

Produktion af insektvirus til biologisk bekæmpelse Udvikling af metode til produktion af ageruglens kapselvirus (AsGV)

*Production of insect virus for biological control
Development of a method for production of Agrotis segetum Granulosis Virus*

Bitten Bolet¹⁾

Resumé

En vigtig forudsætning for, at et insektvirus kan anvendes til mikrobiologisk bekæmpelse af skadedyr, er, at der kendes opformeringsmetoder, så produktion i større omfang bliver mulig.

Opformering af virus kan kun foregå i levende celler. Den almindeligste produktionsmetode er opformering i laboratorieopdrættede larver. Grundlaget herfor er masseopdræt af værtsdyret. En anden metode, der især anvendes, når opdræt af værtsdyret ikke er mulig, er indsamling af virusdøde larver i naturen. Opformering i cellekultur er endnu kun lykkedes eksperimentelt, men metoden kan fremover forventes at blive udviklet til masseproduktion.

I et projekt angående udvikling af en metode til produktion af ageruglens kapselvirus (*Agrotis segetum* Granulosis Virus, AsGV) er opnået en række delresultater vedrørende opdrætsmetoder samt inokulerings tidspunkt og -dosis. Disse resultater omtales kort.

Ved hjælp af en række eksempler belyses de mange muligheder, der er for produktion af insektvirus, lige fra lokal produktion ved udnyttelse af meget simple metoder til kommerciel, industriel produktion.

Nøgleord: Produktion, insektvirus, kapselvirus, *Agrotis segetum*, biologisk bekæmpelse.

Summary

An important precondition before an insect virus can be used for microbiological control, is the knowledge of methods for production by masspropagation.

Propagation is only possible in living cells. The most common method used is propagation in laboratory reared larvae, the foundation of which is mass rearing of the host insect. Collecting larvae killed by virus in nature is another method which is mainly used when rearing of the host insect is not convenient. Propagation in cell culture has only been done experimentally, however the method can be expected to be further developed for production of insect virus.

A research programme concerning the development of a method for production of *Agrotis segetum* Granulosis Virus has been in progress since 1980. Preliminary results on rearing methods, inoculating time and dosage have been presented.

Production of insect virus can be done at many different levels, from local production utilizing simple methods to commercial industrial production.

Key words: Production, insect virus, Granulosis Virus, *Agrotis segetum*, biological control

¹⁾ Adresse: Zoologisk Institut, Den kgl. Veterinær- og Landbohøjskole, 1870 København V.

Indledning

Mikrobiologisk bekæmpelse og herunder anvendelse af insektvirus er en af de mange muligheder, der er for biologisk bekæmpelse af skadedyr i jord- og skovbruget i dag.

Blandt de mange forskellige typer af virus, der er patogener over for insekter, anses kernepolyedervirus (NPV) og kapselvirus (GV) tilhørende slægten *Baculovirus* som de mest lovende til mikrobiologisk bekæmpelse, hvorfor kun disse omtales her.

En række krav vedrørende sikkerhed, effektivitet, holdbarhed m.v. skal være opfyldt, før et *Baculovirus* kan anvendes som bekæmpelsesmiddel (Øgaard, 1983). En væsentlig forudsætning for praktisk anvendelse er desuden, at der findes opformeringsmetoder, der giver mulighed for produktion i større skala. Produktion af insektvirus kan foregå på flere forskellige måder, lige fra kommerciel højteknologisk industriproduktion til lokal produktion ved anvendelse af yderst simple metoder.

I Danmark blev der i perioden 1975–78 udført en række mindre forsøg med biologisk bekæmpelse af ageruglelarver (knoporme) ved hjælp af ageruglens kapselvirus (*Agrotis segetum* Granulosis Virus, AsGV) (Zethner, 1980). Forsøgene gav lovende resultater, og det næste trin var at få afklaret mulighederne for massefremstilling af AsGV. Midler hertil blev bevilget af EF, og et 3-årigt projekt med en deltidsansat videnskabelig assistent kunne starte maj 1980. Delresultater foreligger på nuværende tidspunkt og vil blive omtalt her.

Forskellige opformeringsmetoder ved produktion af insektvirus

Virus kan kun reproducere sig i levende celler, dvs. de er obligate intracellulære parasitter. Opformering af *Baculovirus* må derfor foregå i vært-dyret (in vivo). For NPV's vedkommende kan opformering tillige foregå i cellekultur (in vitro). Dette er en vigtig forskel i sammenligning med andre insektpatogener som f.eks. mange bakterier og svampe, der er fakultativt parasitiske.

