



Nieuwe methoden voor bestrijding van bodemplagen in de glastuinbouw

Deel 3: Ontwikkeling 'attract- en kill' strategie voor rouwmuggen (Sciaridae) en oevervliegen (Ephydriidae)

Marjolein Kruidhof, Joop Woelke, Ruben Vijverberg, Laura Català-Senent en Roland Vijverberg

Rapport WPR-787

Referaat

In dit rapport wordt onderzoek naar de ontwikkeling van een 'attract- en kill' strategie voor rouwmuggen (Sciaridae) en oevervliegen (Ephydriidae) beschreven. Allereerst is onderzocht welke substraatsamenstellingen het meest of juist het minst aantrekkelijk zijn voor rouwmugvrouwtjes. Vervolgens is op basis van de meest aantrekkelijke substraatsamenstelling een loksubstraat ontwikkeld, welke in combinatie met een gele vangplaat in de praktijk twee keer zoveel rouwmuggen aantrok dan een gele vangplaat alleen, en in kooien het aantal rouwmuggen in het teeltsubstraat van viooltjes kon halveren. Ook bleek de roofkever *Dalotia* (voorheen *Atheta*) *coriaria* te worden aangetrokken door het loksubstraat. Oevervliegen bleken niet te reageren op geuren van substraat of algen. In een kas werd wel een spontane besmetting van oevervliegen met een entomopathogene schimmel ontdekt. De werking van dit *Beauveria bassiana* isolaat tegen oevervliegen is vergeleken met commerciële entomopathogene schimmels en is vervolgens gebruikt voor de ontwikkeling van een 'attract- en kill' strategie. Experimenten lieten zien dat oevervliegen de dodelijke schimmel kunnen overbrengen vanuit lokbakken met algen waaraan de schimmel is toegevoegd, naar andere algenplekken waar oevervliegen zich ontwikkelen.

Abstract

In this report the research into the development of an attract- and kill strategy for sciarid flies (Sciaridae) and shore flies (Ephydriidae) is described. First it has been evaluated which substrate compositions were the most and least attractive to sciarid fly females. Subsequently, an attractive substrate has been developed, which in combination with a yellow sticky trap could attract twice as many sciarid flies in a commercial greenhouse as a yellow sticky trap alone, and in cages could reduce the number of sciarid flies that developed in the growth substrate of viola plants to 50%. Moreover, the predatory beetle *Dalotia* (previously *Atheta*) *coriaria* was also attracted to this substrate. Shore flies did not react to odours of substrate or algae. However, in a greenhouse compartment a spontaneous contamination of shore flies with an entomopathogenic fungus was discovered. The effectiveness of this *Beauveria bassiana* isolate against shore flies has been compared with commercial entomopathogenic fungi, and has been subsequently used for the development of an attract- and kill method. Experiments have shown that shore flies can transfer this deadly fungus from containers with algae to which the fungus has been added, to other algae spots where shore flies develop.

Rapportgegevens

Rapport WPR-787

Projectnummer: 3742202500

PT nummer: 15139

DOI: 10.18174/454223

Thema: Gewasgezondheid

Dit project / onderzoek is mede tot stand gekomen door de bijdrage van Stichting TKI Tuinbouw, Ministerie van Economische Zaken, Coöperatie Eénjarige Zomerbloeiërs, Productschap Tuinbouw, Syngenta BV, Florensis BV en Horticoop BV, en LTO Glaskracht Nederland.

Disclaimer

© 2018 Wageningen, Stichting Wageningen Research, Wageningen Plant Research, Business unit Glastuinbouw, Postbus 20, 2665 MV Bleiswijk T 0317 48 56 06, www.wur.nl/plant-research.

Kamer van Koophandel nr.: 09098104

BTW nr.: NL 8113.83.696.B07

Stichting Wageningen Research. Alle rechten voorbehouden. Niets uit deze uitgave mag worden verveelvoudigd, opgeslagen in een geautomatiseerd gegevensbestand, of openbaar gemaakt, in enige vorm of op enige wijze, hetzij elektronisch, mechanisch, door fotokopieën, opnamen of enige andere manier zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van Stichting Wageningen Research.

Stichting Wageningen Research aanvaardt geen aansprakelijkheid voor eventuele schade voortvloeiend uit het gebruik van de resultaten van dit onderzoek of de toepassing van de adviezen.

Adresgegevens

Wageningen University & Research, BU Glastuinbouw

Postbus 20, 2665 ZG Bleiswijk

Violierenweg 1, 2665 MV Bleiswijk

T +31 (0)317 48 56 06

Inhoud

	Samenvatting	5
1	Introductie	9
2	Aantrekkende werking van verschillende substraat-samenstellingen voor <i>Bradysia difformis</i> rouwmuggen	13
	2.1 Introductie	13
	2.2 Materiaal en methoden	13
	2.3 Resultaten	15
	2.4 Conclusies en discussie	19
3	Aantrekkende werking van loksubstraat op de roofkever <i>Dalotia coriaria</i>	21
	3.1 Introductie	21
	3.2 Materiaal en methoden	21
	3.3 Resultaten	22
	3.4 Conclusies en discussie	24
4	Effect van leeftijd en vochtgehalte loksubstraat op aantrekkende werking voor rouwmuggen	25
	4.1 Introductie	25
	4.2 Materiaal en methoden	25
	4.3 Resultaten	25
	4.4 Conclusies en discussie	25
5	Opschaling lokmethode voor rouwmuggen: kooiproef	29
	5.1 Introductie	29
	5.2 Materiaal en methoden	29
	5.3 Resultaten	31
	5.4 Conclusies	34
6	Opschaling lokmethode voor rouwmuggen: praktijkproef	35
	6.1 Introductie	35
	6.2 Materiaal en methoden	35
	6.3 Resultaten	36
	6.4 Conclusies	37
7	Ontwikkeling 'attract- en kill' strategie voor oevervliegen (Ephydridae): proeven in klimaatkasten	39
	7.1 Introductie	39
	7.2 Materiaal en methoden	39
	7.3 Resultaten	39
	7.4 Conclusies	40

8	Ontwikkeling 'attract- en kill' strategie voor oevervliegen (Scatella spp.): proeven in klimaatkasten	41
8.1	Introductie	41
8.2	Materiaal en methoden	42
8.3	Resultaten	43
8.4	Conclusies en discussie	47
9	Ontwikkeling 'attract- en kill' strategie voor oevervliegen (Scatella spp.): kasproef in kooien	49
9.1	Introductie	49
9.2	Materiaal en methoden	49
9.3	Resultaten	51
9.4	Conclusies en discussie	54
	Literatuur	55

Samenvatting

In dit onderzoek is een attract- en killmethode voor rouwmuggen en oevervliegen ontwikkeld. Een attract- en killmethode is een methode waarbij plagen van het gewas worden weggevoerd naar een plek waar ze niet verder kunnen ontwikkelen. De 'attract' component moet de plagen aantrekken en weglokken uit het gewas, terwijl de 'kill' component kan bestaan uit een vangplaat, een natuurlijke vijand en/of het elimineren van de lokplek voordat zich een nieuwe generatie van de plaag heeft kunnen ontwikkelen. Een dergelijke attract- en killmethode kan het beste worden toegepast binnen een zogenaamde 'push- en pull' methode, waarbij ook het teeltsubstraat minder aantrekkelijk en/of geschikt wordt gemaakt.

Voor rouwmuggen is met behulp van een gedragsopstelling onderzocht welke substraat-samenstellingen het meest of juist het minst aantrekkelijk zijn voor rouwmugvrouwtjes (zie Hoofdstuk 2). Rouwmugvrouwtjes bleken sterk en consistent te reageren op geuren van substraatsamenstellingen. Vooral de toevoeging van makkelijk afbreekbare organische stof aan het standaard veenmengsel (referentiesubstraat) bleek de aantrekkelijk voor de rouwmugvrouwtjes te bevorderen. Opvallend is dat de mengsels die op een luchtgehalte van 30% air-filled space (AFS) (= relatief hoog vochtgehalte) waren gebracht minder aantrekkelijker bleken voor de rouwmuggen dan de substraatmengsels die op 45% AFS (= voor plantenteelt standaard vochtgehalte) waren gebracht. Ook waren er, relatief kleinere, verschillen in de aantrekkende werking op rouwmugvrouwtjes tussen verschillende soorten veensubstraat, en tussen het referentiesubstraat en kokossubstraat. Hiermee zou voor de samenstelling van het teeltmedium van planten mogelijk rekening kunnen worden gehouden. Een minder aantrekkelijk teeltsubstraat zou het weglokken van rouwmuggen uit het gewas naar een loksubstraat namelijk kunnen bevorderen.

Vervolgens is in een gedragsopstelling onderzocht in welke mate de voor rouwmuggen meest aantrekkelijke substraatsamenstellingen ook de roofkever *Dalotia* (voorheen *Atheta*) *coriaria* aantrekken, welke de rouwmuglarven direct kan bestrijden (zie Hoofdstuk 3). Uit de resultaten van de proeven in de gedragsopstelling en in de praktijk werd duidelijk dat *D. coriaria* roofkevers actief op de geuren van substraten reageren, en dat hun voorkeur in grote lijnen overeenkomst met de voorkeur van rouwmugvrouwtjes.

In Hoofdstuk 4 staan de proeven beschreven waarmee is onderzocht hoe lang een aantrekkelijke substraatsamenstelling (loksubstraat) zijn aantrekkende werking behoudt, en in welke mate het vochtgehalte de aantrekkende werking van het loksubstraat beïnvloedt. Onder geconditioneerde omstandigheden bereikt het loksubstraat op basis van zemelen na een week een optimale aantrekkende werking, en wordt deze aantrekkende werking voor een periode van tenminste 6 weken behouden. Verder kan voor een optimale werking van het loksubstraat het luchtgehalte tussen de 35% en 45% AFS worden gehouden. Voor een loksubstraat op basis van bruine bonen en referentiesubstraat (1:1) komt dit overeen met een vochtgehalte tussen de 60% en 66%, en voor een loksubstraat op basis van zemelen en referentiesubstraat (1:1) komt dit overeen met een vochtgehalte tussen de 64% en 69%.

Vervolgens is in een kooiproef het effect van het loksubstraat in combinatie met twee soorten teeltsubstraat met wel of geen toevoeging van *Trichoderma viride* onderzocht op de ontwikkeling van rouwmuggen in de opkweek van viooltjes (Hoofdstuk 5). De aanwezigheid van een loksubstraat kon het aantal rouwmuggen dat zich in het teeltsubstraat kon ontwikkelen halveren. Verreweg het grootste deel van de rouwmuggen hadden zich ontwikkeld in het veensubstraat dat was geïnoculeerd met *T. viride* TD50. Dit was tegen de verwachting in, omdat *T. viride* schimmels een slechte voedselbron zouden vormen voor rouwmuglarven, zoals in andere studies was gevonden. Hoewel de aanwezigheid van *Trichoderma* ook in het kokossubstraat kon worden aangetoond, had *T. viride* geen significant effect op het percentage rouwmuggen dat zich in het kokossubstraat ontwikkelde. Waarom het effect van *T. viride* zo sterk afhankelijk was van het type teeltsubstraat is niet duidelijk. De aanwezigheid van rouwmuglarven had geen invloed op de groei van viooltjes. Wel had *T. viride* een duidelijk groeibevorderend effect op viooltjes die in het veensubstraat groeiden.

Aansluitend is in de praktijk getest hoeveel rouwmuggen konden worden weggevangen door gele vangplaten die in combinatie met een loksubstraat in de kas waren geplaatst ten opzichte van gele vangplaten alleen (Hoofdstuk 6). Op een vangplaat die was gecombineerd met het loksubstraat op basis van bruine bonen zijn in de praktijk ongeveer twee keer zoveel rouwmuggen gevangen dan op een vangplaat zonder loksubstraat. Hoewel deze resultaten aangeven dat loksubstraat een effect heeft op de aantrekking van rouwmuggen in de praktijk, kan in een praktijkproef niet worden onderzocht welke impact het wegvangen heeft op de populatie rouwmuggen die in het gewas aanwezig is. Het is daarom op basis van alleen deze gegevens moeilijk vast te stellen welke impact een verdubbeling van het aantal gevangen rouwmuggen heeft op de gehele populatie van rouwmuggen, en hoeveel loksubstraat zou moeten worden ingezet om de populatie-opbouw van rouwmuggen tegen te gaan. Het gebruik van een loksubstraat zal in ieder geval moeten worden gecombineerd met andere maatregelen, zoals de inzet van biologische bestrijders en/of het minder aantrekkelijk en geschikt maken van het teeltsubstraat voor respectievelijk eileg en ontwikkeling van rouwmuggen.

Voor oevervliegen is ook met behulp van een gedragsopstelling onderzocht of ze reageren op de geur van algen (wat hun voornaamste voedselbron is) of voor rouwmuggen aantrekkelijk loksubstraat bestaande uit veen gemengd met zemelen (Hoofdstuk 7). Omdat oevervliegen niet bleken te reageren op geur van substraat of algen is een andere benadering gekozen voor het ontwikkelen van een attract-killmethode, waarbij de oevervliegen naar een bak met algen waaraan sporen van entomopathogene schimmels zijn toegevoegd worden gelokt. Het idee hierachter is dat niet alleen de vliegen die zich in deze zogenaamde 'attract- en kill' bakken ontwikkelen doodgaan aan een infectie met de schimmel, maar dat de schimmel ook uitgroeit op dode vliegenlarven-, poppen- en/of adulten en de schimmelsporen verder door vliegen kunnen worden verspreid naar algenplekken elders in de kas waar de schimmel niet actief is toegediend.

In een proefkas bij Wageningen University & Research (WUR) glastuinbouw is bij toeval een spontane besmetting van oevervliegen met een entomopathogene schimmel ontdekt. Het bleek hier te gaan om een *Beauveria bassiana* isolaat, welke verschilde van bestaande commerciële *B. bassiana* isolaten. Eerst is de effectiviteit van dit isolaat vergeleken met 4 andere commerciële entomopathogene schimmels. De twee meest veelbelovende soorten entomopathogene schimmels, waaronder het 'WUR isolaat' van *B. bassiana* zijn verder getest in vervolgprouven, waarbij naast het effect van entomopathogene schimmels op de overleving van larve tot volwassen oevervlieg, ook het effect van de entomopathogene schimmels op de tweede generatie oevervliegen bepaald is (zie Hoofdstuk 8). In de eerste proef kon alleen Botanigard in productvorm voor een significante reductie in het aantal rouwmuggen, dat zich van larve tot adult kon ontwikkelen, zorgen. Schimmeligroei uit oevervliegen was echter het meest evident voor het WUR isolaat, welke niet uit de poppen maar uit de volwassen vliegen groeide. Omdat het effect van het WUR isolaat pas in het volwassen stadium tot expressie kwam, was het logisch dat er voor dit isolaat geen reductie in het aantal larven dat zich tot adult had ontwikkeld kon worden waargenomen. Wanneer zieke vliegen zich niet voortplanten, zou een effect zich pas in een tweede generatie oevervliegen manifesteren. In de tweede proef kon voor de Botanigard behandelingen geen effect worden waargenomen op de ontwikkeling van de eerste generatie larven tot volwassen oevervliegen. Wel was het aantal tweede generatie volwassen vliegen dat zich had ontwikkeld twee keer zo laag in de behandelingen met *B. bassiana* Botanigard en *B. bassiana* WUR isolaat sporenoplossingen dan in de controlebehandeling, hoewel dit effect niet significant was door de grote variatie tussen de herhalingen van elke behandeling. Ook werd in de behandeling met het *B. bassiana* WUR isolaat schimmeligroei uit volwassen oevervliegen waargenomen die waren ontwikkeld in algenbakjes welke niet direct waren behandeld met sporenoplossingen. Vervolgens zijn dezelfde twee soorten entomopathogene schimmels getest in een kooiproef uitgevoerd in grote kooien in de kas. Hierbij is het effect van de schimmels over meerdere generaties vergeleken, en is tevens onderzocht of de oevervliegen de schimmels konden overbrengen naar nieuwe plekken met algen (zie Hoofdstuk 9). De verwachting was dat het aantal nieuwe oevervliegen in de kooi met het *B. bassiana* WUR isolaat gedurende de proef steeds verder zou afnemen, omdat geleidelijk een groter gedeelte van de populatie besmet zou raken met de schimmel.

