

**Information Report GLC-X-5
Great Lakes Forestry Centre**

**Nucleopolyhedrovirus occlusion body
yields from spruce budworm,
Choristoneura fumiferana (Clem.), larvae
infected at various instars and doses**

**Nicholas J. Payne, Jose R. Valero,
Peter M. Ebling and Francoise N. Pelletier**

Natural Resources Canada
Canadian Forest Service, Great Lakes Forestry Centre
Box 490
Sault Ste. Marie, ON
P6A 5M7

National Library of Canada cataloguing in publication data

Nucleopolyhedrovirus occlusion body yields from spruce budworm,
Choristoneura fumiferana (Clem.), larvae infected at various instars and doses

(Information report, ISSN 2562-0738 ; GCL-X-5)

Text in English and French on inverted pages.

Title on added t.p.: Rendement de la production de corps d'inclusion
du virus de la polyédrose nucléaire à partir de chenilles de la tordeuse
des bourgeons de l'épinette, *Choristoneura fumiferana* (Clem.), infectées

à différentes ,ges et à doses diverses.

Includes bibliographical references.

ISBN 0-662-65687-3

Cat. No. Fo29-51/5-2001

1. Spruce budworm — Control — Canada.
2. Forest insects — Biological control — Canada.
3. Insects — Viruses.
4. Baculoviruses — Canada.
1. Payne, N.J. (Nicholas J.)
11. Great Lakes Forestry Centre.
- III. Series: Information report (Great Lakes Forestry Centre) ; GLC-X-5.

SB945.S7N82 2001

634.9'752678

C2001-980123-8E

©Her Majesty the Queen in Right of Canada 2001

Catalogue No. Fo29-51/5-2001

ISBN 0-662-65687-3

ISSN 2562-0738 (online)

Copies of this publication are available at no charge from:

Publication Services
Natural Resources Canada
Canadian Forest Service, Great Lakes Forestry Centre
P.O. Box 490
Sault Ste. Marie, Ontario
P6A 5M7

Microfiche copies of this publication may be purchased from:

Micro Media Inc.
Place du Portage
165, Hotel-de-Ville
Hull, Quebec J8X 3X2

The views, conclusions, and recommendations contained herein are those of the authors and should not be construed as either policy or endorsement by Natural Resources Canada.

Payne, N. J.; Valero, J. R.; Ebling, P. M.; Pelletier, F. N. 2001.
Nucleopolyhedrovirus occlusion body yields from spruce budworm,
Choristoneura fumiferana (Clem.), larvae infected at various instars and doses
Natural Resources Canada, Canadian Forest Service, Great Lakes Forestry
Centre, Infor. Rep. GLC-X-5, p.

ABSTRACT

The spruce budworm, *Choristoneura fumiferana* (Clem.), is an economically significant forest pest in Canada, for which improved control methods are sought. Nucleopolyhedrovirus use would be an improvement by reducing environmental impact, but is not commercially feasible due to high propagation cost and dose requirement. With a view to improving *in vivo* production techniques, spruce budworm larvae were infected at various doses and larval instars, and virus yield quantified. A diet plug bioassay was employed to allow larvae to be individually fed precisely controlled doses. Larval instars 4, 5 and 6 were infected with a wild-type nucleopolyhedrovirus, using doses between 10 and 10^6 virus occlusion bodies (OBs). Average yield per cadaver peaked at 4.3, 5.6 and 7.6×10^8 for fourth-, fifth- and sixth-instars, using doses of 10^3 , 10^4 and 10^6 OBs respectively. At these doses 96, 96 and 68% of larvae consumed the diet plugs, to become infected. Our data suggest that, depending on the circumstance, e.g., limited available inoculum, larvae or labour, different infection strategies are preferable. However, OB potency variation between instars at harvest needs to be evaluated before confirming a propagation strategy. For each instar, feeding deterrence was observed above a threshold dose and may need to be considered in mass propagation strategies.

Keywords: nucleopolyhedrovirus, occlusion body, yield, mass propagation, eastern spruce budworm, *Choristoneura fumiferana*

RÉSUMÉ

La tordeuse des bourgeons de l'épinette, *Choristoneura fumiferana* (Clem.), est un ravageur forestier qui cause des pertes économiques très importantes au Canada et contre lequel de nouvelles méthodes de lutte plus efficaces s'imposent. L'utilisation du virus de la polyédrose nucléaire (VPN) apparaît comme une stratégie de lutte novatrice, ce virus étant sans effet pour l'environnement. Toutefois, l'application à l'échelle commerciale de ce virus ne peut être envisagée pour l'instant en raison des coûts élevés de production et des fortes doses requises pour les traitements en forêts. Dans le but d'améliorer les méthodes de production *in vivo* de ce VPN, les chercheurs ont infecté des Chenilles de la tordeuse à différents âges et à des doses diverses en vue de quantifier chaque fois la production de virus obtenue. Dans le cadre de ces bioessais, des pastilles de milieu nutritif artificiel ont été employées afin de fournir aux Chenilles des doses individuelles très précises de nourriture. Des Chenilles des 4^{ème}, 5^{ème} et 6^{ème} âges ont été infectées par une souche sauvage du VPN, à des doses variant entre 10 et 10⁶ corps d'inclusion par larve. La production moyenne par cadavre a culminé à 4,3, 5,6 et 7,6 x 10⁸ corps d'inclusion par larve pour les 4^{ème}, 5^{ème} et 6^{ème} âges infectés par des doses de 10³, 10⁴ et 10⁶ corps d'inclusion respectivement. À ces doses, 96, 96 et 68 % des Chenilles ont consommé le milieu nutritif artificiel et sont devenues infectées. Les résultats de notre étude indiquent que, selon les circonstances, par exemple une quantité limitée d'inoculum ou un nombre limité de Chenilles ou de techniciens, différentes stratégies sont préférables en matière d'infection. Toutefois, il faut évaluer la virulence des corps d'inclusion d'un stade larvaire à l'autre avant de confirmer la stratégie à adopter. En outre, pour chaque âge testé, un effet anti-appétant a été observé lorsque les Chenilles de tordeuse étaient exposées à une dose supérieure à la dose limite. Il pourrait s'avérer nécessaire de prendre en compte ce phénomène dans le cadre des stratégies de production massive de VPN de la tordeuse des bourgeons de l'épinette.

Mots-clés : virus de la polyédrose nucléaire, corps d'inclusion, rendement, production massive, tordeuse des bourgeons de l'épinette, *Choristoneura fumiferana*.

TABLE OF CONTENTS

ABSTRACT	i
RÉSUMÉ	ii
1 INTRODUCTION	1
2 EXPERIMENTAL METHODS	1
2.1 Insect Supply and Rearing	1
2.2 Virus Inoculum	1
2.3 Virus Infection	1
2.4 Virus Quantification	2
3 RESULTS AND DISCUSSION	2
ACKNOWLEDGEMENTS	4
REFERENCES	5
NOTES	6

1 INTRODUCTION

The spruce budworm, *Choristoneura fumiferana* (Clem.) (Lepidoptera: Tortricidae), is an economically significant Canadian forest pest. Infestations of this insect can stretch over large areas and persist for several years, e.g., between 1970 and 1988 a total of 205 million ha were treated in Ontario (Howse 1995). The magnitude of the impact of this pest has led to the development of various control methods (Nigam 1974). In the 1960's and 70's organophosphorus compounds, e.g., fenitrothion, were widely used against spruce budworm, but concern over environmental impact on non-target organisms resulted in their being replaced with the biological control agent *Bacillus thuringiensis* kurstaki (Btk) in the early 1980's (van Frankenhuyzen 1985). However, because this product impacts lepidopteran species, it affects a wide range of insects, including non-target species. In view of the size of forested areas treated for budworm, a control agent with a narrower activity spectrum would be desirable in order to reduce environmental impact. Spruce budworm nucleopolyhedroviruses (family Baculoviridae) satisfy this requirement, having a very narrow activity spectrum (Cunningham and Kaupp 1995). At the end of the *Choristoneura fumiferana* multiple-embedded nucleopolyhedrovirus (*Cf*MNPV) infection cycle one or more rod shaped virus particles are occluded in nearly spherical proteinaceous occlusion bodies (Hunter-Fujita et al. 1998), typically 1 – 2 μm in diameter (unpublished data). This entity has been employed in broadcast aerial spray applications for experimental budworm control, although these treatments are presently very expensive due in part to the high cost of virus production (Cunningham and Kaupp 1995). In addition the large habitat surface area and cryptic behaviour of spruce budworm larvae necessitate relatively high applied doses, typically 10^{12} OB ha⁻¹. Viruses only propagate in living cells, and mass propagation must therefore be carried out in insects or by cell culture. Although the latter show promise for some species, *in vivo* methods are presently the only practical approach for large-scale mass production in budworm larvae. This is presently carried out by placing small groups of larvae in containers together with artificial diet, the surface of which has been contaminated with OBs.