Denne levevis bevirker, at de ofte kan opformeres på kunstigt substrat, hvilket billiggør produktionen.

Opformering i laboratorieopdrættede larver

De enkelte processer, der indgår i produktion af insektvirus ved opformering i laboratorieopdrættede larver, fremgår af fig. 1.

Masseopdræt

Grundlaget for virusproduktionen er opretholdelse af en laboratoriekultur samt masseopdræt af larver til inokulering (indgivelse af virus). De fleste virus har en høj grad af specificitet, og kan derfor kun produceres ved opformering i deres respektive værdtyr. På grund af forskelle i næringskrav, adfærd m.v. er det for hver art nødvendigt at udvikle en bestemt opdrætsmetode, der samtidig skal være rationel for at begrænse arbejdsindsatsen. Med få undtagelser anvendes *Baculovirus* til bekæmpelse af sommerfugle (*Lepidoptera*), hvorfor det typisk vil dreje sig om opdræt af sådanne.

Afhængig af behovet kan der være tale om laboratorieopdræt i størrelsesordenen nogle tusinde dyr, eller ved industriel produktion, flere hundrede tusinder larver om ugen. F.eks. blev der, ved udvikling af metode til produktion af bomuldsugle kernepolyedervirus (*Heliothis spp.* NPV), produceret 1 mill. larver pr. uge i pilotforsøg, og der blev påregnet en endelig produktion på 7 mill. larver pr. uge (Ignoffo & Couch, 1981).

De største problemer i forbindelse med masseopdræt er opretholdelse af kvaliteten af insektmaterialet (fertilitet, overlevelse m.v.) samt kontrol med sygdomsudbrud. De samme problemer kendes fra opformering af prædatorer, parasitter og sterile hanner til brug i biologisk bekæmpelse.

Ved produktion af insektvirus er det især af betydning, at kontaminering med fremmede patogener undgås. Et andet problem er at undgå kontaminering af stamkulturen med det patogen, der produceres på stedet.

Inokulering

Baculovirus kan kun inficere værdtyret via tarmepitelet, hvorfor inokulering foregår med føden.

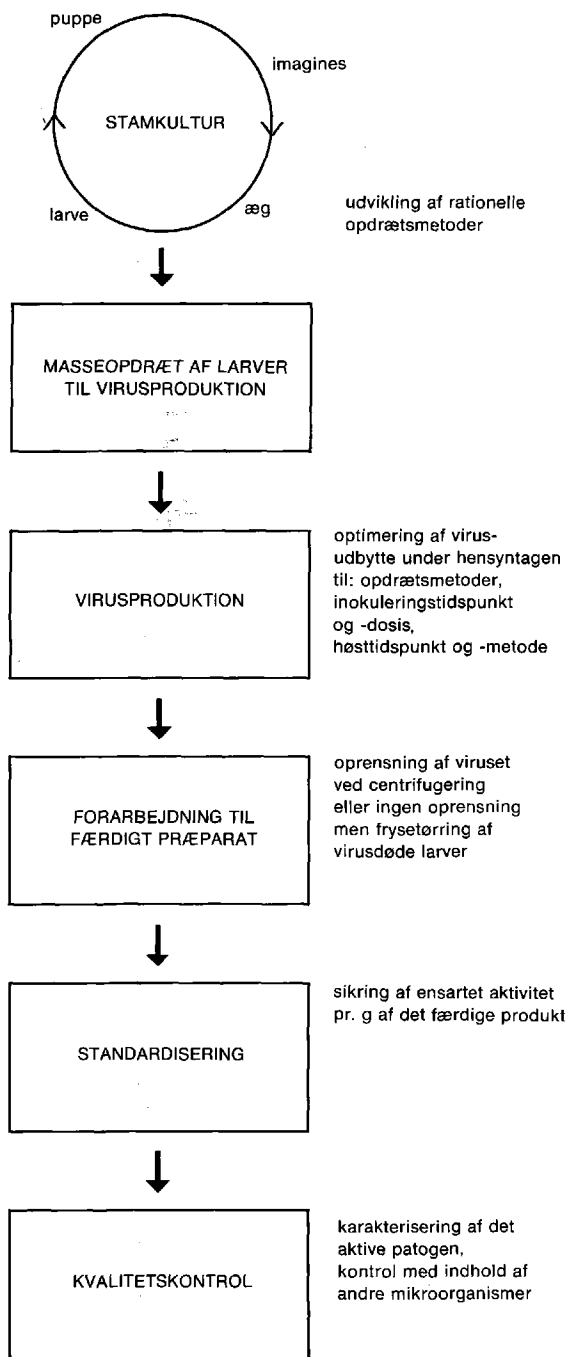


Fig. 1. Produktion af insektvirus ved opformering i laboratorieopdrættede larver.

