



# Optimalisatie toepassing entomopathogene schimmels tegen trips in chryasant

Gerben J. Messelink en Renata van Holstein-Saj



## Referaat

De californische trips, *Frankliniella occidentalis*, is een groot knelpunt in de teelt van chrysant. In dit onderzoek is beoordeeld in hoeverre de verschillende tripsstadia (larven poppen en adulten) vatbaar zijn voor de entomopathogene schimmels *Beauveria bassiana* (Botanigard®), *Metarhizium anisopliae* (BIO 1020®), *Lecanicillium lecanii* (Mycotal®) en *Isaria fumosorosea* PreFeRal®. De larven en poppen van trips bleken nauwelijks vatbaar te zijn voor de geteste entomopathogene schimmels. Bij het direct in contact brengen met schimmelsporen werd slechts incidenteel infectie waargenomen. Een mogelijke verklaring is dat deze tripsstadia een infectie van een schimmelspore weer kwijtraken bij een vervelling naar het volgende stadium. Een preventieve grondbehandeling met *B. bassiana* of *M. anisopliae* had géén meetbaar effect op de overleving van trips in deze gronden. Bij alle geteste schimmelpreparaten was er wel een duidelijk effect op de volwassen tripsen. De schimmel *M. anisopliae* was met een doding van 96% het meest effectief. Het is dan ook aan te bevelen om de bestrijding van trips met entomopathogene schimmels zo veel mogelijk te richten op het volwassen tripsstadium.

## Abstract

Western flower thrips, *Frankliniella occidentalis*, is a major pest species in chrysanthemum. This study was set up to assess the susceptibility of several thrips stages (larvae, pupae and adults) for infection by the entomopathogens *Beauveria bassiana* (Botanigard®), *Metarhizium anisopliae* (BIO 1020®), *Lecanicillium lecanii* (Mycotal®) and *Isaria fumosorosea* PreFeRal®. The larvae and pupae of thrips were hardly susceptible for infection. A possible explanation is that these stages escape from infection after moulting to the next stage. Soil treatments with *B. bassiana* or *M. anisopliae* did not significantly reduce survival of thrips pupae in the soil. However, all entomopathogens were able to infect thrips adults. The pathogen *M. anisopliae* was most effectively killing adults; up to 96% of the adults died after contact with a spore suspension. We therefore recommend to focus thrips control with entomopathogens on the adult stages of thrips.

© 2012 Wageningen, Stichting Dienst Landbouwkundig Onderzoek (DLO) onderzoeksinstituut Wageningen UR Glastuinbouw.

## Wageningen UR Glastuinbouw

Adres : Violierenweg 1, 2665 MV Bleiswijk  
: Postbus 20, 2665 ZG Bleiswijk  
Tel. : 0317 - 48 56 06  
Fax : 010 - 522 51 93  
E-mail : [glastuinbouw@wur.nl](mailto:glastuinbouw@wur.nl)  
Internet : [www.glastuinbouw.wur.nl](http://www.glastuinbouw.wur.nl)

# Inhoudsopgave

	Samenvatting	5
1	Inleiding	7
2	Materiaal en Methoden	9
	2.1 Vatbaarheid van tripsstadia voor entomopathogene schimmels	10
3	Resultaten	11
	3.1 Effect van Botanigard en BIO 1020 op tripspoppen in de bodem	11
	3.2 Vatbaarheid van tripsstadia voor entomopathogene schimmels	12
4	Discussie en conclusies	15
5	Literatuur	17



