

Johannes A. Jehle

## Entwicklung und Implementierung von Baculoviren im biologischen Pflanzenschutz

Development and Implementation of Baculoviruses for Biological Control

71

### Zusammenfassung

Baculoviren sind eine Gruppe insektenpathogener Viren, welche die derzeit selektivsten biologischen Insektizide zur Bekämpfung von Schadlepidopteren sind. Ihre ausgesprochene Wirtsspezifität macht sie zum idealen Bekämpfungsmittel einzelner Schlüsselschädlinge in land- und gartenbaulichen Kulturen. In Deutschland wird hauptsächlich das Apfelwicklergranulovirus (CpGV) eingesetzt. Mit seiner Entdeckung, Erforschung und Entwicklung als Bioinsektizid wurde der Grundstein für eine erfolgreiche biologische Apfelwicklerbekämpfung gelegt.

**Stichwörter:** Apfelwickler, CpGV, Granulovirus, Nucleopolyhedrovirus

### Abstract

Baculoviruses are a group of insect-specific viruses, which represent the currently most selective agents available for the control of lepidopteran pests. Their unique host specificity makes them an ideal control agent of key pests in agriculture and horticulture. The most important baculovirus agent used in Germany is the codling moth granulovirus (CpGV). Its discovery and the subsequent research and development as a biocontrol agent were the fundament of a successful biological control of codling moth.

**Key words:** Codling moth, CpGV, granulovirus, nucleopolyhedrovirus

### Baculoviren

Virusinfektionen werden bei allen Lebensformen beobachtet: bei Menschen und Tieren, Pflanzen und Mikroorganismen, bei Eukarya, Bakteria und Archaea. Die Infektionen von Insekten mit Baculoviren gehören mit zu den ältesten, die in der Menschheitsgeschichte beobachtet worden sind (BENZ, 1986). Unter Baculoviren (Familie: Baculoviridae) versteht man eine Gruppe ausschließlich gegen Insekten wirksamer Viren mit einem zirkulären doppelsträngigen DNA-Genom von 80 – 180 Kilobasenpaaren (kbp). Sie weisen stäbchenförmige Viruspartikel (Virionen) mit einer Länge von 250 – 300 nm auf. Ein weiteres herausragendes Merkmal von Baculoviren ist die Bildung eines Einschlusskörpers (Occlusion Body, OB), in dem die einzelnen Virionen eingebettet sind (Abb. 1). Das Vorkommen der Baculoviren wurde durch molekulare Untersuchungen bei den Insektenordnungen Lepidoptera, Hymenoptera und Diptera bestätigt (JEHLE et al., 2006a).

Wegen ihres großen biotechnologischen Potenzials sind Baculoviren die am besten charakterisierten insektenpathogenen Viren. In den vergangenen Jahren und Jahrzehnten wurden sie einerseits unter dem Gesichtspunkt ihrer Verwendung als hoch wirksame biologische Insektizide untersucht. Einige von ihnen wurden zu den selektivsten Insektiziden entwickelt, die uns heute zur Verfügung stehen (HUBER, 1998). Andererseits wurde mit dem Baculovirus-Expressionsvektor-System eine leistungsfähige gentechnologische Methode etabliert, um eukaryontische Proteine in großen Mengen in kultivier-