Production of insect virus by propagation in laboratory-reared larvae.

Ved virusproduktion fodres larverne med substrat påsprøjtet eller iblandet virus (inokulum). *Baculovirus* angriber celler i de fleste af larvens væv, og afhængigt af virustype samt temperatur afsluttes patogenesen efter 1–3 uger. Vævene henfalder og cellerne brister, hvorved de færdigdannede viruskapsler (inklusionslegemer) frigøres. Virusindholdet er proportionalt med larvens størrelse, når den dør (Hedlund & Yendol, 1974). For at opnå størst muligt virusudbytte i produktionssammenhæng, skal inkuleringstidspunkt og -dosis derfor tilpasses, så larverne dør i sidste larvestadium, når de har opnået maksimal størrelse.

Forarbejdning til færdigt præparat

Fremstilling af det færdige sprøjtemiddel ud fra de virusdøde larver kan foregå på to principielt forskellige måder. Enten kan viruset oprenses, eller produktet kan formuleres direkte på basis af de indsamlede larver. Oprensning ved gradientcentrifugering giver et meget rent viruspræparat, og metoden anvendes ved laboratorieundersøgelser af virus. I mange tilfælde anvendes den også ved produktion af virus til bekæmpelsesforsøg, men ved egentlig masseproduktion i industriel skala er metoden for kostbar (Lewis, 1981). Uden oprensning kan indholdet af fremmede mikroorganismer som bakterier og svampe blive for højt, men ved at holde en høj hygiejnisk standard i forbindelse med larveopdræt og selve virusproduktionen, har det vist sig muligt at holde kontamineringen på et niveau, der tilfredsstiller de krav, som er stillet fra miljømyndighedernes side. F.eks. produceres midlet Gypcheck®, der er baseret på løvskovnonnens (Gypsy moth) kernepolyedervirus (*Lymantria dispar* NPV), således nu på basis af pulveriserede, frysetørrede virusdøde larver (Bell *et al.*, 1980).

Standardisering og kvalitetskontrol

For at sikre en ensartet aktivitet af præparatet, skal der på de enkelte partier udføres bioassay for at undersøge virusets virulens (aktivitet). På grundlag heraf standardiseres det færdige produkt.

For at et insektvirus kan blive godkendt som

mikrobiologisk bekæmpelsesmiddel, skal en række krav, primært af sikkerhedsmæssig karakter, være opfyldt. Desuden kræves der en løbende kvalitetskontrol af produktet. Virusindholdet skal undersøges både biokemisk og serologisk for at sikre, der ikke er sket ændringer under opformeringen. Desuden skal dokumenteres, at produktet ikke indeholder humane- eller pattedyrpatogener, samt at indholdet af øvrige mikroorganismer er på et acceptabelt niveau.

Produktion baseret på indsamling af virusdøde larver i naturen

Dette er den simpleste metode til fremskaffelse af insektvirus til brug i biologisk bekæmpelse. Indsamling af virusdøde larver kan foretages enten på naturligt smittede arealer eller efter, at man selv har startet et sygdomsudbrud (epizooti) ved udsprøjtning af virus. Førstnævnte metode anvendes ikke til egentlig produktion, men bruges f.eks. i forsøgsmæssig sammenhæng for at tilvejebringe en større virusmængde til udførelse af bekæmpelsesforsøg. Sidstnævnte metode har i mange tilfælde med held været brugt til produktion af bladhvæpse (*Neodiprion spp.*) kernepolyedervirus (Cunningham & Entwistle, 1981).

I Canada produceres f.eks. *Neodiprion lecontei* NPV ved at udvælge plantager, hvor der er en høj populationstæthed af bladhvæpse, og udsprøjte virus, når larverne er i 4. stadium. Senere indsamles virussyge og døde larver som frysetørres og pulveriseres (Cunningham, 1982). Grunden til at metoden især anvendes til produktion af bladhvæpse kernepolyedervirus er, at det endnu ikke er lykkedes at opdrætte disse insekter på kunstigt substrat.

