

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)

¹ S. Asser, ^{2,3} N. A. Gund, ¹ K. E. Eberle, ¹ A. Matt-Schmid, ⁴ A. Reineke, ² D. Heckel, ³ C. P.W. Zebitz, ¹ J. A. Jehle

¹ Dienstleistungszentrum Ländlicher Raum – Rheinpfalz, Abteilung Phytomedizin, Biotechnologischer Pflanzenschutz, 67435 Neustadt, Deutschland

² Max Planck Institut für chemische Ökologie, Abteilung Entomologie, 07745 Jena, Deutschland

³ Universität Hohenheim, Institut für Phytomedizin, Abteilung Entomologie, 70599 Stuttgart, Deutschland

⁴ Forschungsanstalt Geisenheim, Institut für Biologie, Abteilung Phytomedizin, 65366 Geisenheim, Deutschland

Key words: Crop protection, Fruit production and viticulture

Schlagwörter: Pflanzenschutz, Obst- und Weinbau

The Codling moth granulovirus (Cydia pomonella granulovirus, CpGV, Baculoviridae) is one of the most important bio control agents of the codling moth in apple production. Since 2003, codling moth populations have been observed in Germany and France, which show an up to thousand fold decreased susceptibility to CpGV. A spread of this phenomenon is a severe threat to the efficient control of the codling moth, particularly in organic farming. In order to prevent this development, investigations on the population genetics of codling moth populations in Germany were initiated to assess the baseline susceptibilities of selected populations. Furthermore, the genetic and biological background of resistance of the codling moth to CpGV are being elucidated by crossing susceptible and low susceptible codling moth populations. These investigations will help to develop new control strategies or to restore high susceptibility towards CpGV.

Mapping of traits involved in resistance will be performed. Involved loci will be identified with the help of amplified fragment length polymorphism (AFLP). Loci coupled with susceptibility can help to elucidate resistance mechanisms. Analysis of complementary DNA amplified fragment length polymorphism (cDNA-AFLP) will be performed to display differences in expression rate of particular genes. If there are differences between sensitive and non-sensitive strains, the genes will be isolated and sequenced. Putative sequence homologies give the direction of the functional sense of the mentioned gene and further conclusion of the mechanisms of the susceptibility of CpGV.

Einleitung und Zielsetzung:

Der Apfelwickler *Cydia pomonella* gehört zu der Familie Tortricidae (Lepidoptera) (Linnaeus). Er ist ein weltweit vorkommender Schädling an Apfel, Birne und Walnuss. In geringerem Maße werden auch Quitten, Aprikosen, Pfirsiche, Kirschen, Weißdorn, Esskastanien und Pflaumen befallen. Die Larven können ohne geeignete Kontrollmaßnahmen einen Schaden bis zu 95% verursachen. In Mitteleuropa durchläuft der

Apfelwickler ein bis zwei Generationen pro Jahr, während in wärmeren Klimaten auch eine dritte Generation möglich ist (LOHRER, 2004).

Ein sehr wirksames Bioinsektizid ist der *Cydia pomonella* Granulovirus (CpGV). Das Virus gehört zu der Familie *Baculoviridae*, Gattung Granuloviren (GV). Es ist ein doppelsträngiger DNA-Virus, das den Apfelwickler im Larvenstadium infiziert. CpGV wurde in Mexiko in infizierten Larven gefunden (TANADA, 1964). CpGV-Präparate enthalten Viruseinschlusskörper (occlusion bodies, OB) dieses mexikanischen Stammes (CpGV-M). Die Einschlusskörper erlauben den Viren, auch außerhalb des Wirtes über längere Zeit zu überdauern. Nach der oralen Aufnahme der Viren durch die Larve, werden die OB mit dem Nahrungsbrei zum Mitteldarm transportiert, wo die aktiven Virionen im dort vorherrschenden alkalischen Milieu freigesetzt werden und Epithelzellen des Mitteldarms infizieren. Vom Mitteldarm ausgehend streut die Infektion in andere Organe und Zelltypen, sodass die befallene Larve etwa 4-8 Tage nach Aufnahme des Virus stirbt (FEDERICI, 1997).

Seit 2003 sind Apfelwickler-Populationen beobachtet worden, die sich trotz intensiven Einsatzes von CpGV nicht ausreichend kontrollieren ließen. Sie weisen eine bis zu 1.000-fach reduzierte Empfindlichkeit gegenüber CpGV-M auf, was die Kontrolle durch das Virus in den betroffenen Betrieben erheblich erschwert (FRITSCH et al. 2005, SAUPHANOR et al. 2006).