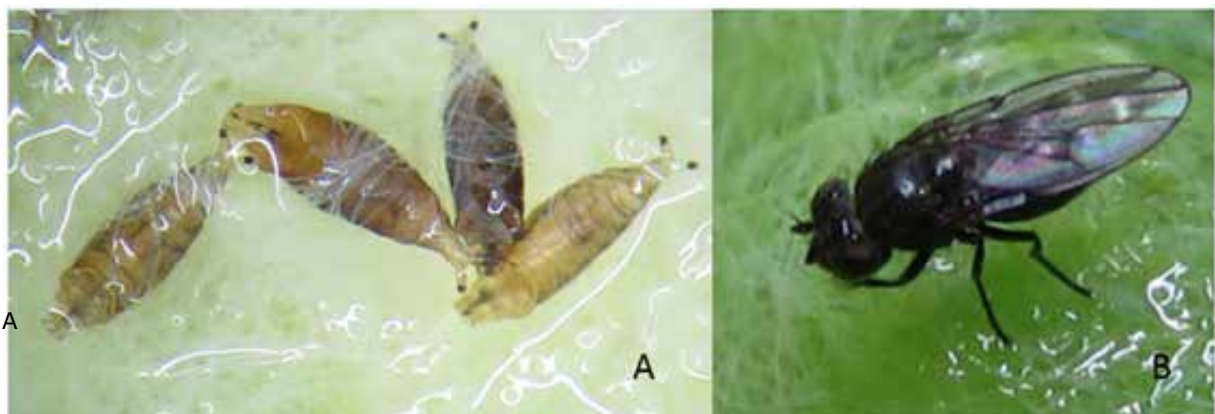
Aan het einde van de proef bevonden zich inderdaad significant minder levende oevervliegen in de behandeling met *B. bassiana* WUR isolaat n. Het totaal aantal oevervliegen dat zich tijdens de 7 weken van de proef in de kooien had ontwikkeld verschilde echter niet tussen de 3 behandelingen. Het was volgens verwachting dat met de methode niet kon worden voorkomen dat er zich een populatie oevervliegen in elke behandeling zou ontwikkelen. Het grote aantal vliegen dat zich in de kooi met het *B. bassiana* WUR isolaat heeft ontwikkeld duidt erop dat de verspreiding van de besmetting van deze entomopathogene schimmel in de populatie oevervliegen zich pas relatief laat in het experiment heeft voorgedaan. Ook trad wederom schimmeluitgroei van het WUR isolaat op uit oevervliegen die waren ontwikkeld uit algenbakjes die niet waren behandeld met sporenoplossingen. Het lijkt dus mogelijk dat de schimmel zich naar onbehandelde algenplekken verspreid. Echter lijkt het voor een succesvolle toepassing van deze 'attract- en kill' strategie in de praktijk belangrijk om al te starten met lokbakjes met algenoplossingen waar reeds meerdere vliegenkadavers liggen waar het *B. bassiana* WUR isolaat uitgroeit. Er zal verder in de praktijk moeten worden onderzocht hoe snel een dergelijke strategie kan zorgen voor een verspreiding van de besmetting van de entomopathogene schimmel door de kas en een reductie in de populatie van oevervliegen.

1 Introductie

Rouwmuggen (Sciaridae) en oevervliegen (Ephydriidae) komen zeer algemeen voor in de glastuinbouw. Rouwmuggen vormen voornamelijk een probleem voor de opkweek van jonge planten en in de champignonindustrie. Rouwmuglarven voeden zich voornamelijk met schimmels, maar ze kunnen ook van de wortels van veel gewassen eten en zo schade veroorzaken. In tegenstelling tot rouwmuglarven veroorzaken oevervliegen geen directe vraatschade. Zowel de larven als volwassen oevervliegen voeden zich voornamelijk met algen. Echter kunnen de volwassen vliegen wel cosmetische schade veroorzaken op de bladeren door hun uitwerpselen. Verder kunnen zowel oevervliegen als rouwmuggen sporen van schimmelziekten zoals *Fusarium* en *Pythium* overbrengen. Tenslotte zijn grote aantallen rouwmuggen en oevervliegen hinderlijk voor telers en consumenten.



Figuur 1.1 Larve (A) en adult (B) van de rouwmug *Bradysia difformis* (Sciaridae).



Figuur 1.2 Poppen (A) en adult (B) van de oevervlieg *Scatella tenuis*.

Voor een literatuurstudie welke is beschreven in het rapport 'Nieuwe methoden voor bestrijding van bodemplagen in de glastuinbouw en zomerbloemen, Deel 2: Literatuurstudie rouwmuggen (Sciaridae) en oevervliegen (Ephydriidae)' zijn meer dan 100 wetenschappelijke studies geraadpleegd om de verschillende aspecten van de biologie en gedrag, monitoring en preventie en biologische bestrijding van rouwmuggen en oevervliegen in kaart te brengen.

Monitoring. Zowel rouwmuggen als oevervliegen kunnen worden gemonitord met behulp van gele vangplaten. Wanneer deze vangplaten horizontaal worden geplaatst, resulteert dit in hogere vangsten van adulten dan wanneer de vangplanten verticaal worden geplaatst. Om de aanwezigheid van rouwmuglarven in het teeltsubstraat aan te tonen kunnen schijfjes rauwe aardappel op het teeltsubstraat worden geplaatst. Deze tactiek werkt echter niet voor de larven van oevervliegen. Rouwmuggen vertonen een sterke aantrekking tot licht, met name tot LED in het UV spectrum. Verder produceren rouwmuggen sexferomonen, maar deze feromonen zijn tot op heden niet chemisch gekarakteriseerd.

Preventie. Ter preventie van rouwmuggen moet worden uitgekeken met het toevoegen van organische stof aan het teeltsubstraat, omdat rouwmuggen hier goed op gedijen. Verder moeten resten van grond, substraat en/of gewasresten snel worden afgevoerd. Algengroei, welke de ontwikkeling van oevervliegen in de hand werkt, kan worden voorkomen door het tegengaan van de vorming van natte plekken, met name van plekken met voedingsoplossingen. Voor rouwmuggen moeten opgeslagen voorraden van substraat goed worden afgesloten, met name als het een substraat een hoog organische stofgehalte heeft. Een drogere toplaag van het substraat kan eileg en ontwikkeling van rouwmuggen reduceren. Verder is aangetoond dat grondsoorten met een hoger percentage zand een droger oppervlakte hebben, waardoor minder algengroei optreedt en de ontwikkeling van oevervliegen moeizamer verloopt.

Bestrijding met natuurlijke vijanden. Verschillende soorten biologische bestrijders kunnen worden ingezet om rouwmuggen en oevervliegen te bestrijden. Bodemroofmijten kunnen een goede bijdrage leveren aan de bestrijding van rouwmuggen en oevervliegen mits ze in voldoende hoge aantallen aanwezig zijn. Met zogenaamde open kweeksystemen konden de populaties van bodemroofmijten sterk worden gestimuleerd (Pijnakker *et al.* 2014). De roofkever *Dalotia* (voorheen *Atheta*) *coriaria* kan rouwmuglarven ook goed bestrijden, maar het effect van deze roofkevers op oevervliegen is niet bekend. Sluipwespen van rouwmuggen en oevervliegen worden tot op heden niet commercieel geproduceerd, maar komen wel vaak spontaan voor in de kas. De soorten sluipwespen van rouwmuggen en oevervliegen die in de kassen voorkomen zijn echter nog niet goed in kaart gebracht, en over hun biologie is op een enkele uitzondering na nog weinig tot niets bekend. Wel is uit enkele studies bekend dat bepaalde sluipwespen een belangrijke bijdrage kunnen leveren aan de bestrijding van rouwmuggen en oevervliegen. Een andere bestrijder die niet commercieel geproduceerd wordt, maar ook vaak spontaan optreedt in kassen en een goede bijdrage kan leveren aan de bestrijding van rouwmuggen en oevervliegen is de roofvlieg *Coenosia attenuata*. Deze roofvlieg kan zowel de larven als de volwassen muggen en vliegen bestrijden.

Bestrijding met micro-organismen. Met behulp van insectparasitaire aaltjes kunnen de larven van zowel rouwmuggen als oevervliegen goed worden bestreden. Echter moeten ze wel frequent worden toegepast. De frequentie van de toepassingen moet worden afgestemd op de ontwikkelingssnelheid, welke afhankelijk is van de teelttemperatuur, en het type substraat. In steenwol blijken de aaltjes minder goed te overleven als in potgrond. De bodembacterie *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti) kan ook rouwmuggen bestrijden door de toxische eiwitten die deze bacterie produceert. Ook voor het Bti product geldt dat het door de beperkte werkingsduur regelmatig moet worden toegepast. Het aantal publicaties over de werking van Bti tegen oevervliegen is beperkt tot één studie, waaruit blijkt dat Bti geen effect heeft op oevervliegen in steenwol. Commercieel beschikbare entomopathogene schimmels zijn tot dusver niet erg effectief gebleken tegen rouwmuggen en oevervliegen. Wel hebben Stanghellini en El-Hamalawi (2005) een sterk effect tegen oevervliegen gevonden van een niet-commercieel *Beauveria bassiana* isolaat, welke ze zelf uit oevervliegen hadden geïsoleerd.

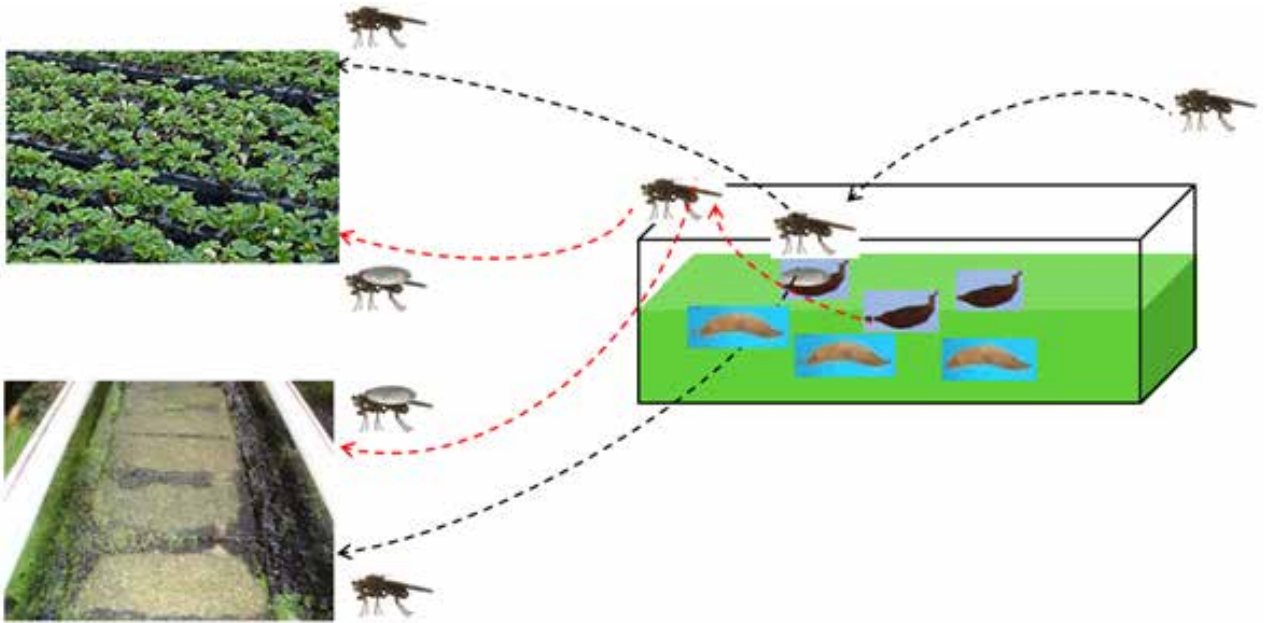
Geschiktheid teeltsubstraat voor rouwmuggen. In puur veensubstraat of kokossubstraat waar geen planten in groeien kunnen vrijwel geen rouwmuggen uit eitjes ontwikkelen (Olson *et al.* 2002). In de wortelzone van planten, waar wortellexudaten worden uitgescheiden en micro-organismen kunnen ontwikkelen, kunnen rouwmuglarven zich wel ontwikkelen. Ook wanneer organisch materiaal wordt toegevoegd aan substraat kunnen rouwmuglarven zich goed ontwikkelen. Schimmels vormen de voornaamste voedselbron voor rouwmuglarven. Echter zijn niet alle schimmelsoorten even geschikt als voedselbron voor de larven. Zo werd in 3 studies gevonden dat rouwmuglarven zich niet goed konden ontwikkelen op *Trichoderma (atro)viride* (Frouz & Novakova, 2001; Anas en Reeleder, 1988; Kühne en Heller, 2011). Verder is ook het vochtgehalte van het teeltsubstraat van invloed op de overleving van rouwmuggen van ei tot adult. Zowel een te hoog als een te laag vochtgehalte benadeelt de ontwikkeling van rouwmuggen (Olson *et al.* 2002). Verder kan een relatief droge toplaag de overleving van rouwmug eitjes tegengaan (van Epenhuijsen *et al.* 2001).

Aantrekkelijkheid teeltsubstraat voor rouwmuggen. Cloyd *et al.* (2007) hebben verschillen gevonden tussen de geuren van twee organische substraatsoorten, zand en perliet voor de aantrekkelijkheid voor volwassen rouwmuggen van de soort *Bradysia coprophila*, en hebben hierbij sterke verschillen gevonden. Verder bleken ook pure schimmelculturen verschillend aantrekkelijk voor eileg voor *Lycoriella ingenua* rouwmuggen (Frouz en Novakova, 2001). Echter zijn er nog geen studies bekend waarin de aantrekkelijkheid van geuren van verschillende substraat-samenstellingen voor de rouwmugsoort die in de Nederlandse glastuinbouw voorkomt, namelijk *Bradysia difformis* (= *B. paupera*), is onderzocht.

In dit onderzoek is een attract- en killmethode voor rouwmuggen en oevervliegen ontwikkeld (zie Figuur 1.3 en 1.4). Een attract- en killmethode is een methode waarbij plagen van het gewas worden weggelokt naar een plek waar ze niet verder kunnen ontwikkelen. De 'attract' component moet de plagen aantrekken en weglokken uit het gewas, terwijl de 'kill' component kan bestaan uit een vangplaat, een natuurlijke vijand en/of het elimineren van de lokplek voordat zich een nieuwe generatie van de plaag heeft kunnen ontwikkelen. Een dergelijke attract- en killmethode kan het beste worden toegepast binnen een zogenaamde 'push- en pull' methode, waarbij ook het teeltsubstraat minder aantrekkelijk en/of geschikt wordt gemaakt (zie Figuur 1.3).



Figuur 1.3 Push-pull systeem voor de bestrijding van rouwmuggen (*Sciaridae*) in de glastuinbouw.



Figuur 1.4 *Attract- en kill systeem voor de bestrijding van oevervliegen in de glastuinbouw. Hierbij worden bakken met algen in de kas geplaatst waar entomopathogene schimmels aan worden toegediend. Vervolgens worden de vliegen die in deze bakken ontwikkelen ziek, en gaat de schimmel zich in deze vliegen vermeerderen. De schimmelsporen kunnen vervolgens worden overgebracht naar plekken in de kas waar algen groeien zodat ook hier de vliegen kunnen worden bestreden.*

2 Aantrekkende werking van verschillende substraat-samenstellingen voor *Bradysia difformis* rouwmuggen

2.1 Introductie

Als eerste stap in de ontwikkeling van een push-pull systeem voor rouwmuggen is in kaart gebracht welke geuren van substraatsamenstellingen het meest of juist het minst aantrekkelijk zijn voor rouwmuggen. Hiervoor hebben we in een speciale gedragsofstelling (zie Figuur 2.1) de aantrekkelijkheid van verschillende grondstoffen getest tegen een standaardmengsel van veen. De onderzoeken zijn uitgevoerd met de rouwmuggensoort *Bradysia difformis*, welke een van de meest voorkomende soorten in Nederlandse kassen is en waarvan de larven veel schade veroorzaken.

2.2 Materiaal en methoden

In de gedragsofstelling (Figuur 2.1) werden steeds rond de 30-50 rouwmuggen losgelaten in de middenbak. Deze geventileerde middenbak heeft 6 uitgangen, waarbij er in deze proef steeds slechts 2 tot 3 uitgangen zijn gebruikt. De taps toelopende uitgangen eindigen elk in een afgesloten compartiment waarin een schaalpje met het testsubstraat was geplaatst met daarop een klein geel vangkaartje. Tevens werd in de middenbak een schaalpje met vochtige watten geplaatst, als vochtvoorziening voor de rouwmuggen. De keuzetests vonden plaats in het donker. Per grondstof zijn er steeds 6 tot 12 herhalingen uitgevoerd. Twee dagen na het loslaten van de muggen werd bepaald hoeveel vrouwtjesmuggen er in elk van de compartimenten terecht waren gekomen. Tussen de herhalingen werd de positie van de verschillende substraten gewisseld, zodat kon worden vastgesteld dat een hoger aantal rouwmuggen in een compartiment met een bepaald substraat ook echt de voorkeur voor dit substraat had, en niet een voorkeur voor een bepaalde richting.



