6,8 (\pm 3,9)	3,6
B	18,2 (\pm 4,7)	21,8

Tab. 6.6: 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)
F	29 Tage	20 Tage
C	24 Tage	19 Tage
E	29 Tage	20 Tage
B	24 Tage	19 Tage

6.3.2 Simulationen zur UV-Stabilität

Die relativ rasche UV-Inaktivierung gilt als eine der stärksten Limitierungen der Wirkung von Baculoviren im Freiland. Sie ist die Ursache für die Notwendigkeit häufiger Virus-Applikationen und somit auch ein bedeutender Kostenfaktor. Die Simulationsrechnungen wurden für vier verschiedene Inaktivierungsraten, nämlich 0,3%, 0,5%, 3% und 5% durchgeführt. Diese Werte orientieren sich einerseits an den abweichenden experimentell ermittelten Inaktivierungsraten (vgl. Kap. 4.3.3) und sollen andererseits das mögliche Systemverhalten bei einem weitergehenden UV-Schutz durch biotechnologische bzw. verfahrenstechnologische Maßnahmen analysieren. Die restlichen Parameterannahmen wurden, wie bereits erwähnt, der Literatur (vgl. Kap.1.2), Labor- und Freilandversuchen (Kap. 2 bis 5) entnommen.

Wie in Abb. 6.1 – 6.4 dargestellt, sinkt nach einmaliger Applikation des Virus erwartungsgemäß die Anzahl der infizierten Larven mit zunehmender Inaktivierungsrate (vgl. Kurven „infizierte Larven“). Aus der Kurven „gesunde Larven“ wird andererseits deutlich wie groß im Hochsommer (nach dem 11.08) der quantitative Einfluss der UV-Inaktivierung auf die Abundanz der zweiten Generation ist.

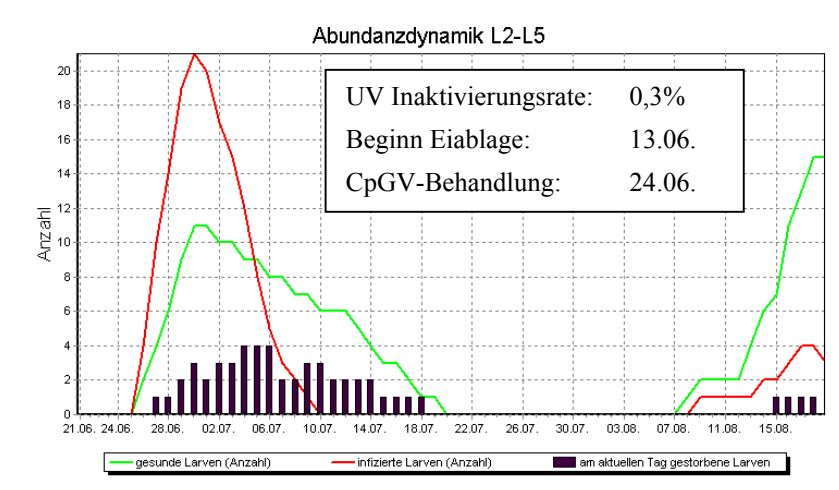


Abb. 6.1: Simulation der L2-L5 Abundanzen bei einer UV-Inaktivierungsrate von 0,3 %.

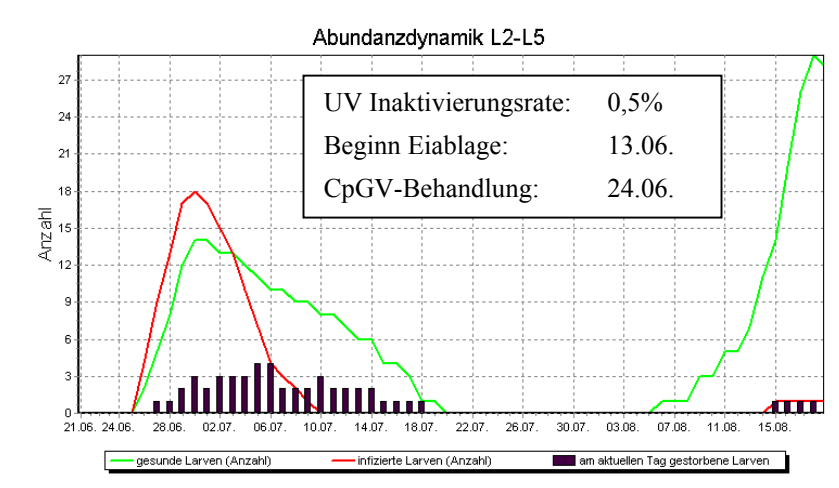


Abb. 6.2: Simulation der L2-L5 Abundanzen bei einer UV-Inaktivierungsrate von 0,5 %.

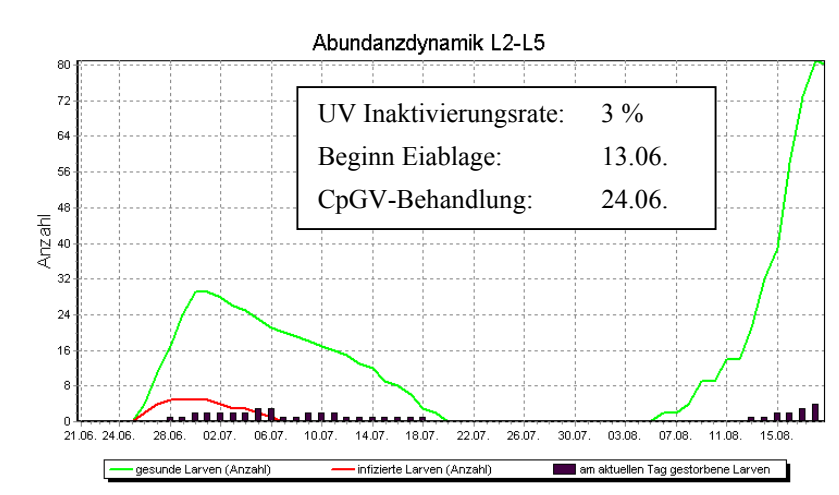


Abb. 6.3: Simulation der L2-L5 Abundanzen bei einer UV-Inaktivierungsrate von 3 %.

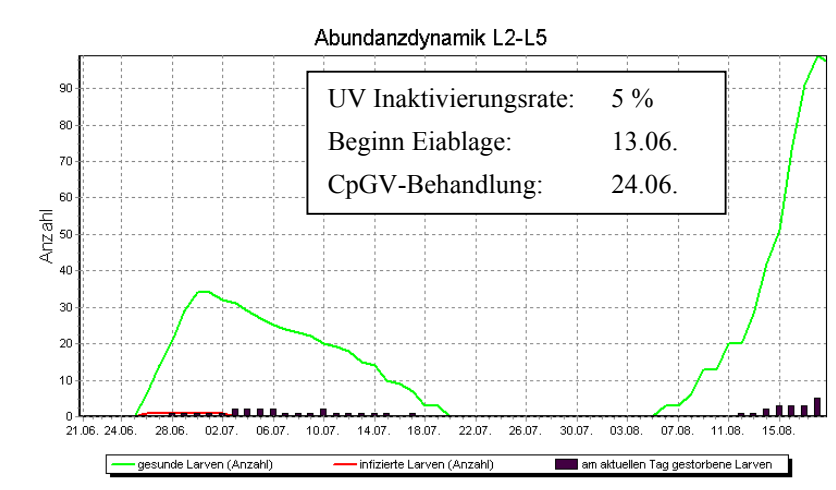


Abb. 6.4: Simulation der L2-L5 Abundanzen bei einer UV-Inaktivierungsrate von 5 %.

6.3.3 Simulationen zur vertikalen Transmission in Kombination mit horizontaler Transmission

Wahrscheinlich spielen die vertikale und eventuell auch die horizontale Transmission eine Rolle für den natürlichen Erhalt des CpGV. Beide Transmissionsformen wurden ausführlich in Kap. 3-5 behandelt, wobei die Resultate eher auf eine effizientere vertikale Transmission hinweisen. Unklar ist jedoch wie sich die extrem hohe Virulenz des CpGV gegenüber dem Apfelwickler (Kap. 2.2.3) mit einer vertikalen Transmission vereinbart. Im Modell beschreibt der Parameter virusbedingte Mortalitätsrate welcher Anteil der infizierten Larven tatsächlich an der Virusinfektion stirbt und demzufolge auch welcher Anteil der Larven subletal infiziert bzw. kontaminiert ist und diese Infektion an die Nachkommen übertragen kann. Für die vertikale Transmission ist also der Parameter virusbedingte Mortalität von wesentlicher Bedeutung. Außerdem stellte sich in Simulationen heraus, dass auch die natürliche Mortalität des L2-L5 Stadiums das Ausmaß an kontaminierten Tieren mit beeinflusst (siehe Anhang). Um die Zusammenhänge zwischen vertikaler Transmission, virusbedingte Mortalitätsrate und natürlicher Mortalität besser verstehen zu können, wurden diese Parameter in Simulationen zur Apfelwicklerpopulationsdynamik variiert.

Eine ausschließlich horizontale Transmission ist vermutlich nicht ausreichend, um den Erhalt des CpGV zu gewährleisten (Kap. 4). In Simulationen sollte getestet werden, inwieweit sie jedoch die Gesamttransmission steigern kann. Die horizontale Transmission wurde in Kombination mit der vertikalen Transmission in drei Szenarien simuliert.

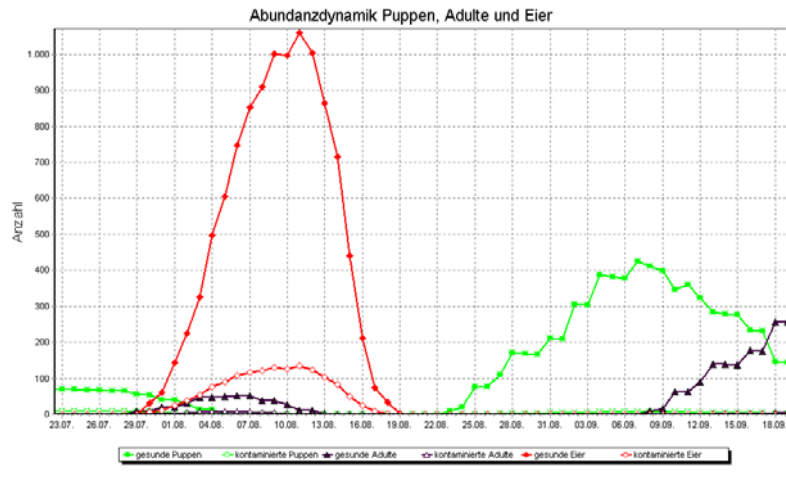


Abb. 6.5: Simulation der Abundanzdynamik von Puppen, Adulten und Eiern mit vertikaler Transmission (natürliche Mortalität L2-L5 = 0,15; virusbedingte Mortalität = 0,75; Faktor für Begegnung mit Virusflecken=0).