Ziel des Projektes ist es, zunächst durch Massenkreuzungen Informationen über den Erbgang zu erhalten (JEHLE et al. 2006). Danach sollen Einzelpaarkreuzungen vorgenommen werden, die die Grundlage für genetische Kartierungen bilden. Damit sollen später anhand molekularer Methoden an der Minderempfindlichkeit beteiligte Genloci gefunden werden, die Auskunft über die genetischen Mechanismen der Resistenz geben könnten. Zudem sollen Genexpressionsmuster von resistenten und empfindlichen Tieren verglichen werden: Unterschiede in der Expressionsstärke bestimmter Gene können ebenfalls Aufschluss hinsichtlich möglicher Resistenzmechanismen geben.

Material und Methoden:

Die verwendeten Apfelwickler stammen aus dem Labor für Biotechnologischen Pflanzenschutz des DLR Rheinpfalz in Neustadt a.d. Wstr.. Der empfindliche Stamm (S) befindet dort sich seit neun Jahren in Zucht. Der resistente Stamm (R) wird seit Ende 2004 in Neustadt gehalten und ist mit dem von Fritsch et. al. (2005) beschriebenen Stamm „Südbaden“ identisch. Die Tiere wurden in getrennten Klimaschränken bei 26 °C, 60% relativer Luftfeuchte und einem Tag-Nacht-Rhythmus von 16:8 Std. gehalten. Für die Massenkreuzungen wurden jeweils 15-20 männliche und weibliche Puppen in mit Folie ausgekleidete 2-L Plastikgefäße gesetzt und zum Schlupf unter den oben genannten Bedingungen inkubiert. Für die Einzeltierkreuzungen wurden je eine männliche Puppe des sensiblen Stammes und eine weibliche Puppe des resistenten Stammes in etwas kleineren, ebenfalls mit Folie ausgekleideten Plastikbehältern inkubiert. Auf der Folie legten die weiblichen Tiere nach der Kopulation die Eier ab. Die Folien mit den Eiern wurden gesammelt und zum Schlupf inkubiert. Die frisch geschlüpften Larven (F1) wurden dann in einem Bioassay auf ihre Empfindlichkeit gegenüber CpGV getestet. Zur genauen Erläuterung der Methodik der Bioassays wird auf EBERLE & JEHLE (2006) verwiesen. Für die Rückkreuzung wurden dann F1-Nachkommen der Massenkreuzungen mit Tieren des S-Stammes gekreuzt und die daraus entstandenen Nachkommen ebenfalls in Bioassays auf ihre Empfindlichkeit getestet.

Anhand der Ergebnisse der F1-Generation der Einzelpaarkreuzungen werden einzelne Familien ausgewählt, mit denen dann weiblich informative (F1♀ x S♂) als auch männlich informative Rückkreuzungen (F1♂ x S♀) vorgenommen werden. Alle Tiere

der Einzelpaarkreuzungen (Großeltern, Eltern und Enkel) werden später molekularbiologisch untersucht.

Ergebnisse und Diskussion:

Um die Empfindlichkeit der beiden Ausgangspopulationen (S- und R-Stamm) zu bestimmen wurden Bioassays zur Dosis-Wirkungsbeziehung durchgeführt und Regressionsgeraden berechnet (EBERLE und JEHLE 2006). Vergleicht man die Regressionsgeraden der Dosis-Wirkungsbeziehungen der Apfelwicklerstämme S und R, so liegt die des empfindlichen Stammes (S) deutlich über der des minderempfindlichen Stammes (R). Die F1-Generation aus der Massenkreuzung S x R liegt zwischen denen der beiden Eltern-Stämme, jedoch näher am resistenten Stamm (R). Das weist darauf hin, dass die Vererbung der Minderempfindlichkeit eher dominant als rezessiv ist (STONE, 1968). Um Informationen darüber zu erhalten, wie viele Faktoren an der Minderempfindlichkeit beteiligt sind, wurde die F1-Generation mit dem empfindlichen Stamm zurückgekreuzt (F1 x S), da die Rückkreuzung nach TABASCHNIK (1991) mit dem Elternstamm durchgeführt wird, der sich am stärksten von der F1 unterscheidet. Die Regressionsgerade der Rückkreuzung nähert sich danach wieder dem sensiblen Stamm. Dies deutet auf einen polygenen und nicht-additiven Vererbungsmodus hin.

Mortalität bei diskriminierender Konzentration ($5,8 \times 10^4$ OB/ml)	
S	95%
R	38%
F1 MK	62%
RK	82%
F1 EK	66%

Tab. 1: Mortalitäten bei einer Viruskonzentration von $5,8 \times 10^4$ OB/ml des empfindlichen Stammes (S), des minderempfindlichen Stammes (R), Der F1 aus den Massenkreuzungen (F1 MK), der Rückkreuzungen (RK) und dem Durchschnitt der Mortalitäten der Einzelkreuzungen (F1 EK).

