

# BÖL

Bundesprogramm  
Ökologischer  
Landbau

## Management der Minderempfindlichkeit von Apfelwicklerstämmen gegenüber dem Apfelwicklergranulovirus

Management of resistance of codling moth strains against CpGV

**FKZ: 05OE023/1**

**Projektnehmer:**

Dienstleistungszentrum ländlicher Raum - Rheinlandpfalz  
Abteilung Phytomedizin  
Breitenweg 71, 67435 Neustadt  
Tel.: +49 6321 671-0  
Fax: +49 6321 671-222  
E-Mail: [dlr-rheinpfalz@dlr.rlp.de](mailto:dlr-rheinpfalz@dlr.rlp.de)  
Internet: <http://www.dlr.rlp.de>

**FKZ: 05OE023/2**

**Projektnehmer:**

Universität Hohenheim  
Institut für Phytomedizin  
Otto-Sander-Straße 5, 70599 Stuttgart  
Tel.: +49 711 459 22400  
Fax: +49 711 459-22408  
E-Mail: [claus.zebitz@uni-hohenheim.de](mailto:claus.zebitz@uni-hohenheim.de)  
Internet: <https://phytomedizin.uni-hohenheim.de/>

**Autoren:**

Jehle, Johannes A.; Asser-Kaiser, Sabine; Fritsch, Eva; Gund, Nadine A.; Heckel, David, Huber, Jürg;  
Kienzle, Jutta; Reineke, Annette; Schulze-Bopp, Stefanie; Undorf-Spahn, Karin; Zebitz, Claus P. W.

Gefördert vom Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz  
im Rahmen des Bundesprogramms Ökologischer Landbau (BÖL)

## Schlussbericht gemäß Nr. 3.1 BNBest-BMf 98

<b>Zuwendungsempfänger:</b>	<b>Dienstleistungszentrum Ländlicher Raum Rheinpfalz, Universität Hohenheim</b>
<b>Förderkennzeichen:</b>	<b>05OE023</b>
<b>Vorhabenbezeichnung:</b>	<b>Management der Minderempfindlichkeit von Apfelwicklerstämmen gegenüber dem Apfelwicklergranulovirus</b>
<b>Laufzeit:</b>	<b>01.01.2006 – 31.12.2009</b>
<b>Berichtszeitraum:</b>	<b>01.01.2006 – 31.12.2009</b>
<b>Koordination und beteiligte Institute:</b>	<b>Koordination:</b> <b>Dr. habil. J. A. Jehle (JKI, Darmstadt)</b> <b>Beteiligte Institute:</b> <ul style="list-style-type: none"><li>• <b>DLR Rheinpfalz, Neustadt/Wstr.</b></li><li>• <b>Julius Kühn-Institut (JKI), Darmstadt</b></li><li>• <b>Universität Hohenheim</b></li><li>• <b>Forschungsanstalt Geisenheim</b></li><li>• <b>Max-Planck-Institut für chemische Ökologie, Jena</b></li><li>• <b>FÖKO e.V., Weinsberg</b></li></ul>

# Inhalt

	<b>Seite</b>
<b>I. Gesamtziel und Aufgabenstellung des Projektes</b>	<b>5</b>
<b>II. Teilprojekte</b>	
<b>Teilprojekt 1</b>	<b>6</b>
<b>Untersuchungen der CpGV-M-Basisempfindlichkeit und der biologischen Fitness von Apfelwicklerpopulationen in Deutschland</b>	
<b>1.1. Arbeitsziele</b>	<b>6</b>
<b>1.2. Material und Methoden</b>	<b>6</b>
<b>1.2.1. Zucht empfindlicher und nicht empfindlicher Apfelwickler-Freilandpopulationen und Untersuchung der Basisempfindlichkeit gegenüber dem CpGV-M</b>	<b>6</b>
<b>1.2.1.1. Herkunft der Freilandstämme des Apfelwicklers</b>	<b>6</b>
<b>1.2.1.2. Züchtung verschiedener Apfelwickler-Freilandstämme im Labor</b>	<b>7</b>
<b>1.2.1.3. Biotests zur Bestimmung der CpGV-M-Basisempfindlichkeit</b>	<b>8</b>
<b>1.2.2. Stabilität der CpGV-M-Resistenz unter Selektionsbedingungen und ohne Selektionsdruck</b>	<b>9</b>
<b>1.2.3. Fitnessvergleich: Biologische Charakterisierung ausgewählter Apfelwicklerpopulationen hinsichtlich ihrer Fertilität, Fekundität und Entwicklungsdauer</b>	<b>9</b>
<b>1.2.4. Bestimmung der Wirksamkeit resistenzbrechender CpGV-Isolate gegenüber verschiedenen Apfelwickler-Laborstämmen</b>	<b>10</b>
<b>1.3. Ergebnisse</b>	<b>10</b>
<b>1.3.1. Entwicklung und Weiterzucht der Apfelwickler-Freilandstämme</b>	<b>10</b>
<b>1.3.2. Untersuchung der CpGV-M-Basisempfindlichkeit verschiedener Apfelwickler-Freilandstämme von 2006 bis 2008</b>	<b>12</b>
<b>1.3.3. Stabilität der CpGV-M-Resistenz unter Selektionsbedingungen und ohne Selektionsdruck</b>	<b>15</b>
<b>1.3.3.1. Stabilität der Resistenz unter Laborbedingungen ohne Virusdruck</b>	<b>15</b>
<b>1.3.3.2. Stabilität der Resistenz unter Laborbedingungen mit Virusdruck</b>	<b>17</b>
<b>1.3.3.3. Stabilität der Resistenz unter Freilandbedingungen mit Virusdruck</b>	<b>19</b>
<b>1.3.4. Fitnessvergleich: Biologische Charakterisierung ausgewählter Apfelwickler-Populationen hinsichtlich ihrer Fertilität, Fekundität und Entwicklungsdauer</b>	<b>20</b>
<b>1.3.4.1. Vergleich der Puppengewichte verschiedener Apfelwicklerstämme</b>	<b>20</b>

	<b>Seite</b>	
1.3.4.2.	Lebensdauer der Imagos verschiedener Apfelwicklerstämme	21
1.3.4.3.	Fekundität und Fertilität	21
1.3.4.4.	Vergleich der Entwicklung eines homogen resistenten Stammes (CpRR1) und eines empfindlichen Freilandstammes (I-MO-NO-06)	24
1.3.5.	Wirksamkeit neuer resistenzbrechender CpGV-Isolate gegenüber verschiedenen Apfelwicklerstämmen	26
1.4.	Zusammenfassung	29
1.5.	Literatur	30
<b>Teilprojekt 2</b>		<b>31</b>
<b>Populations- und Resistenzgenetik minderempfindlicher Apfelwicklerstämme</b>		
2.1.	Genetische Kartierung des/der möglichen CpGV-Resistenzloci	31
2.1.1.	Kartierungsansätze mittels AFLP-Markern	34
2.1.2.	Sequenzierungen von Teilen des <i>C. pomonella</i> Z-Chromosoms zur Identifizierung von Abschnitten, die mit der CpGV-Resistenz gekoppelt sind	39
2.1.3.	Sequenzierungen von Genabschnitten bei <i>C. pomonella</i> , die bei anderen Lepidopteren auf dem Z-Chromosom lokalisiert sind	41
2.2.	Transkriptomanalyse von CpGV-resistenten Apfelwicklern	41
2.3.	Mikrosatelliten-Analyse mit Freilandpopulationen von <i>C. pomonella</i>	43
2.4.	Zusammenfassung	49
2.5.	Literatur	51
<b>Teilprojekt 3</b>		<b>53</b>
<b>Mechanismen der Virus-Wirt-Interaktion</b>		
3.1.	Untersuchung der Pathogenese der CpGV-Infektion	53
3.1.1.	Stadien-spezifische Infektion	53
3.1.2.	Beobachtung des Infektionsverlaufs	54
3.1.3.	Untersuchung der Beteiligung der Peritrophischen Membran an der Resistenz	54
3.1.4.	Hämocölare Infektion	55
3.1.5.	Hämolymp-Transfusion	57
3.1.6.	Gewebespezifische Virusreplikation	58

	<b>Seite</b>	
3.2.	Genetische Untersuchungen zum Minderempfindlichkeitsphänomen bei CpGV	59
3.2.1.	Massenkreuzungen	60
3.2.2.	Einzelpaarkreuzungen	61
3.2.3.	Rückkreuzungen	62
3.2.4.	Homogenisierung des minderempfindlichen Stammes CpR	64
3.2.5.	Einzelpaarkreuzungen zwischen CpS und CpRR1	65
3.2.6.	Kreuzungsexperimente für Linkage Mapping	69
3.3.	Untersuchung minderempfindlicher Individuen auf latente Infektion	71
3.4.	Infektionsversuche mit neuen Isolaten des CpGV	72
3.5.	Infektions- <i>Tracking</i> mit einer gfp-markierten CpGV-Mutante	73
3.6.	Literatur	75
<b>Teilprojekt 4</b>		76
<b>Feldversuche mit resistenzbrechenden CpGV-Isolaten</b>		
4.1.	Einleitung	76
4.2.	Material und Methoden	76
4.3.	Ergebnisse	78
4.4.	Diskussion	80
4.5.	Zusammenfassung	80
4.6.	Literatur	81
<b>Teilprojekt 5</b>		82
<b>Untersuchung der Minderempfindlichkeit gegenüber neuen CpGV-Isolaten</b>		
5.1.	Einleitung	82
5.2.1.	Methode für Einzelpaarkreuzungen	83
5.2.2.	Methode für Resistenzschnelltest	84
5.3.1.	Ergebnisse der Einzelpaarkreuzungen	84
5.3.2.	Ergebnis des Resistenzschnelltests	87
5.4.	Diskussion	87
5.5.	Zusammenfassung	89
5.6.	Literatur	89
<b>III. Übersicht aller Veröffentlichungen im Projekt</b>		90
<b>IV. Beteiligte Institute und Wissenschaftler</b>		98

## **I. Gesamtziel und Aufgabenstellung des Projektes**

### **- Gesamtziel des Vorhabens**

Das Apfelwicklergranulovirus ist das bedeutendste biologische Agens zur Bekämpfung des Apfelwicklers. Im Jahr 2005 wurde erstmals eine Resistenz einzelner Freilandpopulationen des Apfelwicklers gegenüber CpGV-Präparaten beobachtet, die im ökologischen Obstbau massive Probleme bei der Regulierung des Apfelwicklers (AW) verursachten. Der damit verbundene Verlust der Regulierungsmöglichkeit des Apfelwicklers im Ökologischen Obstbau drohte bedeutende wirtschaftliche Schäden nach sich zu ziehen, die in einigen Betrieben bis hin zum Totalausfall zu führen konnten.

Das Ziel dieses Projektes war es, die Ursachen und die Verbreitung des Phänomens der CpGV-Resistenz aufzuklären. Dadurch sollten für bereits betroffene bzw. bisher nicht betroffene Betriebe Managementstrategien und Alternativen zur Regulierung des Apfelwicklers aufgezeigt werden. Im Einzelnen wurden in fünf Teilprojekten folgende Schwerpunkte bearbeitet:

- Untersuchungen der CpGV-M-Basisempfindlichkeit und der biologischen Fitness von Apfelwicklerpopulationen in Deutschland (Teilprojekt 1)
- Populations- und Resistenzgenetik minderempfindlicher Apfelwicklerstämme (Teilprojekt 2)
- Mechanismen der Virus-Wirt-Interaktion (Teilprojekt 3)
- Untersuchung der Minderempfindlichkeit gegenüber neuen CpGV-Isolaten (Teilprojekt 4)
- Untersuchung der Minderempfindlichkeit gegenüber neuen CpGV-Isolaten (Teilprojekt 5)

### **- Bezug des Vorhabens zu den förderpolitischen Zielen**

Bereich A (Landwirtschaftliche Produktion)

Bekanntmachung Nr. 11/03/51 vom 3.6.03: Pflanzenschutz. Themenbereich Entwicklung und Weiterentwicklung von Pflanzenschutzverfahren im Obstbau.

## **II. Teilprojekte**

### **Teilprojekt 1**

#### **Untersuchungen der CpGV-M-Basisempfindlichkeit und der biologischen Fitness von Apfelwicklerpopulationen in Deutschland**

(Institut für biologischen Pflanzenschutz, Julius Kühn-Institut, Darmstadt)

##### **1.1. Arbeitsziele**

Für die Entwicklung einer Strategie zur Resistenzvermeidung bzw. eines effektiven Resistenzmanagements bei der Anwendung des CpGVs zur Apfelwickler-Kontrolle wurden folgende Schwerpunkte bearbeitet:

- Untersuchungen zum geografischen Vorkommen minderempfindlicher Apfelwicklerpopulationen in Deutschland (CpGV-M Basisempfindlichkeitstests)
- Beobachtung der Entwicklung der Minderempfindlichkeit in Resistenzprüfungen mit ausgewählten Apfelwicklerstämmen unter Selektionsbedingungen und ohne Selektionsdruck
- Aufklärung der Mechanismen der Minderempfindlichkeit durch die Bestimmung biologischer Parameter in Fitnessuntersuchungen (Fekundität, Fertilität, Entwicklungsdauer)
- Erprobung neuer resistenzbrechender CpGV-Isolate gegenüber resistenten Apfelwicklerstämmen

##### **1.2. Material und Methoden**

###### **1.2.1. Zucht empfindlicher und nicht empfindlicher Apfelwickler-Freilandpopulationen und Untersuchung der Basisempfindlichkeit gegenüber dem CpGV-M**

###### **1.2.1.1. Herkunft der Freilandstämme des Apfelwicklers**

In den Jahren 2006 bis 2008 wurden jeweils im Sommer von der Fördergemeinschaft ökologischer Obstbau (Föko), vertreten durch Frau Jutta Kienzle, in verschiedenen Regionen Deutschlands Apfelwicklerpopulationen in Apfelanlagen gesammelt. Bis zum Jahr 2006 wurden die Anlagen mit Granuloviruspräparaten auf der Basis des CpGV-M behandelt. In Anlagen, in denen trotz CpGV-M Behandlungen ein hoher Apfelwicklerbefall auftrat, wurden im Sommer 2007 erstmals neue, resistenzbrechende CpGV-Isolate (CpGV-II2 und Madex Plus) eingesetzt.

Die folgende Tabelle 1.1 gibt eine Übersicht über die Herkunft der verschiedenen Apfelwicklerpopulationen für jedes Sammeljahr.

Tabelle 1.1: Übersicht der gesammelten Apfelwicklerstämme in den verschiedenen Apfelanlagen von 2006 bis 2008.

<b>Sammeljahr</b>	<b>Code</b>	<b>Beschreibung</b>	<b>Behandlung im Sammeljahr</b>
2006	BW-MA-06	Bio-Betrieb seit 1994 (starke Insellage)	CpGV-M
	BW-BO-06	Bio-Betrieb in Bötzingen bei Freiburg	CpGV-M
	BW-HA-06	Bio-Betrieb in Südbaden, 10 km von BW-FI	CpGV-M
	BW-LF-06	Bio-Betrieb in Südbaden	CpGV-M
	BW-MN-06	Bio-Betrieb in Südbaden	CpGV-M
	BW-HI-06	resistent getestet 2005	CpGV-M
	NS-HH-06	Bio-Betrieb im Alten Land	erstmalig CpGV-M
	SA-DR-06	Biobetrieb aus Sachsen	CpGV-M
	NS-BU-06	Bio-Betrieb im Alten Land	unbehandelt
2007	BW-LN-07	Biobetrieb, hoher Befall	CpGV-I12, Madex Plus
	BW-BB-07	Biobetrieb, hoher Befall	CpGV-I12
	BW-LF-07	Biobetrieb, 2006 als resistent getestet	CpGV-I12
	BW-AM-07	Biobetrieb, Verdacht auf Resistenz	CpGV-I12, Madex Plus
	BW-SM-07	Biobetrieb, Verdacht auf Resistenz	CpGV-I12
2008	NRW-WE/S-08	Biobetrieb, Sorte Santana, hohe Resistenz	Madex Plus
	NRW-WE/T-08	Biobetrieb, Sorte Topaz, hohe Resistenz	Madex Plus, V06, V03
	SA-GO-08	Biobetrieb, hohe Resistenz	Madex Plus, V06
	BW-KT-08	Biobetrieb, Verdacht auf Resistenz	Madex 3
	BW-TU-08	Biobetrieb, Tübingen, Verdacht auf Resistenz	Madex Plus
	BW-HI-08	Biobetrieb, Hirschlatt, Resistenz nachgewiesen	V06

#### 1.2.1.2. Züchtung verschiedener Apfelwickler-Freilandstämme im Labor

Alle Diapauselarven wurden in Bellaplastschalen mit Wellpappstücken an der Universität Hohenheim in einem frostfreien Raum überwintert. Mit Ende der Frostperiode wurden die Diapauselarven zum JKI Darmstadt gebracht, wo sie zunächst noch unter Freilandbedingungen weiter gehalten wurden. Ab Ende März erfolgte die Lagerung unter Raumbedingungen und natürlichem Tageslicht, um die Verpuppung der Diapauselarven zu beschleunigen.

Die Adulten wurden in Plexiglasgestellen gehalten, die mit Baumwollgaze (MULLRO, Hartmann) bespannt waren und in die Parafilm®-Streifen zur Eiablage eingehängt wurden. Diese Eigelege wurden alle 48 h abgenommen und bei 26°C und Langtagbedingungen (16:8 h Licht:Dunkelheit) bis zum Schlüpfen der L1-Larven inkubiert. Befeuchtete Watte diente den Faltern als Wasserquelle.

Für die Etablierung von Laborzuchten wurden L1-Larven verschiedener Apfelwicklerstämme auf Zuchtmedium für etwa 2 Wochen inkubiert. Zur Verpuppung wurden die L5-Larven auf Wellpapperollen umgesetzt und für weitere 4 Wochen bei 26°C und Langtag bis zum Falterschlupf gehalten.

### **1.2.1.3. Biotests zur Bestimmung der CpGV-M-Basisempfindlichkeit**

#### ***Versuchstiere***

In den Biotests wurden die verschiedenen gezüchteten Apfelwicklerstämme aus dem Freiland sowie ein empfindlicher und seit Jahren etablierter Laborstamm des Apfelwicklers (DA) und ein hoch resistenter, über Einzelpaarkreuzung selektierter Laborstamm (CpRR1; Herkunft DLR Rheinpfalz), als Referenz verwendet.

#### ***Virus***

Das in den Biotests eingesetzte CpGV stammte von dem Wildtyp CpGV, Isolat M ("Mexican strain") (Tanada, 1964) ab, auf dem alle heute verwendeten CpGV-Handelspräparate basieren. Das eingesetzte CpGV wurde *in vivo* am DLR Rheinpfalz (Teilprojekt 3) produziert. Eine Probe dieser Charge (TPCpGV-BTPS-02) mit einem Titer von  $1,4 \times 10^{11}$  occlusion bodies (OB) pro ml wurde für die Biotests in entsprechenden Verdünnungen verwendet.

#### ***Durchführung der Biotests***

Die Biotests zur Bestimmung der Empfindlichkeit der verschiedenen Apfelwicklerstämme wurden nach einer standardisierten Methode nach Huber (1981) durchgeführt. Hierfür wurden die frisch geschlüpften L1-Larven der verschiedenen Apfelwicklerstämme über das Zuchtmedium nach Ivaldi-Sender (1974) mit CpGV-M in unterschiedlichen Konzentrationen ( $10^3$  bis  $10^8$  OB/ml Medium) gemischt und die Wirkung der Viren anhand der Larvenmortalität nach 7 und 14 Tagen bestimmt. Die Larven wurden bei 26°C und unter Langtagbedingungen (16:8 h Licht:Dunkelheit) gehalten.

Als klassische Methode zur statistischen Auswertung der Biotests diente die Probit-Analyse (MLP 3.08, NAG, Lawes Agricultural Trust, Rothamsted Experimental Station, 1987). Anhand der resultierenden Probit-Regressionsgeraden wurde die Viruskonzentration berechnet, die eine Mortalität von 50% hervorruft. Dieser Wert, der als mittlere letale Konzentration ( $LC_{50}$ ) bezeichnet wird, stellt ein relatives Maß für die biologische Aktivität der Viren dar. Die Steigung der jeweiligen Probit-Geraden gibt Hinweise auf die Homogenität der Reaktion der Testtiere bezüglich ihrer Empfindlichkeit gegenüber dem CpGV. Bei Apfelwicklerstämmen mit einem hohen Anteil an resistenten Tieren, zeigen deren Dosis-Wirkungsgeraden einen deutlich flacheren Verlauf.

### **1.2.2. Stabilität der CpGV-M-Resistenz unter Selektionsbedingungen und ohne Selektionsdruck**

Für Untersuchungen zur Stabilität der Resistenz wurde der seit 2004 in Zucht genommene resistente Apfelwicklerstamm (BW-FI-03), der aus einer Problemanlage stammte, ausgewählt. Die Folgegenerationen wurden seither ohne Selektionsdruck auf Virus freiem Futter gehalten. Die Empfindlichkeit dieser Tiere gegenüber CpGV-M wurde regelmäßig im Biotest überprüft.

Für die Untersuchungen unter Selektionsdruck wurden Nachkommen von BW-FI-03 ab der 30. Generation auf Virus kontaminiertem Zuchtmedium ( $5 \times 10^3$  OB /ml Medium =  $LC_{95}$  des empfindlichen Laborstammes DA im 14-Tage Biotest) über fünf Generationen gezüchtet. Ein weiteres Mal wurden die Zuchttiere ab der 57. Generation für zwei Generationen auf CpGV-M kontaminiertem Futter gezüchtet, wobei hier die Viruskonzentration auf  $5 \times 10^5$  OB/ml Medium erhöht wurde. Die Empfindlichkeit jeder Generation wurde in Biotests mit L1-Larven ermittelt und aus den nach 14 Tagen registrierten Mortalitäten die entsprechenden  $LC_{50}$ -Werte berechnet.

Die Entwicklung der Resistenz wurde nicht nur unter Laborbedingungen untersucht, sondern auch im Freiland. Hierfür wurden einzelne Anlagen, in denen CpGV-M ausgebracht wurde, über mehrere Jahre beobachtet. Die Nachkommen der gesammelten Diapausetiere wurden im Biotest hinsichtlich ihrer Resistenz geprüft.

### **1.2.3. Fitnessvergleich: Biologische Charakterisierung ausgewählter Apfelwicklerpopulationen hinsichtlich ihrer Fertilität, Fekundität und Entwicklungsdauer**

Für die biologische Charakterisierung resistenter Apfelwicklerstämme wurden die Laborstämme BW-FI-03 und BW-FI-04 sowie die Freilandstämme BW-FN-06 und BW-HI-06 ausgewählt. Die Entwicklungsdaten dieser Tiere wurden mit denen der empfindlichen Stämme DA-07 (Laborstamm) und NS-BU-06 (Freilandstamm) verglichen. Folgende Parameter wurden ermittelt: Puppengewicht, Lebensdauer der weiblichen Falter, Anzahl abgelegter Eier (Fekundität) und Anzahl geschlüpfter Larven (Fertilität).

Zur Bestimmung des Puppengewichtes wurden die Puppen nach Geschlecht getrennt und einzeln gewogen. Die Puppen wurden bis zum Falterschlupf bei  $26^\circ\text{C}$  und Langtag gelagert.

Für die Fekunditätstests wurde für jeden Stamm ein Weibchen mit zwei Männchen in kleinen, mit Gaze bespannten Zylindern, bis zum Absterben gehalten. Da sowohl die Fekundität als auch die Fertilität sehr stark vom Alter der Weibchen abhängt (Vickers, 1997), wurden die Versuchsbedingungen so gewählt, dass das Alter der Weibchen höchstens 1 Tag und das der Männchen 2-3 Tage betrug. Die Falter wurden bei natürlicher Dämmerung sowie Raumtemperatur ( $24^\circ\text{C}$ ) gehalten und erhielten 10%iges Zuckerwasser als Nahrung. Für die Eiablage wurden Parafilm<sup>®</sup>-Streifen in die Gefäße eingehängt und täglich gewechselt. Die abgelegten Eier wurden gezählt und zur Untersuchung der Fertilität unter Langtagbedingungen (H/D 8/16 Stunden) und bei  $26^\circ\text{C}$  inkubiert. Die Gesamtzahl der geschlüpften L1-Larven, deren Schlupf nach 4-5 Tagen erfolgte, wurde ermittelt.

Für den Entwicklungsvergleich wurde zum einen der homogen resistente Stamm CpRR1 und zum anderen ein empfindlicher Freilandstamm aus Italien (I-MO-NO-06) verwendet. Die frisch geschlüpften Eilarven dieser Stämme wurden in Rasterschalen auf künstliches Nährmedium gesetzt und im Lichtthermostaten bei  $26^\circ\text{C}$  und Langtagbedingungen gehalten. Bis zum Falterschlupf wurde täglich die Entwicklung

von 50 Tieren bonitiert, d.h. das Larvenstadium wurde jeweils durch Bestimmung der Größe der abgestoßenen Kopfkapseln bestimmt.

#### **1.2.4. Bestimmung der Wirksamkeit resistenzbrechender CpGV-Isolate gegenüber verschiedenen Apfelwickler-Laborstämmen**

Die Wirksamkeit verschiedener resistenzbrechender CpGV-Isolate (Madex Plus, CpGV-I12, I07R), die z.T. bereits in Problemanlagen eingesetzt wurden, wurden in Biotests, wie unter 1.2.1.3. beschrieben, untersucht. Als Versuchstiere dienten zum einen der homogen resistente Apfelwicklerstamm CpRR1 sowie der im Labor gezüchtete resistente Freilandstamm BW-FI-03 (60. Generation). Zusätzlich wurden Tiere aus Apfelanlagen, in denen die neuen Virusisolate im Jahr 2008 zum Einsatz kamen, im Biotest auf Resistenz getestet.

### **1.3. Ergebnisse**

#### **1.3.1. Entwicklung und Weiterzucht der Apfelwickler-Freilandstämme**

Die überwinterten Diapauselarven verpuppten sich ab Ende März und die ersten Falter schlüpfen Anfang April, wobei der Falterschluß teilweise bis Ende Juni andauerte. Die Anzahl der geschlüpften Falter variierte sehr stark, was häufig auf eine Parasitierung oder auch Infektion, z.B. mit Viren oder Pilzen, zurückzuführen war (siehe Tabelle 1.2). Der Grad der Parasitierung lag bei den 2006 gesammelten Apfelwicklerpopulationen im Mittel bei 2,4% und im Jahr 2007 bei durchschnittlich 3,8%. Der Anteil an toten Diapauselarven, die durch Viren bzw. mit Pilzen infiziert waren, lag 2006 durchschnittlich bei 60%. Weitere Ausfälle (6%) waren auch noch im Puppenstadium zu beobachten (Fehlverpuppungen und abgestorbene Puppen). Nur noch 30% der Diapausetiere entwickelten sich zum Falter.

In Biobetrieben mit hohem Befall, in denen CpGV-M keine ausreichende Wirkung mehr zeigte, wurden 2007 neue resistenzbrechende CpGV-Isolate (CpGV-I12 und Madex Plus) verwendet.

In diesen Anlagen waren deutlich weniger Diapausetiere zu finden, was auf eine bessere Wirkung der neuen Virusisolate zurückzuführen war. Innerhalb der gesammelten Diapausetiere starben etwa 80% der Tiere vorzeitig und nur noch 15% erreichten das Falterstadium.

Im Jahr 2008 wurden für die weiteren Untersuchungen gezielt Anlagen ausgewählt (NRW-WE-08, SA-GO-08, BW-KT-08) in denen sogar durch den Einsatz der neuen Isolate Madex Plus und CpGV-I12 der Apfelwicklerbefall nicht mehr kontrolliert werden konnte. In einigen dieser Anlagen kamen neben Madex Plus weitere neue Isolate (Madex 3, VO3 und VO6) zum Einsatz. Von den abgesammelten Diapausetieren entwickelten sich durchschnittlich 60% zum Falter. Auffällig war in diesen Anlagen eine Parasitierungsrate von 5,5%.

Tabelle 1.2: Entwicklung der 2006 bis 2008 gesammelten Diapausetiere in den verschiedenen Bioanlagen in Deutschland (Baden-Württemberg (BW), Nordrhein- Westfalen (NRW), Niedersachsen (NS) und Sachsen (SA)).

<b>Sammeljahr</b>	<b>Apfelwicklerstämme</b>	<b>Behandlung im Sammeljahr</b>	<b>Tiere gesammelt</b>	<b>Parasitierte Diapause-larven</b>	<b>Tote Larven</b>	<b>Tote Puppen</b>	<b>Falter</b>
2006	SA-DR-06	CpGV-M	45	3 (6,6%)	24 (53%)	4 (8,8%)	14 (31,1%)
	NS-HH-06	erstmalig CpGV-M	110	7 (6,4%)	59 (53%)	9 (8,1%)	35 (31,8%)
	NS-BU-06	unbehandelt	129	5 (3,8%)	81 (62%)	7 (5,4%)	36 (27,9%)
	BW-HI-06	CpGV-M	126	3 (2,4%)	80 (63%)	11 (8,7%)	32 (35,4%)
	BW-FN-06	CpGV-M	73	1 (1,3%)	39 (53%)	9 (12,3%)	24 (32,9%)
	BW-LF-06	CpGV-M	70	2 (2,8%)	44 (62%)	-	24 (33,3%)
	BW-BO-06	CpGV-M	212	1 (0,5%)	121 (57%)	9 (4,4%)	81 (38,2%)
	BW-MN-06	CpGV-M	22	-	15 (68%)	2 (9%)	5 (22,7%)
	BW-MA-06	CpGV-M	166	1 (0,6%)	113 (68%)	5 (3%)	47 (28,3%)
	BW-HA-06	CpGV-M	81	-	61 (75%)	1 (1,2%)	19 (23,5%)
2007	BW-LN-07	I12 und Madex Plus	115	7 (6,1%)	81 (70,4%)	5 (4,4%)	22 (19,1%)
	BW-LF-07	CpGV-I12	4	-	3 (75%)	-	1 (25%)
	BW-BB -07	CpGV-I12	20	-	18 (90%)	1 (5%)	1 (5%)
	BW-AM-07	CpGV-I12 und Madex Plus	28	2 (7,2%)	20 (71,4%)	-	6 (21,4%)
	BW-SM-07	CpGV-I12	17	1 (5,9%)	15 (88,2%)	-	1 (5,9%)
2008	NRW-WE/S-08	Madex Plus	572	18 (3,1%)	148 (25,9%)	59 (10,3%)	347 (60,7%)
	NRW-WE/T-08	Madex Plus, V06 und V03	494	30 (6,1%)	97 (19,6%)	43 (8,7%)	324 (65,6%)
	SA-GO-08	Madex Plus und V06	297	16 (5,4%)	152 (51,2%)	40 (13,5%)	282 (94,9%)
	BW-KT-08	Madex 3	65	5 (7,7%)	27 (41,5%)	9 (13,8%)	24 (36,9%)

### 1.3.2. Untersuchung der CpGV-M-Basisempfindlichkeit verschiedener Apfelwickler-Freilandstämme von 2006 bis 2008

Von acht gezüchteten Freilandstämmen der im Jahr 2006 gesammelten Apfelwickler wurde jeweils die F1-Generation in Biotests hinsichtlich ihrer Empfindlichkeit gegenüber CpGV-M untersucht. Dabei erwies sich nur der Stamm NS-BU-06, gegen den nie CpGV-M eingesetzt worden war, als ebenso empfindlich wie der Laborstamm DA-07 und zeigte somit keine Resistenz. Die Nachkommen des Stammes NS-HH-06 reagierten heterogen auf das CpGV-M. Die Konzentrations-Wirkungsgerade war nach rechts in einen höheren Konzentrationsbereich hin verschoben und flachte deutlich ab (Abb. 1.1). In dieser Apfelanlage waren Granulovirus-Präparate im Jahr 2006 erstmals eingesetzt worden. Für den Stamm BW-HA-06 wurden vergleichbare Ergebnisse erzielt. Die  $LC_{50}$ -Werte waren gegenüber den  $LC_{50}$ -Werten der empfindlichen Stämme um etwa Faktor 100 erhöht (Tabelle 1.3). In diesen Apfelwicklerpopulationen sind sowohl Tiere vorhanden, die auf das CpGV-M normal empfindlich reagieren als auch solche, die bereits eine Resistenz entwickelt haben. Diese Heterogenität zeigt sich im Abflachen der Regressionsgeraden und einer Verschiebung in einen höheren Konzentrationsbereich.

In allen übrigen Anlagen, in denen auch massive Bekämpfungsprobleme auftraten, erwiesen sich die Apfelwicklerstämme als deutlich resistent. Selbst bei hohen Viruskonzentrationen waren noch überlebende Larven zu finden. Dies zeigte sich in den sehr flach verlaufenden Wirkungsgeraden und den um etwa Faktor  $10^4$  erhöhten  $LC_{50}$ -Werten (Abb. 1.1 und Tabelle 1.3).

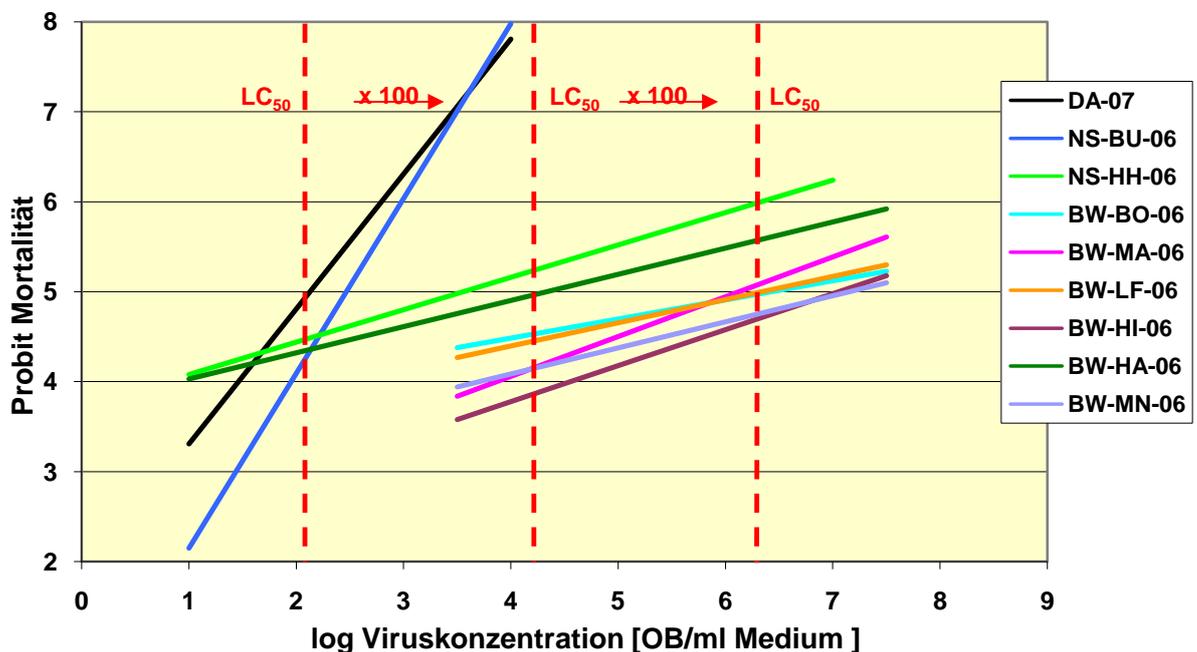


Abb. 1.1: Konzentrations-Wirkungsgeraden verschiedener Apfelwicklerstämme (gesammelt 2006) gegenüber CpGV-M, ermittelt in Biotests nach 14 Tagen. Als Referenz für einen empfindlichen Stamm diente der Laborstamm DA-07.

Tabelle 1.3: LC<sub>50</sub>-Werte für die verschiedenen Apfelwicklerstämme (AW-Stämme) aus dem Jahr 2006, ermittelt aus den Konzentrations-Wirkungsgeraden aus den Biotests nach 14 Tagen.

AW-Stamm	N Tiere im Versuch	LC <sub>50</sub> [OB/ml Medium] (95%-Vertrauensgrenzen)	Steigung (SE)	X <sup>2</sup> (DF)
DA-07	746	1,34 x 10 <sup>2</sup> (0,84 – 1,86)	1,50 (0,14)	28,28 (17)
NS-BU-06	262	2,93 x 10 <sup>2</sup> (1,31 – 4,94)	1,94 (0,32)	27,51 (7)
NS-HH-06	882	3,55 x 10 <sup>3</sup> (0,40 – 17)	0,36 (0,03)	141,33 (23)
BW-BO-06	896	2,61 x 10 <sup>6</sup> (0,39 – 121)	0,21 (0,03)	102,69 (25)
BW-MA-06	365	1,31 x 10 <sup>6</sup> (0,35 – 9,19)	0,44 (0,05)	38,26 (12)
BW-LF-06	609	2,17 x 10 <sup>6</sup> (0,30 – 173)	0,26 (0,04)	63,32 (16)
BW-HI-06	289	1,11 x 10 <sup>7</sup> (0,33 – 9,69)	0,40 (0,07)	39,36 (6)
BW-HA-06*	63	2,16 x 10 <sup>4</sup> (0,03 – 507)	0,29 (0,02)	31,62 (4)
BW-MN-06*	80	1,4 x 10 <sup>7</sup> (0,01 – 221)	0,29 (0,02)	21,15 (4)

\* aufgrund weniger Einzeldaten wurden die LC<sub>50</sub>-Werte über die Potency mit BW-BO-06, BW-MA-06, BW-LF-06 und BW-HI-06 berechnet.

Im Jahr 2007 sollten die Untersuchungen zur Verbreitung der CpGV-Resistenz auf zusätzliche Anlagen ausgeweitet werden, in denen im Jahr 2006/2007 die neuen resistenzbrechenden Virusisolate (CpGV-I12 und Madex Plus) zum Einsatz kamen. Insgesamt konnten in den Anlagen nur wenige Diapausetiere gesammelt werden, was auf eine Dezimierung der Population durch die Wirkung der neuen Virusisolate zurückzuführen war. Bei allen Apfelwicklerstämmen war zudem die Mortalität der Diapausetiere so hoch, dass nicht genug Adulte für die Etablierung einer Zucht vorhanden waren (siehe Tabelle 1.2) und somit für die Biotests nicht genügend L1-Larven zur Verfügung standen. Aus diesem Grund konnte die CpGV-M-Basisempfindlichkeit in diesem Jahr nicht bestimmt werden.

Im Jahr 2008 wurden in ausgewählten Problemanlagen, in denen eine geringe Effektivität der neuen resistenzbrechenden Isolate beobachtet worden war, Diapauselarven im Spätsommer gesammelt. Die Untersuchungen zur Empfindlichkeit gegenüber dem CpGV-M ergaben LC<sub>50</sub>-Werte zwischen 10<sup>6</sup> und 10<sup>8</sup> OB/ml, die um Faktor 10 bis 100 höher lagen als bei den 2006 gesammelten Apfelwicklerstämmen (Tabelle 1.3 und Tabelle 1.4). Im Vergleich zum empfindlichen Laborstamm DA-07

zeigten die Freilandstämme SA-GO-08, NRW-WE/S-08 und NRW-WE/T-08 um etwa Faktor  $10^6$  höhere Unempfindlichkeiten gegenüber CpGV-M. Das Resistenzniveau lag bei diesen Stämmen im Bereich des im Labor selektierten, homogen resistenten Stammes CpRR1 (Abb. 1.2 und Tabelle 1.4).

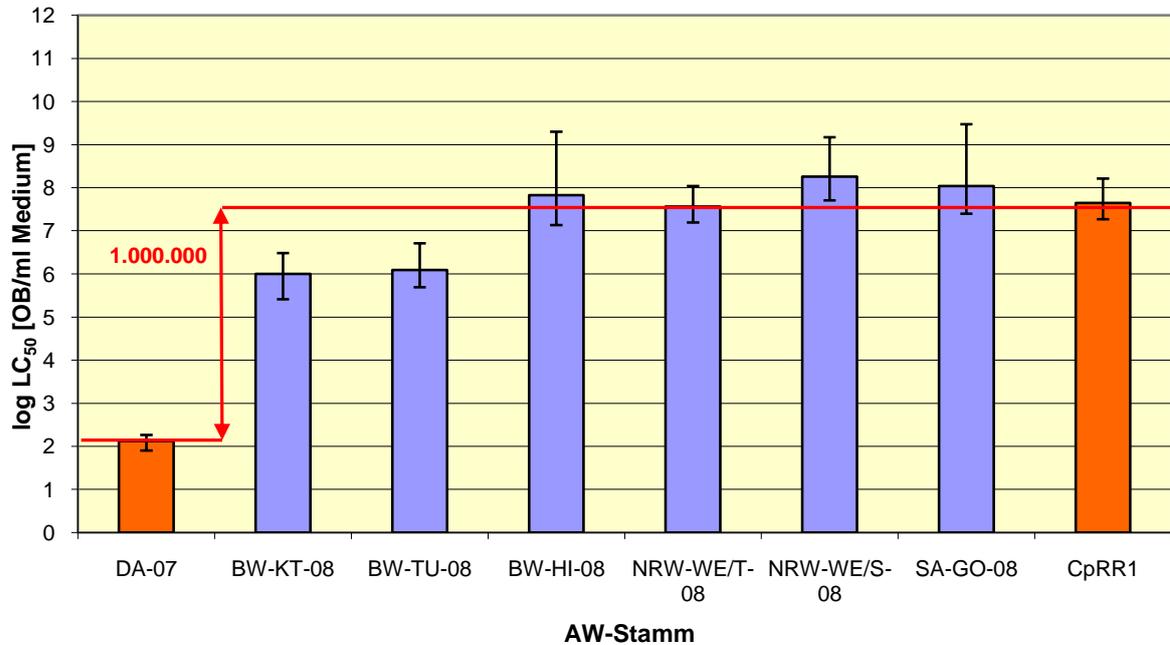


Abb. 1.2: LC<sub>50</sub>-Werte für die Apfelwicklerstämme (AW-Stamm) aus dem Jahr 2008 im Vergleich zum empfindlichen Laborstamm DA-07 und dem homogen resistenten Stamm CpRR1, ermittelt im Biotest nach 14 Tagen. Die vertikalen Linien geben den 95% Vertrauensbereich der LC<sub>50</sub> an.

Tabelle 1.4: LC<sub>50</sub>-Werte für die verschiedenen Apfelwicklerstämme (AW-Stämme) aus dem Jahr 2008, ermittelt aus den Konzentrations-Wirkungsgeraden aus den Biotests nach 14 Tagen.