To optimize *in vivo* virus production it is necessary to obtain optimal yield and potency, i.e., to obtain the maximum number of lethal doses per larva (Shapiro and Bell 1981). This requires maximising the parameter Y/LD_i , where Y_i is the OB yield for the i th larval instar and LD_j is the lethal dose of OBs from this instar required to control the j th larval instar. The goal of reducing the cost of treating spruce budworm with baculovirus is partly achieved by maximising yield from larvae during *in vivo*

propagation, and quantitative information is needed about maximum yields that can be expected, and under what dosing conditions, to facilitate improvements in production.

In the present investigation, OB yield was quantified in larvae dosed with a wild-type nucleopolyhedrovirus at various stages, using a range of doses in a diet plug bioassay. In this methodology larvae are individually fed small amounts of artificial diet on which known OB doses have been deposited (Kaupp and Ebling 1990). This method was chosen because it allows the effect of dose and timing on yield to be evaluated, unlike surface contamination assays often employed for yield quantification in which the dose ingested is variable and unknown, and timing is uncontrolled. Although dosing with diet plugs is too laborious to be used in a large scale propagation, needed information is provided by this methodology on the effect of dose and timing.

2 EXPERIMENTAL METHODS

2.1 Insect Supply and Rearing

Eastern spruce budworm larvae were obtained post-diapause, as second-instars, from the Insect Rearing Unit (IRU) of the Great Lakes Forestry Centre, Canadian Forest Service. Cotton gauze patches containing approximately 30 - 50 second-instar larvae were placed in 21 ml semi-transparent, ribbed, creamer cups (Portion Packaging, Etobicoke, Ontario) containing about 15 ml artificial diet (McMorran 1965), and capped with an unwaxed paper lid. Once larvae reached their fourth-instar they were thinned to six per cup, and placed on fresh diet. Larvae were maintained in a rearing chamber at 25°C, 60% RH with a 16L:8D photoperiod.

2.2 Virus Inoculum

A wild-type *Cf*MNPV isolate (T3) found in the early 1980's in field samples from Quebec (Valero 1995) was passaged through eastern spruce budworm larvae from the IRU to produce fresh inoculum for the bioassay. Infected insects were macerated in distilled water and cells lysed by the addition of sodium dodecylsulfate (0.3% w/v). The solution was stirred for 2 h at room temperature, filtered through three layers of cheesecloth, and the OBs pelleted out of suspension by centrifugation at 1483 $\times g$ for 30 min at 15°C. The pellet was washed 2 more times by resuspension in distilled water and recovered by similar centrifugation. After the final wash, OBs were resuspended in distilled water and stored at 4°C. The OB concentration in the stock solution was quantified by enumerating the number of OBs in a known volume, by

depositing, staining and microscopically counting OBs (Wigley 1980). With the technique employed suspensions with counts above 10^5 OB/ml were quantifiable.

2.3 Virus Infection

Larval dosing was accomplished using a diet plug bioassay technique (Kaupp and Ebling 1990). The following six serial dilutions were made from a stock virus suspension: 10^9 , 10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 and 10^4 OBs/ml. In the diet plug bioassay, 1ml of each dilution was deposited onto a cylindrical pellet of artificial diet (5 mm x 1 mm OD; surface area ~ 15 mm², volume ~ 4 mm³) which was previously placed inside a Beem® embedding capsule (size 00; interior volume 0.6 mL). Immediately thereafter, a newly molted (less than 24 h) larva of either gender was placed in the capsule to feed on the treated diet. Groups of larvae at the fourth-, fifth- and sixth-instar (L_4 , L_5 and L_6 , respectively) were treated with each of the six viral dilutions. This procedure was replicated twice with 10 larvae per group and twice with 20 larvae per group, to provide an overall total of 60 larvae set up for each instar and dose. With each replicate, larvae were also set up on diet plugs dosed with distilled water to provide an overall total of 60 control insects per instar. An overall total of 1260 larvae were set up.

After being set up on diet plugs larvae were returned to the rearing chamber for 24 h. At the end of that time those larvae which had consumed the entire pellet were transferred to creamer cups (five per cup) and again returned to the rearing chamber. Cups were inspected twice daily, at which time cadavers were removed to prevent rupture and OB loss, and stored in 1.5 ml microtubes at -20°C. Larval death within 24 h after being transferred to diet was assumed to be due to handling injury and these larvae were discarded. Any larvae that ruptured during removal were also discarded, although this was rare due to the frequent checks. Cross-infection between cohabiting larvae was not considered to be of importance because of the low density. Furthermore, the absence of OB production early in the baculovirus replication cycle would impair cross-infection until the original infection was well advanced (Hunter-Fujita et al. 1998), at which point the impact of cross infection would be relatively unimportant. Diet was changed at one week intervals from the date of inoculation. Larvae attaining the pupal stage were reared for a minimum of 10 days. Dead pupae were assumed to contain OBs, and were combined with dead larvae from the same replicate for counting. Adult insects were assumed not to contain OBs and were discarded.

2.4 Virus quantification

To determine the average yield per larva from each combination of instar and dose, cadavers were pooled and ground in a known volume of distilled water. OBs were then enumerated as described in section 2.2. The low level of control mortality, characteristic appearance of virus infected larvae at harvest, and absence of significant amounts of other microrganisms observed during counts, supported the assumption that the bulk of larval and pupal mortality was caused by NPV infection.

3 RESULTS AND DISCUSSION

Table 1 presents the average OB yield per cadaver, and Table 2 shows the proportion of fully dosed larvae, and the mortality amongst these larvae. To avoid misleading results, no corrections were made for control mortality as this could result in zero mortalities for some low dose treatments. Average survival times for various doses and instars are given in Table 3.

Table 1. Average OB yield per cadaver
(± 95% confidence interval).

OB Dosage	Average yield per cadaver		
	Fourth instar	Fifth instar	Sixth instar
10^1	$2.1 \pm 2 \times 10^5$	ND	ND
10^2	$3.6 \pm 0.6 \times 10^8$	$7.5 \pm 3 \times 10^7$	$1.3 \pm 0.7 \times 10^6$
10^3	$4.3 \pm 0.3 \times 10^8$	$1.8 \pm 0.6 \times 10^7$	$7.7 \pm 7.7 \times 10^5$
10^4	$2.6 \pm 0.2 \times 10^8$	$5.6 \pm 0.4 \times 10^8$	$1.7 \pm 0.4 \times 10^8$
10^5	$8 \pm 1 \times 10^7$	$2.9 \pm 0.2 \times 10^8$	$3.4 \pm 0.4 \times 10^8$
10^6	$1.8 \pm 0.6 \times 10^8$	$1.6 \pm 0.2 \times 10^8$	$7.6 \pm 0.5 \times 10^8$

ND – No OBs observed due to low number

These results allow OB yield potential for *in vivo* production of CfMNPV from various instars and doses to be assessed. The highest yield per cadaver for larvae dosed as L_4 's was for the 10^3 OB dose, which provided 4.3×10^8 OBs per larva. The 10^2 OB dose yielded slightly less at 3.6×10^8 OBs per larva. At doses of 10^4 , 10^5 and 10^6 some larvae died before reaching the final instar (6th), thereby resulting in a lower yield due to the reduced final body weight (Ebling and Kaupp 1998). Average survival time decreased from 18 to 6 days with a dose increase from 10^2 to 10^5 OBs. The reduced survival times with increasing dose reflects the reduced time needed for the virus count to reach a lethal level. With the 10^1 OB dose, yield was low due to the light infection caused in the most susceptible larvae. The highest yield per cadaver for larvae dosed as L_5 's was with a dose of 10^4 OBs, which provided 5.6×10^8 OBs per larva. At doses of 10^2 and 10^3

Table 2. Percentage of larvae that completely consumed the diet plug, and uncorrected¹ mortality amongst fully-dosed larvae (\pm SE).