I forbindelse med bekæmpelse af nonnen (*Lymantria monacha*) med kernepolyedervirus i Danmark i 1971-74 blev indsamlet virusdøde og syge larver. Herved lykkedes det imidlertid kun at genvinde ca. 10% af den udsprøjtede virusmængde (Zethner, 1976), hvilket viser, at metoden ikke altid er umiddelbar anvendelig.

Muligheder for opformering i cellekultur

Teknikken til opformering af insektvirus i cellekultur er endnu ikke udviklet i en sådan grad, at

metoden kan anvendes til masseproduktion. Industrielt set har in vitro teknikken imidlertid en række fordele frem for produktion ved opformering i værtdyret. Derfor er det muligt, det bliver fremtidens løsning for store firmaer, der ønsker at gå ind i produktion af mikrobiologiske bekæmpelsesmidler, og som har tilstrækkelig kapital og know how. Etableringsomkostningerne er større end ved produktion ved opformering i værtdyret, men til gengæld er produktionsmetoden i højere grad industrialiserbar, og dermed arbejdsbesparende. Dyrkning af cellekultur foregår sterilt, hvorfor man umiddelbart får et renere produkt, og der er mindre risiko for kontaminering med fremmede patogener (Stockdale & Priston, 1981).

Ved vurdering af muligheder for in vitro produktion skal imidlertid også tages hensyn til følgende. De foreløbige retningslinjer, der er anvendt ved godkendelse af insektviruspræparater i f.eks. USA og England, omfatter kun virus opformeret in vivo. Ved produktion in vitro kan det forventes, at der stilles endnu strengere sikkerhedsmæssige krav, hvilket kan vise sig at være en væsentlig hindring for anvendelse af denne produktionsmetode.

Udvikling af metode til produktion af ageruglens kapselvirus (AsGV)

Masseopdræt af ageruglelarver

Laboratorieopdræt af ageruglen er velbeskrevet i litteraturen (Poitout & Bues, 1974; Sherlock, 1979). De fleste metoder er baseret på separatopdræt, idet ageruglelarver, hvis de går mange sammen, er kendt for at bide eller endog æde hinanden. Ved EF-projektets start blev larverne opdrættet separat i plastrammer med mindre rum, efter metode beskrevet af Hansen og Zethner, 1979.

Ved masseopdræt af larver til virusproduktion er denne metode imidlertid alt for arbejdskrævende, og det første trin var derfor at udvikle mere rationelle opdrætsmetoder. Forskellige former for koloniopdræt, hvor mange larver går sammen i et miljø, hvor de har mulighed for at skjule sig, som f.eks. i kasser med papir eller vermiculite, blev afprøvet. Opdræt i vermiculite, der er et granuleret, let isoleringsmateriale af

brændt moler, viste sig velegnet. I naturen er larverne jordboende fra 3. stadium. Ved at anvende vermiculite som erstatning for jord, tilfredsstilles larvernes graveadfærd, og det bliver samtidig muligt at have mange sammen. Høj fugtighed, der opstår, hvis kasserne er for tætte, kan give problemer med svampevækst på substrat og fæces i vermiculiten, ligesom larvetætheden påvirker miljøet i kassen. Det er derfor nødvendigt, at tage nøje hensyn til disse to faktorer.

Larverne opdrættes i vermiculite fra 2. stadium og frem til inokuleringstidspunktet, der er 14-18 dage senere. I denne periode stiger larvernes gennemsnitsvægt fra ca. 3 mg til 325 mg. For at undgå udtynding anvendes den maksimale tæthed for ultimo 5. stadium larver (6 cm² pr. larve), hvilket betyder, der kan opdrættes 125 larver pr. kasse (28,5 × 25,8 × 5 cm) (fig. 2). Til opdræt af larver under og efter inokulering kan metoden

ikke benyttes, idet der er problemer med at opsamle de virusdøde larver fra vermiculiten. Separatopdræt i forskellige typer plastrammer er afprøvet, men forkastet på grund af problemer med at styre fugtigheden, hvorved der enten opstår svampevækst eller substratet udtørre.