AW-Stamm	N Tiere im Versuch	LC <sub>50</sub> (OB/ml Medium) (95%-Vertrauensgrenzen)	Steigung (SE)	X <sup>2</sup> (DF)
DA-07	746	1,34 x 10 <sup>2</sup> (0,84 – 1,86)	1,49 (0,15)	28,28 (17)
CpRR1	231	4,46 x 10 <sup>7</sup> (1,90 – 16,4)	0,68 (0,11)	10,42 (4)
NRW-WE/S-08	433	1,88 x 10 <sup>8</sup> (0,52 – 14,9)	0,38 (0,06)	61,34 (11)
NRW-WE/T-08	412	3,61 x 10 <sup>7</sup> (1,55 – 11,1)	0,53 (0,06)	42,22 (9)
BW-KT-08	192	1,09 x 10 <sup>6</sup> (0,26 – 3,08)	0,65 (0,19)	0,04 (2)
SA-GO-08	409	1,12 x 10 <sup>8</sup> (0,23 – 27,4)	0,27 (0,06)	37,59 (9)
BW-TU-08	209	2,25 x 10 <sup>7</sup> (0,40 – 99,0)	0,33 (0,08)	22,65 (4)
BW-HI-08	235	6,71 x 10 <sup>7</sup> (1,34 – 212)	0,37 (0,08)	8,50 (4)

### 1.3.3. Stabilität der CpGV-M-Resistenz unter Selektionsbedingungen und ohne Selektionsdruck

Ein im Labor gehaltener Freilandstamm (BW-FI-03) wurde zum einen auf unbehandeltem Futter und zum anderen unter Virusdruck, d.h. auf Medium, das mit CpGV-M (10<sup>2</sup> bis 10<sup>8</sup> OB/ml Medium) behandelt war, über mehrere Generationen weitergezüchtet. Mit den L1-Larven jeder Generation wurden Biotests zur Überprüfung der Empfindlichkeit gegenüber dem CpGV-M durchgeführt. Auf diese Weise konnten unter den gegebenen Selektionsbedingungen Veränderungen bezüglich der CpGV-Empfindlichkeit festgestellt werden.

#### 1.3.3.1. Stabilität der Resistenz unter Laborbedingungen ohne Virusdruck

Der im Jahr 2003 im Freiland gesammelte Apfelwicklerstamm (BW-FI-03) wurde unter Laborbedingungen ohne Virusdruck weiter gezüchtet. Stichproben der Folgegenerationen wurden im Laufe der Jahre im Biotest auf ihre Empfindlichkeit gegenüber dem CpGV-M getestet. Der im Vergleich zum empfindlichen Laborstamm DA-07 1000-fach resistenterer Apfelwicklerstamm BW-FI-03 zeigte über 32 Generationen (2,5 Jahre) keine deutlichen Veränderungen in seiner Resistenz. Erst ab dieser Generation setzte eine Abnahme des Resistenzniveaus ein (Abb. 1.3 und Tabelle 1.5).

Diese Beobachtungen weisen darauf hin, dass der Anteil empfindlich reagierender Tiere eines ursprünglich heterogen resistenten Freilandstammes wieder zugenommen hat, was sich in der Abnahme der LC<sub>50</sub> zeigt. Eine derartige Veränderung, die im Labor nach etwa 36 Generationen sichtbar wurde, würde im Freiland, vorausgesetzt, dass dort keine anderen Selektionsbedingungen herrschen, einem Zeitraum von 18 Jahren entsprechen.

Ab der 45. Generation stieg das Resistenzniveau wieder leicht an und die LC<sub>50</sub>-Werte streuten über weitere 15 Generationen um etwa 10<sup>4</sup> OB/ml Medium. Nach 5 Jahren in Laborzucht ohne Virusdruck waren die Tiere des Apfelwicklerstammes BW-FI-03 noch etwa 100-fach unempfindlicher gegenüber CpGV-M als der empfindliche Laborstamm DA-07.

Tabelle 1.5: Verlauf der Resistenz von BW-FI-03 unter Laborbedingungen ohne Virusdruck über 5 Jahre, ermittelt in Biotests (14 Tage) anhand von Konzentrations-Wirkungsgeraden.

BW-FI-03 Generationen	N Tiere im Versuch	LC <sub>50</sub> (OB/ml Medium) (95%-Vertrauensgrenzen)	Steigung (SE)	X <sup>2</sup> (DF)
F1	1194	3,02 x 10 <sup>5</sup> (2,07 – 4,62)	0,52 (0,04)	122,38 (28)
F8	353	1,03 x 10 <sup>6</sup> (0,45 – 3,03)	0,51 (0,06)	18,62 (4)
F10	354	3,70 x 10 <sup>5</sup> (2,14 – 7,00)	0,96 (0,10)	35,37 (10)
F14	171	2,45 x 10 <sup>6</sup> (0,70 – 17,7)	0,51 (0,06)	3,25 (3)
F30	98	3,55 x 10 <sup>5</sup> (0,46 – 288)	0,35 (0,13)	0,55 (3)
F32	193	8,86 x 10 <sup>5</sup> (3,75 – 194)	0,55 (0,22)	0,17 (3)
F36	442	1,55 x 10 <sup>4</sup> (0,84 – 3,19)	0,57 (0,05)	16,97 (10)
F37	842	2,63 x 10 <sup>4</sup> (1,42 – 4,84)	0,35 (0,03)	17,76 (12)
F42	885	1,71 x 10 <sup>3</sup> (0,93 – 2,86)	0,51 (0,04)	31,47 (18)
F44	387	1,14 x 10 <sup>3</sup> (0,33 – 2,92)	0,42 (0,05)	75,76 (7)
F48	291	9,54 x 10 <sup>3</sup> (5,90 – 17,15)	0,84 (0,11)	4,45 (5)
F53	321	1,03 x 10 <sup>4</sup> (0,16 – 12,60)	0,49 (0,05)	25,66 (5)
F 57	264	3,46 x 10 <sup>4</sup> (0,71 – 44,70)	0,36 (0,05)	9,38 (5)
F 58	322	3,29 x 10 <sup>3</sup> (1,36 – 7,87)	0,43 (0,06)	5,99 (5)
F 59	276	2,22 x 10 <sup>5</sup> (0,25 – 2010)	0,20 (0,06)	4,15 (4)
F 60	244	1,51 x 10 <sup>4</sup> (0,54 – 4,68)	0,43 (0,06)	3,77 (4)

### 1.3.3.2. Stabilität der Resistenz unter Laborbedingungen mit Virusdruck

In Untersuchungen, die mit der 30. Generation des resistenten Freilandstammes BW-FI-03 begannen, wurde eine Kohorte der Apfelwickler über fünf weitere Generationen unter CpGV-Druck bei einer Konzentration von  $5 \times 10^3$  OB/ml Medium weitergezüchtet. Bereits bei der 1. Generation (FV 1.1) zeigte sich eine Zunahme der  $LC_{50}$  von  $3,55 \times 10^5$  OB/ml auf  $1,01 \times 10^7$  OB/ml, was einem Faktor von ca. 28 entspricht (Abb. 1.3 und Tabelle 1.6).

Bei der folgenden Generation (FV 1.2) stieg der  $LC_{50}$ -Wert nochmals um Faktor 10 auf  $10^8$  OG/ml Medium an und änderte sich dann bis zur fünften Generation (FV 1.5) nicht mehr signifikant. Im Vergleich zum normal empfindlichen Apfelwickler-Laborstamm entspricht dies einer bisher beobachteten maximalen Resistenz von Faktor  $10^6$ .

Tabelle 1.6: Entwicklung der CpGV-Resistenz des resistenten AW-Freilandstammes BW-FI-03 im Labor unter Virusdruck ab der 30. Generation (Virusdruck 1) und ein zweites Mal nach der 57. Generation (Virusdruck 2).  $LC_{50}$ -Werte ermittelt in Biotests nach 14 Tagen.

Generationen unter Virusdruck	N Tiere im Versuch	$LC_{50}$ (OB/ml Medium) (95%-Vertrauensgrenzen)	Steigung (SE)	$\chi^2$ (DF)
<b>Virusdruck 1 auf Larven der 30. Generation</b>				
FV 1.1	235	$1,01 \times 10^7$ (0,21 – 63,8)	0,39 (0,10)	3,50 (4)
FV 1.2	463	$2,93 \times 10^8$ (0,53 – 135)	0,38 (0,08)	16,08 (10)
FV 1.3	834	$6,91 \times 10^8$ (1,07 – 473)	0,45 (0,09)	11,57 (5)
FV 1.4	557	$1,37 \times 10^8$ (0,37 – 18,6)	0,45 (0,08)	30,98 (10)
FV 1.5	417	$9,97 \times 10^7$ (3,63 – 45,6)	0,50 (0,07)	25,55 (8)
<b>Virusdruck 2 auf Larven der 57. Generation</b>				
FV 2.1	427	$1,87 \times 10^6$ (0,56 – 9,51)	0,31 (0,03)	19,86 (70)
FV 2.2	370	$2,73 \times 10^8$ (0,56 – 39,6)	0,24 (0,04)	21,37 (5)

Bei der Weiterzucht des resistenten Stammes BW-FI-03 im Labor ohne Virusdruck bis zur 60. Generation (5 Jahre) streuten die  $LC_{50}$ -Werte um  $10^4$  OB/ml Medium, so dass sich jetzt ein Resistenzniveau von etwa Faktor 100 einstellte. Bei erneuter Virusexposition und 100-fach höherer Konzentration ( $5 \times 10^5$  OB/ml Medium) der nun empfindlicheren 57. Generation stieg die Resistenz wieder sprunghaft an. Aufgrund der höheren Viruskonzentration stieg die  $LC_{50}$  bereits nach zwei Generationen auf CpGV kontaminiertem Futter wieder auf  $2,73 \times 10^8$  OB/ml Medium, was einem Resistenzfaktor von ca.  $10^6$  entspricht (Abb. 1.3).

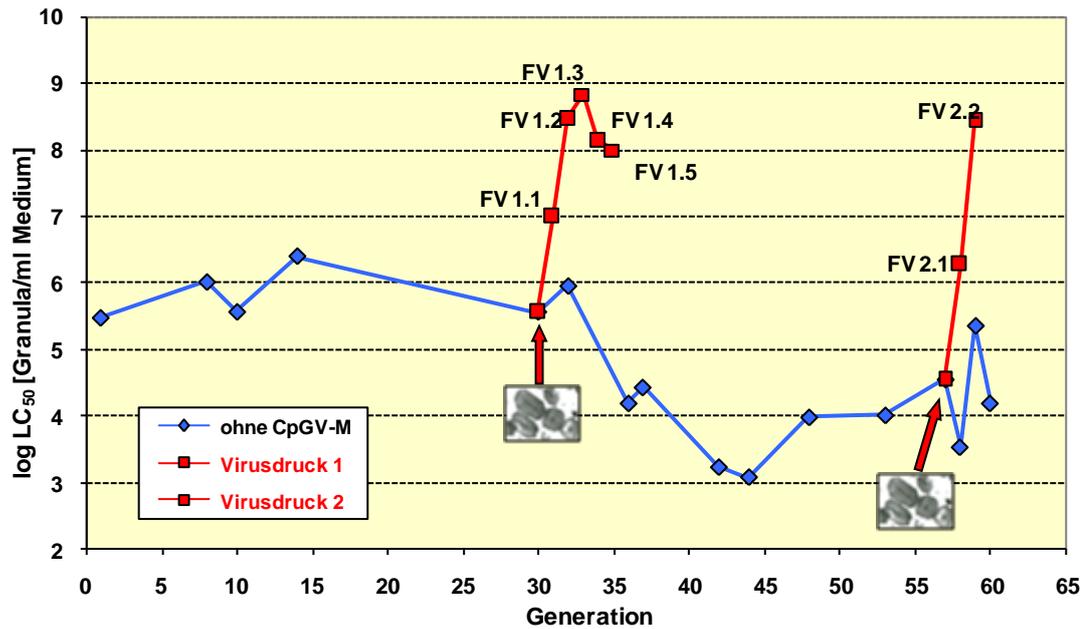


Abb. 1.3: Entwicklung des Resistenzniveaus des resistenten Apfelwickler-Freilandstammes BW-FI-03 ohne Selektionsdruck (**blaue Linie**) bzw. mit Selektionsdruck (**rote Linien**) nach 30 Generationen (FV 1.1 - FV 1.5) und 57 Generationen (FV 2.1 - FV 2.2). LC<sub>50</sub>-Werte ermittelt in Biotests nach 14 Tagen.

Die Ergebnisse lassen darauf schließen, dass durch den weiteren Einsatz des CpGV-M in Problemanlagen und die damit verbundene Elimination anfälliger Apfelwickler, die Resistenzentwicklung innerhalb weniger Generationen weiter forciert werden kann. Im Labor konnte beobachtet werden, dass ohne Selektionsdruck mit CpGV-M erst nach 32 Generationen das Resistenzniveau wieder abnahm. Dies bedeutet, dass unter Laborbedingungen die resistenten Tiere keinen Selektionsnachteil oder eine geringere biologische Fitness als die anfälligen Apfelwickler besaßen. Für das Freiland könnte dies bedeuten, dass die CpGV-Resistenz auch nach Absetzen der Anwendung von CpGV-M noch lange Zeit, d. h. über viele Jahre, persistiert.

### 1.3.3.3. Stabilität der Resistenz unter Freilandbedingungen mit Virusdruck

In Anlagen, in denen eine Behandlung mit CpGV-M trotz Minderempfindlichkeit des Apfelwicklers weitergeführt wurde, wurden im Abstand von 1 bis 3 Jahren wiederholt Diapausetierte gesammelt und deren Nachkommen im Biotest auf Resistenz untersucht. Damit sollten Informationen über die Entwicklung der Resistenz gegenüber CpGV-M in Freilandpopulationen gewonnen werden.

Die Ergebnisse zeigten, dass in den mit CpGV-M behandelten Apfelanlagen, die Resistenz unterschiedlich stark ausgeprägt ist. Die  $LC_{50}$  schwankte zwischen  $8 \times 10^4$  OB/ml Medium und  $2 \times 10^8$  OB/ml Medium. Insbesondere der Apfelwicklerstamm NRW-WE zeichnete sich durch ein sehr hohes Resistenzniveau,  $LC_{50}$  etwa  $10^8$  OB/ml Medium, aus. Das im Labor unter Virusdruck maximal erreichte Resistenzniveau, konnte somit auch schon im Freiland nachgewiesen werden.

Einige Anlagen, die über 3 bzw. 4 Jahre beobachtet wurden, zeigten während dieser Zeit keine signifikanten Veränderungen in ihrer Minderempfindlichkeit (BW-FI, BW-FN, BW-TU und NRW-WE). Bei den übrigen Anlagen nahm die im ersten Jahr nachgewiesene Resistenz im Lauf der Jahre sogar noch weiter zu (BW-FN, BW-OK, BW-HI-IP, RP-NS und BW-HI-Bio) (Abb. 1.4).

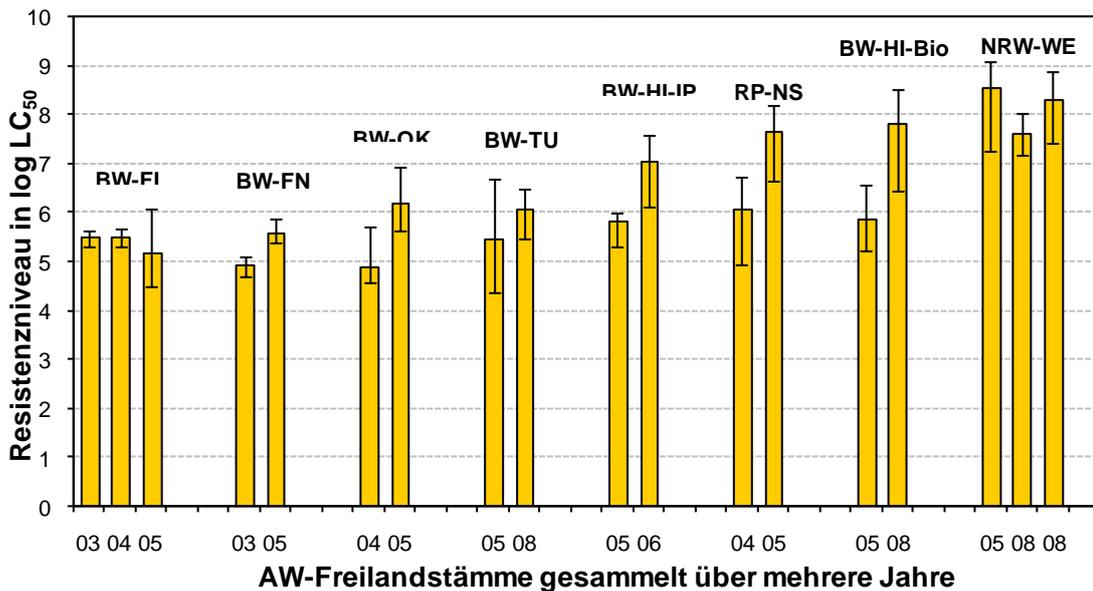


Abb. 1.4: Resistenzniveaus verschiedener Apfelwickler-Freilandstämme (AW) aus CpGV-M behandelten Apfelanlagen über mehrere Jahre, ermittelt in Biotests nach 14 Tagen. Die vertikalen Linien geben den 95% Vertrauensbereich der  $LC_{50}$  an.

### 1.3.4. Fitnessvergleich: Biologische Charakterisierung ausgewählter Apfelwickler-Populationen hinsichtlich ihrer Fertilität, Fekundität und Entwicklungsdauer

#### 1.3.4.1. Vergleich der Puppengewichte verschiedener Apfelwicklerstämme

Bei der Bestimmung der Puppengewichte zeigte sich, dass wie zu erwarten, das durchschnittliche Gewicht der Weibchen immer höher lag als das der Männchen (Hathaway et al., 1971). Die Überprüfung dieser Daten im t-Test ( $\alpha=0,05$ ) ergab bei allen AW-Stämmen sowohl aus den Laborzuchten als auch aus dem Freiland, einen signifikanten Unterschied (Abb. 1.5).

Das Puppengewicht der Weibchen (t-Test,  $p=3,8 \times 10^{-7} < \alpha=0,05$ ) und Männchen (t-Test,  $p=1,1 \times 10^{-6} < \alpha=0,05$ ) der Freilandstämme war signifikant geringer als das der im Labor über einen längeren Zeitraum gezüchteten Tiere (DA-07 >20 Jahre, BW-FI-03 =3,8 Jahre, BW-FI-04 =2,8 Jahre). Innerhalb der AW-Stämme aus den Laborzuchten zeigte sich sowohl bei den Weibchen (t-Test,  $p=2,8 \times 10^{-4} < \alpha=0,05$ ) als auch bei den Männchen (t-Test,  $p=2,0 \times 10^{-4} < \alpha=0,05$ ) ein signifikanter Gewichtsunterschied zwischen sensitiven und resistenten Apfelwicklern. Bei den AW-Stämmen aus dem Freiland war dieser Unterschied jedoch nicht signifikant (t-Test, ♀  $p=0,56 > \alpha=0,05$ , ♂  $p=0,28 > \alpha=0,05$ ).

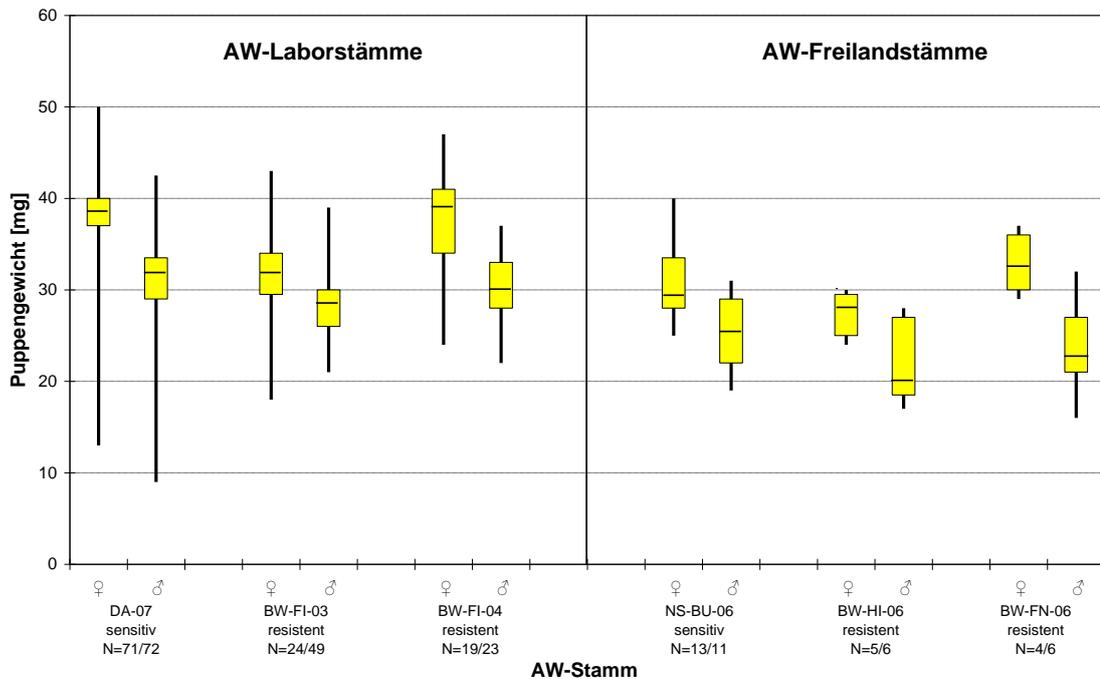


Abb. 1.5: Boxplot-Analyse des Puppengewichts der Männchen (♂) und Weibchen (♀) verschiedener Apfelwicklerstämme (AW-Stämme) aus Labor- und Freiland. Jede Box gibt die 25%-75% Quartile an, wobei die horizontale Linie dem arithmetischen Mittelwert des Puppengewichts (mg) entspricht. Die Vertikalen geben das Minimum bzw. Maximum der jeweiligen Datenreihe an.

### 1.3.4.2. Lebensdauer der Imagos verschiedener Apfelwicklerstämme

Die Entwicklungsdaten der im Labor über einen längeren Zeitraum gezüchteten AW-Stämme zeigten keinen signifikanten Unterschied in der Lebensdauer von Männchen und Weibchen (t-Test,  $p=0,48 > \alpha=0,05$ ). Auch bei den Freilandtieren war zwischen Männchen und Weibchen kein signifikanter Unterschied (t-Test,  $p=0,27 > \alpha=0,05$ ). Die Freilandstämme zeigten mit durchschnittlich 23,3 Tagen (SE=8,2) eine längere Lebensdauer als die Laborstämme mit 15,7 Tagen (SE=4,0) (t-Test,  $p=0,02 < \alpha=0,05$ ). Zwischen empfindlichen und unempfindlichen Apfelwicklern war weder bei den Laborstämmen noch bei den Freilandstämmen ein signifikanter Unterschied in der Lebensdauer der Falter festzustellen (t-Test,  $p=0,18 > \alpha=0,05$  und  $p=0,14 > \alpha=0,05$ ) (Tabelle 1.7).

Tabelle 1.7: Mittlere Lebensdauer der Imagos (Männchen ♂ und Weibchen ♀) verschiedener Apfelwicklerstämme (AW-Stämme) aus Laborzuchten und Freiland.

	AW-Stämme Labor						AW-Stämme Freiland					
	sensitiv		resistent				sensitiv		resistent			
	DA-07		BW-FI-03		BW-FI-04		NS-BU-06		BW-HI-06		BW-FN-06	
<b>Generationen im Labor</b>	>1220		45		33		1		1		1	
<b>Geschlecht der Falter</b>	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂
<b>Anzahl Falter</b>	4	9	7	14	4	8	1	2	2	3	1	1
<b>Mittlere Lebensdauer [Tage]</b>	18,0	16,7	17,3	14,1	13,5	15,5	36,0	29,0	25,0	17,1	21,0	15,0
<b>Standardabweichung (SE)</b>	7,1	2,7	5,6	2,9	4,4	3,4	-	11,3	0	6,4	-	-

### 1.3.4.3. Fekundität und Fertilität

Die Freilandstämme legten im Durchschnitt 198 Eier (SE=33, N=4), die Laborstämme 193 Eier (SE=71, N=15) und zeigten somit keine Unterschiede in der Fekundität (t-Test,  $p=0,68 > \alpha=0,05$ ) (Abb. 1.6).

Die mittlere Schlupfrate der Eilarven lag bei Labor- und Freilandstämmen in etwa gleich um 70% und war nicht signifikant verschieden (t-Test,  $p=0,49 > \alpha=0,05$ ) (Abb. 1.7).

Innerhalb der im Labor gezüchteten AW-Stämme war zwischen den resistenten und den empfindlichen Tiere war nicht nur im Bezug auf die Fekundität (t-Test,  $p=0,46 > \alpha=0,05$ ) sondern auch auf die Fertilität (t-Test,  $p=0,17 > \alpha=0,05$ ) kein signifikanter Unterschied zu verzeichnen.

Vergleicht man alle untersuchten sensitiven AW-Stämme aus Labor und Freiland mit den resistenten Stämmen, zeigte sich bezüglich Fekundität (t-Test,  $p=0,14 > \alpha=0,05$ ) und Fertilität (t-Test,  $p=0,71 > \alpha=0,05$ ) kein signifikanter Unterschied.

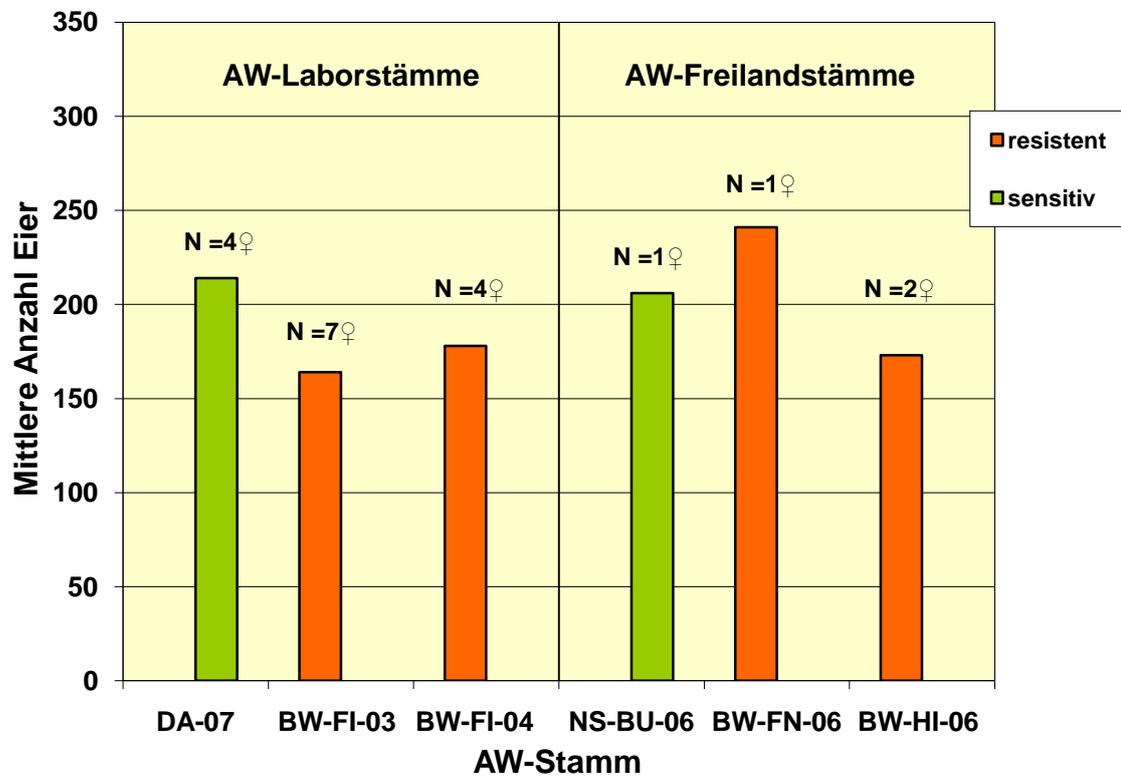


Abb. 1.6: Fekundität: Mittlere Anzahl abgelegter Eier verschiedener Apfelwicklerstämme (AW-Stämme) im Labor und im Freiland, ermittelt unter Langtagbedingungen bei 24°C.

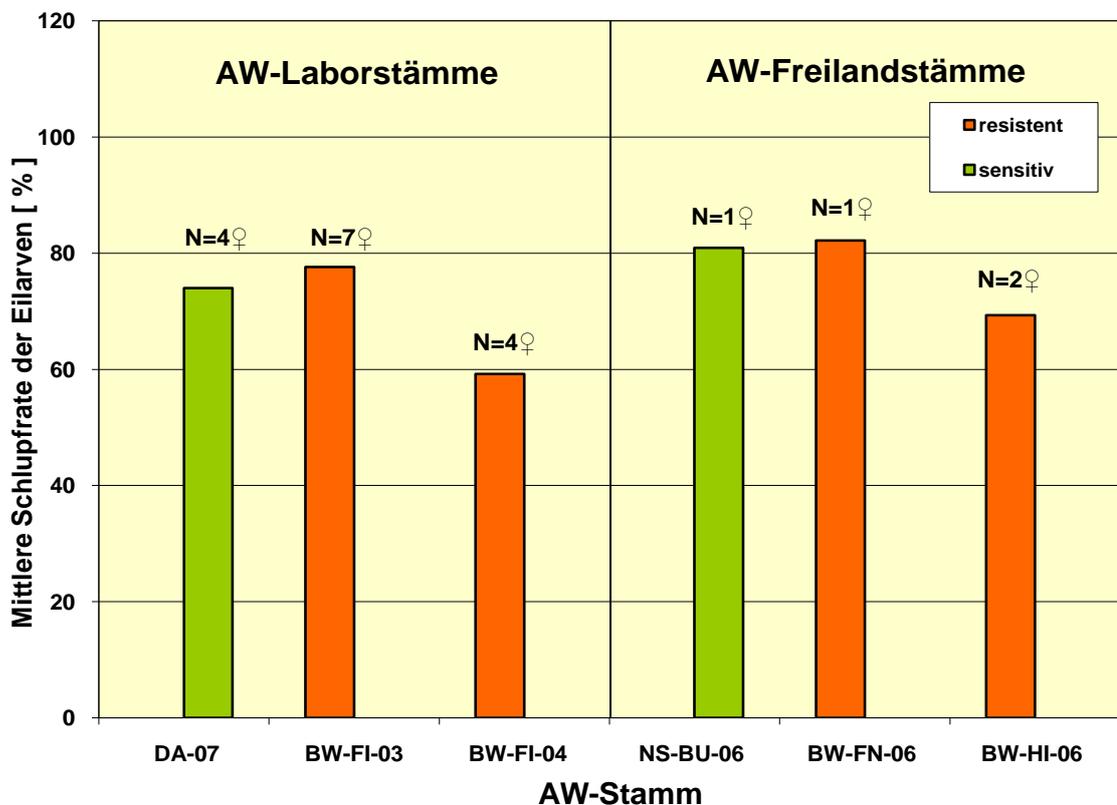


Abb. 1.7: Fertilität: Mittlere Schlupfrate der Eilarven verschiedener Apfelwicklerstämme (AW-Stämme) aus Laborzuchten und aus dem Freiland, ermittelt unter Langtagbedingungen bei 26°C.

Hinsichtlich der untersuchten Parameter wurden weder bei den Laborzuchten noch bei den Freilandstämmen deutliche Unterschiede in der biologischen Fitness zwischen empfindlichen und resistenten Apfelwicklerstämmen gefunden. Die Ausbildung der Resistenz bei den untersuchten Apfelwicklerpopulationen ist offenbar nicht mit Nachteilen bezüglich der untersuchten Fitnessparameter verbunden.

Die resistenten Freilandstämme umfassten genetisch heterogene Populationen aus resistenten und sensiblen Individuen. Daher kann bei den Einzelpaarkreuzungen nicht mit Sicherheit davon ausgegangen werden, dass nur resistente Individuen miteinander gekreuzt wurden. Die Paarung von sensiblen und resistenten Partnern, bzw. ausschließlich sensiblen Partnern, konnte daher nicht ausgeschlossen werden. Mögliche Unterschiede zwischen empfindlichen und resistenten Tieren in diesen Stämmen ließen sich daher nur durch die Verwendung genetisch homogener Stämme feststellen. Solche Stämme müssten jedoch durch Selektion im Labor erzeugt werden und wären dann eventuell an Laborbedingungen adaptiert, was die Untersuchungsergebnisse verfälschen könnte. Dieses Problem ließe sich nur durch extrem aufwendige Einzelpaarkreuzungen, bei denen die Nachkommen einem Resistenztest unterzogen werden, umgehen. Aus dem Resistenzniveau der F1-Nachkommen könnte dann wieder auf den Genotyp der Eltern geschlossen werden.

### 1.3.4.4. Vergleich der Entwicklung eines homogen resistenten Stammes (CpRR1) und eines empfindlichen Freilandstammes (I-MO-NO-06)

Ein Problem bei den bisherigen Fitness-Untersuchungen war die Verwendung von Einzelpaaren aus heterogenen Apfelwicklerstämmen, die sowohl resistent als auch empfindlich sein konnten. Für die weiteren Untersuchungen wurde daher ein am DLR Rheinpfalz über Einzelpaarkreuzungen erzeugter homogener Stamm (CpRR1) eingesetzt (Siehe Kap. 3.2.4). Als Vergleich diente ein empfindlicher Freilandstamm (I-MO-NO 06) aus Italien, der 2006 in Zucht genommen worden war.

Für die biologische Charakterisierung des resistenten Apfelwicklerstammes CpRR1 wurde die Entwicklungsdauer der einzelnen Larvenstadien bis hin zum Falterschlupf ermittelt und mit den Daten der empfindlichen Apfelwicklerpopulation I-MO-NO-06 verglichen.

Der zeitliche Verlauf der Larvalentwicklung ist für beide Stämme in Abb. 1.8a und 1.8b grafisch dargestellt.

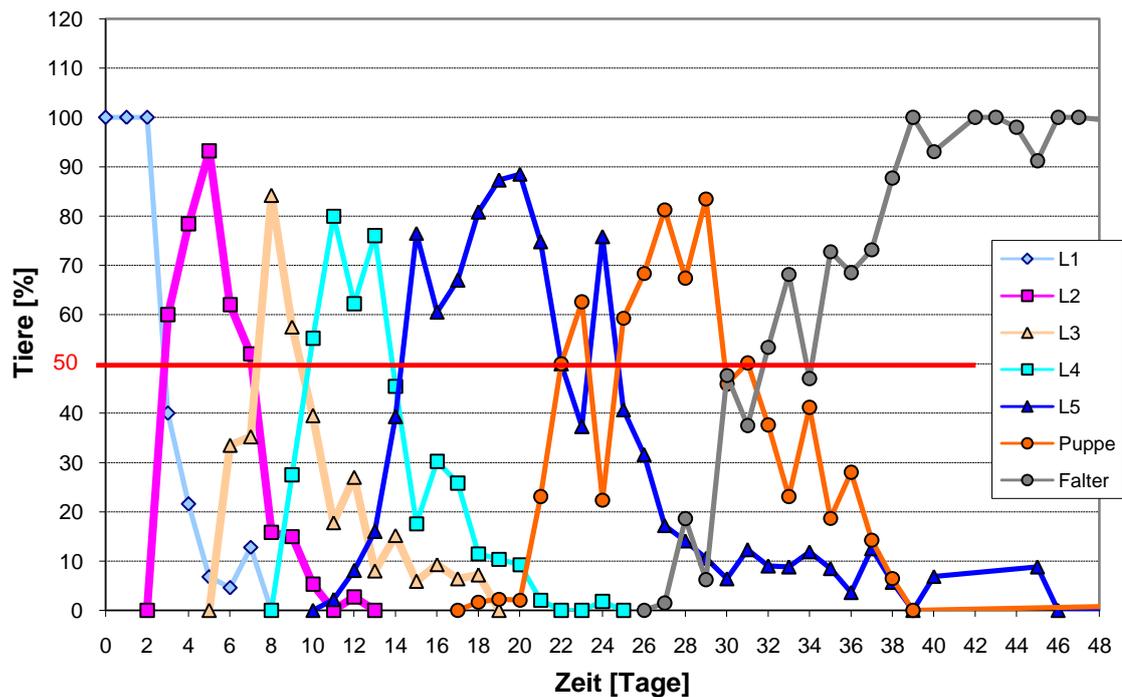


Abb. 1.8a: Verlauf der Entwicklung des empfindlichen Freilandstammes I-MO-NO-06 für alle Stadien bei 26°C unter Langtagbedingungen.

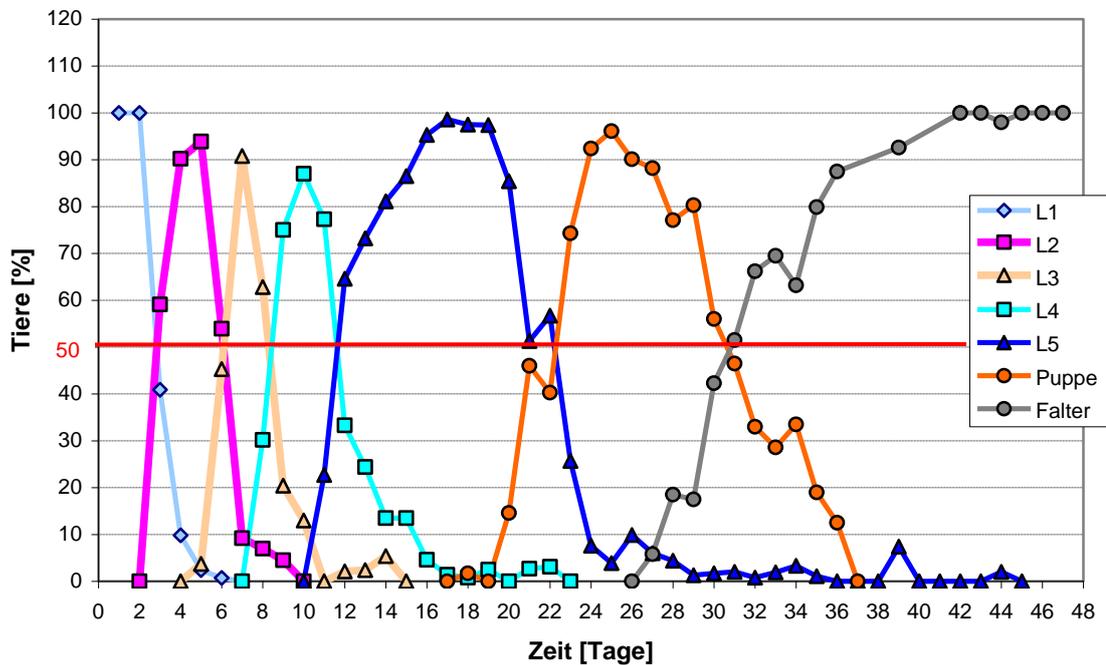


Abb. 1.8b: Verlauf der Entwicklung des homogen resistenten Stammes CpRR1 für alle Stadien bei 26°C unter Langtagbedingungen.

Der Verlauf der Entwicklung des resistenten Laborstammes CpRR1 war insgesamt homogener als der des empfindlichen Apfelwicklerstammes I-MO-NO-06, was sich in den glatteren Entwicklungskurven der einzelnen Stadien von CpRR1 widerspiegelt (Abb. 1.8a und 1.8b). Bei dem homogenen resistenten Stamm erreichten 90-100% der Tiere zur selben Zeit das jeweilige Stadium, während weniger als 10% sich in einem früheren beziehungsweise späteren Stadium befanden. Beim weniger homogenen empfindlichen Apfelwicklerstamm betrug der Anteil an Tieren, die sich nicht im gleichen Stadium befanden bis zu 20%.

Um die Entwicklungsdauer der einzelnen Larvenstadien miteinander vergleichen zu können, wurde der Zeitpunkt ( $Et_{50}$ ), an dem 50% der Testtiere das jeweilige Stadium erreicht hatten, mit Hilfe der Probit-Analyse (MLP 3.08, Nag, Lawes Agricultural Trust, Rothamsted Experimental Station, 1987) statistisch berechnet. Die ermittelten  $Et_{50}$ -Werte wurden anhand eines  $X^2$ -Tests (95% Grenze) für jedes Stadium auf Signifikanz überprüft (Tabelle 1.8).

Die  $Et_{50}$ -Werte zeigten, dass der Stamm CpRR1 die Entwicklung vom ersten Larvalstadium bis zum Falter insgesamt schneller durchläuft, als der aus Italien stammende Stamm I-MO-NO-06. Die L1-Larven des Stammes CpRR1 entwickelten sich mit  $Et_{50}=3,1$  Tagen nur geringfügig schneller als die des empfindlichen Stammes ( $Et_{50}=3,2$  Tagen). Die folgenden Larvenstadien des Stammes CpRR1 wurden jedoch deutlich früher erreicht als die des empfindlichen Stammes. Bereits 3 Tage vor den empfindlichen Tieren befanden sich 50% der resistenten Larven im 5. Larvalstadium. Dies bedeutet, dass die resistenten Larven eine kürzere Entwicklungszeit benötigen und

somit die L5-Larven im Freiland die Äpfel früher verlassen als die der empfindlichen Tiere. Auch die Verpuppung setzte bei CpRR1 2,6 Tage früher ein. Da ihr Puppenstadium selbst jedoch 1,6 Tage länger dauerte, erreichten die resistenten Tiere im Mittel nur einen Tag vor den empfindlichen das Falterstadium. Die verzögerte Entwicklung des empfindlichen Stammes I-MO-NO-06 ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass diese Freilandpopulation aus einer wärmeren Region (Italien) stammt und eventuell für eine optimale Entwicklung eine größere Temperatursumme als die aus Süddeutschland stammende Ursprungspopulation von CpRR1 benötigt.

Tabelle 1.8: Mittlere Entwicklungsdauer ( $Et_{50}$ ) der verschiedenen Larvenstadien des empfindlichen Freilandstammes I-MO-NO-06 und des homogen resistenten Stammes CpRR1.