### Institution

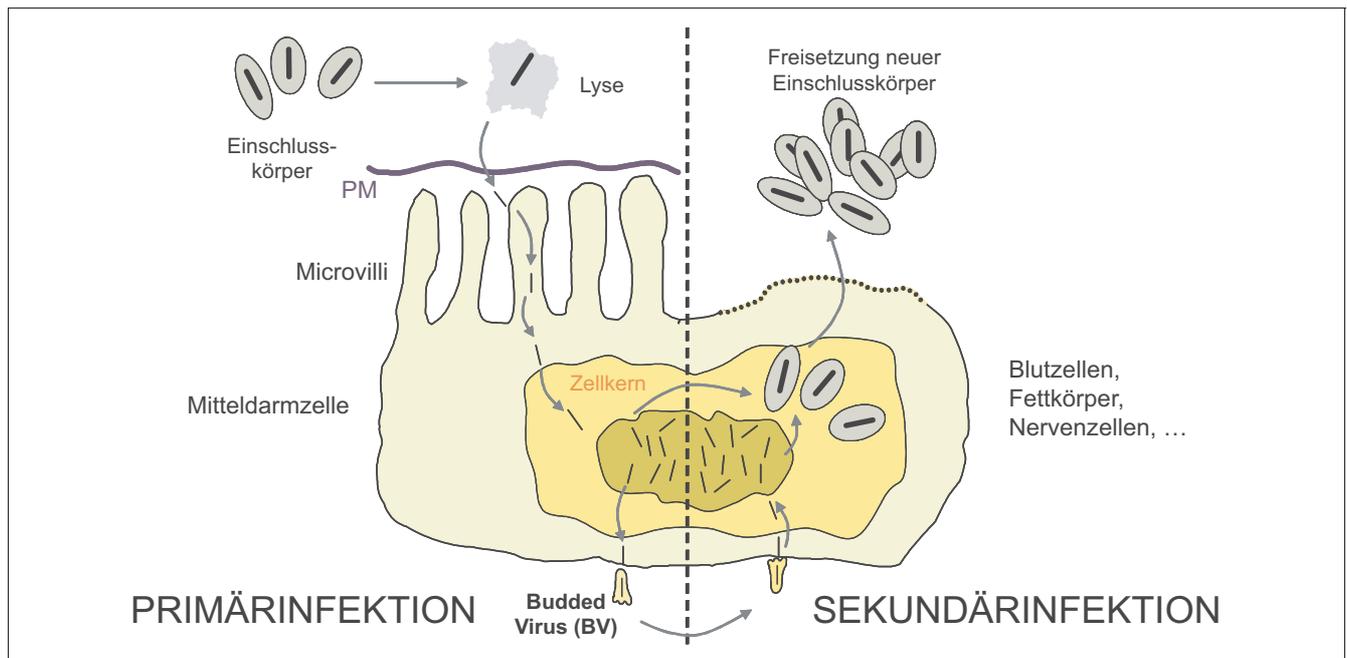
Biotechnologischer Pflanzenschutz, Abteilung Phytomedizin, Dienstleistungszentrum Ländlicher Raum (DLR) Rheinpfalz, Neustadt an der Weinstraße; seit 2010 Julius Kühn-Institut – Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen, Institut für Biologischen Pflanzenschutz, Darmstadt

### Kontaktanschrift

Dr. Johannes A. Jehle, Julius Kühn-Institut – Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen, Institut für Biologischen Pflanzenschutz, Heinrichstraße 243, 64287 Darmstadt, E-Mail: johannes.jehle@jki.bund.de

### Zur Veröffentlichung angenommen

Februar 2010



**Abb. 1.** Vermehrungszyklus des Apfelwickler-Granulovirus. Die im Einschlusskörper eingeschlossenen Viruspartikel werden mit dem Fraß aufgenommen. Die Einschlusskörper lösen sich unter den alkalischen Bedingungen (hoher pH-Wert!) des Mitteldarms auf (Lyse) und setzen die infektiösen Viruspartikel frei. Diese überwinden die peritrophe Membran (PM) und binden an die Microvilli der Mitteldarmzellen. Die Viruspartikel werden zum Zellkern transportiert, wo es zu einer ersten Vermehrung kommt (Primärfektion). Aus dieser Primärfektion gehen neue, nicht eingeschlossene Viren (*budded virus*, BV) hervor, die sich mit der Zellmembran der infizierten Wirtszelle umgeben. Dadurch sind sie für die Immunabwehr des Wirtes nicht erkennbar. Die nicht eingeschlossenen Viren (BV) verursachen Sekundärfektionen in anderen Zelltypen, z.B. Blutzellen, Fettkörperzellen, usw. Erst gegen Ende des Vermehrungszyklus werden wieder eingeschlossene Viren gebildet. Die infizierte Larve stirbt. Die Larvenkadaver zerfließen häufig und setzen neue Viren frei.

ten Insektenzellen zu exprimieren (SMITH et al., 1983). In jüngster Zeit schließlich haben diese Viren ein Interesse bei der somatischen Gentherapie beim Menschen gefunden (KOST und CONDREAY, 2002).