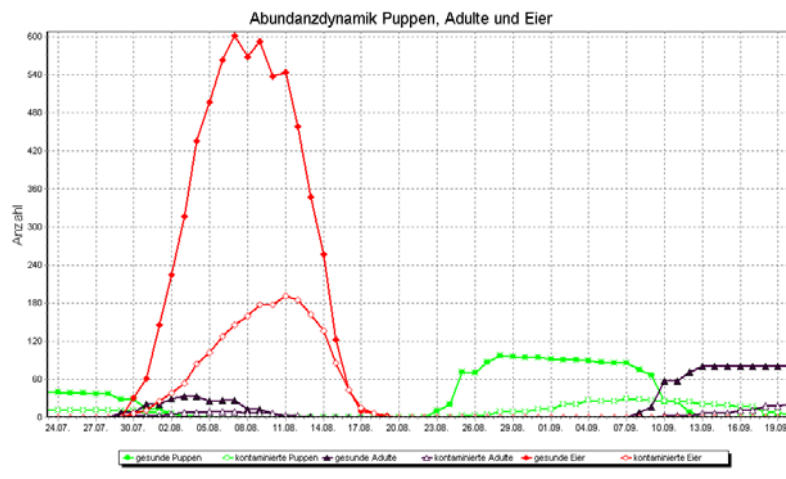


Abb. 6.6: Simulation der Abundanzdynamik von Puppen, Adulten und Eiern mit vertikaler und horizontaler Transmission (natürliche Mortalität L2-L5 = 0,15; virusbedingte Mortalität = 0,75; Faktor für Begegnung mit Virusflecken = 0,5; Anteil der außerhalb des Apfels sterbenden infektiösen Larven = 0,5).

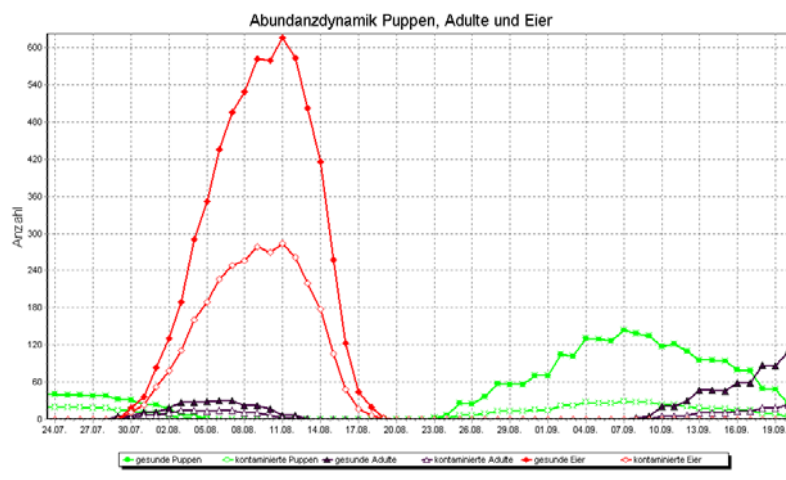


Abb. 6.7: Simulation der Abundanzdynamik von Puppen, Adulten und Eiern mit vertikaler Transmission (natürliche Mortalität L2-L5 = 0,5; virusbedingte Mortalität = 0,3; Faktor für Begegnung mit Virusflecken = 0).

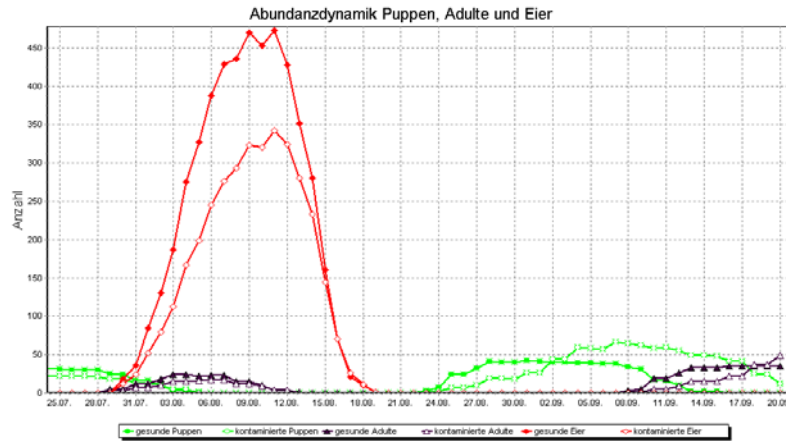


Abb. 6.8: Simulation der Abundanzdynamik von Puppen, Adulten und Eiern mit vertikaler und horizontaler Transmission (natürliche Mortalität L2-L5 = 0,5; virusbedingte Mortalität = 0,3; Faktor für Begegnung mit Virusflecken = 0,5; Anteil der außerhalb des Apfels sterbenden infektiösen Larven = 0,5).

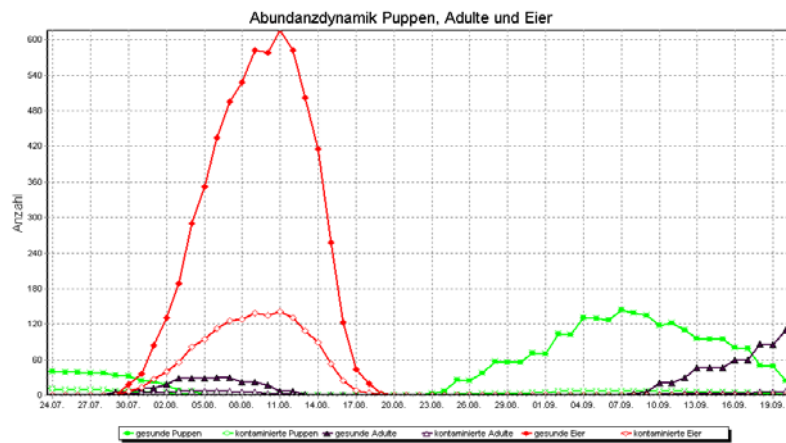


Abb. 6.9: Simulation der Abundanzdynamik von Puppen, Adulten und Eiern mit vertikaler Transmission (natürliche Mortalität L2-L5 = 0,5; virusbedingte Mortalität = 0,4; Faktor für Begegnung mit Virusflecken = 0).

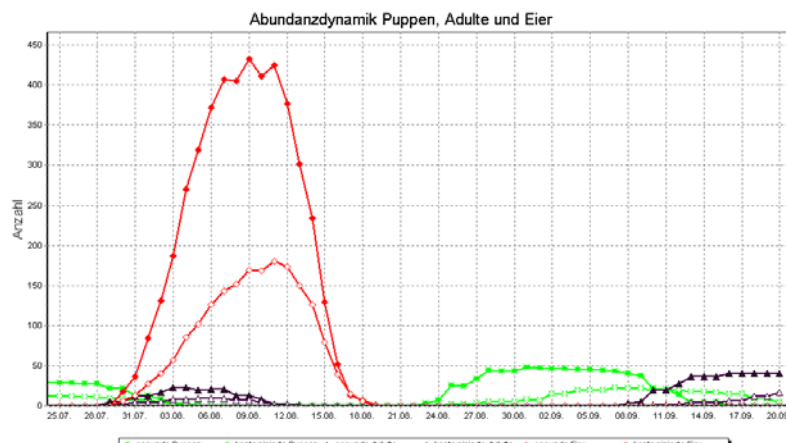


Abb. 6.10: Simulation der Abundanzdynamik von Puppen, Adulten und Eiern mit vertikaler und horizontaler Transmission (natürliche Mortalität L2-L5 = 0,5; virusbedingte Mortalität = 0,4; Faktor für Begegnung mit Virusflecken = 0,5; Anteil der außerhalb des Apfels sterbenden infektiösen Larven = 0,5).

Erwartungsgemäß zeigten die Simulationen, dass durch die horizontale Transmission mehr kontaminierte Tiere im System vorhanden waren (Abb. 6.5-6.10). Bei einer ausschließlich vertikalen Transmission waren in zwei aus drei Simulationen bereits in der zweiten Generation keine Puppen und Adulttiere kontaminiert (Abb. 6.5 und Abb. 6.9). Lediglich bei einer virusbedingten Mortalitätsrate von 0,3 und einer natürlichen Mortalitätsrate der L2-L5 Larven von 0,5 konnten sich kontaminierte Tiere bis an das Ende der zweiten Generation halten (Abb. 6.7). Doch auch hier war das Verhältnis zu den gesunden Tieren im Vergleich zur ersten Generation deutlich verringert. Die einzige der sechs durchgeführten Simulationen, bei der ausreichend Tiere für eine dritte Generation bzw. für ein Winterüberdauern vorhanden waren, hatte Parameterwerte von 0,3 für die virusbedingte Mortalitätsrate und 0,5 für die natürliche Mortalitätsrate der L2-L5 Larven für die vertikale Transmission und die bereits erwähnten Werte für die horizontale Transmission.

6.4 Diskussion

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 CpGV 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. Die Parameter wurden in ein mathematisches Modell integriert, das diese Interaktion auch quantitativ beschreiben 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. Es ist als Werkzeug geeignet, die Einflüsse der CpGV-Applikation, den Zeitpunkt der Applikation und die ausgebrachte Virusmenge auf die Kontrolle des Apfelwicklers analytisch zu untersuchen. Viele dieser Aspekte nehmen direkten Bezug zur aktuellen Pflanzenschutzpraxis, in der das 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. 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 (wie z.B. *Helicoverpa armigera* und das HaSNPV auf Baumwolle) und damit dem Virus nur für kurze Zeit ausgesetzt sind.

Das Modellverhalten wurde mittels Sensitivitätsanalyse hinsichtlich seiner Stabilität und Plastizität überprüft. Auch erste Modellverifizierungen, die anhand der erhobenen Freilanddaten zur Bestimmung der horizontalen Transmission und Persistenz des CpGV durchgeführt wurden (Kap. 4), ergaben eine sehr gute Übereinstimmung zwischen den beobachteten Werten und den Simulationswerten (Tab. 6.5), was auf eine sehr gute Modellperformance schließen lässt.

In Szenariosimulationen wurde das Verhalten der Apfelwicklerpopulation bei veränderter UV-Stabilität gezeigt. Dabei stellte sich die Inaktivierungsrate als ein sehr sensitiver Parameter dar, bei dem kleine Änderungen große Auswirkungen auf die Populationsgröße der Insekten haben. Die Simulationsrechnungen zeigen, dass durch einen verbesserten UV-Schutz eine direkte Wirkung auf die erste Generation und eine indirekte Wirkung auf die zweite Generation erzielt werden könnte. Eine Etablierung des Virus in der Wicklerpopulation war 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. In der Praxis könnte ein verbesserter UV-Schutz durch Applikationszusätze (Hunter-Fujita *et al.*, 1998) oder gentechnische Verfahren (Petrik *et al.*, 2003) erreicht werden.