OB Dosage	Instar					
	Fourth	Fifth	Sixth			
% of larvae consuming plug	Mortality (%)	% of larvae consuming plug	Mortality (%)	% of larvae consuming plug	Mortality (%)	
Control	66±10	12±7	96±3	10±4	86±5	5±3
10 ¹	71±10	6±5	94±3	6±6	88±5	3±3
10 ²	84±6	8±7	99±2	10±10	93±5	1±1
10 ³	96±3	42±20	90±5	5±3	91±5	12±3
10 ⁴	91±5	63±19	96±3	30±21	95±3	11±4
10 ⁵	41±22	77±21	91±7	71±34	88±6	34±9
10 ⁶	3±3	100±0	20±12	100±0	68±8	52±20

¹ – no corrections were made because of the low mortalities observed with low virus doses, which could result in zero corrected mortality.

OBs the resulting light infection reduced yields, whereas doses of 10⁵ and 10⁶ reduced survival time and, by implication, body weights; average survival time was reduced from 18 to 6 days with a dose increase from 10² to 10⁶ OBs. Larvae dosed as L₆'s provided low yields at doses of 10² and 10³ OBs due to the light infection caused, and the highest average yield per cadaver was 7.6 x 10⁸ OBs, obtained from the 10⁶ OB dose.

Our results suggest various strategies for mass propagation, depending on the goals to be met. Infecting fourth-instars with 10³ OBs produces an OB increase greater than x 10⁵, and this would be a preferable production route if limited available inoculum was the overriding consideration. On the other hand if a limited number of larvae were available, combining the yield per larva (5.6 x 10⁸) and infection rate (96%) shows that infecting fifth-instars with 10⁴ OBs would provide the highest overall yield. The ease of handling sixth-instars would be a desirable aspect of production if economising on labour was of prime importance, and infecting this instar also provides the highest yield per infected larva. This observation is consistent with previous findings that show a close relationship between host weight at death and OB productivity (Hunter-Fujita et al. 1998). The choice of instar for harvesting needs to be evaluated further with measurements of product potency from the different instars, as in gypsy moth NPV production the potency of OBs from L₆ larvae was less than those from L₄'s (Shapiro et al. 1986). Based on a typical field dose (10¹² OBs ha⁻¹; Cunningham and Kaupp 1995), the maximum yield

obtained in these experiments (7.6 x 10⁸ OBs) would imply requirement of 1316 larvae ha⁻¹ for propagation. Recent work has shown that OB yield may be increased by dosing early in the instar (O'Reilly et al. 1998), and in the present investigation this opportunity was realised as larvae were set up on diet plugs within 24 h of molting.

By comparison with the present results, the results from the diet surface contamination experiment showed an average yield per cadaver (\pm SE) of 1.1 ± 0.3, 4.4 ± 1.0 and 5.1 ± 0.4 x 10⁷ OBs for larvae inoculated as fourth-, fifth- and sixth-instars (Ebling and Kaupp 1998). These yields are more than ten-fold lower than the respective maximum

Table 3. Average number of days to death for fully dosed larvae ("SD).

OB Dosage	Instar		
	Fourth	Fifth	Sixth
	Days to death	Days to death	Days to death
Control	16±8	17±6	13±5
10 ¹	14±9	10±1	13±6
10 ²	18±5	17±6	11±7
10 ³	15±6	15±7	14±5
10 ⁴	11±6	13±5	15±4
10 ⁵	6±4	10±5	11±5
10 ⁶	6	6±2	9±4

yields per cadaver obtained in the present experiment. Those larvae ingested an unknown dose over an undetermined time period from an average OB density of 1000 mm⁻². Only one density was employed and no attempt was made to optimise this parameter. It is apparent that employing diet surface contamination to evaluate potential yield, without any dose optimisation, may lead to underestimation. Nevertheless, it is evident that the average yield per cadaver (Table 1) is a theoretical maximum for diet surface contamination methodology, and some reduction from this value would be expected due to sub- or superoptimum dosing resulting from the use of diet surface contamination methodology in mass propagation.

Our results (Table 2) show a reduction in the proportion of larvae completely ingesting the plug when doses above a threshold value were presented; the reduction occurred when doses of 10⁴ OBs (L₄) or 10⁵ OBs (L₅ and L₆) were exceeded. This suggests that feeding deterrence occurred in our experiments. The corresponding OB densities on the diet plug surface are about 670 and 6700 OB mm⁻². Thus in the diet surface contamination experiments referred to above (Ebling and Kaupp 1998), some L₄ feeding deterrence likely occurred. Feeding deterrence may result from inoculum components other than OBs, although with the purification method employed (see 2.2) this was unlikely. At the 10⁶ dose, the mass of OBs on the diet plug was estimated to be only about 0.3% of the diet plug mass. Our observations of feeding deterrence appear to be novel in that no literature references on this aspect could be found. This phenomenon could be of practical importance in mass production, requiring adjustment of dosing levels to ensure adequate larval feeding for dose ingestion, or use of a gustatory stimulant.

For all instars the highest yields per cadaver were obtained when mortality was well below 100%, specifically 42, 30, and 52 % for L₄, L₅ and L₆'s. Thus the dose ingested was at or below the LD₅₀ value. To improve the economics of large scale propagation it would be desirable to infect a larger proportion of the larvae, to obtain OBs from a large fraction of insects reared. However, from the present results (Table 2) it is apparent that feeding deterrence occurs at those doses where 100% mortality is obtained. This phenomenon would tend to limit dose ingestion and the proportion of larvae infected. One way to ameliorate this effect, and increase the proportion of larvae infected, would be to use a viral enhancer such as an optical brightener (Hunter-Fujita et al. 1998; Li and Otvos 1999).

The putative mechanism for the action of these agents in reducing LD₅₀ is to degrade the peritrophic membrane in the insect gut thereby providing higher infection probabilities (Shields and Podgewaite 1995).

The present investigation provides insight into some aspects of *in vivo* baculovirus propagation in spruce budworm, but several aspects remain to be explored. Firstly, the potency of OBs from harvesting various eastern spruce budworm instars should be evaluated. In addition, because production methodology is presently labour intensive, ways of reducing labour input are needed to achieve economically viable production. This implies cutting down on time spent in insect handling and diet requirements and manipulation. Nevertheless, diet quality is a significant factor in successful *in vivo* production, and requires adequate maintenance.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank AEF Global and the National Biotechnology Strategy fund for financial support.