Erste Versuche, die Nonne (*Lymantria monocha*) durch Aussetzen virusinfizierter Nonnenlarven zu bekämpfen, wurden bereits Ende des 19. Jahrhunderts unternommen. Seit Anfang der 1960er Jahre, als man die negativen Auswirkungen vieler chemischer Insektizide auf den Naturhaushalt zunehmend erkannte, nahm die Forschung und Entwicklung biologischer Insektizide, die auf Baculoviren basierten, einen rasanten Aufstieg. In diese Zeit fiel auch die Entdeckung des Apfelwicklergranulovirus (*Cydia pomonella granulovirus*, CpGV), das 1963 im Valle de Allende (Mexiko) von Leo CALTAGIRONE gefunden wurde (TANADA, 1964). Seitdem wurde das CpGV unter maßgeblicher Beteiligung von Dr. Jürg HUBER und Dr. Erich DICKLER am Institut für Biologischen Pflanzenschutz (Darmstadt) bzw. Institut für Pflanzenschutz im Obstbau (Dossenheim) der damaligen Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft (BBA) zu einem der bedeutendsten biologischen Bekämpfungsmittel des Apfelwicklers entwickelt. Absolute Selektivität und Nützlingsschonung bei sehr guter Wirksamkeit sind sein wesentlichster Vorzug. Aber auch seine Handhabung ist einfach, denn es besitzt eine sehr gute Lagerfähigkeit und kann mit praxisüblichen Applikationsgeräten ausgebracht werden. In Deutschland sind heute mehrere Produkte auf dem Markt, weitere befinden sich zurzeit in

der Zulassung und kommen aller Voraussicht sehr bald auf den Markt. Weltweit werden derzeit ca. 500 000-Ha-Dosen produziert; damit haben CpGV-Präparate längst ihr Nischendasein im Bioanbau verlassen und werden im ökologischen und integrierten Apfelanbau gleichermaßen eingesetzt – bei weiterhin steigender Tendenz.

Neben dem CpGV sind in der Europäischen Union weitere Viruspräparate zur Bekämpfung der Gemüseeule (*Spodoptera exigua*) und des Apfelschalwicklers (*Adoxophyes orana*) zugelassen (Annex I der Directive 91/414/EEC). Die Zulassung von Baculoviren ist generell durch umfangreiche Forschungsarbeiten hinsichtlich ihrer Wirkung, ihres Umweltverhaltens, ihres engen Wirtsbereiches und ihrer Unbedenklichkeit gegenüber Nichtziel-Organismen, die im OECD-Konsensusdokument (ENV/JM/MONO (2002)1) (OECD, 2002) zusammengefasst sind, erleichtert worden. Außerdem sind Baculoviren zurzeit die einzigen Mikroorganismen, die wegen ihrer extremen Selektivität, des Fehlens von Stoffwechselprodukten und aufgrund ihrer allgemeinen Sicherheit nicht auf Stamm-, sondern auf Artebene zugelassen werden können (SANCO/0253/2008 rev. 2). Damit wurde ein Vorschlag von REBECA (2007) zur Vereinfachung der Zulassung mikrobiologischer Pflanzenschutzmittel rasch umgesetzt.

