Zeitschrift: Mitteilungen der Schweizerischen Entomologischen Gesellschaft = Bulletin de la Société Entomologique Suisse = Journal of the Swiss Entomological Society

Herausgeber: Schweizerische Entomologische Gesellschaft

Band: 51 (1978)

Heft: 2-3

Artikel: Entwicklung von Methoden für die Produktion eines Granulosisvirus-Präparates zur mikrobiologischen Bekämpfung des Apfelwicklers, Laspeyresia pomonella (L.) (Lep., Tortricidae) und Schätzung der Produktionskosten

Autor: Brassel, Jakob

DOI: https://doi.org/10.5169/seals-401878

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften auf E-Periodica. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen sowie auf Social Media-Kanälen oder Webseiten ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Mehr erfahren

Conditions d'utilisation

L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. La reproduction d'images dans des publications imprimées ou en ligne ainsi que sur des canaux de médias sociaux ou des sites web n'est autorisée qu'avec l'accord préalable des détenteurs des droits. En savoir plus

Terms of use

The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. Publishing images in print and online publications, as well as on social media channels or websites, is only permitted with the prior consent of the rights holders. Find out more

Download PDF: 07.08.2025

ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, https://www.e-periodica.ch

MITTEILUNGEN DER SCHWEIZERISCHEN ENTOMOLOGISCHEN GESELLSCHAFT
BULLETIN DE LA SOCIÉTÉ ENTOMOLOGIQUE SUISSE
51, 155–211, 1978

Entwicklung von Methoden für die Produktion eines Granulosis-virus-Präparates zur mikrobiologischen Bekämpfung des Apfelwicklers, Laspeyresia pomonella (L.) (Lep., Tortricidae) und Schätzung der Produktionskosten[1]

JAKOB BRASSEL
Entomologisches Institut der ETH, ETH-Zentrum, CH-8092 Zürich

Development of techniques for the production of a granulosis virus preparation for microbial control of the codling moth, Laspeyresia pomonella L. (Lep. Tortricidae), and estimation of production costs - The granulosis virus of the codling moth has proved to be a very promising control agent against this major pest. Techniques have been developed for the production of the virus in large quantities.

The suitability of diapausing larvae for maximum virus production has been investigated. Diapausing L_4, i.e. reared under short day conditions, could be infected more easily than those obtained under long day conditions. Infection of the former was achieved using a virus dosis which was 5 times smaller. The infection of a larval population, ranging from 2-3 days old L_4 to 1.5 days old L_5, by a single dipping into a virus suspension with 10^4 virus particles/ml resulted in a high rate of infection and in maximum larval weight. After the infection it was necessary to feed again the infected larvae. The use of L_6 for the virus production could not be considered because their rate of infection was low in spite of an extremely high amount of virus applied to the larvae.

Two media for the artificial mass rearing of the codling moth larvae, one based on agar and the other on sawdust, were compared. The medium based on sawdust was preferred because it is more resistant to bacterial and fungous contamination.

The mass rearing of the larvae was performed with simple equipment able to control the desiccation of the rearing media and the sanitation in the rearing unit. The incidence of virus epizootics interrupted the production of larvae occasionally, until the rearing unit with healthy larvae was separated from the facilities for the virus production.

A good virus yield could only be obtained, when L_4 and L_5 were infected with virus. As the larvae develop within the medium, they must be separated from it at the time of infection. The larvae were driven out of the medium by heating. The emigration of the larvae can be made easy by eliminating the upper dry layer of the medium. Using a special device the larvae leaving the medium were collected and subsequently infected by dipping intu a virus suspension. The collecting device was then adjusted to an other device covered with agar medium, where the larvae could bore in and continue to grow. Four days after infection the heavily sick larvae were driven out of the medium by means of a heatable sand bath and finally collected for virus production. 40–65% of the larvae present in the medium before the first heating could be obtained as virus dead larvae. This amount corresponds to a average virus yield of 5.5×10^{12} virus particles per rearing tray. An average multiplication factor of 1.4×10^7 has been calculated. The storage of virus material proved to be best, when glycerin was added and the subsequent freezing temperature was at -20 °C.

The cost for the virus production is about as high as the price of chemical insecticides commonly used. The cost doubles when the expenses for additional materials as skim-milk powder and Etalfix (detergent) are included in the calculation.

[1] ETHZ Diss. No. 6055, ausgeführt unter der Leitung von Prof. Dr. G. Benz, mit Unterstützung durch die Schweiz. Alkoholverwaltung. Veröffentlicht mit finanzieller Unterstützung der Schweiz. Alkoholverwaltung und des Laurschen Fonds der Abteilung für Landwirtschaft der ETH Zürich.

Inhaltsverzeichnis

1 Material und Methoden ... 159

1.1 Tiermaterial ... 159

1.2 Virusmaterial ... 159

1.2.1 Das Virus ... 159

1.2.2 Herkunft des Virusmaterials ... 159

1.2.3 Herstellung von rohen Virussuspensionen ... 160

1.2.4 Reinigung der Viren im diskontinuierlichen Saccharosegradienten ... 160

1.2.5 Reinigung von Viren im kontinuierlichen Saccharosegradienten ... 160

1.2.6 Abbildung von Viren im Elektronenmikroskop ... 160

1.2.7 Bestimmung der Viruskonzentration ... 161

1.2.8 Lyophilisierung und Lagerung von Virussuspensionen ... 161

1.2.9 Lagerung von Viren bei -20 °C bzw. 2 °C ... 161

1.3 Infektion von Raupen mit Viren ... 161

1.3.1 Infektion durch perorale Mikroinjektion ... 161

1.3.2 Tauchinfektion ... 162

1.3.3 Infektion durch kontaminierte Apfelrondellen ... 162

1.3.4 Diagnose virustoter Raupen ... 162

2 Entwicklungsarbeit ... 162

2.1 Selektion eines Virusstammes mit erhöhter Resistenz gegenüber künstlicher, ultravioletter Strahlung und Sonnenlicht ... 162

2.1.1 Material und Durchführung der Versuche ... 163

Selektion durch Bestrahlung mit künstlicher UV-Quelle ... 163

Prüfung der Virusstämme im Freiland ... 165

2.1.3 Resultate ... 166

Selektionsversuche ... 166

Vergleichende Untersuchung von Selektions- und Grundstamm ... 167

Freilandprüfung der Virusstämme ... 168

2.1.4 Diskussion ... 169

Selektionsversuch ... 169

Freilandprüfung der Virusstämme ... 172

2.2 Versuche zur Optimierung der Virusausbeute mit diapauseinduzierten Raupen und künstlich erzeugten L_6 ... 172

2.2.1 Infektion von diapauseinduzierten Raupen mit Viren ... 172

2.2.2 Das Spinnverhalten bei infizierten Raupen unter Kurztagbedingungen ... 173

2.2.3 Einfluss von Infektionsdosis und Raupenalter auf die Pathogenese ... 174

2.2.4 Nahrungsentzug bei infizierten Raupen ... 177

2.2.5 Infektion von L_6 mit Viren ... 178

2.2.6 Diskussion ... 178

2.3 Aufbau einer Massenzucht im Hinblick auf die Produktion von Viren 179

2.3.1 Versuche zur Wahl eines Massenzuchtmediums 181
Versuche mit dem Medium auf Agarbasis 181
Versuche mit dem Massenzuchtmedium der Eidg. Forschungsanstalt Wädenswil 181
Grundmethodik der Massenzucht 182

2.3.2 Festlegung der Zuchtbedingungen für eine Massenzucht zur Virusgewinnung 182
Die Bedeutung der Mediumstruktur 182
Beeinflussung der Mediumstruktur durch nassere Zubereitung 183
Beeinflussung der Mediumstruktur durch Abdeckung und Wasserzufuhr während der Anzucht 183
Beeinflussung des Austrocknungsprozesses durch Paraffinierung der Mediumoberfläche ... 184
Einfluss von Luftfeuchtigkeit und Paraffinierung auf die Eientwicklung und den Puppenertrag 185
Notwendigkeit einer definierten Luftführung während der Raupenanzucht 185

2.3.3 Durchführung der Massenzucht 186

2.4 Entwicklung einer Methode für die Gewinnung von Viren in einer Apfelwickler-Massenzucht 188

2.4.1 Vorversuche 188
Trennung von Massenzuchtraupen vom Medium 188
Nachfütterung der infizierten Raupen 191
Trennung der virösen Raupen von der Nachzuchteinheit 191
Austreibezeitpunkt und optimale Infektionsdosis 195

2.4.2 Methode zur Virusgewinnung 195
Die Raupen-Abfangvorrichtung 195
Das Raupenaustreiben 197
Infektion der Raupen mit Virus und Weiterzucht 199
Gewinnung viröser Raupen und des Viruspräparates 200

2.5 Lagerung von Virusproben 201

2.5.1 Verfahren 201

2.5.2 Aktivitätsprüfung 201

2.5.3 Resultate 201

2.5.4 Diskussion 202

3 Schätzung der Produktionskosten 203

3.1 Allgemeines 203

3.2 Der Arbeitsaufwand 203

3.3 Vereinfachte Kostenrechnung 204

4 Diskussion 205

5 Zusammenfassung 207

6 Bibliographie 209

Im Obstbau, wie in vielen andern Intensivkulturen, setzt sich heute immer mehr das Konzept der integrierten Schädlingsbekämpfung durch. Bei diesem Konzept kann zwar nicht auf den Einsatz von Fungiziden und Insektiziden verzichtet werden, doch wird dabei unter möglichst weitgehender Schonung der Nützlinge und anderer natürlicher Gegenkräfte der Schädlinge gearbeitet. Da Insektizide bei der integrierten Bekämpfung sehr gezielt zum Einsatz gebracht werden, sollten sie möglichst spezifisch wirken. Es ist deshalb wünschenswert neue Mittel mit dieser Eigenschaft zu entwickeln. Zu den spezifischsten Angentien gegen bestimmte Insekten gehören *Baculovirus*-Arten, insbesondere Granulosisviren. Aus wirtschaftlichen Gründen ist die chemische Industrie aber nur bedingt bereit, solche Mittel zu produzieren.

Der Apfelwickler, *Laspeyresia pomonella* (L.), der im Apfelbau als wichtiger Primärschädling in Erscheinung tritt, vermag bei ungenügenden Kontrollmassnahmen bedeutenden wirtschaftlichen Schaden zu verursachen. Im Zusammenhang mit der Entwicklung selektiver Mittel haben Untersuchungen von FALCON *et al.* (1968) in Kalifornien, KELLER (1973) und BENZ *et al.* (1977) in der Schweiz, HUBER & DICKLER (1975, 1976) in Deutschland sowie MORRIS (unpubl.) in Australien gezeigt, dass das spezifische Granulosisvirus des Apfelwicklers ein sehr potentes Agens zur mikrobiologischen Bekämpfung dieses Obstschädlings darstellt; die Virusmenge von 2–5 granulösen L_5 genügt für die einmalige Behandlung eines Baumes. In gepflegten schweizerischen Obstanlagen mit einer relativ niedrigen Apfelwicklerpopulation, vermag die Virusmenge von 2 L_5-Kadavern je Baum und Behandlung die Schäden bereits unter der wirtschaftlichen Schadenschwelle zu halten (KELLER, 1973). Trotzdem ist der Bedarf an virösen L_5 sehr gross, wenn Bekämpfungsaktionen grösseren Ausmasses vorgenommen werden sollten, denn je ha Intensivanlage stehen 400–600 Bäume. In diesem Fall wäre die Produktion von Viren mittels einzeln gezüchteter Raupen arbeitsmässig kaum mehr tragbar. Hinsichtlich der praktischen Anwendung stellte sich somit das Problem der Massenproduktion des Granulosisvirus des Apfelwicklers.

Abgesehen von den Schwierigkeiten bei der Virusbereitstellung haben die Versuche in verschiedenen Weltregionen mit ihren unterschiedlichen klimatischen Bedingungen auch gezeigt, dass die Virus-Spritzbeläge, wegen der Sonneneinwirkung, jeweils schon nach 1 bis höchstens 3 Wochen nicht mehr genügend aktiv sind, um die Früchte hinreichend zu schützen. In dieser Beziehung stellte sich das Problem eines besseren Schutzes der Viren vor inaktivierender Strahlung bzw. der Selektion resistenterer Viren.

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit diesen Problemen. Dabei stehen vor allem solche Aspekte im Vordergrund, die, aufbauend auf den Erkenntnissen der Grundlagenforschung, zu einer in der Praxis anwendbaren Bekämpfungsmethode gegen den Apfelwickler weiterleiten. Als Ziel wurde dabei ein Viruspräparat angestrebt, das gut lagerbar, einfach applizierbar und kostenmässig wenigstens annäherungsweise mit modernen, relativ teuren, chemischen Insektiziden konkurrieren kann. Eine Hauptaufgabe bestand darin, eine Methode zu entwickeln, die es erlaubt, ausgehend von einer Massenzucht des Apfelwicklers, mit möglichst geringem Aufwand das Granulosisvirus in grossen Mengen zu gewinnen. Ferner musste ein Verfahren zur Aufarbeitung der virösen Raupenkadaver zu einem Viruspräparat entwickelt werden, das bei der Einlagerung möglichst keine Aktivität verliert. Im Bestreben, die Persistenz im Freiland zu verbessern, wurde zudem eine Selektion für erhöhte Resistenz des Granulosisvirus gegen Licht durchgeführt.

1 Material und Methoden

Im folgenden sind nur die Methoden, die von anderen Autoren übernommen wurden oder die in den Versuchen wiederholt zur Anwendung kommen, zusammengestellt. Weitere Methoden für spezifische Bedürfnisse werden in Verbindung mit den Versuchsabläufen jeweils unter «Versuchsdurchführung» beschrieben.

1.1. Tiermaterial

Die Versuche erfolgten, sofern nichts anderes erwähnt ist, mit Tieren aus einer kontinuierlichen Einzelzucht (Huber, 1973), die bis anhin über 90 Generationen geliefert hat. Die Zucht erfolgte nach der Methode von Huber *et al.* (1972). Bei Bedarf von Diapauseraupen wurden die betreffenden L_1, bei sonst gleichbleibenden Zuchtbedingungen, gleich nach dem Ansetzen in Kurztag (= KT, 12 h hell/12 h dunkel) gebracht.

1.2 Virusmaterial

1.2.1 Das Virus

Das Granulosisvirus (= GV) des Apfelwicklers gehört zum Genus *Baculovirus,* Untergruppe B (Wildy, 1971). Die Viruspartikel ist stäbchenförmig und von einer inneren und einer äusseren Membrane umhüllt, welche die Stäbchenenden rund erscheinen lassen (50–75 x 280–300 nm). Das ebenfalls stäbchenförmige Nucleocapsid enthält doppelstrangige DNA und hat stumpfe Enden. Das Kryptogramm lautet: D/2:X/X:U/E:I/O. Jede Viruspartikel ist von einem ovoid-polyedrischen, parakristallinen Einschliessungskörper, der sogenannten Kapsel, umgeben (180–220 x 370–440 nm), welche das Virion so gut gegen schädliche Umwelteinflüsse schützt, dass seine Infektionskraft in kühl und im Dunkeln gelagerten Suspensionen jahrelang erhalten bleiben kann, was bei nackten Granulosisvirus-Partikeln kaum der Fall ist. Während letztere im optischen Mikroskop nicht gesehen werden können, sind die eingekapselten Viren im Dunkelfeld- oder im Phasenkontrastmikroskop gut sichtbar und zählbar. Bisher ist nur *L. pomonella* als Wirt dieser Baculovirusart bekannt.

1.2.2 Herkunft des Virusmaterials

Das am Entomologischen Institut der ETH Zürich verwendete GV des Apfelwicklers wurde 1967 von Prof. Dr. Y. Tanada, University of California, Berkeley, bezogen und seither über viele Wirtspassagen im Institut weitergezüchtet, u.a. von Keller (1973) und Huber (1973). Eine von letzterem gereinigte Suspension mit 10^6 Viruskapseln (= VK) pro ml, die im Dunkeln bei 2 °C gelagert worden war, diente als Grundlage für die Infektionsversuche der vorliegenden Arbeit.

1.2.3 Herstellung von rohen Virussuspensionen

Die Produktion von rohen Virussuspensionen gestaltete sich äusserst einfach. Nach der Homogenisation viröser Kadaver in Wasser wurde lediglich durch Gaze (Nylon, Maschenweite 45 μ) filtriert und als vorbeugende Massnahme gegen die allfällige Vermehrung von Bakterien in der Suspension je 0,005% (Gew./Vol.) Penicillin und Streptomycin beigegeben.

1.2.4 Reinigung der Viren im diskontinuierlichen Saccharosegradienten

Die hochgradige Reinigung von Virussuspensionen war entschieden aufwendiger, besonders weil der Verlust an Viruspartikeln während der Reinigung niedrig gehalten werden sollte. Im Anschluss an die Gazefiltration wurde die Rohsuspension 3fach mit destilliertem Wasser verdünnt und unter reduziertem Druck durch ein Whatman-Papierfilter Nr. 1 filtriert. Das Filtrat wurde während 10 min bei 1000 x g zentrifugiert, der Überstand abpipetiert, das Sediment mit Wasser aufgeschwemmt und wieder zentrifugiert. Zwecks Waschung der Viren wurde diese Prozedur 2mal wiederholt. Für die Gradientenzentrifugation wurde nach Angaben von HUBER (1973) ein diskontinuierlicher Zuckergradient aufgebaut: 15 ml 57%ige Saccharoselösung (Gew./Gew.) wurden mit 25 ml 53%iger Saccharoselösung und diese mit einer 50% Saccharose enthaltenden Virussuspension überschichtet. Zentrifugiert wurde in einer Beckman-Zentrifuge (spinco, L_2, 65B) mit Ausschwingrotor (SW25). Zur Verhinderung einer zu raschen Sedimentation verunreinigender Begleitpartikeln wurde die Drehzahl am Anfang der Zentrifugation während 30 min bei 10000 U/min konstant gehalten. Anschliessend wurde bei maximaler Tourenzahl (25000 U/min) während 6 h zentrifugiert. Die VK bilden dabei eine Bande zwischen der 53- und der 57%igen Saccharoselösung; die Dichte der VK entspricht ca. 56%iger Saccharoselösung. Nach der Gradientenzentrifugation wurde die Virusbande mit einer Pasteurpipette abgesaugt. Die abpipetierten Viren wurden zwecks Auswaschung der Saccharose 3mal in 50 ml $^1/_{15}$ m Phosphatpuffer (pH = 7) bei 15000 U/min 1 h lang zentrifugiert und, wie die Rohsuspension, mit Antibiotica versetzt.

1.2.5 Reinigung von Viren im kontinuierlichen Saccharosegradienten

Ähnlich gestaltete sich die Ultrazentrifugation von Viren im kontinuierlichen Zuckergradienten. Diese wurde mit Hilfe eines Gradientenmischers aus je 15 ml von zwei Saccharoselösung (50% bzw. 60%, Gew./Gew.) kontinuierlich gemischt und anschliessend mit 10^{11} Viruskapseln, suspendiert in 3 ml Wasser, überschichtet. Zentrifugation und Nachbehandlung der Viren erfolgten wie unter 2.2.4 beschrieben.

1.2.6 Abbildung von Viren im Elektronenmikroskop

Im Hinblick auf die elektronenmikroskopische Betrachtung wurden im kontinuierlichen Saccharosegradienten gereinigte Viren in bidestilliertem Wasser aufgeschwemmt, nach HESS (1966) fixiert und nach LUFT (1961) eingebettet. Die

Kontrastierung der Ultradünnschnitte erfolgte nach REYNOLDS (1963). Sie wurden mit einem Philipps EM 301 photographiert. Diese Arbeiten wurden vom Servicelabor des Instituts für Zellbiologie der ETH, unter der Leitung von Herrn Dr. M. MUELLER durchgeführt.

1.2.7 Bestimmung der Viruskonzentration

Die Konzentration der Virussuspensionen wurden mittels einer PETROFF-HAUSSER-Bakterienzählkammer bestimmt. Im Bestreben, die Zuverlässigkeit der Zählmethode zu erhöhen, wurden die Suspensionen vor der endgültigen Zählung schrittweise verdünnt, bis nur mehr zwischen null und 3 Viren pro Quadrätchen gezählt werden konnten. Bei den 3 endgültigen, gemittelten Auszählungen wurde zudem die pro Zählung berücksichtigte Anzahl Quadrate auf 20 herabgesetzt, was zu einer rascheren Konzentrationsschätzung einer Kammerfüllung führte. Durch diese Massnahme konnte der Anteil von Viren, der sich während dem Zählvorgang an den Kammerwänden festsetzt, so stark reduziert werden, dass es gerechtfertigt erschien, nur mehr frei flottierende Viren bei der Zählung zu berücksichtigen.

1.2.8 Lyophilisierung und Lagerung von Virussuspensionen

Bei der Lyophilisierung von gereinigten Viren wurde die entsprechende Suspension nach der Empfehlung von SCHMID (1973, 1974) mit 5% Cellulosepulver versetzt und bei -50 °C eingefroren. Die anschliessende Trocknung während 30 h erfolgte bei 10^{-5} Torr. Das Lyophilisat wurde in einem Schliffkolben bei 2 °C im Dunkeln aufbewahrt.

1.2.9 Lagerung von Viren bei -20 °C bzw. 2 °C

Neben der Lagerung von Suspensionen gereinigter Viren bei 2 °C im Dunkeln, wurde besonders auch die Lagerung eingefrorener Virussuspensionen geprüft. Bei diesem Verfahren wurde der Suspension als Gefrierschutz 30% (Vol./Vol.) Glyzerin beigegeben, davon Proben zu je 2 ml in kleine Tablettengläser abgefüllt, diese mit einem Gummistopfen verschlossen und bei -20 °C im Dunkeln gelagert. Die Unterteilung in kleine Proben erlaubte es, von Zeit zu Zeit Biotests durchzuführen, ohne dass immer wieder die ganze Probe aufgetaut werden musste. Diese Vorsichtsmassnahme wurde ergriffen, obwohl nach DAVID *et al.* (1971a) wiederholtes Auftauen suspendierter GV von *Pieris brassicae* (L.) keinen wesentlichen Aktivitätsverlust ergeben soll.

1.3. INFEKTION VON RAUPEN UND VIREN

1.3.1 Infektion durch perorale Mikroinjektion

Die Zwangsfütterung der Raupen mit Viren erfolgte nach der Methode von MARTIGNONI (1955). Anfänglich wurden für die perorale Mikroinjektion späte L_4 verwendet, die jedoch, wohl im Zusammenhang mit der Häutung zur L_5, nur

schwer reproduzierbare Virusmortalitäten lieferten. Die später verwendeten, höchstens 24 h alten L_5, ergaben nicht nur befriedigend reproduzierbare Mortalitätswerte, sondern erlaubten, dank ihrer Grösse, auch eine raschere Manipulation bei der Mikroinjektion. Tiere, welche die 2 ersten Versuchstage nicht überlebten, wurden ausgeschieden und bei der Auswertung nicht berücksichtigt, da ein Absterben nach so kurzer Zeit mit Sicherheit nicht auf Virusinfektion, sondern auf Verletzung bei der Injektion zurückgeführt werden muss. Die Versuchsdauer wurde jeweils auf 12 Tage nach der Infektion begrenzt. Tiere, die diese Zeitspanne überlebten, wurden als solche mit negativer Reaktion gewertet.

1.3.2 Tauchinfektion

Bei der einfachen und zuverlässigen Tauchmethode (BENZ, 1960) wurden die Raupen zwecks Infektion während 3–5 Sekunden in Virussuspensionen eingetaucht.

1.3.3 Infektion durch kontaminierte Apfelrondellen

Die Infektion von Eilarven mit kontaminiertem Futter wurde nach der von KELLER (1973) entwickelten Apfelrondellen-Methode durchgeführt. Dieser Pathogenitätstest wurde jedoch nur vereinzelt eingesetzt, da die hochempfindlichen Eilarven aufgrund der individuellen Virusaufnahme mit sehr heterogenen Mortalitäten reagieren können.

1.3.4 Diagnose virustoter Raupen

Die Diagnose virustoter, grösserer Raupen erfolgte in der Regel nach äusseren Symptomen (KELLER, 1973). Nur in Zweifelsfällen mussten Quetschpräparate erstellt und diese bei 1000facher Vergrösserung unter dem Phasenkontrastmikroskop evaluiert werden. Hingegen bereitete die Diagnose beim Pathogenitätstest auf Apfelrondellen gelegentlich Schwierigkeiten, da bei den kleinen Raupenkadavern oft keine eindeutigen äusserlichen Symptome feststellbar waren und auch der lichtmikroskopische Befund nicht immer weiterhalf.

2 Entwicklungsarbeit

2.1 SELEKTION EINES VIRUSSTAMMES MIT ERHÖHTER RESISTENZ GEGENÜBER KÜNSTLICHER, ULTRAVIOLETTER STRAHLUNG UND SONNENLICHT

Sonnenstrahlung hat eine inaktivierende Wirkung auf Insektenviren (CANTWELL, 1967; DAVID *et al.*, 1968; MORRIS, 1971; IGNOFFO, 1973, SCHMID, 1973, 1974). Nach den Untersuchungen des letztgenannten Autors wirkt dabei nicht nur die ultraviolette Strahlung, sondern auch das sichtbare Licht, doch kommt der UV-

Komponente die grösste Bedeutung zu. Die inaktivierende Wirkung des Lichtes wirkt sich natürlich sehr nachteilig aus bei der Applikation im Freiland (STAIRS, 1972; KELLER, 1973, SCHMID, 1974). So sind denn auch verschiedene Massnahmen zur besseren Erhaltung der Virusaktivität eingeführt worden. Neben Vorschriften bei der Applikation (SMIRNOFF, 1972) sind auch mit Erfolg Schutzstoffe gegen die aggressive Strahlung eingesetzt worden (IGNOFFO & BATZER, 1971, JAQUES, 1971; KELLER, 1973; SCHMID, 1974).