REFERENCES

- Cunningham, JC; Kaupp, W. 1995. Insect viruses. Pages 327 - 340 in J.A. Armstrong and W.G.H. Ives, eds. Forest Insect Pests in Canada. Natural Resources Canada, Ottawa.
- Ebling P.M.; Kaupp W.J. 1998. Yield of occlusion bodies from spruce budworm, *Choristoneura fumiferana* (Lepidoptera: Tortricidae), larvae infected with a nuclear polyhedrosis virus. Can. Entomol. 130: 243 - 244.
- Howse, G. 1995. Forest insect pests in the Ontario region. Pages 42 - 57 in J.A. Armstrong and W.G.H. Ives, eds. Forest Insect Pests in Canada. Natural Resources Canada, Ottawa.
- Hunter-Fujita, F.; Entwhistle, P.; Evans, H.; Crook, N. 1998. Pages 24 and 93 in *Insect Viruses and Pest Management*. John Wiley and Sons, Chichester, England.
- Kaupp W.J.; Ebling P.M. 1990. Response of third-, fourth-, fifth-, and sixth-instar spruce budworm, *Choristoneura fumiferana* (Clem.), larvae to nuclear polyhedrosis virus. Can. Entomol. 122: 1037 - 1038.
- Li, S.Y.; Ottos, I.S. 1999. Comparison of activity enhancement of a baculovirus by optical brighteners against laboratory and field strains of *Choristoneura occidentalis* (Lepidoptera: Tortricidae). J. of Econ. Entomol. 92: 534-38.
- McMorran, A. 1965. A synthetic diet of the spruce budworm, *Choristoneura fumiferana* (Clem.). Can. Entomol. 97: 58 - 62.
- O'Reilly, D.R.; Hails, R.S.; Kelly, T.J. 1998. The impact of host developmental status on baculovirus replication. J. Invertebr. Pathol. 72: 269 - 275.
- Nigam, P. C. 1974. Chemical control. Pages 8 - 24 in M. Prebble, ed. Aerial Control of Forest Insects in Canada. Dept. of Environment, Ottawa.
- Shapiro, M.; Bell, R.A. 1981. Biological activity of *Lymantria dispar* nucleopolyhedrosis virus from living and virus killed larvae. Ann. Entomol. Soc. Am. 74: 27-28.
- Shapiro, M.; Robertson, J.L.; Bell, R.A. 1986. Quantitative and qualitative differences in gypsy moth (Lepidoptera: Lymantridae) nucleopolyhedrosis virus produced in different-aged larvae. J. Econ. Entomol. 79: 1174-77.
- Shields, K.; Podgwaite, J.D. 1995. Effects of nuclear polyhedrosis virus formulations on *Lymantria dispar* larval peritrophic membrane. Pages 1010 - 1011 in G.W. Bailey; M.H. Ellisman; R.A. Hennigar; N.J. Zaluzec, eds. Microscopy and Microanalysis. Proc. Conf. 1995. Jones & Begell Publishing, New York.
- Van Frankenhuyzen, K. 1995. Development and current status of *Bacillus thuringiensis* for control of defoliating insects. Pages 315 - 325 in J.A. Armstrong and W.G.H. Ives, eds. Forest Insect Pests in Canada. Natural Resources Canada, Ottawa.
- Valero, J.R. 1995. Le BT H3a3b et le virus de polyhédrose nucléaire: insecticides microbien efficaces contre la TBE. Pages 123 - 127 in Séminaire sur la tordeuse des bourgeons de l'épinette: en savons-nous assez pour lutter efficacement contre la tordeuse? April 12th and 13th 1995. L'Hôtel Hilton, Québec City. Ministère des Ressources Naturelles du Québec.
- Wigley, P.J. 1980. Counting microorganisms. Pages 29 - 35 in J. Kalmakoff and J.F. Longworth, eds. Microbial Control of Insect Pests. Research Bulletin # 228. New Zealand Department of Science and Industry, Wellington, NZ.

NOTES:

Rapport d'information GLC-X-5
Centre de foresterie des Grands Lacs

**Rendement de la production de corps
d'inclusion du virus de la polyédrose nucléaire
à partir de chenilles de la tordeuse des bourgeons de
l'épinette, *Choristoneura fumiferana* (Clem.), infectées à
différents âges et à des doses diverses**

Nicholas J. Payne, José R. Valéro,
Peter M. Ebling et Françoise N. Pelletier

Ressources naturelles Canada
Service canadien des forêts, Centre de foresterie des Grands Lacs
C.P. 490
Sault Ste. Marie (Ontario)
P6A 5M7

Données de catalogage avant publication de la Bibliothèque nationale du Canada

Rendement de la production de corps d'inclusion du virus de la polyédrose nucléaire à partir de chenilles de la tordeuse des bourgeons de l'épinette, *Choristoneura fumiferana* (Clem.), infectées à différentes , âges et à doses diverses

(Rapport d'information, GLC-X-5)

Texte en français et en anglais disposé tête-bêche.

Titre de la p.de t.addit.: Nucleopolyhedrovirus occlusion body yields from spruce budworm, *Choristoneura fumiferana* (Clem.), larvae infected at various instars and doses.

Comprend des références bibliographiques.

ISBN 0-662-65687-3

No de cat. Fo29-51/5-2001

1. Tordeuse des bourgeons de l'épinette, Lutte contre la — Canada.
 2. Insectes forestiers, Lutte biologique contre les — Canada.
 3. Insectes — Virus.
 4. Virus de la polyédrose nucléaire.
- I. Payne, N.J. (Nicholas J.)
II. Centre de foresterie des Grands Lacs.
III. Coll.: Rapport d'information (Centre de foresterie des Grands Lacs) ; GLC-X-5.

SB945.S7N82 2001

634.9'752678

C2001-980123-8F

©Sa Majesté la Reine du chef du Canada 2001
Numéro de catalogue F029-51/5-2001
ISBN 0-662-65687-3
ISSN 0832-7122

Il est possible d'obtenir sans frais un nombre restreint d'exemplaires

en français de cette publication de :

Secteur publication

Ressources naturelles Canada

Service canadien des forêts, Centre de foresterie des Grands Lacs

C.P. 490

Sault Ste. Marie (Ontario)

P6A 5M7

Des copies microfiches de cette publication sont en vente chez :

MicroMedia Inc.

Place du Portage 165, Hotel-de-Ville

Hull (Québec) J8X 3X2

Les opinions, conclusions, et recommandations contenues dans le présent document sont celles des auteurs et ne reflètent pas nécessairement la politique ou les positions de Ressources naturelles Canada.

Payne, N. J.; Valéro, J. R.; Ebling, P. M.; Pelletier, F. N. 2001. Rendement de la production de corps d'inclusion du virus de la polyédrose nucléaire à partir de chenilles de la tordeuse des bourgeons de l'épinette, *Choristoneura fumiferana* (Clem.), infectées à différents âges et à des doses diverses. Ressources naturelles Canada, Service canadien des forêts, Centre de foresterie des Grands Lacs. Rapport d'information. GLC-X-5. 6p.

RÉSUMÉ

La tordeuse des bourgeons de l'épinette, *Choristoneura fumiferana* (Clem.), est un ravageur forestier qui cause des pertes économiques très importantes au Canada et contre lequel de nouvelles méthodes de lutte plus efficaces s'imposent. L'utilisation du virus de la polyédrose nucléaire (VPN) apparaît comme une stratégie de lutte novatrice, ce virus étant sans effet pour l'environnement. Toutefois, l'application à l'échelle commerciale de ce virus ne peut être envisagée pour l'instant en raison des coûts élevés de production et des fortes doses requises pour les traitements en forêts. Dans le but d'améliorer les méthodes de production *in vivo* de ce VPN, les chercheurs ont infecté des chenilles de la tordeuse à différents âges et à des doses diverses en vue de quantifier chaque fois la production de virus obtenue. Dans le cadre de ces bioessais, des pastilles de milieu nutritif artificiel ont été employées afin de fournir aux chenilles des doses individuelles très précises de nourriture. Des chenilles des 4^{ème}, 5^{ème} et 6^{ème} âges ont été infectées par une souche sauvage du VPN, à des doses variant entre 10 et 10⁶ corps d'inclusion par larve. La production moyenne par cadavre a culminé à 4,3, 5,6 et 7,6 x 10⁸ corps d'inclusion par larve pour les 4^{ème}, 5^{ème} et 6^{ème} âges infectés par des doses de 10³, 10⁴ et 10⁵ corps d'inclusion respectivement. À ces doses, 96, 96 et 68 % des chenilles ont consommé le milieu nutritif artificiel et sont devenues infectées. Les résultats de notre étude indiquent que, selon les circonstances, par exemple une quantité limitée d'inoculum ou un nombre limité de chenilles ou de techniciens, différentes stratégies sont préférables en matière d'infection. Toutefois, il faut évaluer la virulence des corps d'inclusion d'un stade larvaire à l'autre avant de confirmer la stratégie à adopter. En outre, pour chaque âge testé, un effet anti-appétant a été observé lorsque les chenilles de tordeuse étaient exposées à une dose supérieure à la dose limite. Il pourrait s'avérer nécessaire de prendre en compte ce phénomène dans le cadre des stratégies de production massive de VPN de la tordeuse des bourgeons de l'épinette.