# Samenvatting

De californische trips, *Frankliniella occidentalis*, is een groot knelpunt in de teelt van chrysant. Bestrijding van deze plaag wordt steeds lastiger door het smalle pakket van chemische middelen en door resistentie-ontwikkeling tegen veel chemische middelen. Telers in chrysant zijn naast de chemische middelen massaal schimmelpreparaten gaan toedienen die tripsen kunnen infecteren en doden. Op dit moment zijn 2 producten op de markt die met dit doeleinde worden ingezet: het product Botanigard® dat de schimmel *Beauveria bassiana* bevat en het product BIO 1020® dat de schimmel *Metarhizium anisopliae* bevat. Een recent onderzoek heeft laten zien dat beide schimmels in staat zijn om gedurende één teelt van chrysant in een vitale staat aanwezig te blijven in de bodem. Dit onderzoek was in eerste instantie gericht op het optimaliseren van de bestrijding van tripspoppen met deze schimmels in de bodem. Daarbij is gekeken of het type grond een effect heeft op de werking van deze schimmels en bij welke doseringen de beste resultaten worden behaald. In een tweede fase is beoordeeld in hoeverre de verschillende tripsstadia verschillen in vatbaarheid voor entomopathogene schimmels. Daarbij zijn naast de bovengenoemde schimmels ook de schimmels *Lecanicillium lecanii* en *Isaria fumosorosea* getest. Het doel van dit onderzoek is om aanbevelingen te geven over het gebruik van deze middelen in chrysant, waardoor de bestrijding van trips effectiever wordt.

De resultaten van dit onderzoek laten zien dat de larven en poppen van trips maar weinig vatbaar zijn voor de geteste entomopathogene schimmels. Bij het direct in contact brengen met schimmelsporen werd slechts incidenteel infectie waargenomen. Een mogelijke verklaring is dat deze tripsstadia een infectie van een schimmelspore weer kwijtraken bij een vervelling naar het volgende stadium. Aangezien volwassen tripsen niet meer vervellen, zijn deze veel vatbaarder voor infectie. Bij alle geteste schimmelpreparaten werd een duidelijk effect op de volwassen tripsen gemeten. De schimmel *Metarhizium anisopliae* was met een doding van 96% het meest effectief. Een preventieve grondbehandeling met deze schimmels in 2 typen grond, had géén meetbaar effect op de overleving van trips in deze gronden. Dit is merkwaardig, omdat verwacht werd dat tripsen die in de bodem uit het popstadium kruipen makkelijk geïnfecteerd kunnen worden. Naast dat poppen minder vatbaar zijn dan volwassen tripsen, is bekend dat bij hogere luchtvochtigheden veel tripsen niet in de bodem verpoppen. In dat geval heeft een grondbehandeling met entomopathogene schimmels waarschijnlijk weinig effect op trips.

Samenvattend kunnen we stellen dat vooral de volwassen tripsen vatbaar zijn voor infecties met entomopathogene schimmels. Het is dan ook aan te bevelen om de bestrijding van trips met deze schimmels te richten op dit stadium.



# 1 Inleiding

De californische trips, *Frankliniella occidentalis*, is één van de grootste plagen in de sierteelt. Bestrijding van deze plaag wordt steeds lastiger door het smalle pakket van chemische middelen en door resistentie-ontwikkeling tegen veel chemische middelen. Telers in chrysant zijn naast de chemische middelen massaal schimmelpreparaten gaan toedienen die tripsen kunnen infecteren en doden. Op dit moment zijn 2 producten op de markt die met dit doeleinde worden ingezet: het product Botanigard® dat de schimmel *Beauveria bassiana* bevat en het product BIO 1020® dat de schimmel *Metarhizium anisopliae* bevat. Een recent onderzoek van LTO-groei-service, Bayer CropScience, Certis en Wageningen UR Glastuinbouw heeft laten zien dat beide schimmels in staat zijn om minimaal gedurende één teelt van chrysant in een vitale staat aanwezig te blijven in de bodem. In ander onderzoek is ook duidelijk aangetoond dat deze schimmels een effect op trips kunnen hebben. Het is echter nog totaal onduidelijk of de manieren waarop deze schimmels nu worden toegepast ook effectief zijn tegen trips. De volgende vragen zijn nog niet helder:

- Hoeveel tripspoppen sterven bij welke doseringen in de bodem?
- Wat is het effect van grondsoort hierop (structuur beïnvloedt trefkans met trips)?