Theoretisch liesse sich eine Wirkungssteigerung auch durch Selektion besonders virulenter Virusisolate vorstellen, doch dürfte der Endeffekt im Freiland kaum überzeugen, wenn nicht gleichzeitig eine Selektion besonders lichttoleranter Viren vorgenommen würde. Durch die Inaktivierung der hochgradig lichtempfindlichen Viren würde der Aktivitätsgewinn vermutlich sehr rasch wieder zunichte gemacht werden. Aufgrund dieser Überlegung haben wir beschlossen, die Selektion eines strahlentoleranteren Virusstammes zu versuchen, wie dies schon von WITT & STAIRS (1975) vorgeschlagen worden war. Ihre Untersuchungen hatten nämlich gezeigt, dass Viren sehr heterogen auf UV-Bestrahlung reagieren können. Falls zwischen dieser Heterogenität und der genetischen Variabilität innerhalb der Viruspopulation ein Zusammenhang bestünde, sollte die Selektion eines UV-toleranteren Isolates möglich sein. Die Selektion wurde deshalb mittels einer künstlichen UV-Quelle durchgeführt, wobei auf möglichst naturnahe Bedingungen geachtet wurde (s. Diskussion 2.1.4). Wie die im folgenden beschriebenen Versuche zeigen, war die Selektion eines lichttolerenteren Virusstammes möglich. Die Versuche zeigten dabei, dass bei der Selektion für Resistenz gegen künstliche UV-Strahlung gleichzeitig Resistenz gegen Sonnenlicht erzielt wurde.

2.1.1. Material und Durchführung der Versuche

Selektion durch Bestrahlung mit künstlicher UV-Quelle

Ausgehend von einer bei 2 °C gelagerten Virusprobe (s. 1.2.1.) wurden durch Eintauchen von frisch gehäuteten L_5 in eine Suspension mit 10^5 VK pro ml 20 viröse Kadaver gewonnen. Das anfallende Homogenat, das lediglich mit Gaze filtriert worden war, diente als Ausgangssuspension für die Bestrahlungsversuche.

Die Applikation der Viren erfolgte in einer Sprühglocke, die mit einer Farbspritzpistole versehen war. Pro Behandlung wurde 1 ml Suspension mit einem Gehalt von 10^6 Viruskapseln versprüht, wobei der Zusatz von einem Netz-Haftmittel (0,1% Etalfix®, Vol./Vol.) einen homogenen Spritzbelag gewährleistete.

In einem Vorversuch zur Selektion, bei dem 1 ml Rohsuspension mit 10^7 Viruskapseln auf die Äpfel gesprüht wurde, hatte sich gezeigt, dass in einem zu dichten Belag infolge gegenseitiger Überdeckung von Viren und Verunreinigungen ein gewisser Anteil von Viruskapseln nicht oder nur unvollständig von der UV-Strahlung getroffen wird. Wie Tab. 1 zeigt, trat zwar bis zu einer Bestrahlungsdauer von 90 min eine Steigerung der Inaktivierungsrate ein, doch konnte diese selbst nach dreifacher Verlängerung der Bestrahlungsdauer nicht mehr weiter gesteigert werden. Bei der Aktivitätsprüfung würden die unbestrahlten Viren selbstverständlich die Mortalitätswerte verfälschen, schlimmstenfalls einen etwaigen Selektionseffekt sogar überdecken. Aus diesem Grunde wurde bei den Hauptversuchen mit einer schwächeren Suspension, die nur 10^6 VK/ml enthielt, gearbeitet.

Tab. 1: Bestrahlung eines dichten Virusbelages auf Äpfeln mit UV.

Bestrahlung in Minuten	N	Virustote L1/L2 in %
0	58	100
30	46	40
90	50	20
270	54	22

Die mit Viren besprühten, insektizidfreien Bohnäpfel wurden über Nacht im Dunkeln bei 13 °C getrocknet und anschliessend, mit Ausnahme der Kontrolläpfel, aus 1 m Abstand mit langwelliger ultravioletter Strahlung (3'150 Å, 160 Watt) während 10 min behandelt (Quarzlampe Typ 156, Solis Apparatebau Zürich). Die Aktivität der bestrahlten Viren wurde nach der Methode KELLER (1973) auf Apfelrondellen ermittelt, wobei der Virusmortalität in der unbestrahlten Kontrolle besondere Aufmerksamkeit geschenkt wurde. Lag der Absterbeprozentsatz bei 100% bzw. unter 70% wurde jeweils der Ansatz erneut durchgeführt, wodurch unterschiedlich dichte und vor allem zu dichte Virusbeläge auf den Äpfeln eliminiert werden konnten.

Die anfallenden virösen L_1 bzw. L_2 lieferten nur sehr geringe Virusmengen, sodass zwischen den einzelnen Selektionsschritten jeweils eine Passage über L_5 eingeschaltet werden musste (Abb. 1). Nach jeder Virusvermehrung wurden 10 viröse Kadaver abgezweigt, homogenisiert und durch Gaze filtriert. Die resultierende Rohsuspension ergab, nach Festlegung der Viruskonzentration, das Spritzgut für den nächstfolgenden Selektionsschritt.

Zur Bestimmung der erreichten Resistenz nach Beendigung der Selektion mussten die Dosis/Mortalitäts-Regressionen der bestrahlten Stämme bestimmt und verglichen werden. Da die statistische Erfassung der Regressionskurven nur möglich ist, wenn jeder Test mindestens 4 Virusdosen umfasst, deren niedrigste mehr als 0% und deren höchste weniger als 100% Mortalität ergibt, musste zuerst der für die Tests geeignete Konzentrationsbereich eruiert werden. Die hohe Empfindlichkeit der Eilarven gegenüber Viren führt nämlich zwangsläufig zu relativ steilen Kurven, die zwischen 0 und 100% Mortalität nur einen relativ engen Konzentrationsbereich umfassen. Vorversuche haben gezeigt, dass der massgebende Konzentra-

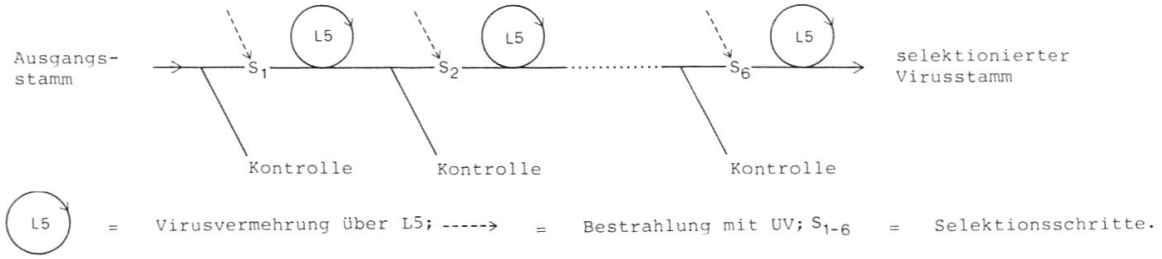


Abb. 1: Selektionsschema.

tionsbereich bei den zu versprühenden Virussuspensionen zwischen 10^5 und 10^6 VK liegen dürfte. Deshalb wurden von jedem der beiden Virusstämme 5 Dosen im Konzentrationsbereich von 8 x 10^4 bis 5 x 10^6 VK/ml geprüft. Unter Berücksichtigung der weniger dichten Virusbeläge auf den Testäpfeln wurde die Bestrahlungszeit von 10 auf 5 min reduziert.

Prüfung der Virusstämme im Freiland

Im Anschluss an die Selektion wurde die Strahlenresistenz des Ausgangs- und des Selektionsstammes auch im Freiland geprüft. Dabei war kein praxisnaher Bekämpfungsversuch beabsichtigt, wo ein hohes Mortalitätsniveau während möglichst langer Zeit anzustreben wäre, sondern Viren des Grund- und des Selektionsstammes sollten bezüglich ihrer UV-Toleranz im Freiland miteinander verglichen werden.

Wie schon bei den Selektionsversuchen im Labor, musste deshalb eine geeignete Konzentration der Virussuspension abgeschätzt werden, die annähernd 100% Mortalität bewirkt. Versuche von KELLER (1973) mit der relativ hohen Konzentration von 10^8 VK/ml ergaben 48 h nach dem Aussprühen im Freiland beim Aktivitätstest im Labor eine Raupenmortalität von 100% und nach 3 Wochen eine solche von 67%. Dies deutet darauf hin, dass diese hohe Viruskonzentration eine Anfangsmortalität lieferte, die potentiell weit über 100% gelegen haben dürfte. Andererseits erschien die bei den Selektionen verwendete Konzentration von 10^6 VK/ml eher niedrig zu liegen (s. 2.1.1), wenn man bedenkt, dass die Bestrahlung im Freiland nicht konstant und kontrolliert, sondern unberechenbar erfolgt (Tab. 2). Aufgrund dieser Überlegungen wurde die Virusdosis in den Spritzbrühen generell auf 10^7 VK/ml festgelegt.

Für eine zusätzliche Verbesserung der UV-Resistenz wurde der Virussuspension Magermilchpulver beigemischt, wobei neben der bereits von KELLER (1973) erfolgreich angewendeten Variante mit 1% (Gew./Vol.) eine weitere mit 2% Milchpulverzusatz durchgeführt wurde.

Die Versuche wurden in einem Obstgarten in Feldmeilen am Zürichsee durchgeführt, dessen Bäume nicht mit Pestiziden behandelt werden. Das Grundstück liegt an windgeschützter Stelle auf einem nach Westen geneigten Hang. Diese Lage bedingt einen relativ späten Sonnenaufgang und einen späten Sonnenuntergang. Für die Versuche wurden Hochstämme mittleren Alters der Sorte Champagner-Reinette ausgewählt. Da die periodische Prüfung der Virusaktivität ohnehin im Labor vorgesehen war, wurden lediglich die südwest orientierten Baumteile gespritzt, wodurch eine vergleichbare Sonnenexposition der Äpfel erzielt werden konnte.

Für die Teilbehandlungen der Versuchsbäume wurden je 4 Liter Spritzbrühe verwendet, die 10^7 VK/ml Wasser, 1% bzw. 2% Magermilchpulver und 0,1% Etalfix® enthielt. Die Spritzungen bis zur Tropfnässe erfolgten mit einer Rückenspritze am 28.7.1975 vor Sonnenaufgang, bei praktisch unbewegter Luft. Spritzung bis zur Tropfnässe ermöglicht die Applikation von homogenen, vergleichbaren Virusbelägen auf den Äpfeln, da überschüssiges Spritzgut abtropft.

Bei 2 Verfahren wurden nach dem Antrocknen des Spritzbelages die für den Versuch vorgesehenen Äpfel mit Aluminiumfolie vor Licht abgeschirmt. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Äpfel nicht mit der Folie in Berührung kamen. Am Tage der Spritzung und periodisch während drei Wochen wurden frühmorgens, vor Sonnenaufgang, Probeäpfel gepflückt und diesen im Laboratorium Apfelrondellen für den Pathogenitätstest nach KELLER (1973) entnommen.

Tab. 2: Über die Versuchszeit aufsummierte Klimaeinwirkungen am Versuchsort.

Zeit nach Versuchs-beginn (Tage)	Sonnen-schein-dauer (Stunden)	Tagesmittel-temperaturen (°C)	Nieder-schlag (mm)
1	9,8	18,5	-
2	21,2	19,6	-
3	32,9	20,8	-
4	43,3	20,9	-
5	53,8	22,1	-
6	67,3	22,5	-
7	81,0	22,4	-
8	92,2	20,7	-
9	105,7	20,4	-
10	119,0	21,5	-
11	132,5	21,4	-
12	141,1	21,0	-
13	141,4	18,8	55,6
14	142,0	15,8	52,7
15	142,0	13,1	22,1
16	152,2	18,1	-
17	160,8	19,7	6,8
18	165,8	18,4	14,0
19	175,8	18,6	-
20	179,3	18,8	4,3
21	181,2	15,7	12,2
	Ø 8,6	Ø 19,5	

2.1.3. Resultate

Selektionsversuche

Die Resultate des Selektionsversuches sind in Tab. 3 zusammengefasst. Wie die Werte zeigen, trat der entscheidende Selektionseffekt sehr rasch beim 3. und 4. Selektionsschritt ein. Da die beiden folgenden Selektionsschritte keine weitere Resistenzsteigerung mehr ergaben, wurde die Versuchsserie abgebrochen.

Tab. 3: Erhöhung der Resistenz gegen UV-Strahlung bei Viren, applizierte Viruskonzentration 10^6 VK/ml.

Selektions-schritt		N	Verletzungs-mortalität %	Virustote Raupen %	Ueberlebende Raupen %
1	bestrahlt	110	18	11	71
	unbestrahlt	40	5	90	5
2	bestrahlt	105	13	12	75
	unbestrahlt	40	7	85	8
3	bestrahlt	110	9	40	51
	unbestrahlt	40	7	87	6
4	bestrahlt	120	12	70	18
	unbestrahlt	45	3	90	7
5	bestrahlt	115	7	65	28
	unbestrahlt	45	4	92	4
6	bestrahlt	125	7	69	24
	unbestrahlt	40	10	85	5

Die Virusmortalitäten bei den mit unbestrahlten Viren der Selektionslinie infizierten Kontrollraupen blieben recht konstant bei 85-92%, ein Indiz dafür, dass die verwendete Sprühkonzentration von 10^6 VK/ml nicht zu hoch war und dass während der Selektion keine Selektion virulenterer Viren durchgeführt wurde.

Nach Bestrahlung von Viren sowohl des Grund- als auch des Selektionsstammes ergab die Aktivitätsprüfung Regressionsgeraden von ähnlicher Steinheit, wobei jedoch beim selektionierten Isolat 5,6mal weniger Viren benötigt wurden als bei der Grundsuspension (Abb. 2).

Vergleichende Untersuchung von Selektions- und Grundstamm

Bei der Betrachtung von Viren beider Stämme im Phasenkontrastmikroskop schien es vorerst, als ob bei den selektionierten Viren vermehrt überdurchschnittlich grosse Viruskapseln vorkämen. Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Dünnschnitten beider Isolate (s. 2.2.6.) ergaben aber eine statistisch gleiche Verteilung der Kapselgrössen (Abb 3).

Auch der Dichtevergleich im kontinuerlichen Zuckergradienten (s. 2.2.5.) ergab keine Unterschiede; für beide Stämme wurde eine identische Lage der Virusbanden festgestellt (Abb. 4).

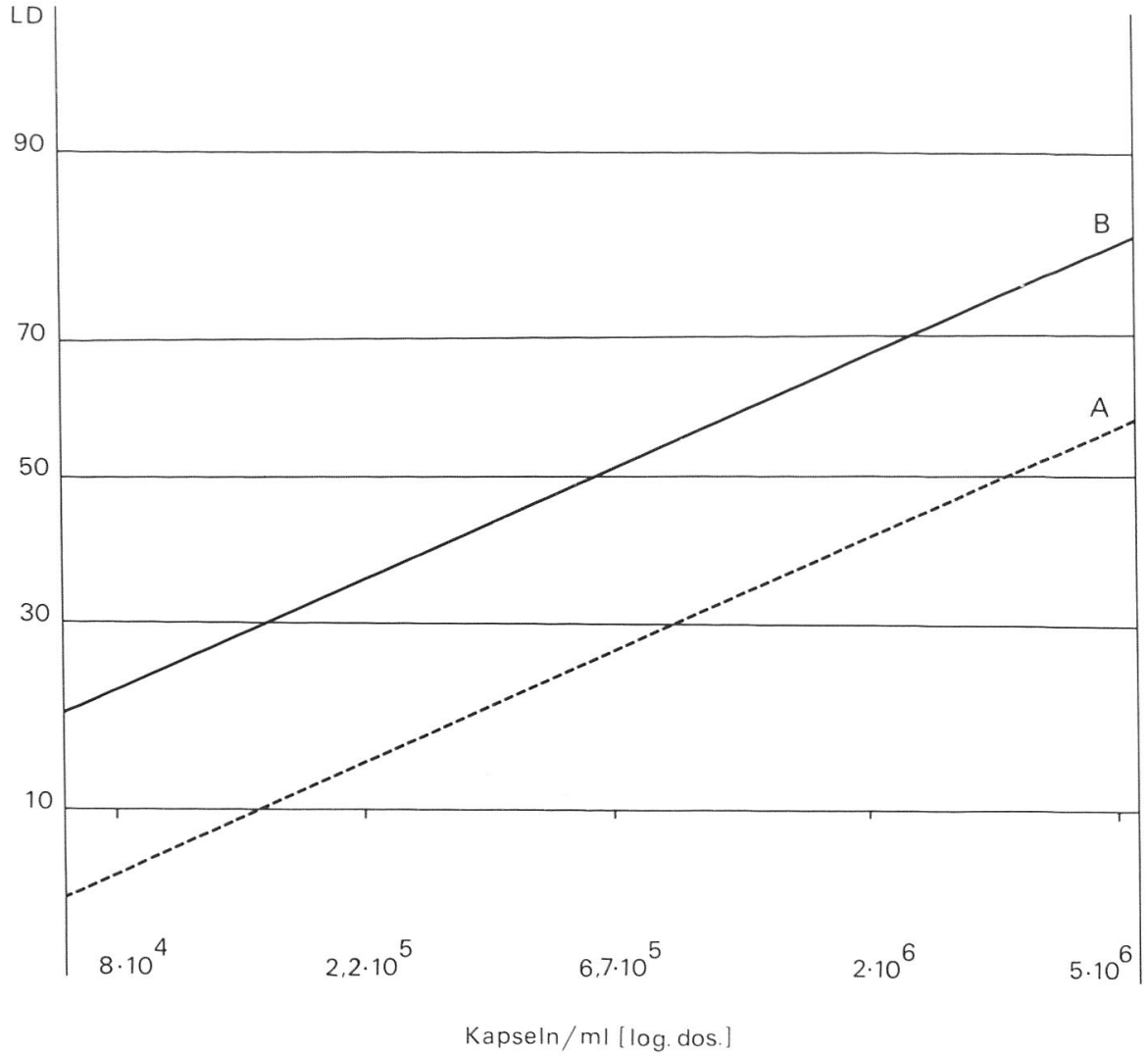


Abb. 2: Dosis-Mortalitätskurven von Viren des Grund- (A) und des selektionierten Virusstammes (B) nach UV-Bestrahlung während 5 min.

Freilandprüfung der Virusstämme

Die Pathogenitätstests mit freilandexponiertem Virusmaterial ergaben die in Abb. 5 dargestellten Resultate. Wie die Wetterdaten der Meteorologischen Zentralanstalt (Tab. 2) zeigen, herrschte während der ersten 12 Tage ununterbrochen schönes, sonniges und warmes Wetter. Trotzdem blieb, bei Fernhalten des Sonnenlichtes durch Folien, die Aktivität der Spritzbeläge beider Virusstämme während 3 Wochen voll erhalten. Für die Verfahren 1–3 mit unbedeckten Äpfeln trifft dies nicht zu. Dabei konnte beim Grundstamm durch eine Erhöhung des Milchpulverzusatzes auf 2%, gegenüber dem Verfahren mit 1% Milchpulverzusatz lediglich während der ersten 3 Tage eine statistisch signifikant erhöhte Mortalität erreicht werden. Hingegen ergab der Selektionsstamm nach 3, 9 und 15 Tagen Exposition im Freiland signifikant höhere Mortalitätswerte als der Grundstamm. Bezüglich dieser beiden Verfahren lieferte die Regressionsanalyse 2 parallele Kurven der Aktivitätsabnahme mit einer verdoppelten T50 für den Selektionsstamm (Abb. 6).

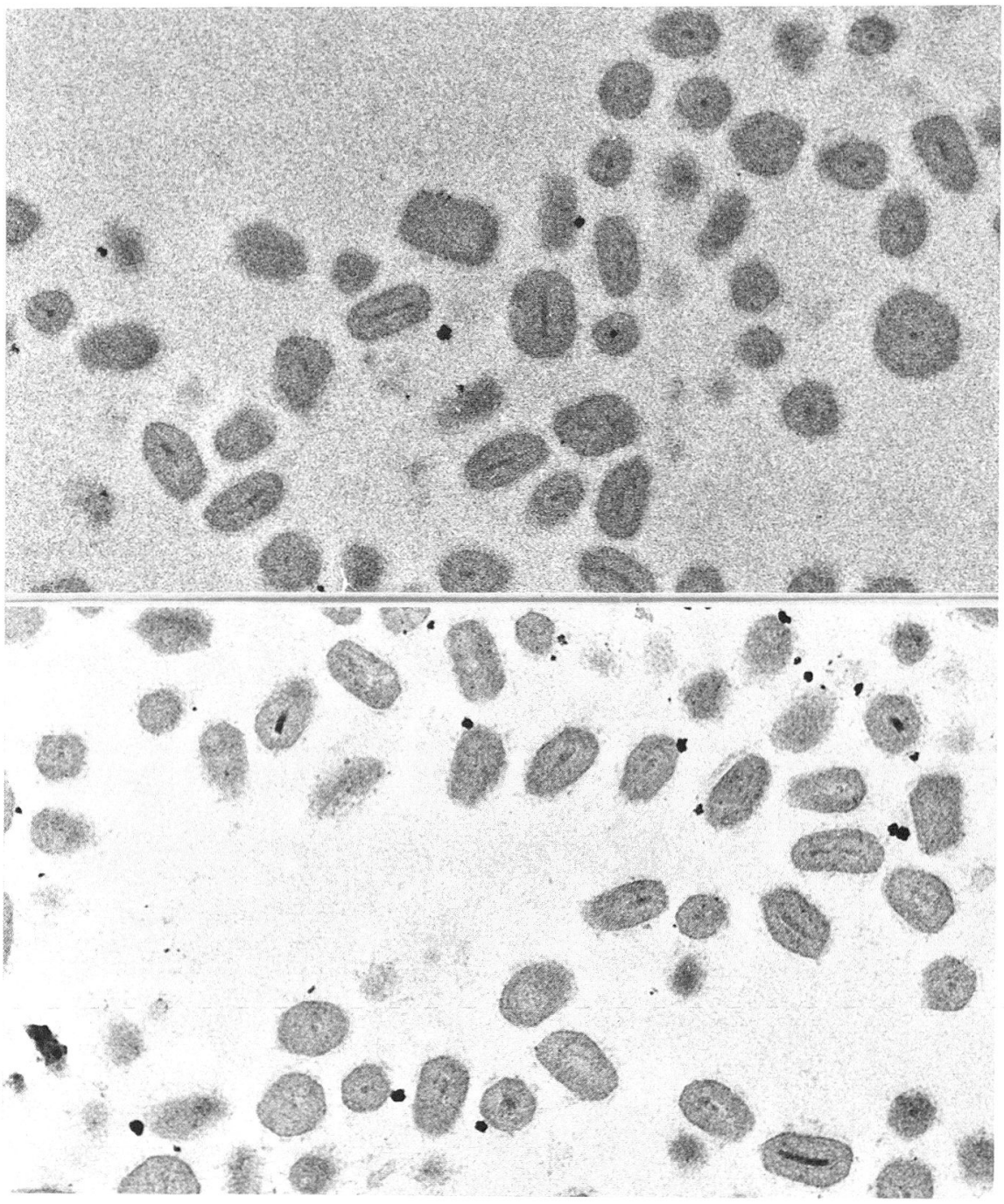


Abb. 3: Elektronenmikroskopische Aufnahme von Dünnschnitten mit Viren des Grundstammes (oben) und des selektionierten Stammes (unten).

2.1.4 Diskussion

Selektionsversuch

Bei jedem Selektionsvorgang, der ein bestimmtes Ziel verfolgt, müssen die Versuchsbedingungen genauestens durchdacht werden, wenn verhindert werden soll, dass bereits durch eine ungeeignete Versuchsanordnung die Selektion in eine falsche Richtung gelenkt wird. Im Fall von *L. pomonella* muss das Virus frisch ge-

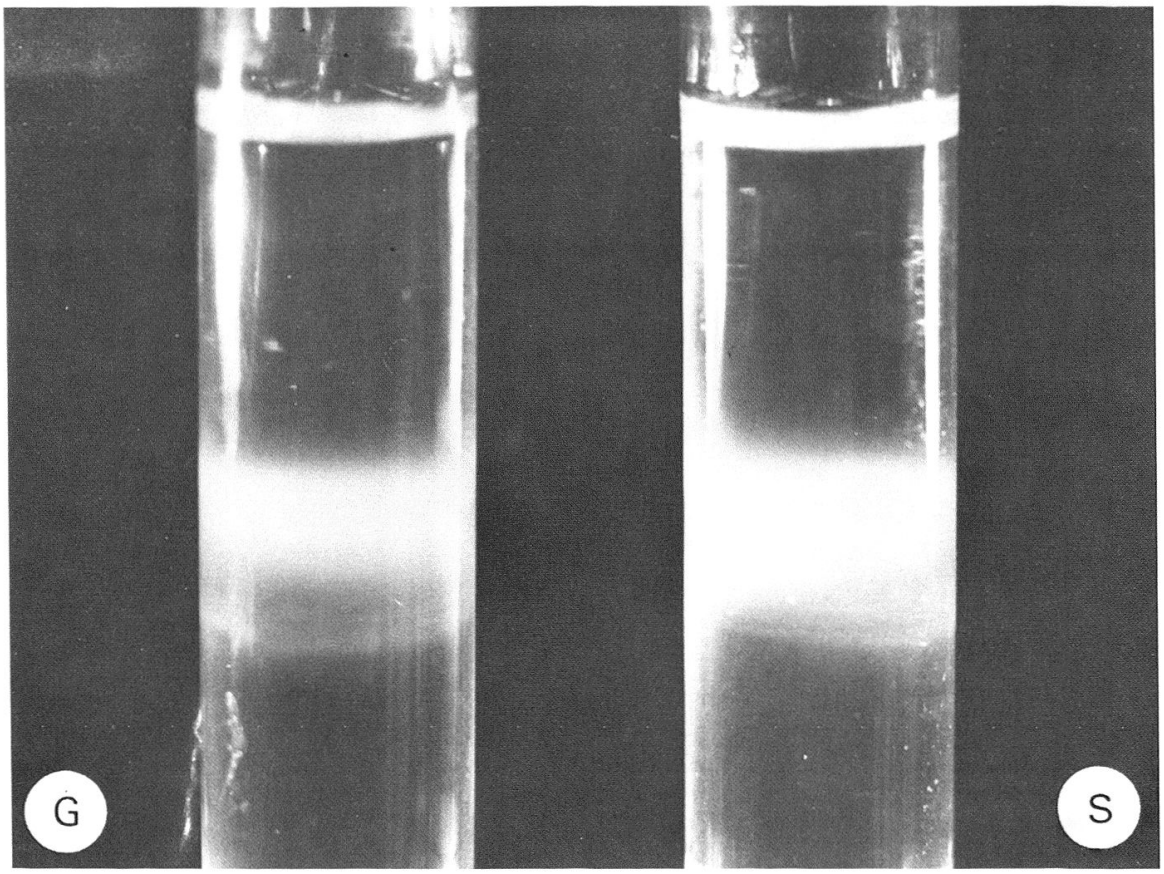


Abb. 4: Dichtevergleich im kontinuierlichen Zuckergradienten von Viren des Grundstammes (G) mit selektionierten Viren (S).