Mots-clés : virus de la polyédrose nucléaire, corps d'inclusion, rendement, production massive, tordeuse des bourgeons de l'épinette, *Choristoneura fumiferana*.

Abstract:

The spruce budworm, *Choristoneura fumiferana* (Clem.), is an economically significant forest pest in Canada, for which improved control methods are sought. Nucleopolyhedrovirus use would be an improvement by reducing environmental impact, but is not commercially feasible due to high propagation cost and dose requirement. With a view to improving *in vivo* production techniques, spruce budworm larvae were infected at various doses and larval instars, and virus yield quantified. A diet plug bioassay was employed to allow larvae to be individually fed precisely controlled doses. Larval instars 4, 5 and 6 were infected with a wild-type nucleopolyhedrovirus, using doses between 10 and 10^6 virus occlusion bodies (OBs). Average yield per cadaver peaked at 4.3, 5.6 and 7.6×10^8 for fourth-, fifth- and sixth-instars, using doses of 10^3 , 10^4 and 10^6 OBs respectively. At these doses 96, 96 and 68% of larvae consumed the diet plugs, to become infected. Our data suggest that, depending on the circumstance, e.g., limited available inoculum, larvae or labour, different infection strategies are preferable. However, OB potency variation between instars at harvest needs to be evaluated before confirming a propagation strategy. For each instar, feeding deterrence was observed above a threshold dose and may need to be considered in mass propagation strategies.

Keywords: nucleopolyhedrovirus, occlusion body, yield, mass propagation, eastern spruce budworm, *Choristoneura fumiferana*

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	i
ABSTRACT	ii
1 INTRODUCTION	1
2 MÉTHODES EXPÉRIMENTALES	1
2.1 Source de chenilles et élevage	1
2.2 Inoculum viral	2
2.3 Infection virale	2
2.4 Évaluation du rendement de corps d'inclusion du VPN	2
3 RÉSULTATS ET DISCUSSION	3
REMERCIEMENTS	5
RÉFÉRENCES	6

1 INTRODUCTION

La tordeuse des bourgeons de l'épinette, *Choristoneura fumiferana* (Clem.) (Lepidoptera : Tortricidae), est un ravageur forestier qui cause des pertes économiques très importantes au Canada. Les infestations par cet insecte peuvent sévir durant plusieurs années sur de très grands territoires. Entre 1970 et 1988, par exemple, 205 millions d'hectares ont été traités en Ontario contre ce lépidoptère (Howse, 1995). L'ampleur des dommages causés par ce ravageur ont conduit à la mise au point de diverses méthodes de lutte (Nigam, 1974). Au cours des années 1960 et 1970, divers insecticides organophosphorés, comme le fénitrothion, ont été largement utilisés contre la tordeuse, mais les craintes suscitées par les effets de ces produits sur l'environnement ou les organismes non ciblés ont entraîné leur remplacement, au début des années 1980, par l'agent de lutte biologique *Bacillus thuringiensis* var kurstaki (Btk) (van Frankenhuyzen, 1985). Toutefois, comme Btk agit contre la plupart des lépidoptères, certaines espèces non ciblées peuvent être touchées. Compte tenu de l'importance des zones forestières devant être traitées contre la tordeuse, la mise au point d'un agent de lutte plus spécifique paraît donc souhaitable. Les virus déterminant une polyédrose nucléaire (famille des Baculoviridae) chez la tordeuse satisfont à ce critère, du fait que leur spectre d'activité est très étroit (Cunningham et Kaupp, 1995). À la fin du cycle d'infection par le virus de la polyédrose nucléaire à inclusions multiples du *Choristoneura fumiferana* (CJMVPN), une ou plusieurs particules virales en forme de bâtonnets sont incluses dans des corps d'inclusion de nature protéique presque sphériques mesurant typiquement entre 1 et 2 mm de diamètre (données non publiées). Cette entité a été mise à l'essai dans le cadre de pulvérisations aériennes expérimentales en pleine surface contre la tordeuse des bourgeons de l'épinette. Ces traitements demeurent pour l'instant très chers, en raison, notamment, des coûts très élevés de production du virus (Cunningham et Kaupp, 1995). En outre, les grandes superficies à traiter et le comportement cryptique des chenilles nécessitent l'application de doses relativement élevées – habituellement 10^{12} corps d'inclusion ha⁻¹.

Par ailleurs, comme les virus se multiplient uniquement dans les cellules vivantes, la production massive de VPN doit être réalisée par infection de l'hôte ou de cultures cellulaires. Bien que la deuxième option semble prometteuse pour certaines espèces, les méthodes de production *in vivo* demeurent pour l'instant la seule approche pratique pour la production à grande échelle de VPN de tordeuse. Cette technique consiste à placer de petits groupes de chenilles sur un milieu nutritif artificiel dont la surface a été contaminée par des corps d'inclusion du VPN à produire.

Pour optimiser la production *in vivo* du virus, il est nécessaire d'obtenir les meilleurs rendement et virulence possibles ou, en d'autres mots, d'obtenir le nombre maximal de doses létale par chenille (Shapiro et Bell, 1981). À cette fin, il faut maximiser le paramètre Y/DL_i, où Y_i est la quantité de corps d'inclusion obtenue avec le i^{ème} stade larvaire et DL_i la dose létale de corps d'inclusion issue de ce stade qui est requise pour éliminer les chenilles du j^{ème} stade. L'objectif de réduction des coûts du traitement par le VPN contre des chenilles de tordeuse est partiellement atteint en optimisant la production à partir des chenilles durant la multiplication *in vivo*. Pour y parvenir, il faut toutefois disposer d'informations quantitatives sur les meilleurs rendements auxquels on est en droit de s'attendre et sur les doses requises pour atteindre de tels rendements.

Dans le cadre de la présente recherche, la production de corps d'inclusion a été quantifiée chez des chenilles de tordeuse de différents âges exposées à des doses diverses d'une souche sauvage de VPN administrées dans une pastille de milieu artificiel. Durant ces bioessais, les chenilles ont été nourries individuellement à l'aide de petites quantités de milieu nutritif artificiel sur lequel une dose connue de corps d'inclusion avait été déposée (Kaupp et Ebling, 1990). Cette méthode a été retenue parce qu'elle permet d'évaluer l'effet de la dose et de la durée d'exposition sur la production de VPN, contrairement aux essais de contamination de la surface qui sont souvent utilisés pour quantifier la production et dans le cadre desquels la dose ingérée est à la fois variable et indéterminée et la durée d'exposition non contrôlée. Bien que la détermination de la dose avec les pastilles de milieu artificiel soit une opération trop fastidieuse pour être envisagée dans un contexte de production massive, cette méthode permet d'obtenir les informations recherchées sur l'effet de la dose et de la durée d'exposition.

2 MÉTHODES EXPÉRIMENTALES

2.1 Source des chenilles et élevage

Les chenilles de tordeuse des bourgeons de l'épinette utilisées dans le cadre des essais étaient du 2^{ème} âge en post-diapause et provenaient de l'unité d'élevage d'insectes du Centre de foresterie des Grands Lacs du Service canadien des forêts. Des tampons de gaze hébergeant environ de 30 à 50 chenilles du 2^{ème} âge ont été placés dans de petits contenants translucides à parois cannelées d'une capacité de 21 ml (Portion Packaging, Etobicoke, en Ontario) renfermant environ 15 ml de milieu nutritif artificiel (McMorran, 1965). Chaque contenant a ensuite été fermé à l'aide d'un couvercle en papier non ciré. Les chenilles ayant atteint le 4^{ème} âge ont été

transférées sur un milieu nutritif frais, à raison de six individus par contenant. L'élevage des chenilles s'est déroulé dans une chambre de croissance à 25°C, avec une humidité relative de 60 % et une photopériode de 16/8 heures (L/O).