Het oorspronkelijke plan van dit onderzoek was om de effecten op tripspoppen die in het laboratorium worden gemeten, te koppelen aan dichtheden van schimmelsporen die op praktijkbedrijven in de bodem worden gevonden. Echter, doordat er nauwelijks effect op tripspoppen werd gemeten, is besloten om de gevoeligheid van verschillende tripsstadia voor deze middelen te testen. Het doel van dit onderzoek is om aanbevelingen te geven over het gebruik van deze middelen in chrysant, waardoor de bestrijding van trips effectiever wordt.





## 2 Materiaal en Methoden

### Effect van Botanigard en BIO 1020 op tripspoppen in de bodem

De effecten van de entomopathogene schimmels *Beauveria bassiana* (Botanigard) en *Metarhizium anisopliae* (BIO 1020) op tripspoppen in de bodem is getest in 2 typen gronden bij 3 doseringen (Tabel 1.). De grond is verzameld bij 2 chrysantenbedrijven, één met een kleigrond en één met een zand-kleigrond verrijkt met organisch materiaal. Totaal geeft dit 14 behandelingen (zie Tabel 1.). Bij iedere behandeling zijn totaal 100 poppen van trips getest op vatbaarheid voor de schimmels, verdeeld over 5 herhalingen. De proef is uitgevoerd in ronde plastic bakjes met een diameter van 10 cm. In ieder bakje werd 100 ml grond gedaan, welke van te voren was geautoclaveerd en gezeefd. Het vochtgehalte in de kleigrond was 32% (volumebasis) en in de zand-kleigrond 27%. Dit komt overeen met een goed vochtige grond. De schimmels werden preventief aangebracht. Botanigard werd als sporensuspensie over de grond gespoten, terwijl BIO 1020 door het oppervlakte van de grond werd gemengd. Bij inzet van de proef werden tripslarven verzameld die dicht tegen verpopping aanzaten (Figuur 1.). Deze werden vervolgens op een stukje boon geplaatst, zodat ze vanaf de boon in de grond konden kruipen om daar te verpoppen (Figuur 1.). Onder de microscoop is gecontroleerd of de tripslarven dat ook daadwerkelijk deden. De bakjes werden afgesloten met een deksel met daarop een stukje vangplaat en geplaatst in een klimaatcel bij 22 °C (Figuur 2.). Mortaliteit van trips is indirect (niet terugvangen van adulten, 10 dagen na inzet) en direct (incuberen van uitgekomen adulten) gescoord. Van de behandelde gronden is aan het einde van de proef de dichtheid van de schimmels bepaald met uitplaatstechnieken op selectief medium. De gehele proef is herhaald, met het verschil dat de vochtigheid van de grond in de tweede proef gelijk is gehouden door tussentijds de bakjes te besproeien met water.

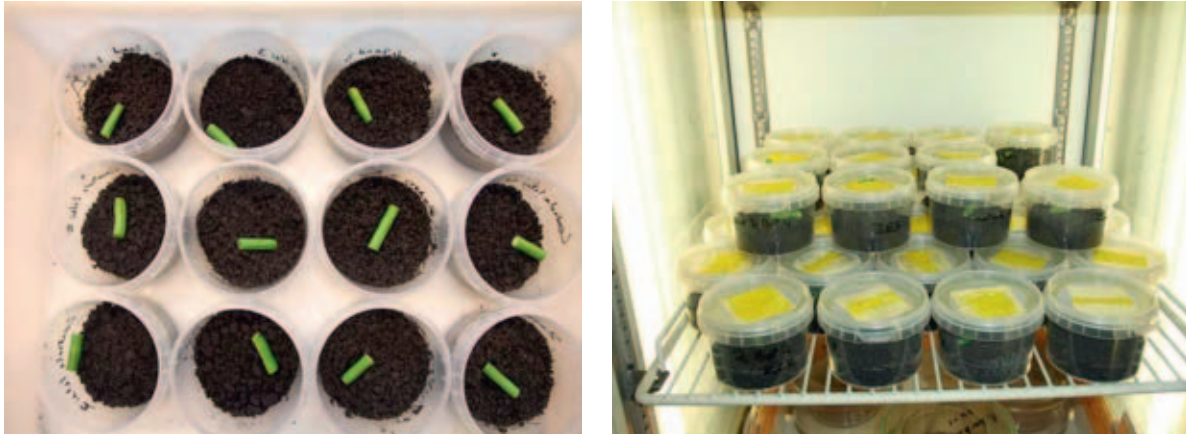
Tabel 1. Behandelingen waarbij de mortaliteit van trips is gescoord.