Einen besonders starken Impuls hat die Entwicklung biologischer Insektizide auf der Basis von Baculoviren durch eine verstärkte molekularbiologische Forschung erhalten. Molekulare Methoden erlauben heute nicht nur

eine eindeutige Identifizierung verschiedener Isolate, was für die Zulassung der Baculoviren von erheblicher Bedeutung ist. Identifizierungsmethoden der Wahl sind SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese, die Genomsequenzierung und die DNA-Restriktionsanalyse. Bei letzterer wird die virale DNA mit spezifischen Endonukleasen in definierte Abschnitte geschnitten, die anschließend mittels Gelelektrophorese entsprechend ihrer Größe aufgetrennt werden. Genetische Unterschiede lassen sich dadurch relativ einfach visualisieren. Fortschritte in Genomsequenzieretechniken führten auch dazu, dass bislang die Genome von mehr als 50 Baculoviren komplett sequenziert wurden (GenBank, Stand 2009). Dies erleichterte Genomvergleiche und ermöglichte in vielen Fällen, einen direkten Bezug zwischen biologischen Funktionen und der jeweiligen genetischen Ausstattung der Viren herzustellen.

Eine weitere Motivation für intensive Forschungs- und Entwicklungsarbeiten bei Baculoviren war die relativ einfache Möglichkeit, diese Viren gentechnisch zu verändern und damit einige vermeintlich nachteilige Eigenschaften, wie z.B. langsame Wirkgeschwindigkeit, zu modifizieren. Eine signifikante Beschleunigung um bis zu 60% konnte insbesondere durch die Expression insektenwirksamer Toxingene in verschiedenen gentechnisch veränderten Baculoviren erzielt werden (INCEOGLU et al., 2006). Freilandversuche mit gentechnisch veränderten Baculoviren wurden in UK, den USA und China durchgeführt. Allerdings war der Erfolg dieser Versuche nicht durchschlagend, was unter anderem auch daran lag, dass die korrekte Terminierung der Virusapplikation eine viel größere Rolle spielt als die Wirkgeschwindigkeit. Daher lassen sich Wirkungsgrade auch bei natürlich vorkommenden Viren durch eine verbesserte Applikationsstrategie erhöhen. In Konkurrenz zu transgenen Pflanzen, z.B. Bt-Mais und Bt-Soja, haben gentechnisch veränderte Baculoviren zudem ihr Marktpotenzial weitgehend eingebüßt. Natürliche, nicht gentechnisch veränderte Baculoviren werden hingegen auch in Zukunft ein wichtiger Baustein im Pflanzenschutzrepertoire sein.

Eine neue Herausforderung für die Baculovirenforschung brachte die Entdeckung von Apfelwicklerpopulationen mit einer ausgeprägten Resistenz gegen kommerzielle CpGV-Präparate. Erste CpGV-resistente Apfelwickler wurden 2005 vom Institut für Biologischen Pflanzenschutz der damaligen BBA gefunden (FRITSCH et al., 2005), und kurze Zeit später konnte eine Resistenz auch in Frankreich nachgewiesen werden (SAUPHANOR et al., 2006). In den vergangenen vier Jahren konnten minderempfindliche Apfelwickler in etwa 35 bis 40 Anlagen in Deutschland, Frankreich, Schweiz, Italien und den Niederlanden identifiziert werden. Bei all diesen Befunden handelte es sich um Verdachtsanlagen, da dort unzureichende Bekämpfungserfolge mit CpGV beobachtet wurden. Offensichtlich ist die Virusresistenz zwar geographisch weit verbreitet, doch sind nur einzelne Anlagen bzw. Teilanlagen – die allermeisten sind Biobetriebe – davon betroffen. Zwar konnte bisher kein direkter Zusammenhang zwischen der Applikationsstrategie und

dem Auftreten der Resistenz beobachtet werden, doch ist davon auszugehen, dass in Betrieben, die seit langem und ausschließlich CpGV zur Apfelwicklerbekämpfung verwenden, eine deutlich stärkere Selektion vorherrscht als in Betrieben mit einer stärker diversifizierten Bekämpfungsstrategie.