2.2 Inoculum viral

Un isolat sauvage de C/MVPN (T3) découvert au début des années 1980 parmi des échantillons prélevés sur le terrain au Québec (Valéro, 1995) a été multiplié à l'aide de chenilles de tordeuse provenant de l'unité d'élevage d'insectes en vue d'obtenir la quantité d'inoculum frais requise pour les expériences. Les chenilles virosées ont été mises à macérer dans de l'eau distillée, et les cellules ont été lysées par addition d'une solution de sodium dodécylsulfate (0,3 % p/v). La suspension a été agitée pendant deux heures à la température de la pièce et filtrée à travers trois épaisseurs d'un tissu coton à fromage. Un culot de corps d'inclusion du C/MVPN (T3) a été obtenu par centrifugation à 1 483 x g de la suspension virale pendant 30 minutes à 15°C. Le culot a été lavé deux autres fois dans de l'eau distillée et récupéré selon le même protocole de centrifugation. Après le dernier lavage, les corps d'inclusion du C/MVPN (T3) ont été remis en suspension dans de l'eau distillée et entreposés à 4°C. La concentration des corps d'inclusion dans la suspension de réserve a été évaluée grâce au compte des corps d'inclusion dans un volume connu, par dépôt, coloration et dénombrement sous microscope des corps d'inclusion (Wigley, 1980). En procédant ainsi, les suspensions contenant plus de 10⁵ corps d'inclusion/ml étaient mesurables.

2.3 Infection virale

Les doses d'infection des larves de tordeuse ont été déterminées au moyen de bioessais réalisés à l'aide de pastilles de milieu nutritif artificiel (Kaupp et Ebling, 1990). Six dilutions en série allant de 10⁰, 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴ à 10⁻⁵ corps d'inclusion/ml ont été préparées à partir d'une suspension de réserve du C/MVPN. Pour les bioessais, 1 µl de chaque dilution a été déposé sur une pastille cylindrique de milieu artificiel (5 mm x 1 mm de dimensions; superficie ~ 15 mm², volume ~ 4 mm³) préalablement placée dans une capsule d'enrobage Beem® (calibre 00; volume intérieur de 0,6 ml). Immédiatement après, une chenille venant tout juste de muer (au cours des dernières 24 h), d'un sexe ou de l'autre, a été placée dans la capsule renfermant le milieu nutritif. Des groupes de chenilles des 4^{ème}, 5^{ème} et 6^{ème} âges (L₄, L₅, L₆ respectivement) ont ainsi été exposés à chacune des six dilutions virales. Cette procédure a été répétée deux fois avec des groupes de 10 chenilles et deux fois avec des groupes de 20 chenilles de manière à obtenir un total global de 60 individus pour

chaque âge larvaire et chaque dose. Pour chacune des répétitions, d'autres chenilles ont été placées sur des pastilles traitées avec de l'eau distillée, de manière à avoir un total de 60 individus témoins par âge larvaire. Un total global de 1 260 larves de tordeuse ont ainsi été utilisées dans le cadre des bioessais.

Après avoir été déposées sur les pastilles de milieu nutritif, les chenilles ont été retournées dans la chambre d'élevage pendant 24 heures. Au terme de cette période, les chenilles ayant consommé toute la pastille ont été transférées dans de petits contenants, à raison de cinq individus par contenant, et de nouveau retournées dans la chambre de croissance. Les contenants ont été inspectés deux fois par jour. Chaque fois, les cadavres étaient enlevés afin de prévenir la rupture des téguments ainsi que la perte des corps d'inclusion, et entreposés à -20°C dans des tubes de 1,5 ml. La mort d'une chenille dans les 24 heures suivant son transfert sur le milieu nutritif était vraisemblablement imputable à des blessures subies durant la manipulation. Toutes les larves présentant ces symptômes ont été éliminées. De la même façon, les chenilles dont les téguments se sont rompus durant le transfert ont été exclues. Toutefois, en raison de la fréquence des inspections, ce problème fut rarement observé. Le risque de contamination croisée entre les insectes réunis dans un même contenant a été jugé négligeable, étant donné la faible densité des chenilles dans les contenants. À cet égard, l'absence de production de corps d'inclusion au début du cycle de réPLICATION du baculovirus devrait prévenir la contamination croisée jusqu'à ce que l'infection originale soit bien installée (Hunter-Fujita *et al.*, 1998), l'incidence de la contamination croisée devant donc alors s'estomper considérablement. Le milieu nutritif a été changé une fois par semaine à partir de la date d'inoculation virale. Les larves ayant atteint le stade nymphal ont été élevées pendant au moins dix jours. Les chrysalides mortes ont été considérées comme contenant des corps d'inclusion et, dès lors, regroupées avec les chenilles mortes provenant de la même répétition aux fins des dénominations des corps d'inclusion obtenus. Les adultes ont été jugés exempts de corps d'inclusion et éliminés.

2.4 Évaluation du rendement de corps d'inclusion du VPN

Pour déterminer la production moyenne de corps d'inclusion du VPN par chenille pour chaque combinaison d'âge larvaire et de dose, les cadavres des insectes ont été regroupés dans un volume déterminé d'eau distillée. Les corps d'inclusion ont alors été dénombrés selon la procédure décrite à la section 2.2. Le faible niveau de mortalité observé parmi les chenilles témoins, l'aspect

caractéristique des Chenilles infectées par le virus au moment de la récolte et l'absence de quantités importantes d'autres micro-organismes au moment des dénombremens ont contribué à renforcer l'hypothèse selon laquelle la mortalité larvaire et nymphale était essentiellement attribuable à l'infection par le VPN.

3 RÉSULTATS ET DISCUSSION

Tableau 1. Quantité moyenne de corps d'inclusion par cadavre ($\pm 95\%$ d'intervalle de confiance).

Dose inoculée (Corps d'inclusion)	Production moyenne par cadavre		
	4 ^{ème}	5 ^{ème}	6 ^{ème}
10 ¹	2.1 \pm 2x10 ⁵	ND	ND
10 ²	3.6 \pm 0.6x10 ⁶	7.5 \pm 3x10 ⁷	1.3 \pm 0.7x10 ⁶
10 ³	4.3 \pm 0.3x10 ⁸	1.8 \pm 0.6x10 ⁷	7.7 \pm 7.7x10 ⁵
10 ⁴	2.6 \pm 0.2x10 ⁸	5.6 \pm 0.4x10 ⁸	1.7 \pm 0.4x10 ⁸
10 ⁵	8 \pm 1x10 ⁷	2.9 \pm 0.2x10 ⁸	3.4 \pm 0.4x10 ⁸
10 ⁶	1.8 \pm 0.6x10 ⁸	1.6 \pm 0.2x10 ⁸	7.6 \pm 0.5x10 ⁸

ND – Quantité de corps d'inclusion non déterminée en raison d'une trop faible concentration

Le tableau 1 présente la production moyenne de corps d'inclusion virale par cadavre, et le tableau 2, la proportion de Chenilles ayant reçu la dose maximale ainsi que la mortalité enregistrée parmi celles-ci. Afin d'éviter

d'obtenir des résultats pouvant porter à confusion, aucune correction n'a été apportée aux données de mortalité enregistrées chez les Chenilles témoins, puisque cela aurait pu mener à des taux négligeables de mortalité parmi certains groupes exposés à des faibles doses de C/MVPN. Les durées moyennes de survie par âge larvaire et par dose virale sont présentées dans le tableau 3.

Tableau 3. Nombre de jours avant que les larves meurent après avoir consommé la dose requise de virus ($\pm SD$).