behandelingen	cfu/bakje*	dosering/ha	kleigrond	zand-kleigrond
A onbehandeld	-	-	x	x
B dosering 1 Botanigard	2 * 105	0.2	x	x
C dosering 2 Botanigard	2 * 106	2l	x	x
D dosering 3 Botanigard	2 * 107	20l	x	x
E dosering 1 BIO 1020	2 * 104	0.5	x	x
F dosering 2 BIO 1020	2 * 105	5	x	x
G dosering 3 BIO 1020	2 * 106	50	x	x

\* cfu = colony forming units, een eenheid voor de dichtheid van vitale schimmelsporen.



Figuur 1. Tripslarven van het tweede larvale stadium (rechts) werden op een stukje boon geplaatst (links), waarna ze in de bodem verpoppen.



Figuur 2. Bakjes waarin de effectiviteit van entomopathogene schimmels op tripspoppen in de bodem is gemeten.

## 2.1 Vatbaarheid van tripsstadia voor entomopathogene schimmels

In het laboratorium is bepaald welke stadia van trips het meest vatbaar zijn voor entomopathogene schimmels. Daarvoor zijn 4 producten getest die momenteel op de markt zijn (Tabel 2.). De vatbaarheid is getest door larven (L2) , poppen en volwassen trips direct in contact te brengen met sporensuspensies van deze schimmels.

De verschillende tripsstadia werden in groepjes van 20 voor 10 seconden ondergedompeld in concentraties van  $10^7$  cfu/ml. Na onderdompeling werden de tripsen op een bladpans van chrysant geplaatst bij 80% RV en 22 °C. Na 3 en 7 dagen werd het aantal levende, dode en beschimmelde tripsstadia beoordeeld. Voor ieder middel werd dit 5x herhaald. Als controlebehandeling werd onderdompeling in water en een behandeling zonder water meegenomen. Bij de popstadia is alleen Botanigard en BIO-1020 getest.

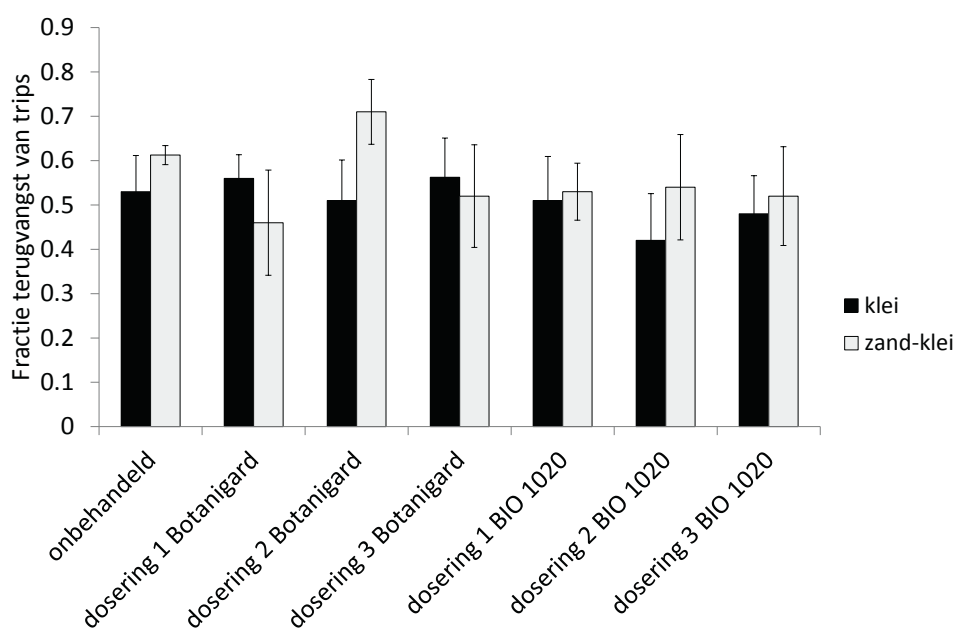
Tabel 2. Toegelaten producten op basis van entomopathogene schimmels.