Stadien	I-MO-NO-06 (N=597)		CpRR1 (N=776)	
	$Et_{50}$ [Tage] (95% Vertrauensgrenzen)	$\chi^2$ (DF)	$Et_{50}$ [Tage] (95% Vertrauensgrenzen)	$\chi^2$ (DF)
L2	3,2* (2,5 – 3,8)	39,43 (3)	3,1* (2,4 – 3,7)	39,83 (3)
L3	7,0 (6,4 – 7,8)	29,38 (3)	6,1 (6,0 – 6,2)	0,45 (3)
L4	9,9 (9,6 – 10,3)	12,51 (3)	8,6 (8,2 – 9,0)	18,13 (3)
L5	15,3 (14,6 – 16,0)	64,55 (10)	12,3 (11,6 – 12,8)	51,16 (7)
Puppe	24,5 (24,4 – 25,6)	126,21 (12)	21,9 (21,5 – 22,2)	28,34 (8)
Falter	32,7 (31,8 – 33,7)	109,34 (13)	31,7 (31,3 – 32,0)	48,01 (12)

\* Werte unterscheiden sich nicht signifikant im Chi-Quadrat-Test (95% Schranke).

### 1.3.5. Wirksamkeit neuer resistenzbrechender CpGV-Isolate gegenüber verschiedenen Apfelwicklerstämmen

Im Vergleich zu CpGV-M zeigten die neuen Virusisolate (Madex Plus und CpGV-I12) eine gute Wirksamkeit gegenüber den resistenten Laborstämmen CpRR1 und BW-FI. Die resultierenden  $LC_{50}$ -Werte lagen im Bereich der  $LC_{50}$  des sensitiven Laborstammes DA für CpGV-M. Am effektivsten erwiesen sich die beiden Isolate Madex Plus und CpGV-I12. Auch bei den Freilandstämmen BW-HI-08 und BW-TU-08 wirkten diese Isolate deutlich besser als CpGV-M. Dagegen erwiesen sich die Freilandstämme NRW-WET-08, NRW-WES-08 und SA-GO-08 als wenig empfindlich für die neuen CpGV-

Isolate. Die CpGV-M resistenten Apfelwicklerstämme zeigten auch gegenüber den neuen Isolaten eine ausgeprägte Resistenz (Abb. 1.9 und Tabelle 1.9). Diese Ergebnisse aus den Biotests im Labor stimmen mit den Beobachtungen aus dem Freiland und den Resistenztests in Einzelpaarkreuzungen dieser Populationen (siehe Teilprojekt 5) überein. Da die neuen Isolate bei diesen Apfelwicklerstämmen auch im Freiland keine eindeutige resistenzbrechende Wirkung zeigten, sind hier weitere Untersuchungen erforderlich. Es ist zu vermuten, dass bei diesen Stämmen andere Resistenzmechanismen zugrunde liegen könnten.

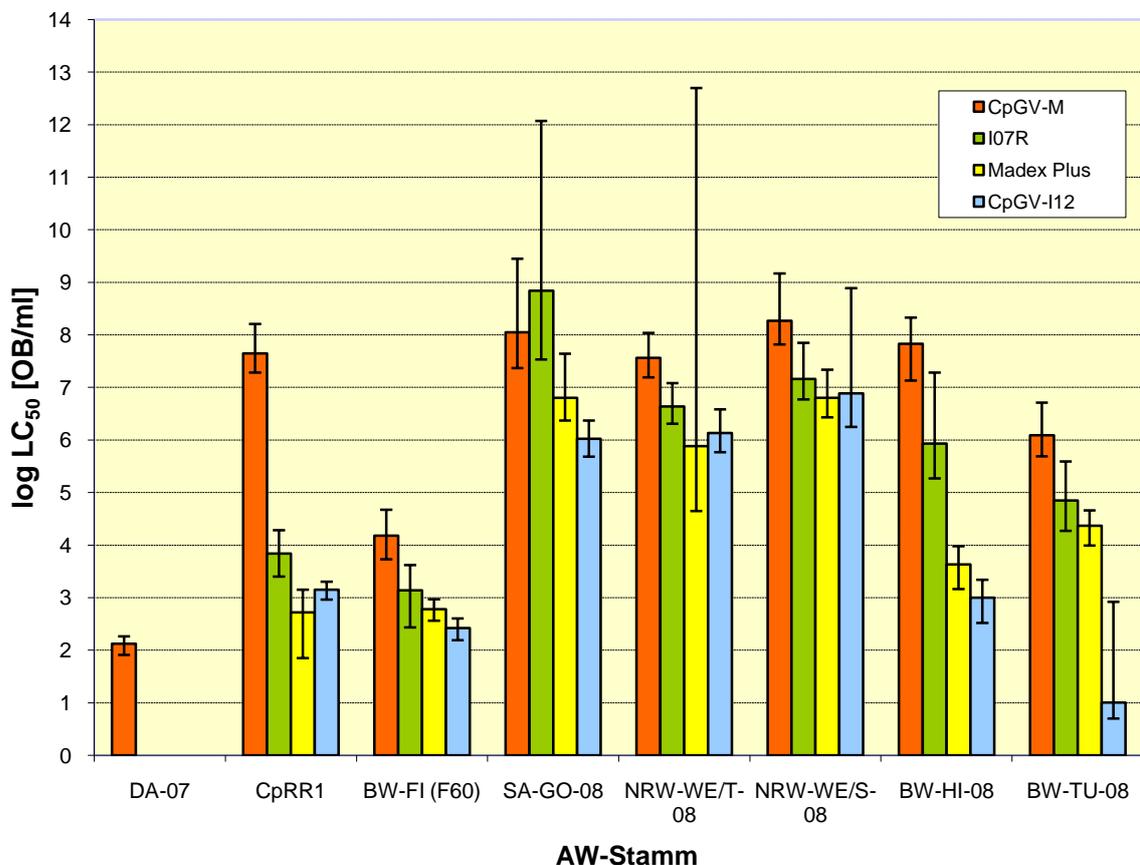


Abb. 1.9: Wirksamkeit neuer resistenzbrechender CpGV-Isolate gegenüber verschieden resistenter Apfelwicklerstämme (AW-Stämme) aus Labor und Freiland, getestet im Biotest nach 14 Tagen. Die vertikalen Linien geben den 95% Vertrauensbereich der  $LC_{50}$  an.

Tabelle 1.9: Vergleich der Wirksamkeit neuer resistenzbrechender CpGV-Isolate anhand der LC50-Werte, ermittelt aus Konzentrations-Wirkungsgeraden in Biotests nach 14 Tagen.

AW-Stamm	CpGV Isolat	N Tiere im Versuch	LC <sub>50</sub> (OB/ml Medium) (95%-Vertrauensgrenzen)	Steigung (SE)	X <sup>2</sup> (DF)
DA-07	CpGV-M	746	1,34 x 10 <sup>2</sup> (0,84 – 1,86)	1,49 (0,15)	28,28 (17)
CpRR1	CpGV-M	231	4,46 x 10 <sup>7</sup> (1,90 – 16,4)	0,68 (0,11)	10,42 (4)
	IO7R	259	6,97 x 10 <sup>3</sup> (2,52 – 18,9)	0,42 (0,06)	45,36 (4)
	Madex Plus	195	5,26 x 10 <sup>2</sup> (0,71 – 14,0)	0,72 (0,16)	0,36 (3)
	CpGV-I12	573	1,40 x 10 <sup>3</sup> (0,92 – 2,02)	0,88 (0,08)	79,86 (11)
BW-FI (F60)	CpGV-M	244	1,51 x 10 <sup>4</sup> (0,54 – 4,68)	0,43 (0,06)	3,77 (4)
	IO7R	213	1,39 x 10 <sup>3</sup> (0,27 – 4,2)	0,39 (0,06)	3,20 (4)
	Madex Plus	267	5,92 x 10 <sup>2</sup> (3,85 – 9,13)	1,48 (0,19)	1,19 (4)
	CpGV-I12	257	2,69 x 10 <sup>2</sup> (1,6 – 4,07)	1,78 (0,30)	12,67 (4)
NRW-WE/ S-08	CpGV-M	433	1,88 x 10 <sup>8</sup> (0,52 – 14,9)	0,38 (0,06)	61,34 (11)
	IO7R	186	1,46 x 10 <sup>7</sup> (0,59 – 7,06)	0,85 (0,18)	3,79 (5)
	Madex Plus	218	6,32 x 10 <sup>6</sup> (2,71 – 22,0)	0,67 (0,11)	14,86 (5)
	CpGV-I12	175	7,76 x 10 <sup>6</sup> (1,78 – 89,1)	0,44 (0,08)	7,82 (5)
NRW-WE/ T-08	CpGV-M	412	3,61 x 10 <sup>7</sup> (1,55 – 11,1)	0,53 (0,06)	42,22 (9)
	IO7R	295	4,37 x 10 <sup>6</sup> (2,06 – 12,1)	0,71 (0,10)	3,92 (5)
	Madex plus	183	7,66 x 10 <sup>5</sup> (0,45 – 51600000)	0,17 (0,07)	3,72 (4)
	CpGV-I12	414	1,35 x 10 <sup>6</sup> (0,59 – 3,77)	0,41 (0,05)	30,40 (11)
SA-GO-08	CpGV-M	409	1,12 x 10 <sup>8</sup> (0,23 – 27,4)	0,27 (0,06)	37,59 (9)
	IO7R	453	6,88 x 10 <sup>8</sup> (0,34 – 11900)	0,26 (0,06)	15,23 (9)
	Madex Plus	202	6,26 x 10 <sup>6</sup> (2,36 – 43,8)	0,83 (0,18)	5,63 (4)
	CpGV-I12	232	1,04 x 10 <sup>6</sup> (0,48 – 2,37)	0,60 (0,08)	9,04 (5)

BW-TU-08	CpGV-M	173	$1,23 \times 10^6$ (0,49 – 5,1)	0,69 (0,14)	9,28 (3)
	IO7R	221	$7,12 \times 10^4$ (1,85 – 38,9)	0,35 (0,07)	4,80 (4)
	Madex Plus	213	$4,65 \times 10^4$ (0,99 – 4,58)	0,99 (0,16)	1,84 (4)
	CpGV-I12	233	$1,0 \times 10^1$ (0,02 – 83,1)	0,51 (0,13)	0,94 (4)
BW-HI-08	CpGV-M	235	$6,71 \times 10^7$ (1,34 – 212)	0,37 (0,08)	8,50 (4)
	IO7R	207	$8,58 \times 10^5$ (1,87 – 189)	0,36 (0,09)	4,09 (4)
	Madex Plus	240	$4,26 \times 10^3$ (1,46 – 9,54)	0,65 (0,09)	3,41 (4)
	CpGV-I12	218	$1,01 \times 10^3$ (0,33 – 2,18)	0,79 (0,13)	2,70 (4)

#### 1.4. Zusammenfassung

Die im Jahr 2006 begonnenen Untersuchungen zur Verbreitung der Resistenz des Apfelwicklers gegenüber CpGV-M haben eindeutig gezeigt, dass dieses Problem nicht nur auf den süddeutschen Raum beschränkt ist, sondern auch in Bioanlagen in Norddeutschland auftritt. Während die in den Jahren von 2003 bis 2005 in Problemanlagen gesammelten Apfelwicklerstämme eine um etwa Faktor 1000 verminderte Empfindlichkeit aufwiesen (Fritsch et al., 2005), zeigten resistente Stämme aus dem Jahr 2006 eine nochmals um Faktor 10 höhere Unempfindlichkeit. Durch eine Optimierung des Biotestsystems konnte belegt werden, dass die Apfelwickler-Freilandstämme in der Regel Mischpopulationen aus empfindlichen und resistenten Tieren sind. Je nach Resistenzgrad, gemessen anhand der  $LC_{50}$  und der Steigung der Konzentrations-Wirkungsgeraden, variierte der Anteil an resistenten bzw. empfindlichen Individuen. Diese Ergebnisse stimmen mit den bisherigen Erkenntnissen zum genetischen Vererbungsmodus der Resistenz überein (Asser-Kaiser et al., 2007; 2010). Die bislang aus dem Freiland in Zucht genommenen Stämme erwiesen sich im Bezug auf ihre Resistenz somit als genetisch nicht homogen.

Untersuchungen zur Stabilität der Resistenz unter Laborbedingungen zeigten, dass nach etwa 60 Generation ohne Selektionsdruck, der Anteil an empfindlichen Tieren in einem ursprünglich heterogen resistenten Freilandstamm wieder zunahm. Nach 5 Jahren Weiterzucht im Labor war dieser Stamm nur noch etwa 100-fach weniger empfindlich gegenüber CpGV-M als der empfindliche Laborstamm DA-07.

Unter Selektionsdruck, das heißt nach Verabreichung von CpGV-haltigem Futter, kommt es innerhalb der Population bereits nach zwei Generationen zu einem sprunghaften Anstieg der Resistenz auf höchstem Niveau, was auf die Eliminierung CpGV-sensitiver Individuen zurückzuführen ist.

Untersuchungen zur Stabilität der Resistenz im Freiland zeigten, dass in den regional verschiedenen, mit CpGV-M behandelten Apfelanlagen bereits unterschiedliche Resistenzniveaus ( $LC_{50}$  zwischen  $10^5$  und  $10^8$  OG/ml Medium) vorlagen. In einigen dieser Anlagen blieb der Grad der Resistenz über mehrere Jahre (2 bis 4) unverändert oder aber stieg noch weiter an.

Erste Laboruntersuchungen zur biologischen Fitness ergaben keine signifikanten Unterschiede in der Fertilität und Fekundität zwischen empfindlichen und resistenten Apfelwicklerstämmen.

Im Jahr 2007 kamen in zusätzlichen Bioanlagen neben dem CpGV-M auch neue resistenzbrechende Virusisolate zum Einsatz. Die Anzahl der in diesen Anlagen gesammelten Diapausetiere war gering, was für eine gute Wirkung dieser neuen Isolate in den Anlagen mit CpGV-resistenten Apfelwicklern spricht. In diesen Anlagen konnten daher keine weiteren Erhebungen zur Verbreitung der Resistenz durchgeführt werden.

Im Jahr 2008 wurde in zwei Anlagen beobachtet, dass eine Vermadung trotz Einsetzen neuer, resistenzbrechender CpGV-Isolate hoch war. Nachdem von diesen Populationen Laborstämme etabliert worden waren und diese in Bioassays getestet wurden, konnte festgestellt werden, dass diese auch gegen Madex Plus und CpGV-I12 weitgehend unempfindlich waren. Es ist zu vermuten, dass bei diesen Populationen andere Resistenzmechanismen zugrunde liegen. Daher sind weitere Untersuchungen und neue Strategien für ein effektives Resistenzmanagement erforderlich.

## 1.5. Literatur

Asser-Kaiser, S.; Heckel, D. G.; Jehle, J. A. (2010): Sex linkage of CpGV resistance in a heterogenous field strain of the codling moth *Cydia pomonella* (L.). J. Invertebr. Pathol. 103, 59-64.

Asser-Kaiser, S.; Fritsch, E.; Undorf-Spahn, K.; Kienzle, J.; Eberle, K. E.; Gund, N. A.; Reineke, A.; Zebitz, C. P. W.; Heckel, D. G.; Huber, J.; Jehle, J. A. (2007): Rapid emergence of baculovirus resistance in codling moth due to dominant, sex-linked inheritance. Science 318, 1916-1918.

Bathon, H. (1981): Zur Zucht des Apfelwicklers, *Laspeyresia pomonella* (L.) (Lep., Tortricidae), auf einem künstlichen Nährmedium. Mitt. dtsh. Ges. allg. angew. Ent. 2, 136-140.

Fritsch, E.; Undorf-Spahn, K.; Kienzle, J.; Zebitz, C. P. W.; Huber, J. (2005): Apfelwickler-Granulosevirus: Erste Hinweise auf Unterschiede in der Empfindlichkeit lokaler Apfelwickler-Populationen. Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutzd. 57(2), 29-34.

Hathaway, D. O.; Clift, A. E.; Butt, B. A. (1971): Development and Fecundity of codling moths reared on artificial diets or immature apples. J. Econ. Entomol., 64, 1088-1090.

Huber, J. (1981): Apfelwickler-Granulosevirus: Produktion und Biotests. Mitt. dtsh. Ges. allg. angew. Ent. 2, 141-145.

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.

Tanada, Y. (1964): A granulosis virus of the codling moth, *Carpocapsa pomonella* (Linnaeus) (Olethreutidae, Lepidoptera). J. Insect Pathol. 6, 378-380.

Vickers, R. A. (1997): Effect of delayed mating on oviposition pattern, fecundity and fertility in codling moth, *Cydia pomonella* (L.) (Lepidoptera: Tortricidae). Aust. J. Entomol. 36, 179-182.

## Teilprojekt 2

### Populations- und Resistenzgenetik minderempfindlicher Apfelwicklerstämme

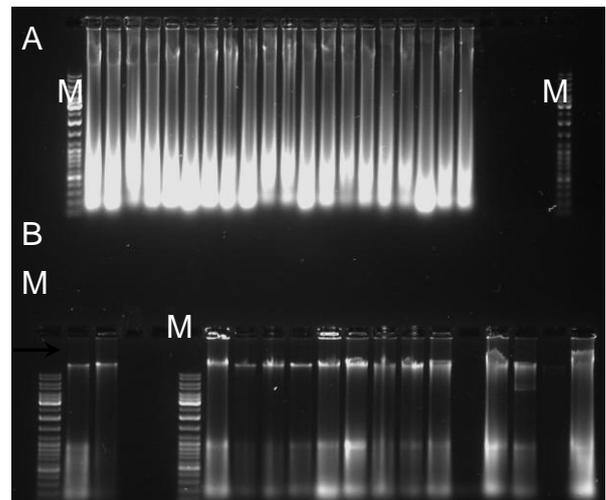
(Forschungsanstalt Geisenheim, Max-Planck-Institut Jena, Universität Hohenheim)

#### 2.1. Genetische Kartierung des/der möglichen CpGV-Resistenzloci

##### Methodischer Vorversuch A: Etablierung eines DNA-Extraktionsprotokolls für die Gewinnung hochreiner DNA

Für alle geplanten Untersuchungen war es zunächst wichtig, ein DNA-Extraktionsprotokoll zu etablieren, anhand dessen ausreichend reine DNA guter Qualität gewonnen werden konnte. Gleichzeitig sollte auch erreicht werden, die DNA-Extraktion vieler Tiere in einem einzigen Arbeitsschritt zu bewerkstelligen. Eingesetzt wurde zunächst ein modifiziertes CTAB-Protokoll (Reineke et al., 1998), wobei der mechanische Gewebeaufschluss mit Hilfe eines TissueLyser der Firma Qiagen erfolgte (dabei können 48 Proben gleichzeitig aufgeschlossen werden). Dies resultierte zwar in einer ausreichenden DNA-Menge, allerdings waren die Ergebnisse erster AFLP-Untersuchungen dieser DNAs insofern nicht zufrieden stellend, da sich auf Agarosegelen stellenweise ein erheblicher „Schmier“ (Hintergrund) befand, der höchstwahrscheinlich auf Verunreinigungen der DNA z.B. mit RNA-Resten zurückzuführen ist. Daher wurde der eigentlichen DNA-Extraktion eine RNase-Behandlung nachgeschaltet, die eine Gewinnung hochreiner DNA erlaubte (Abb. 2.1).

Abb. 2.1: Agarosegel mit genomischer DNA von *C. pomonella* Tieren vor (A, oberes Gel) und nach (B, unteres Gel) Behandlung der DNA mit RNase. M kennzeichnet einen Größenstandard. Auf Gel B ist hochmolekulare DNA zu sehen, die im Gegensatz zur DNA im Gel A frei von Verunreinigungen ist.



## Methodischer Vorversuch B: Molekularer Ansatz zur Bestimmung des Geschlechts von *Cydia pomonella* Larven

Im Laufe der Erstellung von Kreuzungspopulationen von *C. pomonella*, die für die Kartierung des CpGV-Resistenzgens Verwendung finden sollten, gab es 96 Larven, die sich nicht verpuppten, sondern im letzten Larvenstadium in ihrer Entwicklung „feststeckten“. Für alle weiteren Versuchsansätze sowie für die Überprüfung der Hypothese einer geschlechtsgebundenen Vererbung der CpGV-Resistenz war es allerdings zwingend notwendig, das Geschlecht dieser Tiere zu kennen. Für die sichere Geschlechtsbestimmung der Larven wurden zwei verschiedene methodische Ansätze gewählt, die jeweils mit der Hälfte einer durchteilten Larve durchgeführt wurden.

Zum einen wurde aus der vorderen Hälfte der Larven genomische DNA nach einem modifizierten CTAB-Protokoll (Reineke et al., 1998) extrahiert und ein Abschnitt eines geschlechtsspezifischen Apfelwickler-Gens amplifiziert. Die Sequenzen des betreffenden Primers wurden aus der Publikation von Fuková et al. (2007) entnommen. Die PCR-Produkte wurden auf einem Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Nur bei weiblichen *Cydia*-Tieren waren auf dem Agarosegel deutliche Banden mit einer Größe von 93 bp vorhanden (Abb. 2.2).

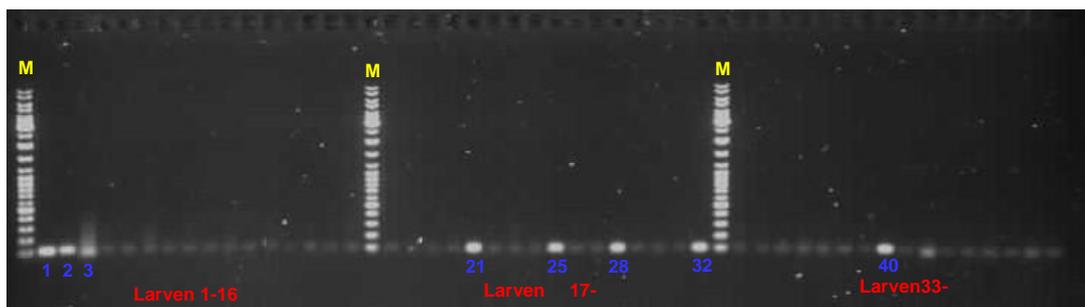


Abb. 2.2: Agarosegel mit PCR-Produkten eines geschlechtsspezifischen Apfelwickler-Gens von 48 *C. pomonella* Larven. M kennzeichnet einen Größenstandard. PCR-Produkte weiblicher Tiere sind mit Zahlen gekennzeichnet.

Für den zweiten Ansatz diente der hintere Teil der Larve. Die Larvenhälfte wurde mit Lactic Acetic Orcein für ca. 30-50 Minuten angefärbt und auf einem Objektträger zwischen Deckglas und Objektträger fixiert. Unter einem Zeiss Axiovert 200 Mikroskop wurde bei einer Vergrößerung von 100x die polypliden Interphasen-Zellkerne auf das Vorhandensein von Sexchromatin untersucht. Bei Lepidopteren tragen weibliche Tiere die Geschlechtschromosomen ZW und männliche ZZ. Demnach ist bei einem weiblichen Tier ein tief gefärbter heterochromatischer W-Körper zu sehen, während ein Lepidopteren-Männchen keinen W-Körper besitzt (Abb. 2.3).

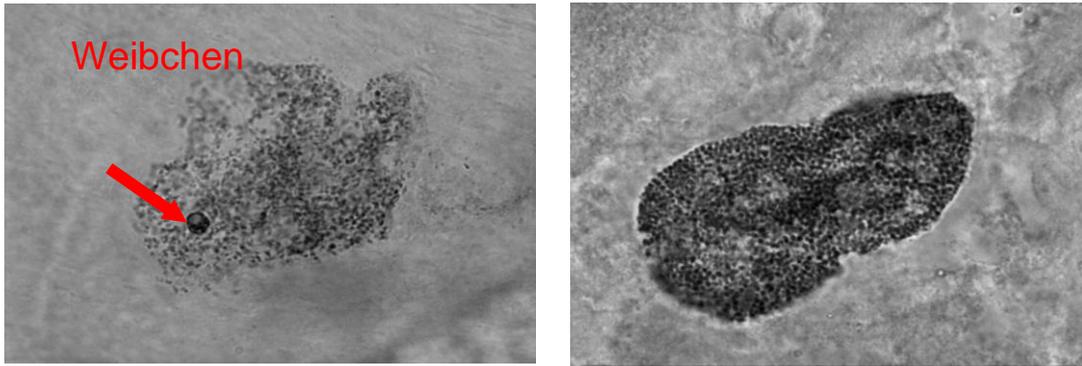


Abb. 2.3: Sexchromatin von einem Apfelwickler-Weibchen (linke Abbildung) und einem Apfelwickler-Männchen (rechte Abbildung). Der Pfeil kennzeichnet den W-Körper des Weibchens.

### DNA-Schnelltest zur Geschlechtsbestimmung von *Cydia*-Larven

Auf Basis der Ergebnisse der Geschlechtsbestimmung von *Cydia*-Larven mittels PCR wurde eine einfache Methode zur schnellen DNA-Extraktion und damit zur raschen Determination des Geschlechts von frisch geschlüpften *Cydia*-Larven entwickelt. Hierfür wurden Erstlarven in einen Tropfen Wasser gelegt, der sich auf einem Objektträger befand. Mit einem Skalpell wurde die frisch geschlüpfte Larve durchgeschnitten und etwas zerdrückt. Das Gemisch aus Wasser und DNA wurde in Reaktionsgefäße gegeben und für ca. 30 Sekunden bei 460 Watt in einer Mikrowelle erhitzt. Anschließend wurde mit den von Fuková et al. (2007) veröffentlichten geschlechtsgebundenen Primern (spezifisch für das *C. pomonella* W-Chromosom weiblicher Tiere) eine PCR durchgeführt. Auf einem Agarosegel (Abb. 2.4) zeigten die Männchen keine Banden, da sie über die Geschlechtschromosomen ZZ verfügen, während es eine deutliche Bande bei den Weibchen (ZW) gab (Ergebnisse wurden publiziert in Fuková et al. 2009).

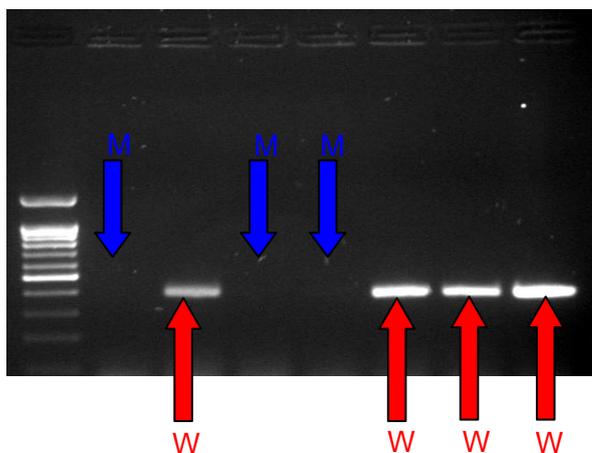
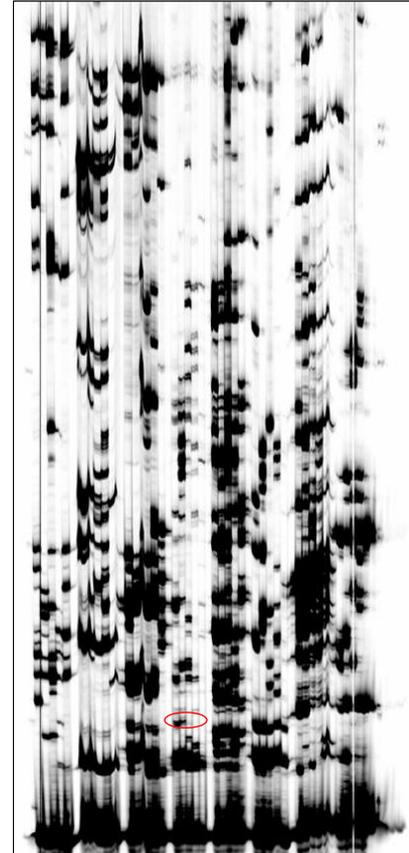


Abb. 2.4: Agarosegelbild mit Amplifikationsprodukten mit dem geschlechtsgebundenen Primer W2. Es wurden sieben *C. pomonella* Erstlarven in einem DNA-Schnelltest getestet. Nur bei den weiblichen Tieren (W) ist eine deutliche Bande bei ca. 400 bp zu sehen, die männliche Tiere (M) nicht aufweisen.

### 2.1.1. Kartierungsansätze mittels AFLP-Markern

Die Kenntnis der genetischen Basis der Ausbildung von „Minderempfindlichkeit“ von Apfelwicklern gegenüber CpGV ist für das weitere Resistenzmanagement von großem praktischem Interesse. Zur Identifizierung und Isolierung möglicher beteiligter genetischer Mechanismen wurden im Teilprojekt 2 verschiedene Ansätze durchgeführt, um beteiligte Genloci genetisch zu kartieren und damit zu identifizieren. Hierfür wurden auf Grund des hohen Informationsgehaltes zunächst Marker auf Basis von AFLPs (amplified fragment length polymorphism) eingesetzt.

Abb. 2.5: Ausschnitt aus einem AFLP-Gel mit gepoolten DNAs von Tieren aus resistenten und empfindlichen *Cydia*-Populationen. Die AFLP-Analysen wurden mit 8 verschiedenen AFLP-Primer-kombinationen durchgeführt. Die markierte Bande bezeichnet ein AFLP-Fragment, das nur bei empfindlichen, nicht aber bei resistenten Tieren detektiert wurde. Versuche, dieses Fragment aus dem Gel zu isolieren schlugen fehl, außerdem wies es nur eine sehr geringe Größe (ca. 100 bp) auf.



### AFLP-Analysen gepoolter DNA von *C. pomonella* Tieren aus dem Freiland

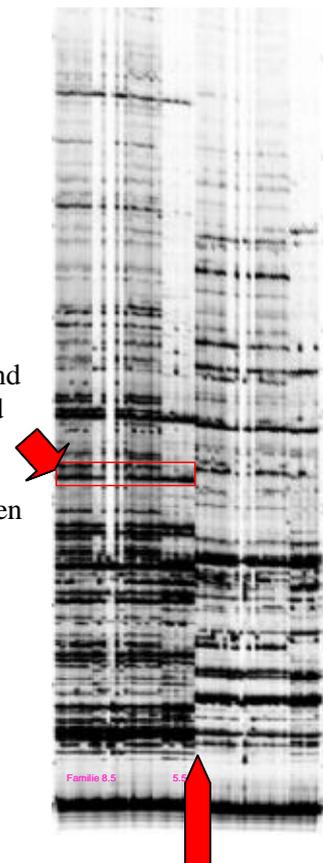
Als Basis für ein zukünftiges Resistenzmanagement sollte in diesem Teilprojekt einer oder mehrere diagnostische Marker entwickelt werden, anhand dessen empfindliche und minderempfindliche *C. pomonella* Populationen rasch voneinander unterschieden werden können. DNA von sensitiven und resistenten Tieren aus verschiedenen Freilandpopulationen von *C. pomonella*, die in den Jahren 2003 und 2004 gesammelt wurden, wurde extrahiert und anschließend „gepoolt“, d.h. DNA von jeweils 10 Tieren pro Population wurden für die weiteren Analysen zusammen gemischt, um den Einfluss individuenspezifischer Unterschiede im Bandenmuster möglichst gering zu halten. Diese gepoolten DNAs wurden mit insgesamt 42 verschiedenen AFLP-Primerkombinationen analysiert. Dies resultierte in der Detektion von einer Vielzahl von Banden, von denen der größte Teil kleiner als 500 bp war. Zugleich wurde deutlich, dass – trotz des Mischens unterschiedlicher DNAs von resistenten bzw. sensitiven Tieren – die Proben genetisch sehr divers waren, was sich in einer Vielzahl von

polymorphen Banden auf den AFLP-Gelen niederschlug (Abb. 2.5). Ein Vergleich des Bandenmusters von Tieren aus empfindlichen und sensitiven Populationen gestaltete sich daher ausgesprochen schwierig, da es bis auf wenige Ausnahmen (2 AFLP-Fragmente im Größenbereich von unter 200 bp, Abb. 2.5) keine AFLP-Banden gab, die durchgehend und ausschließlich bei allen sensitiven bzw. bei allen resistenten Tieren auftraten. Der weitere Einsatz der AFLP-Technik an natürlichen *Cydia*-Populationen zur Entwicklung diagnostischer Marker für CpGV-Resistenz erschien daher nicht geeignet.

### AFLP-Analysen von *C. pomonella* Tieren aus Kreuzungspopulationen

Tiere aus den Kreuzungspopulationen aus Teilprojekt 3 wurden mit Hilfe von AFLP Markern analysiert. In Abbildung 2.6 ist ein Beispiel eines AFLP-Geles zu finden, bei dem Individuen aus 3 verschiedenen Familien mit 2 verschiedenen AFLP-Primerkombinationen analysiert wurden. Deutlich wird zum einen, dass die Methodik zur Extraktion von DNA und zur Anwendung von AFLP-Markern bei *Cydia* erfolgreich etabliert wurde, und zum anderen, dass die DNAs von Individuen einzelner Familien deutliche Polymorphismen aufweisen, die bei Eltern und Nachkommen zu finden sind.

Abb. 2.6: Ausschnitt aus einem AFLP-Gel mit Eltern und Kreuzungsnachkommen von drei *Cydia*-Familien (BC 5.5, 8.1 und 8.5). Die Tiere wurden mit zwei verschiedenen AFLP-Primerkombinationen (Eco-ATG + Mse-CAC: links, Eco-AAG+Mse-CTG: rechts) analysiert. Die Pfeile kennzeichnen monomorphe (mit Kästen) sowie polymorphe AFLP-Fragmente.



Da sich im Verlauf der bereits begonnenen AFLP-Kreuzungsanalysen herausstellte, dass der für die Kreuzungen verwendete resistente *Cydia*-Stamm genetisch nicht homogen für den oder die Resistenzloci war (siehe Teilprojekt 3), wurde von einer weiteren AFLP-Analyse von Nachkommen dieser Kreuzungen Abstand genommen.

Für die weitere Kartierung des möglichen Resistenzlocus wurden Tiere aus neuen Kreuzungsfamilien herangezogen. Man wählte dazu Tiere der Familien BCAm7.6 und BCAm7.7 aus, die mit homogen resistenten CpRR Individuen erstellt worden waren und damit das genetisch beste Ausgangsmaterial darstellten, um den CpGV-Resistenzlocus zu lokalisieren. Im neuen Ansatz wurden aus weiblichen Tieren, die auf virusfreier Diät (Ko) und Tieren, die auf virushaltiger Diät mit der diskriminierenden Dosis „LC95“ gehalten worden waren (viruskontaminierte Diät = VK) der Familien BCmA7.6 und BCmA7.7 DNA isoliert. Für die weiteren AFLP-Analysen wurden DNA-Pools gebildet (4 verschiedene Pools: weibl. Ko-Tiere der Fam. 7.6, weibl. VK-Tiere der Fam. 7.6, weibl. Ko-Tiere der Fam. 7.7 und weibl. VK-Tiere der Fam. 7.7). Mit Hilfe der AFLP-Technik wurden diese Pools mit 222 verschiedenen Primerkombinationen getestet. Wurden unterschiedliche Banden zwischen Tieren, die auf virusfreier Diät (Ko) und viruskontaminierter Diät (VK) gefressen hatten, in einer Familie (beide Familien wurden separat betrachtet) gefunden, wurde die DNA von einzelnen Tieren des zuvor eingesetzten Pools getestet (Abb. 2.7). Zeigte sich auch bei den Einzeltieren das gleiche Muster, ist davon auszugehen, dass der entsprechende AFLP-Marker möglicherweise geschlechtsgebunden ist (Abb. 2.8).

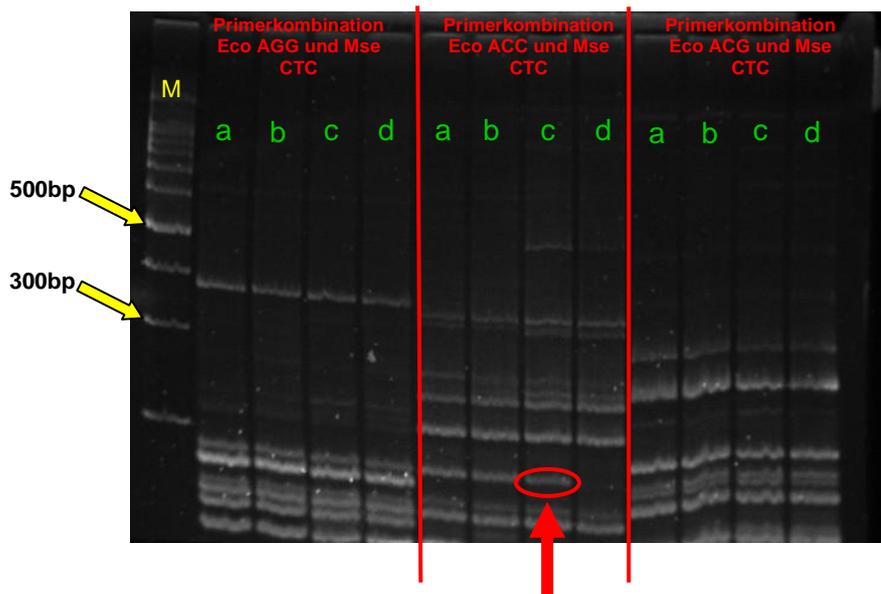


Abb. 2.7: AFLP-Gel mit *C. pomonella* DNAs. In „a“ befindet sich der Pool der weiblichen Ko-Tiere (auf virusfreier Diät gehalten) der Fam. BCAm7.6, „b“: Pool der weiblichen VK-Tiere (auf virus-haltiger Diät gehalten) der gleichen Familie. „c“ und „d“: Pools der Fam. BCAm7.7 Ko-Tiere bzw. VK-Tiere. Der Pfeil zeigt bei Primerkombination 2 eine deutliche Bande bei dem Pool der Ko-Tiere (BCAm7.7), der bei den VK-Tieren fehlt.

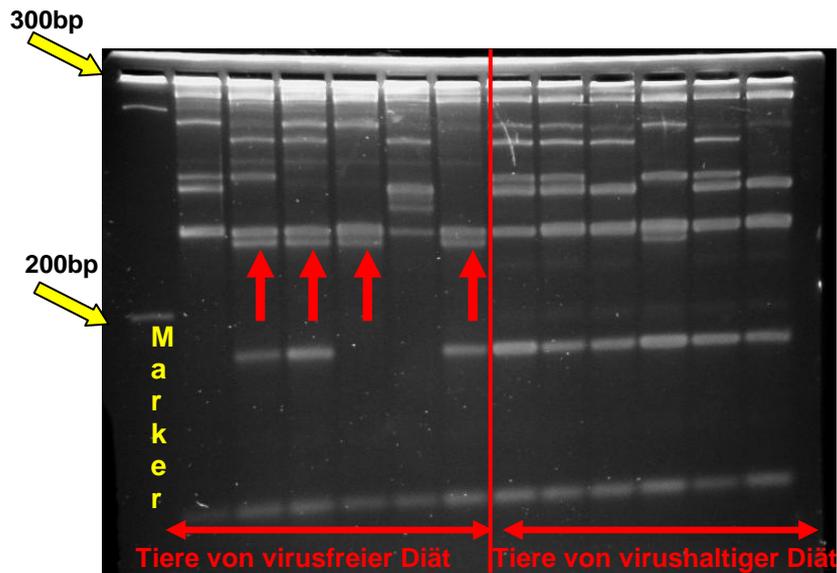


Abb. 2.8: AFLP-Gel mit der Primerkombination Eco AGG/Mse ACG mit Einzeltieren aus den *C. pomonella* Familien BCAm7.6 und BCAm7.7. Das Muster aus den getesteten DNA-Pools (siehe Abb. 7) muss auch wieder in den einzelnen DNAs auftreten. Pfeile kennzeichnen die gewünschten Amplifikationsprodukte, die gereinigt und sequenziert wurden.

Die Banden dieses Musters wurden ausgeschnitten, die DNA aus dem Gelstückchen gelöst, per PCR wieder vermehrt und aufgereinigt. Die gereinigte DNA wurde zum Sequenzieren versendet. Tabelle 1 fasst die erhaltenen Ergebnisse zusammen.

Die Sequenzen dieses Ansatzes wurde bei Kaikobase (= Datenbank im Internet, <http://sgp.dna.affrc.go.jp/KAIKO/>) mit den Sequenzen, die dort vorliegen, verglichen. Kaikobase beinhaltet Daten der Lepidopterenart *Bombyx mori* (Seidenspinner). Des Weiteren erfolgte ein Abgleich dieser Sequenzen mit Eintragungen in GenBank. Wenige Apfelwickler-Sequenzen zeigten Homologien mit den dort vorliegenden Sequenzen des Seidenspinner, jedoch war kein Treffer auf dem Geschlechtschromosom von *B. mori* zu finden. Hätten die Apfelwickler-Sequenzen im Abgleich mit den Seidenspinner-Sequenzen einen Treffer auf dem Geschlechtschromosom von *B. mori* ergeben, wäre es sehr wahrscheinlich gewesen, dass die Sequenzen auch im Apfelwickler geschlechtsgebunden gewesen wären.

Um zu überprüfen, ob die identifizierten Sequenzen tatsächlich auf dem Z-Chromosom des Apfelwicklers liegen, wurde ein Southern Blot mit genomischer DNA durchgeführt. Zuvor wurden alle AFLP-Fragmente, die kleiner als 200 bp waren in einen Vector (pGEM-T Vector) kloniert, um den Einsatz als Sonde im Southern Blot-Verfahren zu ermöglichen. Für den Southern Blot wurde hochmolekulare DNA von männlichen und weiblichen Apfelwicklern eingesetzt, die mit den Restriktionsenzymen Dra I und Xba I geschnitten wurde. Die Fragmente wurden auf ein Agarosegel aufgetragen, elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Membran geblottet. Die AFLP-Fragmente, die als

Tabelle 2.1: Erhaltene AFLP-Fragmente aus den *C. pomonella* Familien BC m A 7.6 und BC m A 7.7 mit Angabe gelungener Sequenzierungen (Sequenzlänge „n.a.“ bezieht sich auf fehlgeschlagene Sequenzierreaktionen) und Homologien bei Kaikoblast bzw. GenBank. Die mit einem \* markierten Fragmente liegen möglicherweise auf dem Geschlechtschromosom von *C. pomonella*.