Die Szenariosimulationen zur vertikalen und horizontalen Transmission zeigen, dass beide Faktoren im Modell kaum Auswirkungen auf die Größe der Apfelwicklerpopulation haben. Eine vertikale Transmission kann erst dann gemessen werden, wenn möglichst viele kontaminierte Tiere überleben. Im Modell wurde die Anzahl der kontaminierten Tiere durch eine niedrige virusbedingte Mortalität und eine niedrige natürliche Mortalität der Tiere maximiert. Eine niedrige virusbedingte Mortalität bedeutet, dass nur wenige der infizierten Tiere sterben, der Rest aber als Kontaminierte überlebt. In den durchgeführten Simulationen beeinflusst eine niedrige virusbedingte Mortalität zum einen die erste Apfelwicklergeneration, die sich an dem einmalig applizierten CpGV infiziert hat, zum anderen aber auch die zweite Generation, die sich über die horizontale Transmission infiziert hat. Die Auswirkungen der

Mortalitätsrate der L2-L5 Larven sind im Zusammenhang mit der Anzahl der kontaminierten Tieren weniger eindeutig. Im Vergleich zu den anderen Lebensstadien ist die natürliche Mortalitätsrate nur bei den L1 und den L2-L5 Larven relativ hoch. Da der Infektionszyklus im Modell mit den L1-Larven der ersten Generation beginnt, kontaminierte Larven aber erst im L2-L5 Stadium entstehen, ist zu Beginn der Simulation die natürliche Mortalität der L1-Larven für die Anzahl der kontaminierten Tiere unbedeutend. Im Modell ist sie erst ab der zweiten Generation von Bedeutung, da hier erstmals kontaminierte L1-Larven auftreten. Somit ist es hauptsächlich die niedrige natürliche Mortalität der L2-L5 Larven, die das Überleben kontaminierter Larven begünstigt. Aus biologischer Sicht ist jedoch eine niedrige natürliche Mortalität, von der die Simulationen in Abb. 6.6 und 6.7 ausgehen, eher unwahrscheinlich, da besonders L5-Larven, die den Apfel verlassen, vielen Gefahren ausgesetzt sind. Demzufolge wäre für das Entstehen ausreichender kontaminierter Tiere eine niedrige virusbedingte Mortalitätsrate (Abb. 6.7 und 6.8) notwendig. Aber auch eine niedrige virusbedingte Mortalität von 0,3 lässt sich biologisch nicht einfach erklären, da das CpGV seinen Wirt sehr effizient töten kann. Die Simulationsergebnisse zeigen jedoch wie wichtig virusbedingte und natürliche Mortalitätsrate kontaminierter Tiere für die vertikale Transmission sind und dass diese beiden Parameter in zukünftigen biologischen Untersuchungen zur vertikalen Transmission keinesfalls fehlen sollten.

Die Simulationen zur vertikalen und horizontalen Transmission haben außerdem angedeutet, dass eine Etablierung des Virus wahrscheinlich nur mit einer effizienten vertikalen Transmission in Kombination mit einer horizontalen Transmission möglich ist. Trotz günstiger Bedingungen wie einer maximierten transstadialen und vertikalen Transmission kann sich das CpGV ohne horizontale Transmission nicht in gleichem Maße als subletale Infektion in kontaminierten Tieren bis in eine dritte Generation halten. Die Simulationen werfen somit interessante Fragen zum Mechanismus der Etablierungsfähigkeit des CpGV auf.

Eine weitergehende Modellvalidierung wäre der natürliche und notwendige nächste Schritt, um die Genauigkeit der getroffenen Modellaussagen zu prüfen und möglicherweise vorhandene Schwachstellen auszumerzen. Beispielsweise wird im Modell derzeit nicht berücksichtigt, dass sowohl ältere Larvenstadien (Kap. 4.3.4) als auch kontaminierte L1-Larven in der Lage sind sich über appliziertes CpGV oder horizontale Transmission zu infizieren. Zwar wird die Infektion kontaminierter Tiere das System bei einer hohen virusbedingten Mortalität vermutlich kaum beeinflussen, doch könnte sie bei einer geringen virusbedingten Mortalität in Kombination mit einer effizienten transstadialen und vertikalen Transmission von Bedeutung sein. 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.

7 ALLGEMEINE DISKUSSION

Evolutionäre Betrachtung der CpGV-Wirt-Interaktion

Das CpGV wurde erstmals 1964 aus vier Apfelwicklerlarven, die aus dem nördlichen Mexiko stammten, isoliert (Tanada, 1964). Die später festgestellte hohe Virulenz und Selektivität gegenüber dem Apfelwickler waren die ausschlaggebenden Eigenschaften für die Entwicklung eines biologischen Kontrollagenz. Nach intensiver Forschung in den 1970er und 1980er Jahren wurden drei Produkte in Europa auf den Markt gebracht (Tab. 1.2). Die CpGV-Forschung konzentrierte sich insbesondere auf für die Anwendung im Freiland relevante Themen: Virulenz des Virus, Wirtsspektrum, Vermehrung bzw. Produktion, Haltbarkeit bzw. Inaktivierungsrate, Spritzabstände und –zusätze (Falcon & Huber, 1991). Auch heute ist es noch immer eines der wenigen Baculovirusinsektizide, die erfolgreich in der Praxis eingesetzt werden.

Das natürliche Auftreten des CpGV wurde im Allgemeinen für gering gehalten, da das Virus nur selten isoliert wurde (Evans & Entwistle, 1987; Huber, 1998). Auch bei mehrfacher Anwendung wurde angenommen, dass das CpGV, aufgrund der raschen Inaktivierung durch UV-Strahlung, wenig Möglichkeiten besitzt sich im Freiland zu etablieren. Diese Annahme wurde durch Studien unterstützt, die zeigen, dass im Jahr nach der CpGV-Applikationen keine oder kaum viröse Larven gefunden wurden (Huber & Dickler, 1977). Dabei wurde in den vergangenen Jahren das Vorkommen von Baculoviren größtenteils nur anhand von Funden viröser Larven abgeleitet. Mit dieser Methode wurde somit ein Großteil der infizierten (z.B. subletal infizierte Virusträger) oder auch toten, lysierten Larven möglicherweise nicht erfasst. Hingegen lässt sich mit molekularbiologischen Methoden, die es erlauben, eine Infektion vor dem Tod des Insektes festzustellen, das CpGV-Vorkommen in Apfelwicklerpopulationen besser abschätzen. Eastwell *et al.* (1999) haben mittels PCR-Nachweis erstmals ein durchschnittliches CpGV-Vorkommen von 23% in fünf verschiedenen Apfelwicklerpopulationen in Kanada festgestellt. Dies weist auf das Vorliegen einer erfolgreichen evolutionären Strategie hin.

Im Gegensatz zu 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 natürlichen Epizootien auf. Hierfür reicht die Populationsdichte des Apfelwicklers in der Regel nicht aus. Anders als bei den genannten Insektenarten scheidet für den Apfelwickler außerdem ein Virus als Regulationsmechanismus

vermutlich aus. Vielmehr gibt es Hinweise dafür, dass eine Apfelwicklerpopulation durch Räuber oder die Anzahl an Verpuppungsverstecken reguliert wird (Geier, 1961). Der Apfelwickler zählt zu den K-Strategen, die durch eine niedrige Reproduktionskapazität gekennzeichnet sind und eine verhältnismäßig stabile Populationsdichte nahe der *carrying capacity* (K) haben. Besonders für Pathogene dieser K-Strategen gilt, dass sie ein ausgewogenes Verhältnis zwischen einem erfolgreichen Infektionsmechanismus und einem nicht Ausrotten ihres Wirtes erreichen müssen (Evans & Entwistle, 1987). Folglich könnte das CpGV auf einem konstanten Niveau als Endzootie mit seinem Wirt coexistieren.

Wichtigste Übertragungsformen für Pathogene sind die horizontale sowie die vertikale Transmission. Bei einer horizontalen Transmission wird das Pathogen oder die Infektion auf Artgenossen der gleichen Generation übertragen, was bei den meisten Baculoviren bedeutet, dass eine Larve an der Infektion stirbt und eine zweite Larve die durch sie freigesetzten Viren aufnehmen kann. Diese Art der Transmission ist sowohl abhängig von der Wirts- als auch von der Pathogendichte. Bei jeweils einer virustoten und einer gesunden L1-Larve je Apfel konnte in Laborversuchen auf losen Äpfeln eine horizontale Transmissionsrate von ~40% festgestellt werden. Diese relativ hohe Rate wurde, trotz der geringen Wahrscheinlichkeit auf der Apfeloberfläche auf Artgenossen zu treffen, erreicht (Kap. 3). Bei einer wesentlich geringeren Wirtsdichte in einem Freilandversuch konnte jedoch keine horizontale Transmission gemessen werden (Kap. 4). Außerdem können sich die freigesetzten Viren auch in einem Umweltreservoir sammeln, um dann Larven späterer Generationen zu infizieren. Bisher wurde besonders eine langfristige Persistenz der Baculoviren mit ihrem Fortbestehen in Umweltkompartimenten in Zusammenhang gebracht (Burden *et al.*, 2003). Das wichtigste Umweltreservoir für das CpGV ist wahrscheinlich der Boden. Dort kann es zwar lange Zeit vor der inaktivierenden UV-Strahlung geschützt bleiben (Thompson *et al.*, 1981), doch scheint es keinen direkten Mechanismus zur Rückverlagerung auf den Baum zu geben, denn auch die Entwicklungsstadien (Puppen und Diapauselarven), zu deren Lebensraum der Boden zählt, nehmen keine Nahrung mehr auf. Es ist daher unwahrscheinlich, dass sie das CpGV in den Lebensraum der jüngeren Larven transportieren. In verschiedenen Baculovirus-Wirtsbeziehungen kann eine langfristige Persistenz durch eine vertikale Transmission erreicht werden, bei der das Pathogen bzw. die Infektion an die Nachkommen weitergegeben wird (Burden *et al.*, 2003). Bei einem Wirt wie dem Apfelwickler, der sich unter anderem durch eine geringe Populationsdichte auszeichnet, hat diese Übertragungsform den Vorteil, dass sie unabhängig von der Wirtsdichte ist. Ideal für einen Wirt mit saisonalem Vorkommen ist außerdem, dass das Pathogen vor Umwelteinflüssen geschützt in seinem Wirt überdauern

kann. Beide Eigenschaften und auch die Ergebnisse aus dem Versuch zur vertikalen Transmission (Kap. 5) sprechen für diese Übertragungsform des CpGV.

Nach wie vor ist jedoch unklar, wie ein virulentes Baculovirus wie das CpGV einen Teil der Larven nur subletal infiziert, um dann möglicherweise vertikal übertragen zu werden. Hierfür gibt es mehrere Hypothesen: (i) Es könnte sich um einen Mischgenotypen handeln, der aus einem virulenten und einem avirulenten Genotypen besteht. So konnten Fuxa & Richter (1991) für *Spodoptera frugiperda* und sein NPV durch die Vermehrung der Virusnachkommen aus vertikal infizierten Tieren eine höhere vertikale Transmissionsrate herausselektieren. Dieser Hypothese widerspricht jedoch, dass in den vorliegenden Versuchen das für die Inokulation verwendete CpGV-M1 einen einzigen *in vivo* klonierten Genotypen darstellt. (ii) Alternativ könnte ein in den Insekten latent oder persistent vorhandener avirulenter Genotyp durch die Neuinfektion mit CpGV-M1 aktiviert werden. Berichten zufolge war es in Versuchen gelungen, eine latente oder persistente Baculovirusinfektion durch eine Infektion mit einer zweiten Baculovirusart zu aktivieren (Burden *et al.*, 2003; Cooper *et al.*, 2003). Unterschieden sich die Virusnachkommen von den Viren der Inokulation, konnte dies auf eine Aktivierung der bereits vorhandenen Infektion zurückgeführt werden. Bisher wurde jedoch nicht untersucht ob avirulente CpGV-Genotypen vorkommen. (iii) Eine weitere Hypothese betrifft die in der Natur häufig vorkommenden Mischinfektionen verschiedener Pathogene (z.B. Malakar *et al.*, 1999; Siegel *et al.*, 2001; Ishii *et al.*, 2002). In der Heuschrecke, *Shistocerca gregaria*, wurde bei Mischinfektionen beobachtet wie die Leistung eines virulenten Pathogens durch die Anwesenheit eines avirulenten Pathogens verändert wurde. Bei diesem Wirt agierten die co-infizierenden Pathogene entweder unabhängig voneinander, synergistisch oder antagonistisch, abhängig von den äußeren Umwelteinflüssen und der Abfolge der durchgeführten Infektionen (Thomas *et al.*, 2003). Das erklärt, warum ein an sich virulentes Pathogen sich weniger virulent verhalten kann. Für ein Verständnis der Wirkungsweise des CpGV, insbesondere bei der vertikalen Transmission, wäre es von Nutzen die Gründe für subletale Infektionen zu kennen.