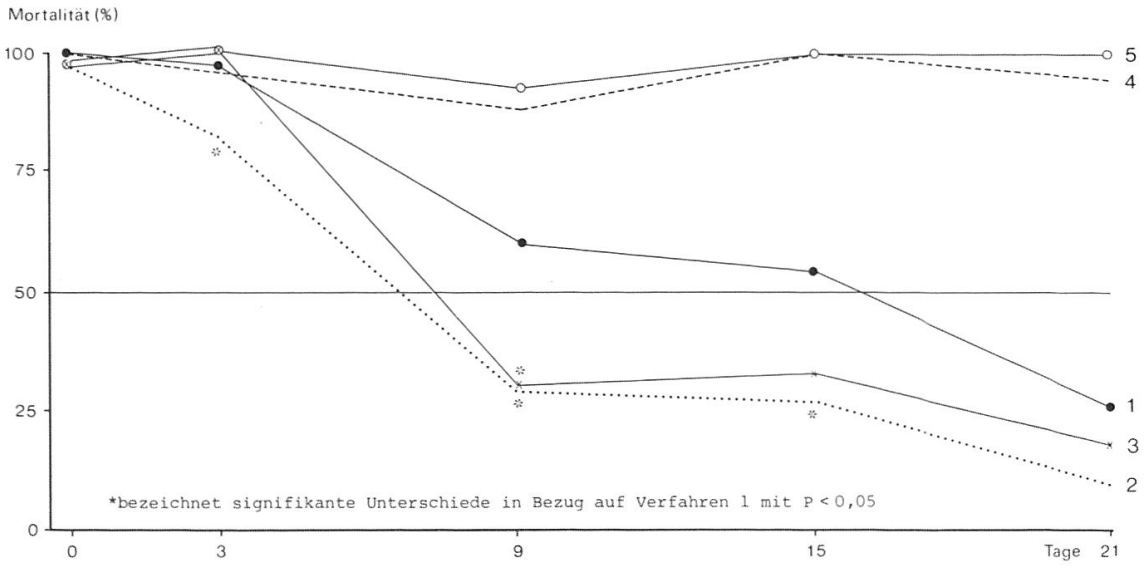


Abb. 5: Beeinflussung der Aktivität von Viren des Grund- und des Selektionsstammes durch Freilandbedingungen:
Verfahren 1: Selektionierte Viren, 1% Milchpulverzusatz
Verfahren 2: Viren aus Grundstamm, 1% Milchpulverzusatz
Verfahren 3: Viren aus Grundstamm, 2% Milchpulverzusatz
Verfahren 4: Selektionierte Viren, 1% Milchpulverzusatz, Abdeckung mit Folie
Verfahren 5: Viren aus Grundstamm, 1% Milchpulverzusatz, Abdeckung mit Folie.

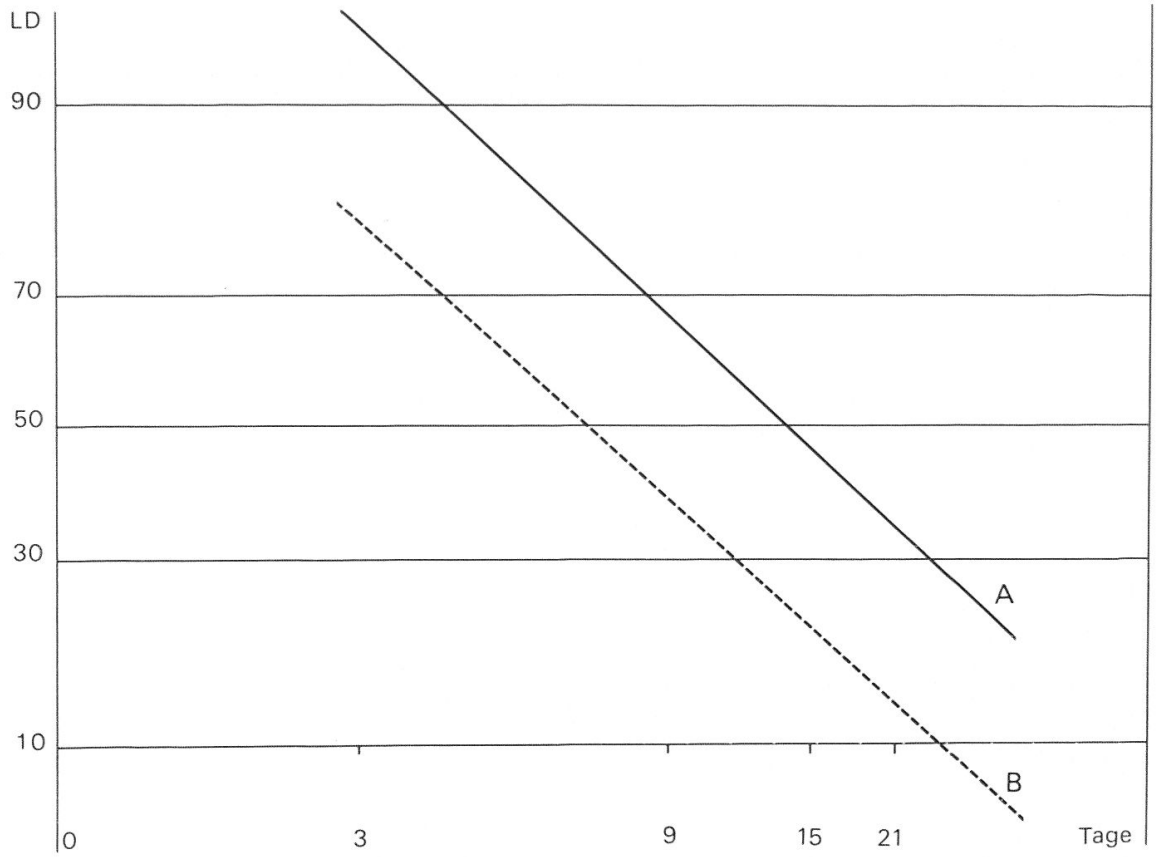


Abb. 6: Inaktivierung von Viren des Selektions- (A) und des Grundstammes (B) im Freiland.

schlüpfte Larven töten, die sich in die Früchte einbohren wollen. Bei der Selektion wurde deshalb diese Situation imitiert, da dies am ehesten einen Effekt in der gewünschten Richtung versprach. In diesem Sinne wurden als Testtiere Eilarven verwendet, obwohl diese Jungstadien erfahrungsgemäss bedeutend schwieriger zu manipulieren sind als ältere Stadien. Neben der leichten Verletzbarkeit der Tiere und der problematischen Diagnose der Virustoten, machte sich besonders der grosse Arbeitsaufwand für die Virusvermehrung bemerkbar, mussten doch nach jedem Selektionsschritt mit den geringen Virusmengen, die die L_1 lieferten, L_5 infiziert werden. Desgleichen wurde die Bestrahlung der Viren auf dem natürlichen Substrat für die Eilarven durchgeführt, obwohl die Verwendung von Glasplatten anstelle von Äpfeln arbeitsmässig und in hygienischer Hinsicht einfacher gewesen wäre. Da im Freiland vor allem die langwellige UV-Strahlung (3'000–3'800 Å) bis zur Erdoberfläche gelangt (BENER, 1963), der Rest aber grösstenteils vom atmosphärischen Ozon absorbiert wird, ist für die Bestrahlung ausschliesslich langwellige UV-Strahlung verwendet worden. Abgesehen davon ist die kurzwellige Komponente (1'900–3'000 Å) bedeutend energiereicher und dadurch stärker inaktivierend (DAVID, 1969, SMIRNOFF, 1972). Sie wurde aus diesem Grunde als für eine Selektionierung eher ungeeignet betrachtet. Es sollte jedenfalls vermieden werden, dass durch einen allzu starken Selektionsdruck interessante Genkombinationen vorzeitig ausgeschaltet und dadurch in unerwünschtem Ausmass reduziert werden. Der rasche Selektionseffekt innerhalb von nur 3 Selektionsschritten spricht allerdings dafür, dass die erreichte UV-Resistenz wahrscheinlich auf einem einzigen genetischen Faktor oder wenigstens nur einem eng gekoppelten Faktorenkomplex beruht. Welche spezifi-

sche Eigenschaft den Selektionsstamm lichttolerant macht, konnte nicht herausgefunden werden.

Sicher ausgeschlossen werden kann die Hypothese, die Resistenzsteigerung beruhe auf einem verbesserten Strahlenschutz durch grössere oder dichtere Viruskapseln. Dieses Ergebnis passt zum Befund von IGNOFFO (1973), der bei diesbezüglichen Versuchen mit dem Kernplyedervirus von *Heliothis zea* BODDIE die lange Zeit von manchen Autoren vertretene Meinung, das Kapselprotein vermöge das Virion vor UV-Strahlung zu schützen (CANTWELL, 1967; RIVERS, 1967; SMIRNOFF, 1972), nicht bestätigen konnte.

Freilandprüfung der Virusstämme

Die Versuche im Freiland zeigen, dass die bereits festgestellte, erhöhte Resistenz der Viren des selektionierten Stammes gegenüber künstlichem UV-Licht auch eine erhöhte Resistenz gegen das Sonnenlicht umfasst, wobei sich die Aktivitätsabnahme, besonders während der ersten 12 Versuchstage mit konstant sonnigem Wetter, von derjenigen des Grundstammes deutlich abzuheben vermochte. Hingegen brachte die Verdoppelung des Milchpulverzusatzes keine deutliche Verbesserung der Viruspersistenz, konnte doch nur bis zum 3. Versuchstag ein gesicherter Unterschied zu Verfahren 2 verzeichnet werden. Diese eher bescheidene Zusatzwirkung ist mit den Kosten für die erhöhte Milchpulverzugabe zu teuer erkauft, ganz abgesehen von Rückständen der letzten Spritzung, die das Erntegut verunstalten dürften. Diesbezüglich gibt hingegen ein Gehalt von 1% Milchpulver in der Spritzbrühe zu keinen Bedenken anlass.

Durch totale Abschirmung der Virusbeläge vor Sonnenlicht konnte die Aktivität bei beiden Virusstämmen in vollem Umfang erhalten werden. Diese, gegenüber den Resultaten von KELLER (1973) bedeutend bessere Aktivitätserhaltung mag darauf zurückzuführen sein, dass nicht einzelne Äpfel, sondern ganze Fruchtgehänge mitsamt den dazugehörigen Astpartien lose mit Aluminiumfolie eingebunden wurden, wodurch zwischen der sonnenbeschienenen Folie und den darin befindlichen Äpfeln ein genügend grosser Luftraum erhalten blieb, dass keine virusinaktivierenden Temperaturen erreicht wurden. Der Versuch zeigt jedenfalls, dass im Freiland keine Emanationen des Apfels oder der Blätter an der Inaktivierung der Viren beteiligt sind.

2.2 VERSUCHE ZUR OPTIMIERUNG DER VIRUSAUSBEUTE MIT DIAPAUSEINDUZIERTEN RAUPEN UND KÜNSTLICH ERZEUGTEN L_6

2.2.1 Infektion von diapauseinduzierten Raupen mit Viren

Der Apfelwickler überwintert als diapausierende, ausgewachsene Raupe. In der Nord- und Ostschweiz treten 50% der Tiere obligat (genetisch bedingt) in Diapause, während bei den restlichen 50% der Tiere fakultative Diapause durch Kurztag ausgelöst wird (WILDBOLZ & RIGGENBACH, 1969). Der in unserem Institut gezüchtete Stamm des Apfelwicklers ist zu über 99% fakultativ diapausierend, wobei bei einer Photoperiode von mehr als 16 Stunden pro Tag oder bei Dauerlicht praktisch keine Tiere diapausieren. Für den in den Massenzuchten verwendeten Stamm der Eidg. Forschungsanstalt Wädenswil gilt Ähnliches.

Versuche mit infizierten Raupen haben gezeigt, dass sich die meisten Tiere, welche die Verpuppung noch einleiten können, ohne Symptome von Granulose

normal entwickeln. Gelegentlich kommen zwar viröse Puppen vor; ihr Anteil liegt jedoch unter 0,1%. Für eine zuverlässige Infektion von Langtagtieren wären deshalb Raupenalter und Viruskonzentration so zu wählen, dass die Verpuppung infolge einer genügend fortgeschrittenen Pathogenese unterbunden wird. Bei einer Masseninfektion bringt jedoch die Verwendung eines bestimmten Raupenstadiums Schwierigkeiten mit sich, weil bei der Aufzucht der Larven die Entwicklung nur schlecht synchronisiert werden kann (KELLER, 1973). Gleichermassen ist bei einer heterogenen Stadienverteilung die Wahl einer bestimmten Infektionsdosis problematisch, da ja möglichst viele Altersklassen der Raupenpopulation durch die Viren in dem Sinne optimal infiziert werden sollen, dass eine möglichst grosse Virusproduktion resultiert. Es wäre deshalb vorteilhaft, wenn die Pathogenese nach der Infektion während einer möglichst unbeschränkten Inkubationszeit ablaufen könnte. Dies liesse sich mit diapauseinduzierten Raupen verwirklichen, falls bei diesen eine befriedigende Virusvermehrung überhaupt zustande käme. Wegen des stark verlängerten letzten Larvenstadiums der diapausierenden Tiere müsste nämlich selbst eine sehr geringe Infektionsdosis genügend Zeit haben, um bei L_5 eine akute Virose auszulösen. Anderseits würde möglicherweise die geringe Dosis bei Raupen des 4. Stadiums ein so langsames Anlaufen der Krankheit bewirken, dass diese die Häutung zur L_5 noch vollziehen und die Tiere noch wachsen könnten, bevor sie an der Virose zugrunde gingen. Neben der grundsätzlichen Frage, ob sich diapausierende Raupen überhaupt infizieren lassen, interessierte deshalb vor allem, in welchem Ausmass die Infektionsdosis im Vergleich zu Langtagtieren allenfalls reduziert werden könnte. Zu diesem Zweck wurden L_4 aus Kurz- und Langtagzuchten (s. 1.1) mit einer minimalen (6×10^3 VK/ml) und einer 100fach höheren Dosis durch Zwangsfütterung infiziert (s. 1.3.1).

Die in Tab. 4 zusammengefassten Ergebnisse zeigen, dass diapauseinduzierte Raupen infiziert werden können und dass dazu eine etwa 5mal niedrigere Infektionsdosis benötigt wird als für die bei Langtag gezüchteten Larven. Die kurztagbedingte Verlängerung des Larvenstadiums bei den Diapausierenden bewirkt, dass schon eine geringe Infektionsdosis von 600 VK pro L_4 100% Mortalität auslösen kann.

Bei der Diagnose der Virustoten wurde ersichtlich, dass 5–15% der Tiere sowohl aus den Kurz- als auch den Langtagzuchten vor dem Absterben zwar keinen Cocon mehr bilden können, sich aber doch noch einzuspinnen vermögen.

2.2.2 Das Spinnverhalten bei infizierten Raupen unter Kurztagbedingungen

Das Einspinnen viröser Raupen vor dem Absterben ist für die Virusgewinnung unvorteilhaft, da viröse Kadaver nicht leicht aus den Gespinsten genommen werden können, sondern häufig zerfliessen. Dazu kommt, dass diapauseinduzierte Larven eine intensivere Spinntätigkeit entfalten als Langtagsraupen. Dies zeigt sich auch im Umstand, dass der Cocon der ersteren dichter und grösser gesponnen wird als jener der letzteren (HANSEN & HARWOOD, 1968). Es wurde deshalb untersucht, ob sich die Spinntätigkeit der diapauseinduzierten L_5 eventuell reduzieren lasse, wenn der Lichtregimewechsel und damit die Diapauseinduktion erst möglichst spät vollzogen werde. In diesem Sinne wurden bei Langtag gezüchtete Raupen des 4. und 5. Stadiums im Tauchverfahren (s. 1.3.2) infiziert (10^6 VK/ml) und erst nachträglich unter Kurztagbedingungen weitergezüchtet.

Tab. 4: Infektion 3 Tage alter L_4 aus Kurz- (KT) und Langtagzuchten (LT) durch Zwangsfütterung.

Lichtregime	Virus-dosis pro L4	N	Virustote Larven in %*	Ueberlebende Diapausen in %	Puppen in %
KT	6 VK	47	41	59	-
LT	6 VK	51	11	-	89
KT	600 VK	44	100	-	-
LT	600 VK	45	94	-	6

* Geschätzte LD_{50}-Werte: KT = 7 - 9 VK/ml; LT = 40 - 50 VK/ml

Tab. 5: Einfluss des Zeitpunktes der Diapauseinduktion auf das Einspinnverhalten von Raupen (Infektionsdosis 10^6 VK/ml; allgemein 100 % Mortalität).

Stadium und Alter der Raupen	N	Anteil L4	Virustote unter Gespinst
L4, 3 Tage	52	14 %	15 %
L5, 1 Tag	52	-	15 %

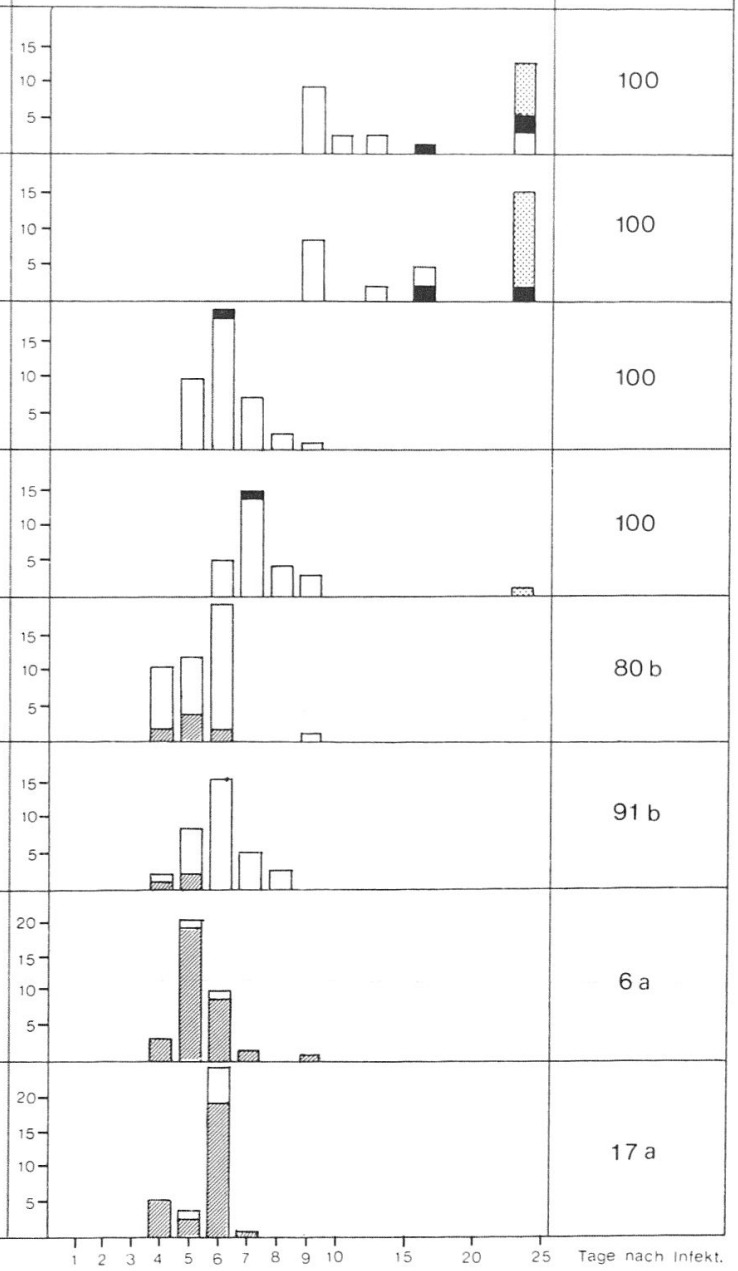
Der verzögerte Beginn der Kurztagbedingungen vermochte jedoch das Auftreten von Virustoten unter Gespinsten nicht zu reduzieren (Tab. 5). Bei einer Endmortalität von 100% bei beiden Infektionsstadien vermochten 14% der jüngeren L_4 keine Häutung mehr durchzumachen, was darauf hindeutet, dass die verwendete Infektionsdosis eher etwas zu hoch war. Effektiv liess sich durch eine Senkung der Viruskonzentration auf 10^5 VK/ml die L_4-Mortalität reduzieren (vergl. Tab. 6: 3 Tage alte L_4).

2.2.3 Einfluss von Infektionsdosis und Raupenalter auf die Pathogenese

Da bei dem in Zuchten unvermeidbaren Stadiengemisch nur wenige Altersklassen durch eine Virusdosis optimal infiziert werden können, ist einmalige Infektion von Raupenpopulationen problematisch. Ziel jeder Virusproduktionsmethode muss es aber sein, mit dem geringsten Virusaufwand für die Infektion einen maximal grossen Ertrag zu erreichen, d.h. die Raupen sollten erst im völlig ausgewachsenen Zustand sterben. Dies würde aber gestaffelte Infektion der bestgeeigneten Raupenstadien und damit zwangsläufig das Sortieren des Tiermaterials voraussetzen,

Tab. 6: Einfluss des Raupenalters und der Infektionsdosis auf die Pathogenese.

Stadium	Alter, Tage	Virus-konz. VK/ml	N	N'	Verlauf der Pathogenese (N' absolut)	L5-Anteil in% *
L5	3	10^7	32			100
		10^5	36			100
	1	10^7	36			100
		10^5	27			100
L4	3	10^7	41			80 b
		10^5	44			91 b
	1	10^7	40			6 a
		10^5	42			17 a



*Gleiche kleine Buchstaben bezeichnen nicht signifikante, verschiedene Buchstaben signifikante Unterschiede mit $P < 0{,}001$

□ = Virustote L5, ▨ = Virustote L4, ■ = Mortalität durch Bakterien,

▒ = Diapausierende

was sehr zeitaufwendig wäre. Es wurde deshalb untersucht, ob sich bei diapauseinduzierten Raupen durch optimale Kombination von Raupenalter und Infektionsdosis der Spielraum der Pathogenese so erweitern liesse, dass ein Optimum an grossen, virösen Kadavern erreicht werden könnte. Zur Klärung der Versuchsfrage

Tab. 7: Einfluss des Raupenalters und der Infektionsdosis auf das Gewicht virustoter Raupen.

Stadium	Alter in Tagen	Virus-Konz. VK/ml	N	Durchschnittsgewicht* virustoter Raupen in mg		Virusmortalität in %
				L4	L5	
				$\bar{x}$ s	$\bar{x}$ s**	
L4	1	10^5	42	30,0 ± 7,0	***	100
L4	1	10^7	40	21,6 ± 6,3	***	100
L4	3	10^5	44	***	73,8 ± 13,1 b	100
L4	3	10^7	41	***	51,7 ± 20,1 a	100
L5	1	10^5	41		61,6 ± 15,0 a	98
L5	1	10^7	36		53,7 ± 13,7 a	100
L5	3	10^5	36		64,4 ± 8,2 a	61
L5	3	10^7	32		60,2 ± 7,8 a	75

* Gleiche, kleine Buchstaben bezeichnen nicht signifikante Unterschiede, während verschiedene, kleine Buchstaben oder deren Fehlen Signifikanz mit $P < 0,05$ bezeichnen.

** s = Streuung

*** Für die Auswertung zu geringe Raupenanteile (vergl. Tab. 6)

wurden je 2 diapauseinduzierte Altersklassen von L_4 bzw. L_5 durch Tauchen in Virussuspension mit 10^5 und 10^7 VK/ml infiziert.