En metode, hvor larverne går flere sammen uden vermiculite, er afprøvet med godt resultat. Opdrætseenheden er en flad plastkasse (22,4 × 17,5 × 1 cm), hvor substratet er placeret i den ene ende. Normalt vil larverne, hvis de ikke er i vermiculite, samles omkring substratet og borer sig ind. Mange larver tæt sammen bevirker, at de bider eller æder hinanden; samtidig kontamineres substratet med fæces med større risiko for svampevækst. Ved at mørklægge ²/₃ af opdrætsskassen og lægge et stykke plast her, opnår man, ved at udnytte larvernes adfærd, at de nu fortrinsvis lægger sig i den mørke ende, dvs. uden for sub-



Fig. 2. Koloniopdræt af ageruglelarver i vermiculite (125 pr. kasse). Metoden anvendes til masseopdræt af larver frem til inokuleringstidspunktet. Foto: L. Holzmann.

Colony-rearing of Agrotis segetum in vermiculite (125 pr. box). The method is used for mass-rearing larvae until time of inoculation.

stratet. Fugtigheden kan styres ved at have et passende antal huller i kassens sider. En larvetæthed på 26 cm² pr. larve, dvs. 15 pr. kasse, er fundet passende (fig. 3).

Opformering af AsGV

For at finde den produktionsmetode, der giver størst virusudbytte pr. larve inokuleret, blev der udført forsøg med forskellige kombinationer af inokuleringsstidspunkt (5 størrelseskategorier af larver) samt 8 viruskoncentrationer. Forsøgene viste, at nettoudbyttet (udbytte efter oprensning ÷ inokulum) er størst ved inokulering af larver i 5. og primo 6. stadium (175–325 mg) med en koncentration på 10¹¹ kapsler pr. ml.

Ved en temperatur på 22–25°C kan de døde larver høstes efter 17–18 dage. Da larverne er meget skrøbelige og går i stykker ved mindste

berøring, hvorved virusindholdet flyder ud, er opsamling med vacuumpumpe den letteste og mest effektive metode (fig. 3). Efter henstand i ca. 2 uger ved stuetemperatur, filtreres råsuspensionen gennem vat, og viruset oprenses ved centrifugering på 50% sucrose (1 del virussuspension og 1 del sucrose).

Metoden er foreløbig afprøvet ved virusproduktion på basis af 1500 larver. Her opnåedes et udbytte på $4,8 \times 10^{11}$ kapsler pr. virusdød larve. Denne virusmængde betegnes en larveækvivalent (L/Æ). Da kun 60–70% af de inokulerede larver høstes som virusdøde, er udbyttet således $3,4 \times 10^{11}$ kapsler pr. larve inokuleret.

Ud fra tidligere udførte markforsøg (Zethner, 1980) skønnes, at der skal bruges en koncentration omkring 10⁸ kapsler pr. ml sprøjtevæske. Anvendes 500 l pr. ha skal således bruges $5 \times$