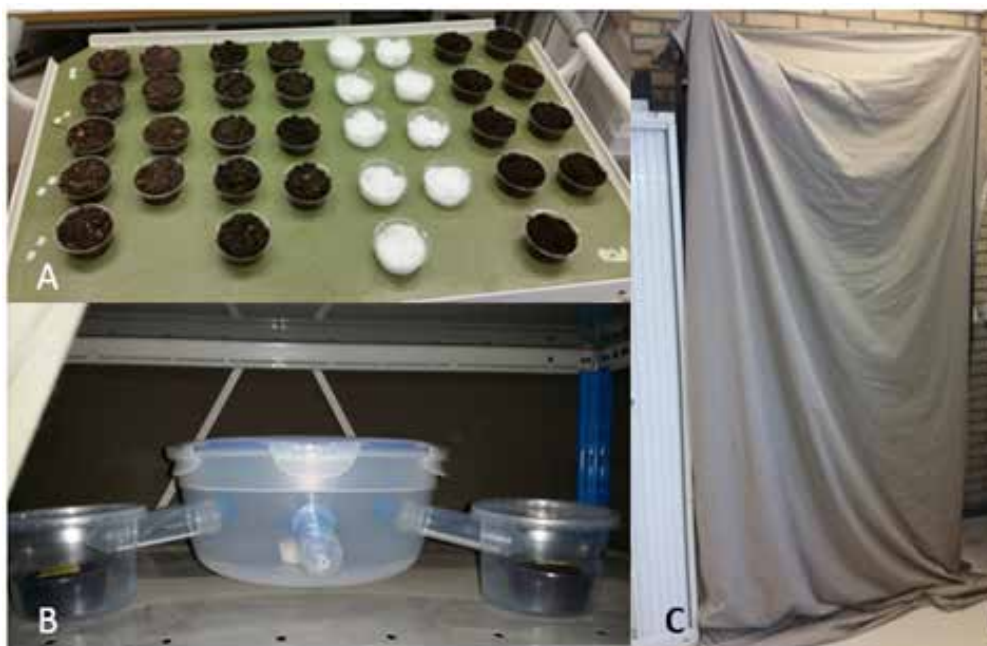
Figuur 2.1 Gedragsofstelling voor keuzetests met de rouwmug *B. difformis*. De geventileerde middenbak heeft 6 uitgangen, waarbij er in deze proef slechts 2 tot 3 uitgangen zijn gebruikt. De uitgangen lopen taps toe en eindigen elk in een afgesloten compartiment waarin een schaalpje met het testsubstraat was geplaatst met daarop een klein geel vangkaartje. De keuzetests vonden plaats in het donker. Er werden steeds rond de 30-50 rouwmuggen losgelaten in de middenbak. Twee dagen na het loslaten van de muggen werd bepaald hoeveel vrouwtjesmuggen er in elk van de 3 compartimenten terecht waren gekomen.

Ten eerste is getest of de geur van het standaard veenmengsel (afkomstig van Horticoop), vanaf nu 'referentiesubstraat' genoemd, aantrekkelijk was voor rouwmugvrouwtjes. Dit referentiesubstraat bestond uit 40% Baltisch veen (middel), 40% tuinturf en 20% Zweeds veen (middel). Het is voor deze eerste test op twee verschillende vochtgehalten gebracht; een "standaard" vochtgehalte dat binnen de range valt die normaal in de teelt wordt aangehouden en een relatief hoog vochtgehalte, en getest tegen natte watten.

Vervolgens zijn binnen de verschillende categorieën teeltsubstraat alternatieven met elkaar vergeleken. Hiervoor zijn eerst tuinturf, Baltisch veen en Zweeds veen met elkaar vergeleken. Vervolgens is voor tuinturf onderzocht of de pH van invloed is op de aantrekkende werking voor rouwmugvrouwtjes. Voor kokossubstraat zijn kokosgruis, kokoschips en kokosvezel met elkaar vergeleken. Ook is puur kokossubstraat getest tegen referentiesubstraat in een 2-keuze test (zie Figuur 2.3). Voor deze tests waren alle substraten op het standaard luchtgehalte van 45% AFS gebracht.

Voor de volgende tests zijn verschillende grondstoffen steeds in een verhouding van 1:1 gemengd met het referentiesubstraat. Op deze wijze zijn boomschors, kokosgruis, houtvezel en spaghnum getest. Vervolgens zijn een serie organische grondstoffen getest, waaronder a) chompost, b) compost GFT, c) compost groen, d) wortelen, e) zemelen, f) stalmeest en g) bruine bonen. Ook zijn h) NPK mestkorrels, i) kalkoenvoer korrels en j) alginaat capsules met gist en geïmpregneerd met de entomopathogene schimmel *Metarhizium* gemengd door het referentiesubstraat getest. Uit deze alginaat capsules met gist komt geleidelijk CO₂ vrij.

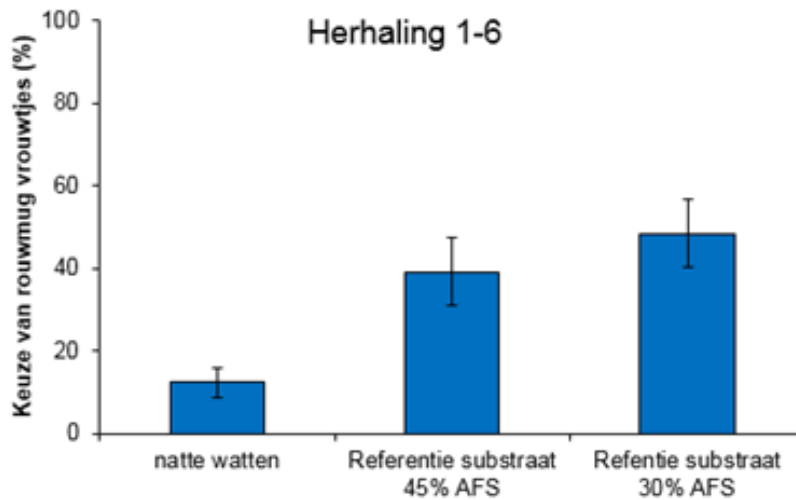
Niet het vochtgehalte zelf, maar het luchtgehalte is steeds gestandaardiseerd op 45% AFS (= 'air-filled space') en 30% AFS. Het idee is dat bij verschillende luchtgehalten verschillende microbiële processen plaatsvinden, waardoor ook weer verschillende geurstoffen worden gevormd. 45% AFS betekent dat 45% van het volume van het substraat gevuld is met lucht. Het referentiesubstraat met 45% AFS had een voor plantenteelt relatief 'standaard' vochtgehalte van 73%, en het referentiesubstraat met 30% AFS (minder lucht) hadden een hoger vochtgehalte van 78%. Echter was de relatie tussen vochtgehalte en luchtgehalte afhankelijk van de samenstelling van het substraat. Om de verschillende substraatmengsels op 45% en 30% AFS te brengen moesten eerst alle grondstoffen en hun mengsels worden gekarakteriseerd met betrekking tot droge stofgehalte, organische stofgehalte, laboratory bulk density (LBD) en dry bulk density (DBD) en poriënvolume. Na het standaardiseren van het juiste luchtgehalte werden de substraatmengsels voor een periode van 5 tot 10 dagen bewaard bij 20 °C alvorens ze werden getest. Tijdens deze periode kunnen de microbiële processen al op gang komen.



Figuur 2.2 Schaaltjes met verschillende soorten substraat voor in de 3 compartimenten van de 3-keuze gedragsopstelling, en schaaltes met vochtige watten voor in de middenbak van de gedragsopstelling (A), gedragsopstelling geplaatst in de kas waar de proef plaatsvindt (B), en de kas waar de gedragsopstellingen zijn geplaatst, welke volledig is afgesloten voor licht met een dubbele laag gordijnen (C).

2.3 Resultaten

Uit de eerste proef is gebleken dat rouwmugvrouwtjes worden aangetrokken tot de geur van het standaard veenmengsel (referentiesubstraat) dat in de teelt van veel opkweekgewassen en potplanten wordt gebruikt (zie Figuur 2.3). Hierbij was er geen duidelijk effect van het luchtgehalte van het referentiesubstraat op de aantrekking van de rouwmugvrouwtjes.

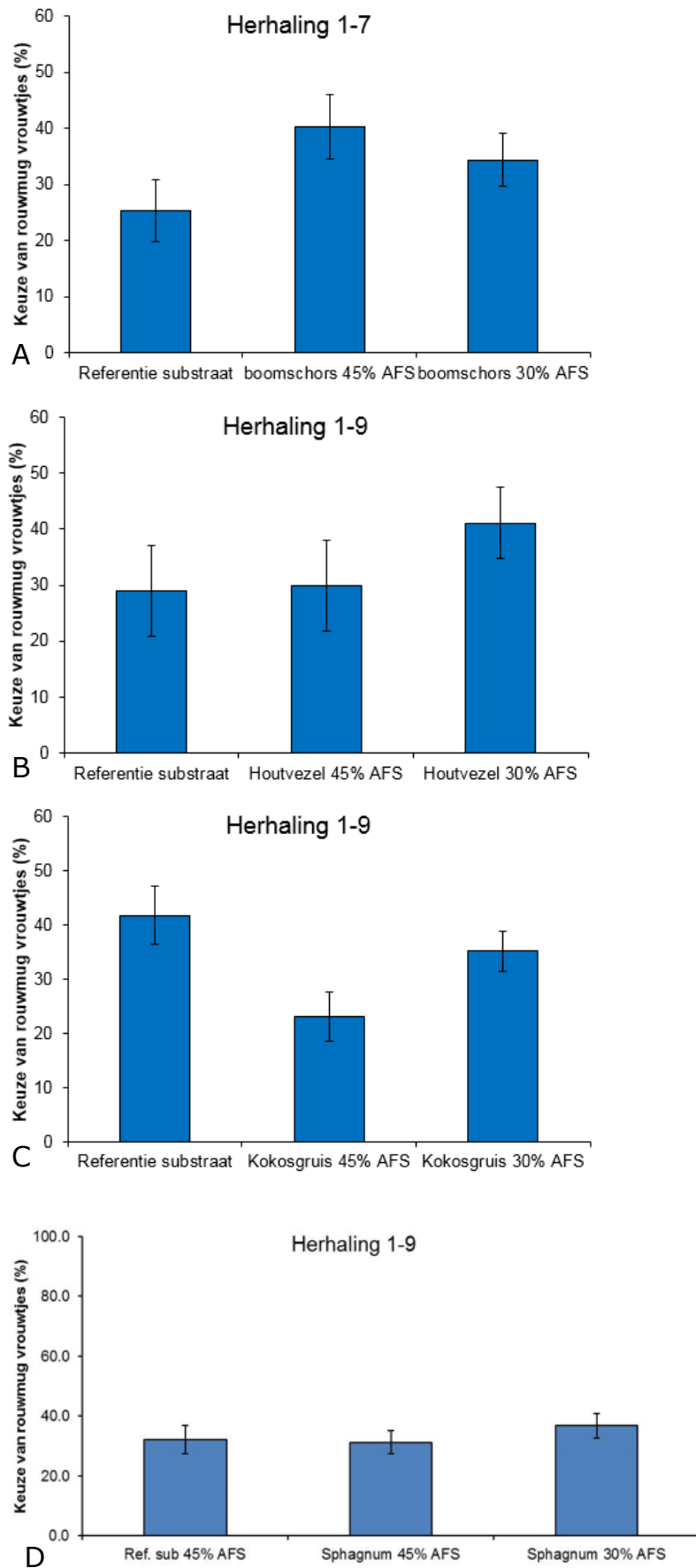


Figuur 2.3 Aantrekkelijkheid van een standaard veenmengsel (referentiesubstraat) in twee verschillende luchtgehaltenes (45% AFS en het relatief vochtigere 30% AFS) voor *B. difformis* vrouwtjes. Test is uitgevoerd in de gedragsoptelling beschreven in Figuur 2.1.

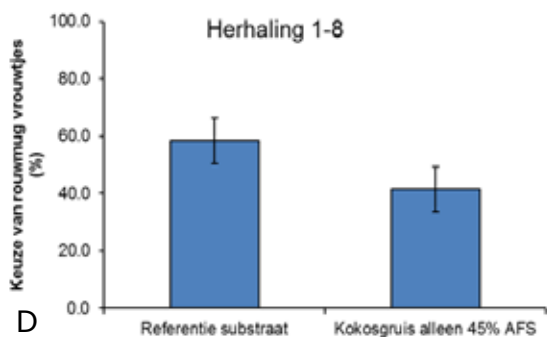
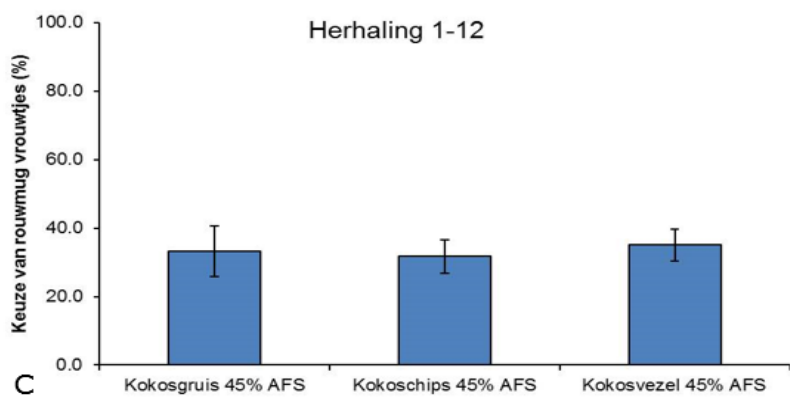
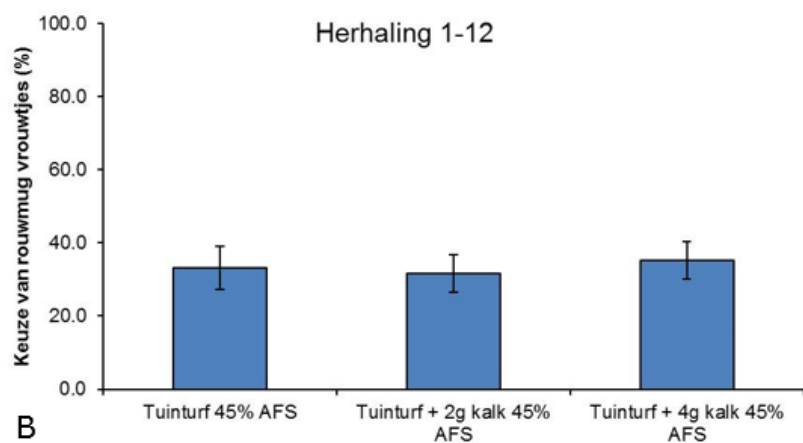
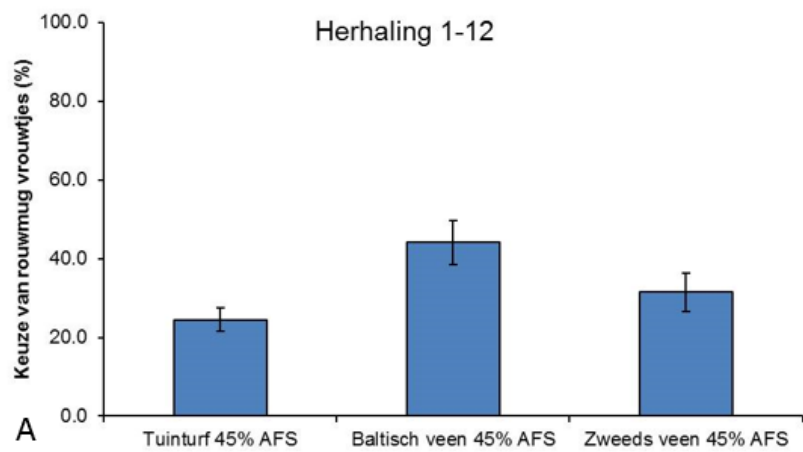
Het mengen van boomschors, houtvezel of spaghnum door het referentiesubstraat had geen duidelijke invloed op de aantrekking van rouwmugvrouwtjes (Zie Figuur 2.4A, B en D). Wanneer kokossubstraat door het referentiesubstraat werd gemengd bij standaard luchtgehalte (45% AFS), lag de aantrekkelijkheid voor rouwmuggen iets lager, maar er was geen verschil met het referentiesubstraat wanneer het kokossubstraatmengsel iets natter was en minder lucht bevatte (30% AFS) (Figuur 2.4C).

Met betrekking tot de vergelijkingen van verschillende soorten veensubstraat, bleek tuinturf minder aantrekkelijk voor rouwmugvrouwtjes te zijn dan Baltisch veen (zie Figuur 2.5A). Dit bleek niet te liggen aan de relatief lage pH van het tuinturf, want er was geen verschil tussen de aantrekkelijkheid voor rouwmugvrouwtjes tussen de geur van tuinturf met en zonder toevoeging van kalk (zie Figuur 2.5B). Kokosgruis, kokoschips en kokosvezel bleken niet te verschillen in aantrekkelijkheid voor rouwmugvrouwtjes (zie Figuur 2.5C), en wanneer kokosgruis in pure vorm werd getest tegen het referentiesubstraat, was het kokosgruis iets minder aantrekkelijk voor rouwmugvrouwtjes (zie Figuur 2.5D).