Abgesehen von den beiden Varianten mit 3 Tage alten L_5 und der Variante von 1 Tag alten L_5, die mit einer Konzentration von 10^5 VK/ml infiziert wurden, führten die verwendeten Viruskonzentrationen durchwegs zu 100% Mortalität (Tab. 6: Diapausierende; Tab. 7). Wie Tab. 6 zeigt, beeinflusst das Alter der Raupen beim Infektionszeitpunkt sowohl die Intervallänge als auch den Verlauf des Absterbens, vor allem bei den Varianten mit 3 Tage alten L_5. Eine Verzögerung des Infektionszeitpunktes um 1 bis 2 Tage bei den L_4 ergab einen bedeutend höheren Anteil von L_5. Hingegen zeigten verschiedene Infektionsdosen bei gleichaltrigen L_4 nur tendenzmässig erhöhte L_5-Anteile. Zwecks Abschätzung des Virusertrages wurden die Raupenkadaver gewogen (Tab. 7). Dieses Vorgehen ist insofern gerechtfertigt, als bei offensichtlicher Virose Raupengewicht und Virusertrag befriedigend korreliert sind. Bei allen Verfahren lieferte die niedrige Infektionskonzentration höhere Kadavergewichte, wobei das Verfahren mit 3 Tage alten L_4, die mit 10^5 VK/ml infiziert wurden, die schwersten Tiere ergab und somit eine besonders grosse Virusausbeute versprach. Die Gewichtsverhältnisse bei den als L_4 und L_5 gestorbenen Larven zeigen zudem, dass Kadaver durchschnittlich doppelt so schwer werden, wenn der Tod erst in einem späteren Stadium eintritt.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass es bei einmaliger Tauchinfektion vorteilhaft ist, wenn sich die infizierte Population grösstenteils aus reifen, 2 bis 3 Tage alten L_4 und jungen, maximal 1,5 Tage alten L_5 zusammensetzt. Dabei darf der Anteil reifer L_4 zum Infektionszeitpunkt etwas überwiegen, wenn man bedenkt,

dass nicht mehr alle 3 Tage alten L_5 infiziert werden können. Die im Versuch gefundenen Mortalitätswerte deuten an, dass die Virusmenge für die Tauchinfektion den Wert von 10^5 VK/ml nicht übersteigen soll.

2.2.4 Nahrungsentzug bei infizierten Raupen

Bei der Verwendung von L_4 und L_5 für die Infektion liegen Raupen vor, die keineswegs ausgewachsen sind. Ein maximales Raupenvolumen kann deshalb nur erreicht werden, wenn nach der Infektion weiterhin Nahrung geboten wird. Diese durchgehende Fütterung bringt jedoch einen erheblichen Arbeitsaufwand mit sich, da die Kadaver kurz nach dem Absterben täglich eingesammelt werden müssen. Andernfalls zerfliessen sie auf dem Medium, wobei ein Grossteil der Viren verloren geht. Der grosse Arbeitsaufwand beim täglichen Einsammeln liesse sich reduzieren, wenn die Raupen in einem Arbeitsgang, gleich anschliessend an die Infektion vom Medium getrennt würden. Die virösen Kadaver könnten auf diese Weise gesamthaft nach dem Absterben aller Raupen gewonnen werden.

Nachdem Untersuchungen von SCHNYDER (1967) gezeigt haben, dass die Entwicklung einer Kernpolyedrose in *Sterrha seriata* (SCHRCK.) beeinträchtigt wird, wenn die Raupen nach der Infektion nicht weitergefüttert werden, wurde in einem ergänzenden Versuch abgeklärt, ob auch bei *L. pomonella* die Virusproduktion in ähnlichem Ausmass durch den Nahrungsentzug betroffen werde.

Zu diesem Zweck wurden L_4 und L_5 durch Eintauchen in eine Virussuspension (5×10^6 VK/ml) infiziert, anschliessend vom Medium entfernt und in einer feuchtigkeitsgesättigten Atmosphäre gehalten. Die feuchte Umgebung sollte den Gewichtsverlust durch Transpiration reduzieren. Als Kontrolle wurden sonst gleichbehandelte Tiere nach der Infektion weitergefüttert.

Die bewusst hoch gewählte Infektionsdosis konnte sich bei Nahrungsentzug in keinem Fall vollständig durchsetzen (Tab. 8). Zudem liegen die Mortalitätswerte durchwegs tiefer als bei den gefütterten Kontrollen. In allen Fällen waren die Kada-

Tab. 8: Beeinflussung der Mortalität durch Nahrungsentzug nach der Infektion.

Stadium	Alter Tage	Virus-Konz. VK/ml	Virustote Raupen in % mit Nahrung	Virustote Raupen in % ohne Nahrung
L4	3	$5 \cdot 10^6$	100 N = 42	75 N = 40
L5	1	$5 \cdot 10^6$	100 N = 39	83 N = 41
L5	2	$5 \cdot 10^6$	86 N = 42	66 N = 44

ver auch sehr leicht. Die Ergebnisse zeigen, dass eine optimale Virusvermehrung nur möglich ist, wenn den Raupen nach der Infektion Nahrung geboten wird.

2.2.5 Infektion von L_6 mit Viren

Da der Virusertrag durch das Volumen des virösen Kadavers massgebend beeinflusst wird, ist es naheliegend, bereits bei der Infektion möglichst grosse Raupen zu verwenden. Maximale Raupenvolumina können beispielsweise erreicht werden, wenn Raupen durch Applikation von Juvenilhormon zu einer zusätzlichen Larvenhäutung gezwungen werden. Zur Abklärung ob und in welchem Ausmass sich die übergrossen L_6 überhaupt mit Viren infizieren lassen, wurden solche durch einmalige, topikale Applikation (50 µg) des Juvenilhormonmimetikums Altosid® bei frisch gehäuteten L_5 gezüchtet. Von 35 L_6 wurden 20 durch das übliche Tauchverfahren, der Rest mittels Zwangsfütterung infiziert. In beiden Fällen wurde die gleiche Virussuspension (10^7 VK/ml) verwendet.

Trotz hoher Infektionsdosis starben bei beiden Verfahren nur rund die Hälfte der Tiere an Virose (Tab. 9). Immerhin zeigen die Versuche, dass sich L_6 mit Viren infizieren lassen. Der Aufwand an Virusmaterial und Arbeit wäre jedoch viel zu gross, denn L_5 ergeben nach Infektion mit einer 100mal geringeren Virusmenge 98% Mortalität (Tab. 7). Wie die Tab. 4 zeigt, konnte eine entsprechende Mortalität bei diapauseinduzierten L_4 durch Zwangsfütterung mit Viren sogar schon mit einer 1670mal geringeren Dosis erreicht werden.

2.2.6 Diskussion

Nach den vorliegenden Resultaten eignen sich diapauseinduzierte Raupen gut für die Infektion mit dem Granulosisvirus. Ein maximaler Virusertrag lässt sich aber nur dann erreichen, wenn die Infektionsstadien und die Viruskonzentration gut aufeinander abgestimmt sind. Neben der vorzüglichen Eignung von jungen L_5 können für die Infektion auch L_4-Stadien verwendet werden, doch sollen dabei nicht, wie von KELLER (1973) empfohlen, in erster Linie frisch gehäutete, sondern mit Vorteil ausgewachsene L_4 infiziert werden. Erstere sterben viel zu häufig bereits

Tab. 9: Infektion von L_6 mit Viren.

Infektion 10^7 VK/ml	N	Mortalität Virose	Mortalität Bakterien	Puppen	Halbpuppen[a]
Tauchen	20	9	3	1	7
Injektion[b]	15	6	4	2	3

[a] Uebergangsstadien mit teils larvalen, teils puppalen Merkmalen

[b] Zwangsfütterung durch perorale Mikroinjektion

als L_4, während sich die älteren L_4 nach der Infektion meistens häuten und L_5 mit maximalem Kadavergewicht ergeben. Der Vorschlag, bei der Infektion besonders geeignete Stadien zu verwenden, setzt natürlich voraus, dass durch Beobachtung der Raupenpopulation der Infektionszeitpunkt möglichst optimal getroffen wird (s. 2.3).

Die Spinntätigkeit bei diapauseinduzierten Raupen im fortgeschrittenen letzten Stadium ist von untergeordneter Bedeutung, da sich der an und für sich schon bescheidene Einspinnprozentsatz von 5–15% durch vermehrte Verwendung von L_4-Infektionsstadien noch reduzieren lässt. Bei diesen wird durch das frühe Anlaufen der Virose die Spinntätigkeit im folgenden 5. Stadium so stark gehemmt, dass sie nicht mehr störend in Erscheinung tritt. Schwerwiegender ist der Umstand, dass Raupen nach der Infektion weitergefüttert werden müssen. Der daraus resultierende Mehraufwand scheint jedoch gerechtfertigt, wenn man bedenkt, wie drastisch der Virusertrag bei Nahrungsentzug sinkt.

Der Einsatz von L_6-Larven kommt für eine Virusproduktion kaum in Frage, da trotz grosser, viröser Kadaver auch bei sehr hohen Infektionsdosen keine befriedigende Mortalität erzielt werden konnte. Zudem darf nicht übersehen werden, dass die Applikation von Juvenilhormon einen zusätzlichen Aufwand an Arbeit und Material darstellt.

2.3 Aufbau einer Massenzucht im Hinblick auf die Produktion von Viren

Die Vermehrung des spezifischen GV durch Infektion von Apfelwicklerraupen ist zur Zeit die einzige Methode, die es erlaubt, das Pathogen in grösseren Mengen herzustellen. Untersuchungen von H.G. Miltenburger, (mündl. Mitt.) haben nämlich gezeigt, dass das Virus in Apfelwickler-Zellinien nicht repliziert. Überhaupt scheint die Produktion von GV *in vitro* besondere Schwierigkeiten zu bereiten, da es bis anhin lediglich gelungen ist, NPV in permanenten Zellinien zu produzieren (Gardiner & Stockdale, 1975, Miltenburger *et al.,* 1977). Beim Apfelwickler sind die Voraussetzungen zu einer Virusproduktion *in vivo* insofern günstig, als für die genetische Bekämpfung durch Freilassung steriler Männchen bereits Massenzuchtmethoden entwickelt worden sind. Bei dieser Methode werden sehr grosse Faltermengen benötigt (Wildbolz & Mani, 1975). Ausdünnungs-Äpfel als natürliches Substrat für die Massenzucht von Apfelwicklern wurden besonders in den USA verwendet (Hamilton & Hathaway, 1966). Obwohl die Methode auf Grund des geringen Zeitaufwandes lange Zeit praktiziert wurde (Hathaway, 1967), kommt deren Verwendung für die Virus-Grossproduktion nicht in Frage, da die Infektion der Raupen im Apfel drin praktisch unmöglich sein dürfte.

Im Bestreben, von Zuchtäpfeln unabhängig zu werden, wurden verschiedene semisynthetische Medien für die Zucht von Apfelwicklerraupen zusammengestellt (Redfern, 1964; Nvaon, 1968; Sender, 1969), wobei man vorerst der Ansicht war, dass die Raupe zu einer optimalen Entwicklung Apfelfleisch, zumindest jedoch die Kerne der Frucht benötige. Schliesslich zeigte es sich jedoch, dass das Weglassen von Apfelbestandteilen den Zuchterfolg keineswegs schmälert (Rock, 1967; Schmid-Mattenberger, 1968; Sender, 1970). Diese Erkenntnis ist bedeutungsvoll bei der Verwendung von Massenzuchtmedien, werden doch durch Weglassen von Apfelbestandteilen lästige Infektions- und Vergiftungsquellen im Medium stark reduziert.

Die ersten Massenzuchten des Apfelwicklers wurden schliesslich von BRINTON *et al.* (1969) in Kanada aufgebaut. Sie modifizierten dazu ein Medium, das von IGNOFFO (1963) für die Zucht von *Trichoplusia ni* HUEBNER entwickelt worden war. Interessant am Medium von BRINTON *et al.* ist, dass der teure Agar durch Sägemehl ersetzt wurde und die Zucht in offenen Schalen erfolgen konnte.

Leider eignen sich diese gross angelegten Zuchten nur bedingt zur Produktion von Viren, da die dabei verwendeten Zuchtmedien spezifisch auf die Gewinnung von vitalen Faltern ausgerichtet sind, welche das Substrat erst verlassen, wenn die Entwicklung abgeschlossen ist, d.h. wenn die Tiere nicht mehr mit dem Granulosisvirus infiziert werden können. Die Infektion muss jedoch spätestens im frühen 5. Stadium erfolgen, wenn die Raupen noch im Medium leben. Bei einer Massenzucht zur Produktion von Viren dient deshalb die volle Entwicklung eines Teils der Tiere bis zum Falter lediglich der Erhaltung der Grundzucht, aus welcher die für die Virusvermehrung benötigten Raupen fortwährend abgezweigt werden. Wenn diese Raupen das günstigste Infektionsalter erreicht haben, sind sie noch nicht bereit das Medium selbsttätig zu verlassen. Sie müssen zwecks Infektion entweder vom Medium getrennt oder aber in diesem infiziert werden. Diese angedeuteten Schwierigkeiten mögen zeigen, dass der Wahl des Zuchtmediums im Zusammenhang mit der Produktion von Viren grosse Bedeutung zukommt.

Im Hinblick auf die Produktion von Viren wurden folgende Zuchtmedien des Apfelwicklers bezüglich deren Eignung miteinander verglichen:

Medium 1: Das bereits erwähnte Einzelzuchtmedium auf Agarbasis nach HUBER *et al.*, (1972)

Medium 2: Eine von Drs. E. MANI und TH. WILDBOLZ an der Eidg. Forschungsanstalt Wädenswil entwickelte Modifikation des Massenzuchtmediums von BRINTON *et al.*, (1969) (WILDBOLZ & MANI, 1971).

Da die Zusammensetzung der beiden Medien und auch deren bisherige Verwendung sehr verschiedenartig ist, kann es nicht verwundern, wenn sie im Zusammen-

Tab. 10: Vergleichende Betrachtung von Medium 1 und 2 bezüglich Eignung zur Virusproduktion.

	Vorteile	Nachteile
Medium 1	Geschlossenes Zuchtsystem Raupenentwicklung auf bzw. dicht unter der Mediumoberfläche	Lediglich in Einzelzuchten erprobt
Medium 2	Verwendung in Massenzuchten	Offenes Zuchtsystem Raupenentwicklung im Medium drin

hang mit der Methodik zur Virusproduktion Vor- und Nachteile aufweisen (Tab. 10). Das erste Medium ist relativ teuer und wurde nie für die Massenzucht getestet. Es hat jedoch den Vorteil, dass sich die Raupen gewöhnlich nicht in das Medium einbohren, so dass sie, wenn sie das für die Infektion günstigste Stadium erreicht haben, leicht zugänglich sind. Dies gilt nicht für das zweite Medium, das sich dafür bereits für Massenzuchten bewährt hat.

2.3.1 Versuche zur Wahl des Massenzuchtmediums

Versuche mit dem Medium auf Agarbasis

Bei dem lediglich in Einzelzuchten erprobten Agarmedium musste in erster Linie abgeklärt werden, ob dessen Verwendung auch in einer Massenzucht in Frage komme.

Durchsichtige Acetatschachteln mit Deckel (200 x 200 x 35 mm) wurden 6–8 mm hoch mit Medium beschichtet. Durch den Einsatz eines Kartonrasters mit 144 quadratischen Einheiten (16 x 16 x 15 mm) wurde die Mediumoberfläche in einzelne Kompartimente unterteilt, wodurch der Kannibalismus der wanderfreudigen Eilarven reduziert werden konnte. Die Zuchtbedingungen entsprachen sonst denjenigen gewöhnlicher Einzelzuchten (HUBER *et al.,* 1972), wobei allerdings den hygienischen Verhältnissen erhöhte Aufmerksamkeit geschenkt wurde. Neben der üblichen Eiblatt- und Materialdesinfektion wurden die Rastereinsätze aus Karton mit Paraffin beschichtet, wodurch Pilzsporen am Karton als Infektionsquellen weitgehend eliminiert werden konnten. Sämtliches Zuchtmaterial, das mit dem Medium in direkte Berührung kam, wurde in einer sterilen Impfkammer aufbewahrt. Ebenso wurde das Beschichten und Öffnen der Acetatbehälter unter sterilen Bedingungen vorgenommen. Diese intensiven, hygienischen Massnahmen waren notwendig, weil sich sonst bereits nach dreitägiger Raupenentwicklung vereinzelte Bakterienkolonien auf den Medien entwickelten.

Die intensiven Desinfektionsmassnahmen erfüllten die in sie gesetzten Erwartungen aber nur teilweise. Bakterieninfektionen konnten wohl total eliminiert werden, doch traten bereits nach siebentägiger Zucht erste Kolonien von *Aspergillus niger* auf, die überdies von den Raupen relativ rasch verschleppt wurden. Die geschlossenen Zuchteinheiten schliessen wohl die Umgebungsluft als Infektionsquelle grösstenteils aus, doch herrscht in den Zuchteinheiten selbst ein sehr feuchtes Klima, das Pilzinfektionen sehr begünstigt. Infektionsversuche deuteten darauf hin, dass die Primärinfekte grösstenteils von den Eiblättern ausgehen. Bezogen auf die angesetzten L_1 lieferte die Zucht im Durchschnitt einen Falterertrag von 40%.

Versuche mit dem Massenzuchtmedium der Eidg. Forschungsanstalt Wädenswil

Die Produktion von bisher nahezu 1 Mio. Faltern während der letzten 3 Jahre mag beweisen, dass mit dem zweiten Medium unter nicht sterilen Zuchtbedingungen in offenen Schalen mit Erfolg gezüchtet werden kann (WILDBOLZ & MANI 1971, 1975). Selbstverständlich müssen auch bei diesem System die hygienischen Verhältnisse streng kontrolliert werden, doch ist die Kontaminationsgefahr bei diesem Medium recht klein. Bakterieninfektionen fehlen gänzlich und Verpilzung setzt nur dann ein, wenn infolge ungenügender Kontrolle die Sporendichte in der Umluft zu hoch wird oder aber die Feuchtigkeitsverhältnisse nicht richtig angepasst sind. Der

letzte Punkt ist wichtig, denn die relativ geringe Kontaminationsgefahr bei Medium 2 ist grösstenteils auf die oberflächliche Austrocknungsschicht zurückzuführen.

Leider vollzieht sich die Raupenentwicklung fast vollständig im Innern dieses Mediums, so dass die infektionsbereiten Tiere vorerst von diesem separiert werden müssen. Diesbezügliche Versuche haben aber gezeigt, dass mit Wärme ein befriedigender Prozentsatz der Raupenpopulation aus dem Medium getrieben werden kann (s. 2.4.1).

Die vergleichenden Versuche führten zum Schluss, dass die einfachere Kontrolle der Zuchthygiene des Mediums 2 von so ausschlaggebender Bedeutung sei, dass sich der Aufwand für das Austreiben der infektionsbereiten Raupen dafür rechtfertige.

Grundmethodik der Massenzucht

Die Publikation der in der Forschungsanstalt Wädenswil entwickelten Methode wird vorbereitet (MANI, 1978). Zum besseren Verständnis der folgenden Versuche wird sie hier nur kurz erläutert.

Das Zuchtmedium auf Sägemehlbasis wird in einem heizbaren Rührwerk zubereitet und anschliessend in Portionen zu 2,5 kg in Zuchtschalen (36 x 30 x 5 cm) abgefüllt. Dies ergibt eine Schichtdicke des Mediums von ca. 2,5 cm. Zur Verlangsamung des Austrocknungsprozesses wird die Mediumoberfläche mit einem Paraffinfilm versehen (HOWELL, 1967). Die Medien werden nach 3 Tagen mit Streifen aus Wachspapier mit schlüpfreifen Eiern des Apfelwicklers belegt. Es wird darauf geachtet, dass je Zuchtschale 800–1000 Eier vorhanden sind. Anschliessend werden die Schalen in einen Zuchtraum von 26 °C und 70–90% rH gebracht. Nach dem Schlüpfen bohren sich die Eiräupchen in das Medium ein, wo sie sich nach vollzogener Raupenentwicklung verpuppen. Die Gestelle mit den Zuchtschalen werden zu diesem Zeitpunkt mit Wänden umgeben und die schlüpfenden Falter werden mit Hilfe von Licht und bewegter Luft gesammelt. Zur Eiablage werden die Falter in eine spezielle Vorrichtung gebracht, wo sie die Eier auf glattes Wachspapier ablegen.

Im folgenden wird die Grundzucht als Massenzucht- bzw. Raupenproduktionseinheit bezeichnet.

2.3.2 Festlegung der Zuchtbedingungen für eine Massenzucht zur Virusgewinnung

Die Bedeutung der Mediumstruktur

Beim Aufbau einer Massenzucht mit dem Medium auf Sägemehlbasis zur Virusgewinnung können die an der Eidg. Forschungsanstalt Wädenswil angewendeten Zuchtbedingungen nicht vorbehaltlos übernommen werden, da auf Grund der apparativen Einrichtungen, die je nach Labor sehr verschieden sein können, die fein aufeinander abgestimmten Zuchtbedingungen kaum auf Anhieb kontrollierbar sind. In diesem Zusammenhang haben eigene Erfahrungen gezeigt, dass Anpassung und Fixierung der verschiedenen Zustandsgrössen auf eine definierte, horizontale Schichtung im Medium ausgerichtet sein müssen.

Eine optimale Schichtung des Mediums, wie in Abb. 7 dargestellt, ist für die Anzucht der Raupen von grosser Bedeutung. Die oberflächliche Trockenschicht, die bei kontrollierter Zuchthygiene weitgehenden Schutz vor Bakterien- und Pilzinfektionen bietet, soll möglichst dünn sein, da einerseits die in diesem Bereich

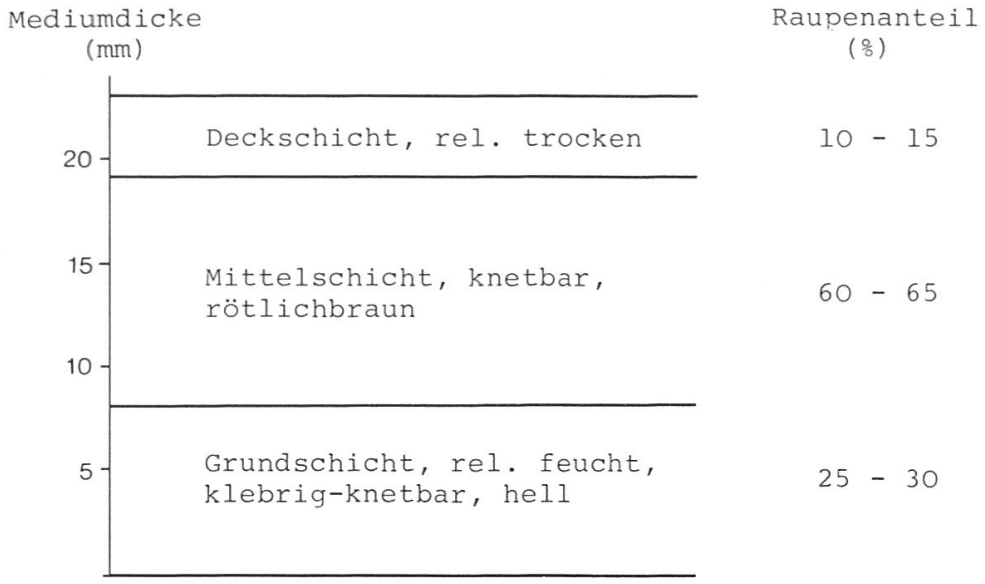


Abb. 7: Verteilung der Raupen in einem Medium mit optimaler Schichtung.

lebenden Raupen relativ klein bleiben und andererseits durch eine Ausdehnung der Trockenschicht die Dicke der für die Raupenentwicklung wichtigen feuchten Schichten reduziert würden. Die mittlere Mediumschicht mit knetbarer Konsistenz und rötlichbrauner Färbung beherbergt den grössten Teil der Raupenpopulation und soll demzufolge mindestens 10 mm dick sein. Die ebenfalls knetbare, jedoch heller gefärbte, klebrige Grundschicht dient als Wasserreserve zur Befeuchtung der Mittelschicht. Die hellere Färbung der Grundschicht beruht auf dem hohen Wassergehalt, der dem Luftsauerstoff den Zutritt erschwert. Obwohl sich die Raupen hauptsächlich in der mittleren Schicht aufhalten, weist doch praktisch jeder Fressgang eine Fortsetzung in die sehr feuchte Grundschicht auf.

Beeinflussung der Mediumstruktur durch nassere Zubereitung

Ein um 20% erhöhter Wasserzusatz bei der Mediumbereitung erleichtert nicht nur das Abfüllen der Zuchtschalen, sondern lässt auch bei tolerierbarer Austrocknung der Mediumsoberfläche eine Reduktion der relativen Feuchtigkeit der Umgebungsluft von 90-95% auf 80-85% rH zu, was die Gefahr von Pilzinfektionen sehr stark senkt. Leider lässt dabei aber auch die Schichtung des Mediums zu wünschen übrig, da die nasse Grundschicht auf Kosten der wichtigen Mittelschicht zu mächtig bleibt. Dies hat zur Folge, dass die Austreibrate der Larven abnimmt. Zudem macht es den Anschein, dass latente Virosen durch relativ nasse Medien aktiviert werden.

Obwohl deshalb eine Kontrolle des Austrocknungsprozesses über erhöhte Wasserzugabe bei der Mediumbereitung nicht in Frage kommt, brachten diese Versuche doch den Hinweis, dass eine relativ niedrige Luftfeuchtigkeit jegliches Pilzwachstum zu unterdrücken vermag.

Beeinflussung der Mediumstruktur durch Abdeckung und Wasserzufuhr während der Anzucht

Da eine relativ niedrige Luftfeuchtigkeit das Verpilzungsproblem weitgehend zu lösen vermag, dürfte es sich lohnen, den damit verbundenen beschleunigten

Austrocknungsprozess unter Kontrolle zu bringen. Abgesehen von einer relativ nassen Mediumbereitung, kann der Wassergehalt im Medium durch Abdeckung der Zuchtschalen bzw. durch Wasserbeschickung während der Anzucht beeinflusst werden.

Bei der relativen Luftfeuchtigkeit von 80–85% wurden neben 2 offen gehaltenen Zuchtschalen zwei Einheiten sofort nach dem Einfüllen des Mediums mit Cellophanfolie abgedeckt. Bei 2 weiteren Schalen wurde über einen perforierten Doppelboden sieben Tage nach dem Schlüpfen der L_1 von unten her 50 ml Wasser an das Medium abgegeben.