Codierung	Primerkombination	Familie	Bandengröße auf AFLP-Gel	Sequenzlänge	Homologien
d2	Eco AAG + Mse ACC	7.6.	ca. 300bp	260bp	Chr.11 <i>B. mori</i>
a9	Eco AGG + Mse ACA	7.6.	ca. 300bp	250bp	Chr.11 <i>B. mori</i>
c3	Eco CGC + Mse ACT	7.6.	ca. 200bp	140bp	no hit
b	Eco AAG + Mse AGG	7.6.	ca. 280bp	n.a.	-
j6 (1)	Eco ACC + Mse CTC	7.7.	ca. 180bp	n.a.	-
j6 (2)	Eco ACC + Mse CTC	7.7.	ca. 300bp	n.a.	-
j9 *	Eco CGC + Mse CTC	7.7.	ca. 250bp	80bp	no hit
g9	Eco CGC + Mse CTA	7.7.	ca. 370bp	n.a.	-
o	Eco AGG + Mse ACG	7.7.	ca. 280bp	n.a.	-
n	Eco ATG + Mse ACG	7.6.	ca. 350bp	n.a.	-
b9	Eco AGG + Mse ACT	7.6.	ca. 450bp	n.a.	-
e8 *	Eco AAC + Mse CTG	7.7.	ca. 250bp	n.a.	-
bC	Eco AAGC + Mse AGG	7.6.	ca. 200bp	186bp	no hit
bG	Eco AAGG + Mse AGG	7.6.	ca. 500bp	253bp	no hit
bT	Eco AAGT + Mse AGG	7.6.	ca. 250bp	183bp	no hit
nA	Eco ATGA + Mse ACG	7.6.	ca. 300bp	n.a.	-
nT	Eco ATGT + Mse ACG	7.6.	ca. 300bp	176 bp	no hit
oA	Eco AGGA + Mse ACG	7.7.	ca. 280bp	n.a.	-
oG	Eco AGGG + Mse ACG	7.7.	ca. 200bp	n.a.	-
oT	Eco AGGT + Mse ACG	7.7.	ca. 300bp	n.a.	-
c3C	Eco CGCC + Mse ACT	7.7.	ca. 400bp	365bp	no hit
c3T	Eco CGCT + Mse ACT	7.7.	ca. 450bp	n.a.	-
j9A	Eco CGCA + Mse CTC	7.7.	ca.140bp	n.a.	-
j9C *	Eco CGCC + Mse CTC	7.7.	ca. 280bp	226bp	no hit
aa *	Eco ACGA + Mse CTC	7.6.	ca. 370bp	n.a.	-
ac	Eco ACGG + Mse CTC	7.6.	ca. 280bp	192bp	no hit
b(1)	Eco AAG + Mse AGG	7.6.	ca. 500bp	n.a.	-
b(2)	Eco AAG + Mse AGG	7.6.	ca. 550 bp	n.a.	-

Sonde fungierten, wurden mit dem High Prime DNA Labeling Kit von Roche markiert und mit der Membran hybridisiert. Gab es ein stärkeres Signal bei der männlichen DNA (Z/Z), scheint das AFLP-Fragment auf dem Z-Chromosom zu liegen. Ist kein Unterschied in der Intensität der Banden auf dem Blot zu erkennen, scheint das entsprechende Fragment autosomal (nicht geschlechtsgebunden) zu sein. Von 20 überprüften AFLP-Fragmenten scheinen nach diesen Hybridisierungsversuchen vier auf dem Z-Chromosom des Apfelwicklers lokalisiert zu sein (Abb. 2.9 und Markierung \* in Tabelle 2.1). Diese vier potentiell Z-gebundenen Fragmente könnten nun für weitere Kartierungsansätze zur Lokalisation des CpGV-Resistenzgens in Kreuzungsnachkommen verwendet werden.

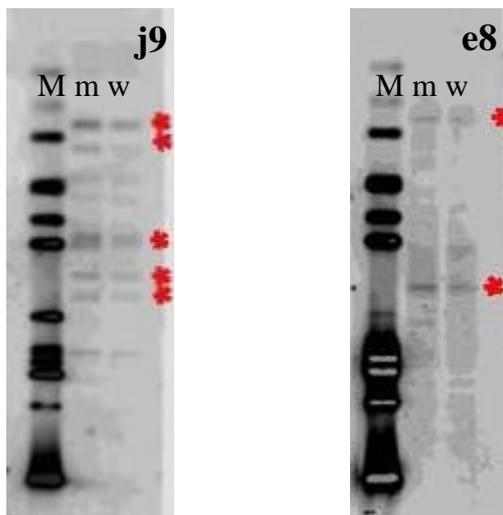


Abb. 2.9: Zwei Southern Blot-Ergebnisse mit genomischer männlicher (m) und weiblicher (w) *C. pomonella* DNA und den Proben j9 und e8 (siehe Tabelle 2.1) als Sonden. Die roten Sternchen zeigen die Banden an, die bei der männlichen DNA ein stärkeres Signal geben und daher sehr wahrscheinlich Z-gebunden sind. M kennzeichnet einen Größenstandard.

### 2.1.2. Sequenzierungen von Teilen des *C. pomonella* Z-Chromosoms zur Identifizierung von Abschnitten, die mit der CpGV-Resistenz gekoppelt sind

Die Forschergruppe um Frantisek Marec (Institute of Entomology, Ceske Budejovice) arbeitet daran, das *C. pomonella* Z-Geschlechtschromosom zu isolieren und zu sequenzieren. Von dieser Arbeitsgruppe wurden verschiedene Z-BAC-Klone mit Apfelwickler DNA zur Verfügung gestellt. BACs (bacterial artificial chromosome) dienen als Vektoren und erlauben die Klonierung von größeren Genomabschnitten.

Da bekannt ist, dass die CpGV-Resistenz auf dem *C. pomonella* Z-Chromosom lokalisiert ist, sollten mit Hilfe dieser *C. pomonella* Z-BACs Z-spezifische Marker erzeugt und für nachfolgende Kartierungsansätze eingesetzt werden.

Für die Erzeugung Z-Chromosomen-spezifischer Sequenzen wurden in einem ersten Ansatz AFLP-Reaktionen mit der Z-BAC-DNA durchgeführt. Erzeugte AFLP-Banden ab einer Größe von 300 bp wurden aus dem Gel ausgeschnitten (Abb. 2.10), die DNA aus dem Gelstückchen heraus gelöst, mit Hilfe der PCR vermehrt und aufgereinigt. Die gereinigte DNA wurde sequenziert, die Ergebnisse sind in Tabelle 2.2 aufgeführt.

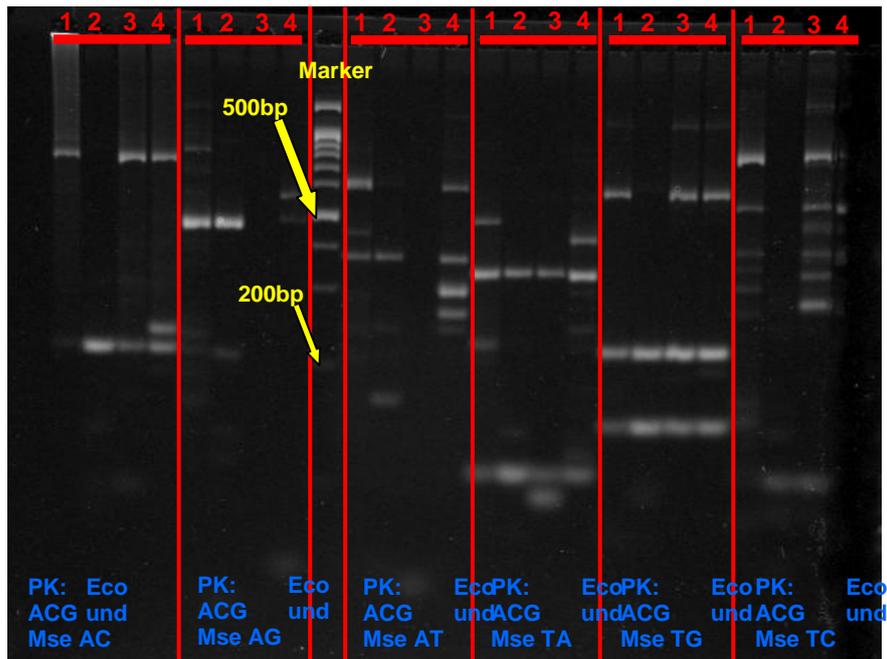


Abb. 2.10: AFLP-Gel mit *C. pomonella* Z-BAC-DNA mit sechs verschiedenen Primerkombinationen (PK). Pro Primerkombination wurden vier verschiedene Z-BACs eingesetzt (1-4).

Tabelle 2.2: *C. pomonella* Z-BAC-DNA Sequenzen, die mittels AFLP-Technik isoliert wurden. Die Blast-Abgleiche erfolgten in den Datenbanken GenBank und Kaikobase. In den Ansätzen wurden noch 34 weitere Sequenzen erstellt, die allerdings signifikante Blast-Hits bei *E. coli* zeigten und daher hier nicht aufgeführt sind.

Codierung	Primerkombination	Bandengröße auf AFLP-Gel	Sequenzlänge	Blast-Hit
1b	Eco ACG + Mse TA	ca. 500bp	293bp	nein
28a	Eco AGG + Mse TA	ca. 1000bp	141bp	nein
40b	Eco AGG + Mse AT	ca. 300bp	199bp	nein

### **2.1.3. Sequenzierungen von Genabschnitten bei *C. pomonella*, die bei anderen Lepidopteren auf dem Z-Chromosom lokalisiert sind**

Ein weiterer Versuch, genetische Marker zur Kartierung des Resistenzgens bei *Cydia pomonella* zu entwickeln, bestand darin, Abschnitte von Genen beim Apfelwickler zu amplifizieren, die beim Seidenspinner *Bombyx mori* auf dem Z-Chromosom lokalisiert sind. Es handelte sich um vier Gene: paraplegin, tan, bgi und Lap. Mit Hilfe der PCR und Primern, die für die Amplifikation dieser Gene bei der Lepidopterenart *Helicoverpa amigera* eingesetzt wurden, wurde versucht, die homologen Genabschnitte im Apfelwicklergenom zu erhalten. Trotz einer Vielzahl an Optimierungsversuchen des PCR-Programmes (Zyklusanzahl, Annealing-Temperatur, eingesetzte DNA-Templatmenge und Komponenten) ist es nicht gelungen, ein Amplifikationsprodukt zu gewinnen. Dies deutet darauf hin, dass es sich bei den betreffenden Genen um schwach konservierte Abschnitte des Genoms handelt, und dass ein Transfer von Primersequenzen zwischen verschiedenen Lepidopterenarten in diesen Fällen nicht möglich ist.

Es wurde außerdem versucht, folgende Gene zu amplifizieren: tpi (Dopman et al., 2005), Kettin (Koike et al., 2003), Ldh (Putnam et al., 2007), Period (Regier et al., 1998) und Apterous (Yasukochi et al., 2006). Diese Gene liegen bei anderen Lepidopteren-Arten (*Bombyx mori*, *Ostrinia nubilalis* und *Papilio*-Arten) auch auf dem Z-Chromosom. Zunächst wurden mit Hilfe von degenerierten Primern die entsprechenden Genabschnitte in *Cydia pomonella* amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden nachfolgend gereinigt und sequenziert, auf Basis der erhaltenen Sequenzen wurden *C. pomonella*-spezifische Primer für die betreffenden Gene hergestellt. Diese Primer wurden nach Optimierung der jeweiligen PCR-Bedingungen anschließend für die Amplifikation von PCR-Produkten aus DNA von je einem *Cydia*-Weibchen und einem *Cydia*-Männchen eingesetzt. Die erhaltenen Amplifikationsprodukte wurden ebenfalls gereinigt und sequenziert. Über einen Vergleich der erhaltenen Sequenzen von männlichen und weiblichen Tieren war es möglich, Unterschiede in den Sequenzen zu entdecken. Diese Polymorphismen, SNP (single nucleotide polymorphism) genannt, könnten zukünftig für weitere Kartierungsansätze eingesetzt werden.

## **2.2. Transkriptomanalyse von CpGV-resistenten Apfelwicklern**

Zur Identifizierung einer oder mehrerer Gene, die möglicherweise an der Ausprägung der CpGV-Resistenz beteiligt sind, wurde eine Transkriptomanalyse durchgeführt. Hintergrund dieses Ansatzes war die Tatsache, dass es neben dem ursprünglichen Isolat CpGV-M mittlerweile eine Reihe neuer CpGV-Isolate gibt, die in der Lage sind, die CpGV-Resistenz beim Apfelwickler zu brechen (z.B. CpGV-I12). Damit stellt sich die Frage, ob in einer CpGV-resistenten Apfelwicklerlarve andere Gene aktiviert oder deaktiviert werden, wenn sie CpGV-M oder CpGV-I12 zu sich nimmt, und ob über die Identifizierung potentiell differentiell exprimierter Gene auch Hinweise auf mögliche CpGV-Resistenzmechanismen erhalten werden können.

Für die Transkriptomanalyse wurden CpGV-M resistente Apfelwickler-Larven (L4-Stadium) mit virushaltiger und virusfreier künstlicher Diät über das „Droplet Feeding“ gefüttert (siehe Abb. 2.14). Apfelwickler im vierten Larvenstadium wurden zuerst drei

bzw. 14 Stunden hungern gelassen. Danach bekamen sie künstliches Futter, auf dem sich ein Tropfen (= 1 µl) von CpGV-M oder CpGV-I12 (1000 OBs/1 ml) oder Wasser als Kontrolle befand. Die Larven hatten 180 min Zeit, das Futterstückchen zu fressen. Nur Larven, die das ganze Stückchen Futter gefressen hatten, wurden in das Experiment involviert. Nach 10, 15, 20 und 24 h wurden die Tiere in flüssigem Stickstoff abgetötet.

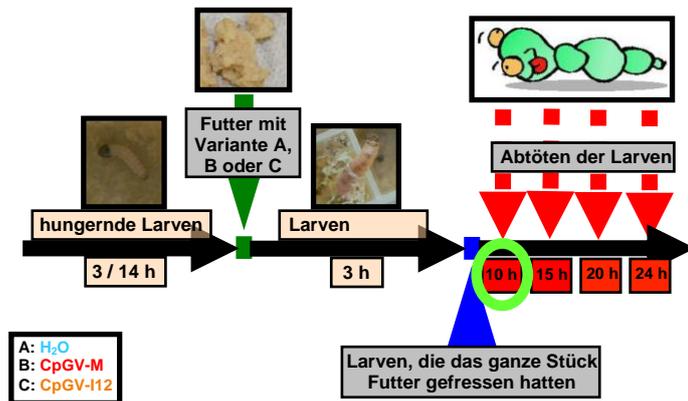


Abb. 2.14: Ablaufschema des Droplet Feeding-Versuchs mit *C. pomonella* Larven und virushaltiger bzw. virusfreier künstlicher Diät.

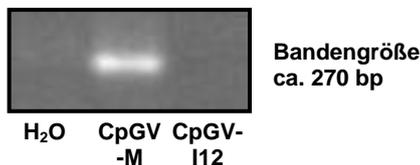


Abb. 2.15: Ausschnitt eines cDNA-AFLP Gels zur Analyse von differenziell exprimierten Genen bei Apfelwickler-Larven, die drei verschiedene Futterquellen aufgenommen haben. Bei den Tieren, die nur Wasser bzw. CpGV-I12 zu sich genommen haben, ist keine Bande sichtbar, während bei Tieren nach Aufnahme von CpGV-M eine differenziell exprimierte Bande gezeigt wird.

Für einen ersten Ansatz wurde RNA aus dem Darm von je sieben Tieren 10 h nach Fraß der virushaltigen bzw. virusfreien Diät extrahiert und in cDNA synthetisiert. Die erhaltenen cDNAs der einzelnen Tiere wurden gepoolt und einer cDNA-AFLP-Analyse unterzogen. Hierzu wurden die drei Pools (Aufnahme von H<sub>2</sub>O, CpGV-M bzw. CpGV-I12) mit 65 verschiedenen AFLP-Primerkombinationen untersucht. Die Auftrennung der Produkte erfolgte auf einem Origins-Elektrophoresesystem (Elchrom). Banden, die nur in einer der drei Varianten vorhanden waren, entsprachen differenziell exprimierten Genen und wurden ausgeschnitten und sequenziert.

Insgesamt wurden 12 differentiell exprimierte Gene aus den cDNA-AFLP Gelen ausgeschnitten und sequenziert. Eine Abgleich mit Eintragungen der GenBank Datenbank zeigte Homologien zu Datenbankeintragen bei sieben Sequenzen (Abb. 2.16). Die mutmaßlichen Gene sind in Immunreaktionen und in Verdauungsprozessen von Insekten involviert. Ein Gen, das für das „Insect Intestinal Mucin“ kodiert, ist von besonderem Interesse, da es ein Hauptbestandteil der peritrophischen Membran im Insektendarm ist und Insekten vor mikrobiellen Infektionen schützt. Baculoviren haben einen Weg gefunden, diese Barriere zu durchbrechen, insbesondere durch das Protein Enhacin, welches eine Mucin-abbauende Wirkung hat (Wang & Granados, 1997). Hier könnten weitere Untersuchungen ansetzen, um die Rolle von Mucin in der Ausbildung von CpGV-Resistenz beim Apfelwickler zu analysieren.

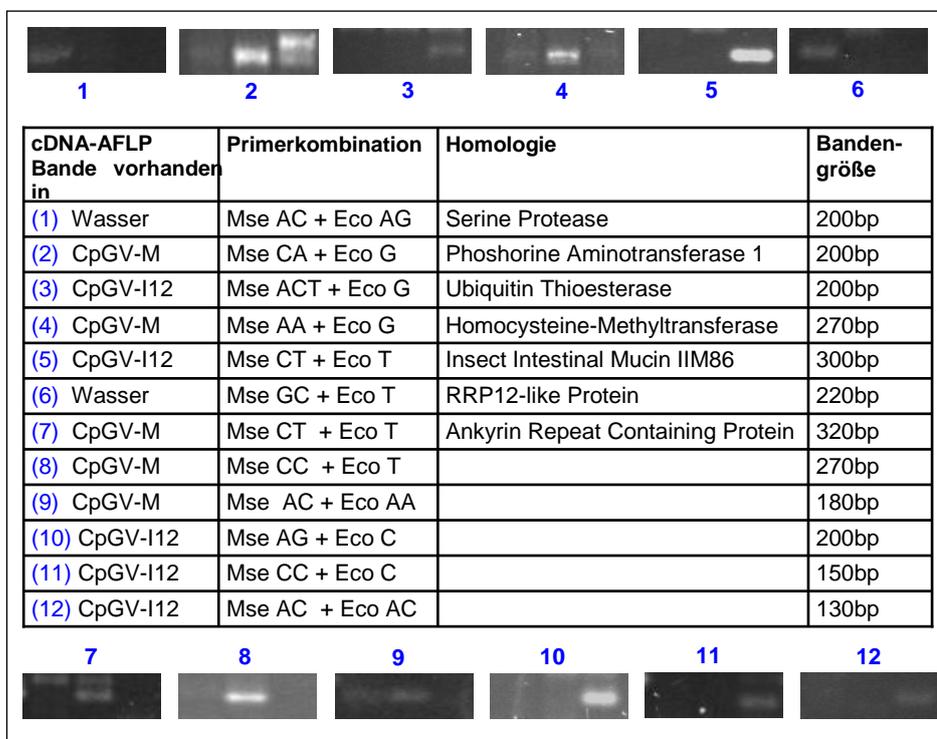


Abb. 2.16: Identifizierte cDNA-AFLP Banden mit der Größenangabe der Bande, der benutzten Primerkombination und Homologien in der Datenbank GenBank. Die blauen Nummern in den Klammern und das entsprechende cDNA-AFLP Gelbild (ober- und unterhalb der Tabelle) zeigt, welche Futtervariante (Wasser, CpGV-M oder CpGV-12) zur Expression der entsprechenden Bande bei *C. pomonella*-Larven führte.

### 2.3. Mikrosatelliten-Analyse mit Freilandpopulationen von *C. pomonella*

Mikrosatelliten (SSR, Simple Sequence Repeats) sind kurze DNA Sequenzen, die sich im Genom eines Organismus mehrmals hintereinander wiederholen. Diese Sequenzen bestehen aus zwei bis vier Nukleotiden, die zwischen zehn und 100-mal wiederholt auftreten können. Da die Anzahl der Mikrosatelliten in einem DNA-Abschnitt von

Individuum zu Individuum schwanken kann (Längenpolymorphismus), eignen sie sich sehr gut als Werkzeug in der Populationsgenetik und zur Unterscheidung von Herkünften.

Im Rahmen des vorliegenden Projektes sollten über den Einsatz von SSR-Markern Aussagen getroffen werden, inwieweit sich CpGV-empfindliche und CpGV-resistente Apfelwickler-Populationen im Freiland genetisch voneinander unterscheiden. Damit können möglicherweise einerseits Hinweise über das Ausbreitungsverhalten von *C. pomonella* sowie andererseits über die Verschleppung resistenter Individuen bzw. die gleichzeitige Entstehung von CpGV-Resistenz in mehreren Populationen getroffen werden.

Dreizehn verschiedene *C. pomonella*-Populationen (siehe Tabelle 2.3) aus Freiland-sammlungen wurden mit sechs verschiedenen SSR-Primern (Franck et al., 2005) analysiert. Es wurden die Primer Cp1.60, Cp1.62, Cp2.39, Cp3.169, Cp3.180 und Cp5.24 ausgewählt.

Nachdem die PCR mit den fluoreszenz-markierten Primern durchgeführt wurden, wurden die Produkte zuerst auf einem 1%-igen Agarosegel hinsichtlich erfolgreicher Amplifikation getestet (siehe Abb. 2.11).

Tabelle 2.3: Herkünfte der *C. pomonella*-Individuen für die Mikrosatelliten-Analysen mit Angabe der Sammlungsorte, des Sammlungsjahrs, Codierung der Sammlungsorte und ihrer Sensivität gegenüber dem Apfelwickler-Granulosevirusisolat aus Mexiko (CpGV-M)

<b>Herkunft der Tiere</b>	<b>Sammlungsjahr</b>	<b>Codierung</b>	<b>CpGV-M Ausprägung</b>
Baden-Württemberg, Bodensee	2005	BW-HI	resistent
Baden-Württemberg, Bötzingen bei Freiburg	2006	BW-BO	resistent
Baden-Württemberg, Lauffen, Südbaden	2006	BW-LF	resistent
Baden-Württemberg, Insel Mainau	2006	BW-MA	resistent
Baden-Württemberg, Denzlingen	2004	CH oder BW-DE	resistent
Italien, Modena, Nanatola	2006	I-MO-NO	normal empfindlich
Baden-Württemberg, Fischingen	2004	MB4 oder BW-FI	resistent
Nordrhein-Westfalen, Wesel; Apfelsorte: Elstar	2008	NRW-WE	sehr hohe Resistenz
Nordrhein-Westfalen, Wesel; Apfelsorte: Santana	2008	NRW-WES	sehr hohe Resistenz
Nordrhein-Westfalen, Wesel; Apfelsorte: Topaz	2008	NRW-WET	sehr hohe Resistenz
Sachsen, Görlitz	2008	SA-GO	resistent
Saarland, Saarwellingen	2004	Latz oder SL-SA	resistent
Baden-Württemberg, Hattnaun, Bodensee	2004	SS	einzelne resistente Tiere

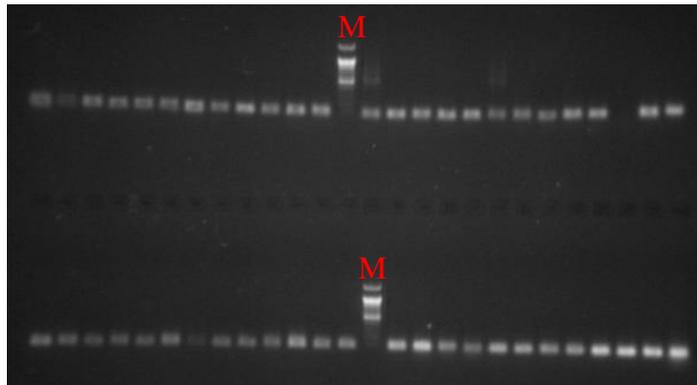


Abb. 2.11: Agarosegelbild mit *C. pomonella*-Tieren von vier verschiedenen Populationen (SA-GO, NRW-WET, BW-DE und BW-FI) und Amplifikationsprodukten des SSR-Primers Cp 1.62. In Spur M befindet sich ein Größenstandard.

Sofern die entsprechende Bande auf dem Agarosegel vorhanden war, wurden die Proben auf einem automatischen Sequenzierer der Firma Beckman Coulter aufgetragen. Das Vorhandensein bzw. die Abwesenheit der entsprechenden Peaks (Beispiel siehe in Abb. 2.12) wurde von einer entsprechenden Software (Genome Lab GeXP, Version 10.2, Beckman Coulter) ausgewertet.

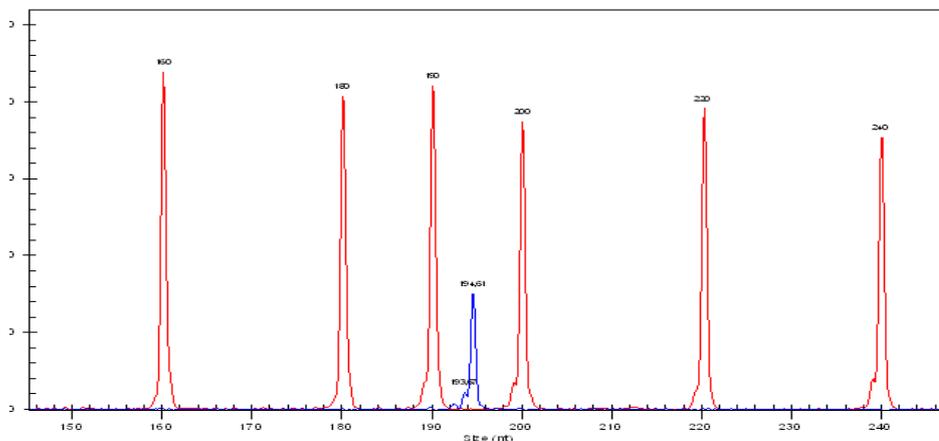


Abb. 2.12: Amplifikationsprodukt des SSR-Primers Cp 3.169 mit einer *C. pomonella*-DNA-Probe der Population BW-DE. Der Größenstandard wird durch die roten Peaks angezeigt. Der blaue Peak zeigt das Vorhandensein eines homozygoten Allels des entsprechenden Mikrosatelliten bei dieser Probe an.

Die statistische Auswertung der erhaltenen genotypischen Daten erfolgte mit dem Programm Genepop 4.0. Da es sich bei Mikrosatelliten um codominante Marker handelt, wurden die Allelfrequenzen (relative Häufigkeit („Prozentsatz“) eines Allels unter den untersuchten Individuen), die Anzahl an Nullallelen für jeden SSR-Marker, der Fixationsindex  $F_{ST}$  (Angaben über die Populationsstruktur bzw. über Variationen in der genetischen Zusammensetzung der Populationen), sowie der Inzuchtkoeffizient  $F_{IS}$  (Verhältnis von Allelen zwischen Individuen der gleichen Subpopulation, ein positiver  $F_{IS}$  Wert bedeutet verringerte Heterozygotie und damit Inzucht) berechnet.

Die Anzahl der Allele bzw. Nullallele in den einzelnen Populationen sind in Tabelle 2.4 wiedergegeben. Bei Nullallelen handelt es sich um den Verlust des betreffenden SSR-Markers durch Veränderung der DNA-Sequenz (Mutation). Die Population aus dem Saarland (SL-SA/Latz) und die Population aus Lauffen (BW-LF) wiesen den geringsten Anteil an Nullallelen auf. Insgesamt war der Anteil an Nullallelen relativ niedrig (meist deutlich unter 10%), die höchsten Anteile lagen bei den Markern Cp1.60 (Population Hattenau SS, 21% der Individuen zeigten nach zweifacher Wiederholung kein Amplifikationsprodukt), Cp3.169 (Populationen Hischlatt BW-HI und Italien, 22% ohne Amplifikationsprodukt) und Cp3.180 (Populationen BW-DE, SS und NRW-WE, 20-22% ohne Amplifikationsprodukt).

Der  $F_{IS}$ -Wert über alle Populationen und verwendeten Marker berechnet betrug 0,187. Dabei bedeutet ein positiver  $F_{IS}$ -Wert verringerte Heterozygotie (Inzucht), ein negativer Wert erhöhte Heterozygotie (Auskreuzen). Der schwach positive Wert von 0,187 deutet damit auf eine mittlere bis geringe „Inzucht“ hin.

In einem entsprechenden Bereich bewegte sich auch der  $F_{ST}$ -Wert, der über alle Populationen und verwendeten Marker berechnet 0,0983 betrug. Für die Interpretation der  $F_{ST}$ -Werte wird folgende Einteilung vorgenommen:

- 0-0,05: geringe genetische Differenzierung
- 0,05-0,15: mittlere genetische Differenzierung
- 0,15-0,25: große genetische Differenzierung
- >0,25: sehr große genetische Differenzierung

Damit sind die untersuchten *C. pomonella* Populationen mit einem mittleren Ausmaß genetisch voneinander differenziert.

Tabelle 2.4: Anzahl der Allele (Al) und Anteil der Nullallele (Na) je SSR-Locus in den untersuchten *C. pomonella* Populationen (n gibt die Anzahl untersuchter Individuen pro Population an).

Population	n	Anzahl Allele/Locus bzw. Anteil Nullallele/Locus											
		Cp1.60		Cp1.62		Cp2.39		Cp3.169		Cp3.180		Cp5.24	
		Al	Na	Al	Na	Al	Na	Al	Na	Al	Na	Al	Na
Baden-Württemberg, Hirschlatt (BW-HI)	12	12	0.00	11	0.05	11	0.00	8	0.22	9	0.16	6	0.00
Baden-Württemberg, Bötzingen (BW-BO)	12	12	0.13	12	0.13	12	0.09	12	0.00	12	0.00	12	0.13
Baden-Württemberg, Lauffen (BW-LF)	12	12	0.06	12	0.00	12	0.00	12	0.00	12	0.00	12	0.04
Baden-Württemberg, Insel Mainau (BW-MA)	8	8	0.00	8	0.15	8	0.14	8	0.12	8	0.00	7	0.11
Baden-Württemberg, Denzlingen (BW-DE oder CH)	12	12	0.08	12	0.06	12	0.07	10	0.08	11	0.20	6	0.00
Baden-Württemberg, Fischingen (BW-FI oder MB)	14	13	0.00	14	0.00	13	0.18	11	0.12	12	0.00	12	0.09
Baden-Württemberg, Hattenau (SS)	12	11	0.21	11	0.00	11	0.06	12	0.04	10	0.22	7	0.13
Nordrhein-Westfalen, Wesel, Apfelsorte: Elstar (NRW-WE)	11	11	0.00	11	0.06	11	0.10	11	0.06	11	0.22	11	0.08
Nordrhein-Westfalen, Wesel, Apfelsorte: Santana (NRW-WES)	12	12	0.00	12	0.06	12	0.11	11	0.00	12	0.00	12	0.10
Nordrhein-Westfalen, Wesel, Apfelsorte: Topaz (NRW-WET)	13	13	0.00	12	0.11	13	0.17	13	0.16	12	0.00	12	0.12
Sachsen, Görlitz (SA-GO)	12	12	0.11	12	0.00	12	0.16	12	0.06	11	0.00	12	0.04
Saarland, Saarwellingen (SL-SA oder Latz)	10	10	0.00	9	0.00	10	0.02	9	0.00	6	n.i.	6	0.00
Italien (I-MO-NO)	7	7	0.00	7	0.00	7	0.14	7	0.21	7	0.00	7	0.29

Tabelle 2.5: Geographische Distanzen zwischen den Populationen (oberhalb der Diagonale, Luftlinie in km) und  $F_{ST}$ -Werte (unterhalb der Diagonalen) zwischen den untersuchten *C. pomonella* Populationen.

<b>Population</b>	<b>BW-HI</b>	<b>BW-BO</b>	<b>BW-LF</b>	<b>BW-MA</b>	<b>BW-DE</b>	<b>BW-FI</b>	<b>SS</b>	<b>SL-SA</b>	<b>NRW-WE</b>	<b>NRW-WES</b>	<b>NRW-WET</b>	<b>SA_GO</b>	<b>I-MO-NO</b>
Baden-Württemberg, Hirschlatt (BW-HI)		137	150	24	126	144	15	265	480	480	480	542	380
Baden-Württemberg, Bötzingen (BW-BO)	0.231		150	117	12	50	153	153	388	388	388	609	445
Baden-Württemberg, Lauffen (BW-LF)	0.219	-0.016		217	229	283	25	233	415	415	415	578	500
Baden-Württemberg, Insel Mainau (BW-MA)	0.162	0.059	0.022		104	120	36	250	465	465	465	560	358
Baden-Württemberg, Denzlingen (BW-DE)	0.129	0.135	0.124	0.091		52	140	160	405	405	405	620	997
Baden-Württemberg, Fischingen (BW-FI)	0.037	0.109	0.099	0.075	0.005		153	195	437	437	437	657	442
Baden-Württemberg, Hattenau (SS)	0.037	0.151	0.135	0.078	0.01	0.047		276	495	495	495	545	420
Saarland, Saarwellingen (SL-SA)	0.045	0.181	0.162	0.097	0.020	0.049	-0.01		245	245	245	604	595
Nordrhein-Westfalen, Wesel, Elstar (NRW-WE)	0.053	0.124	0.116	0.071	0.002	0.028	-0.01	-0.01		0	0	582	820
Nordrhein-Westfalen, Wesel, Santana (NRW-WES)	0.021	0.212	0.201	0.139	0.073	0.114	0.015	-0.015	0.016		0	582	820
Nordrhein-Westfalen, Wesel, Topaz (NRW-WET)	0.131	0.131	0.119	0.088	0.032	0.023	0.047	0.045	0.032	0.108		582	820
Sachsen, Görlitz (SA-GO)	0.120	0.111	0.101	0.083	-0.009	0.012	0.187	0.036	0.014	0.089	0.006		762
Italien (I-MO-NO)	0.212	0.131	0.133	0.109	0.155	0.124	0.143	0.186	0.122	0.196	0.112	0.119	

Werden die  $F_{ST}$ -Werte zwischen den einzelnen Populationen betrachtet (Tabelle 2.5), so ergibt sich allerdings ein sehr viel differenziertes Bild: Zwischen einzelnen Populationen besteht keine genetische Differenzierung (z.B. Sachsen SA-GO und NRW-WET), andere Populationen sind dagegen sehr stark genetisch voneinander differenziert (z.B. Bötzingen BW-BO und Hirschlatt BW-HI). Ein deutlicher Zusammenhang zwischen räumlicher Nähe und genetischer Differenzierung („Isolation by distance“) konnte dabei nicht festgestellt werden (Abb. 2.13), allerdings weist die Regressionsgerade eine leichte Steigung auf.

Damit kann insgesamt festgehalten werden, dass es lokal deutliche genetische Unterschiede zwischen den untersuchten Apfelwicklerpopulationen gibt, die nicht mit der Entfernung zwischen den Populationen in Zusammenhang stehen. So existieren in manchen Gebieten genetisch voneinander getrennte Populationen, in anderen Gebieten lässt sich wiederum keine Differenzierung zwischen einzelnen Populationen nachweisen.

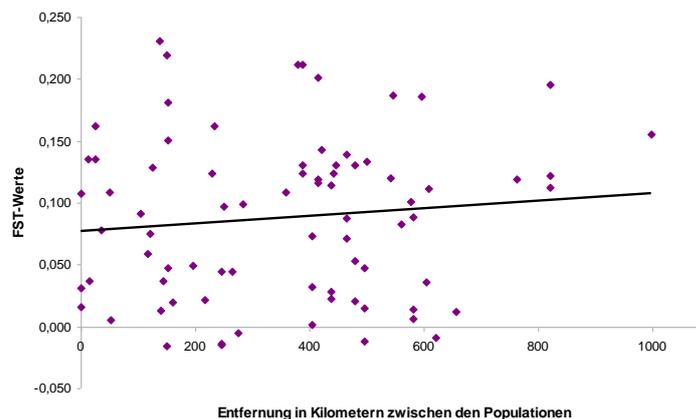


Abb. 2.13: Regressionsanalyse zur Überprüfung des Isolation-by-distance-Modells auf der Grundlage der Ergebnisse der 6 eingesetzten SSR-Marker bei 13 verschiedenen *C. pomonella* Populationen.

## 2.4. Zusammenfassung

Im Rahmen des Teilprojektes 2 wurde die Populations- und Resistenzgenetik CpGV-minderempfindlicher *C. pomonella*-Stämme und Kreuzungsfamilien untersucht.

Für die Absicherung der Hypothese einer geschlechtsgebundenen Vererbung der CpGV-Resistenz (siehe Teilprojekt 3) wurden im Rahmen dieses Projektes zwei unterschiedliche methodische Ansätze gewählt, die es erlauben, das Geschlecht der Tiere bereits im frühen Larvalstadium sicher zu bestimmen. Zum einen wurde das Sexchromatin männlicher und weiblicher Tiere angefärbt, zum anderen wurde ein PCR-Schnelltest bei frisch geschlüpften *C. pomonella*-Larven etabliert, bei dem nach kurzer

Extraktion der Tiere in der Mikrowelle ein Fragment eines weibchenspezifischen Gens amplifiziert werden konnte.

Ein weiteres Ziel dieses Teilprojektes war die Isolierung des verantwortlichen CpGV-Resistenzgens, da dies eine wichtige Voraussetzung für das zukünftige CpGV-Resistenzmanagement ist. Hierzu wurden zunächst molekulare Marker auf Basis von AFLPs mit DNA-Extrakten von CpGV-resistenten bzw. CpGV-empfindlichen *C. pomonella*-Freilandpopulationen erzeugt. Ziel war es, einen oder mehrere diagnostische Marker zu entwickeln, anhand dessen empfindliche und minderempfindliche *C. pomonella*-Populationen rasch voneinander unterschieden werden können. Da die Tiere aus Freilandpopulationen genetisch allerdings sehr divers waren, ließ sich keine AFLP-Bande identifizieren, die ausschließlich bei sensitiven bzw. bei resistenten Tieren auftrat. Im weiteren Projektverlauf wurden daher Kreuzungsnachkommen von homogen resistenten (CpRR1) bzw. sensitiven (CpS) Individuen in den AFLP-Analysen eingesetzt. Es wurden insgesamt 28 AFLP-Fragmente identifiziert, die in Geschwistertieren aus diesen Kreuzungen vorkamen, die entweder virusfreie oder virus-haltige Diät gefressen hatten. Diese Fragmente wurden sequenziert, wiesen aber keine Homologien zu bekannten Genen aus Datenbanken auf. Zwanzig dieser AFLP-Fragmente wurden als Sonden in einem Southern Blot mit genomischer männlicher und weiblicher Apfelwickler-DNA eingesetzt. Hierbei zeigte sich, dass vier der Fragmente zu Genen gehören, die auf dem Z-Chromosom des Apfelwicklers lokalisiert sind. Damit stellen diese vier Gene potentielle geschlechtsgebundene Marker für weitere Kartierungsansätze zur Lokalisation des CpGV-Resistenzgens dar.

Um weitere Z-Chromosom-gebundene Marker bei *C. pomonella* zu identifizieren, wurde darüber hinaus versucht, auf der Grundlage von degenerierten PCR-Primern Gene bei *C. pomonella* zu amplifizieren, die bei anderen Lepidopterenarten auf dem Z-Chromosom liegen. Leider gelang es nur für einen geringen Teil der Gene, Amplifikationsprodukte zu erzeugen, so dass dieser Ansatz zur Generierung von Z-gebundenen Markern nicht weiter verfolgt wurde.

Schließlich wurden bei CpGV-resistenten Apfelwicklerlarven differentiell exprimierte Gene identifiziert, die möglicherweise an der Ausprägung der CpGV-Resistenz beteiligt sind. Insgesamt wurden mit Hilfe von cDNA-AFLPs 12 Gene isoliert und sequenziert, die als Reaktion nach der Aufnahme von H<sub>2</sub>O, CpGV-M bzw. CpGV-II2 (resistenzbrechend) in den CpGV-M-resistenten Apfelwicklerlarven aktiviert bzw. deaktiviert wurden. Die mutmaßlichen Gene sind wahrscheinlich an Immunreaktionen und in Verdauungsprozessen involviert, und könnten möglicherweise an CpGV-Resistenzmechanismen beteiligt sein.

Ein weiteres Ziel des vorliegenden Projektes war es, über den Einsatz von Mikrosatelliten-Markern (SSR) Aussagen über das Ausbreitungsverhalten von *C. pomonella* sowie über die Verschleppung resistenter Individuen bzw. die gleichzeitige Entstehung von CpGV-Resistenz in mehreren Populationen zu treffen. Hierzu wurden 13 verschiedene *C. pomonella*-Populationen aus Freilandsammlungen mit sechs verschiedenen SSR-Markern untersucht. Insgesamt konnte festgestellt werden, dass die untersuchten *C. pomonella*-Populationen mit einem mittleren Ausmaß genetisch voneinander differenziert waren, wobei es keinen Zusammenhang zum Ausprägungsgrad der CpGV-Resistenz gab. Desweiteren gab es lokal deutliche genetische Unterschiede zwischen den untersuchten Populationen, die nicht mit der Entfernung zwischen den jeweiligen Populationen in Zusammenhang standen.

## 2.5. Literatur:

Asser-Kaiser, S.; Fritsch, E.; Undorf-Spahn, K.; Kienzle, J.; Eberle, K. E., Gund, N. A.; Reineke, A.; Zebitz, C. P. W.; Heckel, D. G.; Huber, J.; Jehle, J. A. (2007): Rapid emergence of baculovirus resistance of codling moth due to sex-linkage and concentration-dependent dominance. *Science* 317: 1916-1918.

Cassanelli, S.; Reyes, M.; Rault, M.; Manicardi, G. C.; Sauphanor, B. (2006): Acetylcholinesterase mutation in an insecticide-resistant population of the codling moth *Cydia pomonella* (L.). *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 36: 642-653.

Dopman, E. B.; Perez, L.; Bogdanowicz, S. M.; Harrison, R. G. (2005): Consequences of reproductive barriers for genealogical discordance in the European corn borer. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 102: 14706-14711.

Franck, P.; Guérin, F.; Loiseau, A.; Sauphanor, B. (2005): Isolation and characterization of microsatellite loci in the codling moth *Cydia pomonella* L. (Lepidoptera, Tortricidae). *Molecular Ecology Notes* 5: 99-102.

Fritsch, E.; Undorf-Spahn, K.; Kienzle, J.; Zebitz, C. P. W.; Huber, J. (2005): Apfelwickler-Granulovirus: Erste Hinweise auf Unterschiede in der Empfindlichkeit lokaler Apfelwickler-Populationen. *Nachrichtenblatt Deut. Pflanzenschutzdienst*, 57 (2), 29-34.