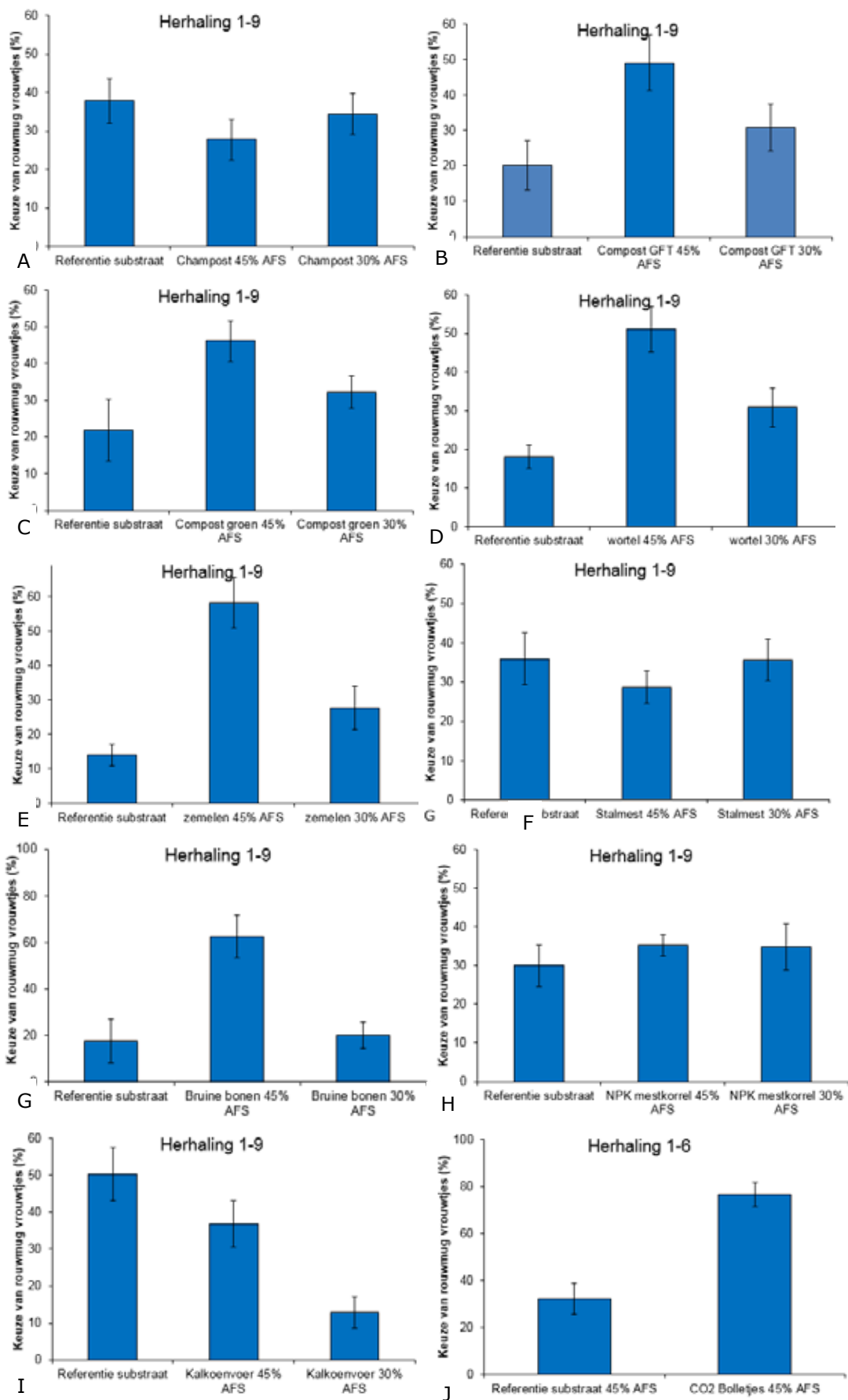
Verschiede soorten makkelijk afbreekbare organische materialen hadden een sterke aantrekkende werking op rouwmugvrouwtjes, waaronder compost GFT, compost groen, gemalen wortelen, zemelen, bruine bonen en CO₂-alginaatcapsules geïmpregneerd met Metarhizium (zie Figuur 2.6B, C, D, E, G en J). Daarentegen hadden champost, stalmest, NPK mestkorrels en kalkoenvoer geen aantrekkende werking (zie Figuur 2.6A, F, H en I). De mengsels die op een luchtgehalte van 30% AFS (= relatief hoog vochtgehalte) waren gebracht waren over het algemeen minder aantrekkelijk voor de rouwmuggen dan de substraatmengsels die op 45% AFS (= voor plantenteelt standaard vochtgehalte) waren gebracht. Zemelen en bruine bonen bleken het sterkst aantrekkende effect te hebben op de rouwmuggen; maar liefst 4x zoveel muggen werden aangetrokken tot de mengsels met zemelen of bruine bonen bij 45% AFS vochtgehalte.



Figuur 2.4 Effect van het 1 op 1 mengen van boomschors (A), houtvezel (B), kokosgruis (C) of spaghnum (D) met referentiesubstraat in twee verschillende luchtgehalten (45% AFS en het relatief vochtigere 30% AFS) op de aantrekking van *B. difformis* vrouwtjes, getest in de gedragsopstelling beschreven in Figuur 2.2.



Figuur 2.5 Effect van het 1:1 mengen van relatief makkelijk afbreekbare organische substraten met referentiesubstraat in twee verschillende luchtgehaltenes (45% AFS en het relatief vochtigere 30% AFS) op de aantrekking van *B. difformis* vrouwtjes, getest in de gedragsopstelling beschreven in Figuur 2.2.



Figuur 2.6 Vergelijking van verschillende soorten veen (A), pH waarden van tuinturf (B), verschillende fracties kokossubstraat (C) of puur kokossubstraat en referentiesubstraat (D) op de aantekking van *B. diffiformis* vrouwtjes, getest in de gedragsofstelling beschreven in Figuur 2.2.

2.4 Conclusies en discussie

Bradysia difformis vrouwtjes bleken sterk en consistent te reageren op geuren van substraatsamenstellingen. Vooral de toevoeging van makkelijk afbreekbare organische stof aan het referentiesubstraat bleek de aantrekkelijk voor de rouwmugvrouwtjes te bevorderen. Opvallend is dat de mengsels die op een luchtgehalte van 30% AFS (= relatief hoog vochtgehalte) waren gebracht minder aantrekkelijker bleken voor de rouwmugvrouwtjes dan de substraatmengsels die op 45% AFS (= voor plantenteelt standaard vochtgehalte) waren gebracht. Het zou kunnen dat de aantrekkelijkheid van het substraat voor rouwmugvrouwtjes samenhangt met de microbiologische activiteit. Bij hoge microbiële activiteit komt ook CO₂ vrij. Opvallend was dat toevoeging van CO₂-capsules met sporen insect-pathogene schimmel *Metarhizium* de aantrekkelijkheid van het standaard veensubstraat sterk verhoogde. Deze resultaten vormen een goede basis voor de verdere ontwikkeling van een loksubstraat. Als vervolgstappen wordt in Hoofdstuk 3 gekeken wat de aantrekkende werking van het loksubstraat is op de roofkever *D. coriaria* en in Hoofdstuk 4 wordt het effect van de leeftijd van het substraat en het vochtgehalte op de aantrekkende werking voor rouwmugvrouwtjes verder onderzocht.

Ook waren er relatief kleinere verschillen in de aantrekkende werking op rouwmugvrouwtjes tussen verschillende soorten veensubstraat, en tussen het referentiesubstraat en kokossubstraat. Hiermee zou voor de samenstelling van het teeltmedium van planten waar mogelijk rekening kunnen worden gehouden. Een minder aantrekkelijk teeltsubstraat zou het weglokken van rouwmugvrouwtjes uit het gewas naar een loksubstraat namelijk nog verder kunnen bevorderen. In Hoofdstuk 5 wordt een kooiproef beschreven waarbij kokossubstraat en referentiesubstraat als teeltsubstraat worden vergeleken binnen een push-pull methode.

3 Aantrekkelijke werking van loksubstraat op de roofkever *Dalotia coriaria*

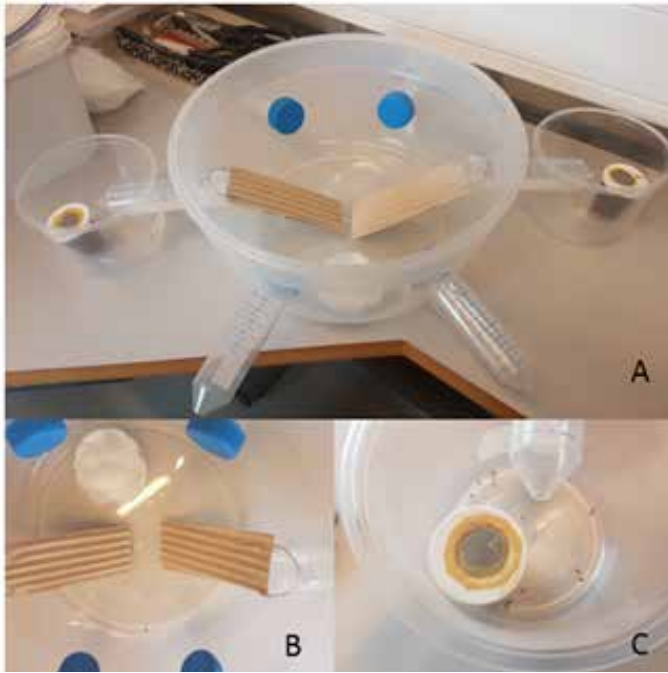
3.1 Introductie

Om te onderzoeken of substraatsamenstellingen die aantrekkelijk zijn gebleken voor *Bradysia difformis* vrouwtjes ook aantrekkelijk zijn voor biologische bestrijders van rouwmuggen is een praktijkproef gedaan en een proef in een gedragsopstelling in het laboratorium.

3.2 Materiaal en methoden

Bij een Phalaenopsis kweker zijn op 2 verschillende momenten bakjes neergezet met a) een 1:1 mengsel van geweekte en gemalen bruine bonen en referentiesubstraat, b) een 1:1 mengsel van zemelen en referentiesubstraat en c) referentiesubstraat (controle). Per keer zijn er van elk van deze 3 behandelingen 3 bakjes in de kas geplaatst. De eerste keer zijn de bakjes 4 dagen na uitzetten verzameld, en de tweede keer zijn de bakjes 1 dag na uitzetten verzameld. Aansluitend is het aantal *D. coriaria* roofkevers per bakje geteld.

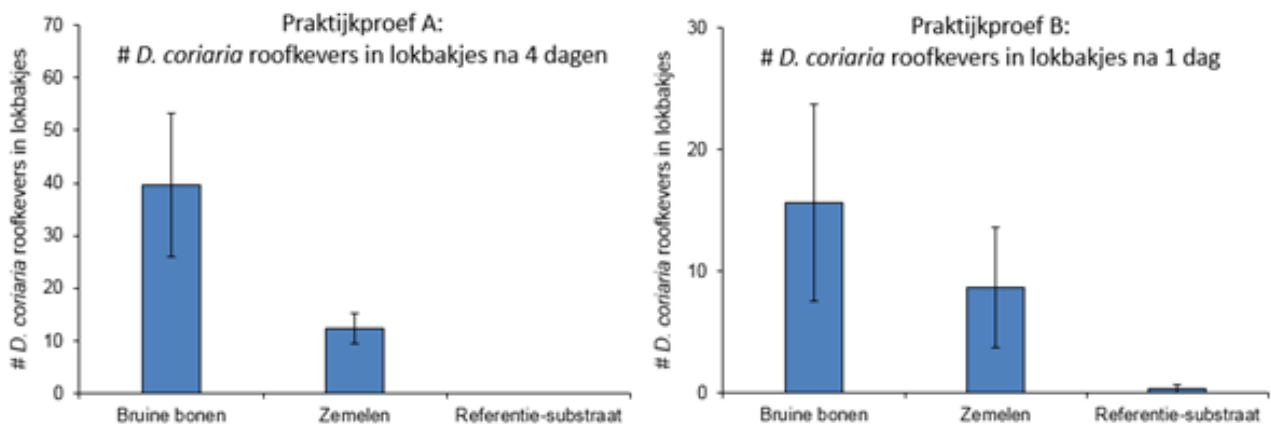
Vervolgens is een serie gedragsproeven gedaan in een gedragsopstelling in het laboratorium om de voorkeur van *D. coriaria* roofkevers voor de geur van 3 substraatsamenstellingen verder te onderzoeken. Omdat *D. coriaria* voornamelijk loopt werkte de gedragsopstelling voor rouwmuggen niet voor *D. coriaria*. Daarom is deze gedragsopstelling aangepast door een 'loopplank' van karton te bevestigen aan de buizen die naar de keuze-compartimenten leiden. Er zijn voor de proeven steeds 2 van de 6 keuze-compartimenten gebruikt. Verder zijn de testsubstraten in geventileerde afgesloten bakjes in de keuze-compartimenten geplaatst, om de roofkevers na afloop van de proef makkelijk te kunnen tellen. Er zijn 3 twee-keuze tests uitgevoerd, met een vergelijking van a) een 1:1 mengsel van zemelen met referentiesubstraat t.o.v. referentiesubstraat, b) een 1:1 mengsel van bruine bonen met referentiesubstraat t.o.v. referentiesubstraat, en c) 1:1 mengsel van zemelen met referentiesubstraat t.o.v. een 1:1 mengsel van bruine bonen met referentiesubstraat. Alle testsubstraten waren op een standaard luchtgehalte van 45% AFS gebracht (zie Materiaal en Methoden van Hoofdstuk 2.2 voor uitleg). Voor de verschillende proeven zijn steeds 9 herhalingen van elke behandeling uitgevoerd, waarbij de positie van de testsubstraten steeds is gewisseld. Voor elke herhaling werden er 20-30 *D. coriaria* kevers aan de middenbak van de gedragsopstelling geïntroduceerd. Een dag na de introductie van de roofkevers is het aantal roofkevers in elk keuze-compartiment geteld.



Figuur 3.1 Gedragsopstelling voor het testen van de voorkeur van *D. coriaria* roofkevers voor geuren van substraten (A). Er zijn hiervoor steeds 2 van de 6 compartimenten gebruikt van de gedragsopstelling voor rouwmuggen. Omdat de roofkevers voornamelijk lopen, zijn er in de middenbak kartonnennetjes bevestigd aan de buizen die naar de keuze-compartimenten leiden, welke als 'loopplanken' fungeren (B). Verder zijn de substraten in geventileerde bakjes in de compartimenten geplaatst, om de roofkevers makkelijk te kunnen tellen (C).

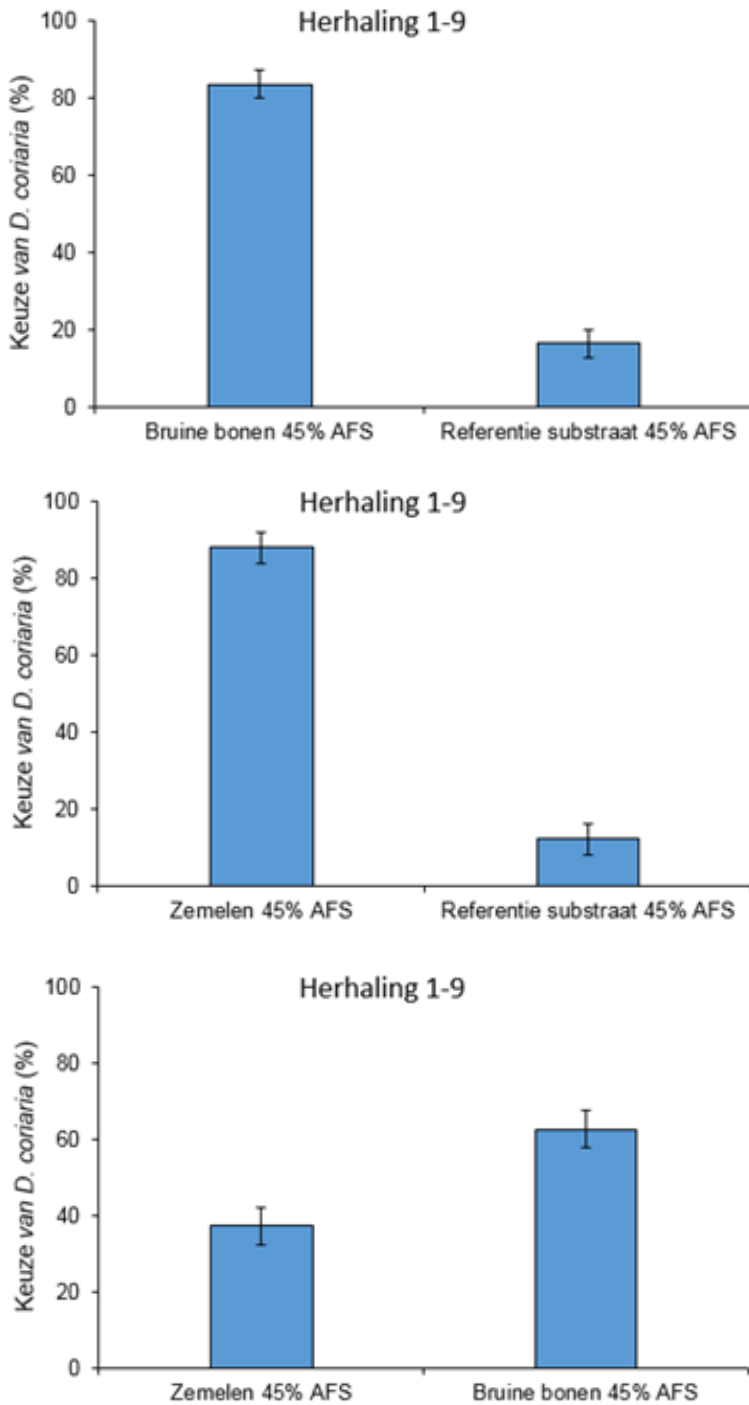
3.3 Resultaten

In beide herhalingen van de praktijkproef werden de meeste roofkevers in de bakjes met een 1:1 mengsel van bruine bonen met referentiesubstraat gevonden. Ook werden er roofkevers in de lokbakjes met een 1:1 mengsel van zemelen met referentiesubstraat gevonden, terwijl er (vrijwel) geen roofkevers in de bakjes met referentiesubstraat werden gevonden (zie Figuur 3.2).