Zusätzlich zu den direkten Übertragungsformen wie die der horizontalen und vertikalen Transmission, kann es sein, dass das CpGV auch von einer indirekten Übertragungsform profitiert. Eine Transmission über Vektoren wurde wegen ihrer Komplexität in den Versuchen jedoch nicht berücksichtigt. Da die *occlusion bodies* (OB) der Baculoviren erst im alkalischen Milieu disintegrieren, können sie die Darmpassage vieler Räuber wie z.B. Vögel oder Laufkäfer intakt passieren (Entwistle *et al.*, 1993; Vasconcelos *et al.*, 1996). Es ist somit nicht unwahrscheinlich, dass diese Tiere als Vektoren für das CpGV in Frage kommen. Zum

Beispiel könnten Meisen (Fam. Paridae), die häufig Räuber des Apfelwicklers sind, das CpGV verbreiten (Glen *et al.*, 1981; Evans & Entwistle, 1987; Mols & Visser, 2002). In Laborversuchen wurde auch die Milbe *Tyrophagus putrescentiae* als Vektor für CpGV beobachtet, wobei die Autoren eher eine äußerliche Übertragung vermuteten, da die OB im Darm teilweise angedaut waren (Szalay-Marzso & Vago, 1975). Neben den genannten biotischen Ausbreitungsmöglichkeiten gibt es auch abiotische Verbreitungsmöglichkeiten wie z.B. Wind oder Regen (Kaupp, 1981; D'Amico & Elkinton, 1995; Fuxa & Richter, 2001). Zu klären wäre, inwieweit diese Faktoren quantitativ zur Persistenz bzw. Etablierungswahrscheinlichkeit des CpGV beitragen.

Außerdem haben diverse Pathogene ein unterschiedliches Potential in Primär-, Sekundär- oder Alternativ-Wirten zu existieren. Erwartungsgemäß wäre es für Pathogene mit einem breiten Wirtsspektrum einfacher ihre Existenz zu sichern als für Pathogene, die für nur einen Wirt spezifisch sind (Tanada & Fuxa, 1987). Für *C. pomonella* ist bisher nur ein sehr kleines Wirtsspektrum bekannt (Kap. 1.1.4). Andererseits ist nicht auszuschließen, dass weitere Insektenarten als Alternativ-Wirte des CpGV eine Rolle bei der Etablierung in der Umwelt spielen. Beispielsweise sind *Choristoneua rosaceana* und *Archips argyrospila*, die ebenfalls in Apfelanlagen vorkommen können, wesentlich unempfindlicher gegenüber dem CpGV (Eastwell *et al.*, 1999). Persistenz und Vermehrung in diesen Wirten könnten einen wesentlichen, wenn nicht sogar den Hauptbeitrag zur Populationsdynamik des Virus leisten.

Anwendungsbezogene Betrachtung der CpGV-Wirt-Interaktion

Im Hinblick auf das zur Zeit in der Pflanzenschutzpraxis eingesetzte natürlich vorkommende CpGV-Isolat, sowie auch auf mögliche gentechnisch veränderte CpGV-Varianten ist eine fundierte Kenntnis der Populationsdynamik des CpGV von großer Bedeutung. So haben die vorliegenden Untersuchungen gezeigt, dass das CpGV nicht nur auf frisch geschlüpfte L1-Larven wirkte, sondern auch ältere Larvenstadien effektiv töten konnte. Ebenso könnte das CpGV durch die vertikale Transmission eine nachhaltige Wirkung auf die Apfelwicklerpopulation ausüben, indem es sich in der Population halten und in jeder Generation erneut Mortalitäten verursachen kann. Obwohl das CpGV die Apfelwicklerpopulation und auch den Schaden erheblich reduzieren kann, haben auf Baculoviren basierende Insektizide den Nachteil, dass sie im Vergleich zu chemischen Insektiziden relativ langsam wirken und einige Tage benötigen, bis ein Fraßstopp und der Tod der Ziel-Organismen eintritt. Nachdem besonders beim Apfel auch oberflächiger Schaden nicht toleriert wird, wäre eine schnellere Wirkung von großem Vorteil. Um die Wirkgeschwindigkeit der Viren zu beschleunigen, wurden Baculoviren in der Vergangenheit

gentechnisch verändert (Bonning & Hammock, 1996). So wurden in den letzten Jahren auch erste gentechnisch veränderte CpGV-Varianten hergestellt (Winstanley, pers. Mitt.). 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 deshalb eine hinreichende Kenntnis ihrer biologischen Eigenschaften und Populationsdynamik unumgänglich.

ZUSAMMENFASSUNG

Das *Cydia pomonella* Granulovirus (CpGV, Fam. *Baculoviridae*) ist ein sehr virulentes und hoch spezifisches Pathogen des Apfelwicklers (*Cydia pomonella*), das seit mehreren Jahren in der Bundesrepublik Deutschland und anderen Ländern der EU als Insektizid zugelassen ist. Wie andere Baculoviren auch befällt es die Larven der Insekten und ist aufgrund seiner Selektivität unbedenklich für Nicht-Zielorganismen. In der Vergangenheit konzentrierte sich die Erforschung des CpGV auf Bereiche, die für die Anwendung im Pflanzenschutz relevant waren, wobei nach fast 20 Jahren nach der ersten Zulassung noch immer nicht bekannt ist, ob und wie sich das CpGV in der Umwelt etablieren kann. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Parameter, mit deren Hilfe die Populationsdynamik des CpGV beschrieben werden kann, analysiert und quantitativ bestimmt. Als populationsdynamische Parameter des CpGV wurden neben den biologischen Eigenschaften wie Virulenz, DNA-Charakterisierung und Quantifizierung der Virusnachkommenschaft insbesondere die horizontale sowie die vertikale Transmission, die Inaktivierung und die Infektion später Larvenstadien untersucht. Letztlich wurden die ermittelten Parameter zusammen mit Daten aus der Literatur in ein mathematisches Modell integriert.

Um die Wahrscheinlichkeit der horizontalen Transmission zu quantifizieren, wurde ein Modellsystem mit losen Äpfeln etabliert, in dem verschiedene Szenarien möglicher horizontaler Transmission unter definierten Laborbedingungen getestet wurden. In Versuchsserien, in denen ein Virusfleck, entsprechend der produzierten Virusmenge einer Eilarve, auf einen Apfel appliziert worden war, war unter den aufgesetzten Apfelwicklerlarven lediglich eine sehr geringe Mortalität von 3 - 6% zu beobachten. Wurde jedoch ein an einer Virusinfektion gestorbenen Larvenkadaver als Inokulum verwendet, lag die Mortalitätsrate aufgesetzter Larven bei über 40%. Diese beobachtete hohe horizontale Transmissionsrate konnte mit dem Verhalten der Larven erklärt werden. Die Larven zeigten eine deutliche Einbohrpräferenz für den Stielansatz bzw. den Kelch, wodurch die Wahrscheinlichkeit des Zusammentreffens einer an der Infektion verendeten Larve mit einer gesunden Larve um ein Vielfaches zunahm.

In einem ähnlich angelegten Freilandversuch konnte eine horizontale Transmission nicht belegt werden. Der Unterschied zur Kontrollgruppe fiel aufgrund einer hohen natürlichen Mortalität und einer damit einhergehenden niedrigen Dichte der Larven zu gering aus. Parallel hierzu wurde außerdem eine Halbwertszeit von 52 Sonnenstunden für das CpGV ermittelt.

Weiterhin konnte festgestellt werden, dass die Mortalität von späteren Larvenstadien, 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.

Der Versuch zur vertikalen Transmission zeigte dass, obwohl die verwendete Apfelwicklerzucht nicht frei von CpGV war, die Mortalitätsrate der Nachkommen subletal infizierter Weibchen (44%) jedoch deutlich höher war als die der Nachkommen subletal infizierter Männchen (28%) und der unbehandelten Kontrolle (27%). Auch in den PCR-Analysen konnte eine größere Menge an CpGV-Trägern bei den Nachkommen subletal infizierter Weibchen (67%) als bei den Nachkommen subletal infizierter Männchen (49%) und bei der Kontrolle (42%) nachgewiesen werden. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass eine Infektion durch subletal infizierte Weibchen vertikal in die nächste Generation übertragen werden kann. Dies lässt erkennen, 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 des Virus zu sehen.

Da die Populationsdynamik des CpGV auf das 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. Letztlich wurden alle Parameter, die die CpGV-Apfelwickler-Beziehung beschreiben, in ein mathematisches Modell GRANULO integriert. Nach einer Sensitivitätsanalyse wurde GRANULO teilweise mit Daten aus den Freilandversuchen verifiziert. Durch Modifikation der Virusparameter im Modell konnte anschließend der Einfluss veränderter biologischer Eigenschaften (UV-Stabilität und Transmissionsraten) der Viren in Simulationen theoretisch erprobt werden. Das beschriebene Modell, das allerdings noch einer weitergehenden Verifizierung und Validierung bedarf, ist eine erste Annäherung an die quantitative Erfassung und Modellierung der Populationsdynamik des Systems CpGV-Apfelwickler.

Die im Zusammenhang mit der Populationsdynamik des Apfelwicklers erhobenen Daten können einen wertvollen Beitrag zur Optimierung von Kontrollstrategien des Apfelwicklers mittels CpGV leisten. Außerdem geben sie Aufschluss über die Etablierungsmöglichkeiten dieses Bioinsektizids.

ANHANG

Modellbeschreibung

GRANULO, das in Borland Delphi 6 geschrieben wurde, ist eine deterministisches und diskretes Modell, bei dem alle betrachteten Prozesse durch ihre Einflussfaktoren genau bestimmt werden und exakt berechenbar sind. Abundanz- bzw. Zustandsänderungen werden taktweise bilanziert. Als Taktzeit des Modells wurde ein Tag gewählt. Als Raumbezug wurde ein Quadratmeter Blattoberfläche angenommen. Als abiotische Einflussfaktoren auf das System wurden Temperatur (Stundenwerte), Niederschlag (Tagessumme) und Sonnenscheindauer (Tagessumme) berücksichtigt. Die einzelnen Prozesse werden nachfolgend erläutert und nochmals in Abb. A.1 zusammengefasst.