Mittlerweile ist es gelungen, den Vererbungsmodus der Resistenz aufzuklären und das Resistenzgen auf dem Geschlechtschromosom Z des Apfelwicklers zu lokalisieren (ASSER-KAISER et al., 2007). Zudem wurden in den vergangenen vier Jahren große Fortschritte bei der Identifizierung und Selektion neuer CpGV-Isolate gemacht, welche die CpGV-Resistenz weitgehend brechen und resistente Populationen mit gutem Erfolg bekämpfen können. Seit 2006 werden neue CpGV-Isolate im Freiland getestet bzw. mit Genehmigung nach § 11(2) PflSchG in betroffenen Betrieben eingesetzt. Darunter befinden sich neue Isolate, wie z. B. CpGV-I12 (JEHL et al., 2006b; EBERLE et al., 2008) oder CpGV-R1 (BERLING et al., 2009), oder Selektionen aus dem bisher kommerzialisierten mexikanischen Isolat CpGV-M (ZINGG, 2008). Ein Vergleich zwischen den Genomsequenzen resistanzanfälliger und resistenzbrechender CpGV-Isolate zeigte eine mehr als 99%-ige genetische Übereinstimmung. Die Identifizierung des molekularen Mechanismus, der die Resistenzbrechung bewirkt, kann auch zum genetischen Faktor der Resistenz beim Apfelwickler führen. Das Ziel weiterer Arbeiten zur CpGV-Resistenz muss daher die Entschlüsselung dieser Mechanismen sein, um so die Voraussetzung für ein effizientes molekulares Resistenzmonitoring zu schaffen. Mehrere der neuen CpGV-Isolate befinden sich derzeit in der Zulassung, und es kann erwartet werden, dass neue Isolate nicht nur in der Schweiz (seit 2008), sondern auch in EU-Ländern zugelassen werden.

Intensive Forschungsarbeiten im Rahmen des Bundesprogramms Ökologischer Landbau und des EU-Projektes SustainCpGV zeigten, dass es offensichtlich mehr resistenzbrechende als resistanzanfällige CpGV-Isolate gibt und dass die CpGV-Resistenz möglicherweise ein CpGV-M spezifisches Phänomen ist. Obwohl der genaue Resistenzmechanismus noch nicht ganz geklärt ist, sollte alles versucht werden, eine weitere Selektion CpGV-resistenter Apfelwickler zu vermeiden. Durch eine baldige Einführung der neuen Isolate in die Praxis können CpGV-Präparate auf eine breitere genetische Basis gestellt werden. Hierdurch sollte es möglich sein, eine weitere Selektion resistenter Individuen durch CpGV-M zu vermeiden.

Die weite Akzeptanz des CpGV und anderer Baculoviren in der Pflanzenschutzpraxis stellt eine Erfolgsgeschichte der Forschungs- und Entwicklungsarbeiten staatlicher Institute, Universitäten und Herstellerfirmen sowie der Beratungsleistung der Pflanzenschutzdienste und des biologischen Pflanzenschutzes insgesamt dar. Zwar sind Baculovirenpräparate wegen ihrer aus ökologischer Sicht gewünschten hohen Selektivität zur Bekämpfung von Schädlingkomplexen weniger gut geeignet, doch können sie überall dort, wo es um die selektive Kontrolle eines oder weniger Schlüsselschädlinge geht auch zukünftig eine herausragende Rolle spielen.