Figuur 3.2 Resultaten praktijkproef waarbij bakjes met loksubstraat in een praktijkkas met een populatie *D. coriaria* roofkevers is gezet. Na 4 dagen (A) of 1 dag (B) is het aantal roofkevers in elk bakje getest.

Uit de resultaten van de proeven in de gedragsopstelling werd duidelijk dat *D. coriaria* roofkevers actief op de geuren van substraten reageren. Er werden significant meer *D. coriaria* roofkevers gevonden in de keuze-compartmenten met het 1:1 substraatmengsel van bruine bonen en referentiesubstraat dan in het keuze-compartment met alleen het referentiesubstraat (zie Figuur 3.3A). Ditzelfde patroon zagen we ook voor de vergelijking van de aantrekking van *D. coriaria* roofkevers voor de geuren van een 1:1 substraatmengsel van zemelen en referentiesubstraat (zie Figuur 3.3B). Wanneer de aantrekking van *D. coriaria* voor de geuren van substraatmengsels met zemelen en bruine bonen direct werd vergeleken, hadden de roofkevers een lichte voorkeur voor het substraatmengsel met bruine bonen (zie Figuur 3.3C).



Figuur 3.3 Keuze van *D. coriaria* roofkevers voor de geuren van een 1:1 substraatmengsel van bruine bonen en referentiesubstraat t.o.v. referentiesubstraat (A), een 1:1 substraatmengsel van zemelen en referentiesubstraat t.o.v. referentiesubstraat (B), of een 1:1 substraatmengsel van bruine bonen en referentiesubstraat t.o.v. een 1:1 substraatmengsel van zemelen en referentiesubstraat (C).

3.4 Conclusies en discussie

Uit de resultaten van de proeven in de gedragsopstelling en de praktijk werd duidelijk dat *D. coriaria* roofkevers actief op de geuren van substraten reageren, en dat hun voorkeur in grote lijnen overeenkomt met de voorkeur van *B. difformis* vrouwtjes. Het zou interessant zijn om verder te onderzoeken hoe de werking van het loksubstraat voor rouwmuggen kan worden gecombineerd met de inzet van *D. coriaria* roofkevers.

4 Effect van leeftijd en vochtgehalte loksubstraat op aantrekkende werking voor rouwmuggen

4.1 Introductie

Voor de toepassing van het loksubstraat is het belangrijk om te weten over welke tijdsperiode het loksubstraat aantrekkelijk blijft voor rouwmuggen. In een serie gedragsproeven met een 1:1 substraatmengsel van zemelen en referentiesubstraat is de aantrekkelijkheid van het substraatmengsel op 0 dagen, 3 dagen, 1 week, 2 weken, 3 weken, 4 weken en 6 weken na incubatie bij 20 °C getest tegen het referentiesubstraat. Verder is het effect van het luchtgehalte van het loksubstraat op de aantrekking van *B. difformis* vrouwtjes verder getoetst. Uit de proeven beschreven in Hoofdstuk 2 bleek dat de geur van een loksubstraat met een relatief laag luchtgehalte (30% AFS = hoog vochtgehalte) minder aantrekkelijk was voor *B. difformis* vrouwtjes dan een loksubstraat met een standaard luchtgehalte (45% AFS). Om te weten te komen hoe belangrijk het is om het luchtgehalte/vochtgehalte van het loksubstraat voor toepassing in de praktijk te standaardiseren en constant te houden is een serie additionele tests gedaan waarbij een 1:1 substraatmengsel van bruine bonen met referentiesubstraat op een luchtgehalte van 35% AFS, 45% AFS of 55% AFS is gebracht. Vervolgens is de aantrekkelijkheid van deze substraten met verschillende luchtpercentages afzonderlijk getoetst ten opzichte van referentiesubstraat met 45% AFS in twee-keuze tests.

4.2 Materiaal en methoden

Voor de gedragstoetsen is dezelfde gedragsopstelling en toets-methode gebruikt als beschreven in Hoofdstuk 2.2. Voor de tijdserie zijn alle substraten gestandaardiseerd op 45% AFS. Tijdens de incubatiemethode is de hoeveelheid verdampt vocht regelmatig aangevuld om het luchtgehalte van het substraatmengsel op 45% AFS te houden.

4.3 Resultaten

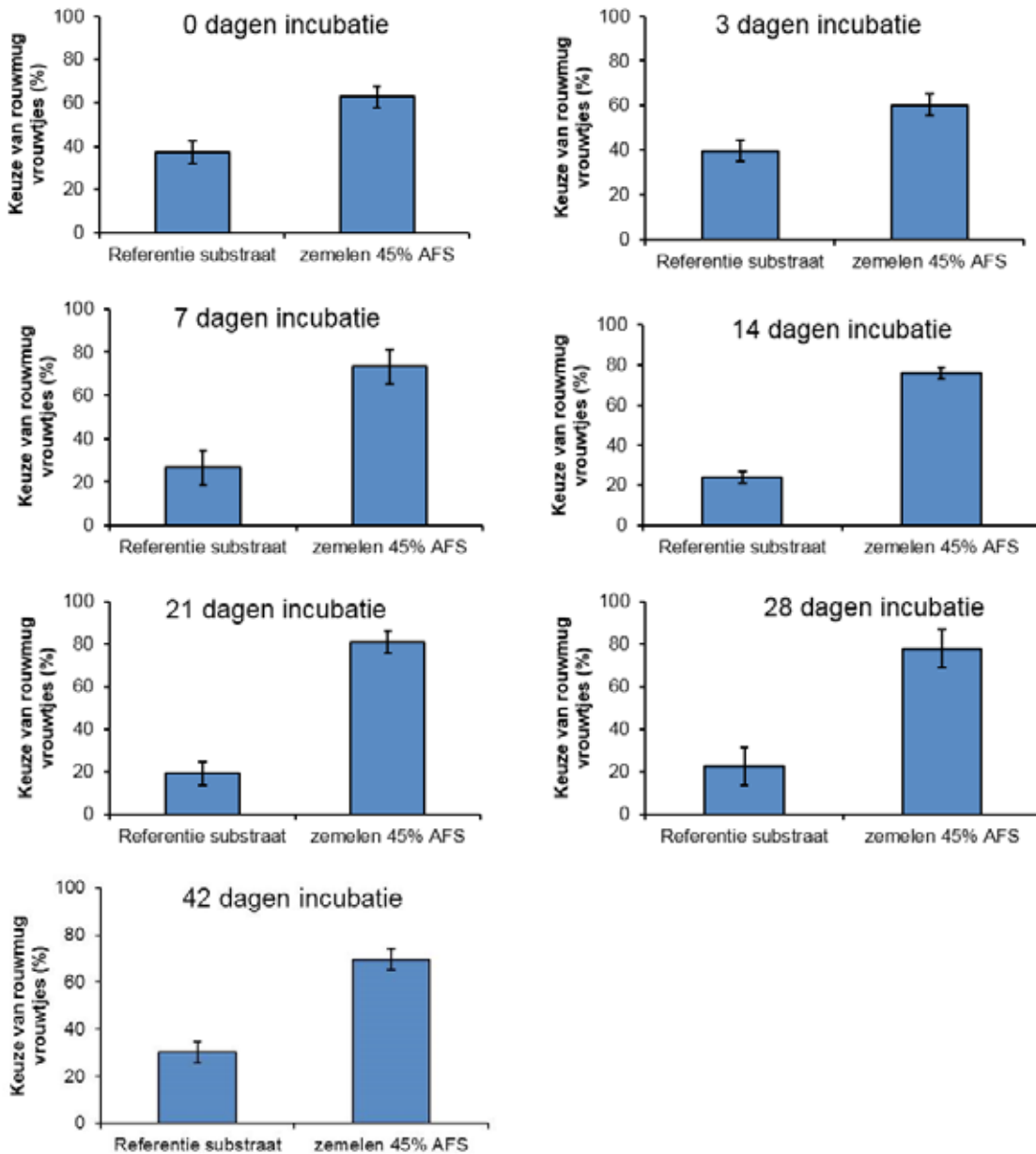
De resultaten van de tijdserie met het loksubstraat op basis van zemelen staat weergegeven in Figuur 4.1. Vanaf 1 week na incubatie was de aantrekkelijkheid van het loksubstraat sterker dan na 0 en 3 dagen na incubatie. De aantrekkelijkheid van het loksubstraat bleef nog tenminste voor een periode van 6 weken na incubatie behouden. De resultaten van de keuzetests met het loksubstraat op basis van bruine bonen is gebleken dat het loksubstraat zowel bij AFS van 35% als bij AFS van 45% ruim 4x zo aantrekkelijk is dan het referentiesubstraat (zie Figuur 4.2A en B). Bij een hoger luchtpercentage van 55% was er geen aantrekkende werking van het referentiesubstraat (zie Figuur 4.2C).

4.4 Conclusies en discussie

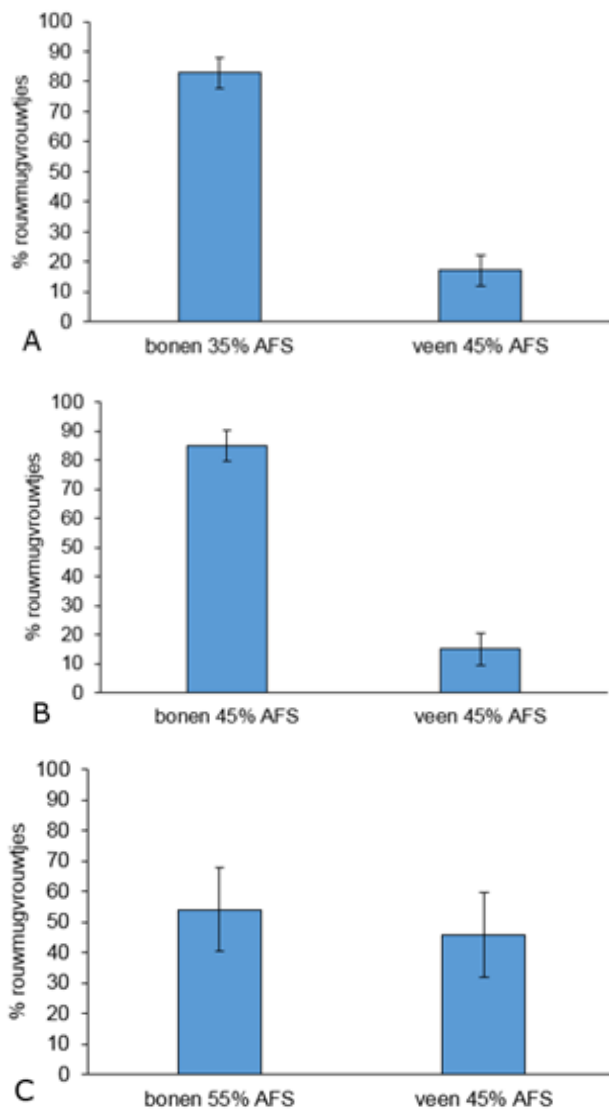
Onder geconditioneerde omstandigheden bereikt het loksubstraat op basis van zemelen na een week een optimale aantrekkende werking, en wordt deze aantrekkende werking voor een periode van tenminste 6 weken behouden. Hoe de aantrekkende werking van het loksubstraat wordt beïnvloed wanneer hierin rouwmuglarven, *D. coriaria* roofkever larven of andere bodemorganismen in leven zal verder moeten worden onderzocht. Omdat deze larven actief van de schimmels eten die op het zetmeelsubstraat groeien, wordt verondersteld dat de werkingsduur minder lang is. Tevens moet worden voorkomen dat zich een nieuwe generatie rouwmuggen ontwikkelt in het loksubstraat. De meest zekere methode om dit te voorkomen is om het loksubstraat te vervangen voordat de rouwmuglarven zich hebben kunnen ontwikkelen tot volwassen vliegen. Deze periode is afhankelijk van de temperatuur, maar bij een gemiddelde temperatuur van 20 °C kan hiervoor het beste 2 weken worden aangehouden. Bij regelmatige toepassing van aaltjes en/of een product op basis van Bti zou het wellicht

mogelijk zijn om het loksubstraat wel voor langere tijd werkzaam te houden. Echter blijft het risico dat er ondanks deze bestrijding toch rouwmuggen kunnen ontwikkelen in het substraat.

Verder kan voor een optimale werking van het loksubstraat het luchtgehalte tussen de 35% en 45% AFS worden gehouden. Voor een loksubstraat op basis van bruine bonen en referentiesubstraat (1:1) komt dit overeen met een vochtgehalte tussen de 60% en 66%, en voor een loksubstraat op basis van zemelen en referentiesubstraat (1:1) komt dit overeen met een vochtgehalte tussen de 64% en 69%.



Figuur 4.1 Voorkeur van *B. difformis* vrouwtjes voor loksubstraat op basis van zemelen welke over verschillende periodes zijn geïncubeerd bij 20 °C, getest in de gedragsopstelling beschreven in Figuur 2.2.



Figuur 4.2 Effect van luchtpercentage van loksubstraat op basis van bruine bonen ten opzichte van het referentiesubstraat gestandaardiseerd op 45% AFS op de aantrekking van *B. difformis* vrouwtjes.

5 Opschaling lokmethode voor rouwmuggen: kooiproef

5.1 Introductie

Na de identificatie van een effectief loksubstraat is als volgende stap een kooiproef in de kas gedaan om meer inzicht te krijgen in de werking van een 'push-pull' systeem voor rouwmuggen. Hierbij is in aan- en afwezigheid van een loksubstraat gekeken hoeveel rouwmuggen zich in het teeltsubstraat kunnen ontwikkelen en is gewerkt met een en minder aantrekkelijk teeltsubstraat. Hierbij is tevens getest of het toevoegen van de schimmelantagonist *Trichoderma viride* het teeltsubstraat minder geschikt kan maken voor de ontwikkeling van rouwmuglarven en de plantenwortels kan beschermen tegen vraatschade. Schimmels vormen de voornaamste voedselbron voor rouwmuglarven. Echter is in een aantal studies op petrischaal-niveau aangetoond dat *Trichoderma (atro)viride* - in tegenstelling tot de veelgebruikte schimmelantagonist *Trichoderma harzianum* - niet geschikt is als voedselbron voor rouwmuglarven (Frouz & Novakova, 2001; Anas en Reeleder, 1988; Kuehne en Heller, 2011). Mogelijk zou kolonisatie van het wortelmilieu door een voor rouwmuglarven als voedselbron ongeschikte schimmelsoort de groei van geschikte schimmelsoorten kunnen remmen en hierdoor de ontwikkeling van de rouwmuglarven belemmeren.

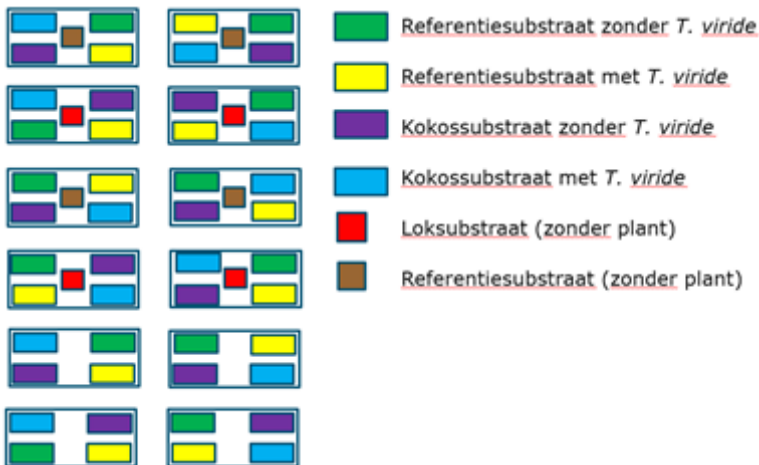
5.2 Materiaal en methoden

Het kooiexperiment is uitgevoerd in een kas bij 20 °C en 70% RV. In kooien van 40x60x40 cm zijn 4 kleine trays aangebracht met per tray 5 violenplantjes (zie Figuur 5.1). Er waren 4 verschillende behandelingen van het teeltsubstraat, nl. a) kokossubstraat met toevoeging van *Trichoderma viride* TD50, b) kokossubstraat zonder *T. viride* TD50, c) referentiesubstraat (o.b.v. veen) met toevoeging van *T. viride* en d) referentiesubstraat zonder *T. viride* TD50. In het midden van de kooi is al naargelang de behandeling een bakje met loksubstraat op basis van zemelen of een bakje met referentiesubstraat geplaatst. Hierdoor ontstonden 8 verschillende behandelingscombinaties van de 'push-pull' methode, welke in een gerandomiseerd split-plot design zijn neergelegd (zie Figuur 5.2). Alle substraten zijn vooraf geautoclaveerd, en alle substraatmengsels zijn op een luchtgehalte van 45% AFS gestandaardiseerd. Voor het referentiesubstraat en kokossubstraat kwam dit overeen met een vochtgehalte van respectievelijk 73% en 77%.