productnaam	schimmel	firma
Mycotal®	Lecanicillium (=Verticillium) lecanii	Koppert Biological Systems
PreFeRal®	Isaria fumosorosea (= Paecilomyces fumosoroseus)	Biobest NV
BIO 1020®	Metarhizium anisopliae	Bayer CropScience
Botanigard®	Beauveria bassiana	Certis

### 3 Resultaten

#### 3.1 Effect van Botanigard en BIO 1020 op tripspoppen in de bodem

De effecten van preventieve grondbehandelingen met Botanigard en BIO 1020 had in de eerste proef géén significant effect op tripspoppen (Figuur 1.). Het type grond had ook geen effect op de overleving van trips. De overleving van de tripsen bij de onbehandelde controlebehandeling lag in de tweede proef (zonder vochtverlies) iets hoger dan in de eerste proef (Figuur 3. en 4.). Ondanks deze hogere vochtigheid werden ook in dit experiment géén significante effecten op de overleving van trips gemeten. Bij alle schimmelbehandelingen werden de schimmels goed teruggevonden in bodemmonsters (Tabel 2.). De gemeten dichtheden van BIO 1020 kwamen goed overeen met de dosering bij inzet. Bij Botanigard lag bij dosering 2 en 3 de gemeten dosering iets lager dan de dosering bij inzet (Tabel 2.).

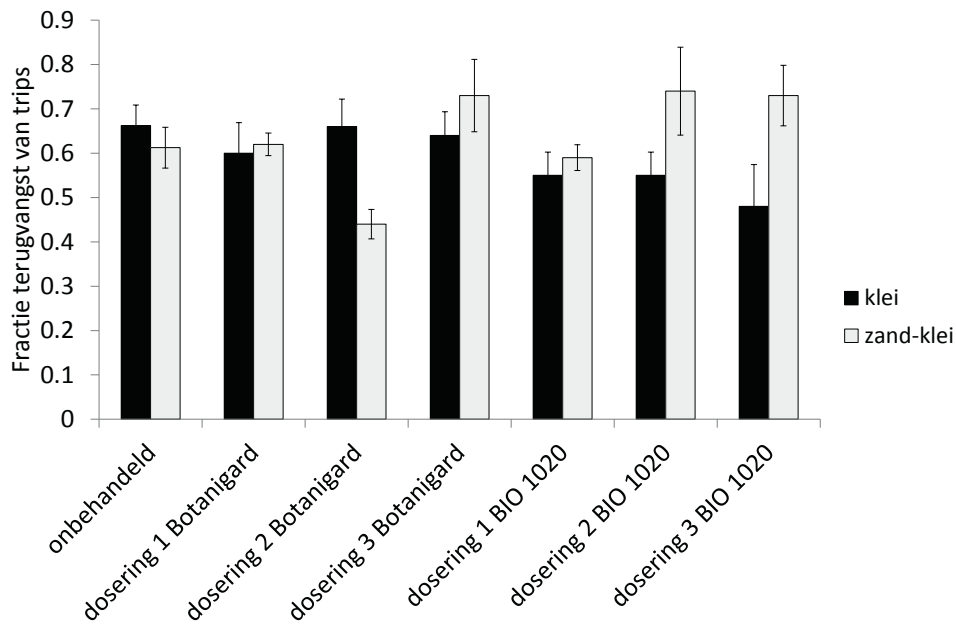


Figuur 3. Overleving van tripspoppen in 2 typen grond behandeld met entomopathogene schimmels ten opzichte van onbehandelde grond. De bakjes hadden een vochtverlies van 20% aan het einde van de proef. Er waren géén significante verschillen tussen de behandelingen ( $p < 0.05$ ).