Nach 14 Tagen wurden bei allen 3 Verfahren die Medien sowie die darin befindlichen Raupen untersucht. Im Zusammenhang mit der relativ niedrigen Luftfeuchtigkeit konnte lediglich beim Verfahren mit Abdeckung eine einigermassen gute Struktur des Mediums verzeichnet werden. Beim offenen Medium hatte sich eine zu mächtige Austrocknungsschicht gebildet, wogegen die Medien bei der Wasserbeschickung, infolge der unterschiedlichen Kapillarität der Mittelschicht, teilweise durchnässt wurden, was die Entwicklung von Pilzen an der Oberfläche begünstigte. Die in Tab. 11 aufgeführten Resultate zeigen, dass die Raupen in abgedeckten Zuchtschalen, trotz einer akzeptablen Mediumstruktur, sehr schlecht gedeihen, was sich sowohl im geringen Gewicht, als auch am hohen Anteil der im Medium tot aufgefundenen Raupen äussert.

Beeinflussung des Austrocknungsprozesses durch Paraffinierung der Mediumoberfläche

Nach der Empfehlung von HOWELL (1967) wird bei der Zubereitung des Zuchtmediums als abschliessende Massnahme die Mediumoberfläche mit einem dünnen Paraffinfilm versehen, indem warmes, flüssiges Paraffin auf das Medium gesprüht wird. Diese Schutzschicht kann jedoch bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von nur 80–85% den oberflächlichen Austrocknungsprozess nur ungenügend verzögern. Es wurde deshalb geprüft, ob der gewünschte Austrocknungsgrad durch stärkere Paraffinierung erreicht werden könne.

Niedrig schmelzendes Paraffin (Smp. ca. 50 °C) wurde auf 70 °C erhitzt und mit einem gläsernen Sprühkopf in 3 Schichtdicken auf je 2 Zuchtmedien aus 30 cm Abstand gesprüht. Bei der dünnsten Wachsschicht wurden 6 Streifen appliziert,

Tab. 11: Beeinflussung der Raupenentwicklung durch Abdecken der Medien bezw. Wasserzufuhr von unten. (Zuchtbedingungen 28°C, 80–85% r.H.)

Verfahren	N	Raupengewicht nach 14 Tagen in g	Mortalität (%)
Abdeckung	86	9,4 ± 5,3	28
Wasserzufuhr	92	34,1 ± 11,4	5
unbedeckt	81	30,6 ± 12,4	4

wobei die Sprühdauer für jeden einzelnen Streifen 4 Sekunden betrug. Die beiden anderen Wachsfilme setzten sich aus 12 bzw. 18 Streifen zusammen. Die Einhaltung eines Sprühabstandes von 30 cm ist insofern wichtig, als die beim Verlassen der Düse flüssigen Wachströpfchen als feste Teilchen auf dem Medium auftreffen sollen, da die Wachsschicht keineswegs hermetisch abschliessen, sondern einen gewissen Gasaustausch zwischen Luft und Medium erlauben soll.

Aus den Ergebnissen in Tab. 12 geht hervor, dass die Austrocknung bzw. Schichtung der Medien durch verschieden dichte Paraffinfilme beeinflusst werden kann, wobei der Vergleich der 3 Verfahren zeigt, dass bei Applikation von 12 Paraffinstreifen das Medium am ehesten die anzustrebende Idealschichtung erhält.

Tab. 12: Beeinflussung der Mediumstruktur durch verschieden dicke, oberflächlich applizierte Paraffinfilme.

Anzahl Sprühungen	Deckschicht (mm)	Mittelschicht (mm)	Grundschicht (mm)
6 Streifen	4 - 5	9 - 10	5 - 6
12 Streifen	3 - 4	9 - 10	6 - 7
18 Streifen	3 - 4	8 - 9	8 - 9
Idealstruktur	3 - 4	10 - 11	7 - 8

Einfluss von Luftfeuchtigkeit und Paraffinierung auf die Eientwicklung und den Puppenertrag

Durch Applikation einer geeigneten Paraffinmenge kann bei konstanter Luftfeuchtigkeit eine optimale Mediumstruktur reproduziert werden, was für die Entwicklung einer ergiebigen Raupenpopulation beste Voraussetzungen schaffen sollte. Sicherheitshalber wurde dennoch untersucht, inwiefern der verstärkte oberflächliche Wachsfilm die Raupenentwicklung vom Ei bis zur Puppe beeinflusst.

Nach Auszählung der Eier auf Eiblättern und Belegung der Medien mit diesen, wurden je 2 Zuchtschalen bei 65 bzw. 85% rH inkubiert, wobei jeweils eine der beiden Schalen mit 12 Wachsstreifen behandelt worden war.

Die in Tab. 13 aufgeführten Resultate zeigen, dass die Schlüpfrate der L_1 durch relativ hohe Luftfeuchtigkeit verbessert werden kann, während der Paraffinfilm die Aufwachsrate positiv beeinflusste. Möglicherweise wirkt die Paraffinierung bei höherer Luftfeuchtigkeit überdies der Verpilzungsgefahr entgegen.

Notwendigkeit einer definierten Luftführung während der Raupenanzucht

Bei der Installation einer Massenzucht bereitet die Festlegung einer geeigneten Luftumwälzung in den Zuchträumen am meisten Schwierigkeiten

Tab. 13: Einfluss von Paraffinierung (12 Streifen) und Luftfeuchtigkeit auf das Schlüpfen der Eilarven und den Puppenertrag.

Paraffin	rel. Luft-feuchtigkeit	Ansatz Eier	geschlüpfte Eilarven (L)	Puppen
	%	N	% von N	% von L
+	65	1468	62[ac]	28[d]
-	65	1780	59[a]	20[e]
+	85	1775	71[b]	29[d]
-	85	1672	64[bc]	[f]

[a-e] Gleiche Buchstaben bedeuten keine, ungleiche Buchstaben jedoch statistisch gesicherte Unterschiede mit $P < 0,05$.

[f] Das Zuchtmedium musste wegen Verpilzung eliminiert werden.

(Dr. E. Mani, pers. Mitt.). Eigene Erfahrungen haben gezeigt, dass konditionierte Luft bei zu rascher Zirkulation die Medien in kurzer Zeit austrocknet, während zu geringe Luftbewegung bei den offenen Medien unweigerlich zu Pilzbesatz führt. Dies zeigte sich besonders eindrücklich beim Versuch, eine Massenzucht in klimatisierten Einheiten ohne Luftumwälzung anzusetzen. Da die Luft lediglich in Abhängigkeit vom sporadischen Dampfeinlass bewegt wurde, sonst aber über den Medien stagnierte, konnten selbst durch Präventivmassnahmen, wie Mediumbereitung bei höherer Temperatur und Abschirmung der Medien von der Laborluft durch Plasticvorhänge, die Verpilzung nicht verhindert werden. Da am Entomologischen Institut der ETH keine Klimaanlage mit regelbarer Luftführung zur Verfügung stand, wurden die Massenzuchteinheiten in eine Klimakammer mit konstant 28 °C gebracht, in der die Luftbefeuchtung durch äusserst feines Versprühen von Wasser (Defensor, Typ 3001) erfolgte. Dies erwies sich als äusserst vorteilhaft. Im Gegensatz zur Luftbefeuchtung mit Wasserdampf wird bei dieser Befeuchtungsmethode die Mediumoberfläche andauernd mit kleinen Wassertröpfchen beliefert, was den Austrocknungsprozess auch bei 80-85% rH verlangsamt. Die Förderleistung des Befeuchters war so eingestellt, dass das Gerät für die Aufrechterhaltung der gewünschten Luftfeuchtigkeit fast andauernd in Betrieb stand und daher gleichzeitig als Ventilator eine geeignete Luftbewegung über den Medien zustande brachte.

2.3.3 Durchführung der Massenzucht

Die Zuchtmethodik wurde, mit Ausnahme der folgenden Modifikationen, von Dr. E. Mani übernommen. Zur Verhinderung von Primärinfektionen durch

Pilze wurden die Trägerstoffe Sägemehl und Papiermasse während zehn Minuten in einem Rührwerk mit Dampfzufuhr statt mit 110 ° mit 150 °C Kesseltemperatur beheizt. Die Paraffinierung der Medien wurde, entsprechend den Ergebnissen des unter 2.3.2 beschriebenen Versuches, verstärkt. Unmittelbar nach dem Abfüllen des Mediums wurden die Zuchtschalen während zwei Tagen bei 15 °C und 40% rH gelagert, wodurch eine optimal dünne, pilzabweisende Trockenschicht an der Mediumoberfläche realisiert werden konnte. Sicherheitshalber wurden die Eistreifen während 5 min mit 10%igem Formalin desinfiziert, 1 h lang gewässert und anschliessend getrocknet. Das Schlüpfen der Eilarven erfolgte während vier Tagen im Dunkeln bei 28 °C und 80–85% rH. Zur präventiven Bekämpfung von Pilz- und Bakterienkontaminationen wurde der Zuchtraum nach jeder abgeschlossenen Raupenentwicklung mit ca. 20 ml Formol bedampft. Desgleichen wurde das Vernebelungsgerät wöchentlich gewaschen und mit 1% Desogenlösung desinfiziert.

Die arbeitsintensiven Desinfektionsmassnahmen drängten sich besonders auf, weil anstelle eines Fungistatikumgemisches aus Sorbin- und Propionsäure nurmehr die erste Komponente den Medien beigemischt wurde. Nach Dr. E. Mani (mündl. Mitt.) führte nämlich Propionsäure im Medium zu reduzierten Puppengewichten. Möglicherweise liesse sich jedoch die Kontrolle der Zuchthygiene vereinfachen durch den Einsatz von Orthophaltan bzw. Orthozid, da nach Untersuchungen von Bathon (1977) bei deren Anwendung pilzfreie Zuchtmedien für *Mamestra brassicae* (L.) bei gleichzeitig normaler Entwicklung der Tiere erzielt werden konnten.

Gemäss den oben beschriebenen Bedingungen konnten sieben lückenlos sich folgende Apfelwicklergenerationen in gut strukturierten, praktisch pilzfreien Medien gezüchtet werden. Je Generation wurden dabei jeweils fünf Zuchtschalen angesetzt von denen jede einen Ertrag von 200–400 Raupen lieferte. Leider musste die Zucht aber bereits nach der siebten Generation unterbrochen werden, da, beginnend in der 4. Generation eine auffällige Mortalität durch Granulosis in Erscheinung trat, die in der 7. Generation rund 80% der vorhandenen Raupen tötete. An sich kann ein enzootisches Auftreten von Granulosis in einer Massenzucht toleriert werden (Brinton *et al.,* 1969), sicher aber nur solange die Viroseinzidenz konstant niedrig bleibt.

Es ist sehr wahrscheinlich, dass die Infektion der Zucht darauf zurückzuführen war, dass während den betroffenen Zuchtgenerationen an unserem Institut Infektionsversuche mit dem Granulosisvirus durchgeführt wurden. In diesem Zusammenhang muss deshalb darauf aufmerksam gemacht werden, dass eine saubere Trennung von Zucht- und Infektionseinheiten eine unabdingbare Voraussetzung für das längerfristige Funktionieren einer Massenzucht ist. Dies ergibt sich schon aus dem Umstand, dass selbst bei nicht auf Virusproduktion ausgerichteten Massenzuchten strengste hygienische Massnahmen erforderlich sind. So werden beispielsweise besonders infektionsgefährdete Einheiten geschützt durch separate Zugänge zu den Zuchträumen (Vago, 1972). Noch weitergehende Vorsichtsmassnahmen sehen neben räumlicher Isolation auch Personaltrennung und Ultraviolett-Schleusen für das Zuchtmaterial vor (Raulstone & Lingren, 1969; Griffin & Linding, 1973). Die Erfahrung hat zudem gezeigt, dass eine Insektenmassenzucht, die als Basis für eine Virusproduktion dient, mit Vorteil separat in einem anderen Gebäude untergebracht wird. Andernfalls riskiert man in vermehrtem Ausmass Infektionen der Grundzucht (Ignoffo, 1973). Aus diesen Gründen wurde nicht mehr weiter versucht, die Grundzucht am Entomologischen Institut weiterzuführen.

Auf Vorschlag und dank dem freundlichen Entgegenkommen der Herren Drs. E. MANI und Th. WILDBOLZ von der Eidg. Forschungsanstalt Wädenswil wurde hinfort eine gute räumliche und personelle Trennung der Virusproduktion von der Tierproduktion dadurch ermöglicht, dass die Medien an der Forschungsanstalt zubereitet, dort auch mit Eilarven aus der Grundzucht belegt und die Raupen während 7 Tagen angezogen wurden.

2.4 ENTWICKLUNG EINER METHODE FÜR DIE GEWINNUNG VON VIREN IN EINER APFELWICKLER-MASSENZUCHT

2.4.1 Vorversuche

Trennung von Massenzuchtraupen vom Medium

Die Verwendung von Massenzuchtraupen für die Virusproduktion setzt voraus, dass diese, vor der Infektion mit Viren, vom Medium getrennt werden (s.2.3). Diesbezüglich sind verschiedene Methoden auf deren Eignung geprüft worden.

Zuchteinheiten, die für die Virusproduktion bestimmt waren, wurden 7 Tage nach dem Eiansatz aus der Grundzucht abgezweigt (s.2.3.3) und zwecks Induktion der Diapause bis zur Raupeninfektion unter Kurztagbedingungen bei 24 °C und

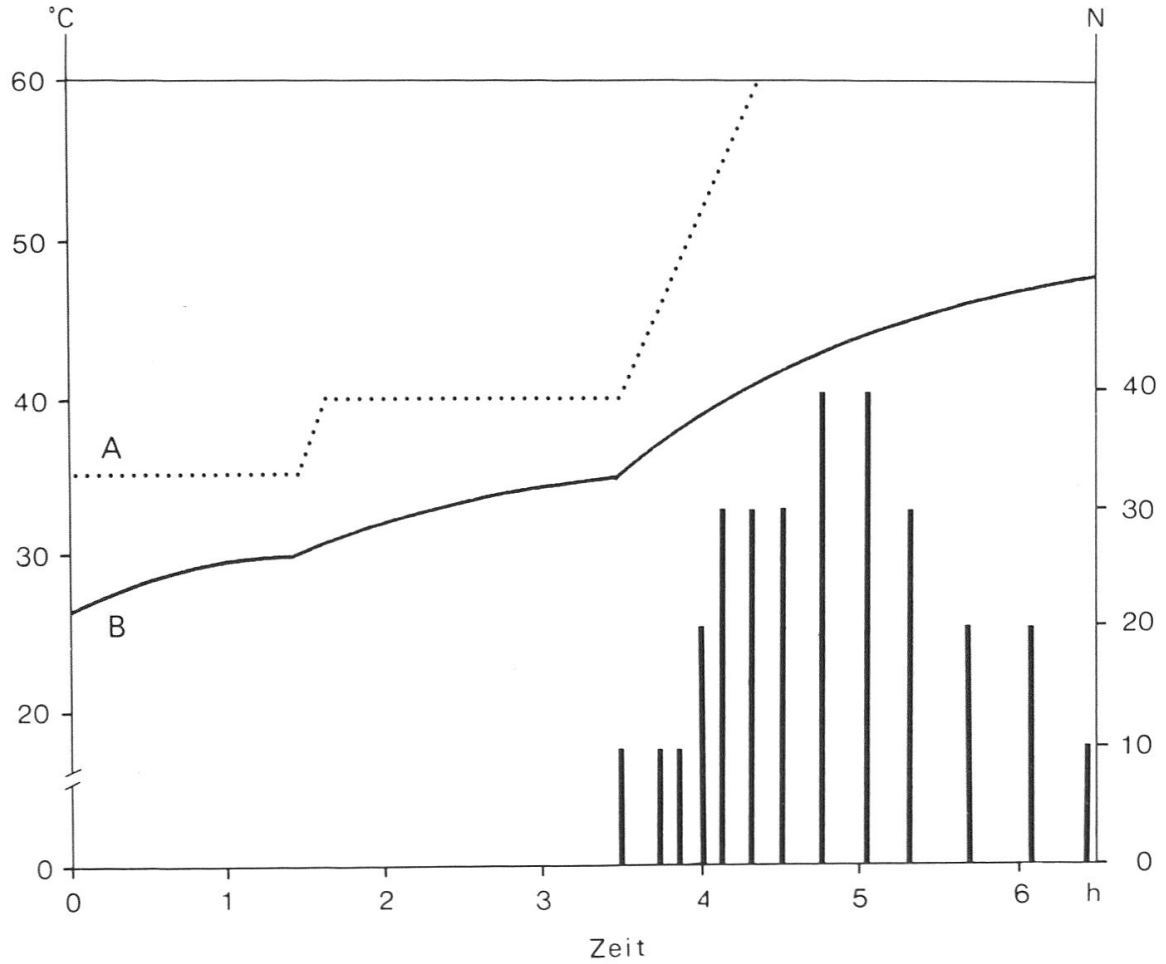


Abb. 8: Austrieb von Raupen aus Massenzuchtmedien mit Wärme (A = T Wasserbad, B = T Medium; Säulen bzw. N = ausgewanderte Raupen).

80–85% relativer Luftfeuchtigkeit gehalten. Die Reduktion der Zuchttemperatur von 28 auf 24 °C wurde als prophylaktische Massnahme gegen Pilzinfektionen vorgenommen, da die Weiterzucht unter Kurztagbedingungen in einer Klimaeinheit ohne Luftumwälzung erfolgen musste (s.2.3.2).

Nach Dr. E. Mani (mündl. Mitt.) verlassen diapauseinduzierte Raupen am Ende der Raupenentwicklung das Massenzuchtmedium auf der Suche nach einem trockenen Ort zum Einspinnen. Die Virusproduktion könnte somit relativ einfach gestaltet werden, wenn es gelänge, solche Raupen beim Verlassen des Mediums mit dem GV zu infizieren. Entsprechende Versuche haben jedoch gezeigt, dass nicht nur die Auswanderungsraten diapauseinduzierter Raupen stark variieren und oft nur 40% erreichen, sondern sich diese Tiere zudem auch mit sehr hohen Virusdosen nur ausnahmsweise infizieren lassen. Damit die Infektion in einem günstigeren Stadium durchgeführt werden konnte, musste deshalb unter Zwang ein verfrühter Raupenaustrieb vorgenommen werden. Zu diesem Zweck wurden verschiedene Versuche durchgeführt.

Raupenbesetzte Medien wurden zwischen 2 Kupfernetzen unter Gleich- oder Wechselstrom gesetzt. Die Raupen reagierten jedoch in keiner Weise auf geringe Reizströme bzw. Reizspannungen. Hingegen verliessen bei erhöhtem Stromfluss auf Grund der Wärmewirkung bis zu 64% der Raupen das Medium.

Mit dem Einsatz eines Wasserbades, das mit einem Thermostaten beheizt wurde, konnten Austreiberaten zwischen 60 bis 90% erreicht werden. Die Erwärmung der Medien erfolgte dabei stufenweise mit Wasserbadtemperaturen von 35 °C, 40 °C und 60 °C während 4–6 h, wobei 80–85% der auswandernden Raupen das Medium verliessen, wenn die Temperatur in diesem 40–47 °C betrug (Abb. 8). Die Raupen wurden in einem auf die Mediumoberfläche aufgesetzten Raster aus Plexiglas (Länge 31,5 cm, Breite 25,5 cm, Höhe 3,0 cm), bestehend aus 80 quadratischen Kompartimenten mit 3 cm Seitenlänge abgefangen. Dieser Raster war an der Oberseite mit feiner, für die Raupen unpassierbarer Gaze, an der Unterseite gegen das Medium hin, mit passierbarer Gaze (Maschenweite 3,5 mm) versehen. Der verbesserte Raupenaustrieb mittels Wasserbad war auf den gleichmässigen Übergang der Wärme vom Wasser zum darüberliegenden Medium und den sich darin entsprechend gleichmässig von unten nach oben aufbauenden Wärmegradienten zurückzuführen. Der grosse Zeitaufwand von 4–6 h für einen Raupenaustrieb konnte nicht reduziert werden, da bei höheren Wasserbadtemperaturen der für den Raupenaustrieb günstige Temperaturgradient von 40–47 °C im Medium zu rasch aufgebaut wird, so dass die meisten Raupen auf dem teilweise verbauten Weg zur Mediumoberfläche mit der ansteigenden Temperatur nicht Schritt halten konnten und folglich im Medium starben (Tab. 14). Ein solcher Effekt wurde auch festgestellt, als versucht wurde, die Temperatur kontinuierlich statt stufenweise zu steigern.

Die Untersuchung von Zuchtmedien hat gezeigt, dass Unterschiede im Austreibeerfolg grösstenteils auf eine im Vergleich zur Idealstruktur (s.2.3.2) unvorteilhafte Mediumschichtung zurückzuführen sind. Die Gründe hiefür waren bei der Zubereitung der von der Eidg. Forschungsanstalt Wädenswil bezogenen Zuchtmedien zu suchen. Wegen Schwierigkeiten mit latenter Virose und/oder Verpilzung wurde dort zur Zeit dieser Versuche der Wassergehalt des Mediums variiert (Dr. E. Mani, mündl. Mitt.). Ein Versuch, die Unregelmässigkeiten im Raupenaustrieb dadurch zu umgehen, dass den Raupen Ausschlupföffnungen geschaffen wurden, indem mit 1 mm dicken Nägeln 12 mm tiefe Löcher in die obere Schicht des Mediums gepresst wurden, scheiterte, weil einerseits die Raupen

Tab. 14: Beeinflussung des Raupenaustriebs durch verschieden rasche Wärmezufuhr und durch Lochung der Medien.

Verfahren	N	Raupen im Medium %	ausgewanderte Raupen %
A	334	62	38
B	360	52	48
C	272	44	56

A = Temperaturstufen des Wasserbades: 40, 50, 60°C; B = kontinuierliches Aufheizen des Mediums mit einer Wassertemperatur von 55°C; C = Temperatustufen des Wasserbades 35, 40, 60°C; Lochung der Medien.

die vorgegebenen Löcher nur in beschränktem Ausmass für die Auswanderung benützten und anderseits die durchlochte Schicht zu stark austrocknete (Tab. 14).

Für die folgenden Austreibeversuche sind schliesslich speziell präparierte Zuchtmedien verwendet worden. Dabei wurde von der Idee ausgegangen, dass die Raupenauswanderung stark erleichtert würde, wenn vor dem Austreiben das wichtigste Hindernis, die ausgetrocknete Deckschicht des Mediums, von diesem entfernt werden könnte. Verschiedene Versuche führten schliesslich zu der Lösung, dass auf eine flache Mediumschicht eine, auf einer raupendurchlässigen Gazeschicht aufgetragene, abhebbare Deckschicht gebracht wird. Zur Herstellung dieser Schicht wurde eine besondere Vorrichtung geschaffen. Wie die Tabelle 15 zeigt, hat sich eine Deckschicht aus 600 g Medium als optimal erwiesen; sie ist leicht abhebbar und enthält nur so wenige Raupen, dass auf ein Austreiben dieser Tiere verzichtet werden kann. Bei der Zubereitung der Zuchtmedien wurde deshalb wie folgt vorgegangen: Von den insgesamt 2,6 kg Medium pro Zuchtschale wurden 2 kg auf dem Schalenboden mit einem Streichblech ausgeebnet (Abb. 9). Die restlichen 600 g Medium wurden in die besondere Vorrichtung zur Herstellung der Deckschicht gebracht und ebenfalls mit dem Streichblech ausgestrichen (Abb. 10-12). Nach vollzogener Nivellierung wurde der Klemmrahmen der Vorrichtung entfernt, die Gaze mitsamt der anklebenden Deckschicht von der Grundplatte abgezogen und auf die vorgängig ausgeebnete Grundschicht gelegt (Abb. 13). Die Weiterbehandlung der Medien und der Raupenanzucht erfolgten bis zum siebten Tag gemäss den Bedingungen, die für die Grundzucht gelten.

Der Austreibezeitpunkt wurde für jeden Zuchtansatz einzeln bestimmt, indem, ausgehend vom 16ten Tag nach Ansetzen der Eier, täglich in Zuchtmedien 100 Raupen auf deren Stadium untersucht wurden, bis ein L_5-Anteil von 35-45% erreicht war (s.2.2.3). Dann wurde die Deckschicht mit Hilfe des Gazestückes abgezogen (Abb. 14), und aus dem übrigbleibenden Medium wurden die Raupen ausgetrieben. Wegen der nunmehr grösstenteils offen liegenden Raupengänge (Abb. 15), durfte in den so präparierten Medien die Temperatur rascher gesteigert werden als in den nicht aufgetrennten Medien (s. oben). Verschiedene Versuche

Tab. 15: Prozentualer Austrieb von Raupen aus Massenzuchtmedien mit Wärme.

Deckschicht Gew. g	Qual. *	N Larven	tot im Medium	% Larven in Deckschicht	auf Medium	im Raster
450	u	340	17	3	8	17
600	g	338	7	3	13	7
800	g	218	4	31	15	4
1000	u	220	2	55	12	2

*Abziehbarkeit der Deckschicht: g = gut, u = ungenügend

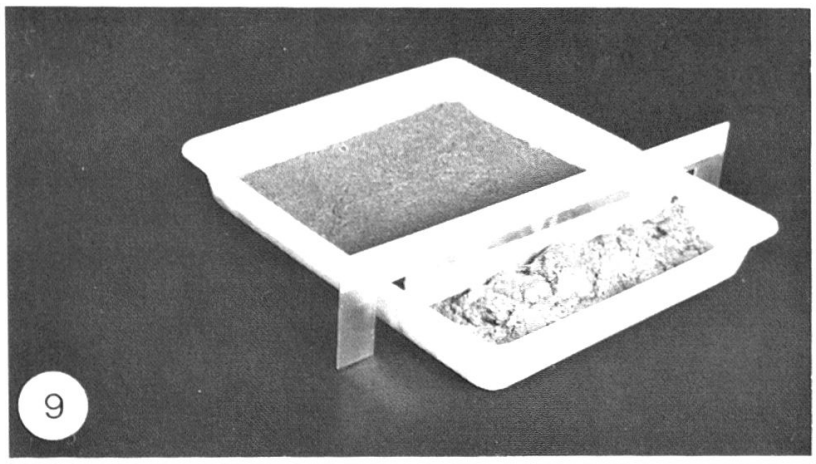
führten zum Ergebnis, dass mit einer konstanten Wasserbadtemperatur von 70 °C nicht nur Austriebsraten von 80–90% erzielt, sondern auch die für den Austrieb benötigten Zeiten auf 40–45 min reduziert werden können.