Aufgrund der geringen Nachkommenzahl der einzelnen Paare wurde die F1-Generationen der Einzeltierkreuzungen nur anhand einer diskriminierenden Konzentration von $5,8 \times 10^4$ OB/ml auf ihre Empfindlichkeit getestet. Dies entspricht der Konzentration, bei der beim S-Stamm nach sieben Tagen eine 95%ige Mortalität (LC_{95}) erreicht wird. Die Durchschnittsmortalität aller Einzelpaarkreuzungen betrug 66% und bestätigt damit das Ergebnis für die F1 der Massenkreuzungen (Tab. 1).

Mortalität*	Paar Nr.										
	5	11	18	9	15	3	20	17	10	8	13
[%]	100	100	96,9	64,9	61,7	61	60	57,5	41,1	41	38,3

* korrigiert nach Abbott (1925)

Tab. 2: Mortalitäten der F1 Generation von 11 verschiedenen Einzelpaarkreuzungen bei einer diskriminierenden Viruskonzentration von $5,8 \times 10^4$ OB/ml.

Betrachtet man die Mortalitäten der Einzeltierkreuzungen im Einzelnen, stellt man fest, dass diese sehr inhomogen sind und von 100% bis 38,3% variieren (Tab.2). Zwar ist man bisher davon ausgegangen, dass der minderempfindliche Stamm R, aufgrund

über Generationen konstant bleibender Aktivität weitgehend homogen ist (EBERLE & JEHL, 2006), so deuten die Ergebnisse der Einzelpaarkreuzungen darauf hin, dass sich doch noch empfindliche Tiere in der Population befinden könnten.

Schlussfolgerung:

Die Vererbung der Minderempfindlichkeit ist unvollständig dominant, polygen und nicht additiv. Die Mortalität der F1-Generation in den Massenkreuzungen stimmt mit der durchschnittlichen F1-Mortalität der Einzelkreuzungen überein. Die Homogenität des minderempfindlichen Stammes ist Voraussetzung für die weiteren geplanten Einzeltierkreuzungen und molekularbiologischen Untersuchungen. Um dies zu erreichen werden zunächst Einzeltierkreuzungen zwischen Individuen dieser Population (R x R) unternommen, und deren Nachkommen anhand der diskriminierenden Dosis getestet. Die resistentesten Familien werden selektiert und weiter vermehrt.

Danksagung:

Die Autoren bedanken sich für die finanzielle Förderung dieses Projekts durch die Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung (BLE) (05OE023).

Literatur:

Abbott W.S. (1925): A Method of computing effectiveness of an insecticide. J. Econ. Entomol. 18, 265-267.

Eberle K.E., Jehle J.A. (2006): Field resistance of codling moth against *Cydia pomonella* Granulovirus (CpGV) is autosomal and incompletely inherited. J. Invertebrate Pathol. 93, 201-206.

Fritsch E., Undorf-Spahn K., Kienzle J., Zebitz C.P.W., Huber J. (2005): Apfelwickler-Granulovirus: Erste Hinweise auf Unterschiede in der Empfindlichkeit lokaler Apfelwicklerpopulationen. Nachrichtenblatt des Deutschen Pflanzenschutzdienstes 57, 29-34.

Sauphanor B., Berling M., Toubon J.-F., Reyes M. Delnatte J., Allemoz P., (2006): Carpopapse des pommes. Cas de résistance au virus de la granulose en vergers biologique. Phytoma – La Défense des Végétaux 590, 24-27.

Tabaschnik B.E. (1991): Determining the mode of inheritance of pesticide resistance with backcross experiments. J. Econ. Entomol. 84, 703-712.

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

Federici B.A. (1997). Baculovirus Pathogenesis. The Baculoviruses. Edited by Louis K. Miller. Plenum Press, New York and London, S. 35-36.

Jehle J.A., Sayed S., Wahl-Ermel, B. (2006). What do we (need to) know about low-susceptibility of codling moth against *Cydia pomonella* granulovirus (CpGV)! *Ecofruit - 12th International Conference on Cultivation Technique and Phytopathological Problems in Organic Fruit-Growing: Proceedings to the Conference from 31st January to 2nd February 2006 at Weinsberg/Germany*, S. 14-18. Fördergemeinschaft Ökologischer Obstbau e.V. (FÖKO), Organic eprints: http://orgprints.org/8804/01/ecofruit_12th_2.pdf

Lohrer T. (2004). Infoblätter: Apfelwickler. Institut für Gartenbau, FH Weihenstephan, Forschungsanstalt: <http://www.fh-weihenstephan.de/fgw/wissenspool/infos/kurzinfo.php?id=8>. (Abruf 15.10.2006).