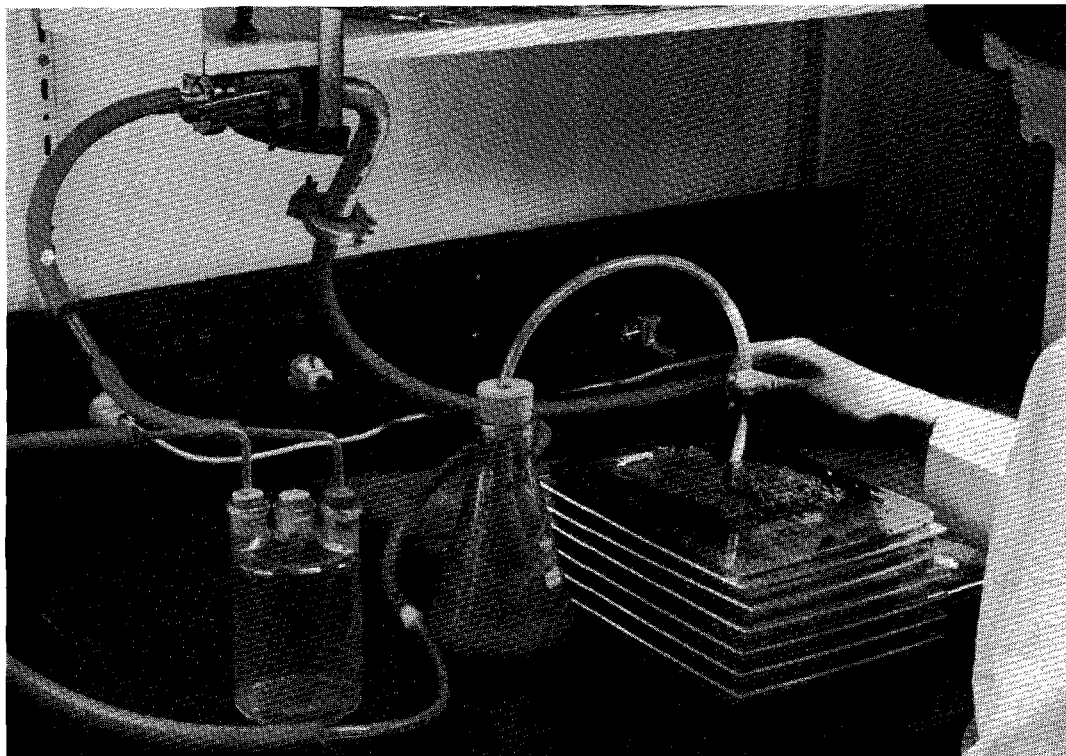


Fig. 3. Under og efter inokulering opdrættes larverne i flade plastkasser (15 pr. kasse). De virusdøde larver høstes ved hjælp af vacuumpumpe. Foto: L. Holzmänn.
At the time of inoculation the larvae are reared in flat plastic boxes (15 pr. box). The virus-killed larvae are harvested by use of a vacuum pump.

10¹³ kapsler pr. ha svarende til 104 LÆ. Denne virusmængde, målt i LÆ, er i samme størrelsesorden som anvendes til virusbekæmpelse af andre skadedyr. F.eks. anvendes til bekæmpelse af henholdsvis bomuldsugler, bladhpvpe og løvskovnonnen med kernepolyedervirus ca. 25, 75 og 120 LÆ pr. ha (Ignoffo & Couch, 1981; Cunningham & Entwistle, 1981).

Eksempler på produktion af insektvirus

Baculovirus har et snævert værtspektrum, hvilket er en fordel set fra et miljømæssigt synspunkt, men det betyder, at markedsgrundlaget for et produkt baseret på insektvirus er langt mindre end for et bredspektret kemisk middel. Dette er en vigtig begrænsende faktor for egentlig kommerciel produktion. Til gengæld er der en række andre produktionsmuligheder, som belyses ved eksempler i det følgende.

Privat og statslig industriel produktion

Det første kommercielle middel (Elcar®/Sandoz) kom på markedet i USA i 1976. Præparatet indeholder kernepolyedervirus til bekæmpelse af bomuldsugler (*Heliothis spp.*). Udviklingen af produktet startede allerede i 1961, på grund af problemer med anvendelse af store insecticidmængder og begyndende resistens (Ignoffo & Couch, 1981). Endnu produceres kun få andre midler kommercielt.

Ved udvikling af biologiske bekæmpelsesmetoder er ofte inddraget universiteter og andre offentlige forsknings- og forsøgsvirksomheder. Ved udvikling af bekæmpelsesmetoder over for skadedyr i skovbruget, har det i flere tilfælde ført til, at der er startet en produktion af insektvirus i industriel skala i statslig regi. F.eks. produceres præparatet Gypcheck® nu industrielt af US Forest Service (Bell et al., 1980).

Lokal produktion

Mikrobielle bekæmpelsesmidler kan ofte produceres ved meget simple metoder, hvilket giver mulighed for, at der kan ske en produktion i småindustrier placeret, hvor der er behov for midlerne.

I begyndelsen af 50-erne viste insektpatologer i

Californien, hvorledes jordbrugere selv kunne indsamle og udnytte virusdøde larver af flere sommerfuglearter til bekæmpelse (Falcon, 1982). Fra Kina er der flere eksempler på anvendelse af insektpatogener, der ved simple metoder produceres i de enkelte provinser. Et bekæmpelsesprogram over for den lille kålsommerfugl (*Pieris rapae*) er således baseret på anvendelse af kapselvirus, hvor produktionen foregår lokalt i mere end 20 provinser (Liu & Liang, 1982).