De viooltjes zijn eerst gekiemd in plastic bakjes met glasparels bij 20 °C en 70% RV. Bij het overzetten van de zaailingen in de trays is in de behandeling met *T. viride* bij elk plantje 4 ml van een 10^7 *T. viride* sporenoplossing toegediend. Na het plaatsen van alle trays met zaailingen en lokbakjes in de kooien, zijn in elke kooi 16 *B. difformis* rouwmuggen losgelaten, welke na een periode van 3 dagen zijn verwijderd uit de kooien. Tijdens de proef is het vochtgehalte van het substraat 3x per week aangevuld om te compenseren voor verdamping. Twee weken na de introductie van de rouwmuggen is elke tray met planten overgezet naar een aparte emmer welke aan de bovenkant was afgesloten met een panty. Aan de binnenkant van elke emmer waren aan de ene helft gele vangplaten en was aan de andere helft een doorzichtige plakrand aangebracht (zie Figuur 5.4). Op deze manier konden de uitgekomen volwassen rouwmuggen makkelijk worden geteld. Vier weken na introductie van de rouwmuggen is de eindtelling gedaan. Naast de kooien waar rouwmuggen waren geïntroduceerd, waren er ook kooien met dezelfde teeltsubstraat behandelingen waar geen rouwmuggen waren geïntroduceerd. Van alle plantjes is aan het einde van de proef het drooggewicht van de bovengrondse plantendelen bepaald.



Figuur 5.1 Configuratie van 4 trays met elk 5 violenplantjes en een andere samenstelling van het teeltsubstraat. In het midden van de kooi is een bakje met of loksubstraat op basis van zemelen of referentiesubstraat geplaatst. Per kooi zijn 16 *B. difformis* rouwmuggen voor een periode van 3 dagen losgelaten.



Figuur 5.2 Proefopzet van de kooiproef van een 'push-pull' systeem ter bestrijding van *B. difformis* rouwmuggen. Van elke behandelingscombinatie zijn 4 herhalingen uitgevoerd.



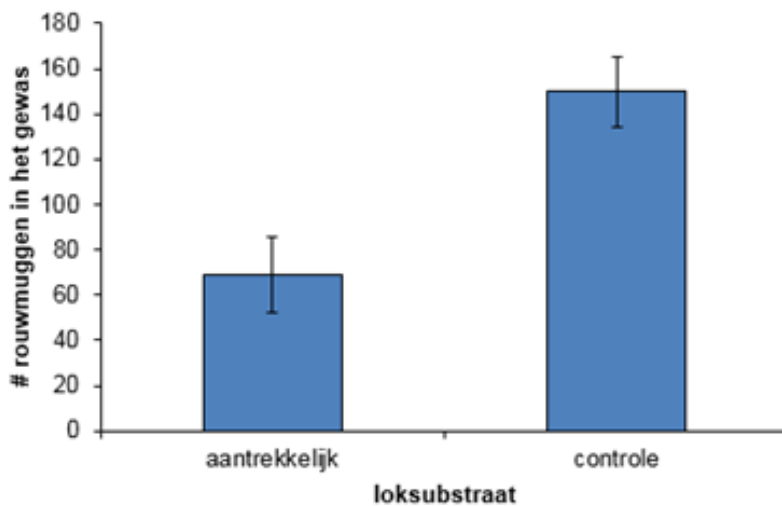
Figuur 5.3 Opstelling van de kooien op de teelttafel. Watergift werd 3x per week met de hand uitgevoerd.



Figuur 5.4 Emmer met aan de bovenkant een panty, en aan de binnenkant aan de ene helft gele vangplaten en aan de andere helft een doorzichtige plakrand waarin van elke tray met 5 violenplantjes individueel het aantal ontwikkelde *B. difformis* rouwmuggen kon worden bepaald.

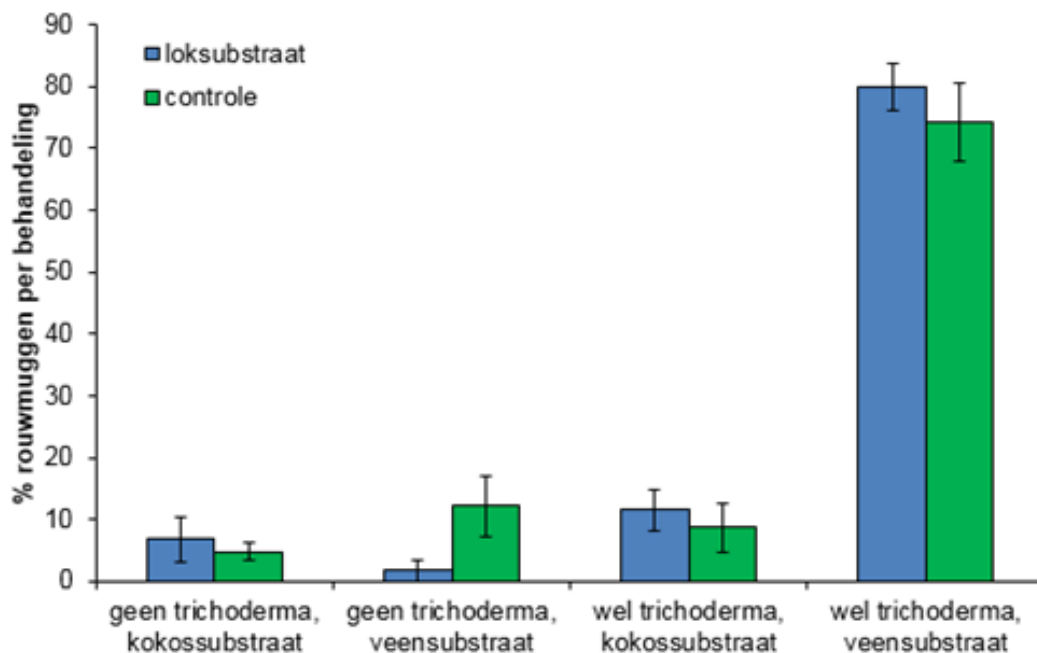
5.3 Resultaten

Ten eerste is het effect van het loksubstraat op basis van zemelen ten opzicht van het referentiesubstraat op het aantal ontwikkelde rouwmuggen in het teeltsubstraat per kooi bepaald. Hiervoor zijn eerst het aantal rouwmuggen dat was uitgekomen voor elke van de 4 trays met 5 planten van de verschillende teeltsubstraat behandelingen bij elkaar opgeteld. In de behandeling met het loksubstraat lag het aantal rouwmuggen dat zich tot adult had ontwikkeld ongeveer 2x zo laag als in de behandeling zonder loksubstraat (met referentiesubstraat als controle) (GLM, $P = 0.0270$; zie Figuur 5.5).



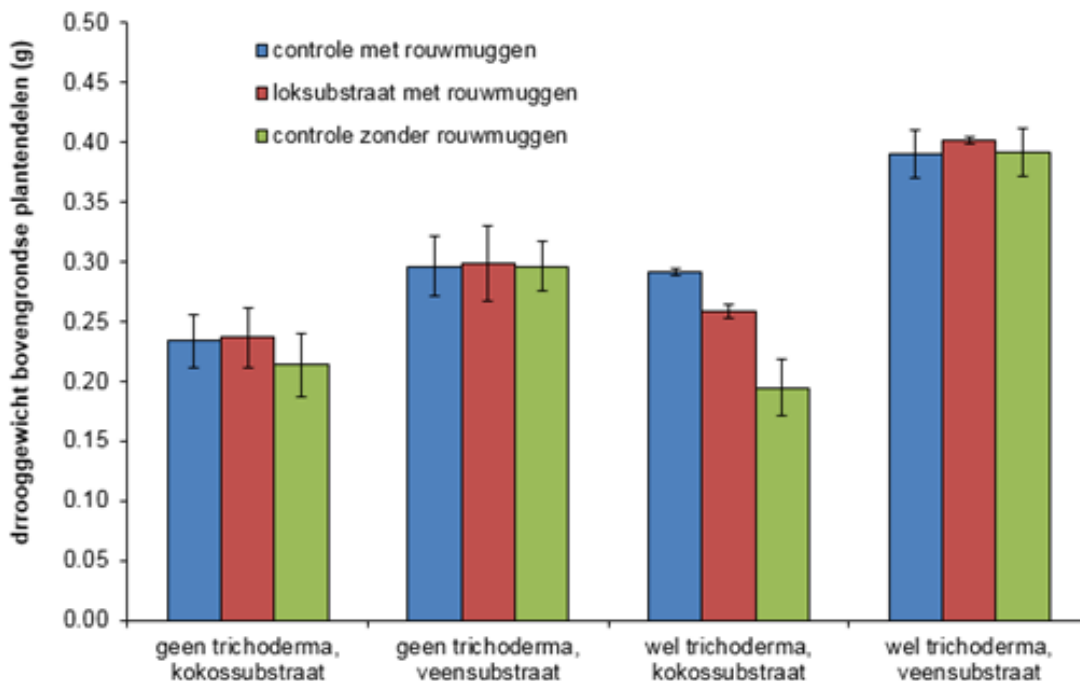
Figuur 5.5 Aantal rouwmuggen dat zich per kooi met loksubstraat op basis van zemelen en per kooi zonder loksubstraat (met referentiesubstraat als controle) had ontwikkeld.

Ten tweede is de verdeling van de rouwmuggen die zich per kooi hadden ontwikkeld over de 4 verschillende behandelingscombinaties van het teeltsubstraat geanalyseerd. Hierbij bleek er geen effect te zijn van de aanwezigheid van het loksubstraat (GLM, $P = 0.988$). Wel was er een significante interactie tussen substraatsoort (kokossubstraat of veensubstraat (= referentiesubstraat) en inoculatie met *T. viride* TD50 (GLM, $P = 0.001$). Er waren ruim 10x meer rouwmuggen in veensubstraat met *T. viride* ontwikkeld dan in veensubstraat zonder *T. viride* ($P < 0.001$), maar het percentage rouwmuggen dat in kokossubstraat was ontwikkeld was niet afhankelijk van inoculatie met *T. viride* ($P = 0.185$) (zie Figuur 5.6). In de afwezigheid van *T. viride* was er geen verschil in het percentage rouwmuggen dat zich had ontwikkeld in het kokossubstraat en het percentage rouwmuggen dat zich had ontwikkeld in het veensubstraat ($P = 0.699$).



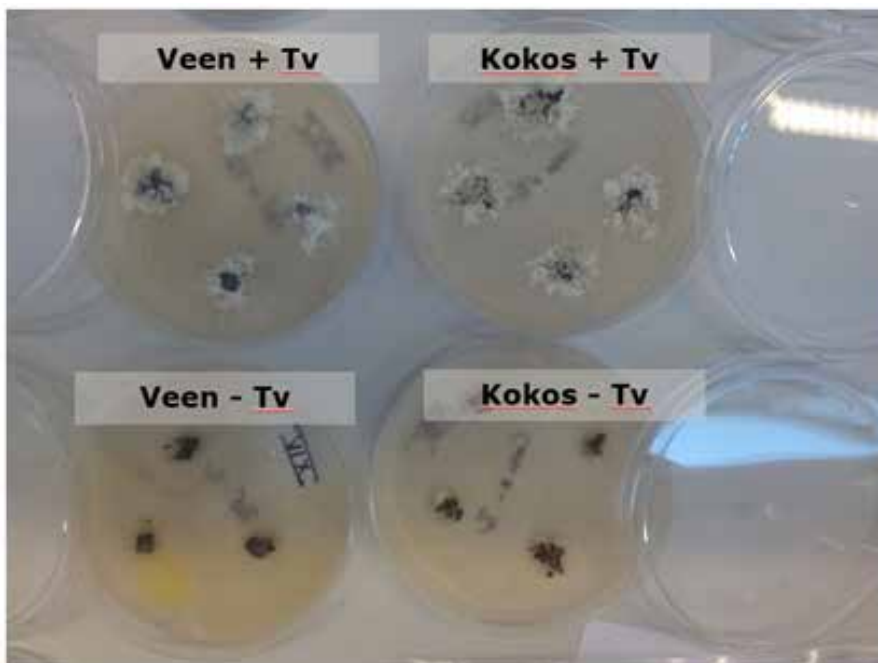
Figuur 5.6 Verdeling van *B. difformis* adulten die zich in elke kooi hadden ontwikkeld over de 4 behandelingscombinaties van het teeltsubstraat.

Er was een significante interactie tussen de factoren Trichoderma en substraattype op het drooggewicht van de bovengrondse plantendelen van viooltjes (GLM, $P = 0.002$). Het drooggewicht van de bovengrondse plantendelen van de viooltjes was significant hoger wanneer de planten groeiden in het veensubstraat waaraan *T. viride* TD50 was toegediend dan wanneer de planten groeiden in het veensubstraat waaraan geen *T. viride* was toegediend (GLM, $P < 0.001$; zie Figuur 5.7). Voor planten die groeiden in kokossubstraat was er geen significant effect van de toediening van *T. viride* op het drooggewicht van de bovengrondse plantendelen (GLM, $P = 0.253$). In zowel de behandeling met *T. viride* als in de behandeling zonder *T. viride* was het drooggewicht van de bovengrondse plantendelen van viooltjes significant hoger wanneer de viooltjes in veensubstraat groeiden dan wanneer de viooltjes in kokossubstraat groeiden (GLM, $P < 0.001$). Het drooggewicht van de bovengrondse plantendelen van viooltjes was niet afhankelijk van de aanwezigheid van rouwmuggen en/of loksubstraat ($P = 0.119$).



Figuur 5.7 Drooggewicht (g) van bovengrondse plantendelen van viooltjes in de verschillende behandelingscombinaties.

Na afloop van de proef zijn monsters genomen van wortelstukjes uit alle 4 de behandelingen van het teeltsubstraat. Op de platen met wortelstukjes van planten die in het veensubstraat of kokossubstraat waaraan *T. viridae* TD50 was toegediend hadden gegroeid, vertoonden wel uitgroei van Trichoderma, terwijl dit niet het geval was voor de wortelstukjes van planten die in het veensubstraat of kokossubstraat hadden gegroeid waar geen *T. viridae* TD50 was toegediend (zie Figuur 5.8).



Figuur 5.8 Test van uitgroei van Trichoderma op wortelstukjes van planten die a) in veensubstraat hadden gegroeid waaraan *T. viride* TD50 was toegediend, b) in kokossubstraat hadden gegroeid waaraan *T. viride* TD50 was toegediend, c) in veensubstraat hadden gegroeid waaraan geen *T. viride* TD50 was toegediend, en d) in kokossubstraat hadden gegroeid waaraan geen *T. viride* TD50 was toegediend.

5.4 Conclusies

De aanwezigheid van een loksubstraat kon het aantal *B. difformis* rouwmuggen dat zich in het teeltsubstraat kon ontwikkelen halveren. Verreweg het grootste deel van de rouwmuggen hadden zich ontwikkeld in het veensubstraat dat was geïnoculeerd met *T. viride* TD50. Het kan uit deze proef niet worden opgemaakt of dit een gevolg is van een hogere aantrekking van veensubstraat geïnoculeerd met *T. viride* en/of een betere ontwikkeling van de rouwmuglarven in veensubstraat geïnoculeerd met *T. viride*. Hoewel de aanwezigheid van *Trichoderma* ook in het kokossubstraat kon worden aangetoond, had *T. viride* geen significant effect op het percentage rouwmuggen dat zich in het kokossubstraat ontwikkelde. Waarom het effect van *T. viride* zo sterk afhankelijk was van het type teeltsubstraat is niet duidelijk. Echter is er alleen een kwalitatieve, en geen kwantitatieve bepaling gedaan van *T. viride* in de twee substraattypen. Het is daarom niet duidelijk of *T. viride* zich sterker heeft ontwikkeld in het veensubstraat dan in het kokossubstraat.

Het resultaat dat het grootste deel van de rouwmuggen zich had ontwikkeld in het veensubstraat met *T. viride* was onverwacht, en niet in lijn met de publicaties van Frouz & Novakova (2001), Anas & Reeleder (1988) en Kühne & Heller (2011). In deze studies werd juist gevonden dat rouwmuglarven zich niet goed konden ontwikkelen op *Trichoderma (atro)viride*. Echter is in geen van deze studies het isolaat van *T. (atro)viride* gespecificeerd. Onlangs is het hele soortencomplex van *Trichoderma viride* gereviseerd (Jaklitsch en Vogelmayr, 2015), waardoor het erg lastig is om het juiste *T. (atro)viride* isolaat te vinden om deze resultaten te reproduceren.