Fuková, I.; Traut, W.; Vítková, M.; Nguyen, P.; Kubíčková, S.; Marec, F. (2007). Probing the W chromosome of the codling moth, *Cydia pomonella*, with sequences from microdissected sex chromatin. *Chromosoma* 116: 135-145.

Li, M.; Guo, Q.; Hou, C.; Miao, X.; Xu, A.; Guo, X.; Huang, Y. (2006): Linkage and mapping analyses of the denonucleosis non-susceptible gene *nsd-Z* in the silkworm *Bombyx mori* using SSR markers. *Genome*, 49: 397-402.

Koike, Y.; Mita, K.; Suzuki, M. G.; Maeda, S.; Abe, H.; Osoegawa, K.; DeJong, P. J.; Shimada, T. (2003): Genomic sequence of a 320-kb segment of the Z chromosome of *Bombyx mori* containing a kettin ortholog. *Molecular Genetics and Genomics* 269: 137-149.

Putnam, A. S.; Scriber, J. M.; Andolfatto, P. (2007): Discordant divergence times among Z-chromosome regions between two ecologically distinct swallowtail butterfly species. *Evolution* 61: 912-927.

Regier, J. C.; Fang, Q. Q.; Mitter, C.; Peigler, R. S.; Friedlander, T. P.; Solis, M. A. (1998): Evolution and phylogenetic utility of the period gene in Lepidoptera. *Molecular Biology and Evolution* 15: 1172-1182.

Reineke, A.; Karlovsky, P.; Zebitz, C. P. W. (1998): Preparation and purification of DNA from insects for AFLP-analysis. *Insect Molecular Biology* 7: 95-99.

Yasukochi, Y.; Ashakumary, L. A.; Baba, K.; Yoshido, A.; Sahara, K. (2006): A Second-Generation Integrated Map of the Silkworm Reveals Synteny and Conserved Gene Order Between Lepidopteran Insects. *Genetics* 173: 1319-1328.

Wang, P.; Granados, R. R. (1997): An intestinal mucin is the target for a baculovirus enhacin. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 46: 6977-6982.

## Teilprojekt 3 Mechanismen der Virus-Wirt-Interaktion

(Dienstleistungszentrum Ländlicher Raum Rheinpfalz, Neustadt/Wstr.)

### 3.1. Untersuchung der Pathogenese der CpGV-Infektion

#### 3.1.1. Stadien-spezifische Infektion

Um zu untersuchen, ob die Resistenz gegenüber CpGV in allen Larvenstadien gleichermaßen ausgeprägt ist, wurden stadienspezifische Infektionsversuche durchgeführt. Hierzu wurden Larven des empfindlichen Laborstammes CpS und des minderempfindlichen Stammes CpR (BW-FI-03) auf virusfreiem Futtermedium angezogen, bis sie das entsprechende Stadium erreicht hatten. Diese wurden dann auf Futtermedium mit einer Konzentration von  $2 \times 10^5$  OB/ml von CpGV-M, CpGV-I12 sowie auf virusfreies Kontrollfutter umgesetzt. Die Mortalität wurde täglich erfasst.

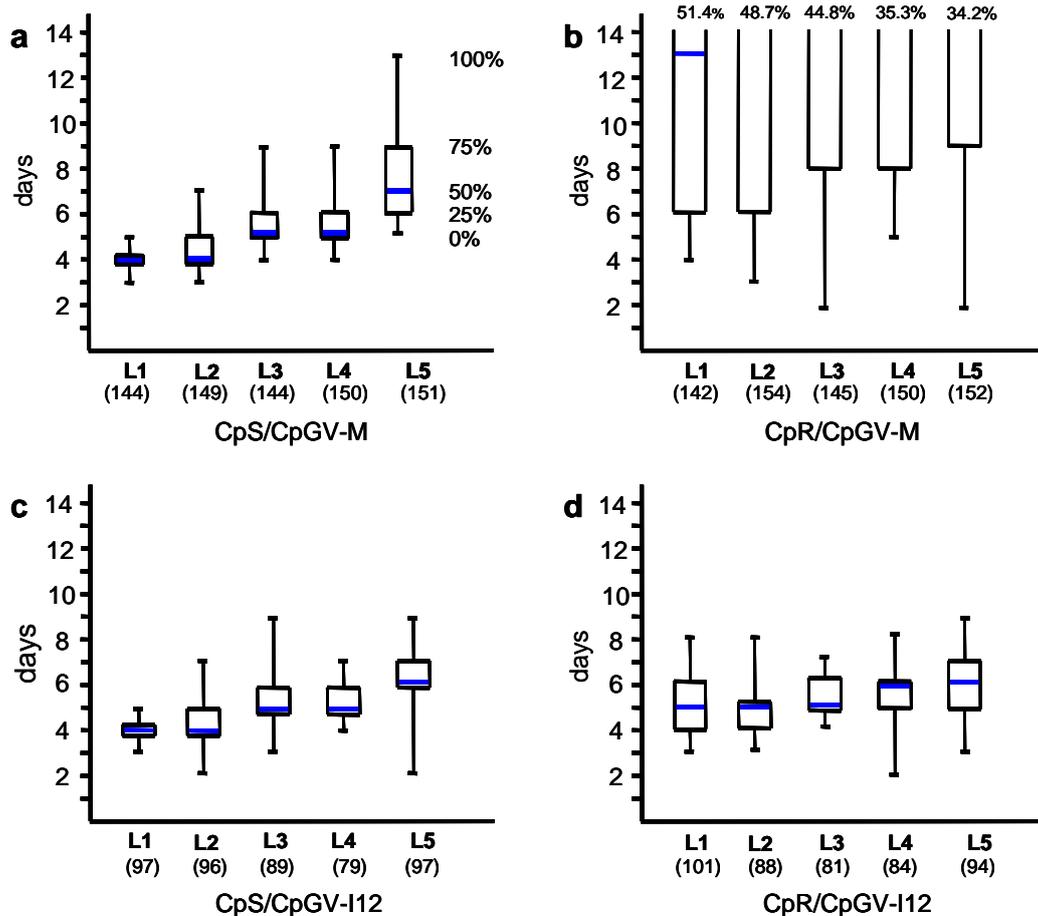


Abb. 3.1: Mortalitäten der verschiedenen Larvenstadien (L1-L5) von CpS und CpR an den Tagen 1-14 nach Aufsetzen auf Futtermedium mit  $2 \times 10^5$  OB/ml CpGV-M bzw. CpGV-I12.

Je älter die Larven waren, desto länger dauerte es bis zum Eintritt des Todes durch Infektion mit den beiden Isolaten CpGV-M und -I12. Dies war sowohl beim empfindlichen Stamm CpS als auch beim minderempfindlichen Stamm CpR zu beobachten. Bei CpGV-M-infizierten CpR-Individuen wurde jedoch während der 14-tägigen Versuchsdauer in keinem Stadium eine 100%-ige Mortalität erreicht. Die Resistenz ist also in allen Larvenstadien ausgeprägt (Abb. 3.1 a, b). Wurden die einzelnen Larvenstadien dem Virusisolat CpGV-I12 ausgesetzt, konnte in CpR eine ähnlich gute Wirkung erzielt werden wie CpGV-M in CpS Larven (Abb. 3.1 d). CpGV-I12 ist also in der Lage in allen Larvenstadien die Resistenz zu brechen, wobei die Wirkung in den Stadien L1 und L2 leicht verzögert ist. Die Wirkung von CpGV-I12 auf Larven des Stammes CpS war ebenso vergleichbar mit der Wirkung von CpGV-M, bei den Larvenstadien L4 und L5 sogar etwas besser, da die 100%-ige Mortalität früher erreicht wird (Abb. 3.1 c).

### **3.1.2. Beobachtung des Infektionsverlaufs**

Der Infektionsverlauf von CpGV in L5-Larven von empfindlichen und minderempfindlichen Apfelwicklerstämmen sollte vergleichend untersucht werden. Dazu wurden frisch gehäuteten L5-Larven über Futterstückchen (ca. 2 mm<sup>2</sup>) eine Dosis von 500 OBs verabreicht. Nachdem die Tiere das Futterstückchen vollständig aufgenommen hatten, wurden sie auf virusfreies Futtermedium überführt. Nach 2, 3, 4, 6, 8 und 10 Tagen wurden jeweils drei Larven in *Duboscq-Brazil's alcoholic Bouin's* fixiert. Parallel dazu wurden je zwei unbehandelte Kontrolllarven fixiert. Die fixierten Larven wurden an das JKI Darmstadt zur weiteren histologischen Untersuchung überlassen. Unterschiede zwischen den CpS und CpR konnten nicht gefunden werden, was vermutlich an der genetischen Heterogenität von CpR lag (siehe Kap. 3.2.2)

### **3.1.3. Untersuchung der Beteiligung der Peritrophischen Membran an der Resistenz**

Zur Lokalisierung des Resistenzmechanismus in den minderempfindlichen Tieren wurde zunächst untersucht, ob die Peritrophe Membran (PM) im Mitteldarm der Larven an der Resistenz beteiligt ist. Nach der oralen Aufnahme mit dem Fraß gelangen die viralen Einschlusskörper (occlusion bodies, OBs) in den Mitteldarm, wo sich die Proteinhülle im alkalischen Milieu auflöst und die Virionen freigesetzt werden. Die Virionen müssen dann zunächst die PM passieren, um an das Mitteldarmepithel zu gelangen. Optische Aufheller, wie der Fluorescent Brightener 28 (FB28), zerstören die PM. In der Literatur wird eine Steigerung der Anfälligkeit von Insekten gegenüber Baculoviren nach Zerstörung der PM beschrieben (El-Salamouny et al., 2005). Um zu überprüfen, ob die Resistenz durch ein Entfernen der PM mittels FB28 gebrochen werden kann, wurde folgender Versuch durchgeführt:

FB28 wurde in 4 verschiedenen Konzentrationen dem Futtermedium zugegeben. Die Viruskonzentration war konstant bei  $2 \times 10^5$  OB/ml für den minderempfindlichen Stamm CpR und  $2 \times 10^3$  OB/ml für den empfindlichen Laborstamm CpS. Für diese Versuche wurden L4 Larven eingesetzt. Die Mortalität wurde nach neun Tagen erfasst.

Beim empfindlichen Laborstamm CpS wurde durch FB28 eine geringe Steigerung der Mortalität erreicht, dieser Effekt war jedoch statistisch nicht signifikant (Abb. 3.2). Bei

einer FN28-Konzentration von 0,3% war die Mortalität deutlich geringer. Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass FB28 stark sauer wirkt und dadurch der pH-Wert im Mitteldarm herabgesetzt wird. Möglicherweise wirkt sich dies negativ auf die Auflösung der OBs im Mitteladarm aus. Beim minderempfindlichen Apfelwicklerstamm CpR wurde durch Zusatz von FB28 keine Steigerung der Mortalität erreicht, die Resistenz wurde also nicht gebrochen. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die PM nicht am Resistenzmechanismus beteiligt ist.

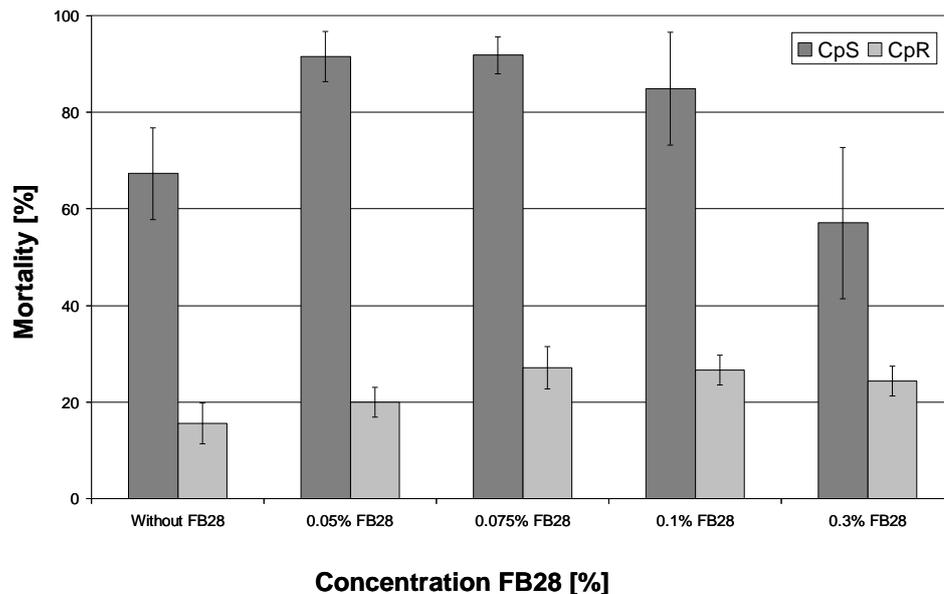


Abb. 3.2: Wirkung des Fluorescent brightener 28 (FB28) auf die Virulenz von CpGV gegenüber dem empfindlichen Apfelwicklerstamm CpS und den minderempfindlichen Stamm CpR.

### 3.1.4. Hämocölare Infektion

In einem weiteren Versuchsansatz wurden Hämolympheinjektionen durchgeführt, um zu überprüfen, ob die Resistenz im Mitteldarm lokalisiert ist. Dabei wird die Primärinfektion gezielt umgangen, indem so genannte *Budded Viruses* (BVs) direkt in die Hämolymphe injiziert werden.

Zunächst wurden L5-Larven des empfindlichen Laborstammes CpS mit einer Dosis von 1000 OBs über Futterstückchen infiziert. Nach 4 Tagen wurde diesen Tieren Hämolymphe entnommen. Von nicht infizierten Tieren wurde ebenfalls Hämolymphe entnommen. Mittels Real-Time-PCR wurde die Konzentration der BVs in der Hämolymphe bestimmt bzw. überprüft, ob die Kontrolllymphe virusfrei war. Dann wurden in je 25 L4-Larven des empfindlichen (CpS) sowie des minderempfindlichen CpR-Stammes 2 µl Kontrollhämolymphe und in weitere 25 L4-Larven je 2 µl Hämolymphe mit BVs über einen Mikroinjektor in das Hämocöl injiziert. Die injizierte Virusdosis betrug ca.  $1,2 \times 10^5$  BVs. Nach der Injektion wurden die Larven auf virusfreies Futtermedium gesetzt und die Mortalität täglich erfasst. Es wurden 5 Wiederholungen durchgeführt.

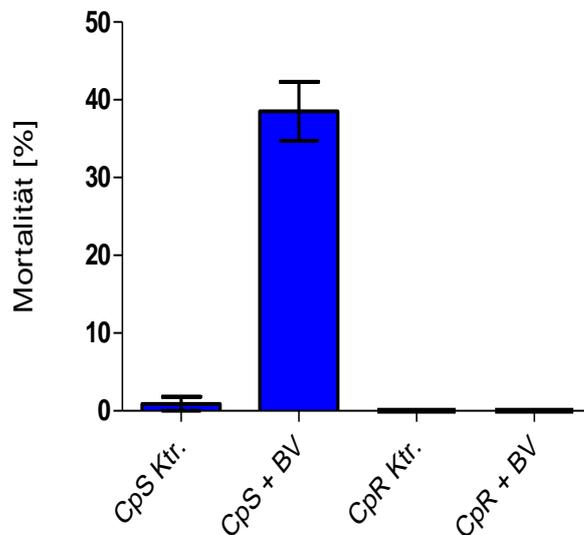


Abb. 3.3: Mortalität bei CpS (empfindlicher Laborstamm) und CpR (minderempfindlicher Stamm BW-FI-03) 12 Tage nach hämocölarer Injektion von Kontroll- bzw. Virus-Lymphe.

Beim empfindlichen Laborstamm wurde nach 12 Tagen eine Mortalität von knapp 40% erreicht. Der minderempfindliche Stamm CpR zeigte dagegen keine Mortalität. Dies weist darauf hin, dass die Larven des Stammes CpR sowohl gegenüber der Infektion durch OBs als auch durch BVs resistent sind, und die Resistenz während der Primär- und während der Sekundärinfektion auftritt.

2008 wurden diese Versuche mit dem homogen resistenten Apfelwicklerstamm CpRR1 wiederholt. Zunächst wurde neues BV in CpS produziert: 10 Tage alte CpS Larven (L4) wurden mit 1000 OBs (CpGV-M, Standard 1) oral infiziert. Nach 5 Tagen wurde diesen Tieren Hämolymphe entnommen. Von nicht infizierten Tieren wurde ebenfalls Hämolymphe entnommen. Zum Nachweis und zur Quantifizierung von CpGV in der Hämolymphe mittels Real-time PCR wurden granulin-spezifische Primer verwendet. Die Viruskonzentration betrug  $9,8 \times 10^4$  Kopien/ $\mu\text{l}$ . Anders als 2006, wurde das BV nicht bei  $-20$ , sondern bei  $-80^\circ\text{C}$  eingefroren und gelagert. Dadurch blieb die Aktivität des Virus besser erhalten.

Je 25 L4-Larven des empfindlichen CpS sowie des inzwischen neu generierten homogen resistenten Apfelwicklerstammes CpRR1 (siehe 3.2.4) wurden  $2 \mu\text{l}$  Kontrollhämolymphe und in weitere 25 L4-Larven je  $2 \mu\text{l}$  Hämolymphe mit BVs über einen Mikroinjektor in das Hämocöl injiziert. Die injizierte Virus-Dosis betrug  $2 \times 10^5$  BVs/Larve. Nach der Injektion wurden die Larven auf virusfreies Futtermedium gesetzt und die Mortalität täglich erfasst. Es wurden 3 Wiederholungen durchgeführt. Larven, die bereits 24 Stunden nach der Injektion tot waren, wurden vom Test ausgeschlossen. Bereits 7 Tage nach der Injektion wurden beim empfindlichen Stamm CpS 100% Mortalität erreicht (Tabelle 3.1). Beim homogen resistenten Stamm CpRR1 wurde die

Resistenz nach hämocölarer Injektion nicht gebrochen, es wurde keine Mortalität beobachtet.

Dieses Ergebnis bestätigt die Befunde des Experiments aus 2007: Die Resistenz nicht allein im Mitteldarm lokalisiert, sondern auch in der Sekundärinfektion wirksam. Dies gilt auch für den homogen resistenten Apfelwicklerstamm CpRR1.

Tabelle 3.1: Mortalität bei empfindlichen (CpS) und resistenten (CpRR1) Apfelwicklerlarven, fünf bis sieben Tage nach hämocölarer Injektion von Budded Virus (BVs) bzw. Kontrollhämolymph.

	Control		BV injection	
	CpS	CpRR1	CpS	CpRR1
Mean mortality [%]	2.7	0	100	0
Standard deviation	4.6	0	0	0

### 3.1.5. Hämolymph-Transfusion

Um zu überprüfen, ob die Ursache der Resistenz in der Hämolymph begründet ist und ob die Resistenz durch das Virus erst induziert wird, wurde folgendes Experiment durchgeführt: Nicht infizierten sensiblen (CpS) und resistenten (CpRR1) L5-Larven und mit 1000 OBs infizierten resistenten L5-Larven wurde Hämolymph entnommen und in Sf900 Zellkulturmedium + Phenylthiourea 10-fach verdünnt. Diese Hämolymph wurde empfindlichen CpS L4-Larven injiziert. Kontrolltieren wurde Zellkulturmedium (Sf900) + Phenylthiourea injiziert. Anschließend wurden einem Teil der Larven 1000 OBs über ein Futterstückchen verabreicht. Nur diejenigen Larven, bei denen die Injektion erfolgreich war und die ihr Futterstückchen vollständig aufgefressen hatten, wurden im Experiment weiter beobachtet. Abb. 3.4 zeigt die Mortalitäten (Mittelwerte aus 4 Wiederholungen) der einzelnen Behandlungsvarianten neun Tage nach der Injektion.

Die Ergebnisse der einzelnen Wiederholungen variierten sehr stark (siehe Standardabweichung), mal waren die Unterschiede stärker, mal schwächer ausgeprägt. Die Mortalität der CpS-Larven nach oraler Infektion war durchschnittlich um ca. 17% verringert, wenn den Tieren zuvor Hämolymph aus resistenten Tieren injiziert worden war (Abb. 3.4 d). Sogar um 20% geringer war die Mortalität wenn Hämolymph aus resistenten Tieren injiziert wurde, denen zuvor CpGV-OBs oral verabreicht wurde (Abb. 3.8 f). Keine Reduktion der Mortalität sah man, wenn CpS-Larven vor der oralen Infektion Hämolymph aus sensiblen Larven injiziert wurde (Abb. 3.4 c).

Diese Effekte sind aufgrund der hohen Streuung statistisch nicht signifikant und deuten nur an, dass sich in der Hämolymph resistenzbildende Faktoren befinden könnten. Interessant ist jedoch trotzdem die Variante, bei der den CpS-Larven Hämolymph aus CpRR1-Larven injiziert wurde, die zuvor oral infiziert worden waren, und denen danach keine Futterstückchen mit Virus verabreicht wurden (Abb. 3.5 e). Hier zeigt sich eine nur sehr geringe Mortalität von 2,5%. Dies lässt darauf schließen, dass sich in der

Hämolymphe resistenter Apfelwicklerlarven, die oral infiziert wurden, keine oder zumindest keine infektiösen BVs befanden.

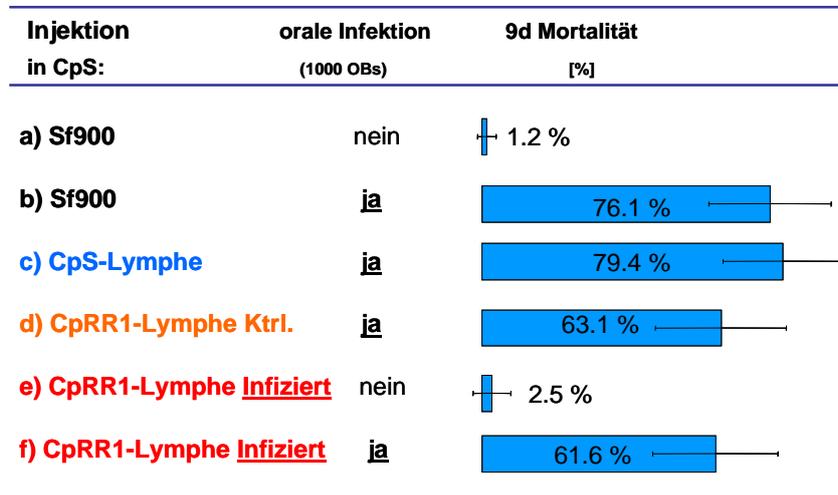


Abb. 3.4: Mortalität der L4-Larven neun Tage nach Hämolymp-Transfusion und anschließender oraler Infektion. Injektion von Sf900 Medium ohne (a) und mit (b) anschließender oraler Infektion mit 1000 Occlusion bodies; Injektion von Hämolymphe aus CpS, die zuvor nicht infiziert waren mit anschließender oraler Infektion (c); Injektion von Hämolymphe aus nicht infizierten (d) und infizierten (e, f) CpRR1 ohne (e) und mit (d,f) anschließender oraler Infektion

### 3.1.6. Gewebsspezifische Virusreplikation

Um den Verlauf der CpGV-Infektion in empfindlichen (CpS) und resistenten (CpRR1) Apfelwicklerlarven zu vergleichen, wurden 25 L5-Larven pro Stamm entweder oral (1000 OBs CpGV-M) oder intrahämocölar ( $1,96 \times 10^5$  BVs CpGV-M) infiziert. Kontrolllarven bekamen virusfreies Futter bzw. virusfreie Hämolymphe. 24, 48, 72 und 96 Stunden nach Infektion (hpi) wurden der Mitteldarm, Hämolymphe und Fettkörper aus 5 Larven pro Variante entnommen. Aus diesen Proben wurde DNA isoliert und die darin enthaltenen CpGV-Genome mittels Real-time PCR und granulinspezifischen Primern quantifiziert.

Bei empfindlichen Apfelwicklerlarven (CpS) steigt die Viruskonzentration sowohl nach oraler als auch nach intrahämocölarer Infektion in allen untersuchten Gewebetypen im Verlauf von vier Tagen an (Abb. 3.5 und Abb. 3.6). Bei den resistenten Larven CpRR1 war kein Anstieg zu verzeichnen. Daraus lässt sich schließen, dass die Resistenz in allen drei Gewebetypen von CpRR1 wirksam ist. Es ist wahrscheinlich, dass der Resistenzmechanismus auf einer Inkompatibilität zwischen Virus und Wirtszelle basiert und die Virusreplikation dadurch unterbunden wird.

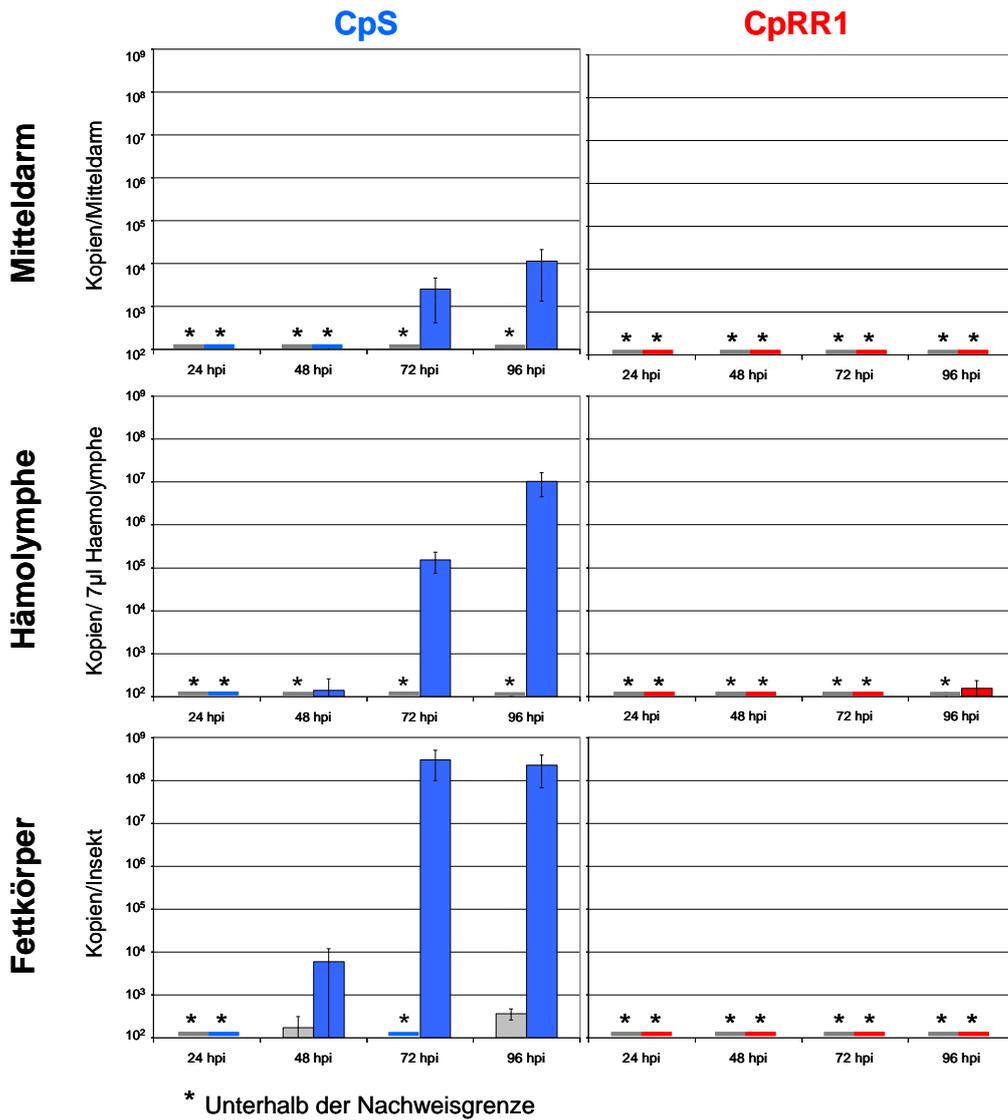


Abb. 3.5: Anzahl an Kopien des Granulin-Gens in Mitteldarm, Hämolymphe und Fettkörper von empfindlichen (CpS) und resistenten (CpRR1) Apfelwicklerlarven 24, 48, 72 und 96 Stunden nach oraler Infektion mit OBs von CpGV-M (rote und blaue Balken) bzw. nicht infizierte Kontrolltiere (graue Balken).

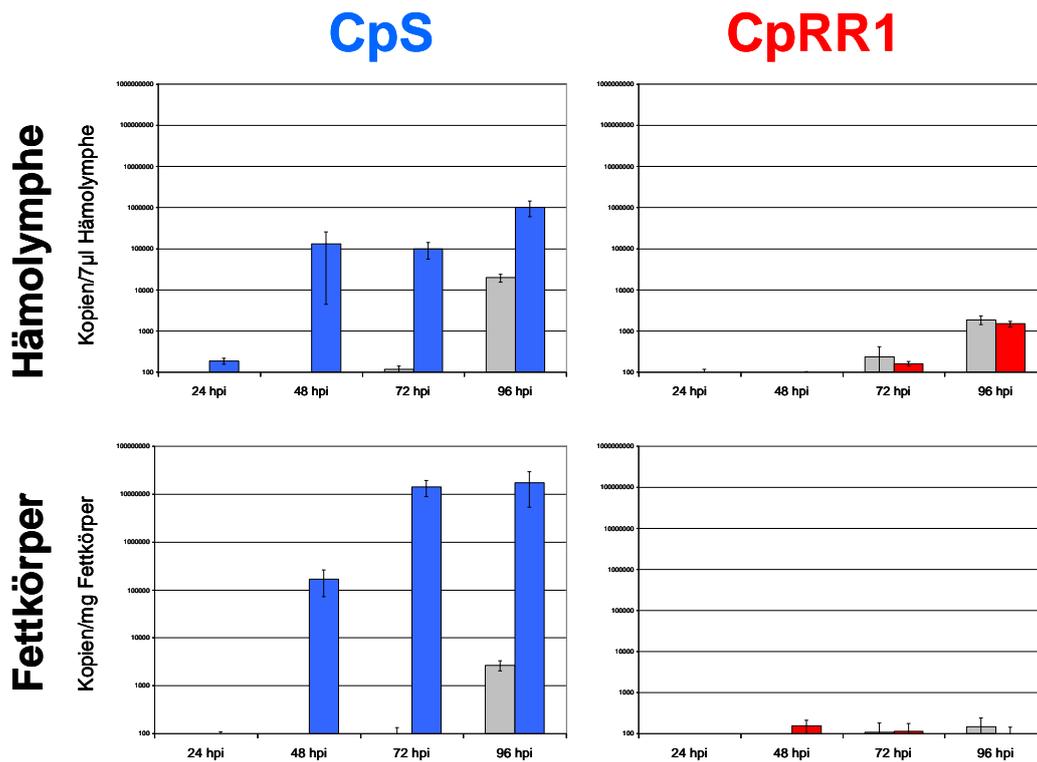


Abb. 3.6: Anzahl an Kopien des Granulin-Gens in Hämolymphe und Fettkörper von empfindlichen (CpS) und resistenten (CpRR1) Apfelwicklerlarven 24, 48, 72 und 96 Stunden nach intrahämocölar Infektion mit BVs von CpGV-M (rote und blaue Balken) bzw. nicht infizierte Kontrolltiere (graue Balken).

## 3.2. Genetische Untersuchungen zum Minderempfindlichkeitsphänomen bei CpGV

### 3.2.1. Massenkreuzungen

Ziel der Massenkreuzungsexperimente war es, Aufschluss über das Schema der Vererbung der Minderempfindlichkeit des Apfelwicklers *Cydia pomonella* gegenüber dem CpGV zu erhalten.

Zur Untersuchung, ob die Vererbung geschlechtsgebunden erfolgt, oder ob maternale Effekte eine Rolle spielen, sowie zur Bestimmung des Dominanzlevels, wurden reziproke Kreuzungen zwischen dem normal empfindlichen Stamm CpS und der minderempfindlichen Population CpR (BW-FI-03) durchgeführt. Rückkreuzungen zwischen den daraus resultierenden F<sub>1</sub>-Generationen und der normal empfindlichen Parentalgeneration sollten Aufschluss darüber geben, ob mehrere Faktoren die Vererbung bestimmen oder ob es sich um eine monogene Vererbung handelt.

Die mittlere Letalkonzentration (LC<sub>50</sub>) der Parentalgeneration, F<sub>1</sub>- und Rückkreuzungsgeneration wurden im Bioassay mit CpGV-M bestimmt. Die Auswertungen erfolgten hierbei nach 7 und 14 Tagen.

Dabei zeigte sich, dass sich die reziproken  $F_1$ -Kreuzungen in ihrer  $LC_{50}$  nicht untereinander, aber signifikant von ihren Parentalgenerationen in ihrer Reaktion auf eine CpGV-M Infektion unterschieden (Abb. 3.7). Aufgrund dessen wurden eine geschlechtsgebundene Vererbung sowie der Einfluss maternaler Effekte ausgeschlossen. Deshalb wurden die beiden  $F_1$ -Populationen für die Rückkreuzungsexperimente zusammengefasst. Die  $LC_{50}$  der  $F_1$ -Generationen lag zwischen denen der beiden Parentalgenerationen, der Dominanzwert bei fast null. Dies spricht für eine unvollständig dominante (intermediäre) Vererbung.

Die Rückkreuzungen wurden zwischen der zusammengenommenen  $F_1$ -Generation und der normal empfindlichen Parentalgeneration CpS durchgeführt, um Aufschluss über die Anzahl der in die Vererbung involvierten Faktoren zu erhalten. Die Ergebnisse entsprachen nicht den für eine monogene Vererbung erwarteten, sondern deuteten auf eine nicht additive, polygene Vererbung hin.

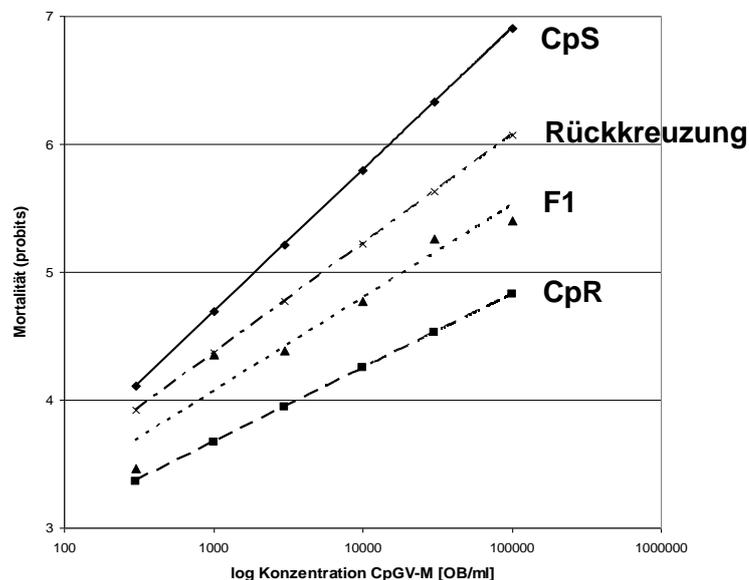


Abb. 3.7: Dosis-Wirkungsgeraden der Apfelwicklerstämme CpS und CpR, der  $F_1$  Generation und der Rückkreuzungsgeneration ausgedrückt in Probits.

### 3.2.2. Einzelpaarkreuzungen

Um Gene zu isolieren, die an der Resistenz des Apfelwicklers gegenüber CpGV beteiligt sind, sollte ein biphasisches Linkage-Mapping durchgeführt werden. Dazu wurden Einzelpaarkreuzungen am DLR Rheinpfalz vorgenommen werden, die dann für die Kopplungsanalysen zur Verfügung gestellt wurden (Siehe Kap. 2.1).

In einem ersten Kreuzungsversuch wurden 20 Paare aus minderempfindlichen Weibchen (CpR) mit empfindlichen Männchen (CpS) miteinander gekreuzt. Die daraus entstehende  $F_1$ -Generation wurde in einem Bioassay mit einer diskriminierenden Dosis (=  $LC_{95}$  des empfindlichen Stammes) auf Ihre Empfindlichkeit gegenüber CpGV getestet.

11 von 20 Kreuzungen waren erfolgreich. Die Mortalitäten der getesteten F1 Generationen variierten zwischen 100 und 38% (Abb. 3.8). Der Durchschnitt lag bei 62%, was das Ergebnis aus den Massenkreuzungen (68%) bestätigt. Die Variabilität zwischen den einzelnen Kreuzungen war sehr hoch. Das deutete daraufhin, dass der minderempfindliche Stamm CpR nicht homogen ist, und vermutlich noch empfindliche Individuen in der Population CpR vorhanden sind.

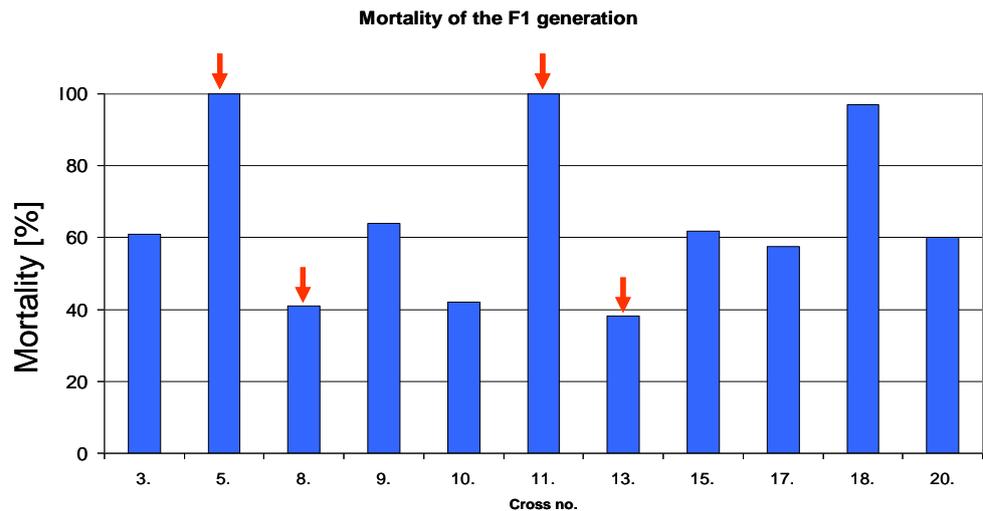


Abb. 3.8: Mortalitäten der F1-Generation aus 11 Kreuzungen zwischen CpS und CpR im 7-Tage-Bioassay mit der diskriminierenden Konzentration von  $5,8 \times 10^4$  OB/ml.

### 3.2.3. Rückkreuzungen

Für die Rückkreuzungen wurden die F1-Familien 5, 8, 11 und 13 ausgewählt (Abb. 3.9). Die Familien 5 und 11 wiesen die höchste, die Familien 8 und 11 die niedrigste F1-Mortalität auf.

Pro Familie wurden 4-5 weiblich informative ( $F1_{\text{♀}} \times CpR_{\text{♂}}$ ) und je 4-5 männlich informative ( $F1_{\text{♂}} \times CpR_{\text{♀}}$ ) Rückkreuzungen mit dem Stamm CpR durchgeführt. Die Rückkreuzungsnachkommen wurden ebenfalls in einem 7-Tage-Bioassay mit der diskriminierenden Dosis auf Ihre Empfindlichkeit getestet.

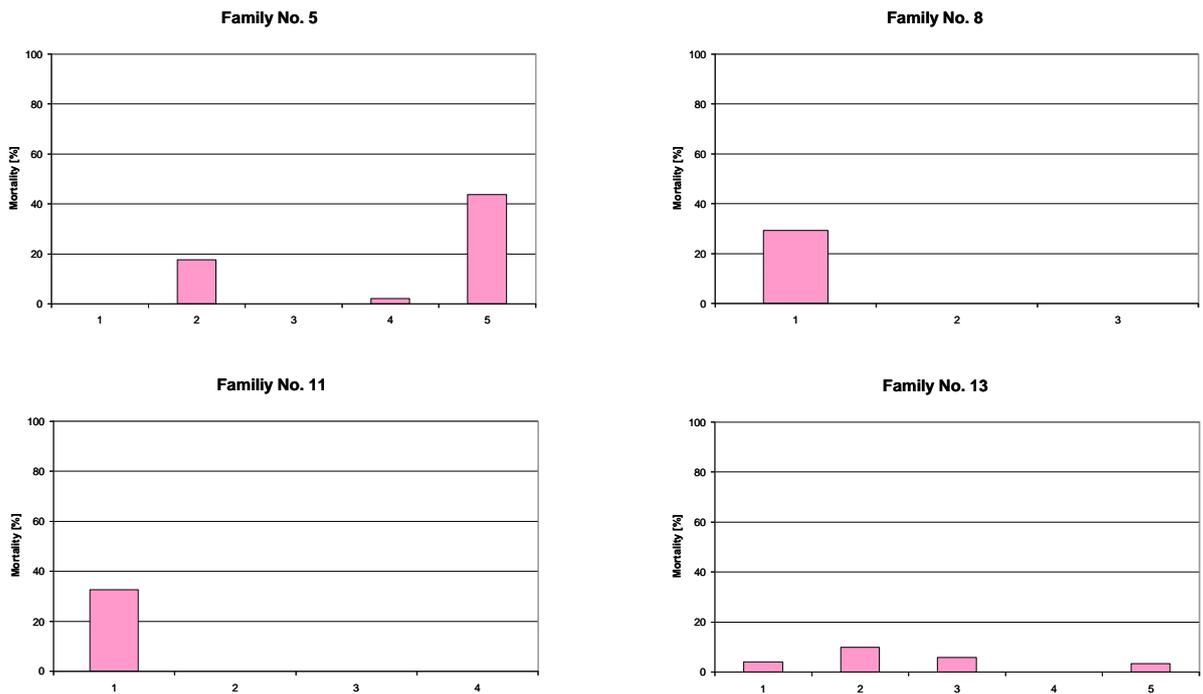


Abb. 3.9: Mortalitäten der Nachkommen der einzelnen weiblich informativen Rückkreuzungen im 7-Tage-Bioassay mit der diskriminierenden Konzentration von  $5,8 \times 10^4$  OB/ml.