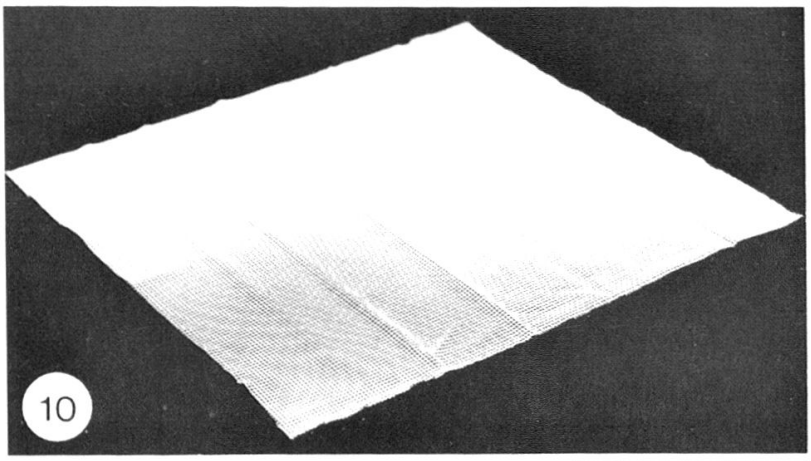
Nachfütterung der infizierten Raupen

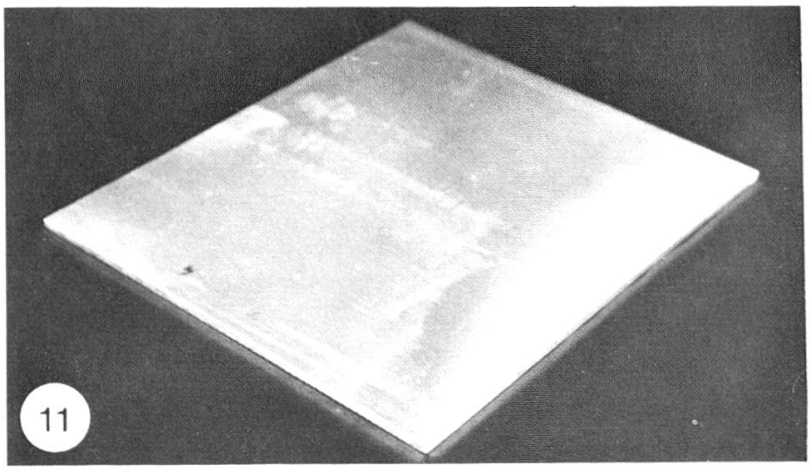
Wie unter 2.2.4 gezeigt wurde, kann nur bei Weiterfütterung der Raupen nach der Infektion mit dem GV ein befriedigender Virusertrag erreicht werden. Untersuchungen mit infizierten Raupen auf Medien, die mit Leichtmetalleinsätzen in einzelne Kompartimente unterteilt waren, haben gezeigt, dass die Kompartimente keine Raupenschlupfwinkel aufweisen dürfen, d.h. ganz mit Medium aufgefüllt sein müssen, wenn eine intensive Nahrungsaufnahme der Raupen gewährleistet und ihr Spinnverhalten (s. 2.2.2) verhindert werden soll. Dies bedingt sehr niedrige Kompartimentwände. Die Versuche führten zur Entwicklung der unten beschriebenen Nachzuchteinheit, wobei eine mit Einzelzuchtmedium ausgestrichene Streckeisenplatte die Kompartimente lieferte (s. 2.4.2).

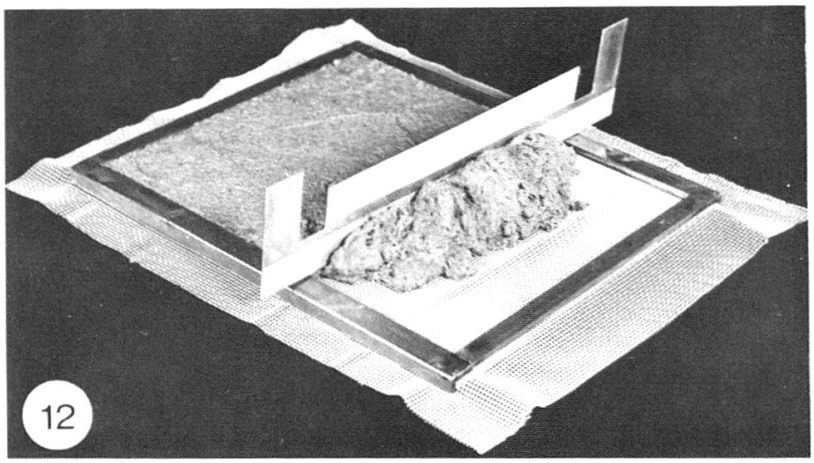
Trennung der virösen Raupen von der Nachzuchteinheit

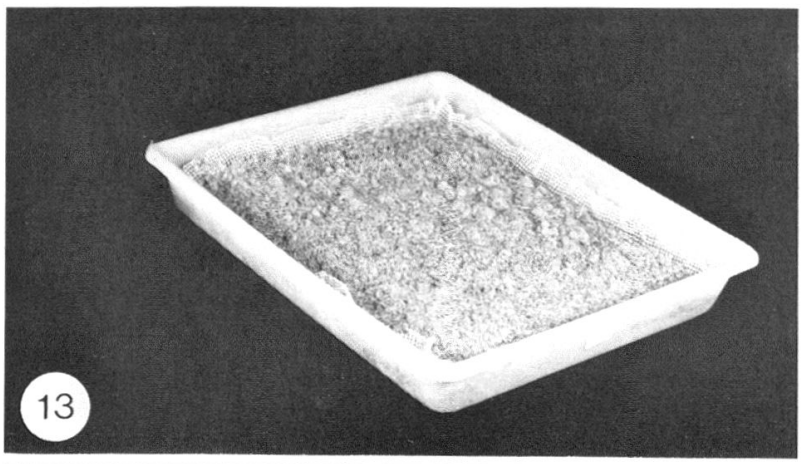
Zur Virusgewinnung müssen die kranken Raupen vom Nachfütterungssubstrat getrennt werden. Am einfachsten wäre eine Methode bei der die moribunden Raupen selbständig vom Medium wegwandern würden, wie dies bei Einzelzuchtraupen des Apfelwicklers bei der Suche nach einem Verpuppungsplatz normal ist (HUBER *et al.*, 1972) und als «Wipfeln» bei der Kernpolyedervirose der Nonnenraupe zum typischen Krankheitssyndrom gehört (KOMAREK & BREINDL, 1924; BENZ, 1963). Zur Klärung der Versuchsfrage, ob Massenzuchtraupen des Wädenswilerstammes gleichfalls das feuchte Medium auf der Suche nach einem trockenen Einspinnort verlassen, wurden 1 Tag alte L_5 nach dem Austreiben mit dem Wasserbad durch Tauchen in einer Virussuspension von 10^5 VK/ml infiziert und nach der von HUBER *et al.* (1972) beschriebenen Methode in 18 offenen Einzeldöschen weitergezüchtet. Mit den restlichen Raupen wurde, nach Beschichtung des Bodens von

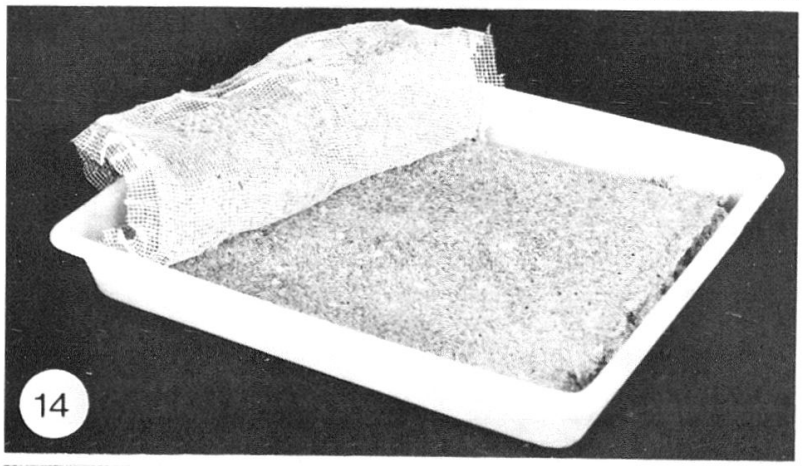

9


10


11


12





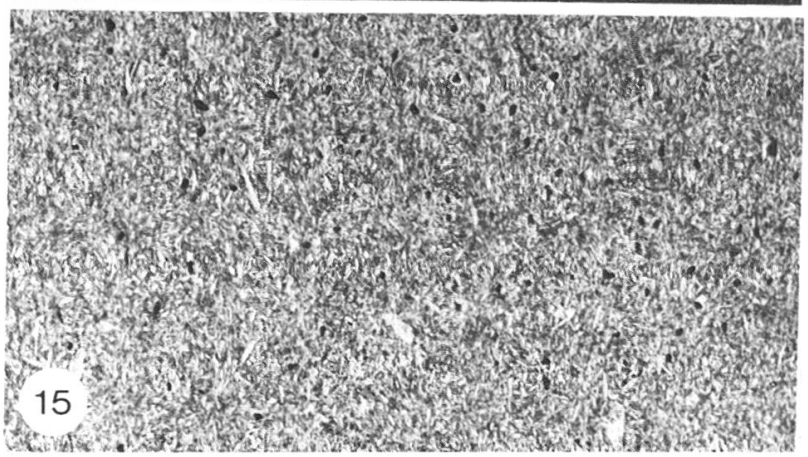


Abb. 9–15: Herstellung der Grundschicht durch Ausebnen von Zuchtmedium mit einem Streichblech (9); Nylongaze (10); Platte aus Aluminium (11); Herstellung der Medium-Deckschicht (12). Ein Klemmrahmen fixiert das Gazestück (10) auf der Aluminiumplatte (11); Zuchtschale mit Medium und eingefügtem Gazestück (13); Gazestück mit aufliegender Deckschicht teilweise von der Grundschicht abgehoben (14); offenstehende Raupengänge im abgedeckten Zuchtmedium (15).

Tab. 16: Selbständige Wegwanderung infizierter und nicht infizierter Raupen vom Nährmedium.

Verfahren	N	Infektionsdosis VK/ml	Virose %	Auswanderung %
A	108	10^5	92	24
B	126	10^5	100	28
B	108	-	100	58
C	108	10^5	100	12
C	126	-	-	96

A = Massenzuchtraupen auf nicht unterteilter Mediumoberfläche in grossen Dosen; B = Massenzuchtraupen und C = Einzelzuchtraupen in offenen Einzelzuchtdöschen mit Medium.

Tab. 17: Infektion ausgetriebener Raupen mit Viren und Bestimmung des Frassstoppes (in Tg) bei erneuter Ernährung.

Konz. VK/ml	Stad.	N	Viröse %	Viröse L4 %	Frass-stopp
10^5	L4	40	100	54	5
10^5	L5	45	100	-	5
10^4	L4	64	91	24	5
10^4	L5	70	96	-	5
10^3	L4	59	84	8	6
10^3	L5	64	78	-	4
-	L4	42	5	-	7
-	L5	38	-	-	3

140 x 75 x 35 mm grossen Polystyrendosen mit Agarmedium, die nicht unterteilte Mediumoberfläche mit je 18 Raupen besetzt. Zum Vergleich wurden zusätzlich Einzelzuchtraupen mit der gleichen Virusdosis infiziert und nach der Einzelzuchtmethode weitergezüchtet. Die in Tab. 16 aufgeführten Resultate zeigen, dass Raupen des Wädenswilerstammes eine geringere Tendenz haben, das Medium zu verlassen und dass die Auswanderungsrate bei virösen Tieren stark sinkt. Beim Verfahren mit nicht unterteilter Mediumoberfläche konnte zwar nach der Infektion während 3 Tagen eine vermehrte Wandertätigkeit der Raupen beobachtet werden, doch führte dies, neben einer unter 100% liegenden Virusmortalität, nur zu auffällig kleinen Raupenkadavern.

Da bei natürlicher Auswanderung der moribunden Raupen somit nur ein sehr geringer Teil der Population erfasst werden könnte, wurde auch für die Trennung der virösen Tiere von den Nachfütterungseinheiten das Austreiben mittels Wärme eingesetzt. Anstelle eines Wasserbades wurde jedoch ein Sandbad verwendet, da bei ersterem das heisse Wasser die flache Nachfütterungseinheit überfluten und die darin befindlichen Raupen abtöten würde.

Austreibezeitpunkt und optimale Infektionsdosis

Im Hinblick auf eine optimale Virusgewinnung musste vorerst der optimale Austreibezeitpunkt und die optimale Infektionsdosis eruiert werden. Zu diesem Zweck wurden L_4 und L_5 nach dem Austreiben mit dem Wasserbad mit verschiedenen Virusdosen durch Tauchen infiziert und anschliessend zwecks Bestimmung des Fressstoppes täglich gewogen. Die Wägungen haben gezeigt, dass innerhalb der einzelnen Verfahren die Nahrungsaufnahme verschieden lang dauert. Als Kriterium für das Einstellen der Nahrungsaufnahme wurde deshalb jener Zeitpunkt gewählt, bei dem das Gewicht bei mehr als 50% der Raupen stagnierte oder abnahm. Die in Tab. 17 aufgeführten Resultate zeigen, dass die Anwesenheit von Viren bei L_4 die Dauer der Nahrungsaufnahme verkürzt, während bei L_5 das Gegenteil zutrifft.

Erwartungsgemäss brachte die Konzentration von $10^{2/3}$ VK/ml neben einer Mortalität von 100% einen relativ hohen L_4-Anteil (s. 2.2.2). Die niedrigste Konzentration von 10^3 VK/ml brachte wohl erstaunlich hohe, im Vergleich zu den höheren Dosen jedoch zu stark reduzierte Mortalitäten. Für die Masseninfektion mit Viren wurde deshalb eine Konzentration von 10^4 VK/ml verwendet. Die Raupen stellten bei dieser Virusdosis 5 Tage nach der Infektion die Nahrungsaufnahme ein. Dabei zeigte sich jedoch, dass zu diesem Zeitpunkt die Virose bereits weit fortgeschritten war und infolgedessen bis zu 35% der kranken, bereits bewegungsträgen Raupen nicht mehr von der erwärmten Nachfütterungseinheit wegzuwandern vermochten. Das Austreiben der Raupen aus der Nachfütterungseinheit wurde deshalb bereits 4 Tage nach der Infektion vorgenommen, wodurch der Anteil der wanderungsunfähigen Raupen auf 10–20% reduziert werden konnte.

2.4.2 Methode zur Virusgewinnung

Die Raupen-Abfangvorrichtung

In der Absicht, die Raupen nach dem Verlassen des heissen Zuchtmediums möglichst rationell abzufangen, ist eine spezielle Vorrichtung, bestehend aus fol-

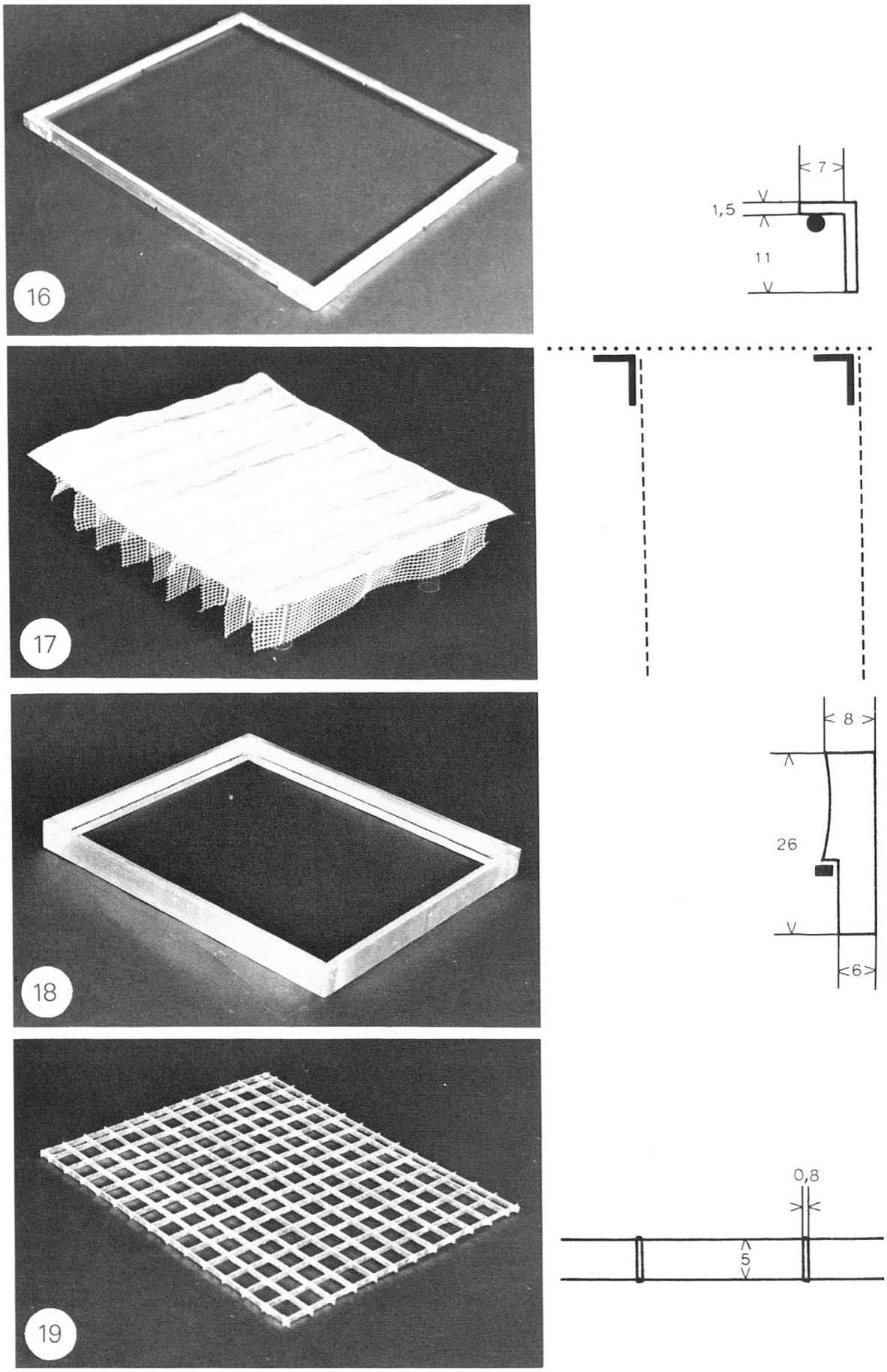


Abb. 16–19: Vorrichtung zum Abfangen von Raupen. Klemmrahmen (16); Abfanggaze (17); Dichtungsrahmen (18); Abfangraster (19). Gummidichtungen, Verbindungsstreifen aus Polyvinylchlorid.

genden Einzelteilen, konstruiert worden: Klemmrahmen (Abb. 16), Abfanggaze (Abb. 17), Dichtungsrahmen (Abb. 18), Abfangraster (19). Länge und Breite des Dichtungsrahmens und des Abfangrasters sind so zu wählen, dass sie auf das in der Zuchtschale befindliche Medium gesetzt werden können. Entsprechend ist der Klemmrahmen und die Abfanggaze den Ausmassen des Dichtungsrahmens anzupassen. Der Abfangraster aus Aluminium, der die Mediumoberfläche in Kompartimente unterteilt, hat die Aufgabe, die auswandernden Raupen rasch vom heissen Medium wegzuführen. Der Dichtungsrahmen, ebenfalls aus Aluminium, der auf den Abfangraster zu liegen kommt, ist das tragende Element der Vorrichtung. Sie ist oben durch die aufliegende Abfanggaze verschlossen. Diese wird durch den Klemmrahmen abgedichtet und verunmöglicht den aus dem Medium getriebenen Raupen das Wegwandern. Zur Vermeidung von Schlupfwinkeln, die das Einspinnen der Raupen begünstigen, wurde der obere Teil des Dichtungsrahmens konkav ausgebohrt. Die Abfanggaze, die mit den freihängenden, für die Raupen passierbaren Gazestücken bis zum Abfangraster reicht, übernimmt von der Mediumoberfläche die der Wärme ausweichenden Raupen. Die Gazestücke sind mit 2 mm breiten Streifen aus Aluminiumblech versehen, wodurch deren Zerknittern verhindert wird.

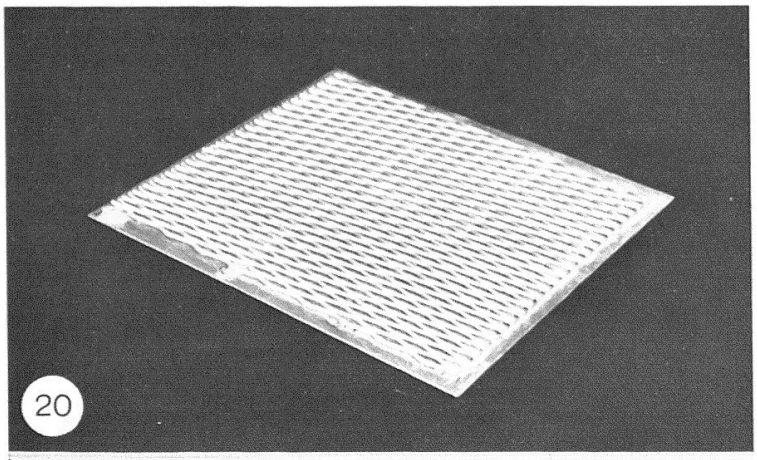
Das Raupenaustreiben

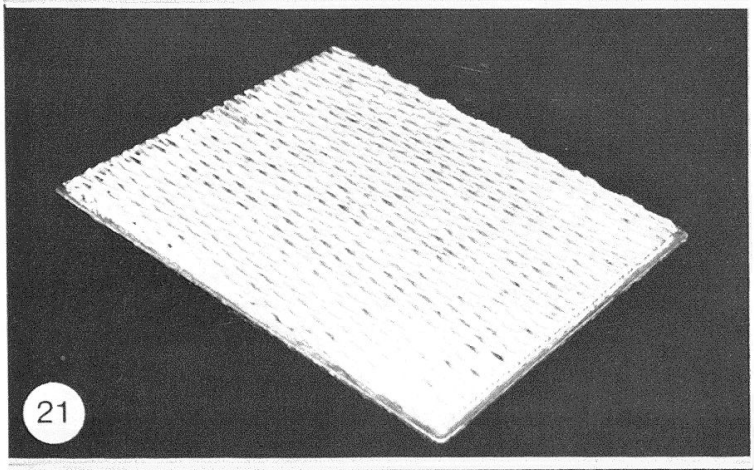
Nach Bestimmung des L_5-Anteils in den Zuchtmedien und nach Entfernen der Deckschicht (s. 2.4.1) wird das Medium durch Eintauchen der Zuchtschale in ein Wasserbad von konstant 70 °C kontinuierlich aufgeheizt. Nach einer Erwärmung von 10 min, wenn sich bereits ein Teil der Raupen zur Mediumoberfläche emporgearbeitet hat, wird auf diese die oben beschriebene Abfangeinheit lose aufgesetzt. Sie darf nicht sofort auf das Medium gepresst werden, da sie sich sonst zu sehr erwärmen würde. Erst nach 10 min wird die nun immer noch relativ kühle Abfangeinheit mit einem Gewicht von 2 kg beschwert, wodurch den unter Wärmestress stehenden Raupen auf dem Medium der Kontakt mit dem Abfangraster erleichtert wird. Aufgrund der offenstehenden Larvengänge lässt sich der für die Raupenauswanderung massgebende Temperaturbereich im Medium von 40–47 °C rasch aufbauen, sodass der Raupenaustrieb schon nach 40–45 min beendet werden kann.

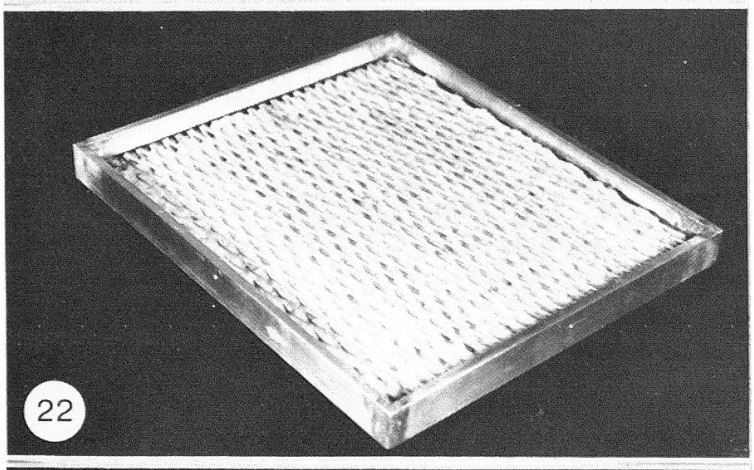
Tab. 18: Durchschnittliche Abwanderung von Raupen aus ihren Medien beim Einsatz eines Wasserbades und einer speziellen Abfangvorrichtung.