Tabel 2. Dichtheden van sporen (cfu/bakje)\* na uitplanting van behandelde gronden op selectief medium.

behandelingen		dosering bij inzet	dosering/ha	kleigrond gemeten dosering	zand-kleigrond gemeten dosering
A	onbehandeld	-	-	-	-
B	dosering 1 Botanigard	2 * 10 <sup>5</sup>	0.2	1.00 * 10 <sup>5</sup>	1.22 * 10 <sup>5</sup>
C	dosering 2 Botanigard	2 * 10 <sup>6</sup>	2l	6.97 * 10 <sup>5</sup>	9.35 * 10 <sup>5</sup>
D	dosering 3 Botanigard	2 * 10 <sup>7</sup>	20l	1.56 * 10 <sup>6</sup>	1.97 * 10 <sup>6</sup>
E	dosering 1 BIO 1020	2 * 10 <sup>4</sup>	0.5	6.14 * 10 <sup>4</sup>	8.00 * 10 <sup>4</sup>
F	dosering 2 BIO 1020	2 * 10 <sup>5</sup>	5	4.22 * 10 <sup>5</sup>	3.73 * 10 <sup>5</sup>
G	dosering 3 BIO 1020	2 * 10 <sup>6</sup>	50	1.87 * 10 <sup>6</sup>	1.03 * 10 <sup>6</sup>

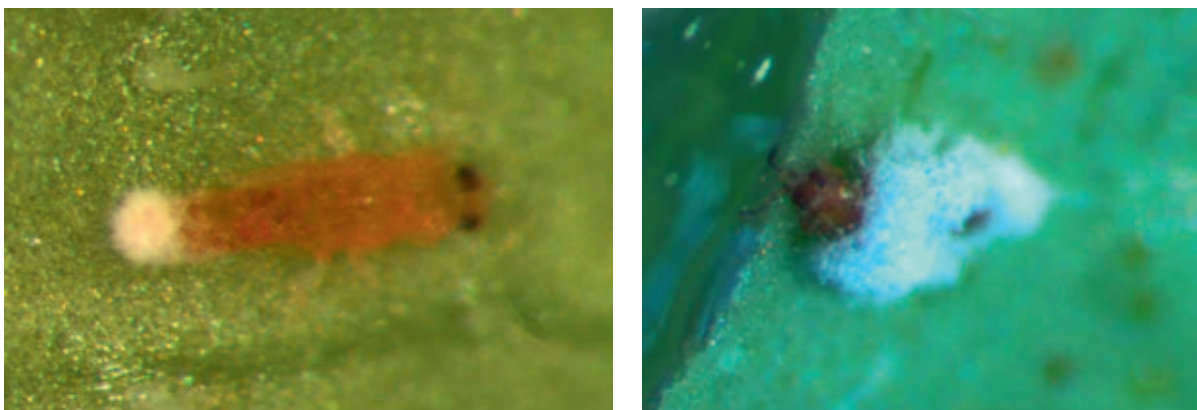
\* cfu = colony forming units, een eenheid voor de dichtheid van vitale schimmelsporen.



Figuur 4. Overleving van tripspoppen in 2 typen grond behandeld met entomopathogene schimmels ten opzichte van onbehandelde grond. Het vochtgehalte werd gedurende de proef gelijk gehouden. Er waren géén significante verschillen tussen de behandelingen ( $p < 0.05$ ).