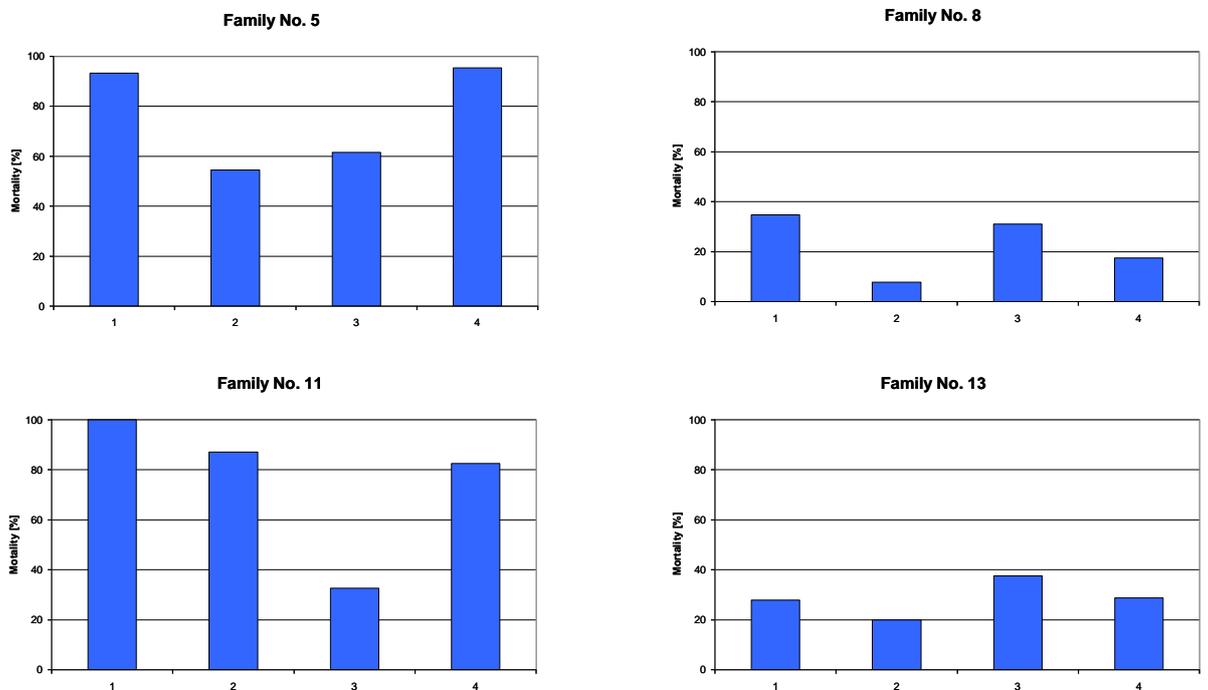


Abb. 3.10: Mortalitäten der Nachkommen der einzelnen männlich informativen Rückkreuzungen im 7-Tage-Bioassay mit der diskriminierenden Konzentration von  $5,8 \times 10^4$  OB/ml.

Die durchschnittliche Mortalität der Rückkreuzungsnachkommen der weiblich informativen Rückkreuzung war mit 9% wesentlich geringer als die der männlich informativen Rückkreuzungen mit durchschnittlich 51% (Abb. 3.9, Abb. 3.10). Besonders ausgeprägt war dieser Effekt bei den Familien 5 und 11, die in der F1-Generation die höchste Mortalität aufwiesen. Dies deutet darauf hin, dass es doch einen gewissen geschlechtsspezifischen Effekt bei der Vererbung gibt. Möglicherweise ist eines der beteiligten Gene geschlechtsspezifisch. Wegen der hohen Variabilität in der F1-Generation musste der resistente Stamm CpR jedoch zunächst auf seine Homogenität überprüft und ggf. homogenisiert werden.

### 3.2.4. Homogenisierung des minderempfindlichen Stammes CpR

Einzelpaarkreuzungen zwischen dem empfindlichen Laborstamm CpS und dem minderempfindlichen Stamm CpR (BW-FI-03) deuteten darauf hin, dass der Stamm CpR nicht homogen resistent ist (Abb. 3.8). Um dies zu prüfen, wurden Einzelpaarkreuzungen innerhalb CpR durchgeführt, und die daraus resultierenden, verschiedenen F1-Generationen anhand der diskriminierenden Konzentration ( $5,8 \times 10^4$  OB/ml) im 7-Tage-Bioassay getestet. 17 aus 20 Kreuzungen produzierten ausreichend viele Nachkommen, die dem Test unterzogen werden konnten. Die durchschnittliche Mortalität der F1-Generation betrug 31% und ist mit dem entsprechenden Wert aus Massenkreuzungen (38%, Eberle & Jehle 2006) vergleichbar. Zwischen den einzelnen F1-Familien existiert jedoch einen sehr große Variabilität: Während sechs Familien 0% Mortalität aufwiesen, zeigten 3 Familien 100% Mortalität. Bei sieben Familien wurden Mortalitäten von etwa 25% beobachtet, und eine Familie zeigte mit 60% Mortalität (Abb. 3.11). Dieses Ergebnis bestätigte die Annahme, dass der Apfelwickler-Stamm CpR nicht homogen resistent ist und noch empfindliche Individuen enthält.

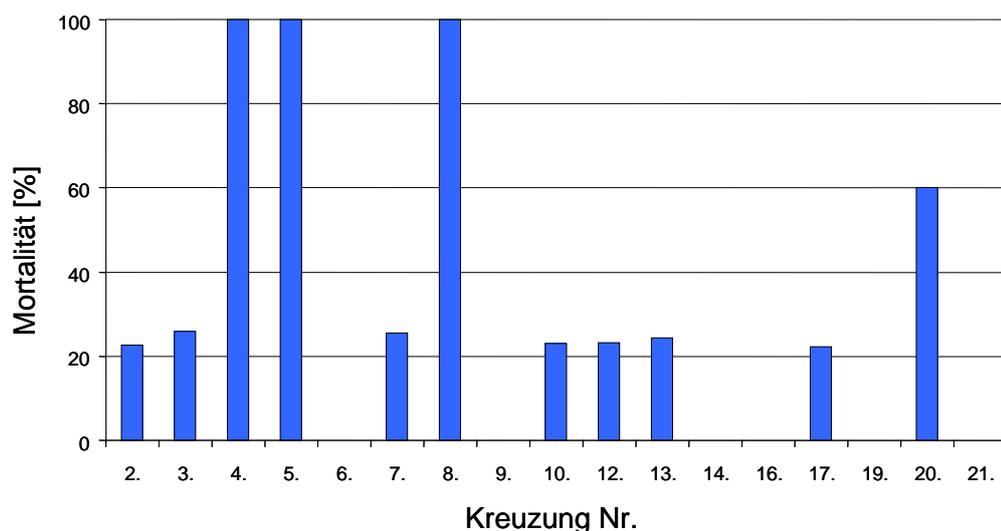


Abb. 3.11: Mortalitäten der verschiedenen F1-Generationen aus 17 Kreuzungen innerhalb CpR ( $\text{CpR}_{\text{♀}} \times \text{CpR}_{\text{♂}}$ ) im 7-Tage-Bioassay mit der diskriminierenden Konzentration  $5,8 \times 10^4$  OB/ml.

Um den Stamm CpR zu homogenisieren, wurden die Familien mit 0% Mortalität (Abb. 3.11: Familien 6, 9, 14, 16, 19 und 21) selektiert, und Einzelparkreuzungen innerhalb dieser einzelnen Familien durchgeführt. Hierfür wurden die Kontroll-Tiere aus dem Bioassay herangezogen. Pro Familie wurden vier Kreuzungen angesetzt, wovon zwischen zwei und vier erfolgreich waren.

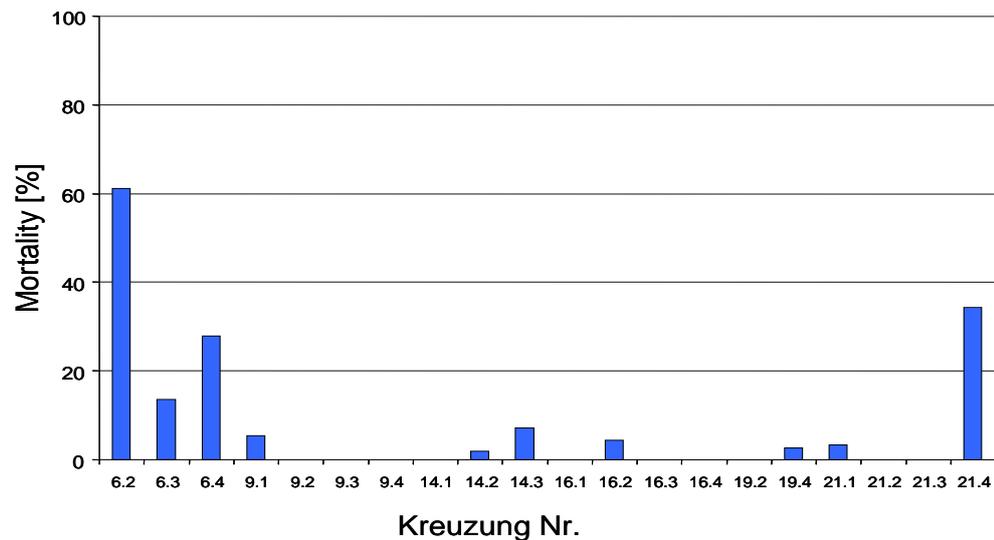


Abb. 3.12: Mortalitäten der verschiedenen F1-Generationen aus Kreuzungen innerhalb der F1-Familien aus CpR x CpR) im 7-Tage-Bioassay mit der diskriminierenden Konzentration  $5,8 \times 10^4$  OB/ml.

Die durchschnittliche Mortalität der F1-Familien betrug nun noch 8,1%. Die Bestimmung der Mortalität war nicht ganz einfach, da hier vermutlich aufgrund von Inzucht-Effekten, häufig nicht genau beurteilt werden konnte, ob der Tod wirklich durch das Virus verursacht wurde. Bei 10 Familien konnte jedoch mit Sicherheit festgestellt werden, dass keine Mortalität vorlag (Familien 9.2; 9.3; 9.4; 14.1; 16.1; 16.3; 16.4; 19.2 und 21.2) (Abb. 3.12). Die Tiere aus den unbehandelten Kontrollen dieser Familien wurden gepoolt und weitervermehrt. Die Nachkommenschaft dieser Population wurde wiederum auf ihre Empfindlichkeit anhand der diskriminierenden Konzentration getestet und die Mortalität betrug stets 0%. Diese neue, homogen resistente Population trägt die Bezeichnung CpRR1. CpRR1 zeigte sich (auch nach einem Jahr ohne Virusdruck) konstant resistent und es konnte eine gut funktionierende Laborzucht etabliert werden.

### 3.2.5. Einzelparkreuzungen zwischen CpS und CpRR1

Nach der Homogenisierung des resistenten Apfelwicklerstammes, konnte mit neuen Kreuzungsversuchen für das Linkage-Mapping begonnen werden. In 15 Einzelparkreuzungen wurden je ein Weibchen des Stammes CpRR1 und ein Männchen des empfindlichen Stammes CpS miteinander gekreuzt (Abb. 3.13). Die Nachkommen

der einzelnen Paare wurden als F1-Familien bezeichnet und getrennt im 7-Tage-Bioassay mit der diskriminierenden Konzentration ( $5,8 \times 10^4$  OB/ml) hinsichtlich ihrer Empfindlichkeit gegenüber CpGV-M getestet (Abb. 3.14).

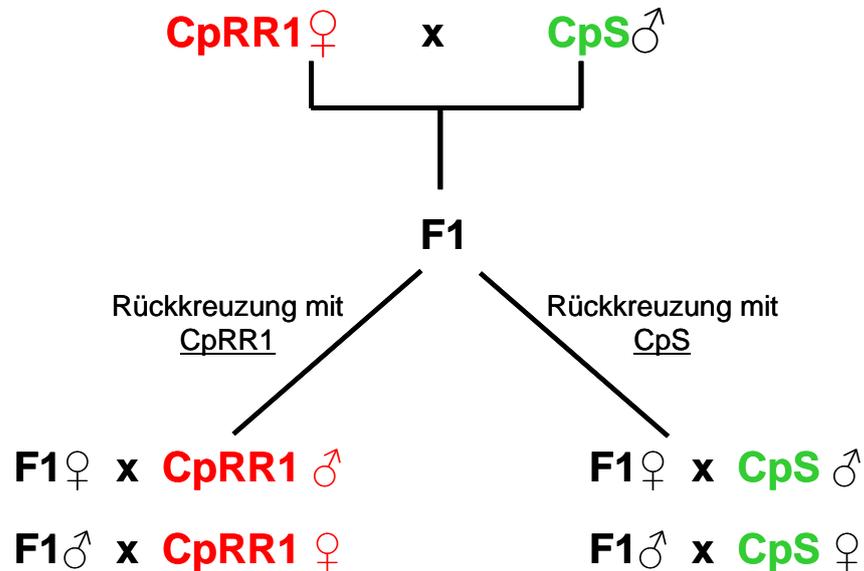


Abb. 3.13: Kreuzungsschema der Einzelpaarkreuzungen, die für das Linkage-Mapping benötigt werden.

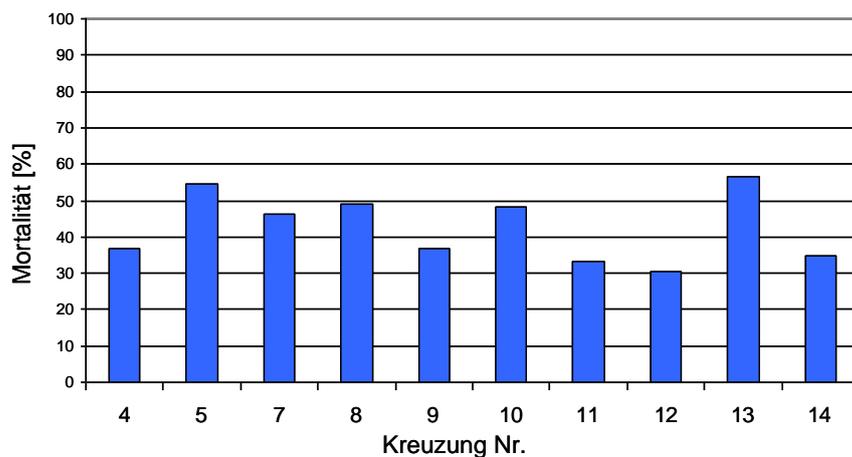


Abb. 3.14: Mortalitäten der verschiedenen F1-Generationen aus Einzelpaarkreuzungen zwischen CpRR1♀ und CpS♂ im 7-Tage-Bioassay mit der diskriminierenden Konzentration  $5,8 \times 10^4$  OB/ml.

Die Variabilität der Mortalitäten der einzelnen Familien war nun wesentlich geringer und betrug durchschnittlich 43% (Tabelle 3.2). Die Tiere aus den Kontrollen dieser einzelnen Bioassays wurden bis zum adulten Tier weiter gezogen und für Rückkreuzungen mit CpS und CpRR1 verwendet. Es wurden vier Rückkreuzungsvarianten mit je zehn Kreuzungen vorgenommen. Zwischen sieben und zehn Kreuzungen waren erfolgreich. Die Nachkommen eines jeden Rückkreuzungspaares wurden getrennt in einem 7-Tage-Bioassay mit der diskriminierenden Konzentration ( $5,8 \times 10^4$  OB/ml) hinsichtlich ihrer Empfindlichkeit gegenüber CpGV-M getestet. Der Tabelle 3.2 sind jeweils die durchschnittlichen Mortalitäten zu entnehmen. Wird die Resistenz autosomal vererbt, so müssten die Mortalitätswerte der reziproken Rückkreuzungen ähnlich sein. Dies ist hier nicht der Fall (Tabelle 3.2). Die Werte der jeweils reziproken Kreuzungen unterscheiden sich sehr stark, was auf eine geschlechtsspezifische Vererbung der Resistenz schließen lässt. Interessanterweise liegen die Werte sehr nahe an Mortalitätswerten, die man bei einem einzelnen, dominanten Gen auf dem Z-Chromosom erwarten würde (Tabelle 3.2).

Tabelle 3.2: Durchschnittliche Mortalitäten aus den 7-Tage-Bioassays der Elternstämme CpS und CpRR1 und der unterschiedlichen Kreuzungsnachkommen und die bei einer dominanten Vererbung der Resistenz auf dem Z-Chromosom erwartete Mortalität.

Stamm/Kreuzung	Erwartete Mortalität dominanter Vererbung auf Z- Chromosom [%]	Beobachtete Mortalität [%]
CpS	100	98
CpRR1	0	0
F1	50	43
RK1 (F1♀ x CpRR1♂)	0	0
RK2 (F1♂ x CpRR1♀)	25	27
RK3 (F1♀ x CpS♂)	100	100
RK4 (F1♂ x CpS♀)	50	51

Diese Ergebnisse beweisen die These, dass die Resistenz monogen, dominant und auf dem Z-Chromosom vererbt wird, jedoch noch nicht lückenlos. Die Bioassays wurden aufgrund der geringen Nachkommenzahl der einzelnen Paare (50-100) nur mit einer einzigen Konzentration, nämlich  $5,8 \times 10^4$  OB/ml getestet. Die Resistenz könnte auch unvollständig dominant sein, weshalb Kreuzungsnachkommen aus einer erneuten Kreuzung in einem Full-Range-Bioassay mit verschiedenen Konzentrationen getestet wurden.

Beim Apfelwickler, wie auch bei den meisten Lepidopteren, verhält es sich mit den geschlechtsbestimmenden Chromosomen genau umgekehrt wie beim Menschen, wo die Frauen zwei X-Chromosomen und die Männer ein X- und ein Y-Chromosom besitzen. Die Apfelwickler-Männchen sind homogametisch und tragen ZZ und die Weibchen sind heterogametisch und tragen ZW. Geht man davon aus, dass das Resistenzgen

dominant ist und auf dem Z-Chromosom liegt, so tragen die Männchen des resistenten Stammes  $Z^R Z^R$  und die Weibchen  $Z^R W$ . Die empfindlichen Männchen im Stamm CpS tragen  $Z^S Z^S$  und die Weibchen  $Z^S W$ .

Zur Überprüfung der Dominanzhypothese war es notwendig, eine Population zu testen, die nur aus heterozygot resistenten Tieren besteht. Wegen der Lage des Resistenzgens auf dem Z-Chromosom können dies nur Männchen sein ( $Z^R Z^S$ ), da die Weibchen nur ein Z-Chromosom besitzen ( $Z^R W$ ). Daher wurde eine Kreuzung durchgeführt bei der alle männlichen Nachkommen heterozygot resistent sind: Resistente Männchen ( $Z^R Z^R$ ) wurden mit empfindlichen Weibchen ( $Z^S W$ ) gekreuzt und die Nachkommenschaft ( $Z^R W$  u.  $Z^R Z^S$ ) gemeinsam in einem Bioassay mit den Viruskonzentrationen  $3 \times 10^3$ ,  $10^4$ ,  $3 \times 10^4$ ,  $10^5$ ,  $3 \times 10^5$  und  $10^6$  OB/ml untersucht. Parallel dazu wurden Tiere des Stammes CpS und CpRR1 bei denselben Konzentrationen getestet. Die Bioassays wurden nach sieben, 14 und 21 Tagen ausgewertet. Am 21. Tag wurden die Puppen gezählt und deren Geschlecht bestimmt.

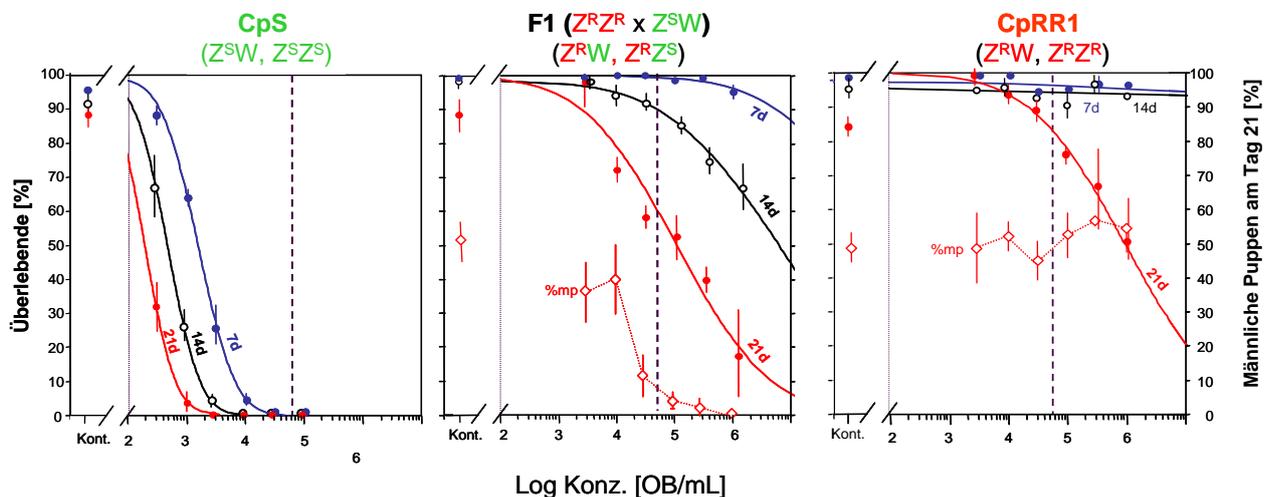


Abb. 3.15: Konzentrations-Wirkungsbeziehungen der Stämme CpS und CpRR1 und der F1-Generation der Kreuzung CpRR1<sup>♂</sup> x CpS<sup>♀</sup>, im Bioassay mit sechs verschiedenen Virus-Konzentrationen, nach sieben, 14 und 21 Tagen ausgewertet.

Der empfindliche Stamm CpS zeigte eine sehr starke Konzentrations-Wirkungsbeziehung mit LC<sub>50</sub> Werten von 1425 OB/ml nach sieben und 501 OB/ml nach 14 Tagen. Bis zum Tag 14 überlebten im resistenten Stamm CpRR1 nahezu alle Tiere in allen Konzentrationen, sodass keine LC<sub>50</sub>-Werte bestimmt werden konnten (Abb.3.15). Nach 21 Tagen jedoch nahm der Anteil der erfolgreich verpuppten Tiere mit zunehmender Viruskonzentration ab. Der Anteil der männlichen Puppen an der Gesamtpuppenzahl betrug in allen Konzentration um 50%. Die 7-Tage Mortalität der F1-Generation war sehr gering, was die Dominanz des Resistenzgens bestätigt. Nach 14 Tagen nahm die Mortalität mit der Konzentration allerdings zu. Diese Mortalität kann ausschließlich den heterozygoten Männchen ( $Z^R Z^S$ ) zugeschrieben werden, da sich die F1-Generation von CpRR1 nur durch diese Männchen unterscheidet und die Weibchen ( $Z^R W$ ) in CpRR1 nach 14 Tagen offenbar alle Konzentrationen überlebten. Dies wird noch klarer wenn man den Anteil männlicher Puppen nach 21 Tagen in der F1-

Generation betrachtet: mit zunehmender Konzentration gab es immer weniger männliche Puppen. Die heterozygoten Männchen starben also oder verpuppten sich nicht und starben später noch als Larve. Aus diesen Ergebnissen lässt sich also ableiten, dass die Resistenz monogen auf dem Z-Chromosom vererbt wird. Die Weibchen mit Resistenzgen auf dem Z-Chromosom und die homozygoten Männchen mit zwei resistenzgebenden Z-Chromosomen sind vollständig resistent. Erst ab Tag 21 erreichen sie eine Mortalität von ca. 50%, und zwar unabhängig vom Geschlecht. Die heterozygoten Männchen überleben alle Konzentrationen bis zum siebten Tag, ab Tag 14 sterben sie oberhalb der diskriminierenden Konzentration von  $5,8 \times 10^4$  OB/ml. Die Dominanz ist damit konzentrationsabhängig.

Durch diesen außergewöhnlichen Erbgang, kann die schnelle Selektion der Resistenz im Feld erklärt werden. Wenn die Allelfrequenz des Resistenzgens in einer Population gering ist, werden die sensiblen Tiere mit geringen Virusaufwandmengen sehr schnell ausselektiert. Stellt der Landwirt dann eine verschlechterte Wirkung des Virus fest, erhöht er vermutlich die Aufwandmenge. Die Folge: Nur noch die resistenten Weibchen und die homozygoten Männchen überleben und die Allelfrequenz für das Resistenzgen steigt stark an. Das Virus ist dann nahezu wirkungslos. Für das Resistenzmanagement bedeutet dies, dass alle Faktoren, die zu einer Erhöhung der Allelfrequenz des Resistenzgens (sofern in der Population existent) führen, vermieden werden müssen.

### **3.2.6. Kreuzungsexperimente für Linkage Mapping**

In Teilprojekt 2 sollen genetische Marker für das Resistenzgen identifiziert werden. Um Kopplungsanalysen durchführen zu können, müssen empfindliche und resistente Apfelwickler nach einem bestimmten Schema (Abb. 3.16) miteinander gekreuzt werden. Die Kreuzungen hierzu wurden am DLR Rheinpfalz durchgeführt.

Zwischen empfindlichen und resistenten Apfelwicklern wurden reziproke Einzelpaar-Hybridkreuzungen durchgeführt. Die Kreuzungen fanden im Klimaschrank bei 26°C, 60% Luftfeuchte, und 16h:8h Licht: Dunkelheit statt.

Die für die Hybridkreuzungen eingesetzten CpS-Tiere mussten Vollgeschwister sein. Deshalb wurden zunächst fünf einzelne Pärchen CpS x CpS inkubiert und die Nachkommenschaft der einzelnen Pärchen getrennt bis zum Puppenstadium gehalten. Die Puppen des Pärchens mit den meisten Nachkommen wurden für die reziproken Hybridkreuzungen verwendet. Für die Hybridkreuzungen wurden 12 Pärchen CpS ♂ x CpRR1 ♀ (HC1) und 10 Pärchen CpS ♀ x CpRR1 ♂ (HC2) inkubiert. Jeden zweiten Tag wurden die Eier der einzelnen Pärchen gesammelt und spätestens sieben Tage nach der Ablage im Klimaschrank inkubiert. Die frisch geschlüpften L1-Larven wurden auf Futtermedium aufgesetzt und bis zum Puppenstadium herangezogen. Neun der 12 HC1- und acht der zehn HC2-Kreuzungen waren erfolgreich. Von fünf Familien aus HC2 wurden je zehn weibliche und zehn männliche Puppen zu Adulten herangezogen und dann bei -20°C eingefroren. Aus HC1 wurden ebenfalls aus fünf Familien je zehn weibliche und zehn männliche Puppen zu Adulten herangezogen und dann bei -20°C eingefroren. Auch die Eltern der einzelnen Hybridkreuzungen wurden eingefroren. Die Nachkommenschaft der Hybridkreuzung setzt sich zusammen aus heterozygoten Männchen ( $Z^R Z^S$ ) und resistenten Weibchen ( $Z^R W$ ).

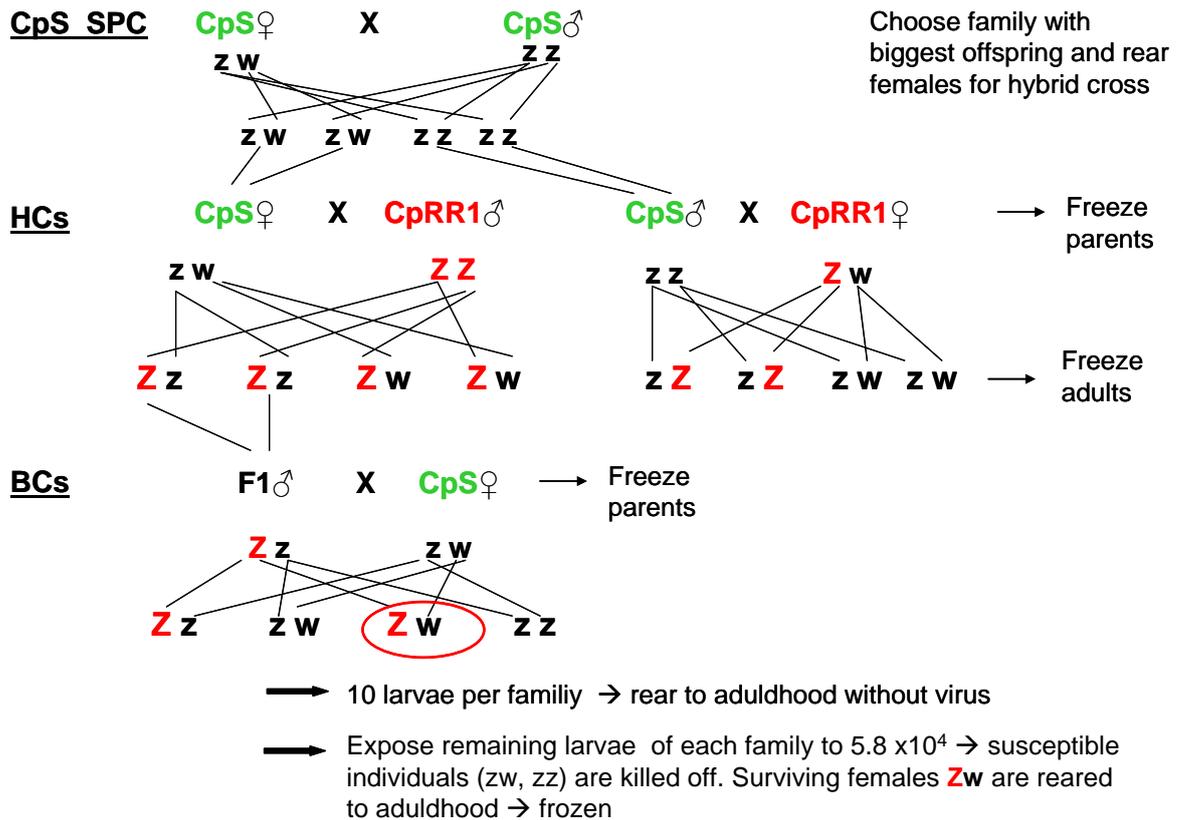


Abb. 3.16: Kreuzungsschema für Hybrid- und Rückkreuzungen

Danach wurden Rückkreuzungen zwischen der F1-Generation aus HC1 und dem empfindlichen Stamm CpS angelegt. Hierfür wurde Familie 10 aus HC1 ausgewählt. Fünfundzwanzig einzelne Pärchen bestehend aus je einer männlichen F1-Puppe ( $Z^R Z^S$ ) und einer weiblichen CpS-Puppe ( $Z^S W$ ) wurden inkubiert. Nach dem Schlupf der Falter und der Paarung wurden die Eier jeden zweiten Tag gesammelt und bis zu Inkubation im Kühlschrank aufbewahrt. Zwanzig Kreuzungen waren erfolgreich und lieferten ausreichen Eier. Die Falter wurden nach Ende der Eiablage bei  $-20^\circ\text{C}$  eingefroren. Ab Beginn des Schlupfes der L1-Larven der Rückkreuzungsnachkommenschaft wurden zunächst pro Familie 13 bis 15 Larven auf virusfreies Futter aufgesetzt, und alle restlichen Larven auf Futter mit der diskriminierenden Konzentration von  $5,8 \times 10^4$  OB/ml aufgesetzt und die resistenten Individuen zu selektieren. Da für die weitere genetische Untersuchung mindestens 300 resistenten Weibchen benötigt werden, wurden die Eier alle paar Stunden über den Zeitraum von einer Woche nach neu geschlüpften Larven abgesucht, um zu verhindern, dass Larven verhungern. Dadurch sollte die Ausbeute optimiert werden. Insgesamt wurden 2198 Larven aufgesetzt. Es wurde erwartet, dass 50% der Rückkreuzungsnachkommen empfindlich ( $Z^S Z^S$  und  $Z^S W$ ), und 50% resistent ( $Z^R Z^S$  und  $Z^R W$ ) sind. Nur die 50% resistenten Tieren überleben die diskriminierende Konzentration, wobei hiervon nur die Weibchen, also 25% der Nachkommenschaft, für das linkage mapping verwendet werden. Das hätten rein rechnerisch 549 Tiere sein sollen, was für das linkage mapping mehr als ausreichend gewesen wäre. Vierzehn Tage nach dem Aufsetzen der Laven wurde aber beobachtet,

dass die Mortalität bei nahezu 100% lag. Es stellte sich heraus, dass der verwendete Virusstandard CpGV-M0808 mit dem resistenzbrechenden Virus CpGV-I12 verunreinigt war. Es konnten also keine resistenten Weibchen aus diesen Kreuzungen gewonnen werden. Die Larven, die auf virusfreies Futter gesetzt worden waren, wurden jedoch trotzdem bis zum adulten Tier herangezogen und eingefroren.

Daraufhin wurde mit Puppen aus der Hybridkreuzung und Familie 2 erneut eine Rückkreuzung angelegt. Allerdings waren diese Puppen schon relativ alt und ähnlich alte CpS-Puppen standen nicht zu Verfügung. Von 25 angelegten Pärchen legten leider nur vier Pärchen befruchtete Eier ab. Auch diesmal wurden zunächst 13 bis 15 Larven pro Familie auf virusfreies Futter aufgesetzt und bis zum adulten Tier herangezogen. Für die Virusvariante wurde diesmal ein anderer Virusstandard, CpGV-M-EU, verwendet. Insgesamt konnten nur 530 Larven auf Futter mit der diskriminierenden Konzentration aufgesetzt werden. 106 Larven überlebten die Selektion und wurden 14 Tage nach dem Aufsetzen eingefroren um weitere Verluste während der Verpuppung und Entwicklung zum Falter zu vermeiden. Diese 106 Larven waren bis auf vier männliche Larven alle weiblich. Diese Anzahl entspricht in etwa den 25% resistenten Weibchen ( $Z^fW$ ) die man bei dieser Kreuzung erwartet hatte. Die heterozygoten Männchen ( $Z^sZ^f$ ) hätten die diskriminierende Konzentration allerdings ebenfalls überleben müssen. Dies war nicht der Fall.

Im Jahr 2008 trat eine Kontamination der Apfelwicklerzuchten (CpS und CpRR1) am DLR Rheinpfalz mit dem resistenzbrechenden Isolat CpGV-I12 auf. Dies machte Versuche mit den Tieren für das gesamte erste Halbjahr 2008 unmöglich. Durch mühsame Einzelhaltung und konsequentem Aussortieren infizierter und verdächtiger Larven waren die Zuchten ab Juni 2008 wieder symptomfrei und die Versuche mit den Tieren wurden wieder aufgenommen. Im August 2008 wurde ein neuer Virusstandard aus CpGV-M in CpS Larven vermehrt (CpGV-M0808). Es wird vermutet, dass die hierfür verwendeten CpS Larven nicht hundertprozentig frei von CpGV-I12 waren, was zu der Kontamination des neuen Virusstandards CpGV-M0808 geführt haben könnte.

### **3.3. Untersuchung milderempfindlicher Individuen auf latente Infektion**

Es sollte untersucht werden, ob sich empfindliche und milderempfindliche Populationen in Deutschland durch die Existenz latenter Infektion mit CpGV unterscheiden, die evtl. die Kapazität der Pathogenabwehr beeinflusst. Hierzu wurden empfindliche (CpS) und milderempfindliche (CpR = BW-FI-03) Larven der Laborzucht des DLR sowie Larven aus CpGV-behandelten und nicht behandelten Freilandflächen in Baden-Württemberg und dem Saarland untersucht. Zunächst wurde die DNA aus den Laven mithilfe des DNeasy-Tissue Kit von Qiagen extrahiert. Es stellte sich heraus, dass ein vorangehender alkalischer Solubilisierungsschritt nicht notwendig war. Mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) sollten CpGV-spezifische Sequenzen nachgewiesen werden. Die hierfür verwendeten Primer basierten auf der Granulinsequenz. Die nach dieser PCR negativen Proben wurden einer nested PCR unterzogen. Die nested PCR ist eine hochsensitive Variante der herkömmlichen PCR, bei der das PCR-Produkt einer vorhergehenden PCR als Template eingesetzt wird. Das verwendete Primerpaar liegt innerhalb der in der vorhergehenden PCR bereits amplifizierten PCR-Produkte aus der

Granulinsequenz. Die Auswertung der PCR-Produkte erfolgte über Agarose-Gel-Elektrophorese.

Der Nachweis von CpGV in Larven aus den Laborzuchten und dem Freiland konnte erbracht werden. In Larven des Laborstammes CpR konnte in 62,65% der untersuchten Proben CpGV nachgewiesen werden. Auch im empfindlichen Stamm CpS konnte Virus nachgewiesen werden, allerdings nur in 22,6% aller Proben. In nahezu allen Larven aus dem Freiland wurde Virus nachgewiesen. Hierbei gab es keinen Unterschied zwischen CpGV-behandelten und nicht-behandelten Freilandpopulationen. Diese Ergebnisse lassen die Vermutung zu, dass eine latente Infektion der Larven vorliegt.

Geplante Feldexperimente, bei denen untersucht werden soll, ob unterschiedliche Applikationsstrategien (volle und 1/10 Aufwandmenge) Einfluss auf die latente Infektion haben, wurden zugunsten der aufwendigen Kreuzungsversuche, nicht durchgeführt.

### 3.4. Infektionsversuche mit neuen Isolaten des CpGV

Bisher waren nur der empfindliche Laborstamm CpS und der minderempfindliche Stamm CpR (BW-FI-03) hinsichtlich ihrer Empfindlichkeit gegenüber dem resistenzbrechenden Isolat CpGV-I12 getestet worden. Nach der Etablierung des neuen homogen resistenten Stammes CpRR1 wurde auch dieser einem Bioassay mit CpGV-I12 unterzogen und Konzentrations-Wirkungsbeziehungen hergestellt (Abb. 3.17). Da es nicht gelang im Bioassay mit CpGV-M eine 50%-ige Mortalität bei CpRR1 zu erzeugen, wurden anstatt der LC<sub>50</sub>- die LC<sub>25</sub>-Werte herangezogen, um die Wirkung der verschiedenen Virus-Isolate CpGV-M und CpGV-I12 auf die drei Apfelwicklerstämme (CpS, CpR und CpRR1) vergleichen zu können. CpGV-I12 war auch bei CpRR1 in der Lage die Resistenz zu brechen, allerdings nicht vollständig und nicht so gut wie in CpR, wie ein Vergleich der LC<sub>25</sub>-Werte in Tabelle 3.3 zeigt.

Tabelle 3.3: LC<sub>25</sub>-Werte der verschiedenen Virus-Isolate CpGV-M und CpGV-I12 bei dem empfindlichen Apfelwicklerstamm CpS, dem minderempfindlichen Stamm CpR und dem homogen resistenten Stamm CpRR1.

Stamm:	Virus:	LC <sub>25</sub> 7d	LC <sub>25</sub> 14d
CpS	M	6.5 x 10 <sup>2</sup>	2.4 x 10 <sup>2</sup>
CpS	I12	3.3 x 10 <sup>2</sup>	8.1 x 10 <sup>1</sup>
CpR	M	1.4 x 10 <sup>4</sup>	- / -
CpR	I12	1.2 x 10 <sup>3</sup>	1.1 x 10 <sup>2</sup>
CpRR1	M	- / -	1.2 x 10 <sup>8</sup>
CpRR1	I12	3.9 x 10 <sup>4</sup>	2.5 x 10 <sup>3</sup>

CpGV-I12 wirkte gegen CpS sogar etwas besser als CpGV-M. Gegen CpRR1 wirkte CpGV-I12 nach 14 Tagen ca. 72.000-fach besser als CpGV-M. Vergleicht man die Wirkung von CpGV-I12 auf CpS und CpRR1 nach sieben Tagen, so war diese in CpRR1 etwa 120-mal schlechter. Nach 14 Tagen konnte CpGV-I12 in CpRR1 noch etwas aufholen und wies einen nur noch um 30-fach höheren  $LC_{25}$ -Wert auf als in CpS. Anhand der  $LC_{25}$ -Werte für CpGV-M in CpS und CpRR1 errechnet sich ein Resistenzfaktor von 500.000. CpRR1 ist demnach 500.000-fach resistenter als CpS im Hinblick auf CpGV-M.

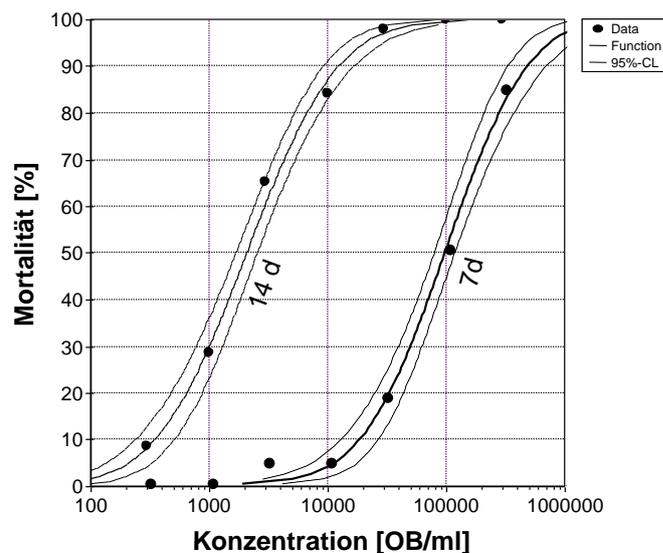


Abb. 3.17: Konzentrations-Wirkungskurven des homogen resistenten Stammes CpRR1 in einem 7- und 14-Tage-Bioassay mit CpGV-I12.

### 3.5. Infektions-Tracking mit einer gfp-markierten CpGV-Mutante

Der Infektionsverlauf von CpGV wurde in anfälligen (CpS) und resistenten (CpRR1) Larven mit einer CpGV-Rekombinate ( $\text{bacCpGV}^{\text{hsp-eGFP}}$ ), die mit einer fluoreszenzgebenden Markergen (*egfp*) ausgestattet war, verfolgt. Die Rekombinante wurde freundlicherweise vom HRI Warwick (UK) überlassen.

L5-Larven wurden mit 1000 OB  $\text{bacCpGV}^{\text{hsp-eGFP}}$  peroral inokuliert und die infizierten Tiere wurden nach 24, 48, 72 und 96 h nach Infektion (hpi) präpariert und fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Die Ergebnisse sind in Abb. 3.18 dargestellt. Infizierte CpS-Larven zeigten eine Virusreplikation im Fettkörper nach bereits 48 hpi, mit einer deutlichen Zunahme bis 96 hpi. Replikation in CpRR1 konnte hingegen so gut wie nicht festgestellt werden (Abb. 3.18 a und d). Einige infizierte CpRR1-Individuen zeigten nach 96 hpi einzelne fluoreszierende Spots in Fettkörper, Darm und im Tracheen-System. Die Infektion in CpRR1 war nie systemisch und alle Larven überlebten die Infektionsversuche und verpuppten sich normal. Die Tracking-Experimente bestätigte die in 3.1. gefundenen Ergebnisse.