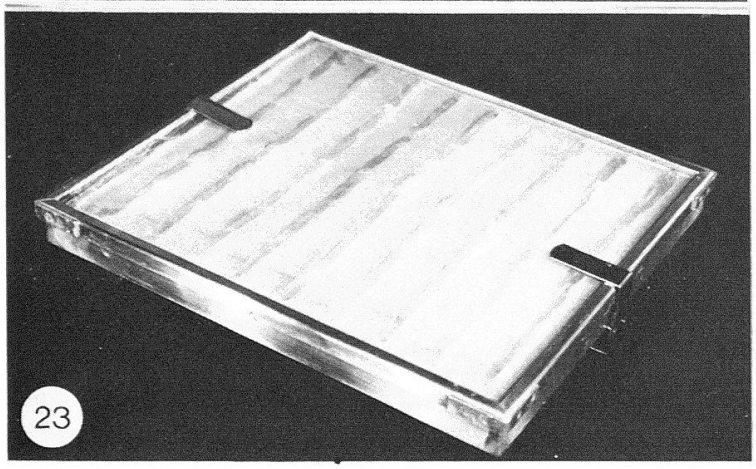
Anzahl Raupen N = 250-350	L3 %	L4 (%) kurz vor Häutung	L4 (%) gehäutet	L5 %
an Gaze	-	-	40	35
tot auf Medium	4	6	1	2*
tot in Medium	2	3	1	6*

*grösstenteils frisch gehäutete L5


20


21


22


23

Die in Tab. 18 aufgeführten Resultate zeigen, dass 88% der Raupenpopulation aufgrund der Wärmewirkung das Medium verlassen. Für die Infektion mit Viren kommen jedoch nur 75% der Raupen in Frage, da von ihnen 13% das heisse Medium zu spät verlassen und auf diesem sterben. Bei diesen Tieren handelt es sich, neben vermehrt wärmeempfindlichen L_3 und frisch gehäuteten L_5, vor allem um L_4, die kurz vor der Häutung stehen und infolgedessen nicht genügend aktiv sind, um der Wärme auszuweichen. Ähnliche Verhältnisse zeigen sich bei den Raupen, die das Medium nicht verlassen haben.

Infektion der Raupen mit Virus und Weiterzucht

Nach beendetem Raupenaustrieb werden die Teile (1)-(3) der Abfangvorrichtung während 5 sek in eine Virussuspension mit 10^4 VK/ml getaucht, wobei die an der Abfanggaze verweilenden Raupen infiziert werden. Anschliessend wird den Raupen mit Hilfe einer in den Abb. 20-23 dargestellten Nachfütterungs-Vorrich-

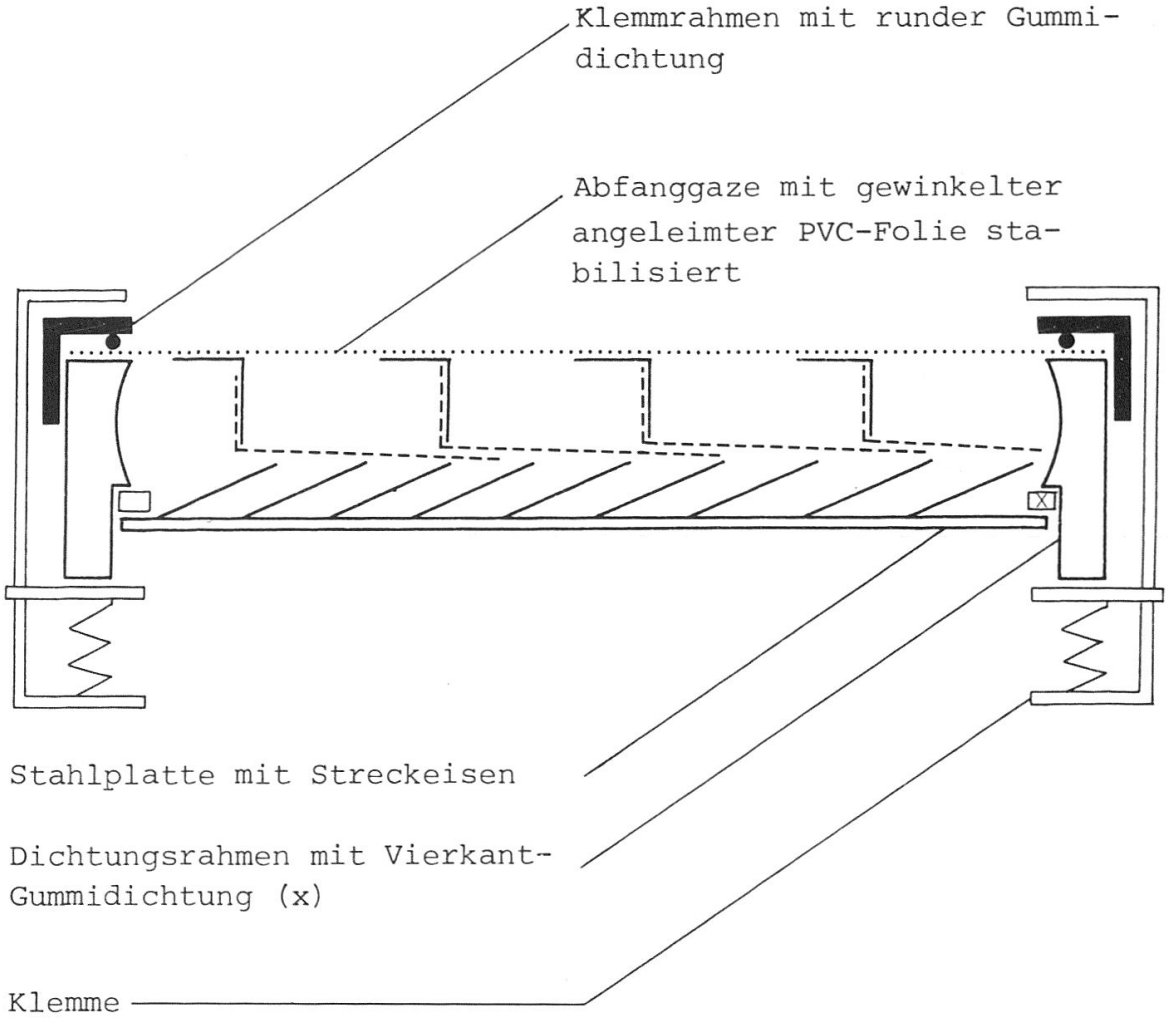


Abb. 24: Nachfütterungseinheit schematisch im Schnitt dargestellt.

Abb. 20-23: Vorrichtung zur Nachfütterung infizierter Raupen. Chromstahlplatte mit aufgeleimtem Streckeisen ohne Agrarmedium (20); Streckeisen-Einsatz mit Agrarmedium beschichtet (21); Streckeisen-Einsatz von unten her in Dichtungsrahmen (18) eingesetzt (22); Einheit fertig zur Inkubation, abgedichtet mit der Abfanggaze (17), dem Klemmrahmen (16) und zusätzlichen Klammern (23).

tung erneut Nahrung geboten. Die komplette Einheit ist in Abb. 24 schematisch im Schnitt dargestellt.

Bei der Beschichtung des Streckeisens wird dieses in Schräglage mit Agarmedium (HUBER *et al.,* 1972) übergossen und anschliessend das überschüssige Medium abgestreift. Die Wabenstruktur des Streckeisens, die dadurch zum Vorschein kommt, ist eine wichtige Voraussetzung für eine rasche und standortgebundene Besiedlung des Mediums durch die Raupen. Bei überdecktem Streckeisen wandern nämlich die Raupen auf der nicht unterteilten Mediumoberfläche verstärkt umher, was zu reduzierten Kadavergewichten führt. Die infizierten Raupen werden während 4 Tagen bei Kurztag, 24 °C und 80-85% rel. Luftfeuchtigkeit inkubiert.

Gewinnung viröser Raupen und des Viruspräparates

Zur Virusgewinnung werden die virösen Raupen mit Hilfe eines Sandbades aus der Mediumschicht des Streckeisens zu den passierbaren Gazestücken der Abfanggaze getrieben, die, zwecks Raupenaufnahme, das Streckeisen vollständig abdecken (Abb. 24). Grösste Aufmerksamkeit muss dabei der Temperatur des Sandbades geschenkt werden, da die im Agarmedium meist vollständig eingebohrten Raupen gewöhnlich direkt auf der aufzuheizenden Chromstahlplatte liegen. Ein Raupenaustrieb von 80-90% kann deshalb nur erreicht werden, wenn während einer Anpassungsphase von 15 min mit 35 °C und bei der anschliessenden Austreibephase während 20 min mit max. 48 °C geheizt wird. Anschliessend wird die Abfanggaze mit den bereits offensichtlich virösen Raupen bis zu deren Ableben in ein Virussammelgefäss gehängt, wo die virösen Kadaver nach 4-6 Tagen abgewaschen werden. Die anfallende Rohsuspension wird homogenisiert, filtriert (s. 1.2.2) und anschliessend bei -20 °C gelagert (s. 2.5).

Tab. 19: Durchschnittliche Ausbeute an virösen Kadavern pro Zuchtschale.

Anzahl Raupen pro Zuchtschale vor dem Austrieb		300	(100%)
Raupenverlust durch Wasserbadeinsatz			
auf Medium	10-15%		
in Medium	10-15%		
Raupenverlust durch Sandbadeinsatz	10-20%		
weitere Verluste (Wegwanderung etc.)	5-10%		
Verluste total	35-60%		
anfallende Kadaver pro Zuchtschale		120-195	(40-65%)

Tab. 20: Durchschnittlicher Virusertrag (Anzahl VK) pro Zuchtschale.

Infektionskonzentration (VK/ml)	10^4
Virusaufwand (VK) für Infektion pro Zuchtschale	4.10^5
Virusertrag (VK) pro Zuchtschale	$5,5.10^{12}$
Vermehrungsfaktor	$1,4.10^7$

Ausgehend von Populationen mit 250–350 Raupen pro Zuchtschale (Tab. 18), können 40–65% der Tiere als viröse Kadaver gewonnen werden (Tab. 19). Die Auszählung der filtrierten Homogenate ergab die in Tab. 20 aufgeführten Vermehrungsraten. Viruserträge in dieser Grössenordnung lassen sich jedoch nur erzielen, wenn die beschriebenen Bedingungen genau eingehalten werden. Besondere Aufmerksamkeit ist dabei der kontrollierten Erwärmung der Medien mit dem Wasser- und dem Sandbad zu schenken.

2.5 Lagerung von Virusproben

Die praktische Anwendung des Pathogens in grösserem Umfang setzt eine Virusproduktion voraus, die sich je nach Bedarf über mehrere Monate erstreckt. Es ist deshalb wünschenswert, dass das Virus für die Zeitspanne zwischen Produktion und Anwendung möglichst optimal eingelagert werden kann. Neben einem minimalen Aktivitätsverlust soll vor allem der Aufwand für die Aufarbeitung der Viren im Zusammenhang mit der Lagerung klein gehalten werden.

Hohe Lagertemperaturen beeinträchtigen die Aktivität der Viren rasch (Robert, 1969; Cunningham, 1970; David *et al.,* 1971 b), dagegen üben Temperaturen bis weit unter den Gefrierpunkt keinen negativen Einfluss aus (Tanada, 1953). Auch anderen abiotischen Faktoren, wie pH-Verschiebungen und Salzkonzentrationen, muss Beachtung geschenkt werden (Chambers, 1968).

2.5.1 Verfahren

Im Anschluss an das unter 1.2.1 beschriebene Reinigungsverfahren wurden Viruspräparate nach folgenden Verfahren eingelagert:
(1) Lagerung lyophilisierter Viren (s. 1.2.7)
(2) Lagerung von Viren in Suspension bei 2 °C (s. 1.2.8)
(3) Tiefkühlen suspendierter Viren bei -20 °C (s. 1.2.8)
(4) Lagerung vorerst tiefgekühlter Proben bei 18 °C.

Im Bestreben die Haltbarkeit einer GV-Suspension unter praxisnahen Bedingungen zu prüfen, wurden tiefgefrorene Proben nach 30 Wochen aufgetaut und für den Rest der Versuchsdauer bei 18 °C gelagert.

2.5.2 Aktivitätsprüfung

Im Laufe von 64 Wochen wurden periodisch von allen gelagerten Präparaten Proben entnommen und in Biotests (s. 1.3.1) auf ihre Pathogenität geprüft. Die LD_{50}-Werte wurden mittels Komputer nach einem Programm für die Probit-Analyse von Daum und Killcreas (1966) berechnet.

2.5.3 Resultate

Die Resultate sind in Abb. 25 dargestellt. Da die Lyophilisierung bereits im Nulltest einen signifikanten Aktivitätsverlust ergab, wurden mit diesem Material lediglich 2 Biotests durchgeführt. Die beiden anderen Lagerverfahren bei 2 °C und

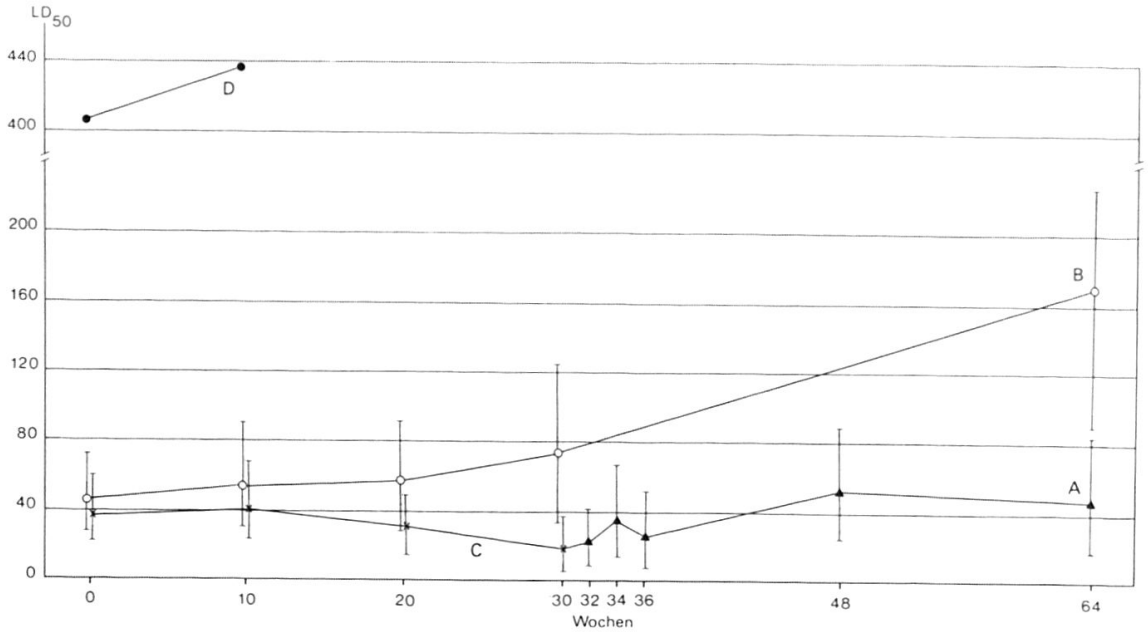


Abb. 25: Vergleich der LD_{50}-Werte von 4 Lagerverfahren bei Viren: Lagerung bei + 18 °C (A), bei + 2 °C (B), bei - 20 °C (C), Lyophilisation (D).

-20 °C ergaben nach 30 Wochen noch keinen signifikanten Unterschied. Hingegen war das Tiefkühlverfahren der gewöhnlichen Kühlung insofern überlegen, als bei jenem selbst nach weiteren 34 Wochen Lagerung bei 18 °C noch keine Aktivitätsverminderung festgestellt werden konnte, was für die gewöhnliche Kühlung bei 2 °C nicht zutraf. Nach 64 Wochen Lagerung konnte deshalb ein statistisch gesicherter Unterschied zwischen dem Verfahren 2 einerseits und dem kombinierten Verfahren 4 anderseits verzeichnet werden.

2.5.4 Diskussion

Nach den vorliegenden Resultaten erweist sich die Tiefkühlung glycerinisierter Virussuspensionen und Aufbewahrung bei -20 °C als bestes Lagerverfahren. Nebst einem minimalen Arbeitsaufwand für die Herstellung solcher Präparate und einer sehr guten Erhaltung der Virusaktivität, hat diese Methode die weiteren Vorteile, dass bei eventuell vorhandenen Mikroorganismen deren Entwicklung gestoppt wird und dass die Viren nicht sedimentieren können, wodurch eine unerwünschte Verklumpung weitgehend vermieden wird.

Auch die Lagerung mit Puffer und Antibiotica bei 2 °C (Verfahren 2) hat sich bewährt. Dabei führten 2 von 4 Biotests sogar zu einer allerdings nicht signifikanten Virulenzsteigerung. Solche Phänomene sind bei langfristigen Testserien nicht selten, da die Sensibilität der Testorganismen variieren kann (David & Gardiner, 1967; Schmid, 1973). Obwohl nicht ausdrücklich geprüft, muss jedoch angenommen werden, dass diese Proben nach einer Weiterlagerung bei höherer Temperatur doch mehr Aktivität eingebüsst hätten, als dies bei der 2 °C der Fall war. Deshalb haben wir das Tiefkühlverfahren dem gewöhnlichen Kühlverfahren vorgezogen.

Wider Erwarten hat das Lyophilisat bereits im Nulltest eindeutig am schlechtesten abgeschnitten. Abgesehen davon, dass die jederzeit anwesenden, freien Viruspartikeln durch Trocknung Schaden nehmen (Heimpel, 1967), wird der

Lyophilisationsvorgang die Aktivität der eingekapselten Viruspartikeln kaum beeinflusst haben SCHMID, 1973, 1974). Die reduzierte Aktivität im Biotest dürfte viel eher auf die nicht homogene Verteilung der Viren beim Resuspendieren zurückzuführen sein. Die ungenügende Verteilbarkeit ist wahrscheinlich die Folge einer Aggregatbildung während des Trocknungsprozesses. Nach HEIMPEL (1967) verbinden sich dabei Viren mit dem Trägerstoff (Cellulosepulver) und Raupenresten zu Aggregaten, die sich später nie mehr vollkommen resuspendieren lassen. Beim Biotest dürfte die Konzentration der Viren in der Suspension, infolge relativ rascher Sedimentation der Aggregate, während der Mikroinjektion laufend abnehmen, wodurch der Infektionstiter einer starken Schwankung unterworfen wird. Da ein optimaler Schutz der Äpfel einen möglichst homogenen Virusbelag voraussetzt, dürfte sich die Aggregatbildung auch im praktischen Spritzversuch negativ bemerkbar machen.

Auf die Praxis bezogen, ergeben sich nach den Resultaten mit den Verfahren 3 und 4 folgende Richtlinien für die Produktion: Während rund 30 Wochen (beispielsweise von September bis April) könnten Viren produziert und praktisch ohne Virulenzverlust bei -20 °C eingelagert werden. Entsprechend dem Termin der ersten Apfelwicklerspritzung (Anfang Juni) könnten die Virussuspensionen im Laufe des Monats Mai an die Obstproduzenten versandt werden, wo die Präparate bei einer Kellertemperatur von 18 °C für eine ganze Saison ohne signifikanten Virulenzverlust gelagert und verwendet werden könnten.

3 Schätzung der Produktionskosten

3.1 ALLGEMEINES

Im Hinblick auf eine zukünftige Herstellung des Viruspräparates ist es wichtig zu wissen, welches Ausmass die dabei entstehenden Kosten annehmen. Eine Kostenkalkulation, wie sie üblicherweise in der Industrie angewendet wird, kommt jedoch nicht in Frage, da im vorliegenden Fall verschiedene Kostenelemente, wie Zinsen auf eingesetztem Kapital, Miet- und/oder Abschreibungskosten etc. nur unbefriedigend erfasst werden könnten und zudem der Produktepreis bei deren Kalkulation auf unrealistische Weise angehoben würde. Bei der folgenden Betrachtung wurden deshalb diese Kosten ausgeklammert und lediglich die bei der Virusproduktion direkt anfallenden Produktionskosten berücksichtigt. Hiezu kommen in Betracht: Rohmaterialkosten, Kosten durch Abschreibung spezieller Vorrichtungen (s. 2.4.2), Fremdleistungskosten und Lohnkosten.

3.2 DER ARBEITSAUFWAND

Die Grösse der Raupenzuchten wird vorwiegend durch die verfügbare, teuere Arbeitsleistung festgelegt. Da letztere möglichst kostensparend eingesetzt werden soll, darf bei der Raupenanzucht sowie auch in der räumlich abgesonderten Einheit für die Virusproduktion nur je eine Person eingesetzt werden. Praktische Erfahrung hat gezeigt, dass die Zubereitung von 40 Schalen (= 1 Charge) für die Raupenanzucht von einer Person in einem Tag bewältigt werden kann. Dabei wird bei Berücksichtigung der im Produktionsprozess anfallenden, grösstenteils termingebundenen Arbeiten (Tab. 21) der Zeitpunkt der Mediumbereitung mit

Tab. 21: Termingebundene Arbeiten bei der Virusproduktion: 10 Tage in der Raupenproduktionseinheit, 12 Tage in der Virusproduktionseinheit.

Fortlaufende Anzahl Tage	Wochentag	Arbeit
0	Dienstag	Mediumzubereitung
3	Donnerstag	Belegung der Medien mit Eiern Anzucht der Larven während 7 Tagen
10	Donnerstag	Verlegung der Zuchtschalen in die Virusproduktionseinheit
17/18*	Donnerstag/Freitag	Raupenaustrieb, Infektion und Nachfütterung
21/22*	Montag/Dienstag	Raupenaustrieb mit Sandbad

*Möglichkeit zur Verschiebung der Termine auf den nächstfolgenden Tag bei verzögerter Raupenentwicklung

Vorteil auf den Dienstag verlegt. Gemäss diesem Zuchtkonzept liessen sich pro Jahr 48 Chargen mit einem Gesamtausstoss von ca. 500000 infektionsbereiten Raupen bzw. ca. 250000 virösen Kadavern produzieren. Ein 4wöchiger Unterbruch im laufenden Produktionsjahr wäre dabei für Reparatur- und Desinfektionsarbeiten zu reservieren.

3.3 Vereinfachte Kostenrechnung

Die Ergebnisse einer stark vereinfachten Kostenrechnung sind in Tab. 22 zusammengestellt. Die Lohnkostenberechnung (a, c) basiert auf dem Aufwand (40000.- Fr./Jahr = 100%), den ein Arbeitgeber unter Berücksichtigung aller Leistungen aufzubringen hat. Dabei wurden jedoch nur jene Arbeitsstunden berücksichtigt, die für die Herstellung einer Charge viröser Raupen nötig sind. In der Apfelwicklergrundzucht wird bei dieser Einschränkung ein Laborant zu 33%, in der Virusvermehrungseinheit zu 50% ausgelastet. Bei den Materialkosten (b, d) sind Aufwände (Zutaten für die Zuchtmedien, Desinfektionsmittel etc.) berücksichtigt, die bei der Produktion dauernd anfallen. Bei den Vorrichtungen wurde unter der Annahme einer 10jährigen Nutzungsdauer ein Abschreibungssatz von 0,2% pro Charge festgelegt. Die Fremdleistungskosten (b, d), ebenfalls auf eine Charge bezogen, beinhalten Aufwände für elektrischen Strom und Wasser.

Tab. 22: Produktspezifische Kosten je Spritzung einer ha Apfel-Dichtpflanzung.

A) Virus-Produktionskosten je Charge zu 40 Zuchtschalen:		
(1) Kosten bei der Raupenproduktion: Mediumzubereitung und Beschickung von 40 Zuchtschalen pro Woche mit Medium, Eiern, etc. (nach MANI, mündl. Mitt.):		
(a) Lohnkosten (Arbeitsauslastung = 33%)		Fr. 250.--
(b) Material- und Fremdleistungskosten*		" 50.--
(2) Kosten bei der Virusproduktion je Charge:		
(c) Lohnkosten (Arbeitsauslastung = 50%)		Fr. 417.--
(d) Material- und Fremdleistungskosten*		" 60.--
(e) Vorrichtungen und Apparate, Abschreibungssatz bei 10jähriger Nutzung = 0,2% von Fr. 20'000.--		" 40.--
Produktionskosten je Charge (a-e)		Fr. 817.--
B) Produktspezifische Kosten je Spritzung je ha:		
(1) Virusproduktionskosten je Spritzung je ha zu 450 Bäumen:		
Virusaufwand / Baum (nach BENZ et al. 1977)	= 4.10^{10} VK	
Virusaufwand / Spritzung / ha	= 18.10^{12} VK	
Virusproduktion je Charge (s. 4.2.)	= 220.10^{12} VK	
Produktionskosten / Spritzung / ha		Fr. 67.--
(2) Produktspezifische Zusatzkosten / Spritzung / ha (700 l/ha):		
Kosten für 7 kg Magermilchpulver (1% g/v)	Fr. 17.50	
Kosten für 0,7 Liter Etalfix (0,1% g/v)	" 2.50	
Kosten der Zusatzstoffe / Spritzung / ha		" 20.--
Virusproduktionskosten / Spritzung / ha, incl. Zusatzstoffe		Fr. 87.--

* Wasser, Elektrizität.

Die Angaben in Tab. 22 zeigen, dass bei der Virusproduktion (a-e), bei ausschliesslicher Berücksichtigung der Produktionskosten, der Aufwand für Löhne einen Kostenanteil von mehr als 80% einnimmt.

4 Diskussion

Bei der Entwicklung einer Methode zur Produktion des Granulosisvirus von *L. pomonella* mit Hilfe einer Massenzucht des Wirtsinsektes wurde für die Infektionen ein speziell auf UV-Toleranz selektionierter Virusstamm verwendet, der im Vergleich zu einem nicht selektionierten Stamm im Freiland eine verdoppelte Aktivitätszeit (T50) aufweist. Da für die zukünftige Massenproduktion des Granulosisvirus ausschliesslich der selektionierte Stamm verwendet werden soll, muss dafür

gesorgt werden, dass er seine besonderen, positiven Eigenschaften nicht verliert. Dies könnte auf 2 Wegen erreicht werden: 1. Es wird eine grosse Vorratsmenge Stammvirus erzeugt und diese in Portionen tiefgefroren, so dass die zur Infektion benötigten Virusmengen jahrelang aus diesem Vorrat bezogen werden können. 2. Das Pathogen wird von Zeit zu Zeit in L_5 vermehrt. Dabei würde sich Gelegenheit bieten, das Virus jeweils vorgängig (nach den unter 2.1.1 beschriebenen Bedingungen) einer Bestrahlung zu unterziehen, wodurch die spezifischen Eigenschaften des Selektionsstammes immer wieder dem spezifischen Selektionsdruck ausgesetzt wären und sich somit erhalten würden.