I forbindelse med skadedyrbekæmpelse i u-lande, er lokal produktion af insektvirus en mulighed. I Thailand er et udviklingsprogram igang, hvor man anvender kernepolyedervirus til bekæmpelse af *Spodoptera exiqua*. Virusproduktionen foretages af jordbrugerne selv ved opformering i larver indsamlet i marken (McKinley & Areekul, 1982). I Ægypten foregår et projekt med det formål at bekæmpe det alvorlige bomuldsskadedyr *Spodoptera littoralis* ved hjælp af kernepolyedervirus, som det er hensigten at producere i småindustrier i bomuldsdistrikterne (McKinley et al., 1982).

Mulighed for produktion af AsGV i Danmark

Kapselvirus, til biologisk bekæmpelse af agerugler i Danmark, kunne på lignende måde tænkes produceret i mindre målestok, f.eks. af berørte avlersammenslutninger evt. i samarbejde med universiteter og højere læreanstalter.

Litteratur

- Bell, R. A., Owens, C. D., Shapiro, M. & Tardif, J. G. R. (1980): Development of mass rearing technology. In: Doane, C. C. (ed.): The Gypsy moth: research towards integrated pest management. U.S. Dept. Agric. Tech. Bull. 1584.
- Cunningham, J. C. & Entwistle, P. F. (1981): Control of sawflies by Baculovirus. In: Burges, H. D. (ed.): Microbial control of pest and plant diseases. 1970-1980. Academic Press. 379-407.
- Cunningham, J. C. (1982): Ontario ministry of natural resources staff use virus to control redheaded pine sawfly. Forest Pest Management Institute, Newsletter 1(4), Dec. 1982.
- Falcon, L. A. (1982): The Baculovirus of *Autographa*, *Trichoplusia*, *Spodoptera* and *Cydia*. Proceedings, Invertebrate pathology and microbial control, IIIrd Int. Coll. Inv. Path., 6-10 Sept. 1982, Brighton, UK, 125-128.

- Hansen, L. & Zethner, O. (1979): Techniques for rearing 26 species of Noctuidae (*Lepidoptera*) on an artificial diet. Yearbook Royal Vet. and Agricult. Univ., 84-97.
- Hedlund, R. C. & Yendol, W. G. (1974): Gypsy moth nuclear polyhedrosis virus production as related to inoculating time, dosage and larval weight. J. econ. Entomol. 67, 61-63.
- Ignoffo, C. M. & Couch, T. L. (1981): The nuclearpolyhedrosis virus of *Heliothis species*. In: *Burges, H. D.* (ed.): Microbial control of pest and plant diseases 1970-1980. Academic Press. 329-362.
- Lewis, F. B. (1981): Control of the Gypsy moth by a Baculovirus In: *ibid.* 363-378.
- Liu, N. C. & Liang, D. R. (1982): Control of *Pieris rapae* larvae with granulosis virus in PRC. Progr. abstr. off. papers, Invertebrate pathology and microbial control, IIIrd Int. Coll. Inv. Path., 6-10 Sept. 1982, Brighton, UK. 159.
- McKinley, D. J. & Areekul, P. (1982): The use of viruses to control the insect pests of vegetables in Thailand in 1982. *Ibid.*, 218.
- McKinley, D. J., Topper, C. & Hosny, M. (1982): Progress in the evaluation of the NPV of *Spodoptera littoralis* in Egypt. *Ibid.*, 196.
- Poitout, S. & Bues, R. (1974): Élevage de chenilles de vingt-huit espèces de lépidoptères Noctuidae et de deux espèces d'arctiidae sur milieu artificiel simple. Particularités de L'élevage selon les espèces. Ann. Zool. Ecol. anim. 6, 431-441.
- Sherlock, P. L. (1979): A method for mass-rearing the cutworm, *Agrotis segetum*, in the laboratory. Ent. exp. & appl. 26, 245-251.
- Stockdale, H. & Priston, R. A. J. (1981): Production of insect viruses in cell culture. In: *Burges, H. D.* (ed.): Microbial control of pest and plant diseases 1970-1980. Academic Press. 313-328.
- Zethner, O. (1976): Control experiments on the nun moth (*Lymantria monacha* L.) by nuclear polyhedrosis virus in Danish coniferous forests. Z. ang. Ent. 81, 192-207.
- Zethner, O. (1980): Control of *Agrotis segetum* (*Lep.: Noctuidae*) in root crops by granulosis virus. Entomophaga 25, 27-35.
- Øgaard, L. (1983): Mulighederne for anvendelse af insektvirus i skadedyrbekæmpelse. Tidsskr. Planteavl 87, 407-415.

Manuskript modtaget den 5. maj 1983.