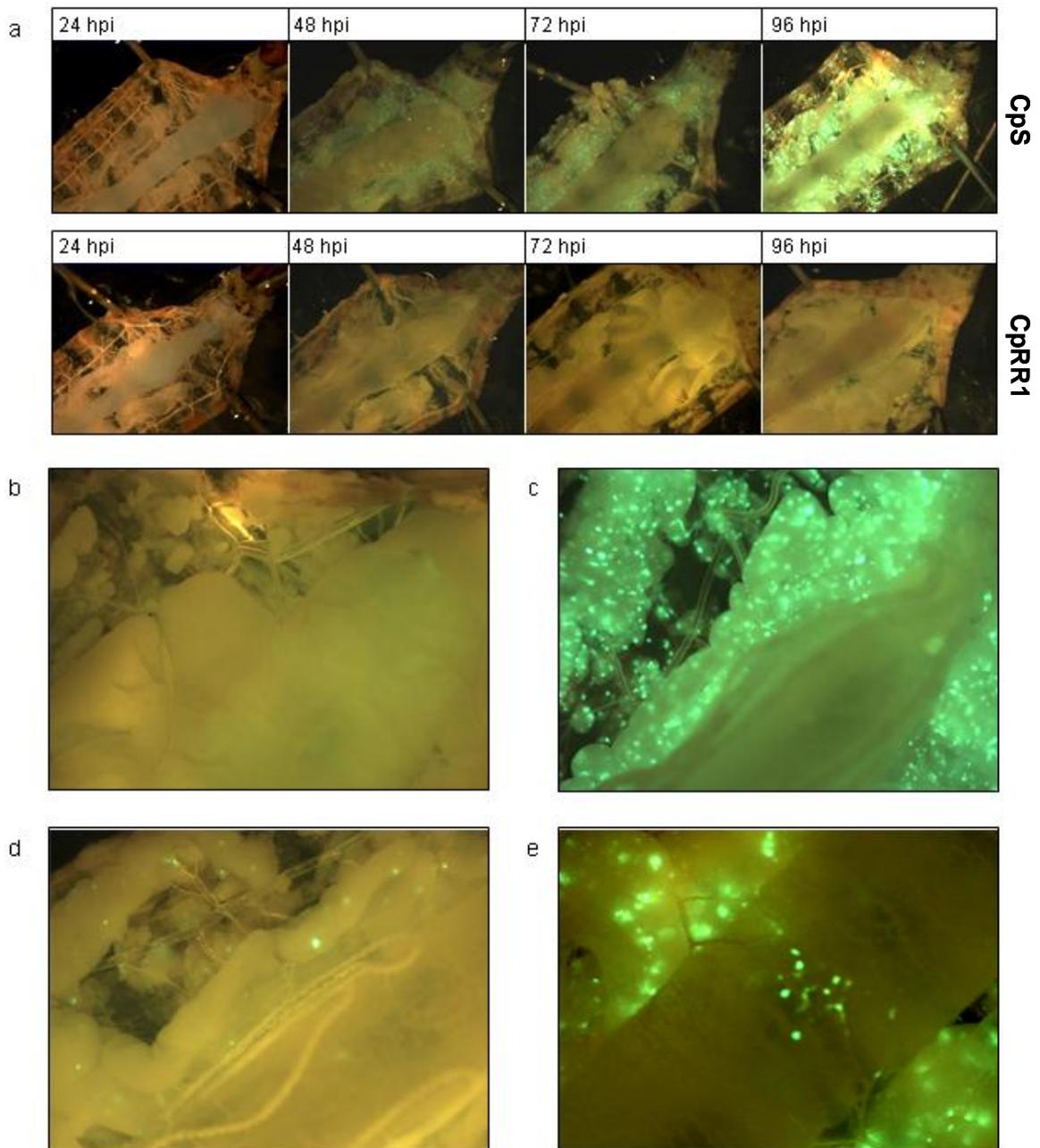


Abb. 3.18. (a) Replikation des *eGFP* exprimierenden rekombinanten bacCpGV<sup>hsp-eGFP</sup> in anfälligen (CpS) und resistenten (CpRR1) L5-Larven 24, 48, 72 und 96 Stunden nach peroraler Infektion (hpi) mit 1000 OBs beobachtet im Fluoreszenz-Stereomikroskop (12x Vergrößerung). *EGFP*-Expression 96 hpi (25x Vergrößerung) im oberen Mitteldarm und Fettkörper in einer (b) nicht infizierten Larve (CpS), (c) infizierten anfälligen (CpS) Larve und (d) einer infizierten resistenten (CpRR1) Larve; (e) Mitteldarm und benachbarte Tracheen einer infizierten CpS-Larve mit Fluoreszenz-Spots an den Verbindungspunkten.

### **3.6. Literatur**

El-Salamouny, S.; Kleespies, R. G.; Huber, J. (2005): Understanding the mechanism of increasing susceptibility of insects to baculovirus by fluorescent brightener. In: Papierok, B. (ed.): Insect Pathogens and Insect Parasitic Nematodes, Proceedings of the 9th European Meeting 'Insect Pathogens and Insect Parasitic Nematodes: Growing Biocontrol Markets Challenge Research and Development' at Schloss Salzau, Kiel.

## **Teilprojekt 4**

### **Untersuchung der Minderempfindlichkeit gegenüber neuen CpGV-Isolaten**

(FÖKO, Jutta Kienzle)

#### **4.1. Einleitung**

Die Applikation der neuen, resistenzbrechenden Isolate von CpGV (z. B. Madex Plus, CpGV-12 und andere) eröffnet die Möglichkeit, den von der Resistenz betroffenen Betrieben ein wirksames Viruspräparat zur Verfügung zu stellen. Madex Plus wurde 2006 zunächst versuchsweise und 2007 entsprechend §11 Pflanzenschutzgesetz in allen betroffenen Betrieben eingesetzt. Allerdings war Anfang 2008 nicht bekannt, ob alle Populationen gegenüber Madex Plus gleich empfindlich sind und inwieweit sich eine Strategie mit niedrigeren Aufwandmengen, wie in der Praxis mit Granuloviruspräparaten üblich, auf eine weitere Selektion resistenter Apfelwicklerpopulationen auswirkt. Andererseits wurden 2007 mindestens zwei Populationen gesichtet, in denen auch die neuen Isolate keinen durchschlagenden Erfolg zeigten. Hier könnte im ungünstigsten Fall sogar ein anderer Resistenzmechanismus vorherrschen, der nicht dem bisher beobachteten entspricht. Für die Entwicklung einer effizienten Resistenzmanagement-Strategie sind aber Kenntnisse bezüglich der Anfälligkeiten CpGV-resistenter Anlagen gegenüber den neuen CpGV-Isolaten unerlässlich. Für Betriebe mit CpGV-M-Resistenz wurde das neue Virusisolat Madex Plus nur mit hoher Aufwandmenge und kurzen Spritzabständen empfohlen. Dies ist mit hohen Kosten verbunden und auf Dauer in der Praxis nicht ohne weiteres vermittelbar. Eventuelle negative Auswirkungen niedriger Aufwandmengen im Hinblick auf das Resistenzmanagement sollten untersucht und ggf. dokumentiert werden.

Daher wurden während der Vegetationsperiode 2008 in 9 Anlagen mit CpGV-M-resistenten Apfelwicklerpopulationen Vergleichsversuche mit Strategien mit hoher Aufwandmenge und „üblicher“ Aufwandmenge an resistenzbrechenden Isolaten (nach Beratungsempfehlung Madex 3 für Betriebe ohne Resistenzen) durchgeführt. In der Vegetationsperiode 2009 wurden diese Versuche auf zwei Betrieben wiederholt. In allen Versuchen wurden Wellpapperinge in hoher Anzahl angebracht werden, um überlebende Larven abzufangen. Diese diapausierenden Larven werden überwintert und im nächsten Jahr einer Einzelpaarkreuzung mit anfälligem CpS unterzogen. Die Nachkommen aus den Einzelpaarkreuzungen wurden wiederum bei einer diskriminierenden Dosis hinsichtlich ihrer Empfindlichkeit gegenüber CpGV-I12 bzw. Madex Plus getestet.

Hiermit sollte eine Möglichkeit zum gezielten Virulenzmanagement auf der Basis relativ weniger gesammelter Larven erarbeitet werden. Um hier an Zukunftsperspektiven zu arbeiten, wurden 2008 in drei Betrieben bereits neue Isolate der Fa. Andermatt (V06, V03) eingesetzt. Im Jahr 2009 wurde Madex MAX verwendet.

#### **4.2. Material und Methoden**

Im Jahr 2008 war auf 7 Betrieben mit CpGV-M-Resistenz die Apfelwicklerpopulation noch hoch genug, um aussagefähige Ergebnisse erwarten zu lassen. Bei zwei Betrieben

(NRW-WE und SA-GO) bestand eine Unsicherheit bezüglich der ausreichenden Wirkung von Madex Plus. Bei zwei anderen Betrieben (BW-HI, BW-LF) war der Bekämpfungserfolg im vergangenen Jahr ebenfalls nicht ganz zufriedenstellend. Die Population SA-GO war bei Tests in 2007 (Schulze-Bopp, unveröffentlicht) nur sehr wenig empfindlich gegenüber GpGV-I12.

Auf den Betrieben BW-HI und BW-LF wurde daher ein neues Versuchspräparat der Firma Andermatt Biocontrol AG, Madex V03, eingesetzt. Auf dem Betrieb NRW-WE führte die Firma Andermatt selbst Versuche mit verschiedenen Versuchspräparaten durch. Daher wurde dort im Versuch zur Reduktion Madex Plus eingesetzt. Für die Tests zum Virulenzmanagement konnten jedoch auch Larven verwendet werden, die in den Versuchen von Andermatt zum Vergleich von Madex Plus, Madex V03 und Madex V06 gesammelt wurden. Im Jahr 2009 wurden die Versuche mit dem neuen Isolat der Fa. Andermatt Madex MAX in den Anlagen BW-HI und HE-WI durchgeführt, um die Effekte dieses Isolates bei niedriger Aufwandmenge zu testen.

Die Versuche waren als Praxisversuche ohne Wiederholungen aufgebaut. Ein kleines Stück von 8 Reihen mit 25 Bäumen diente als unbehandelte Kontrolle. Die beiden Varianten wurden quer zu den Reihen angelegt um die Abdrift zu reduzieren. Auf dem Betrieb NRW-WE waren aufgrund der Größe der Parzelle zwei Wiederholungen möglich.

Im Jahr 2008 gab es in den meisten Regionen kaum eine längere gesicherte Periode mit keiner oder nur geringer Eiablageaktivität des Apfelwicklers. Daher wurde in allen Betrieben bei der Strategie mit hoher Aufwandmenge (VOLL) jeweils 50 ml/ha und m Kronenhöhe (Kh) des Viruspräparates eingesetzt. Bei der Strategie mit reduzierter Aufwandmenge (RED) kam bei jeder Spritzung die halbe Aufwandmenge, d.h. 25 ml/ha und m Kh zum Einsatz. Die Applikation erfolgte durch die Betriebsleiter, es erfolgte auch die betriebsübliche Mischung mit Fungiziden. Die Spritzabstände lagen je nach Witterungsverlauf und Befallsdruck zwischen 6 und 10 Tagen

Im Jahr 2009 wurde am Standort BW-HI je nach Schlupfverlauf im Abstand von 5 bis 10 Tagen Madex MAX mit 50 ml/ha und m Kh in der Variante mit voller Aufwandmenge bzw. mit 25 ml/ha und m Kh in der Variante mit reduzierter Aufwandmenge bis Ende Juli ausgebracht. Am Standort HE-WI erfolgten die Behandlungen nach demselben Schema bis Anfang Juli.

An allen Standorten wurde gleichzeitig das Verfahren der Pheromonverwirrung (RAK 3) praktiziert. Der Befall wurde jeweils an zwei Terminen im Juli und vor der Ernte erfaßt. Dabei wurden pro Variante mindestens 1000 zufällig ausgewählte Früchte ausgewertet. Befallene Früchte wurden aufgeschnitten und auf das Vorhandensein von lebenden Larven untersucht („aktiver“ Befall). Waren keine lebenden Larven zu finden und die Einbohrstelle auch offensichtlich verlassen, wurde der Befall als „abgestoppt“ klassifiziert. Die einzelnen Larvenstadien wurden visuell geschätzt und vermerkt. Dies ist nur bei NRW-WE im Jahr 2008 dargestellt, da es hier für die Interpretation der Ergebnisse relevant war.

Vor dem Abwandern der ersten Larven im Frühsommer wurden in allen Versuchen Wellpapperinge angebracht, die zum Schutz gegen Vögel noch mit Paketklebeband umwickelt wurden. Besonders in der Parzelle mit voller Aufwandmenge wurde eine sehr hohe Zahl an Ringen angebracht, um eine ausreichende Anzahl von Larven zu erhalten. Zu Saisonende wurden die Ringe wieder abgenommen und die Larven in Belaplastschalen verbracht. Sie wurden kühl aber frostfrei überwintert und im Frühjahr 2009 zum DLR Rheinpfalz für die Einzelpaarkreuzungen und zum JKI Darmstadt zum

Aufbau einer Zucht gebracht (SA-GO und NRW-WE). 2009 wurden nur wenige Larven gesammelt, die aber für weiterführende Untersuchungen zur Verfügung stehen.

### **4.3. Ergebnisse**

Auf den Betrieben in BadenWürttemberg und Hessen war im Jahr 2009 der Befallsdruck nicht mehr sonderlich hoch. Für eine erfolgreiche Verwirrung werden in Regionen mit mehr als einer Generation Erfahrungswerte angenommen, die etwa um 0,1 Larven pro Baum in den Wellpapperingen (bei normalen Spindelbäumen) liegen. Es gelang jedoch nur auf den Betrieben BW-FN und BW-TU mit der vollen Aufwandmenge, die Anzahl der Diapauselarven zu Saisonende unter diesen Richtwert zu senken (Abb. 4.2). Die reduzierte Aufwandmenge reichte hierfür in keinem Fall aus. Kaum Unterschiede zwischen voller und halber Aufwandmenge konnten auf dem Betrieb HE-WI festgestellt werden. Dies betraf sowohl den Fruchtbefall als auch die Anzahl der Diapauselarven. Während an der Population BW-MA beim Fruchtbefall ein Effekt der Aufwandmenge sichtbar scheint, war die Anzahl der Diapauselarven in der Parzelle mit voller Aufwandmenge höher.

Auf dem Betrieb BW-HI zeigte Madex V03 eine gute Wirkung. Aufgrund des guten Behangs war der prozentuale Befall zwar relativ niedrig. In den Wellpapperingen fanden sich jedoch in der Kontrolle recht viele Larven. Weder mit der vollen noch mit der reduzierten Aufwandmenge konnte eine Reduktion bis auf 0,1 Larven pro Baum erreicht werden. Es waren jedoch deutliche Unterschiede zwischen der vollen und der reduzierten Aufwandmenge erkennbar.

Auf dem Betrieb NRW-WE war bereits bei der Bonitur der ersten Generation ein sehr starker Befall festzustellen (Abb. 4.1, links), der für diese Jahreszeit in dieser Region sehr ungewöhnlich ist. Weder mit voller noch mit reduzierter Aufwandmenge war eine Kontrolle dieses Befalls möglich gewesen. Ein zu später Beginn der Behandlungen konnte nicht ausgeschlossen werden.

Aber auch wenn alle älteren Larvenstadien, die ggf. von der ersten Behandlung nicht erfaßt worden waren, nicht berücksichtigt wurden (Abb. 4.1, rechts), zeigte sich noch ein sehr hoher aktiver Befall in beiden Varianten. Es waren auch keine Effekte der vollen oder reduzierten Aufwandmenge zu erkennen, die Kontrolle wies eher einen geringeren Befall auf. Um den wirtschaftlichen Schaden für den Betrieb zu begrenzen, wurde der Versuch abgebrochen.

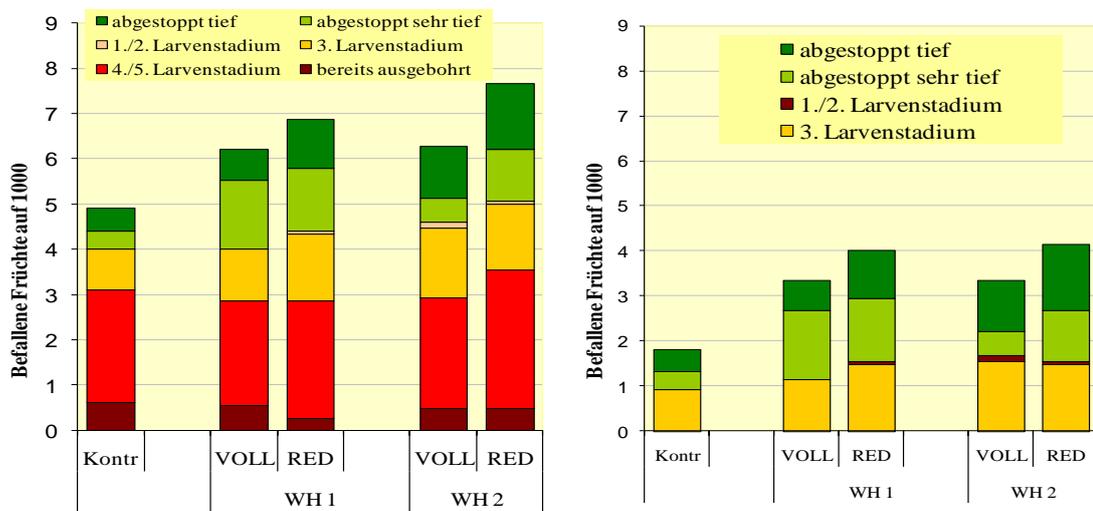


Abb. 4.1: Fruchtbefall (in Prozent) bei der ersten Bonitur am 5.7.2008 in den beiden Wiederholungen auf dem Betrieb NRW-WE bei Einsatz von Madex Plus mit voller und reduzierter Aufwandmenge. In der linken Grafik sind alle Larvenstadien dargestellt, in der rechten Grafik sind die fortgeschrittenen Larvenstadien, die evtl. durch einen zu späten Beginn der Behandlungen nicht erfasst wurden, nicht dargestellt.

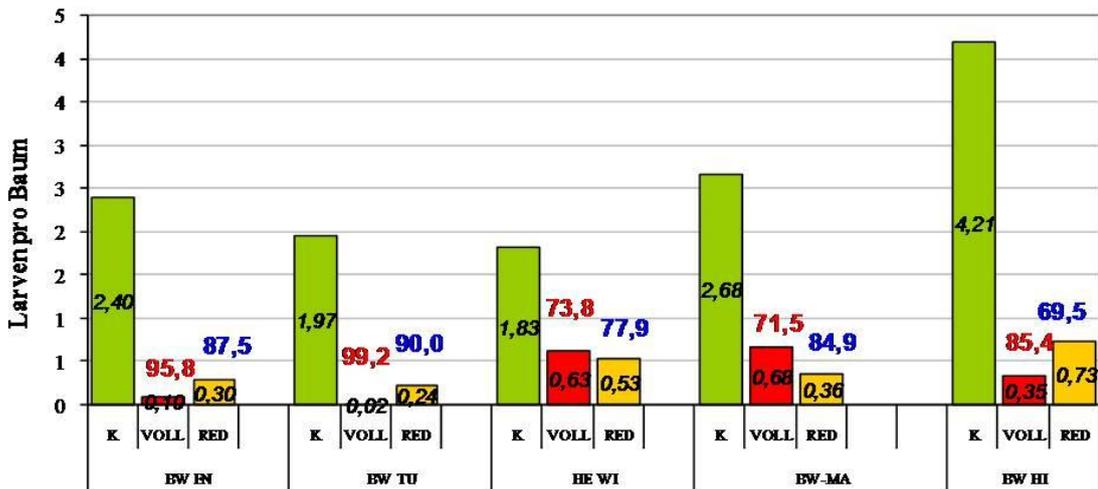


Abb. 4.2: Wirkungsgrade auf die Folgepopulation (überlebende Larven in den Wellpapperingen zu Saisonende) auf den verschiedenen Betrieben bei voller und reduzierter Aufwandmenge von Madex Plus bzw. Madex V03 (BW-HI).

Im Jahr 2009 war auf dem Betrieb HE-WI nur noch ein relativ geringer Befall festzustellen. Weder beim Fruchtbefall noch bei der Anzahl der Diapauselarven in den Wellpapperingen kam es zu wesentlichen Unterschieden zwischen der reduzierten und der vollen Aufwandmenge. Beim Betrieb BW-HI wurde nur geringer prozentualer Fruchtbefall gefunden. In den Wellpapperingen fand sich in der Kontrolle dann ein Befall von 0,5 Larven pro Baum. In den behandelten Parzellen wurden bei der Abnahme der Ringe „Befallsnester“ beobachtet. Dabei handelte es sich um wenige Bäume, bei denen dann mehrere Larven in den Ringen gefunden wurden. Von diesen „Befallsnestern“ gab es in der etwas größeren Parzelle mit voller Aufwandmenge etwas mehr, so dass dort eher mehr Larven zu finden waren.

#### **4.4. Diskussion**

Ziel der Versuche war unter anderem, abzuschätzen, inwieweit die momentan empfohlenen hohen Aufwandmengen an Madex Plus für die Betriebe mit CpGV-M-resistenten Populationen notwendig sind oder ob eine Reduktion empfohlen werden kann. Unter dem Gesichtspunkt einer erfolgreichen dauerhaften Reduktion der Apfelwicklerpopulation auf ein Niveau, das wieder eine gute Wirkung der Verwirrungsmethode erlaubt, waren die hohen Aufwandmengen im Jahr 2008 in allen Betrieben notwendig. Setzt man als kritische Schwelle einen Erfahrungswert von 0,1 Larven pro Baum in den Wellpapperingen, so gelang es 2008 nur bei BW-FN und BW-TU mit bereits relativ niedrigem Befallsdruck, die Population auf diese Schwelle zu reduzieren. Die halbe Aufwandmenge reichte dazu aber nicht aus. 2009 war dies bei HE-WI mit sowohl mit voller als auch mit halber Aufwandmenge möglich. Die Aufwandmenge definiert sich also vor allem über den Befallsdruck sowie den Schlupfverlauf. Je nach Situation kann bei den CpGV-M-resistenten Populationen eine halbe oder geringere Aufwandmenge vollkommen ausreichend sein, um das gewünschte Ergebnis zu erzielen. Die Empfehlung in der Praxis sowohl bei bereits resistenten Populationen als auch für das Resistenzmanagement sollte sich daher an Befallsdruck und Schlupfverlauf orientieren und sich nicht generell auf hohe Aufwandmengen festlegen.

Die Ergebnisse auf dem Betrieb NRW-WE sowie auf einem Betrieb in Sachsen (SA-GO) legten die Vermutung nahe, dass in dieser Population Individuen existieren, die gegenüber den bisher verwendeten neuen Isolaten von CpGV ebenfalls Resistenzen aufweisen. In diesen Anlagen zeigten diese Isolate von Anfang an eine geringere Wirkung (Kienzle et al. 2007). Mit den in diesen Anlagen gesammelten Larven wurden Einzelpaarkreuzungen durchgeführt, bei denen dies auch nachgewiesen werden konnte. Bei BW-HI kam es dagegen zur Bildung von Befallsherden – allerdings bei beiden Aufwandmengen, wobei die Variante mit voller Aufwandmenge eher mehr betroffen war. Dieses Phänomen sollte näher untersucht und – so möglich – die entsprechenden Tiere auf Resistenzen gegenüber Madex Max getestet werden.

#### **4.5. Zusammenfassung**

Ziel der Versuche war unter anderem, abzuschätzen, inwieweit die momentan empfohlenen hohen Aufwandmengen an MadexPlus für die Betriebe mit CpGV-M-resistenten Populationen notwendig sind oder ob eine Reduktion empfohlen werden kann. Unter dem Gesichtspunkt einer erfolgreichen dauerhaften Reduktion der Apfelwicklerpopulation auf ein Niveau, das wieder eine gute Wirkung der Verwirrungsmethode erlaubt, waren die hohen Aufwandmengen in den meisten Betrieben

notwendig. War der Befallsdruck jedoch relativ niedrig, konnten keine Unterschiede zwischen den hohen und niedrigen Aufwandmengen beobachtet werden. Die Aufwandmenge definiert sich also vor allem über den Befallsdruck sowie den Schlupfverlauf. Je nach Befallssituation kann auch bei den CpGV-M-resistenten Populationen eine halbe oder geringere Aufwandmenge vollkommen ausreichend sein, um das gewünschte Ergebnis zu erzielen. Die Empfehlung in der Praxis sowohl bei bereits resistenten Populationen als auch für das Resistenzmanagement sollte sich daher an Befallsdruck und Schlupfverlauf orientieren und sich nicht generell auf hohe Aufwandmengen festlegen.

Die Ergebnisse auf dem Betrieb NRW-WE sowie auf einem Betrieb in Sachsen (SA-GO) legten die Vermutung nahe, dass in dieser Population Individuen existieren, die gegenüber den bisher verwendeten neuen Isolaten von CpGV ebenfalls Resistenzen aufweisen. In diesen Anlagen zeigten diese Isolate von Anfang an eine geringere Wirkung (Kienzle et al. 2007). Mit den in diesen Anlagen gesammelten Larven wurden Einzelpaarkreuzungen durchgeführt, bei denen dies auch nachgewiesen werden konnte (siehe Teilprojekt 5).

#### **4.6. Literatur**

Kienzle, J.; Zebitz, C.P.W.; Volk, F. (2007): Erste Freilanduntersuchungen zur Wirkung von Madex plus, einem Präparat basierend auf einem selektionierten CpGV, auf CpGV-resistente Apfelwicklerpopulationen in Öko-Betrieben. In : 9. Wissenschaftstagung Ökologischer Landbau. Hrsg.: S. Zikeli, W. Claupein, S. Dabbert, B. Kaufmann, T. Müller und A. Valle Zárate, 2007: 321-324.

## **Teilprojekt 5**

### **Untersuchung der Minderempfindlichkeit gegenüber neuen CpGV-Isolaten**

(Dienstleistungszentrum Ländlicher Raum Rheinpfalz, Neustadt/Wstr.)

#### **5.1. Einleitung**

Seit im Jahr 2005 erstmals Apfelwicklerpopulationen mit verminderter Empfindlichkeit gegenüber dem Apfelwicklergranulovirus (CpGV-M) in Deutschland entdeckt wurden, wurden viele Populationen in Zucht genommen und auf ihre Empfindlichkeit hin untersucht. Desweiteren wurden auch Resistenzschnelltests entwickelt, die eine sichere und schnelle Auskunft über eine vorhandene Resistenz innerhalb einer verdächtigen Population gewährleisten.

Im Rahmen dieses Projekts wurden Apfelwicklerpopulationen aus acht unterschiedlichen Regionen in Deutschland als Einzelpaare jeweils mit einem CpGV-sensiblen Apfelwickler-Laborstamm gekreuzt und die Nachkommenschaft auf ihre Anfälligkeit in Bioassays getestet.

Einzelpaarkreuzungen aus schlüpfenden Wildtieren mit dem CpGV-sensiblen Laborstamm CpS wurden im Frühjahr 2009 durchgeführt. Die daraus resultierende Hybridgeneration wurde bei einer diskriminierenden Konzentration von  $5,8 \times 10^4$  OB/ml mit den beiden Virusstämmen CpGV-M und CpGV-S als auch einer unbehandelten Kontrolle getestet. Die Ergebnisse sollten den bekannten Vererbungs-Mechanismus (Asser-Kaiser et al., 2007) auch in Freiland-Populationen bzw. deren hybriden Nachkommen nachweisen bzw. evt. auch andere Vererbungsmuster anzeigen. Es konnte gezeigt werden, dass alle untersuchten Wildpopulationen gegenüber dem CpGV-M resistent sind; gegenüber CpGV-S waren vier der untersuchten Populationen anfällig, vier weitere Populationen zeigten jedoch Resistenzen gegen dieses resistenzbrechende Virusisolat auf. Insgesamt wurden Populationen identifiziert, die mit dem bekannten Resistenzmechanismus übereinstimmen, aber auch solche, die damit nicht übereinstimmen.

Weiterhin wurde ein Resistenzschnelltest mit einer diskriminierenden Konzentration von  $5,8 \times 10^4$  OB/ml mit einer aus den Niederlanden erhaltenen Population durchgeführt, bei dem keine Wirkung von CpGV-I12 (23% Mortalität) oder -S (38% Mortalität) nachgewiesen werden konnte, CpGV-M wirkte hier geringfügig besser auf die getesteten Tiere als die neuen Isolate (Mortalität 39%). Diese Anlage wurde noch nie mit CpGV-Isolaten behandelt, sondern chemisch, weshalb hier keine Erklärung zur auftretenden Resistenz gegeben werden kann.

### 5.2.1. Methode für Einzelpaarkreuzungen

Diapausierende Larven, die im Vorjahr 2008 aus bundesweiten Problemanlagen gesammelt und überwintert wurden, wurden im Frühjahr bei 26°C und 16/8 h Photoperiode inkubiert, um eine Verpuppung dieser Tiere zu erlangen. Nach erfolgter Verpuppung wurden Einzelpaar-Hybridkreuzungen mit dem sensiblen Laborstamm CpS unter Zugabe eines wassergetränkten Wattebausches durchgeführt. Die Kreuzungen erfolgten nach dem unten angegebenen Schema (Abb. 5.1) bei 26°C, 70% Luftfeuchte und 16h:8h Photoperiode im Klimaschrank. Nach erfolgter Paarung und Eiablage wurden die Eier für drei bis vier Tage inkubiert (s.o) und die geschlüpften L1-Larven einem Bioassay bei 26°C mit einer diskriminierenden Konzentration von  $5,8 \times 10^4$  OB/ml des herkömmlichen Virusisolats CpGV-M und des resistenzbrechenden Virusisolats CpGV-S sowie einer virusfreien Kontrolle unterzogen. Zur Auswertung wurden die Mortalitäten nach Abbott (1925) gegen die Kontrollen korrigiert. Durchschnittlich wurden 20 Tiere pro Virusisolat und Kontrolle getestet. Alle Familien, die weniger als fünf Nachkommen pro Virusisolat erbrachten, wurden aus der Auswertung genommen.

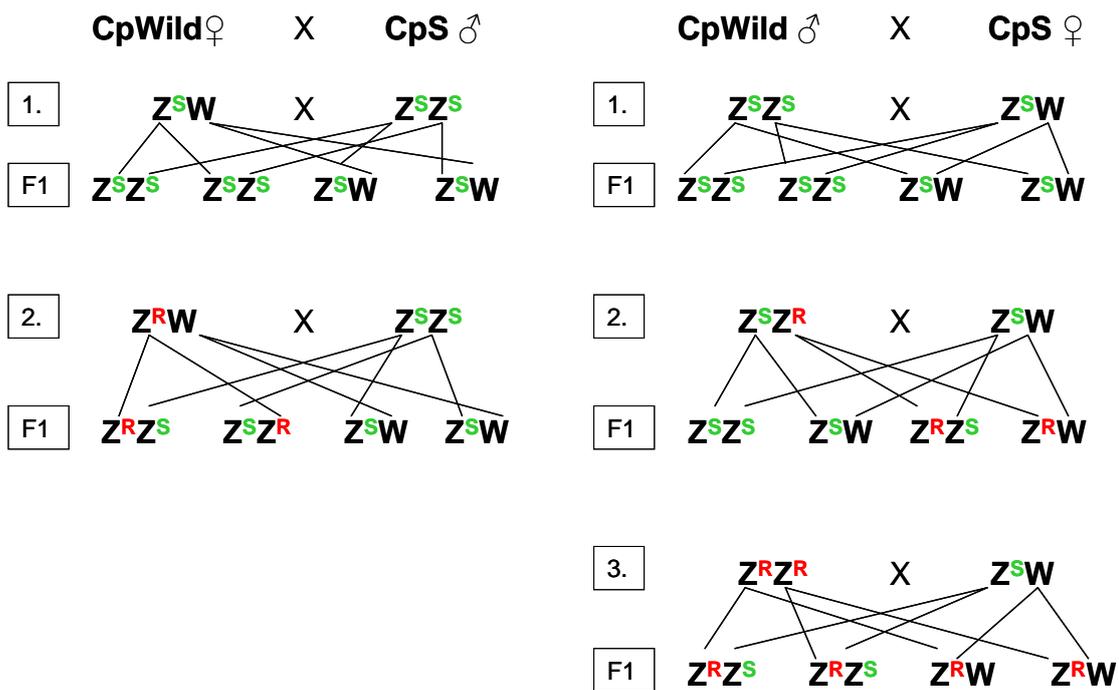


Abb. 5.1: Kreuzungsschemata mit wilden Apfelwicklertieren und sensiblen Laborstammtieren. Die Resistenz wird geschlechtsgebunden dominant vererbt, wobei Hybridweibchen der F1-Generation homogen (reinerbig) resistent oder sensibel (Z<sup>R</sup>W, Z<sup>S</sup>W) sind und Hybridmännchen der F1-Generation sowohl homogen resistent sein können (Z<sup>R</sup>Z<sup>R</sup>) als auch heterogen (mischerbig) resistent (Z<sup>R</sup>Z<sup>S</sup>, Z<sup>S</sup>Z<sup>R</sup>), wie auch homogen sensibel (Z<sup>S</sup>Z<sup>S</sup>) sein können.

### 5.2.2. Methode für Resistenzschnelltest

Für die Direkttestung wurden befallene Äpfel aufgeschnitten und die darin enthaltenen Larven entnommen und gleichermaßen auf Kontroll-, CpGV-M-, CpGV-I12- und CpGV-S-Futter gesetzt (je  $5,8 \times 10^4$  OB/ml) und bei 26°C einem 14-Tage Bioassay unterzogen. Für die Auswertung wurden alle Larvalstadien zu Beginn des Tests notiert und L5-Larven aus der Wertung genommen. Bonituren fanden am Tag 1 nach Aufsetzen statt; hier wurden alle Toten notiert und die Zahl der Überlebenden als Startzahl des Bioassays notiert. Am Tag 7, 10 und 14 erfolgten weitere Bonituren.

### 5.3.1. Ergebnisse der Einzelpaarkreuzungen

Aus den Einzelpaarkreuzungen gingen insgesamt 105 Hybridfamilien aus acht Populationen hervor, die untersucht wurden (Abb. 5.2 a-d). Alle Populationen konnten als CpGV-M resistent eingestuft werden. Ihre Nachkommenschaft zeigte nur in drei Familien Mortalitäten von 100% auf CpGV-M (z.B. zwei Hybridfamilien der Population BW-MA à 5 und 10 Tiere), Nachkommen eines weiblichen Wildtieres, sowie eine Familie mit 26 Tieren der Population HE-WI, Nachkommen eines männlichen Wildtieres. Bei diesen drei Elterntieren kann man von reinerbig sensiblen Tieren ausgehen (siehe Abb. 5.1). Da bei diesen Populationen sowohl 100% Mortalität als auch 0% und 50% Mortalität auftraten, kann man davon ausgehen, dass diese Wildpopulationen heterogen resistent sind. Eine geschlechtsabhängige Vererbung der Resistenz kann in den Populationen BW-FN, BW-HI und BW-MA erkannt werden, jedoch nicht so eindeutig, wie in der Population HE-WI. Hier lag die Mortalität der Nachkommen in drei von vier Testfamilien, die ein weibliches Wildelternteil hatten, bei ca. 50%, in einer Familie wurde eine Mortalität von 75% nachgewiesen. Von sieben Familien mit männlichem Wildelternteil konnten fünf mit 0% Mortalität, zwei mit Mortalitäten zwischen 65-80% und eine mit 100% Mortalität nachgewiesen werden. Hier handelt es sich bei dem Elternteil mit 100% Mortalität in der Nachkommenschaft um ein homozygot sensibles Männchen, solche, deren Nachkommen 0% Mortalität aufwiesen, sind homozygot resistent. Die beiden Familien mit 65-80% Mortalität gehen wohl auf ein heterozygot wildes Männchen zurück. Die F1-Generationen der Populationen NRW-WE, NRW-WE-S, NRW-WE-E und SA-GO zeigten keine ausgeprägte geschlechtsgebundene Resistenzvererbung. In 30 Familien konnte sogar eine höhere Mortalität gegen CpGV-M als gegen CpGV-S festgestellt werden.

CpGV-S wirkte, außer in einer Familie, gegen alle Familien der Populationen BW-FN und HE-WI zu 100% tödlich. In dem Ausnahmefall handelt es sich um Nachkommen eines weiblichen Wildtieres, die bei Gabe von CpGV-S zu 80% im 14-Tage Bioassay starben. Gegen die Populationen BW-HI, BW-MA, NRW-WE, NRW-WE-S, NRW-WE-S, NRW-WE-E und SA-GO konnte nur in 9 Familien 100% Mortalität erreicht werden (eine Familie aus BW-HI mit wildem Vatertier; fünfmal in BW-MA, davon dreimal mit wildem Muttertier und zweimal mit wildem Vatertier; einmal in NRW-WE mit wildem Vatertier und jeweils einmal in NRW-WE-E und SA-GO mit jeweils wildem Muttertier). Bei den Populationen NRW-WE, NRW-WE-S, NRW-WE-E und SA-GO muss man von einer anderen vorherrschenden Resistenz ausgehen, da die Hybridnachkommen wenig bis keine Mortalitäten aufwiesen.