### 3.2 Vatbaarheid van tripsstadia voor entomopathogene schimmels

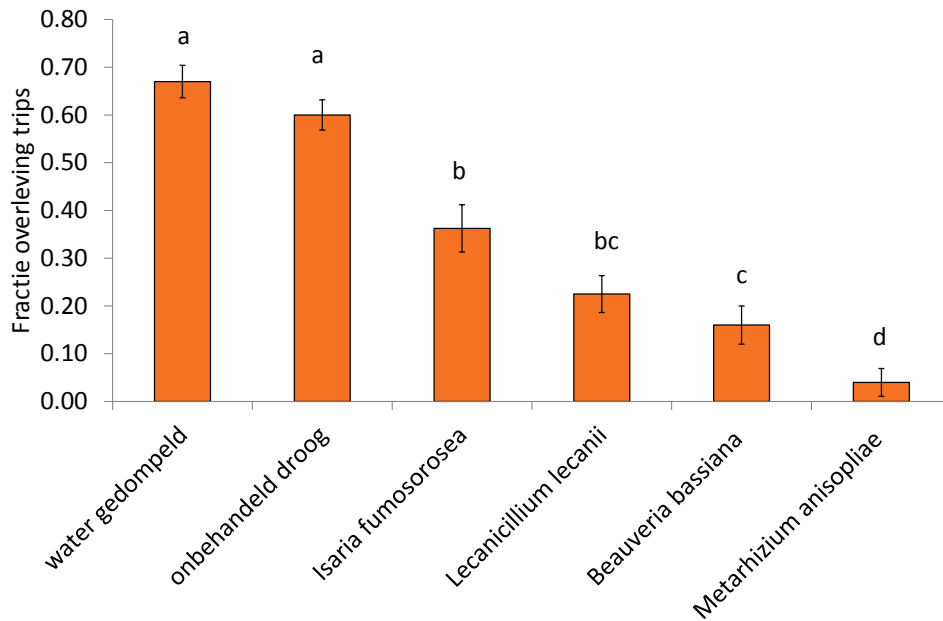
Infectie van tripslarven met entomopathogene schimmels gebeurde incidenteel, maar bij géén van de middelen werd een significant effect waargenomen. Gemiddeld overleefde 50 tot 70% van de larven de behandelingen. Bij de popstadia was de overleving gemiddeld hoger (68%), maar ook hier was de overleving bij de schimmelbehandelingen niet significant anders dan bij de controlebehandelingen. Bij de volwassen tripsen was er wel een duidelijk effect van de schimmelbehandelingen en werden veel geïnfecteerde tripsen gevonden waaruit mycelium groeide (Figuur 5. en 6). Alle behandelingen hadden een significant effect op de volwassen tripsen ( $F_{5,26} = 30.39$ ,  $p < 0.001$ ), maar bij BIO 1020 (*M. anisopliae*) was de mortaliteit significant groter dan bij de andere producten (Figuur 7.).



Figuur 5. Een tripspop en volwassen trips geïnfecteerd door de schimmel *Beauveria bassiana*.



Figuur 6. Een volwassen trips is het beginstadium (links, wit mycelium) en in een later stadium (rechts, groene sporulerende schimmel) van infectie met de schimmel *Metarhizium anisopliae*.



Figuur 7. Gemiddelde overleving van volwassen tripsen (fractie van  $20 \pm s.e.m.$ ) bij verschillende behandelingen. Verschillende letters geven significante verschillen aan tussen de behandelingen (Fisher's LSD test,  $p < 0.05$ ).



## 4 Discussie en conclusies

De resultaten van dit onderzoek laten zien dat de larven en poppen van trips maar weinig vatbaar zijn voor de geteste entomopathogene schimmels. Bij het direct in contact brengen met schimmelsporen werd slechts incidenteel infectie waargenomen. De resultaten komen overeen met eerder onderzoek met vergelijkbare schimmelisolaten. Vestegaard *et al.* (1995) vonden een sterfte van 30% bij het popstadium en 25% bij het larvale stadium, terwijl dezelfde schimmelisolaten tot 100% sterfte bij volwassen tripsen veroorzaakte. In een andere studie van Gerritsen en Wieggers (2000) werd eveneens gevonden dat bij tripslarven (L1) slechts 10-30% stierf na behandeling met schimmelisolaten, terwijl dezelfde isolaten 70-80% sterfte gaven bij volwassen tripsen. Een mogelijke verklaring is dat deze tripsstadia een infectie van een schimmelspore weer kwijtraken bij een vervelling naar het volgende stadium. Aangezien volwassen tripsen niet meer vervellen, lijken deze veel vatbaarder te zijn voor infectie. In ons onderzoek stierf na direct contact met de schimmel *Metarhizium anisopliae* 96% van volwassen tripsen.