Populationsdynamik des Wirtes

Für die Beschreibung der Populationsdynamik des Apfelwicklers wurden folgende Parameter verwendet:

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

Die notwendigen Parameter wurden bereits veröffentlichten Arbeiten entnommen (Kap. 1.2). Ähnlich wie bei anderen populationsdynamischen Modellen von Insekten wurde eine Altersstruktur aufgebaut, bei der Insekten im gleichen Entwicklungs- bzw. Alterszustand in einem Kompartiment zusammengefasst wurden. Für jedes Insekt musste zusätzlich zum Zustand Alter auch der Zustand Infektion betrachtet werden. Letzterer war eine ja/nein bzw. 0/1-Größe.

Ontogenese

Um die ermittelte Entwicklungsdauer einzelner Insektenstadien (Abb. 1.6) für die Berechnung der Ontogenese (Entwicklungsraten) unter Wechseltemperaturen nutzen zu können, wird in diskreten Simulationsmodellen in der Regel der inverse Wert als der Entwicklungsfortschritt pro Zeiteinheit verwendet. Wenn beispielsweise bei 22°C die Entwicklungsdauer eines Stadiums 6 Tage dauert, dann ist der tägliche Entwicklungsfortschritt 0,17. Im Modell besitzt jede Altersklasse eines Kompartiments einen definierten Entwicklungszustand, der den Anteil der in diesem Kompartiment bereits durchlaufenen Entwicklung beschreibt. Diese Zahl liegt immer zwischen 0 (bei Neu-Eintritt) und 1 (beim Übertritt zum nächsten Kompartiment). Erreichen Adulte den Alterszustand 1, scheiden sie aus dem System aus. Für die Berechnung

der Ontogenese der L1-Larven wurde auf der Basis der Ergebnisse in Abb. 1.6 die Annahme gemacht, dass L1-Larven unabhängig von der Temperatur einen Tag alt werden, ehe sie ins L2-Stadium übergehen.

Natürliche Mortalität

Im Modell wird zwischen virusbedingter und natürlicher Mortalität unterschieden. Die Mortalität wird als natürlich bezeichnet, wenn sie nicht CpGV-infektionsbedingte Ursachen hat, wie z.B. Vogelfraß, andere Krankheiten oder Starkniederschlag. Aus der Literatur bekannte natürliche Mortalitätsraten sind in Tab. 1.3 aufgelistet und können vom Nutzer eingegeben werden. Die aktuell natürliche Mortalitätsrate ergibt sich aus dem Produkt von Entwicklungsfortschritt pro Tag und Gesamtsterberate des Kompartiments.

Virusbedingte Mortalität

Da angenommen wurde, dass sich ausschließlich Larven im L1-Stadium infizieren können (vgl. Kap. 3) und dieses Stadium nur einen Tag dauert, gehen infizierte L1-Larven vor ihrem Tod in das L2-Stadium über. Die Berechnung der virusbedingten Mortalität betrifft im Modell daher nur Larven im L2- bis L5-Stadium. Sie basiert auf dem Entwicklungsfortschritt pro Tag und den beiden als Viruseigenschaften deklarierten Parametern Infektiosität und Wirkgeschwindigkeit.

Reproduktion

Die Anzahl der täglich abgelegten Eier wurde in grober Anlehnung an Blago (1992) in Abhängigkeit von der Temperatur um 19.00 Uhr berechnet. Die Verteilung der Eiablage wurde dabei wie folgt abgebildet:

temp (19.00 Uhr)	< 16°C	keine Eiablage
temp (19.00 Uhr)	= 16°C	4 Eier pro Weibchen pro Tag
temp (19.00 Uhr)	≥ 24°C	8 Eier pro Weibchen pro Tag
temp (19.00 Uhr)	16°C < x < 24°C lineare Interpolation.	

Für die Gesamtlegeleistung pro Weibchen wurden Werte aus der Literatur herangezogen (Tab. 1.5). Im Modell wurde angenommen, dass keine Unterschiede im Eiablageverhalten und in der Eilegeleistung zwischen nicht infizierten und kontaminierten Weibchen vorhanden sind. Wie groß der Anteil infizierter bzw. kontaminierter Eier ist, die von infizierten Weibchen abgelegt werden, kann im Modell jederzeit variiert werden.

Die Virusdynamik

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

- (1) die Virenmenge (applizierte Viren und viröse Larvenkadaver=Virusflecken)
- (2) die Inaktivierungsrate
- (3) die Infektiosität, Wirkgeschwindigkeit und virusbedingte Mortalitätsrate
- (4) die horizontale und vertikale Transmissionsrate
- (5) die Menge der Virusnachkommen

Auch für das Modell Apfelwickler/CpGV wurde zunächst angenommen, dass sich nur die an der Oberfläche befindlichen L1-Larven mit den Viren infizieren können. Ob sich eine frischgeschlüpfte Eilarve mit applizierten Viren infiziert, hängt von der Infektionsrate und der Dichte der aktiven Viren ab. Die Dichte der aktiven Viren resultiert aus dem Applikationszeitpunkt, 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. Die freigesetzten Virusnachkommen einer abgestorbenen Larve wurden im Modell der Einfachheit halber nicht weiter quantitativ berücksichtigt, sondern jeweils als Virusfleck betrachtet. Diese Virusflecken betreffen wiederum ausschließlich die horizontale Transmission. Larven, die eine Infektion durch applizierte Viren oder Virusflecken überleben, haben die Möglichkeit über eine vertikale Transmission das Virus an ihre Nachkommen weiterzugeben.

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 dem vorgestellten 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. Letztere 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). Als Inaktivierungsrate für das applizierte Virus wurden die von Fritsch & Huber (1989) ermittelten Ergebnisse

herangezogen. Pro Stunde Sonnenschein werden 3% der vorhandenen Viren inaktiviert. Dagegen stellen Virusflecken eine Einheit dar, die einheitlich aktiv oder inaktiv ist. Die Inaktivierung von Virusflecken wird in Abhängigkeit von kumulativer Sonnenscheindauer und stärkeren Tagesniederschlägen berechnet. Es wird angenommen, dass ein Virusfleck nach 100 Sonnenstunden oder 5 mm täglichem Niederschlag inaktiviert bzw. abgespült wurde. Beide Werte können vom Nutzer noch verändert werden. Bei täglichen Niederschlagssummen von mehr als 15 mm verschwinden alle bis zu diesem Ereignis entstandenen Virusflecken. Bei täglichen Niederschlägen zwischen 5 mm und 15 mm wird der Verlust an Virusflecken durch eine lineare Interpolation berechnet.

Infektionsrate und Wirkgeschwindigkeit

Infektionsrate und Wirkgeschwindigkeit beschreiben in quantitativer Form die Wirkung des Virus auf die Larve. Im Modell betreffen sie ausschließlich das applizierte Virus. Auf Grund der Biologie des Apfelwicklers wurde zunächst angenommen, dass sich nur das erste Larvenstadium (L1) an der Apfeloberfläche und auf Blättern infizieren kann. Diese Annahme wurde im Freilandversuch widerlegt (Kap. 4) und sollte zukünftig berücksichtigt werden. Die Infektionsrate ergibt sich aus der Aufnahmerate von Einschlusskörpern und der Infektiosität der Viren. Die Anzahl der von einer L1-Larve aufgenommenen Viren (z_{av}) wird folgendermaßen berechnet:

$$z_{av} = a * \text{Virenanzahl}$$

Virenanzahl = Anzahl der durch Spritzung gleichmäßig im System verteilten Viren bezogen auf 1m^2

$a =$ Faktor für Virenaufnahme

Die Infektiosität wird mittels Bioassays durch die LD_{50} (Dosis bei der 50% der Larven sterben) parametrisiert und als Wahrscheinlichkeitsereignis berechnet. Es wird somit angenommen, dass jedes aufgenommene OB die gleiche Wahrscheinlichkeit p hat, eine akute Infektion auszulösen und alle Larven gleichermaßen empfänglich für das Virus sind. Die Infektiosität p eines Viruspartikels wird folgendermaßen berechnet:

$$p = 1 - e^{-0,693/LD_{50}}$$

Mit dieser Berechnung ergibt sich beispielsweise bei einer LD_{50} von 1 OB eine Infektiosität von 0,5, bei einer LD_{50} von 2 OB eine Infektiosität von 0,29 und bei einer LD_{50} von 5 eine Infektiosität von 0,13.

Die Anteil der inokulierten Larven der bei einer bestimmten Infektiosität p stirbt (= M , Mortalität) kann anschließend mit

$$M = 1 - (1 - p)^n$$

kalkuliert werden, wobei n für die Infektionsdosis steht. Hätte das Virus eine Infektiosität von 0,13 und die Larve würde 10 Einschlusskörper aufnehmen, dann würde sie sich mit 75%-iger Wahrscheinlichkeit infizieren.

Die Wirkgeschwindigkeit stellt die Sterberate dar und wird in Bioassays mit einer LT_{50} (Zeitraum, nach dem 50% der Larven an der Virusinfektion gestorben sind) bzw. mit einer ST_{50} (Zeitraum, nach dem 50% der Larven eine Virusinokulation überlebten) bestimmt. Sie bezieht sich auf alle bis zur Verpuppung virusbedingt gestorbenen Larven. Obwohl in Laborexperimenten festgestellt wurde, dass sich die Wirkgeschwindigkeit in Abhängigkeit von der Temperatur ändert (Kap. 2.3.2.4), ergab sich im Modell bezogen auf den Entwicklungszustand nur eine sehr geringe Schwankungsbreite (0,5). Für die Wirkgeschwindigkeit wurde deshalb auf eine Temperaturabhängigkeit verzichtet. Die virusbedingte Mortalitätsrate wird im Modell definiert als der maximale Anteil an Larven, der bei einer vorgegebenen Dosis bis zur Verpuppung stirbt.

$$\text{virusbedingte Mortalitätsrate} = \frac{\text{Anzahl virusbedingt gestorbener Larven (AvgL)}}{\text{Anzahl infizierter Larven}}$$

bzw.

$$\text{virusbedingte Mortalitätsrate} \sim \frac{\text{AvgL}}{\text{AvgL} + \text{Anzahl kontaminierter Puppen}}$$

Horizontale Transmissionsrate

Eine 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, da sich diese zunächst am Ort der lysierten Larve konzentrieren. Die horizontale Transmissionsrate ist die Wahrscheinlichkeit, dass eine Larve beim Durchqueren eines Virusflecks oder beim Einbohren in der Nähe eines solchen Flecks, Viren aufnimmt und dadurch infiziert wird. Sie wird somit größtenteils durch das Verhalten der Larven bestimmt.

Dem Modell liegt die Annahme zu Grunde, dass sich die Larven nur an der Apfeloberfläche durch Virusflecken infizieren können. Wie stark dieser Prozess zum Befall der Apfelwicklerpopulation beiträgt, hängt daher unter anderem davon ab, wie hoch der Anteil der an der Apfeloberfläche befindlichen Larvenkadaver ist. Bei der horizontalen Transmission wird keine Virenaufnahme berechnet, da angenommen wird, dass sich die Larve nach Kontakt mit einem Virusfleck, der eine sehr hohe Dichte an Viren enthält, sofort infiziert. Die Wahrscheinlichkeit, auf einen Virusfleck zu treffen, hängt von der Anzahl der vorhandenen Virusflecken ab und kann im Programm durch den *Faktor für Begegnung mit Virusflecken* variiert werden.

