



Doctoral Thesis

Untersuchungen zur Genese des Granulosisvirus (Baculoviridae, Gruppe B) von *Cydia pomonella* (Lep., Tortricidae) in vivo und in vitro

Author(s):

Blumer, Annemarie

Publication Date:

1991

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-000619248> →

Rights / License:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

Diss. ETH Nr. 9611

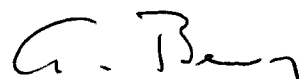
UNTERSUCHUNGEN ZUR GENESE DES GRANULOSISVIRUS
(BACULOVIRIDAE, GRUPPE B)
VON *CYDIA POMONELLA* (LEP., TORTRICIDAE)
IN VIVO UND *IN VITRO*

ABHANDLUNG
zur Erlangung des Titels
Doktor der Naturwissenschaften der
EIDGENÖSSISCHEN TECHNISCHEN HOCHSCHULE ZÜRICH

vorgelegt von
ANNEMARIE BLUMER
Dipl. Natw. Universität Zürich
geboren am 12. November 1952
von Schwanden (GL)

Angenommen auf Antrag von
Prof. Dr. G. Benz, Referent
Prof. Dr. P. Lüthy, Korreferent

1991



Zusammenfassung

Die Genese des Granulosisvirus (GV) von *Cydia pomonella* wurde *in vivo* und *in vitro* untersucht. Die Genese *in vivo* wurde elektronenmikroskopisch im Mitteldarmepithel und im Fettkörper verfolgt. Unterschiedlich hohe Infektionsdosen ergaben einen anderen Viroseverlauf. Je kleiner die Infektionsdosis ist, desto weniger "membranöse Strukturen" und GV-Kapseln werden pro Zelle gebildet und desto später sterben die Tiere. Dies bedeutet, dass bis zu einer bestimmten Infektionsdosis die Virus-Ausbeute durch die Zahl der infizierenden Viren vorbestimmt wird, was wiederum ein Hinweis dafür sein könnte, dass sich die Virose *in vivo* nicht leicht von Zelle zu Zelle ausbreiten kann. In Mitteldarm und Fettkörper wurden Virionen nicht nur innerhalb der Zellen beobachtet, sondern auch in den Interzellularen, was auf einen Ausbreitungs- und Infektionsweg hindeutet. Ein Vergleich von zwei Virusstämmen, dem Grundstamm und einem relativ UV-resistenten Selektionsstamm ergab keine Unterschiede in der Virogenese.

Die Genese des GV *in vitro* wurde in Organkulturen aus Fettkörpern untersucht. Um zu testen, ob die Virose prinzipiell *in vitro* ablaufen kann, wurden Tiere *in vivo* infiziert und daraus Fettkörperorgankulturen gewonnen. Dabei zeigte sich, dass die Viren die Darmschranke sehr schnell passieren können; schon in 2 h nach oraler Infektion explantierten Fettkörpern entwickelte sich die Virose, nicht aber in 1 h nach Infektion oder früher explantiertem Gewebe. Die Virose verläuft *in vitro* im Prinzip gleich wie *in vivo*. Dies zeigten auch autoradiographische Untersuchungen zum Viroseverlauf *in vitro*. Die einzelnen Virosestadien streuen jedoch stärker als *in vivo*, was vermuten lässt, dass die Kulturbedingungen *in vitro* noch nicht optimal sind.

Insgesamt wurden 23 Mediumvarianten auf der Grundlage von Grace's Insektenmedium getestet. Die Kulturen gedeihen besser, wenn das Medium mit Vitaminen, Aminosäuren und 5% fötalem Kälberserum angereichert wurde. Die Zugabe von Juvenilhormon zum Medium verlangsamt den Viroseverlauf *in vitro* in bestimmten Medien und scheint die Virusausbeute/Fettkörper nicht zu erhöhen.

Versuche zur Infektion von Fettkörperorgankulturen *in vitro* mit Hilfe von Hämolymphe und/oder Fettkörperextrakt viröser Tiere verliefen bis auf eine nicht reproduzierbare Ausnahme negativ. Dies zeigt, dass die Schwierigkeit der Produk-

tion von GV *in vitro* bei der Infektion der Zellen liegt. Medien, welche bei der Infektion *in vitro* verwendet wurden, erzeugten *in vivo* die Virose, enthielten also infektiöse Virionen. Offensichtlich fehlte in den verwendeten *in vitro* Systemen ein Faktor, der für die Infektion notwendig ist, dessen Natur jedoch nicht ermittelt werden konnte.

Deshalb wurden auch embryonale Primärkulturen aus Eiern angelegt, in denen die verschiedensten Gewebe, u.a. auch Fettkörperzellen ausdifferenzierten, die ihrerseits das Medium modifizieren. Auf diese Weise sollte *in vitro* ein ähnliches Milieu wie *in vivo* geschaffen werden. Bis auf drei Ausnahmen (höchstens 1%) verliefen Infektionsversuche aber auch hier negativ.

Summary

Investigations on the development of the *Baculovirus* (Baculoviridae, Subgroup B) of *Cydia pomonella* (Lep., Tortricidae) *in vivo* and *in vitro*

The development of the granulosis virus (CpGV) of the codling moth, *Cydia pomonella*, was studied *in vivo* and *in vitro*, using light and electron microscopic methods. *In vivo* the granulosis was studied in midgut and fat-body cells as well as in hemocytes of larvae infected by microfeeding. The infective doses were expressed as GV/larva, since virions of the GV are singly encapsulated in paracrystalline occlusion bodies or capsules that can be seen under the phase contrast microscope. Virogenesis *in vivo* is determined by the virus dose: the smaller the dose the less membranous structures, virions, and capsules per cell are produced and the later the larvae die, indicating that for an optimum production of the CpGV an optimum infective dose is needed. In the infected midgut and fat-body virions were found within the cells and in the intercellular spaces. Evidence is presented that the spreading of the virus within and between tissues is not as easy as previously assumed.

In vitro studies were conducted using fat-body organ cultures and EPC cultures (embryonic primary cell cultures). Virogenesis in fat-body organ cultures was studied in tissues (about 4 mm³ per culture) explanted from larvae at different times after infection *in vivo*. Virosis developed in the fat-body *in vitro* when it was explanted at 2 or more hrs after the infection of the donor but not when explanted earlier. Basing on Grace's Insect Tissue Culture Medium, 23 modifications were composed by adding aminoacids, vitamins, and fetal bovine serum. The infected tissues were cultured in these media and in the medium used by NASER *et al.* (the only medium in which the CpGV has been successfully grown in a cell line of *C. pomonella*). The latter supports virogenesis *in vitro* only poorly. With the best media (modifications M and N of Grace's medium) the course of virogenesis *in vitro* was about the same as *in vivo*, though less homogeneous, as shown by electron microscopic and autoradiographic studies, indicating that the medium should still be further optimized. The addition of juvenile hormone (JH) delayed virogenesis

in the best media and did not increase the number of GV per cell in the media with positive JH effect. Attempts to infect *in vitro* cultivated fat-body with infective hemolymph and/or infective fat-body extract failed with one exception. Even when fat-body from a healthy larva was cultivated in contact with infected fat-body, no infection resulted. Since the media of these cultures proved infective when tested *in vivo*, it must be concluded that infection *in vitro* was not possible under our conditions of culture, possibly because a vital factor was missing. Therefore EPC cultures were tested. They differentiated various cell types and tissues. It was thought that such cultures might improve conditions for infection. However, infection with virus containing hemolymph was not much more successful (1%) than the infection in fat-body cultures. Thus, GV infection *in vitro* is possible, but as yet poor and therefore difficult to detect.