Das Füllen der Zuchtschalen mit dem zähen Massenzuchtmedium auf Sägemehlbasis erfordert relativ viel Arbeit, zumal bei den Schalen für die Virusproduktion ein Stück Gaze ins Medium eingebaut werden muss. Leider lässt sich zur Zeit der Arbeitsaufwand durch Verwendung dünnflüssigerer Medien nicht reduzieren, da bei erhöhtem Wassergehalt latent vorhandene Virosen verstärkt aktiviert werden. Es dürfte sich deshalb lohnen, einen Apfelwicklerstamm zu isolieren, bei dem die Viroseinzidenz auch bei relativ nassem Medium gering bleiben würde.

In hygienischer Hinsicht ist dieses Medium recht robust. Mit einfachen Massnahmen lassen sich bei keinesfalls sterilen Laborbedingungen normalerweise pilzfreie Zuchten erzielen. Wahrscheinlich wäre es möglich, Pilzinfektionen auf den Medien, die auf Grund anderer Zuchtbedingungen (Luftbefeuchtung und -umwälzung) auftreten könnten, durch Aufsprühen einer Fungizidlösung zu verhindern. Obwohl nicht näher geprüft, dürfte ein erst nach dem Einbohren der Eiräupchen applizierter Fungizidfilm die Tiere kaum beeinträchtigen, zumal dieser nur an der Mediumoberfläche wirksam wäre und vor dem Austreiben der Raupen mitsamt der Deckschicht entfernt würde (entsprechende Versuche sind vorgesehen).

Beim Austreiben der ausgewachsenen Raupen aus der Nachfütterungseinheit wurde ersichtlich, dass die vorgeschriebenen Sandbadtemperaturen auf keinen Fall überschritten werden dürfen. Dies wäre am ehesten gewährleistet, wenn 2 Sandbäder mit konstanter Temperatur bereitgestellt würden; das eine mit 35 °C für die Anpassungsphase, das andere mit 48 °C für das Austreiben der Raupen. Falls bei den verwendeten Sandbädern die Wärme nicht gleichmässig an die Nachfütterungseinheit abgegeben wird, dürfte es sich lohnen, den Raupen das Auswandern zu erleichtern. Dies liesse sich erreichen, wenn das Streckeisen mit seinen wabenartigen Zellen nicht mit der Grundplatte aus Chromstahl verleimt, sondern lediglich mit einer Klammer auf dieser festgehalten würde. Durch Kehren des Streckeisens kurz vor der Erwärmung würden dann die vollständig in das Medium eingebohrten Raupen freigelegt.

Die Produktion von Insektenpathogenen ist relativ aufwendig und führt im Vergleich zu chemischen Mitteln zu höheren Kosten (IGNOFFO, 1967, 1970). Bei der Schätzung der Produktionskosten für das Apfelwickler-Granulosisvirus-Präparat wurde ersichtlich, dass die Arbeitsleistung den grössten Kostenanteil beansprucht. Eine spezielle Verteuerung bringt dabei der Umstand mit sich, dass 2 räumlich und personell getrennte Produktionseinheiten betrieben werden müssen. Im Vergleich zur Arbeitsleistung kommt das zur Produktion verwendete Rohmaterial relativ billig zu stehen. Dies gilt allerdings nicht für die bei der Applikation aufgewendeten Materialien.

Der relativ grosse Aufwand könnte jedoch gerechtfertigt sein, wenn man bedenkt, dass mit dem Virus die überwinternde Raupenpopulation zu einem hohen Prozentsatz eliminiert werden kann (HUBER & DICKLER, 1975, BENZ *et al.* 1977). Diese drastische Populationssenkungen dürften nämlich nach einigen Virusanwendungen zur Folge haben, dass der Apfelwickler in den Folgejahren jeweils mit nur einer Behandlung pro Jahr bekämpft werden könnte. Trotzdem dürfte sich zur Zeit einer Virusproduktion nur dann einrichten lassen, wenn es gelänge, die Grundzucht und die Virusvermehrung je einem geeigneten, bereits bestehenden Betrieb anzugliedern.

Bevor an eine Grossproduktion des Granulosisvirus des Apfelwicklers gedacht werden kann, muss jedoch als vordringlichste Massnahme dessen gesetzliche Zulassung für die Anwendung im Pflanzenschutz in die Wege geleitet werden. Nach erreichter Zulassung wird es zudem unerlässlich sein, das Virusprodukt gezielt bei den Obstproduzenten einzuführen. In gleichem Ausmass müssen aber auch die Apfelkonsumenten informiert werden. Da bei Virusanwendung bei relativ hohen Apfelwicklerpopulationen noch relativ viele Äpfel von den Jungräupchen angebissen werden, bevor sie sterben, und die Anbiss-Stellen als Schönheitsfehler auf den Früchten sichtbar bleiben (BENZ *et al.* 1977), müsste auch eine gewisse Umerziehung der Konsumenten angestrebt werden, sofern nicht eine andere Verwertungsmöglichkeit für diese Früchte in Frage käme.

5 Zusammenfassung

Da sich das Granulosisvirus des Apfelwicklers als äusserst wirksam zur Populationskontrolle dieses Schädlings erwiesen hat, wurde eine Produktionsmethode entwickelt, die den praktischen Einsatz dieses Pathogens als mikrobiologisches Schädlingsbekämpfungsmittel ermöglichen soll.

Sonnenexponierte Virusbeläge werden relativ rasch inaktiviert. Zwecks Verbesserung der Persistenz im Freiland wurde eine Selektion auf UV-Resistenz durchgeführt. Vom selektionierten Isolat wurden nach Bestrahlung im Laboratorium für gleiche Effekte 5,6mal weniger Viren benötigt als vom Virusgrundstamm. Beim Vergleich der beiden Virussuspensionen im Freiland konnte beim Selektionsstamm eine verdoppelte Wirksamkeitsdauer verzeichnet werden. Hingegen erbrachte eine Erhöhung des Milchpulverzusatzes von 1 auf 2% in den Spritzbrühen keine wesentlich verbesserte Schutzwirkung gegen das Sonnenlicht. Lediglich bei vollständiger Abschirmung vor Licht blieb die Virusaktivität während 3 Wochen in vollem Umfang erhalten. Dabei zeigte sich auch, dass Emanationen aus Apfel und Blatt die Aktivität der Viren nicht beeinträchtigen.

Im Hinblick auf eine optimale Virusausbeute wurde die Eignung von diapauseinduzierten Raupen für die Virusproduktion untersucht. Bei Kurztag gezüchtete, diapauseinduzierte Raupen im L_4-Stadium liessen sich leichter infizieren als bei Langtag gezüchtete L_4; die bei ersteren benötigte Infektionsdosis ist ca. 5mal geringer. Bei einmaliger Tauchinfektion der verschiedenen Stadien einer Raupenpopulation können maximale Kadavergewichte und eine optimale Infektionsrate erzielt werden, wenn zum Infektionszeitpunkt die Raupenpopulation grösstenteils aus reifen 2–3 Tage alten L_4 und maximal 1,5 Tage alten L_5 besteht. Dabei darf die Infektionskonzentration den Wert von 10^5 Granulosis-

kapseln/ml nicht übersteigen, und den infizierten Raupen muss weiterhin Nahrung geboten werden. Für die Praxis hat sich eine Infektionskonzentration von 10^4 Granulosisviren/ml als optimal erwiesen.

Die Verwendung von künstlich erzeugten L_6 für die Virusproduktion dürfte vorläufig nicht in Frage kommen, da diese Tiere auch mit ungewöhnlich hohen Virusdosen nur unbefriedigend infiziert werden können.

Als Grundlage für die Massenproduktion des Granulosisvirus wurde eine Massenzucht bzw. Semi-Massenzucht des Apfelwicklers vorgesehen. Da das verwendete Zuchtmedium neben einer umfangreichen Raupenproduktion auch eine rationelle Infektion der Tiere erlauben muss, wurde ein am eigenen Institut entwickeltes Medium auf Agarbasis mit dem an der Eidg. Forschungsanstalt Wädenswil entwickelten Massenzuchtmedium auf Sägemehlbasis verglichen. Letzteres erhielt den Vorzug, weil bei diesem Medium die Verhütung bakterieller und pilzlicher Kontaiminationen bedeutend weniger aufwendig ist.

Im Bestreben, die Installation der Massenzucht von Neuinvestitionen möglichst unabhängig zu machen, wurden verschiedene Zuchtbedingungen, in Anlehnung an die bereits bestehende apparative Einrichtung untersucht bzw. angepasst. Dabei erwiesen sich die oberflächliche Applikation von Paraffin in definierter Schichtdicke und die Anwendung einer geeigneten Luftfeuchtigkeit und Luftumwälzung mit definierter Luftführung als wichtigste Massnahmen zur Steuerung des Austrocknungsprozesses in den Medien und zur Aufrechterhaltung einer ausreichenden Zuchthygiene. Bei sorgfältiger Einstellung kann auch mit geringem apparativem Aufwand eine definierte Luftführung mit optimalem Effekt erreicht werden.

Eine längerfristige Apfelwicklerproduktion in Semi-Massenzucht ist wegen der Gefahr von Virusepizootien nur möglich, wenn die Zuchteinheit räumlich und personell von der Virusproduktionseinheit wirksam getrennt wird.

Da eine optimale Virusproduktion die Infektion der Raupen mittels definierter Virusdosis innerhalb einer ziemlich eng umschriebenen Entwicklungsphase (L_4/L_5) voraussetzt und sich die Raupen ausschliesslich innerhalb des Mediums entwickeln, musste eine rationelle Methode gefunden werden, um die Raupen im geeigneten Zeitpunkt für die Infektion zugänglich zu machen. Im wesentlichen werden dabei die Raupen mittels Erhitzung von unten her aus dem Medium ausgetrieben. Dieser Prozess wird dadurch erleichtert, dass mit einem bei der Mediumzubereitung eingefügten Gazestück die ausgetrocknete Deckschicht des Mediums abgezogen und dieses dadurch geöffnet wird. Für die Erhitzung des geöffneten Mediums zum Austreiben der Raupen hat sich der Einsatz eines heizbaren Wasserbades am besten bewährt.

Für das Abfangen der aus dem Medium wandernden Raupen wurde eine spezielle Vorrichtung gebaut. Diese kann, mitsamt den Raupen, zwecks Infektion der letzteren, in eine Virussuspension getaucht werden. Anschliessend wird die Abfangvorrichtung mit den infizierten Raupen auf eine ebenfalls besonders konstruierte Nachfütterungsvorrichtung mit Agarmedium gebracht, wo sich die Raupen einbohren. Nach 4 Tagen werden die ausgewachsenen, virösen Raupen zur endgültigen Virusgewinnung durch Erhitzung auf einem Sandbad ausgetrieben.

Mit dieser Methode können 40–65% der Raupen, die vor dem Austreiben mit dem Wasserbad im Massenzuchtmedium vorhanden waren, als viröse Kadaver gewonnen werden. Bei einem Vermehrungsfaktor von $1{,}4 \cdot 10^7$ entspricht dies einem durchschnittlichen Virusertrag von $5{,}5 \times 10^{12}$ Granulosiskapseln pro Zuchtschale.

Als bestes Lagerverfahren hat sich das Tiefkühlen glycerinisierter Virussuspensionen bei -20 °C erwiesen.

Beim Versuch einer vereinfachten Kostenschätzung wurde ersichtlich, dass, bei ausschliesslicher Berücksichtigung der direkt anfallenden Produktionskosten, das Virusprodukt etwa gleich teuer zu stehen kommt wie ein Handelspräparat eines gebräuchlichen, chemischen Insektizides auf Organophosphatbasis. Die Aufwendungen für das Virusprodukt werden jedoch bereits verdoppelt, wenn die Kosten für die Zusatzstoffe bei der Applikation (Milchpulver, Etalfix) mitgerechnet werden.

Verdankungen

Die Durchführung der vorliegenden Arbeit wurde durch einen Forschungskredit der Eidg. Alkoholverwaltung an Herrn Prof. Dr. G. BENZ ermöglicht. Es ist mir deshalb ein Anliegen, den Herren Direktor Dr. V. KÜHNE, Dr. W. SCHWARZENBACH und W. SPÜHLER von der Eidg. Alkoholverwaltung, die das Projekt mit wohlwollendem Interesse verfolgt haben, auch an dieser Stelle für die Finanzierung herzlich zu danken.

Grossen Dank schulde ich auch Herrn Prof. G. BENZ für die Leitung der Arbeit, seine stete Diskussionsbereitschaft und, zusammen mit Herrn Prof. Dr. V. DELUCCHI, für die kritische Durchsicht und Korrektur des Manuskriptes.

Zu besonderem Dank bin ich den Herren Drs. E. MANI und Th. WILDBOLZ sowie deren Mitarbeitern W. RIGGENBACH und M. MENDIK verpflichtet, die mir bei der Bereitstellung von Zuchtmedien und Tiermaterial auf grosszügige Weise behilflich waren.

Mein Dank richtet sich auch an Prof. Dr. Ph. MATILE für die Erlaubnis zur Benützung von Apparaturen sowie an Dr. M. MÜLLER, von der Service-Station für Elektronenmikroskopie der ETH, für die elektronenmikroskopischen Untersuchungen.

Danken möchte ich schliesslich auch allen Mitgliedern des Entomologischen Institutes, die mir auf irgend eine Weise bei der Arbeit behilflich waren.

6 Bibliographie

BATHON, H. 1976/1977. *Fungizide zur Unterdrückung von Verpilzungen auf künstlichen Nährmedien zur Insektenzucht.* Z. ang. Ent. *82:* 247-251.

BENER, P. 1963. *The diurnal and annual variations of the spectral intensity of ultraviolet sky and global radiation (between 297,5 mu and 380 mu) on cloudless days at Davos.* Technical note 2. AFCRL-63-654.

BENZ, G. 1960. *Histopathological changes and histochemical studies on the nucleic acid metabolism in the polyhedrosisinfected gut of Neodiprion hercyniae (Hartig).* J. Ins. Pathol. *2:* 259-273.

BENZ, G. 1963. *Physiopathology and histochemistry.* In: E.A. STEINHAUS (Ed.) Insect Pathology, An Advanced Treatise, Vol. *1,* 299-338, Academic Press Inc., New York.

BENZ, G., BRASSEL, J., CHARMILLOT, P.J. & MERCIER, A. 1978. *Microbial control of the codling moth, Laspeyresia pomonella L., by a specific granulosis virus in orchards of western Switzerland.* In Vorbereitung.

BRINTON, F.E., PROVERBS, M.D. & CARTY, B.E. 1969. *Artificial diet for massproduktion of the codling moth, Carpocapsa pomonella (Lep.: Olethreutidae).* Can. Ent. *101:* 577-584.

CANTWELL, G.E. 1967. *Inactivation of biological insecticides by irradiation.* J. Invert. Pathol. *9:* 138-140.

CHAMBERS, D.L. 1968. *Effect of ionic concentration on the infectifity of a virus of the citrus red mite, Panoychus citri.* J. Invert. Pathol. *10:* 245-251.

CUNNINGHAM, J.C. 1970. *The effect of storage on the nuclear polyhedrosis virus of the eastern hemlock looper, Lambdina fiscellaria fiscellaria (Lepidoptera: Geometridae).* J. Invert. Pathol. *16:* 352-356.

DAUM, R.J. & KILLCREAS, W. 1966. *Two computer programs for probit analysis.* Bull. Ent. Soc. Amer. *12:* 356-369.

DAVID, W.A.L., GARDINER, B.O.C. 1967. *The effect of heat, cold and prolonged storage on a granulosis virus of Pieris brassicae.* J. Invert. Pathol. *9:* 555-562.

DAVID, W.A.L., GARDINER, B.O.C. & WOOLNER, M. 1968. *The effect of sunlight on a purified granulosis virus of Pieris brassicae applied to cabbage leaves.* J. Invert. Pathol. *11:* 496-501.

DAVID, W.A.L. 1969. *The effect of ultraviolett radiation of known wavelength on a purified granulosis virus of Pieris brassicae applied to cabbage leaves.* J. Invert. Pathol. *14:* 336-342.

DAVID, W.A.L., ELLABY, S.J. & GARDINER, B.O.C. 1971a. *Bioassaying an insect virus on leaves. 1. The influence of certain factors associated with the virus application.* J. Invert. Pathol. *17:* 158-163.

DAVID, W.A.L., ELLABY, S.J. & TAYLOR, G. 1971b. *The stability of a purified granulosis virus of the European cabbage-worm, Pieris brassicae, in dry deposits of infact capsules.* J. Invert. Pathol. *17:* 228-233.

FALCON, L.A., KANE, W.R. & BETHELL, R.S. 1968. *Preliminary evaluation of a granulosis virus for control of the codling moth.* J. econ. Ent. *61:* 1208-1213.

GARDINER, G.R. & STOCKDALE, J. 1975. *Two tissue culture media for production of Lepidopteran cells and nuclear polyhedrosis viruses.* J. Invert. Pathol. *25:* 363-370.

GRIFFIN, J.G. & LINDING, O.H. 1973. *Ultraviolet-lamp passthrough cabinet for use in boll weevil (Anthonomus grandis: Col., Curculionidae) mass-rearing facility.* J. econ. Ent. *66 (5):* 1063-1066.

HAMILTON, D.W. & HATHAWAY, D.O. 1966. *Codling moths.* In: C.N. SMITH (Edit.) Insect Colonization and Mass Production, 339-353, Academic Press Inc., New York.

HANSEN, L.D. & HARWOOD, R.F. 1968. *Comparisons of diapause and nondiapause Larvae of codling moth (Laspeyresia pomonella (L)).* Ann. Ent. Soc. Amer. *61:* 1611-1617.

HATHAWAY, D.O. 1967. *Inexpensive cardboard trays for mass-rearing codling moth.* J. econ. Ent. *60:* 888-889.

Heimpel, A.M. 1967. *The problems associated with the standardization of the insect viruses.* In: VAN DER LAAN (Ed.), Insect Pathology and Microbial Control, 355-359, North Holland Publishing Comp., Amsterdam.

HESS, O. 1959. *Osmiumteroxyd als Fixierungsmittel für ungesättigte Fettsäuren und tierische Gewebe.* Exp. Cell Res. 16: 452-455.

HOWELL, J.F. 1967. *Paraffinfilms to control dehydration of an artificial rearing medium for codling moth.* J. econ. Ent. 60: 289-290.

HUBER, J. 1973. *Selektion einer Resistenz gegen perorale Infektion mit einem Granulosisvirus bei einem Laborstamm des Apfelwicklers, Laspeyresia pomonella L.* ETH Zürich, Diss. Nr. 5044.

HUBER, J. & DICKLER, E. 1975. *Freilandversuche zur Bekämpfung des Apfelwicklers, Laspeyresia pomonella (L.), mit Granulosisviren.* Z. Pflanzenkrankh. 82: 540-546.

HUBER, J. & DICKLER, E. 1976. *Efficiency of a granulosis virus for codling moth control.* Proc. I.Int. Coll. Invert. Pathol., Kingston, Canada: 358-359.

HUBER, J., BENZ, G. & SCHMID, K. 1972. *Zuchtmethode und semisynthetische Nährmedien für Apfelwickler.* Experientia 28: 1260-1261.

IGNOFFO, C.M. 1963. *A successful technique for massrearing cabbage loopers on a semisynthetic diet.* Ann. Ent. Soc. Amer. 56: 178-182.

IGNOFFO, C.M. 1973. *Development of a viral insecticide: Concept to commercialization.* Exp. Parasitol. 33: 380-406.

IGNOFFO, C.M. & BATZER, O.F. 1971. *Microencapsulation and ultraviolet protectants to increase sunlight stability of an insect virus.* J. econ. Ent. 64: 850-853.

JAQUES, R.P. 1971. *Tests on protectants for foliar deposits of a polyhedrosis virus.* J. Invert. Pathol. 17: 9-16.

KELLER, S. 1973. *Mikrobiologische Bekämpfung des Apfelwicklers (Laspeyresia pomonella (L.)) (= Carpocapsa pomonella) mit spezifischem Granulosisvirus.* Z. ang. Ent. 73: 137-181.

KOMAREK, J. & BREINDL, V. 1924. *Die Wipfelkrankheit der Nonne und der Erreger derselben.* Z. ang. Ent. 10: 99-162.

LUFT, J.H. 1961. *Improvements in epoxy resin embedding methods.* J. Biophys. Biochem. Cytol. 9: 409-414.

MARTIGNONI, M.E. 1955. *Microinjector needle for determination of per os-LD* $_{50}$ *of insect viruses.* Science 122: 764.

MILTENBURGER, H.G., DAVID, P., MAHR, U. & ZIPP, W. 1976/1977. *Über die Erstellung von Lepidopteren-Dauerzellinien und die in vitro-Replikation von insektenpathogenen Viren.* Z. ang. Ent. 82: 306-323.

MORRIS, O.N. 1971. *The effect of sunlight, ultraviolet, gamma irradiations and temperature on the infectifitiy of a nuclear polyhedrosis virus.* J. Invert. Pathol. 18: 292-294.

NAVON, A. 1968. *Progress report on rearing of the codling moth. In: Radiation, Radioisotopes and Rearing Methods in the Control of Insect Pests.* Panel Proceedings Series STI/PUB/185, I.A.E.A. Vienna: 105-106.

RAULSTONE, J.R. & LINGREN, P.D. 1969. *A technique for rearing large numbers of Heliothis larvae.* J. econ. Ent. 62: 959-961.

REDFERN, R.E. 1964. *Concentrate medium for rearing the codling moth.* J. econ. Ent. 57: 607-608.

REYNOLDS, E.S. 1963. *The use of lead citrate at high pH as an electronopaque stain in electrone microscopy.* J. Cell. Biol. 17: 208-212.

RIVERS, C.F. 1967. *The natural and artificial dispersion of pathogens.* In: VAN DER LAAN (Ed.), Insect Pathology and Microbial Control, 355-359, North Holland Publishing Comp., Amsterdam.

ROBERT, P.H. 1969. *Essais de laboratoirs sur la conservation de la virulence de Vagoiavirus melolontha.* Entomophaga 14: 159-175.

ROCK, G.C. 1967. *Aseptic Rearing of the codling moth on synthetic diets: Ascorbic acid and fatty acid requirements.* J. econ. Ent. 60: 1002-1005.

SCHMID, A. 1973. *Beitrag zur mikrobiologischen Bekämpfung des Grauen Lärchenwicklers, Zeiraphera diniana (Gn.).* ETH Zürich, Diss. Nr. 5045.

SCHMID, A. 1974. *Untersuchungen über die Umweltpersistenz des Granulosisvirus des Grauen Lärchenwicklers, Zeiraphera diniana (Gn.) und die Schutzwirkung verschiedener Stoffe.* Z. ang. Ent. 76: 31-49.

SCHMID-MATTENBERGER, K. 1968. *Der Einfluss der Kopulation auf Eiproduktion und Eiablage beim Apfelwickler (Laspeyresia pomonella).* Diplomarbeit, Entomolog. Institut, ETH Zürich (unveröffentlicht).

SCHNYDER, U. 1967. *Untersuchung einer Kernpolyedrose von Sterrha seriata Schrk. (= Ptychopoda seriata Schrk., = Acidalia virgularia Hb.) (Geometridae, Lepidoptera) und deren Beeinflussbarkeit durch Hunger, DDT, DNOC und Farnesyl-methyl-äther.* ETH Zürich, Diss. Nr. 3802.

SENDER, C. 1969. *Elevage permanente du carpocapse des pommes (= Laspeyresia pomonella L.) sur un milieu artificielle simplifié.* Ann. Zool. Anim. 1: 321-326.

SENDER, C. 1970. *Elevage du carpocapse des pommes sur un nouveau milieu artificiel non specifique.* Ann. Zool. Anim. 2: 93-95.

SMIRNOFF, W.A. 1972. *The effect of sunlight on the nuclear polyhedrosis virus of Neodiprion swainei with measurement of the solar energy received.* J. Invert. Pathol. 19: 179-188.

STAIRS, G.R. 1972. *Pathogenic microorganisms in the regulation of forest insect populations.* Ann. Rev. Entomol. 17: 355-372.

TANADA, Y. 1953. *Description and characteristics of a granulosis virus of the imported cabbageworm.* Proc. Hawaiian Ent. Soc. 15: 235-260.

VAGO, C. 1972. *Problemes pathologiques concernant les elevages en masse d'invertebrés.* Entomophaga 17: 111-129.

WILDBOLZ, TH. & MANI, E. 1971. *Current work on genetic control of Carpocapsa pomonella. Application of induced sterility for control of lepidopterous populations.* Int. Atomic Energy Agency, Vienna: 151-155.

WILDBOLZ, TH. & MANI, E. 1975. *Zum Stand der Sterilpartnermethode beim Apfelwickler.* Z. ang. Ent. 77: 359-362.

WILDBOLZ, TH. & RIGGENBACH, W. 1969. *Untersuchungen über die Induktion und die Beendigung der Diapause bei Apfelwicklerraupen aus der Zentral- und Ostschweiz.* Mitt. Schweiz. Ent. Ges. 42: 58-78.

WILDY, P. 1971. *Classification an Nomenclature of Viruses.* Monographs in Virology Vol. 5, S. Karger, Basel, 81 pp.

WITT, D.J. & STAIRS, G.R. 1975. *The effects of ultraviolet irradiation on a Baculovirus infecting Galleria melonella.* J. Invert. Pathol. 26: 321-327.