Vertikale Transmission

Die vertikale Transmission setzt voraus, dass nicht alle Virus-infizierten Larven an einer Infektion sterben und dass Individuen trotz Wechsel ins nächste Kompartiment Virusträger bleiben. Diese subletal infizierten Individuen werden als kontaminiert bezeichnet. Inwieweit das Virus auch bei der Häutung in den weiteren Entwicklungsstadien des Insektes erhalten bleibt, bestimmt die transstadiale Transmission. Von einer vertikalen Transmission spricht man dann, wenn das Virus an die Nachkommen übertragen wird. Im Modell äußert sich dies als Anteil der kontaminierten Eier eines kontaminierten weiblichen Adulttieres. Nicht infizierte Larven und kontaminierte Larven entwickeln sich über L2-L5 zu Puppen und Adulten, die sich wiederum vermehren. Für die Insekten laufen somit der gesunde Entwicklungszyklus und der kontaminierte Entwicklungszyklus parallel zu einander ab (Abb. A.1).

Simulationsbeginn und Input

Nach Auswahl eines Jahres mit den dazugehörigen Wetterdaten einer Wetterstation startet das Programm mit dem berechneten oder bonitierten Beginn der Eiablage der Apfelwicklerweibchen und endet an dem vom Nutzer vorgegebenen Termin, spätestens jedoch am 31.10. des jeweiligen Jahres. Eine Abbildung der Überwinterungsprozesse ist daher nicht vorgesehen. Für den berechneten Beginn der Eiablage wird die Temperatursummenformel von Gottwald (1996) verwendet, bei der ab dem 1.3. die Gradstunden über der Schwelle von 10°C addiert werden. Der Tag, an dem die Gradstundensumme den Wert 5700 erreicht, wird als Simulationsstart definiert. Die Anzahl der zu Simulationsbeginn sich im System befindlichen Apfelwickleradulten wird durch den Nutzer per Eingabe bestimmt. Da das Modell voraussetzt, dass sich zu Simulationsbeginn

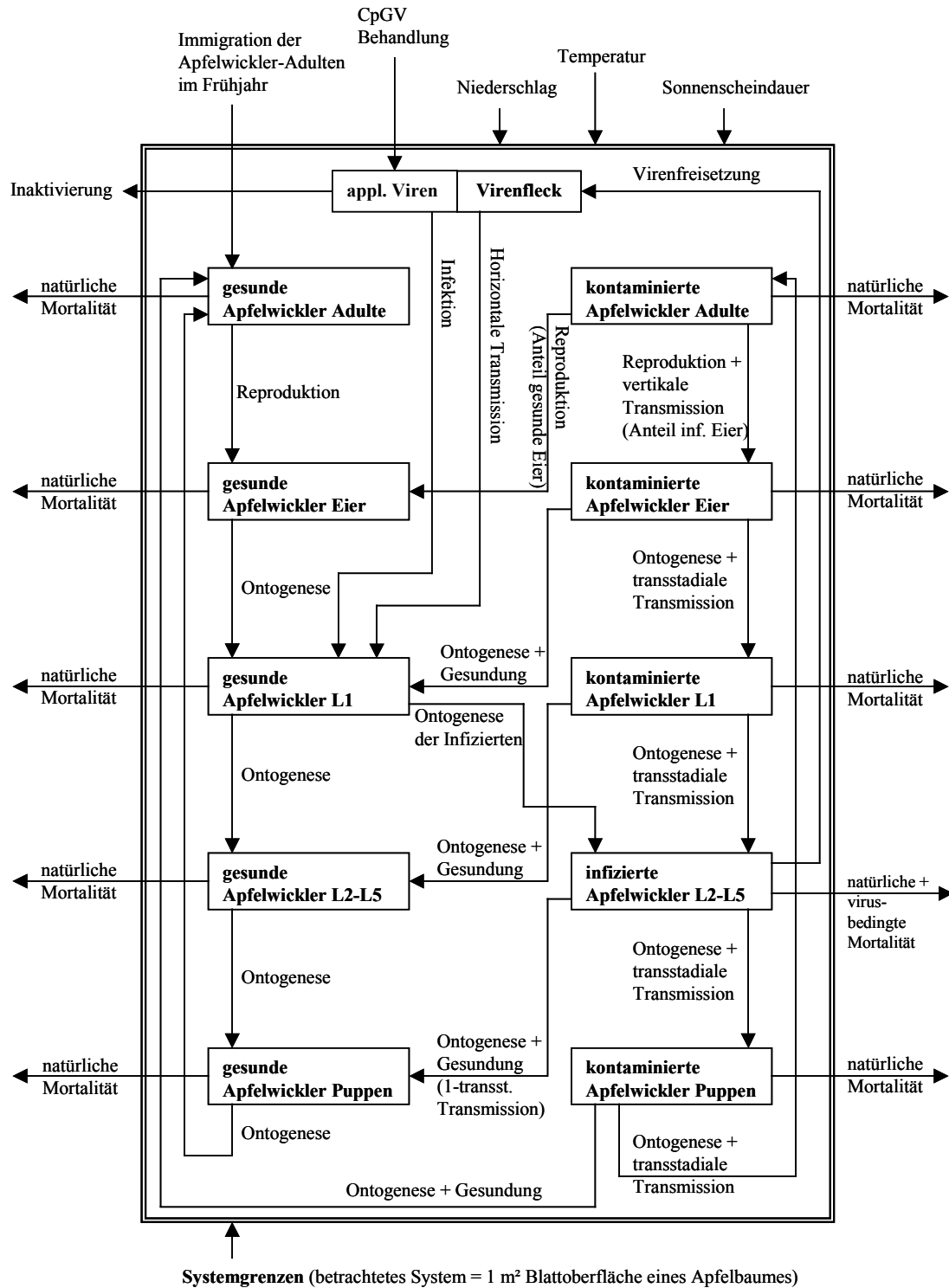


Abb. A.1: Grobstruktur des Modells GRANULO. Infektion = Virusmenge, Infektiosität; Horizontale Transmission = Faktor für Begegnung mit Virusflecken, Anteil außerhalb sterbender infektiöser Larven; Gesundung = 1 – transstadiale Transmission.

keine Viren im System befinden und die Viren vorwiegend durch menschliche Aktivitäten in das System gelangen, muss der Nutzer auch alle während des Simulationszeitraumes durchgeführten CpGV-Applikationen dem Modell als Inputfaktor mitteilen. Die vom Modell-Nutzer einstellbaren Parameter sind in Tab. A.1 dargestellt.

Tab. A.1: Vom Modell-Nutzer einstellbare Parameter (Dateiname in Klammern) mit Beispielen realistischer Parameterwerte, die auch für die Sensitivitätsanalyse (Tab. A.2) verwendet wurden.

ANFANGSBELEGUNG (granulo.anf)	
Beginn Eiablage	0
Termin für die Eiablage (TT.MM.)	01.06.
Simulationseende (TT.MM.)	20.09.
Anzahl Apfelwickler-Adulte (bezogen auf m ² Blattoberfläche)	6
BEHANDLUNGEN (ausbring.par)	
Anzahl ausgebrachter Viren pro Behandlung (bezogen auf m ² Blattoberfläche)	2.000.000
APFELWICKLER ADULTEN (aw_adult.par)	
Geschlechterverhältnis (Weibchen-Anteil)	0,5
Anzahl Eier pro Weibchen	80
Anteil infizierter Eier der Gesamtlegeleistung kontaminierter 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
virusbedingte Mortalitätsrate (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

Output

Nach einer Simulation wird die tägliche Abundanz der Viren und jeweiligen Insektenstadien tabellarisch und grafisch dargestellt. Zum besseren Verständnis wird auch der Witterungsverlauf als Grafik angeboten.

Sensitivitätsanalyse

Mit einer Sensitivitätsanalyse sollten diejenigen Parameter identifiziert werden, deren Variation zu gravierenden Änderungen der Modellergebnisse führten. Insbesondere sollte festgestellt werden, welche Änderungen der Viruseigenschaften die Populationsdynamik des Apfelwicklers stark beeinflussten. Als Vergleichskriterien dienten das *Abundanzmaximum L2-L5*, *Abundanzintegral L2-L5*, *Termin für Abundanzmaximum* und *Dauer für Starkbefall*. Das Abundanzmaximum oder auch der Zeitpunkt der maximalen Befallsstärke (1 Tag) ist ebenso wie das Abundanzintegral für viele Bekämpfungsmaßnahmen 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 bis auf die Simulationen zur horizontalen und vertikalen Transmission jeweils auf die erste Apfelwicklergeneration. Für die zweite Apfelwicklergeneration wurden die selben Kriterien verwendet.

Szenariorechnungen, bei denen jeweils ein Parameter gegenüber der Standardvariante geändert wurde und seine Auswirkung auf die Vergleichskriterien untersucht wurde, ergaben, dass die Anzahl der Adulten zu Beginn der Simulation, die Anzahl der Eier pro Weibchen, das Geschlechterverhältnis und die Mortalitätsraten (besonders im Ei-Stadium) zu den empfindlichsten Insekten-Parametern zählen. Sie sollten so exakt wie möglich bestimmt werden. Beim Variieren der Viruseigenschaften zeigte sich, dass das Abundanzmaximum deutlich erhöht wurde, wenn die Virenaufnahme der L1-Larven oder entsprechend die Menge der applizierten Viren auf 1/10 herabgesetzt wurden, die virusbedingte Mortalität von 95% auf 50% verringert wurde oder die Virusinaktivierung von 3% auf 5% erhöht wurde (Tab. A.2). Besonders die Inaktivierungsrate stellte sich als ein empfindlicher Parameter heraus. Die Parameter Infektiosität, Wirkgeschwindigkeit und virusbedingte Mortalitätsrate hatten vergleichsweise wenig Auswirkung, da das Abundanzmaximum sowohl die gesunden als auch die mit Virus infizierten, aber noch nicht gestorbenen, Apfelwicklerlarven zusammenfasst. Außerdem reagierte das Modell sehr empfindlich auf eine Erhöhung des Parameters *Anteil der außerhalb des Apfels sterbenden infektiösen Larven*.

Bei einem Vergleich des Abundanzintegrals ergaben sich ähnliche Ergebnisse. Die Veränderungen bewirkten jedoch erwartungsgemäß höhere Änderungsraten für das Abundanzintegral. Die Vergleichskriterien *Termin für Abundanzmaximum von L2-L5* und *Dauer für Starkbefall* wurden durch die für die Sensitivitätsanalyse durchgeführten Parameteränderungen kaum beeinflusst (Tab. A.2).

Tab. A.2: Parameterveränderungen und deren Auswirkung auf Abundanzmaximum, Abundanzintegral und Start der Maximalabundanz für die Sensitivitätsanalyse. Die Parametereinstellungen für das Standardmodell werden in Tab. 6.1 wiedergegeben. Grau hinterlegte Zeilen heben diejenigen veränderten Parameterwerte hervor, die zu $\pm 20\%$ Schwankungen im Abundanzmaximum und Abundanzintegral geführt haben.