Dose inoculée (Corps d'inclusion)	Âge		
	4 ^{ème}	5 ^{ème}	6 ^{ème}
	Jours avant la mortalité	Jours avant la mortalité	Jours avant la mortalité
Contrôle	16 \pm 8	17 \pm 6	13 \pm 5
10 ¹	14 \pm 9	10 \pm 1	13 \pm 6
10 ²	18 \pm 5	17 \pm 6	11 \pm 7
10 ³	15 \pm 6	15 \pm 7	14 \pm 5
10 ⁴	11 \pm 6	13 \pm 5	15 \pm 4
10 ⁵	6 \pm 4	10 \pm 5	11 \pm 5
10 ⁶	6	6 \pm 2	9 \pm 4

Ces résultats permettent d'évaluer l'obtention potentielle de corps d'inclusion pour la production *in vivo* du C/MVPN à partir de différents âges larvaires et pour des doses diverses de ce baculovirus. Chez les Chenilles de 4^{ème} âge exposées au C/MVPN la plus forte production de virus

Tableau 2. Pourcentage de larves ayant consommé totalement la pastille de milieu nutritif et mortalité non corrigée¹ chez les larves consommé toute la dose requise de VPN ($\pm SE$).

Dose inoculée (Corps d'inclusion)	Âge					
	4 ^{ème}	5 ^{ème}	6 ^{ème}			
% de larves ayant consommé la Pastille de milieu nutritif	Mortalité (%)	% de larves ayant consommé la Pastille de milieu nutritif	Mortalité (%)	% of ayant consommé la Pastille de milieu nutritif	Mortalité (%)	
Contrôle	66 \pm 10	12 \pm 7	96 \pm 3	10 \pm 4	86 \pm 5	5 \pm 3
10 ¹	71 \pm 10	6 \pm 5	94 \pm 3	6 \pm 6	88 \pm 5	3 \pm 3
10 ²	84 \pm 6	8 \pm 7	99 \pm 2	10 \pm 10	93 \pm 5	1 \pm 1
10 ³	96 \pm 3	42 \pm 20	90 \pm 5	5 \pm 3	91 \pm 5	12 \pm 3
10 ⁴	91 \pm 5	63 \pm 19	96 \pm 3	30 \pm 21	95 \pm 3	11 \pm 4
10 ⁵	41 \pm 22	77 \pm 21	91 \pm 7	71 \pm 34	88 \pm 6	34 \pm 9
10 ⁶	3 \pm 3	100 \pm 0	20 \pm 12	100 \pm 0	68 \pm 8	52 \pm 20

¹ – Aucune correction n'a été apportée en raison du faible taux de mortalité larvaire observé lors de l'infection avec de faibles doses de VPN.

par cadavre, soit $4,3 \times 10^{4^{\text{ème}}}$ corps d'inclusion par chenille, a été enregistrée avec la dose de 10^3 corps d'inclusion. La dose de 10^2 corps d'inclusion a donné une production légèrement inférieure, soit $3,6 \times 10^8$ corps d'inclusion par chenille. Aux doses de 10^4 , 10^5 et 10^6 corps d'inclusion, certaines chenilles du $4^{\text{ème}}$ âge sont mortes avant d'avoir atteint le dernier âge larvaire (L_6) et ont donc produit moins de corps d'inclusion, leur poids corporel final étant réduit (Ebling et Kaupp, 1998). Une augmentation des doses de 10^2 à 10^5 corps d'inclusion a réduit la durée moyenne de survie de 18 à 6 jours. La réduction du temps de survie engendrée par l'augmentation de la dose indique qu'à une concentration plus élevée, la dose létale est atteinte plus rapidement. À la dose de 10^1 corps d'inclusion, la production a été limitée à cause du faible niveau d'infection induit chez les chenilles les plus sensibles. La plus forte production par cadavre chez les chenilles exposées au $5^{\text{ème}}$ âge, soit $5,6 \times 10^8$ corps d'inclusion par chenille, a été enregistrée pour une dose d'infection de 10^4 corps d'inclusion. Le faible niveau d'infection induit par les doses de 10^2 et 10^3 corps d'inclusion a réduit la production. En revanche, les doses de 10^5 et 10^6 corps d'inclusion ont réduit la durée de survie des chenilles et, par conséquent, leur poids corporel. L'augmentation de la dose de 10^2 à 10^6 corps d'inclusion s'est soldée par une réduction du temps moyen de survie de 17 à 6 jours. Chez les larves du $6^{\text{ème}}$ âge, l'exposition à des doses de 10^2 et 10^3 corps d'inclusion s'est soldée par une faible production en raison du faible niveau d'infection induit, et la plus forte production par cadavre, soit $7,6 \times 10^8$ corps d'inclusion par chenille, a été enregistrée pour une dose d'infection de 10^6 corps d'inclusion.

De façon globale, les résultats obtenus proposent diverses stratégies de production massive, selon les objectifs fixés. En effet, l'infection de chenilles de $4^{\text{ème}}$ âge au moyen d'une dose de 10^3 corps d'inclusion a donné lieu à une augmentation du nombre de corps d'inclusion supérieure à $x 10^5$. Il s'agirait donc de la meilleure méthode de production de virus si la quantité limitée d'inoculum était le principal facteur à considérer. Par contre, si c'est la quantité de chenilles qui est limitée, la combinaison du rendement par larve ($5,6 \times 10^8$) et du taux d'infection (96 %) révèle que l'infection de larve de $5^{\text{ème}}$ âge à des doses de 10^4 corps d'inclusion donnerait, dans l'ensemble, le rendement le plus élevé. La facilité avec laquelle il est possible de manipuler les larves de $6^{\text{ème}}$ âge serait un aspect de production souhaitable si la réalisation d'économies sur le plan de la main-d'œuvre était de première importance. L'infection d'une chenille de cet âge donne aussi le rendement le plus élevé par chenille virosée. Par ailleurs ces résultats confirment que le rendement en termes de corps d'inclusion obtenus semble

étroitement lié au poids corporel des chenilles au moment de leur mort (Hunter-Fujita *et al.*, 1998). Toutefois, il reste à évaluer méthodiquement quel âge larvaire de tordeuse doit être utilisé pour produire ce baculovirus en mesurant la virulence des corps d'inclusion obtenus par infection des différents âges de l'insecte. En effet, dans le cadre d'expériences de production de VPN chez la spongivuse, il a été démontré que la virulence des corps d'inclusion obtenus de chenilles L_5 était inférieure à celle des corps d'inclusion provenant de chenilles L_4 (Shapiro *et al.*, 1986). Compte tenu de la dose couramment appliquée en forêts (10^{12} corps d'inclusion ha^{-1} ; Cunningham et Kaupp, 1995), il faudrait utiliser aux fins de la multiplication virale, 1 316 chenilles ha^{-1} pour atteindre la production maximale enregistrée dans le cadre de ces expériences, soit $7,6 \times 10^8$ corps d'inclusion. À ce propos, des résultats récents ont montré qu'il est possible d'accroître la production de corps d'inclusion en exposant les chenilles dès qu'elles atteignent le sixième stade (O'Reilly *et al.*, 1998). Dans le cadre de la présente recherche, cette exigence a été respectée, car les chenilles ont été déposées sur les pastilles de milieu nutritif moins de 24 heures après avoir mué.

Par rapport aux résultats décrits ci-dessus et dans le cadre d'expériences de contamination virale de la surface du milieu nutritif, les productions moyennes par cadavre ($\pm \text{É.T.}$) enregistrées s'établissent à $1,1 \pm 0,3$, $4,4 \pm 1,0$ et $5,1 \pm 0,4 \times 10^7$ corps d'inclusion chez les chenilles exposées au cours des $4^{\text{ème}}$, $5^{\text{ème}}$ et $6^{\text{ème}}$ âges, respectivement (Ebling et Kaupp, 1998). Ces valeurs sont plus de 10 fois inférieures aux productions maximales par cadavre observées au cours de la présente expérience. Toutefois, ces chenilles avaient ingéré une dose indéterminée pendant une période indéterminée à partir d'une densité moyenne inoculée de corps d'inclusion de $1\,000 \text{ mm}^{-2}$. Une seule densité a été utilisée, et rien n'a été fait pour optimiser ce paramètre. Il semble qu'à défaut d'optimiser la dose, le recours à la contamination virale de la surface pour évaluer la production potentielle comporte un risque de sous-estimation. Néanmoins, il est évident que l'obtention moyenne par cadavre (tableau 1) est une production théorique maximale qu'on peut obtenir en recourant à la contamination de la surface du milieu nutritif. En conséquence, il faut s'attendre à ce que cette valeur puisse être plus faible, le recours à la méthode de contamination de la surface à des fins de multiplication massive élargissant l'écart (réduction ou augmentation) entre la dose utilisée et la dose optimale.