Het was ook opvallend dat de aanwezigheid van rouwmuglarven geen invloed had op de groei van de viooltjes. Echter kwam alleen in de behandeling van veensubstraat met *T. viride* relatief veel rouwmuglarven voor (gemiddeld hadden zich hier in de behandeling met en zonder loksubstraat respectievelijk 11 en 22 rouwmuggen per plantje ontwikkeld). In alle andere behandelingen hadden zich gemiddeld slechts 0.5 tot 4 rouwmuggen per plantje ontwikkeld. Of de violenplantjes relatief resistent waren tegen vraat van rouwmuglarven, en/of dat het groeibevorderende effect van *T. viride* eventuele vraatschade ruimschoots heeft kunnen compenseren is niet duidelijk. Het zou interessant zijn om verder te onderzoeken onder welke omstandigheden toevoeging van *Trichoderma* aan het teeltsubstraat negatief uitpakt voor de beginnende plantengroei door stimulatie van rouwmuggen, en onder welke omstandigheden het positief uitpakt doordat het groei-stimulerende effect doorslaggevend is, zoals in deze proef het geval was.

6 Opschaling lokmethode voor rouwmuggen: praktijkproef

6.1 Introductie

Om te toetsen of loksubstraat op basis van zemelen of bruine bonen ook in de praktijk een aantrekkende werking heeft op rouwmuggen, is een praktijkexperiment opgezet. Hiervoor is eerst een prototype ontwikkeld van een lokbakje voor rouwmuggen, waarin de vochtigheid van het substraat relatief stabiel blijft bij watergift door beregening van bovenaf.

6.2 Materiaal en methoden

Voor de lokbakjes zijn plastic containers gebruikt van 12 cm hoog. De onderste 4 cm van de bakjes zijn gevuld met kleikorrels, de 3 cm daarboven zijn gevuld met standaard referentiesubstraat, en alleen in de bovenste 3 cm is het loksubstraat op basis van bruine bonen aangebracht tot 2 cm onder de rand van het bakje (zie Figuur 6.1 en 6.2). Zowel het loksubstraat als het referentiesubstraat zijn op een luchtgehalte van 45% AFS gebracht. Aan twee zijanten van de bakjes zijn op 1.5 cm van de onderkant kleine (3 mm) gaatjes aangebracht om overtollig water af te voeren.

Om de aantrekking van rouwmuggen tot het loksubstraat te monitoren en de rouwmuggen meteen weg te vangen is een gele vangplaat aangebracht. Er zijn 4 soorten lokbakjes gemaakt, a) lokbakje met referentiesubstraat (controle), b) lokbakje met loksubstraat op basis van bruine bonen, c) lokbakje met referentiesubstraat afgedekt door panty, en d) lokbakje met loksubstraat op basis van bruine bonen afgedekt door panty. De 4 behandelingen zijn in 4 herhalingen neergezet aan weerszijden van een veld met trays met jong plantmateriaal, op een onderlinge afstand van ongeveer 4 m. Vier en 7 dagen na de start (dns) van het experiment zijn de bakjes gewogen om de verandering in het vochtgehalte van de lokbakjes vast te kunnen stellen. Hierbij is de panty van de behandelingen c) en d) niet meegewogen. Een week na de start van het experiment zijn de lokbakjes verzameld en is het aantal rouwmuggen op de vangplaten bepaald. Watergift heeft plaatsgevonden door beregening van bovenaf volgens het standaardschema voor opkweek plantmateriaal.

De 2 behandelingen waarbij het loksubstraat was afgedekt door een panty zijn meegenomen in de proef om te toetsen of het mogelijk is om dergelijke lokbakjes te gebruiken voor het beantwoorden van additionele onderzoeksvragen, waarbij het effect van toevoeging van rouwmuglarven of *D. coriaria* roofkevers aan het loksubstraat op de aantrekkelijkheid van het loksubstraat voor volwassen rouwmugvrouwtjes zou kunnen worden getest. Om dergelijke onderzoeksvragen te testen is het nodig eerst het effect van een panty, welke nodig is om het ontsnappen van rouwmuggen of roofkevers uit de lokbakjes te voorkomen, op de aantrekkelijkheid van het loksubstraat te onderzoeken.



Figuur 6.1 Lokbakje met loksubstraat op basis van bruine bonen, gebruikt in de praktijkproef.

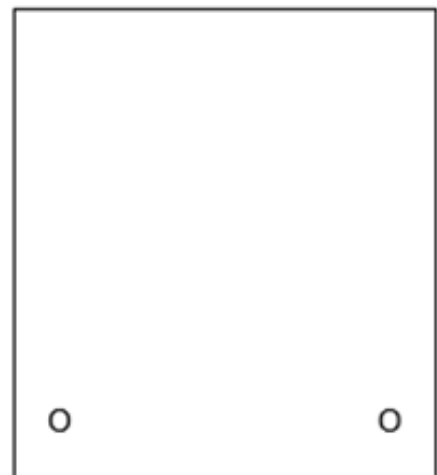
Lokbakje voor rouwmuggen

Zijkant:

2 cm leeg
3 cm bruine bonen mix
3 cm veen, bij geen bruine bonen 6 cm veen
4 cm kleikorrels

bakje is 12 cm hoog.

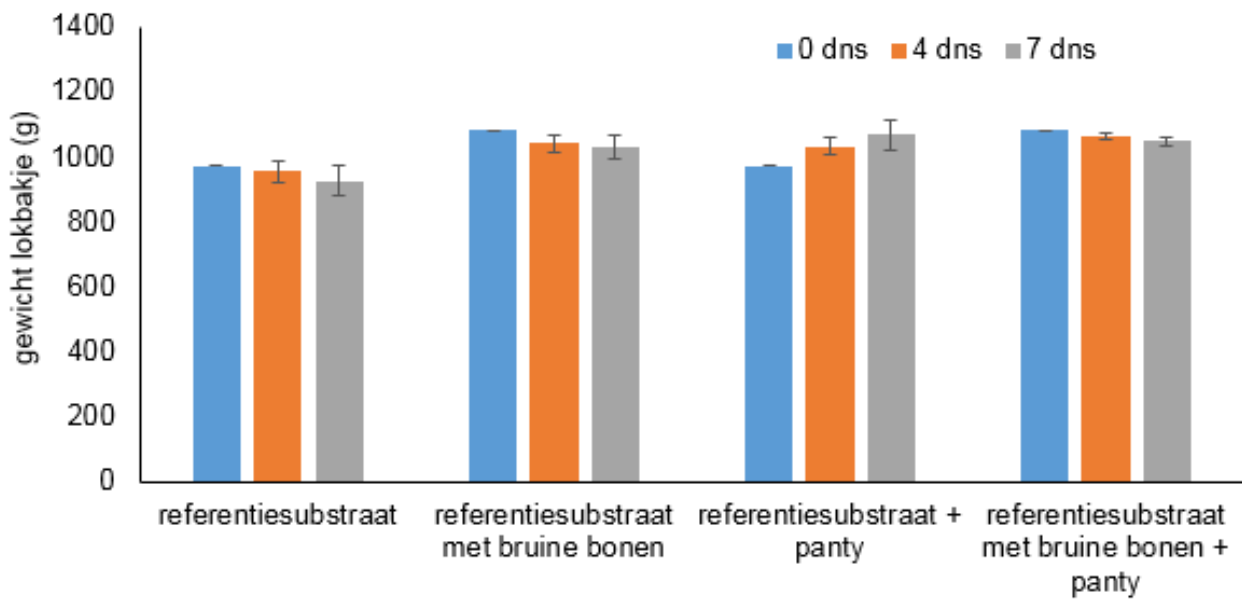
Voor- en achterkant:



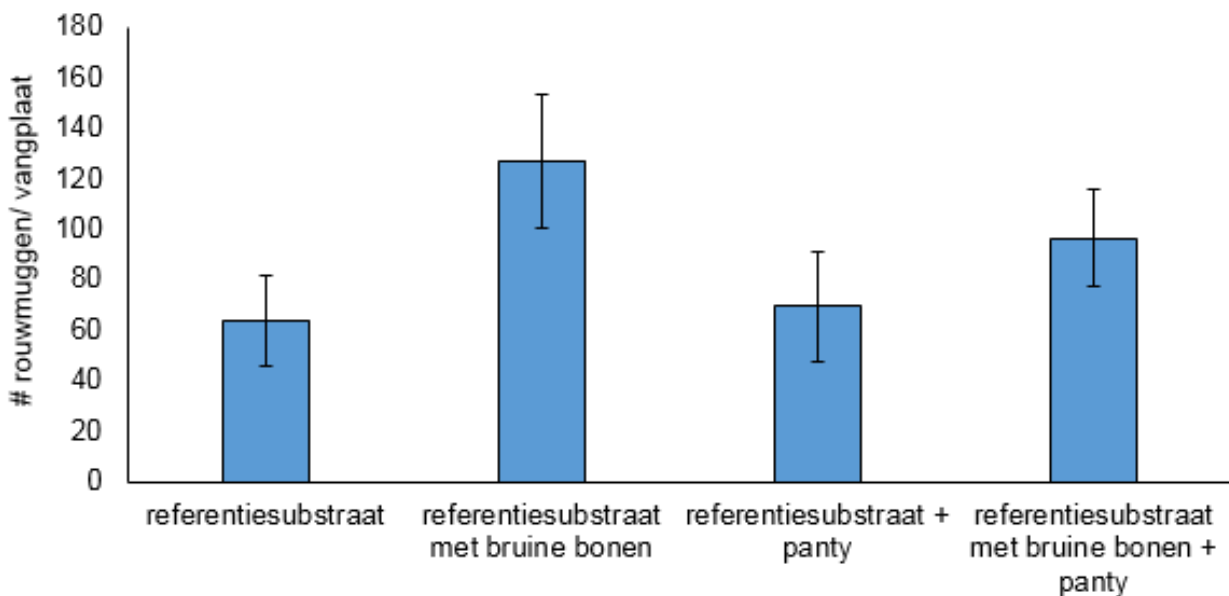
Figuur 6.2 Inhoud van lokbakje met loksubstraat op basis van bruine bonen. Aan de voor- en achterkant zijn 2 gaatjes van 3 mm geboord, 1,5 cm uit elke hoek, om zo overtollig water af te voeren

6.3 Resultaten

De verandering in het gewicht van de lokbakjes was < 5% voor zowel het referentiesubstraat als het referentiesubstraat met bonen. Hieruit kan worden geconcludeerd dat het vochtgehalte van de bakjes zonder verder ingrijpen redelijk goed op peil gehouden kon worden in deze praktijksituatie. Het loksubstraat had een significant effect op het aantal rouwmuggen dat op de vangplaten werd gevangen (GLM, $P = 0.011$). Het aantal rouwmuggen op de vangplaten lag ongeveer twee keer zo hoog voor de lokbakjes met loksubstraat op basis van bruine bonen dan voor de lokbakjes met referentiesubstraat. Wanneer de lokbak was afgesloten met een panty, was dit verschil echter veel kleiner.



Figuur 6.3 Gewicht van de loekbakjes bij 0 dagen na de start (dns), 4 dns en 7 dns van het praktijkexperiment.



Figuur 6.4 Aantal rouwmuggen per vangplaat voor de 4 verschillende behandelingen van de loekbakjes.

6.4 Conclusies

Op een vangplaat die was gecombineerd met het loksubstraat op basis van bruine bonen zijn in de praktijk ongeveer twee keer zoveel rouwmuggen gevangen dan op een vangplaat zonder loksubstraat. Hoewel deze resultaten aangeven dat loksubstraat een effect heeft op de aantrekking van rouwmuggen in de praktijk, kan in een praktijkproef niet worden onderzocht welke impact het wegvangen heeft op de populatie rouwmuggen die in het gewas aanwezig is. Het is daarom op basis van alleen deze gegevens moeilijk vast te stellen welke impact een verdubbeling van het aantal gevangen rouwmuggen heeft op de gehele rouwmug populatie, en hoeveel loksubstraat zou moeten worden ingezet om de populatie-opbouw van rouwmuggen tegen te gaan. Het gebruik van een loksubstraat zal in ieder geval moeten worden gecombineerd met andere maatregelen, zoals de inzet van biologische bestrijders en/of het minder aantrekkelijk en geschikt maken van het teelsubstraat voor respectievelijk eileg en ontwikkeling van rouwmuggen.

7 Ontwikkeling 'attract- en kill' strategie voor oevervliegen (Ephydridae): proeven in klimaatkasten

7.1 Introductie

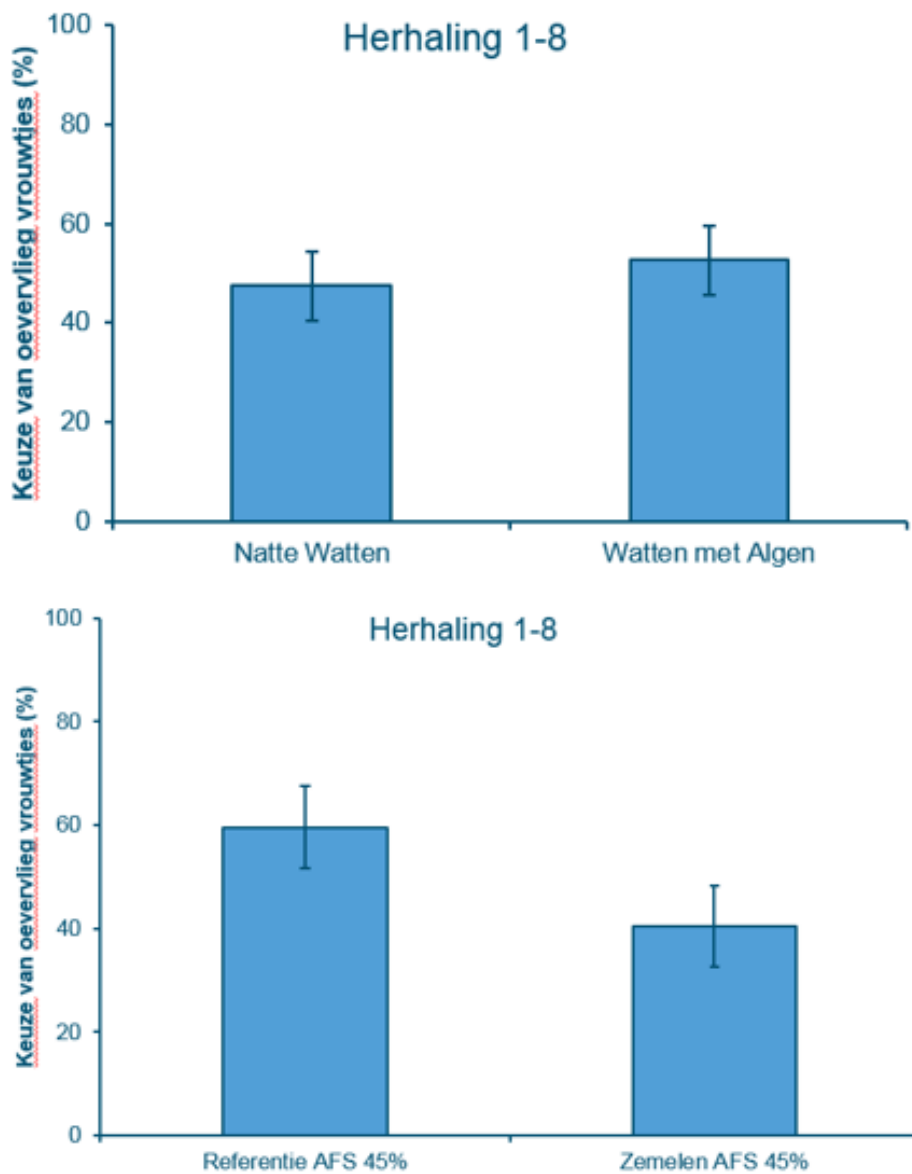
Voor oevervliegen was het tot dusver niet bekend of ze op geuren reageren. Om dit te onderzoeken is dezelfde gedragsofstelling gebruikt als voor de gedragsproeven met rouwmuggen. Eerst is een kweek van *Scatella tenuis* opgezet, waarvoor ook een algenkweek moest worden gestart. In een eerste serie gedragsproeven, beschreven in dit hoofdstuk, is nagegaan of oevervliegen worden aangetrokken tot geuren van algen en/of loksubstraat met zemelen.

7.2 Materiaal en methoden

In de gedragsofstelling beschreven in Hoofdstuk 2 is getest of oevervliegen een voorkeur hebben voor a) watten met algen ten opzichte van watten met alleen water, en b) referentiesubstraat (op basis van veen) ten opzichte van loksubstraat op basis van zemelen. De proeven zijn op dezelfde manier uitgevoerd als staat beschreven voor rouwmuggen in Hoofdstuk 2. Van elke vergelijking zijn 8 herhalingen uitgevoerd.