Veränderter Parameter	variierter Wert	Abundanzmaximum	Abundanzintegral	Termin Abundanzmaximum	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 Adult-Stadium	0,06	105	1706	178	8
natürliche Mortalitätsrate im Adult-Stadium	0,1	105	1706	178	8
natürliche Mortalitätsrate im Adult-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
natürliche Mortalitätsrate im L1-Stadium	0,2	91	1496	178	8
natürliche Mortalitätsrate im L1-Stadium	0,01	119	1925	178	8
Faktor für Virenaufnahme	0,00002	134	2379	179	9
Faktor für Virenaufnahme	0	151	2770	179	10
Faktor für Virenaufnahme	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

Veränderter Parameter				variierter Wert	Abundanz- maximum	Abundanz- integral	Termin Abundanzmaxi- mum	Dauer [Tage]
Anzahl ausgebrachter Behandlung	Viren	pro		2000000	98	1538	178	8
Anzahl ausgebrachter Behandlung	Viren	pro		200000	134	2380	179	9
Infektiosität				0,2	104	1690	178	8
Infektiosität				0,3	104	1668	178	8
Infektiosität				0,05	114	1902	178	9
Infektiosität				0,1	106	1740	178	9
Wirkgeschwindigkeit				0,6	108	1794	178	9
Wirkgeschwindigkeit				0,7	113	1941	178	9
Wirkgeschwindigkeit				0,3	105	1670	178	9
Wirkgeschwindigkeit				0,4	104	1657	178	8
virusbedingte Mortalitätsrate				1	104	1663	178	8
virusbedingte Mortalitätsrate				0,5	127	2323	178	10
virusbedingte Mortalitätsrate				0,7	115	2012	178	9
UV-Inaktivierungsrate (%)				4	118	2006	178	10
UV-Inaktivierungsrate (%)				5	140	2532	179	9
UV-Inaktivierungsrate (%)				1	91	1410	178	8
UV-Inaktivierungsrate (%)				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

Varierte Parameter relevant für horizontale und vertikale Transmission

Das gleichzeitige Variieren der Parameter *Faktor für Begegnung mit Virusflecken* (0; 0,05; 0,25; 0,5; 0,75; 0,95) und *dem Anteil außerhalb sterbender Larven* (0,25; 0,5; 0,75) bei einer virusbedingten Mortalitätsrate von 0,95 ergaben keine Veränderungen der vier Vergleichskriterien Abundanzmaximum, Abundanzintegral, Termin und Dauer für Starkbefall in der zweiten Apfelwicklergeneration, die größer oder kleiner 20% gegenüber dem für diese Simulationen gewählten Standardmodells (Parameter wie in Tab. 6.3 jedoch mit 3 Adulten pro m² bzw. 8 Adulten pro m² und Spritztermin 13.06.01) waren. Wurden analoge Simulationen mit 8 Adulten pro m² gestartet, wurde das Abundanzmaximum und das Abundanzintegral lediglich bei einem Faktor für Begegnung mit Virusflecken von 0,95 und einem Anteil außerhalb sterbender Larven von 0,75 auf < 80% des Standardmodells herabgesetzt.

Das für eine Sensitivitätsanalyse der vertikalen Transmission größte Hindernis war das seltene Auftreten kontaminierter Tiere. Bei den Standardparametern (Tab. 6.4), 20 Adulten pro m², Infektiosität von 0,13 bzw. 0,25, und maximierter vertikaler Übertragung (transstadiale Transmission von 1 in allen Stadien und Anteil infizierter Eier von 1), waren keine

kontaminierten Tiere vorhanden. Kontaminierte Tiere traten erst bei einer niedrigen natürlichen Mortalität im L2-L5 Stadium (maximal 0,2 bei einer virusbedingten Mortalitätsrate von 0,75) oder einer niedrigen virusbedingten Mortalitätsrate (0,2 bei natürlicher Mortalität von 0,5 für L2-L5) auf. Die vier Vergleichskriterien für L2-L5 (Abundanzmaximum, Abundanzintegral, Termin und Dauer für Starkbefall) eigneten sich nicht für eine Sensitivitätsanalyse der vertikalen Transmission, da hierbei nicht zwischen kontaminierten, infizierten und gesunden Tieren unterschieden wurde.

LITERATURVERZEICHNIS

- 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. & Lüthy, 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 demoeologique du carpocarpse (*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.
- Bathon, H. , Singh, P. & Clare, G. K. (1991).** Rearing Methods. In: *Tortricid Pests. Their Biology, Natural Enemies and Control. Vol. 5 of World Crop Pests*. Eds. L. P. S van der Geest & H. H. Evenhuis. Elsevier, Amsterdam, 283 - 294.
- Beisner, B. E. & Myers, J. H. (1999).** Population density and transmission of virus in experimental populations of the western tent caterpillar (Lepidoptera : Lasiocampidae). *Environmental Entomology* **28**, 1107-1113.
- Biache, G., Perchat, S., Quenin, H. & Aupinel, P. (1999).** Codling moth granulosis: Detection of the viral disease by serological diagnostic method or by PCR. *Phytoma* **514**, 27-33.
- Bianchi, F. J. J. A. (2001).** Process-based modeling of the control of beet armyworm, *Spodoptera exigua*, with baculoviruses in greenhouse chrysanthemum. Dissertation, Wageningen University, 143 pp.
- 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.
- Bonning, B. C. & Hammock, B. D. (1996).** Development of recombinant baculoviruses for insect control. *Annual Review of Entomology* **41**, 191-210.
- Borden, A. D. (1931).** Some field observations on codling moth behavior. *Journal of Economic Entomology* **24**, 1137-1145.
- Boucias, D. G., Johnson, D. W. & Allen, G. E. (1980).** Effects of host age, virus dosage, and temperature on the infectivity of a nucleopolyhedrosis virus against velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatalis*, larvae. *Environmental Entomology* **9**, 59-61.
- Brassel, J. & Benz, G. (1979).** Selection of a strain of the granulosis virus of the codling moth with improved resistance against artificial ultraviolet radiation and sunlight. *Journal of Invertebrate Pathology* **33**, 358-363.
- Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (2004).** <http://www.bvl.bund.de/pflanzenschutz/psmdbstart.htm>
- Burden, J. P., Griffiths, C. M., Cory, J. S., Smith, P. & Sait, S. M. (2002).** Vertical transmission of sublethal granulovirus infection in the Indian meal moth, *Plodia interpunctella*. *Molecular Ecology* **11**, 547-555.
- Burden, J. P., Nixon, C. P., Hodgkinson, A. E., Possee, R. D. Sait, S. M., King, L. A. & Hails, R. S. (2003).** Covert infections as a mechanism for long-term persistence of baculoviruses. *Ecology Letters* **6**, 524-531.
- Butt, B. A. (1975).** Bibliography of the codling moth. *United States Department of Agriculture, Agricultural Research Service ARS W-31*: 221 pp.
- 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.
- Chowdhury, S. (1992).** Characterisation of some aspects of the isolates of *Cydia pomonella* virus (CpGV), PhD Thesis, Department of Microbiology, University of Reading and HRI, Littlehampton, U.K.
- Codling Moth Information Support System (CMISS).**
<http://www.ippc.orst.edu/CodlingMoth/modeling/index.html>

- Cooper, D., Cory, J. S., Theilmann, D. A. & Myers, J. H. (2003).** Nucleopolyhedroviruses of forest and western tent caterpillars: cross-infectivity and evidence for activation of latent virus in high-density field populations. *Ecological Entomology* **28**, 41-50.
- 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.
- Cross, J. V., Solomon, M. G., Chandler, D., Jarrett, P., Richardson, P. N., Winstanley, D., Bathon, H., Huber, J., Keller, B., Langenbruch, G. A. & Zimmermann, G. (1999).** Biocontrol of pests of apples and pears in northern and central Europe: 1. Microbial agents and nematodes. *Biocontrol Science and Technology* **9**, 125-149.
- 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.
- Dwyer, G. (1991).** The roles of density, stage and patchiness in the transmission of an insect virus. *Ecology* **72**, 559-574.
- 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 Columbia. *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.
- 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. & Entwistle, P. F. (1987). Viral Diseases. In *Epizootiology of Insect Diseases*, Eds.: J. R. Fuxa and Y. Tanada. New York: John Wiley & Sons, pp. 257-322.
- Falcon, L. A., Kane, W. R. & Bethell, R. S. (1968). Preliminary evaluation of a granulosis virus for control of the codling moth. *Journal of Economic Entomology* **61**, 1208-1213.
- Falcon, L. A. (1978). Economical and biological importance of baculoviruses as alternates to chemical pesticides. In *Proc. Symp. Safety of Baculoviruses as biological Insecticides, Jülich 1978*, Ed. H. G. Miltenburger. Bonn: Bundesministerium für Forschung und Technologie. pp. 27-46.
- Falcon, L. A. & Huber, J. (1991). Biological control of the codling moth. In *Tortricid Pest: their biology, natural enemies and control*. Eds. L. P. S. v. d. Geest & H. H. Evenhuis. Amsterdam: Elsevier, pp. 355-367.
- Federici, B. A. (1997). Baculovirus Pathogenesis. In *The Baculoviruses*, Ed. L. K. Miller. New York: Plenum Press, pp. 33-59.
- 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. W. (1961).** Numerical regulation of populations of codling moth, *Cydia pomonella* (L.). *Nature* **190**, 561-562.
- Geier, P. W. (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. & 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.
- 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*. Eds. R. R. Granados & B. A. Federici. Boca Raton, Florida, CRC Press, pp. 89-108.
- Gröner, A. (1986).** Specificity and safety of baculoviruses. In *The Biology of Baculoviruses*, Eds. R. R. Granados & B. A. Federici. Boca Raton, Florida: CRC Press, pp. 177-202.
- 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.
- Hails, R. S., Hernandez-Crespo, P., Sait, S. M., Donnelly, C. A., Green, B. M. & Cory, J. S. (2002).** Transmission patterns of natural and recombinant baculoviruses. *Ecology* **83**, 906-916.
- 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.
- Hernandez-Crespo, P., Sait, S. M., Hails, R. S. & Cory, J. S. (2001).** Behavior of a recombinant baculovirus in lepidopteran hosts with different susceptibilities. *Applied & Environmental Microbiology* **67**, 1140-1146.
- Hoerner, J. L. (1925).** Notes on codling moth larvae. *Journal of Economic Entomology* **18**, 423-424.

- Howard, C. R. (1986).** The biology of hepadnaviruses. *Journal of General Virology* **67**, 1215-1235.
- Howard, L. O. (1887).** The codling moth. *Report Commissioner Agriculture*, 88-115.
- Howell, J. F. (1991).** Reproductive biology. In *Tortricid Pests. Their Biology, Natural Enemies and Control. Vol. 5 of World Crop Pests*. Eds. L. P. S van der Geest & H. H. Evenhuis. Elsevier, Amsterdam, pp. 57-174.
- 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.
- 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. & Dickler, E. (1976).** Das Granulosevirus des Apfelwicklers: Seine Erprobung für die biologische Schädlingsbekämpfung. *Zeitschrift für Angewandte Entomologie* **82**, 143-147.
- Huber, J. & Dickler, E. (1977).** Codling moth granulosis virus: its efficiency in the field in comparison with organophosphorus insecticides. *Journal of Economic Entomology* **70**, 557-561.
- 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.
- Huber, J. (1986).** Use of baculoviruses in pest management programmes. In *The Biology of Baculoviruses. Vol. II. Practical Application for Insect Control*. Eds. R. R. Granados & B. A. Federici. Boca Raton, CRC Press, pp. 181-202.
- Huber, J. (1998).** Western Europe. In *Insect Viruses and Pest Management*. Eds. F. R. Hunter-Fujita, P. F. Entwistle, H. F. Evans & N. E. Crook. New York: John Wiley & Sons, pp. 201-215.
- Hughes, D. S., Possee, R. D. & King, L. A. (1994).** Quantification of latent *Mamestra brassicae* nuclear polyhedrosis virus in *M. brassicae* insects using a PCR-scintillation proximity assay. *J Virol Methods* **50**, 21-27.
- 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. *Journal of General Virology* **78**, 1801-1805.
- Hughes, P. R. & Wood, H. A. (1981).** A synchronous peroral technique for the bioassay of insect viruses. *Journal of Invertebrate Pathology* **37**, 154-159.