Les résultats (tableau 2) montrent aussi, chez les chenilles exposées à des doses supérieures à la dose limite, une réduction de la proportion de chenilles ayant ingéré tout le milieu nutritif qui leur avait été offert. Une telle réduction

a été observée à des doses supérieures à 10^4 corps d'inclusion (L_4) et à 10^5 corps d'inclusion (L_5 et L_6). Il semble donc qu'un effet anti-appétant ait agi dans le cadre de nos expériences. Les densités de corps d'inclusion correspondantes à la superficie des pastilles de milieu nutritif s'établissent à environ 670 et 6 700 corps d'inclusion mm^{-2} . Dès lors, dans le cadre des expériences de contamination décrites précédemment (Ebling et Kaupp, 1998), un effet anti-appétant s'est probablement exercé parmi les chenilles L_4 . Cet effet pourrait être dû à une contamination de l'inoculum par des composantes autres que les virus, mais cette éventualité paraît improbable, étant donné la méthode de purification utilisée (voir la section 2.2). À la dose de 10^6 , la masse de corps d'inclusion sur la pastille de milieu nutritif ne représentait qu'environ 0,3 % de la masse de la pastille elle-même. Ces observations relatives à l'effet anti-appétant semblent inédites, car aucune mention d'un tel phénomène n'a été retracée dans les écrits. Cet effet pourrait avoir des répercussions pratiques importantes dans un contexte de production de masse du *CfMV* (T3) et les baculovirus en général. Il pourrait en effet s'avérer nécessaire d'ajuster les inoculum de manière à faire en sorte que les chenilles s'alimentent suffisamment pour recevoir la pleine dose, ou encore d'utiliser un agent phagostimulant.

Chez tous les âges larvaires, les plus fortes productions de corps d'inclusion par cadavre ont été enregistrées lorsque les taux de mortalité étaient nettement inférieurs à 100 %, soit 42, 30 et 52 % pour les L_4 , L_5 et L_6 , respectivement. La dose de virus ingérée était donc équivalente ou inférieure à la Dose Létale 50 (DL_{50}). Pour accroître la rentabilité des procédés de multiplication à grande échelle du VPN de la tordeuse, il faudrait infecter une plus grande proportion de chenilles afin d'obtenir des corps d'inclusion d'une plus

grande proportion des insectes virosés. À la lumière des résultats présentés au tableau 2, il est apparent qu'un effet anti-appétant s'exerce surtout aux doses entraînant une mortalité de 100 %. Ce phénomène contribue à réduire l'ingestion des corps d'inclusion virale et, dès lors, les taux d'infection. L'utilisation d'un promoteur de l'activité virale comme un azurant optique pourrait toutefois permettre de contrer cet effet et d'accroître la proportion de chenilles infectées (Hunter-Fujita *et al.*, 1998; Li et Otvos, 1999). Ces agents contribueraient à réduire la DL_{50} en dégradant la membrane péritrophique de l'intestin des chenilles, augmentant du même coup le taux d'infection (Shields et Podgewaite, 1995).

L'ensemble des résultats apporte donc un éclairage nouveau concernant certains aspects de la multiplication *in vivo* des baculovirus chez la tordeuse des bourgeons de l'épinette. De nombreux autres facteurs devront être aussi examinés, en particulier la virulence des corps d'inclusion pour chacun des âges de la tordeuse. En outre, comme cette méthode de production nécessite une forte intensité de main-d'œuvre, il est impératif de réduire le nombre de manipulations et les quantités de milieu nutritif nécessaires pour atteindre un niveau de production viable, efficace et économique. Dans cette optique, le maintien de la qualité du milieu nutritif joue un rôle critique dans le succès de la production *in vivo* et, de ce fait, exige des attentions particulières.

REMERCIEMENTS

Nous remercions de leur appui financier la société AEF Global Inc. et le Fond de la Stratégie nationale en matière de biotechnologie.

RÉFÉRENCES

- Cunningham, J.C. et; Kaupp, W. 1995. Virus entomopathogènes. Pages 328-340 in J.A. Armstrong et W.G.H. Ives, réd. Insectes forestiers ravageurs au Canada. Ressources naturelles Canada, Ottawa.
- Ebling P.M. et Kaupp W.J. 1998. Yield of occlusion bodies from spruce budworm, *Choristoneura fumiferana* (Lepidoptera: Tortricidae), larvae infected with a nuclear polyhedrosis virus. Can. Entomol. 130: 243-244.
- Howse, G. 1995. Forest insect pests in the Ontario region. Pages 42-57 in J.A. Armstrong et W.G.H. Ives, réd. Insectes forestiers ravageurs au Canada..
- Hunter-Fujita F., Entwhistle P., Evans H. and et Crook N., 1998. *Insect Viruses and Pest Management*. John Wiley and Sons, Chichester, England.
- Kaupp W.J. et Ebling P.M. 1998. Response of third-, fourth-, fifth-, and sixth-instar spruce budworm, *Choristoneura fumiferana* (Clem.), larvae to nuclear polyhedrosis virus. Can. Entomol. 122: 1037-1038.
- Li, S.Y. et Otvos, I.S. 1999. Comparison of activity enhancement of a baculovirus by optical brighteners against laboratory and field strains of *Choristoneura occidentalis* (Lepidoptera: Tortricidae). J. of Econ. Entomol. 92: 534-38.
- McMorran, A. 1965. A synthetic diet of the spruce budworm, *Choristoneura fumiferana* (Clem.). Can. Entomol. 97: 58-62.
- O'Reilly, D.R., Hails, R.S. et Kelly, T.J. 1998. The impact of host developmental status on baculovirus replication. J. Invertebr. Pathol. 72: 269-275.
- Nigam, P. C. 1974. Insecticides chimiques. Pages 8-25, in M. Prebble, réd., Traitements aériens pour combattre les insectes forestiers au Canada. Ministère de l'Environnement, Ottawa.
- Shapiro, M. et Bell, R.A. 1981. Biological activity of *Lymantria dispar* nucleopolyhedrosis virus from living and virus killed larvae. Ann. Entomol. Soc. Am. 74: 27-28.
- Shapiro, M., Robertson, J.L. et Bell, R.A. 1986. Quantitative and qualitative differences in gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae) nucleopolyhedrosis virus produced in different-aged larvae. J. Econ. Entomol. 79: 1174-77.
- Shields, K. et Podgwaite, J.D. 1995. Effects of nuclear polyhedrosis virus formulations on *Lymantria dispar* larval peritrophic membrane. Pages 1010-1011 in G.W. Bailey, M.H. Ellisman, R.A. Hennigar et N.J. Zaluzec, réd. Microscopy and Microanalysis. Proc. Conf. 1995. Jones & Begell Publishing, New York.
- Van Frankenhuyzen, K. 1995. Développement et situation actuelle du *Bacillus thuringiensis* pour la répression des insectes forestiers défoliateurs. Pages 315-325 in J.A. Armstrong et W.G.H. Ives, réd. Insectes forestiers ravageurs au Canada. Ressources naturelles Canada, Ottawa.
- Valéro, J.R. 1995. Le BT H3a3b et le virus de polyhédrose nucléaire : insecticides microbiens efficaces contre la TBE. Pages 123-127 in Séminaire sur la tordeuse des bourgeons de l'épinette : en savons-nous assez pour lutter efficacement contre la tordeuse? Les 12 et 13 avril 1995. L'Hôtel Hilton, Québec. Ministère des Ressources naturelles du Québec.
- Wigley, P.J. 1980. Counting microorganisms. Pages 29-35 in J. Kalmakoff et J.F. Longworth, réd. Microbial Control of Insect Pests. Research Bulletin # 228. New Zealand Department of Science and Industry, Wellington, NZ.