## References

- ASSER-KAISER, S., E. FRITSCH, K. UNDORF-SPAHN, J. KIENZLE, K.E. EBERLE, N.A. GUND, A. REINEKE, C.P.W. ZEBITZ, D.G. HECKEL, J. HUBER, J.A. JEHL, 2007: Rapid emergence of baculovirus resistance in codling moth due to dominant, sex-linked inheritance. *Science* **318**, 1916-1917.
- BENZ, G.A., 1986: Introduction: historical perspectives. In *The Biology of Baculoviruses*, Vol. I, Biological Properties and Molecular Biology, ed. by R.R. GRANADOS, B.A. FEDERICI. Boca Raton, CRC Press, pp. 1-35.
- BERLING, M., C. BLACHERE-LOPEZ, O. SOUBABERE, X. LERY, A. BONHOMME, B. SAUPHANOR, M. LOPEZ-FERBER, 2009: *Cydia pomonella* granulovirus genotypes overcome virus resistance in the codling moth and improve virus efficiency by selection against resistant hosts. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**, 925-930.
- EBERLE, K.E., S. ASSER-KAISER, S.M. SAYED, H.T. NGUYEN, J.A. JEHL, 2008: Overcoming the resistance of codling moth against conventional *Cydia pomonella* granulovirus (CpGV-M) by a new isolate CpGV-I12. *J. Invertebr. Pathol.* **98**, 293-298.
- FRITSCH, E., K. UNDORF-SPAHN, J. KIENZLE, C.P.W. ZEBITZ, J. HUBER, 2005: Codling moth granulovirus: First indications of variations in the susceptibility of local codling moth populations. *Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutzd.* **57**, 29-34.
- HUBER, J., 1998: Western Europe. In: *Insect Viruses and Pest Management*, ed. by F.R. HUNTER-FUJITA, P.F. ENTWISTLE, H.F. EVANS, N.E. CROOK, Wiley & Sons, pp. 201-215.
- INCEOGLU, A.B., S.G. KAMITA, B.D. HAMMOCK, 2006: Genetically modified baculoviruses: a historical overview and future outlook. *Adv. Virus Res.* **68**, 323-360.
- JEHL, J.A., G.W. BLISSARD, B.C. BONNING, J. CORY, E.A. HERNIOU, G.F. ROHRMANN, D.A. THEILMANN, S.M. THIEM, J.M. VLAK, 2006a: On the classification and nomenclature of baculoviruses: A proposal for revision. *Arch. Virol.* **151**, 1257-1266.
- JEHL, J.A., S.M. SAYED, B. WAHL-ERMEL, K.E. EBERLE, 2006b: Neues Apfelwicklergranulovirus-Isolat: Bekämpfung von resistenten Apfelwicklerpopulationen möglich? *Obstbau* **31**, 320-322.
- KOST, T.A., J.P. CONDREAY, 2002: Recombinant baculoviruses as mammalian cell gene-delivery vectors [Review]. *Trends in Biotechnology* **20**, 173-180.
- OECD, 2002: Consensus Document on Information used in the Assessment of Environmental Applications involving Baculoviruses (ENV/JM/MONO (2002)1). Series on Harmonization of Regulatory Oversight in Biotechnology, No. 20, OECD Environment, Health and Safety Publications, 90p.
- REBECA, 2007: REBECA proposal on facilitations in the regulation of plant protection products containing baculoviruses (REBECA Conference 2006, September, 18-22).
- SAUPHANOR, B., M. BERLING, J.-F. TOUBON, M. REYES, J. DELNATTE, P. ALLEMOZ, 2006: Carpacap des pommes. Cas de résistance au virus de la granulose en vergers biologique. *Phytoma - La Défense des Végétaux* **590**, 24-27.
- SMITH, G.E., M.D. SUMMERS, M.J. FRASER, 1983: Production of human beta interferon in insect cells infected with a baculovirus expression vector. *Molecular and Cellular Biology* **3**, 2156-2165.
- TANADA, Y., 1964: A granulosis virus of the codling moth, *Carpocapsa pomonella* (Linnaeus) (Olethreutidae, Lepidoptera). *J. Insect Pathol.* **6**, 378-380.
- ZINGG, D., 2008: Madex Plus and Madex I12 overcome Virus Resistance of Codling Moth. In: *Ecofruit - Proceedings to the 13th International conference on cultivation. Technique and Phytopathological Problems in Organic Fruit-Growing*, edited by FÖKO e.V. Weinsberg.