- Hunter-Fujita, F. R., Entwistle, P. F., Evans, H. F. & Crook, N. E. (Eds.) (1998).** Formulation. In *Insect Viruses and Pest Management*, Chichester, John Wiley & Sons, pp. 117-158.
- Ignoffo, C. M., Rice, W. C. & McIntosh, A. H. (1989).** Inactivation of nonoccluded and occluded baculoviruses and baculovirus-DNA exposed to simulated sunlight. *Environmental Entomology* **18**, 177-183.
- Ishii, T., Takatsuka, J., Nakai, M. & Kunimi, Y. (2002).** Growth characteristics and competitive abilities of a nucleopolyhedrovirus and an entomopox virus in larvae of the smaller tea tortrix, *Adoxophyes honmai* (Lepidoptera: Tortricidae). *Biological Control* **23**, 96-105.
- 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. (1977).** Stability of entomopathogenic viruses. *Misc. Publications of the Entomological Society of America* **10 (3)**, 99-116.
- Jaques, R. P., Laing, J. E., MacLellan, C. R., Proverbs, M. D., Sanford, K. H. & Trotter, R. (1981).** Apple orchard tests on the efficacy of the granulosis virus of the codling moth, *Laspeyresia pomonella* (Lep.: Olethreutidae). *Entomophaga* **26**, 111-118.
- Jaques, R. P., Laing, J. E., Laing, D. R. & Yu, D. S. K. (1987).** Effectiveness and persistence of the granulosis virus of the codling moth *Cydia pomonella* (L.) (Lepidoptera: Olethreutidae) on apple. *Canadian Entomologist* **119**, 1063-1067.
- 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. (1994).** Sicherheitsaspekte der Gentechnologie: Verwandtschaft und Variabilität der Genome des *Cryptophlebia leucotreta* Granulosevirus und des *Cydia pomonella* Granulosevirus. Dissertation, TU Braunschweig. 163 pp.
- Jehle, J. A. (1997).** Bioinsektizide. *Nachr. Chem.Tech. Lab.* **45**, 384-386.
- Jehle, J. A. (2000).** Genetically engineered baculoviruses - New strategies for recombinant protein expression and biological insect control. *Bioforum International* 1/2000, 27-29.
- 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.
- Keddie, B. A., Aponte, G. W. & Volkman, L. E. (1989).** The pathway of infection of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus in an insect host. *Science* **243**, 1728-1730.
- 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. (2003a).** Persistence of the biological effect of codling moth granulovirus in the orchard - a preliminary field trial. *IOBC/wprs Bulletin* **26**, 245-248.
- Kienzle, J., Gernoth, H., Litterst, M., Zebitz, C. P. W. & Huber, J. (2003b).** Codling moth granulovirus - An efficient tool for codling moth control in IPM. *IOBC/wprs Bulletin* **26**, 249-256.
- Krieg, A., Gröner, A., Huber, J. & Zimmermann, G. (1981).** Inaktivierung von verschiedenen Insektenpathogenen durch ultraviolette Strahlen. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten* **88**, 38-48.
- Kukan, B. (1999).** Vertical transmission of nucleopolyhedrovirus in insects. *Journal of Invertebrate Pathology* **74**, 103-111.
- Landolt, P. J., Brumley, J. A., Smithhisler, C. L., Biddick, L. L. & Hofstetter, R. W. (2000).** Apple fruit infested with codling moth are more attractive to neonate codling moth larvae and possess increased amounts of (E,E)-alpha-farnesene. *Journal of Chemical Ecology* **26**, 1685-1699.
- 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.
- 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.
- Malakar, R., Elkinton, J. S., Hajek, A. E. & Burand, J. P. (1999).** Within-host interaction of *Lymantria dispar* (Lepidoptera: Lymantriidae) nucleopolyhedrosis virus and *Entomophaga maimaiga* (Zygomycetes: Entomophthorales). *Journal of Invertebrate Pathology* **73**, 91-100.
- Matthews, H. J., Smith, I. & Edwards, J. P. (2002).** Lethal and sublethal effects of a granulovirus on the tomato moth *Lacanobia oleracea*. *Journal of Invertebrate Pathology* **80**, 73-80.
- Melamed Madjar, V., Raccah, 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. (1996).** Insect viruses. In *Fields Virology*, Third Edition. Eds. B. N. Fields, D. M. Knipe, P. M. Howley *et al.*, Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia. pp. 533-556.
- Mols, C. M. M. & Visser, M. E. (2002).** Great tits can reduce caterpillar damage in apple orchards. *Journal of Applied Ecology* **39**, 888-899.
- Murphy, F. A., Fauquet, C. M., Bishop, D. H. L., Ghabrial, S. A., Jarvis, A. W., 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.
- 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.
- Petrik, D. T., Iseli, A., Montelone, B. A., Van Etten, J. L. & Clem, R. J. (2003)**. Improving baculovirus resistance to UV inactivation: increased virulence resulting from expression of a DNA repair enzyme. *Journal of Invertebrate Pathology* **82**, 50-56.
- 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. Publication #4.
- 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.
- Quénin, H. & Laur, P. (2003)**. Carpovirusine granulosis virus formulation: control of resistant strain of codling moth and study of the vertical transmission of the virus. *Proceedings of the 77th Annual Western Orchard Pest & Disease Management Conference*. 15-17 January, Portland, Oregon, USA.
- Reeson, A. F., Wilson, K., Cory, J. S., Hankard, P., Weeks, J. M., Goulson, D. & Hails, R. S. (2000)**. Effects of phenotypic plasticity on pathogen transmission in the field in a Lepidoptera-NPV system. *Oecologia* **124**, 373-380.
- Ribeiro, H. C. T. & Pavan, O. H. O. (1994)**. Effect of temperature on the development of baculoviruses. *Journal of Applied Entomology* **118**, 316-320.
- 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.

- Santiago-Alvarez, C. & Vargas-Osuna, E. (1986).** Differential mortality between male and female *Spodoptera littoralis* larvae infected with a baculovirus. *Journal of Invertebrate Pathology* **47**, 374-376.
- SAS Institute (2001).** SAS software release 8.2 TS2M0 for Windows, SAS Institute, Cary, NC.
- 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, Thesis, Oregon State University, 129 pp.
- 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.
- Siegel, J. P., Lacey, L. A. & Vossbrinck, C. R. (2001).** Impact of a North American isolate of the microsporidium *Nosema carpocapsae* on a laboratory population of the codling moth, *Cydia pomonella*. *Journal of Invertebrate Pathology* **78**, 244-250.
- Simpson, C. B. (1903).** The codling moth, U.S. Department of Agriculture, Division of Entomology, 105 pp.
- Smith, R. H. (1926).** The efficacy of lead arsenate in controlling the codling moth. *Hilgardia* **1**, 403-453.
- Stairs, G. R. (1978).** Effects of a wide range of temperatures on the development of *Galleria mellonella* and its specific baculovirus. *Environmental Entomology* **7**, 297-299.
- StatSoft, Inc. (1999).** STATISTICA software kernel release 5.5 for Windows. Tulsa, OK.
- Steineke, S. B., Jehle, J. A., Fritsch, E., Undorf-Spahn, K., Huber, J., Rossberg, D. & Backhaus, H. (2002).** Mathematische Modellierung der Populationsdynamik von genetisch veränderten Mikroorganismen am Beispiel von Baculoviren. UBA-Texte 63/02. 157 pp.
- Stephen, F. M.; Yearian, W. C.; Young, S. Y.; Wallis, G. W. (1982).** Preliminary evaluation of codling moth granulosis virus for suppression of Nantucket pine tip moth. *Journal of the Georgia Entomological Society* **17**, 398-403.
- Summerland, S. A. & Steiner, L. F. (1943).** Codling moth oviposition and fate of the eggs. *Journal of Economic Entomology* **36**, 72-75.
- Szalay-Marzso, L. & Vago, C. (1975).** Transmission of Baculovirus by mites. Study of granulosis virus of codling moth (*Laspeyresia pomonella* L.). *Acta Phytopathologica Academiae Scientiarum Hungaricae* **10**, 113-122.
- Tanada, Y. (1964).** A granulosis virus of the codling moth, *Carpocapsa pomonella* (L.) (Olethreutidae, Lepidoptera). *Journal of Insect Pathology* **6**, 378-380.

- Tanada, Y. & Fuxa, J. R. (1987).** The pathogen population. In *Epizootiology of Insect Diseases*. Eds. J. R. Fuxa and Y. Tanada. New York: John Wiley & Sons, pp. 113-157.
- Thomas, M. B, Watson, E. L. & Valverde-Garcia, P. (2003).** Mixed infections and insect-pathogen interactions. *Ecology Letters* **6**, 183-.
- 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.
- 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, San Diego: Academic Press. 1162 pp.
- 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 Agricultural Experimental Station Bulletin, 25 pp.
- Watanabe, H. (1987).** The host population. In *Epizootiology of Insect Diseases*. Eds. J. R. Fuxa and Y. Tanada. New York: John Wiley & Sons, pp. 71-112.
- 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.
- Wearing, C. H. (1979).** Integrated control of apple pests in New Zealand 10. Population dynamics of codling moth in Nelson. *New Zealand Journal of Zoology* **6**, 165-199.
- Wormleaton, S. L. (2000).** Molecular and biological studies on fast and slow killing granuloviruses, PhD Thesis, Horticulture Research International, Wellesbourne, U. K.
- 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.
- Young, S. Y., Lack, J. R. & Yearian, W. C. (1987).** Transmission of a nuclear polyhedrosis virus in *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) larval populations on caged soybeans. *Environmental Entomology* **16**, 691-698.

VERÖFFENTLICHUNGEN

Steineke, S. B., Jehle, J. A., Fritsch, E., Undorf-Spahn, K., Huber, J., Rossberg, D. & Backhaus, H. (2002). Mathematische Modellierung der Populationsdynamik von genetisch veränderten Mikroorganismen am Beispiel von Baculoviren. UBA-Texte 63/02. 157 Seiten.

Steineke, S. B. & Jehle, J. A. (2004) Investigating the horizontal transmission of the *Cydia pomonella* granulovirus (CpGV) in a model system. *Biological Control* **30**, 538-545.

Steineke, S. B. & Jehle, J. A. The contribution of horizontal transmission and infection of late instars to the efficacy of *Cydia pomonella* granulovirus (eingereicht).