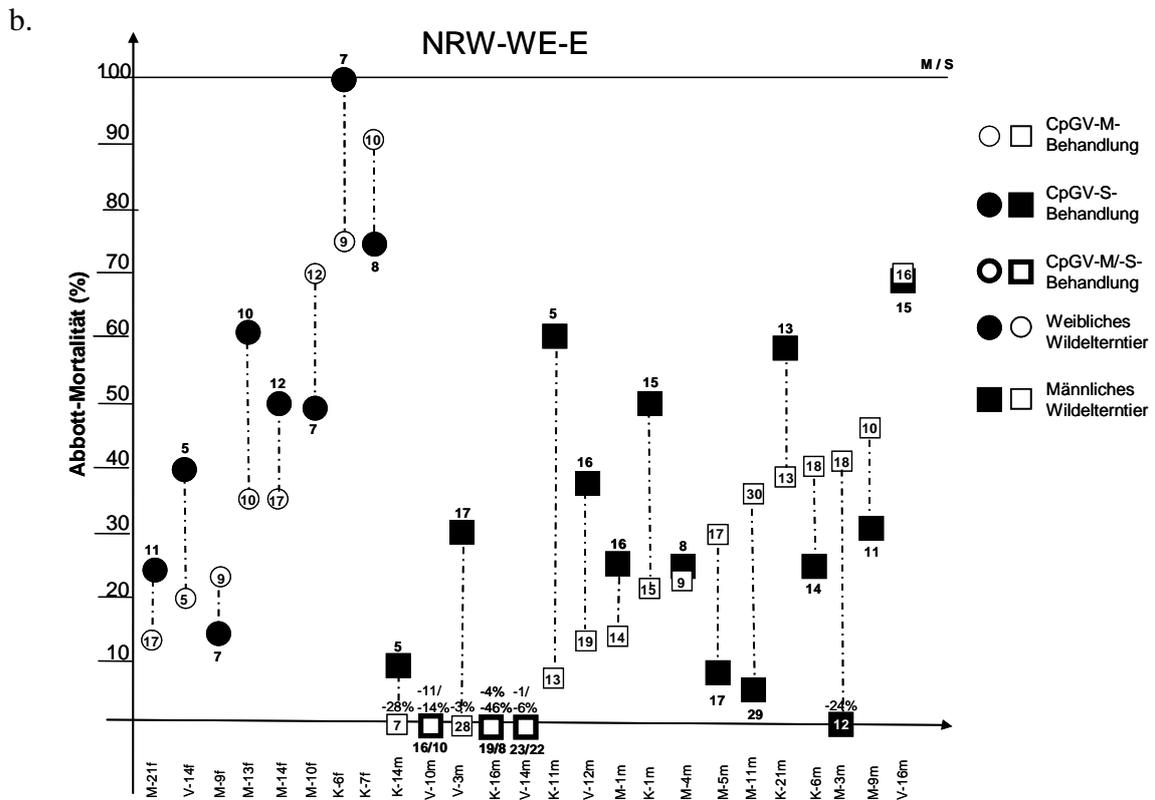
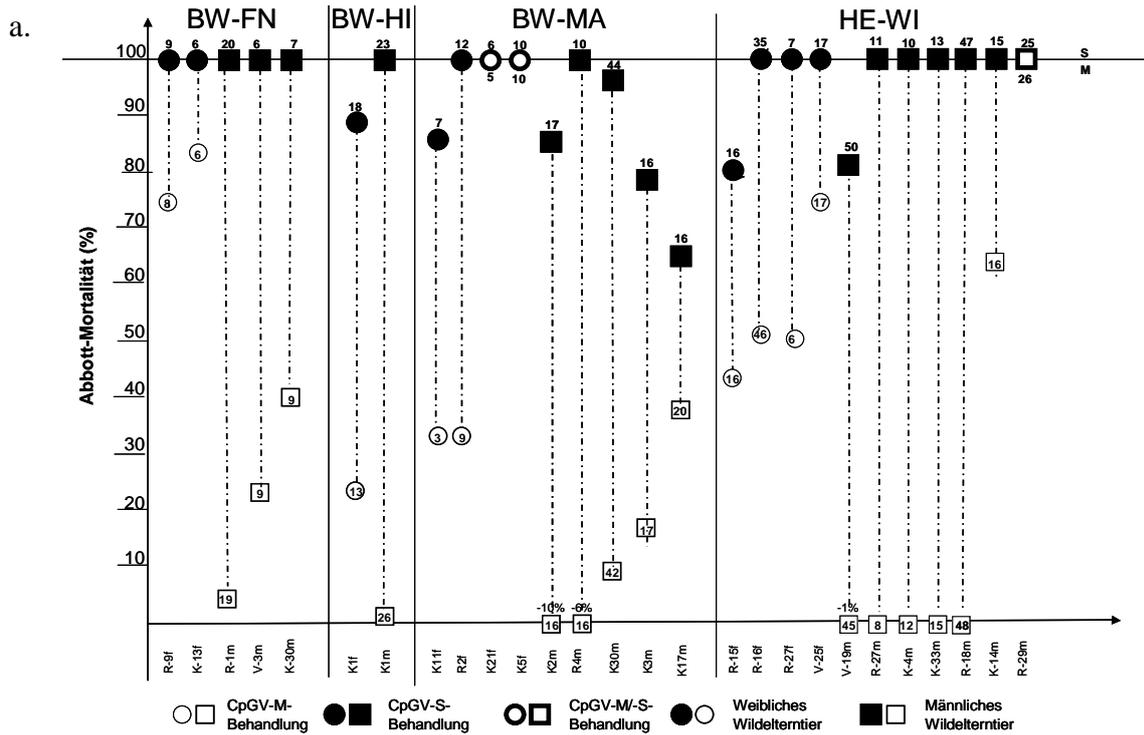
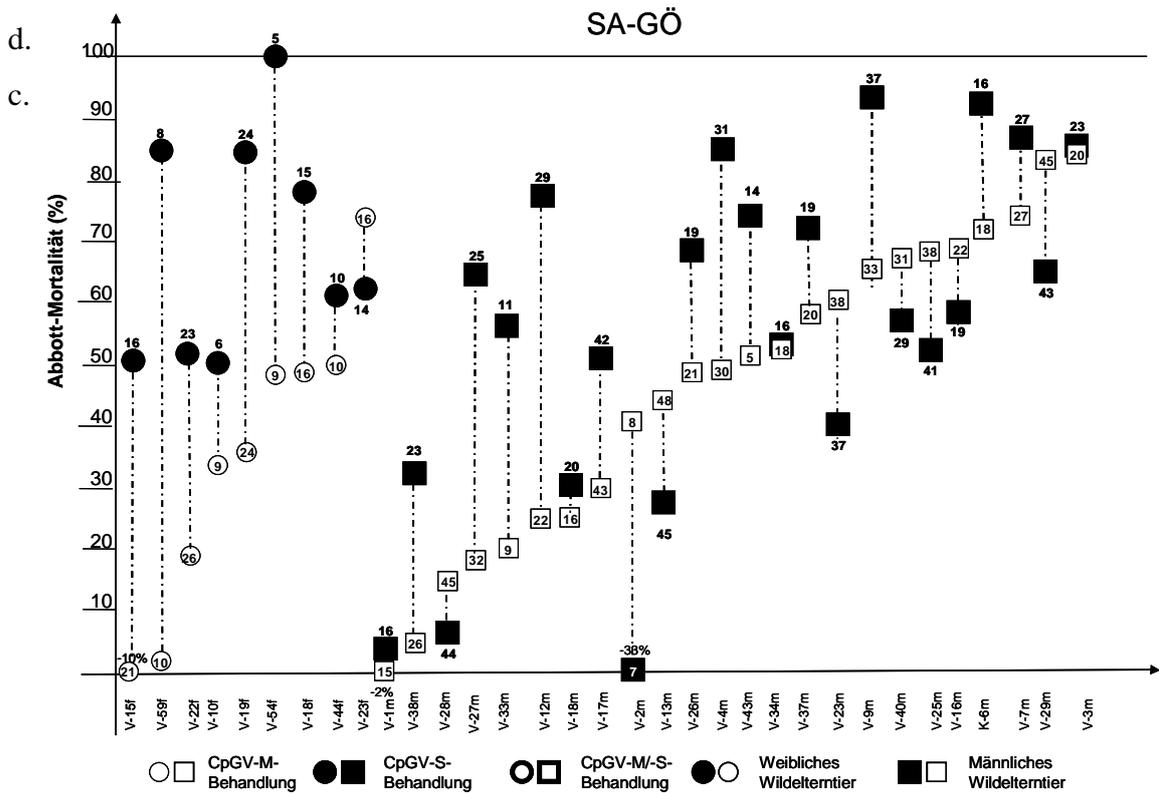
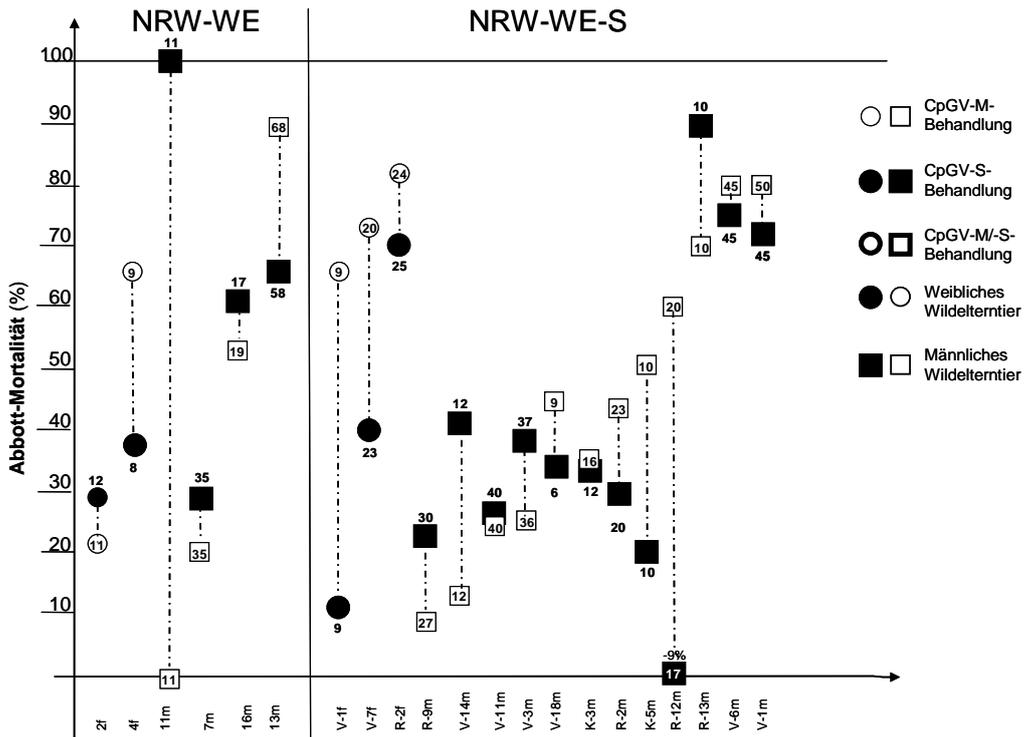


Abb. 5.2 a-d: Ergebnisse der untersuchten Hybridfamilien aus acht unterschiedlichen Populationen Deutschland. Wildtiere der Elterngeneration wurden mit CpS-Labortieren gekreuzt, sodass eine Hybridfamilie (F1-Generation) entstand. Die L1 Larven der F1 Generation wurden auf Kontroll-, CpGV-M- und CpGV-S-Medium mit je  $5,8 \times 10^4$  OB/ml im 14 Tage Bioassay getestet, Ergebnisse anschließend Abbott-korrigiert gegen die unbehandelte Kontrolle. Kreise und Quadrate bedeuten (Fortsetzung nächste Seite)



Fortsetzung Legende Abb. 5.2.: CpGV-M-Behandlung, schwarz-gefüllte Kreise und Quadrate bedeuten CpGV-S-Behandlung, dicke schwarze Kreise oder Quadrate stehen für gleiche Ergebnisse sowohl mit CpGV-M als auch mit CpGV-S, Kreise stehen für wildes Muttertier, Quadrate für wildes Vattertier, Zahlen in, über oder unter den Kreisen und Quadraten stehen für die Anzahl gesteteter Tiere der F1-Generation. Namen der gesteteten Familien stehen auf der X-Achse.

### 5.3.2. Ergebnis des Resistenzschnelltests

Der Resistenzschnelltest mit einer Wildpopulation aus den Niederlanden zeigte eindeutige Resistenz gegen alle getesteten Isolate (CpGV-M, CpGV-I12 und CpGV-S). Es wurden zwischen 14 und 21 Tiere der Larvenstadien L1-L4 auf den unterschiedlichen Futtermedien getestet. Die Mortalitäten mit den untersuchten Virusisolaten lagen zwischen 23% und 38% (Abb. 5.3). Die Äpfel stammen aus einer Anlage in Maarssen, Niederlande, die zuvor noch nie mit CpGV-Produkten behandelt wurde. Hier wurde immer mit herkömmlichen chemischen Insektiziden behandelt. Interessanterweise zeigte das CpGV-M in den Untersuchungen die beste Wirkung gegen die getesteten Larven, am schlechtesten wirkte das Virusisolat CpGV-I12.

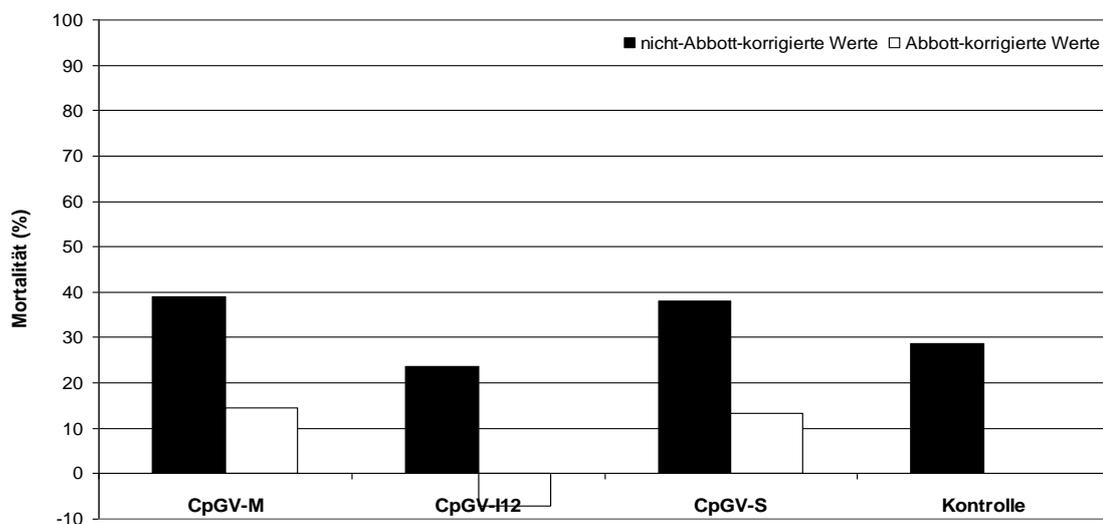


Abb. 5.3. Ergebnisse des Resistenzschnelltests mit Larven des 1.-4. Larvalstadiums auf drei CpGV-Virusisolaten und einer virusfreien Kontrolle nach 14-tägigem Bioassay. In der Kontrolle wurden 14 Tiere, gegen CpGV-M 18 Tiere, gegen CpGV-I12 17 Tiere und gegen CpGV-S 21 Larven untersucht, die den ersten Bioassay-Tag überlebt hatten. In schwarz sind die nicht-Abbott-korrigierten Werte abzulesen, in weiß wurden Abbott-korrigierte Daten angezeigt.

### 5.4. Diskussion

Die Ergebnisse aus den Bioassays mit einer diskriminierenden Konzentration von  $5,8 \times 10^4$  OB/ml deuten an, dass es sich bei den Populationen im Freiland um Mischpopulationen handelt, die sowohl empfindliche als auch homo- und heterozygot resistente Tiere enthalten.

Es konnte in allen Populationen eine Resistenz gegen CpGV-M nachgewiesen werden; es wurde aber auch festgestellt, dass das resistenzbrechende Virusisolat CpGV-S nur in einigen der untersuchten Hybridfamilien zu 100% Mortalität führen konnte. Weiterhin konnte bewiesen werden, dass alle untersuchten Populationen heterozygot im Freiland vorkommen, was sich aufgrund der Ergebnisse mit der F1-Hybridgeneration darstellen ließ. Die untersuchten F1-Tiere wiesen unterschiedliche Mortalitäten auf, die nur dann auftreten können, wenn die wilde Elterngeneration mischerbig war.

Eine Resistenz gegen CpGV-M war in den untersuchten Populationen BW-FN, BW-HI, BW-MA und HE-WI geschlechtsgebunden dominant vererbt worden, wie von Asser-Kaiser et al. (2007) beschrieben. Der Anteil resistenter bzw. sensibler Nachkommen variiert je nach Resistenzgrad. Erwartete Mortalitäten einer geschlechtsgebundenen Resistenz liegen in der F1-Hybridgeneration mit wildem Muttertier entweder bei 50% oder 100%, je nachdem, ob das wilde Muttertier resistent oder sensibel ist. In den Populationen BW-MA und HE-WI konnten diese Ergebnisse sehr anschaulich erzielt werden. Beim wilden Vätertier können in der F1-Hybridgeneration idealerweise Mortalitäten von 0%, 50% und 100% auftreten, je nach Resistenzgrad des Vätertiers bzw. Sensitivität gegenüber CpGV-M. Wurden 0% Mortalität notiert, so war das wilde Vätertier homogen CpGV-M-resistent (Populationen BW-FN, BW-HI, BW-MA und HE-WI); wurden 50% Mortalität erzielt, war das wilde Vätertier heterogen resistent gegen CpGV-M (BW-FN, BW-MA, HE-WI) und wurden 100% Mortalität erlangt, so war das wilde Vätertier homogen sensibel gegen CpGV-M (HE-WI). Oben genannte Werte setzen die Annahme einer idealen Gleichverteilung der Geschlechter in der F1-Generation voraus; die in diesen Untersuchungen festgestellten Abstufungen liegen daran, dass die untersuchten Populationen unterschiedliche Geschlechterverteilungen innerhalb der F1-Generation hervorbrachten.

Bei den Populationen NRW-WE, NRW-WE-S, NRW-WE-E und SA-GO konnte keine eindeutige geschlechtsgebundene Vererbung nachgewiesen werden. Hier starben nur wenige Nachkommen gemäß dem Vererbungsmechanismus. Es wurden auch solche F1-Hybridtiere festgestellt, die keine Mortalität als Nachkommen weiblicher Wildtiere aufzeigten, hierbei muss es sich um einen weiteren Vererbungsmechanismus handeln.

Das resistenzbrechende Virusisolat CpGV-S zeigte volle Wirkung bei allen Nachkommen wilder Eltern in der Population BW-FN. In den Populationen BW-HI, BW-MA und HE-WI wurde mindestens eine Familie festgestellt, die nicht 100% anfällig gegenüber CpGV-S getestet wurde. BW-MA war in seinen Ergebnissen sehr heterogen, hier gab es sogar eine Populationen mit nur 60% Mortalität.

Die Populationen NRW-WE, NRW-WE-E, NRW-WE-S und SA-GO zeigten ebenfalls sehr heterogene Ergebnisse bezüglich ihrer Anfälligkeit gegenüber CpGV-S, lediglich drei F1-Hybridfamilien konnten noch zu 100% abgetötet werden. In 30 Fällen wirkte sogar CpGV-M besser gegen die Nachkommenschaft als CpGV-S. Gegen die vier Populationen aus Nordrhein-Westfalen und Sachsen gibt es derzeit keine geeignete Bekämpfungsstrategie, die derzeit bekannten Isolate zeigen hier keine Wirkung. Die Population SA-GO wurde indes im Jahr 2009 brandgerodet, es gibt jedoch eine ausreichende Anzahl diapausierender Tiere im JKI Darmstadt, um weitere Forschungen mit dieser Population zu betreiben.

Insgesamt wurden Populationen identifiziert, die mit dem bekannten Resistenzmechanismus übereinstimmen, aber auch solche, die damit nicht übereinstimmen.

Die untersuchten Larven aus Äpfeln einer chemisch behandelten Anlage in den Niederlanden wurden, aufgrund von Auffälligkeit im Feld, mittels eines Schnelltests auf Resistenz untersucht. Der Schnelltest brachte hervor, dass diese getesteten Larven, obwohl sie noch nie mit CpGV-Isolaten in Kontakt getreten waren, eine Resistenz gegen alle getesteten Isolate (CpGV-M, CpGV-I12 und CpGV-S) aufweisen. Da insgesamt jedoch nur wenige Tiere im Bioassay getestet wurden, ist es dringend erforderlich diese Population im Jahr 2010 erneut zu testen, um hier vollends sicher gehen zu können. Da leider keine Wellpappstreifen für diapausierende Larven im Jahr

2009 angebracht wurden, müssen 2010 erneut Äpfel und evt. auch Diapauselarven zum Ende der Saison gesammelt werden.

### **5.5. Zusammenfassung**

Untersuchungen zur Minderempfindlichkeit wilder Apfelwicklerstämme gegenüber neuen CpGV-Isolaten wurden im Jahr 2009 anhand von Einzelpaarkreuzungen zwischen resistenten Apfelwickler-Wildpopulationen und einer sensiblen Laborvariante durchgeführt. Die daraus resultierenden Hybridgenerationen wurden einem Bioassay mit diskriminierender Konzentration zweier Virusisolate (CpGV-M und CpGV-S) unterzogen.

Es sollte untersucht werden, ob ein bereits beschriebener Resistenzvererbungsmechanismus, der in einer resistenten Laborpopulation festgestellt wurde (Asser-Kaiser et al., 2007), auch in Wildpopulationen nachgewiesen werden kann.

Klassische Kreuzungsschemata zeigten die im Idealfall geltenden Mortalitäten auf, die im Bioassay einer Hybridkreuzung eines resistenten Stamms mit einem sensiblen Stamm (CpS) auftreten sollten. In zwei Hybridpopulationen konnten Tiere nachgewiesen werden, die 100% anfällig auf CpGV-M reagierten. Das lässt darauf schließen, dass die Wildeltern homozygot sensibel waren; es handelte sich in diesen Fällen also um eine Mischpopulation aus resistenten und empfindlichen Individuen.

Es wurde festgestellt, dass alle untersuchten Wildpopulationen gegenüber dem handelsüblichen CpGV-M resistent waren. Allerdings wurden bei CpGV-S sowohl sensible als auch resistente Tiere / Populationen festgestellt, obwohl es sich hierbei um ein resistenzbrechendes Isolat handelt. Daher muß man davon ausgehen, dass der bekannte Vererbungsmechanismus bei CpGV-M auf alle untersuchten Apfelwicklerpopulationen anzuwenden ist, jedoch für CpGV-S ein bislang unbekannter weiterer Mechanismus greift.

Ein Resistenzschnelltest mit Larven, die direkt aus Äpfeln entnommen und auf Virustestmedium gebracht wurden, das eine diskriminierende Konzentration enthielt, zeigte, dass die getestete niederländische Population sowohl gegen CpGV-M als auch gegen CpGV-I12 und CpGV-S resistent ist.

Auch hier scheint ein anderer Resistenzmechanismus vorzuliegen. Dies macht weitere Untersuchungen zur Strategie und Management von Resistenzen unabdingbar.

### **5.6. Literatur**

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

Asser-Kaiser, S.; Fritsch, E.; Undorf-Spahn, K.; Kienzle, J.; Eberle, K. E.; Gund, N. A., Reineke, A.; Zebitz, C. P. W.; Heckel, D. G., Huber, J.; Jehle, J. A. (2007): Rapid emergence of baculovirus resistance in codling moth due to dominant, sex-linked inheritance. *Science* 317, 1916-1918.

### III. Übersicht aller Veröffentlichungen im Projekt

#### Zeitschriften

##### **2010:**

Asser-Kaiser, S.; Radtke, P.; El-Salamouny, S.; Winstanley, D.; Jehle, J. A. (2010): Baculovirus resistance in codling moth (*Cydia pomonella* L.) caused by early block of virus replication. *Virology* (in press).

Asser-Kaiser, S.; Heckel, D.G.; Jehle, J.A. (2010): Sex-linkage of CpGV resistance in a heterogeneous field strain of the codling moth *Cydia pomonella* (L.). *Journal of Invertebrate Pathology* 103: 59-64.

Asser-Kaiser, S. (2010). On the inheritance and mechanism of baculovirus resistance of the codling moth, *Cydia pomonella* (L.). Dissertation Universität Mainz, 129 S.

Jehle, J. A.; Eberle, K. E.; Asser-Kaiser, S.; Schulze-Bopp, S.; Schmitt, A. (2010): Resistance of codling moth against *Cydia pomonella* granulovirus (CpGV): State of knowledge. In: Ecofruit - Proceedings to the 14<sup>th</sup> International conference on cultivation Technique and Phytopathological Problems in Organic Fruit-Growing. Edited by FÖKO e.V. Weinsberg.

Jehle, J. A.; Eberle, K. E. (2010): Viren als nützliche Helfer im Pflanzenschutz. *Forschungsreport 2/2010*: 15-17.

##### **2009:**

Asser-Kaiser, S.; Jehle, J. A. (2009): Investigations on the mechanism of CpGV resistance in *Cydia pomonella*. *Insect Pathogens and Insect Parasitic Nematodes, IOBC/WPRS Bulletin* 45: 79-81.

Fukova, I.; Neven, L. G.; Barcenas, N. M.; Gund, N. A.; Dalikova, M.; Marec, F. (2009): Rapid assessment of the sex of codling moth *Cydia pomonella* (Linnaeus) (Lepidoptera: Tortricidae) eggs to larvae. *Journal of Applied Entomology* 133: 249-261.

Jehle, J. A. (2009). Das Apfelwicklergranulovirus – neue Herausforderungen für ein bewährtes biologisches Pflanzenschutzmittel. *DLR Aktuell* 2008: 59-66.

Kienzle, J.; Jehle, J. A. (2009): Strategie zum Resistenzmanagement bei der Regulierung des Apfelwicklers im Öko-Obstbau. *Öko-Obstbau* 1/2009; Hrsg. Beratungsdienst Ökologischer Obstbau, Weinsberg, 2009.

##### **2008:**

Eberle, K. E.; Asser-Kaiser, S.; Sayed, S. M.; Nguyen, H. T.; Jehle, J. A. (2008): Overcoming the resistance of codling moth against conventional *Cydia pomonella*

granulovirus (CpGV-M) by a new isolate CpGV-I12. *Journal of Invertebrate Pathology* 98: 293-298.

Jehle, J. A. (2008): Die Zukunft des Apfelwicklergranulovirus im ökologischen Apfelanbau. *Öko-Obstbau* 1/2008; Hrsg. Beratungsdienst Ökologischer Obstbau, Weinsberg, 2008.

Jehle, J. A. (2008). Apfelwicklergranulovirus – wie geht es weiter? *Obstbau* 4/2008: 194-198.

Jehle, J. A. (2008). The future of *Cydia pomonella* granulovirus in biological control of codling moth. In: *Ecofruit - Proceedings to the 13<sup>th</sup> International conference on cultivation Technique and Phytopathological Problems in Organic Fruit-Growing*. Edited by FÖKO e.V. Weinsberg, 265-270.

Kienzle, J. (2008): Einsatz von Granuloviren im Jahr 2008 - Was heißt das für die Praxis im ökologischen Obstbau? *Öko-Obstbau* 1/2008; Hrsg. Beratungsdienst Ökologischer Obstbau, Weinsberg, 2008.

#### **2007:**

Asser, S.; Gund, N. A.; Eberle, K. E.; Matt-Schmid, A.; Reineke, A.; Heckel, D. G.; Zebitz, C. P. W.; Jehle, J. A. (2007): Untersuchungen zur Populationsgenetik der Minderempfindlichkeit des Apfelwicklers gegenüber *Cydia pomonella* Granulovirus (CpGV) [Analyses of the Population Genetics of the Low Susceptibility of codling moth against *Cydia pomonella* granulovirus (CpGV) ], *Organic Eprints*.

Asser-Kaiser, S.; Fritsch, E.; Undorf-Spahn, K.; Kienzle, J.; Eberle, K. E.; Gund, N. A.; Reineke, A.; Zebitz, C. P.W.; Heckel, D. G.; Huber, J.; Jehle, J. A. (2007): Rapid emergence of baculovirus resistance of codling moth due to sex-linkage and concentration-dependent dominance. *Science* 317: 1916-1918.

Fritsch, E.; Undorf-Spahn, K.; Kienzle, J.; Zebitz, C. P. W.; Huber, J. (2007): Apfelwickler-Granulovirus: Unterschiede in der Empfindlichkeit lokaler Apfelwickler-Populationen. In: S. Zikeli, W. Claupein, S. Dabbert, B. Kaufmann, T. Müller und A. Valle Zárate (Eds.): *Zwischen Tradition und Globalisierung – 9. Wissenschaftstagung Ökologischer Landbau, Universität Hohenheim (Deutschland), 20.-23.03.2007*, 321-324 (<http://orgprints.org/10742>).

Fritsch, E.; Undorf-Spahn, K.; Kienzle, J.; Zebitz, C. P. W.; Huber, J. (2007): Codling moth granulovirus: first indications for variations in the susceptibility of local codling moth populations. *Insect Pathogens and Insect Parasitic Nematodes, IOBC/WPRS Bulletin* 30 (1): 181-186.

Kienzle, J.; Jehle, J. A. (2007): Mischbarkeit verschiedener Präparate mit Granuloviren. *Öko-Obstbau* 1/2007; Hrsg. Beratungsdienst Ökologischer Obstbau, Weinsberg, 2007.

Kienzle, J.; Jehle, J. A. (2007): Empfehlungen zur Apfelwicklerstrategie 2007 für Betriebe, die keine offensichtlichen Probleme haben. Öko-Obstbau 1/2007; Hrsg. Beratungsdienst Ökologischer Obstbau, Weinsberg, 2007.

#### **2006:**

Fritsch, E.; Undorf-Spahn, K.; Kienzle, J.; Zebitz, C. P. W.; Huber, J. (2006): Codling moth granulovirus: Variations in the susceptibility of local codling moth populations. In: Proceedings to the 12<sup>th</sup> International Conference on Cultivation Technique and Phytopathological Problems in Organic Fruit-Growing, Weinsberg (Germany), 31<sup>st</sup> January to 2<sup>nd</sup> February 2006, M. Boos (Ed.), Fördergemeinschaft Ökologischer Obstbau e.V. (FÖKO), Weinsberg, 7-13.

Jehle, J. A., Sayed, S. M., Wahl-Ermel, B. (2006). What do we (need to) know about low-susceptibility of codling moth against *Cydia pomonella* granulovirus (CpGV)! In: Ecofruit - Proceedings to the 12<sup>th</sup> International conference on cultivation Technique and Phytopathological Problems in Organic Fruit-Growing. Edited by FÖKO e.V. Weinsberg, 14-18.

#### **Vorträge:**

#### **2010:**

Kienzle, J.: Langfristige tragfähige Strategie zur Regulierung des Apfelwicklers im Ökologischen Obstbau. Ökologische Obstbautagung, 29.01.2010 in Ahrweiler.

Jehle, J. A.; Eberle, K. E.; Asser-Kaiser, S.; Schulze-Bopp, S.; Schmitt, A.: Resistance of codling moth against *Cydia pomonella* granulovirus (CpGV): State of knowledge. Ecofruit-Tagung, 24.02.2010, in Hoheneheim

Jehle, J. A.: Insect viruses: Their ecology, evolution and economic application. Kolloquium der TU Darmstadt, 17.06.2010 in Darmstadt.

#### **2009:**

Asser-Kaiser, S.; Jehle, J. A.: Investigations on the mechanism of CpGV resistance in *Cydia pomonella*. Tagung der Deutschen Gesellschaft für allgemeine und angewandte Entomologie e. V., 16.-19.03.2009, Georg-August-Universität Göttingen.

Asser-Kaiser, S.; Jehle, J. A.: Investigations on the mechanism of CpGV resistance in *Cydia pomonella*. 12<sup>th</sup> European Meeting of the IOBC/WPRS Working Group. 22.-25.06.2009, Universidad Pública de Navarra, Pamplona.

Gund, N. A.; Reineke, A.: Einsatz genetischer Methoden zur Identifizierung potentiell beteiligter Gene in CpGV-resistenten Apfelwicklern (*Cydia pomonella*); 28. Tagung des

Arbeitskreises „Nutzarthropoden und entomopathogene Nematoden“, Ellerhoop, Germany, 24.-25.11.2009.

Jehle, J. A.; Kienzle, J.: Zur Apfelwicklerstrategie. Ökologische Obstbautagung, 06.02.2009 in Weinsberg.

Jehle, J. A.: Baculoviruses in biological control, 2nd Entomopathogens and Microbial Control Symposium, Mugla, Türkei, 24.-27.09.09 (Keynote Speaker, Eingeladen).

Jehle, J. A.: Resistance to baculoviruses - new answers on an old question. 12<sup>th</sup> European Meeting of the IOBC/WPRS Working Group "Insect Pathogens and Insect Parasitic Nematodes", Pamplona/Spanien, 22.-26.06.09.

Jehle, J. A.: Neue Ergebnisse zur CpGV-Resistenzforschung. Ökologische Obstbautagung, Weinsberg, 06.02.09.

Jehle, J. A.: Baculovirus resistance in codling moth – what Gregor Mendel did not tell on inheritance. University of Navarra, Pamplona/Spanien, 22.01.09 (Eingeladen).

#### **2008:**

Jehle, J. A.; Kienzle, J.: Mittel- und langfristige Strategie zur Regulierung des Apfelwicklers. Ökologische Obstbautagung, 02.02.2008 in Jork.

Jehle, J. A.: Analysis of the mechanism and the inheritance of CpGV resistance. International Symposium on Codling Moth Control, DLR Rheinpfalz, Neustadt/Wstr., 19.11.2008.

Jehle, J. A.: Wirkungsstudien mit neuen CpGV-Isolaten, Bundesarbeitstagung für Pflanzenschutzberater im Obstbau, Grünberg, 22.10.2008

Jehle, J. A.: Field resistance against baculoviruses - new challenge for biological control. Department of Virology, University Wageningen/Niederlande, 01.10.2008 (Eingeladen).

Jehle, J. A.: CpGV resistance of codling moth: new isolates with improved efficacy. International Congress of Entomology, Durban/Süd-Afrika, 11.07.08 (Eingeladen).

Jehle, J. A.: The future of *Cydia pomonella* Granulovirus in biological control of codling moth. Ecofruit, Weinsberg, 20.02.2008.

#### **2007:**

Asser, S.; Eberle, K. E.; Nguyen Thu, H.; Sayed, S. M.; El-Salamouny, S.; Jehle, J. A.: Untersuchungen zum Mechanismus der Minderempfindlichkeit des Apfelwicklers gegenüber dem *Cydia pomonella* Granulovirus (CpGV). Tagung der Deutschen

Gesellschaft für allgemeine und angewandte Entomologie e. V. 26.02.-01.03.2007, Innsbruck

Asser, S.; K. E. Eberle; J. A. Jehle: Inheritance of field resistance of codling moth against *Cydia pomonella* granulovirus (CpGV). 40<sup>th</sup> Annual Meeting of the Society for Invertebrate Pathology, 12.-16.08.2007, Québec City, Canada

Jehle, J. A.; J. Kienzle: Zur Regulierung des Apfelwicklers. Ökologische Obstbautagung, 23./24.2.2007 in Weinsberg.

Jehle, J. A.: Codling Moth Granulovirus: Its Biology and Application, Resistance Phenomenons and New Isolates. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Buenos Aires/Argentinien, 19.11.07 (Eingeladen).

Jehle, J. A.: Das Apfelwicklergranulovirus: Wirkungsweise, Resistenzphänomene und neue Isolate. Bioobstbautagung auf der Biolife07, Bozen/Italien, 03.11.07 (Eingeladen).

Jehle, J. A.: Vererbung der CpGV-Resistenz - Konsequenzen für die Praxis, Bundesarbeitstagung für Pflanzenschutzberater im Obstbau, Grünberg, 18.10.07.

Jehle, J. A.: Vererbung der CpGV-Resistenz, Biologische Bundesanstalt Darmstadt, 11.10.07.

Jehle, J. A.: Field resistance to *Cydia pomonella* granulovirus - a new challenge for the biological control of codling moth. 40<sup>th</sup> Annual Meeting of the Society of Invertebrate Pathology, Quebec/Canada, 15.08.07 (Eingeladen).

Jehle, J. A.: Field resistance to *Cydia pomonella* granulovirus – a new challenge for research and application of baculovirus insecticides. Plenary lecture auf dem 11<sup>th</sup> European Meeting der IOBC/WPRS Working Group “Insect Pathogens and Insect Parasitic Nematode, Alés/Frankreich, 06.06.07 (Eingeladen).

Jehle, J. A.: Apfelwickler: Erste Ansätze zur Entwicklung langfristiger Strategien - Kenntnisstand zum Resistenzphänomen des Apfelwicklers gegenüber dem Apfelwickler-Granulovirus (CpGV). Ökologische Obstbautagung der FÖKO e.V., Weinsberg, 02.02.07 (Eingeladen).

Jehle, J. A.: Neue Erkenntnisse zur Resistenz des Apfelwicklers gegenüber CpGV. Arbeitsnetz zur Weiterentwicklung der Anbaukonzepte des Ökologischen Obstbaus der FÖKO e.V., Universität Hohenheim, 01.02.07.

## **2006**

Jehle, J. A.: Codling moth granulovirus – its biology, application and efficacy. 2nd Fruit moth Workshop of PPO, Applied Plant Research, Zetten/Niederlande, 06.12.06 (Eingeladen).

Jehle, J. A.: Untersuchungen zum Phänomen der Minderempfindlichkeit des Apfelwicklers gegenüber CpGV-Produkten. 25. DPG-Arbeitskreistagung Nutzarthropoden und Entomopathogene Nematoden, Kleinmachnow, 14.11.06.

Jehle, J. A.: Stand der Arbeiten und Forschungsprojekte zur CpGV-Resistenz. Bundesarbeitstagung für Pflanzenschutzberater, Grünberg, 25.10.06.

Jehle, J. A.: Untersuchungen zum Resistenzmechanismus einer minderempfindlichen Apfelwicklerpopulation gegenüber dem *Cydia pomonella* Granulovirus (CpGV). 55. Deutsche Pflanzenschutztagung, Göttingen, 25.-28.09.2006.

Jehle, J. A.: Field resistance of codling moth to *Cydia pomonella* granulovirus: Occurrence, genetics and breaking. 39<sup>th</sup> Annual Meeting of the Society of Invertebrate Pathology, Wuhan/China, 30.08.2006

Jehle, J. A.: What do we need to know about low susceptibility of codling moth against *Cydia pomonella* Granulovirus (CpGV). Ecofruit-Tagung in Weinsberg, 01.02.2006.

### **Poster:**

#### **2010:**

Gund, N. A.; Reineke, A. (2010): Application of molecular methods to identify genes involved in CpGV-resistance of the codling moth, *Cydia pomonella*; 14<sup>th</sup> International Conference on Organic Fruit-Growing, Stuttgart-Hohenheim, Germany, 22.-24.02.2010.

Schulze-Bopp, S.; Fritsch, E.; Undorf-Spahn, K.; Huber, J.; Kienzle, J.; Jehle, J. A. (2010): Comparison of methods for monitoring the resistance of codling moth populations to *Cydia pomonella* granulovirus. 57. Deutsche Pflanzenschutztagung, 6. - 9. September 2008, Berlin. Mitt. JKI Bd. 428, 435-436.

#### **2009:**

Gund, N. A.; Asser-Kaiser, S.; Jehle, J. A.; Heckel, D. G.; Zebitz, C. P. W.; Reineke, A. (2009): Genetic mapping of CpGV resistance loci in the codling moth *Cydia pomonella*; Entomologentagung der DGaaE 2009, Göttingen, Germany, 16.-19.3.2009.

Undorf-Spahn, K.; Fritsch, E.; Huber, J. (2009): Development of CpGV-M resistance of codling moth over time. 12<sup>th</sup> European Meeting of the IOBC/WPRS Working Group. 22.-25.06.2009, Universidad Pública de Navarra, Pamplona.

#### **2008:**

Asser-Kaiser, S.; Jehle, J. A. (2008): Untersuchungen zum Mechanismus der Resistenz des Apfelwicklers gegenüber dem *Cydia pomonella* Granulovirus. 56. Deutsche Pflanzenschutztagung, 22.-25-09.2008, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel.

Asser-Kaiser, S.; Jehle, J. A. (2008): Untersuchungen zum Mechanismus der Resistenz des Apfelwicklers gegenüber dem *Cydia pomonella* Granulovirus. International Symposium on Codling Moth Control, 19.-20.11.2008, DLR Rheinpfalz, Neustadt an der Weinstraße.

Asser-Kaiser, S.; Keane, G. L.; Winstanley, D.; Jehle, J. A. (2008): Investigations on the mechanism of CpGV resistance in *Cydia pomonella*. 41<sup>st</sup> Annual Meeting of the Society for Invertebrate Pathology, 03.-07.08.2008, University of Warwick, United Kingdom. (**1. Posterpreis**)

Fritsch, E.; Undorf-Spahn, K.; Huber, J. (2008): Stabilität der Resistenz des Apfelwicklers gegenüber dem CpGV mit und ohne Virusdruck. 56. Deutsche Pflanzenschutztagung, 22.-25. September 2008, Kiel. Mitt. JKI Bd. 417, 427-428.

Fritsch, E.; Undorf-Spahn, K.; Huber, J. (2008): Stabilität der Resistenz des Apfelwicklers gegenüber dem CpGV mit und ohne Virusdruck. 56. Deutsche Pflanzenschutztagung, 22.-25. September 2008, Kiel. Mitt. JKI Bd. 417, 427-428.

Gund, N. A.; Asser-Kaiser, S.; Jehle, J. A.; Heckel, D. G.; Zebitz, C. P. W.; Reineke, A. (2008): Genetic mapping of CpGV resistance loci in the codling moth *Cydia pomonella*; International Symposium on Codling Moth Control, DLR Rheinpfalz, Germany, 19.-20.11.2008.

Gund, N. A.; Asser-Kaiser, S.; Jehle, J. A.; Heckel, D. G.; Zebitz, C. P. W.; Reineke, A. (2008): Genetic mapping of CpGV resistance loci in the codling moth *Cydia pomonella*; 56. Deutsche Pflanzenschutztagung, Kiel, Germany, 22.-25.9.2008. (**Poster-Preis**)

Gund, N. A.; Asser-Kaiser, S.; Jehle, J. A.; Heckel, D. G.; Zebitz, C. P. W.; Reineke, A. (2008): Genetic mapping of CpGV resistance loci in the codling moth *Cydia pomonella*; 23<sup>rd</sup> ICE Meeting, International Congress of Entomology / Durban, South Africa, 06.-12.07.2008.

Keane, G. J.; Asser-Kaiser, S.; Berling, M.; Lopez-Ferber, M.; Jehle, J. A.; Winstanley, D. (2008): Comparison of immune responses in *Cydia pomonella* granulovirus resistant and susceptible strains of *Cydia pomonella*. 41<sup>st</sup> Annual Meeting of the Society for Invertebrate Pathology, 03.-07.08.2008, University of Warwick, United Kingdom.

Undorf-Spahn, K.; Fritsch, E.; Huber, J. (2008): Stability of resistance of codling moth against CpGV with and without virus pressure. Proceedings 41<sup>st</sup> Annual Meeting of the Society for Invertebrate Pathology and 9<sup>th</sup> Conference on *Bacillus thuringiensis* Incorporating COST862 Action: Bacterial Toxins for Insect Control, 3-7 August 2008, Warwick (UK), 105.

## **2007:**

Asser, S.; Gund, N. A.; Eberle, K. E.; Matt-Schmid, A.; Reineke, A.; Heckel, D. G.; Zebitz, C. P. W.; Jehle, J. A. (2007): Untersuchungen zur Populationsgenetik der Minderempfindlichkeit des Apfelwicklers gegenüber *Cydia pomonella* Granulovirus

(CpGV). 9. Wissenschaftstagung Ökologischer Landbau, 20.-23.03.2007, Universität Hohenheim.

Gund, N. A.; Groot, A. T.; Reineke, A.; Heckel, D. G. (2007): Finding the genetic basis of resistance to the *Cydia pomonella* Granulovirus (CpGV) in two *Cydia* moths; 23<sup>rd</sup> ISCE Meeting/International Society of Chemical Ecology, Jena, Germany, 22.-26.7.2007.

Gund, N. A.; Asser, S.; Jehle, J. A.; Reineke, A.; Heckel, D. G.; Zebitz, C. P. W. (2007): Identifizierung und Kartierung von Resistenzloci des Apfelwicklers mit CpGV-Resistenz; Entomologentagung der DGaE/Universität Innsbruck, Institut für Ökologie, Innsbruck, Austria, 26.02.-01.03.2007.

### **2006:**

Fritsch, E.; Undorf-Spahn, K.; Kienzle, J.; Zebitz, C. P. W.; Huber, J. (2006): Apfelwickler-Granulovirus: Unterschiede in der Empfindlichkeit lokaler Apfelwickler-Populationen. 55. Deutsche Pflanzenschutztagung in Göttingen, 25.-28.09.2006, Mitt. Biol. Bundesanst. Land- und Forstwirtsch. 400, 310.

Gund, N. A.; Heckel, D. G.; Reineke, A.; Zebitz, C. P. W. (2006): Population genetics for characterisation of non-susceptible *Cydia pomonella* strains against *Cydia pomonella* granulovirus (CpGV); SAB Meeting/ MPI for Chemical Ecology, Jena, Germany, September 2006.

Gund, N. A.; Heckel, D. G.; Reineke, A.; Zebitz, C. P. W. (2006): Population genetics for characterisation of non-susceptible *Cydia pomonella* strains against *Cydia pomonella* granulovirus (CpGV); The Seventh International Workshop on Molecular Biology and Genetics of the Lepidoptera / Orthodox Academy of Crete, Kolympari, Kreta, Greece, 20.-26.8.2006.

Gund, N. A.; Reineke, A.; Heckel, D. G.; Zebitz, C. P. W. (2006): Population genetics for characterisation of non-susceptible *Cydia pomonella* strains against *Cydia pomonella* granulovirus (CpGV); ICE Symposium/MPI for Chemical Ecology, Jena, Germany, Juni 2006.

#### **IV. Beteiligte Institute und Wissenschaftler**

Dr. habil. Johannes A. Jehle  
Dr. Sabine Asser-Kaiser  
Stefanie Schulze-Bopp

Dienstleistungszentrum Ländlicher Raum Rheinpfalz, Abt. Phytomedizin  
Breitenweg 71, 67435 Neustadt an der Weinstraße

Dr. Jürg Huber  
Dr. Eva Fritsch  
Dr. Karin Undorf-Spahn

Julius Kühn-Institut, Institut für Biologischen Pflanzenschutz,  
Heinrichstr. 243, 64287 Darmstadt

Prof. Dr. Annette Reineke  
Nadine Gund

FG Phytomedizin, Forschungsanstalt Geisenheim  
Von-Lade-Straße 1, 65366 Geisenheim

Prof. Dr. David Heckel  
Max Planck Institut für Chemische Ökologie  
Hans-Knöll-Straße 8, 07745 Jena

Prof. Dr. Claus W. Zebitz  
Universität Hohenheim, Institut für Phytomedizin  
Otto-Sander-Str. 5, 70599 Stuttgart

Jutta Kienzle  
FÖKO e.V.  
Apfelblütenweg 28, 71394 Kernen