Een preventieve grondbehandeling met deze schimmels in 2 typen grond, had géén meetbaar effect op de overleving van trips in deze gronden. Dit is merkwaardig, omdat de tripsen die in de bodem uit een pop kruipen, opnieuw geïnfecteerd kunnen worden met sporen in de bodem. Het is dan logisch te verwachten dat er in de bodem een groter effect op tripspoppen is dan bij het direct aanstrijken van de tripsen. Een andere studie uit Engeland spreekt onze resultaten tegen (Ansari *et al.* 2008). Zij vonden in een vergelijkbare opzet dat bijna 100% van de tripspoppen sterven na infectie met isolaten van *M. anisopliae*. De reden waarom in die studie wel zo'n hoge mortaliteit is gevonden is niet duidelijk. Een verschil met onze studie is dat zij verse sporen hebben getest van sporulerend mycelium en dat de temperatuur waarbij is getest hoger lag (25 °C).

Het effect op trips met bodemtoepassingen van entomopathogene schimmels kan in een chrysantengewas verder gereduceerd worden, doordat niet alle tripsen verpoppen in de bodem. Wanneer er bloemknoppen aanwezig zijn, kruipt een deel van de tripspopulatie in deze knoppen om daar te verpoppen (Buitenhuis & Shipp, 2008). Recent onderzoek uit Australië laat zien dat bij RV's van meer dan 80%, een groot deel van de tripspopulatie op de plant verpopt (Steiner *et al.* 2011). In dat geval heeft een grondbehandeling met entomopathogene schimmels waarschijnlijk weinig effect op trips.

Samenvattend kunnen we stellen dat vooral de volwassen tripsen vatbaar zijn voor infecties met entomopathogene schimmels. Het is dan ook aan te bevelen om de bestrijding van trips met deze schimmels te richten op de volwassen tripsen. Het is daarbij de kunst om de schimmelsporen in contact te laten komen met de tripsen die een verborgen levenswijze hebben. Mogelijk kan de bestrijding verbeterd worden door de tripsen te lokken naar bronnen waar ze geïnfecteerd worden met schimmelsporen (Lure & Infect).





## 5 Literatuur

Ansari, M. A., M. Brownbridge, F. A. Shah, and T. M. Butt. 2008.

Efficacy of entomopathogenic fungi against soil-dwelling life stages of western flower thrips, *Frankliniella occidentalis*, in plant-growing media. *Entomologia Experimentalis Et Applicata* 127:80-87.

Buitenhuis, R. and J. L. Shipp. 2008.

Influence of plant species and plant growth stage on *Frankliniella occidentalis* pupation behaviour in greenhouse ornamentals. *Journal of applied entomology* 132:86-88.

Gerritsen, L. J. M. and G. L. Wieggers. 2000.

Pathogenicity of the fungi *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* to the western flower thrips, *Frankliniella occidentalis*. *Proc. Exper. & Appl. Entomol.* 11:37-40.

Steiner, M. Y., L. J. Spohr, and S. Goodwin. 2011.

Relative humidity controls pupation success and dropping behaviour of western flower thrips, *Frankliniella occidentalis* (Pergande) (Thysanoptera: Thripidae). *Australian Journal of Entomology* 50:179-186.

Vestergaard, S., A. T. Gillespie, T. M. Butt, G. Schreiter, and J. Eilenberg. 1995.

Pathogenicity of the hyphomycete fungi *Verticillium lecanii* and *Metarhizium anisopliae* to the Western Flower Thrips, *Frankliniella occidentalis* *Biocontrol Science and Technology* 5:185-192.