7.3 Resultaten

Er zijn geen verschillen in aantrekking van oevervliegen gevonden tussen de geur van watten met algensuspensie en watten met alleen water. Ook zijn er geen verschillen in aantrekking van oevervliegen gevonden tussen het loksubstraat op basis van zemelen en het referentiesubstraat (zie Figuur 7.1).



Figuur 7.1 Effect van de geur van algen (boven) of de geur van loksubstraat op basis van zemelen (onder) op de aantrekking van oevervlieg vrouwtjes, getest in de gedragsopstelling beschreven in Figuur 2.2.

7.4 Conclusies

Hoewel algen de voornaamste voedsel bron vormen voor oevervliegen, had de geur van algen geen aantrekkende werking op *S. tenuis* vrouwtjes. Ook de geur van het loksubstraat op basis van zemelen, waarvan de geur zeer aantrekkelijk was voor rouwmugvrouwtjes, bleek niet aantrekkelijk te zijn voor oevervlieg vrouwtjes. Het lijkt daarom niet zinvol om een loksubstraat voor oevervliegen op basis van geur te ontwikkelen.

8 Ontwikkeling 'attract- en kill' strategie voor oevervliegen (*Scatella* spp.): proeven in klimaatkasten

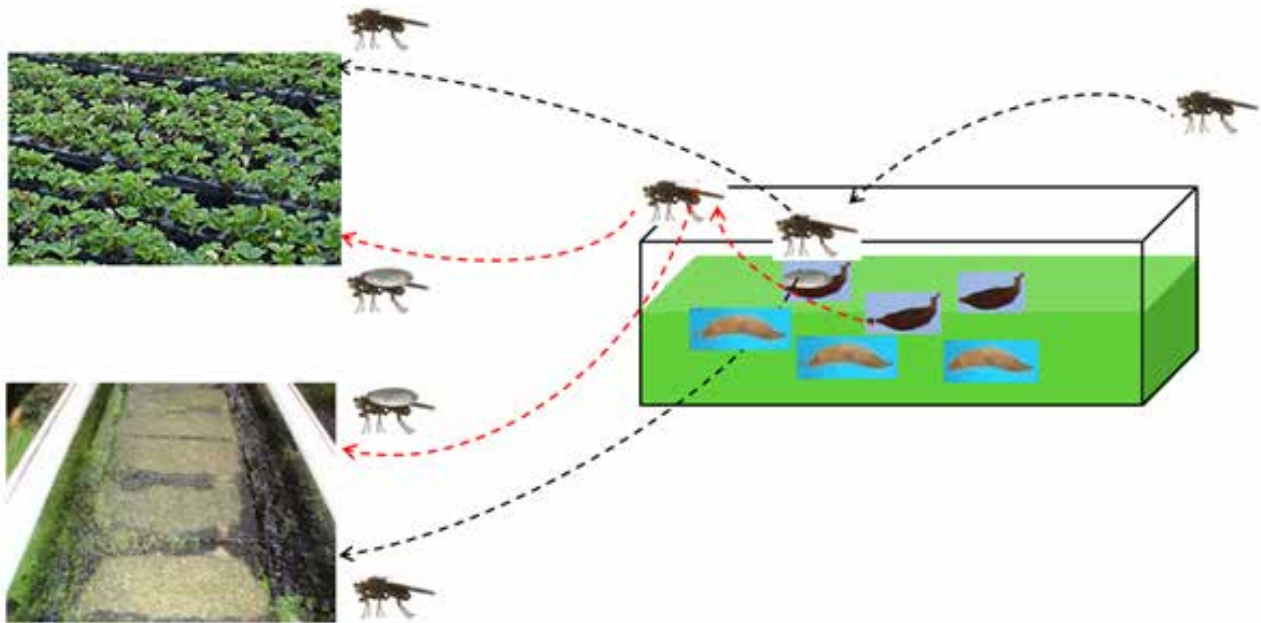
8.1 Introductie

In een proefkas bij WUR glastuinbouw is bij toeval een spontane besmetting van *S. tenuis* met een entomopathogene schimmel ontdekt (zie Figuur 8.1). Het bleek hier te gaan om een *Beauveria bassiana* isolaat, welke verschilde van bestaande commerciële *B. bassiana* isolaten. Eerst is de effectiviteit van dit isolaat vergeleken met 4 andere commerciële entomopathogene schimmels. De twee meest effectieve soorten entomopathogene schimmels, waaronder het *B. bassiana* 'WUR isolaat' zijn gebruikt voor het ontwikkelen van een 'attract & kill' strategie. Het idee hierachter is dat niet alleen de vliegen die zich in deze zogenaamde 'attract- en kill-bakken' ontwikkelen doodgaan aan een infectie met de schimmel, maar dat de schimmel ook uitgroeit op dode vliegenlarven-, poppen- en/of adulten en de schimmelsporen verder door vliegen kunnen worden verspreid naar algenplekken elders in de kas waar de schimmel niet actief is toegediend (zie Figuur 8.2). Op deze manier zou niet de hele kas met de entomopathogene schimmel hoeven te worden behandeld. Een voor dit systeem geschikte entomopathogene schimmel moet niet alleen een goede doding geven van de larven, poppen en/of adulten van oevervliegen die direct zijn blootgesteld aan de schimmelsporen, maar moet ook een goede schimmelgroei uit de vliegen vertonen. Alleen op deze manier kan de schimmelbesmetting verder worden gecontinueerd en verspreid in de kas.

In een tweede proef is naast het effect van de twee meest effectieve entomopathogene schimmels op de overleving van larve tot volwassen oevervlieg, ook het effect van de entomopathogene schimmels op de tweede generatie oevervliegen bepaald.



Figuur 8.1 Nieuwe *Beauveria bassiana* stam in oevervliegen.



Figuur 8.2 Attract- en kill systeem voor de bestrijding van oevervliegen in de glastuinbouw. Hierbij worden bakken met algen in de kas geplaatst waar entomopathogene schimmels aan worden toegediend. Vervolgens worden de vliegen die in deze bakken ontwikkelen ziek, en gaat de schimmel zich in deze vliegen vermeerderen. De schimmelsporen kunnen vervolgens worden overgebracht naar plekken in de kas waar algen groeien zodat ook hier de vliegen kunnen worden bestreden.

8.2 Materiaal en methoden

In een eerste experiment zijn 5 entomopathogene schimmels vergeleken met een controlebehandeling met betrekking tot hun effectiviteit tegen oevervliegen.

Behandelingen:

- a. Controle (geen entomopathogene schimmel)
- b. *Beauveria bassiana* GHA (Botanigard, Certis)
- c. *Beauveria bassiana* ATCC 74040 (Naturalis, Belchim)
- d. *Metarhizium brunneum* F52 (Bio1020, Bayer)
- e. *Lecanicilium muscarium* (Mycotal, Koppert)
- f. *Beauveria bassiana* (WUR isolaat uit oevervliegen)

De entomopathogene schimmels zijn voor gebruik eerst op Petri schalen gekweekt, waarvan de sporen zijn gebruikt voor toepassing in de proef. Op deze manier kon een beter beeld worden verkregen van de werking van de entomopathogene schimmels zelf, zonder de toevoegingen van de productformulering. Alleen van *B. bassiana* GHA hadden we bij de start van de proef geen goede kweek in Petri schalen, waardoor we deze schimmel in de Botanigard productvorm hebben gebruikt. Van elke behandeling met entomopathogene schimmels zijn 7 herhalingen uitgevoerd, en voor de controlebehandeling zijn 14 herhalingen uitgevoerd.

De proef is uitgevoerd in een klimaatkast bij 20 °C en 70% RV. Voor de proef zijn bakjes met watten geïnoculeerd met een algensuspensie. Toen de algen voldoende waren ontwikkeld, hebben oevervliegenvrouwtjes gedurende 24 uur eitjes in de bakjes gelegd. Vervolgens is het aantal eitjes per bakje geteld. Zeven en 10 dagen na eileg door de oevervliegen is in elk bakje 1 ml van een sporenoplossing van 10^9 sporen toegediend. De larven verkeerden tot respectievelijk in het larvenstadium en in het popstadium. Aan het einde van de proef is het aantal levende en dode volwassen oevervliegen, poppen en larven geteld. Verder is vastgesteld of er schimmel uit de larven, poppen en/of volwassen vliegen groeide.

In een tweede experiment hebben we naast het effect van entomopathogene schimmels op de overleving van larve tot volwassen oevervlieg, ook het effect van de entomopathogene schimmels op de tweede generatie oevervliegen bepaald. Verder hebben we gekeken of de overleving van larve tot adult van de tweede generatie oevervliegen afhankelijk was het type algenbakje waarin ze waren ontwikkeld, nl. een 'oud' algenbakje waar de eerste generatie oevervliegen zich in had ontwikkeld, en waar ook eenmalig entomopathogene schimmels waren toegediend toen de eerste generatie oevervliegen zich in het larvenstadium bevond, of een 'nieuw' algenbakje waar geen entomopathogene schimmels waren toegediend.

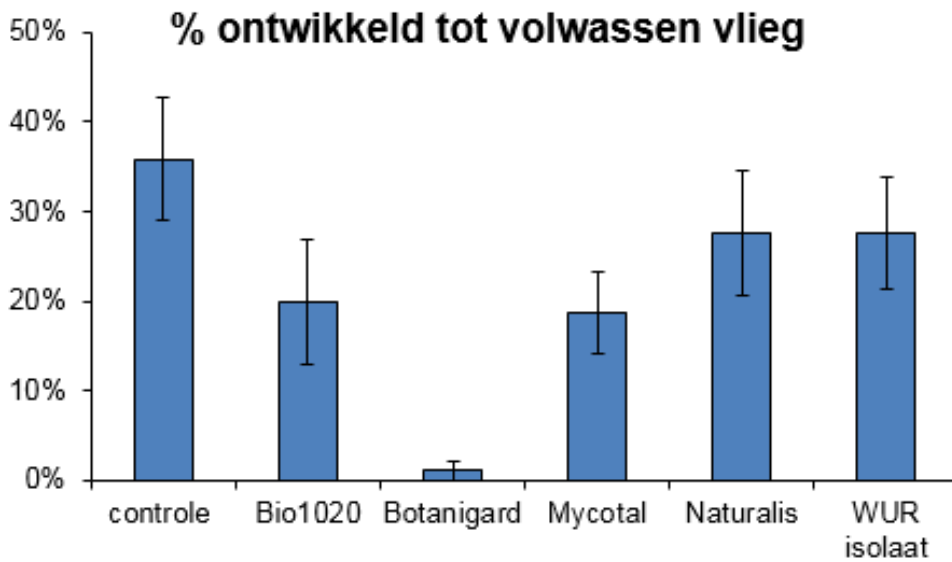
De volgende 4 behandelingen zijn getest:

- a. Controle (geen entomopathogene schimmel)
- b. *B. bassiana* GHA als Botanigard product
- c. *B. bassiana* GHA vanuit eigen kweek
- d. *B. bassiana* WUR isolaat vanuit eigen kweek

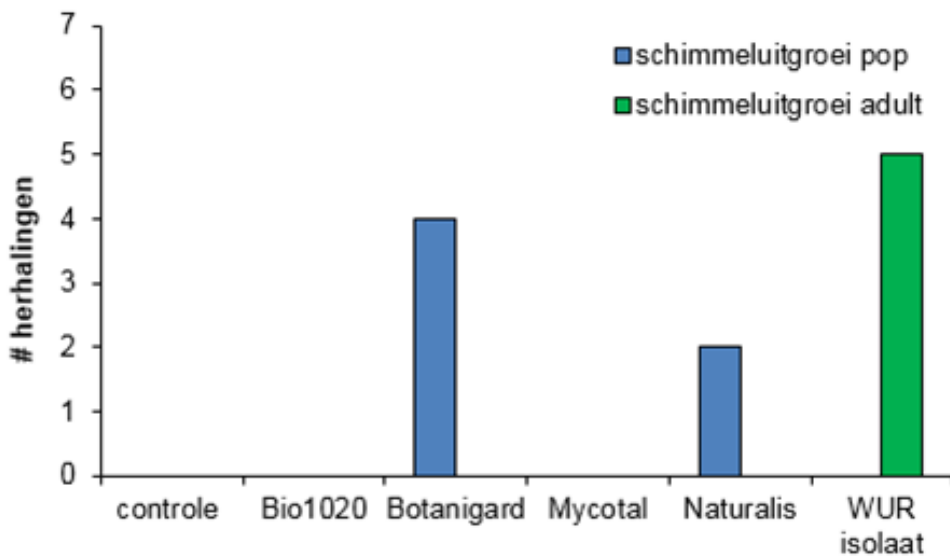
Voor deze proef zijn van elke behandeling 7 herhalingen uitgevoerd. De proef is uitgevoerd in een klimaatkast bij 22 °C en 70% RV. Voor de proef zijn bakjes met watten geïnoculeerd met een algensuspensie. Toen de algen voldoende waren ontwikkeld, zijn er per bakje 20 larven van 2-3 dagen oud overgezet, en voor behandelingen b, c, en d, 1 ml van een sporenoplossing van 10⁹ sporen toegediend. Een week na het overzetten van de larven en de toediening van de entomopathogene schimmels is er naast elk algenbakje een nieuwe algenbakjes geplaatst in een grotere geventileerde plastic container. De uitgekomen oevervliegen uit elk bakje konden op deze manier zowel in het 'oude' bakje waar ze uit waren gekomen eitjes leggen, als in het 'nieuwe' bakje met verse algen. Er zijn niet opnieuw entomopathogene schimmels toegepast. Wel zijn 10 dagen na de toepassing van entomopathogene schimmels in elke plastic container met twee algenbakjes 5 gezonde volwassen mannetjes oevervliegen toegevoegd, om de overdracht van schimmelsporen van een eventuele natuurlijke schimmeluitgroei op poppen of volwassen vliegen naar de nieuwe algenbakjes te bevorderen. Drie dagen na de introductie van de mannetjes oevervliegen zijn de individuele algenbakjes afgesloten, zodat voor elk bakje afzonderlijk het aantal uitgekomen vliegen kon worden bepaald. Nadat de volwassen oevervliegen van de tweede generatie waren uitgekomen is de proef beëindigd, en zijn het aantal poppen en volwassen vliegen in elk algenbakje bepaald. Tevens is het aantal poppen en vliegen met schimmeluitgroei in elk algenbakje vastgesteld.

8.3 Resultaten

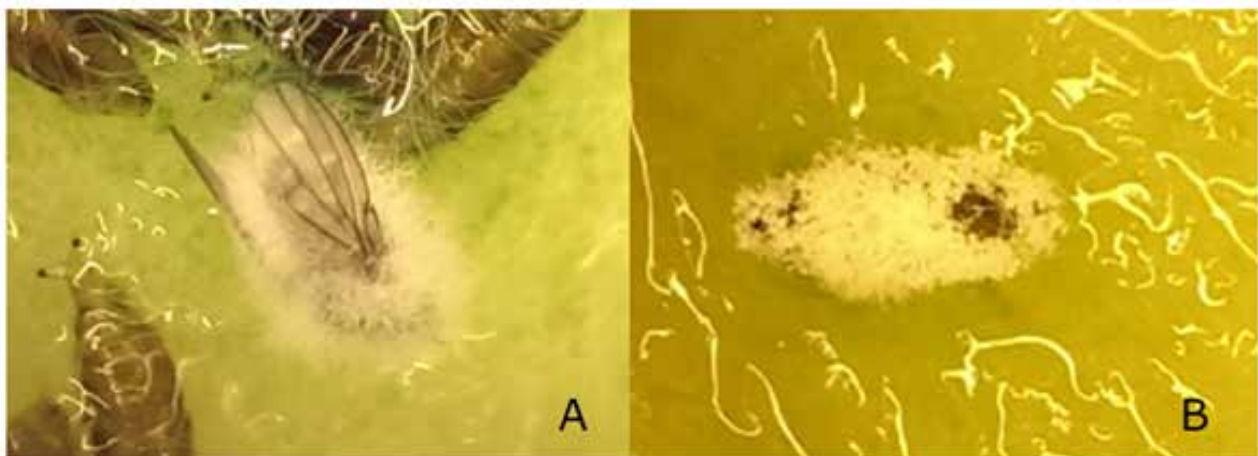
In de eerste proef gaf van alle 5 geteste entomopathogene schimmels alleen de *B. bassiana* GHA schimmel (Botanigard) in productvorm een significant reductie van het percentage oevervliegen dat zich tot adult kon ontwikkelen (zie Figuur 8.3). Bij zowel de *B. bassiana* GHA (Botanigard) in productvorm als *B. bassiana* ATCC 74040 (Naturalis) heeft schimmelgroei uit oevervliegpoppen plaatsgevonden (in respectievelijk 4 en 2 van de 7 herhalingen) (zie Figuur 8.4 en 8.5B). Verder heeft bij het *B. bassiana* WUR isolaat in 5 van de 7 herhalingen schimmelgroei uit volwassen oevervliegen plaatsgevonden (zie Figuur 8.4 en 8.5A).



Figuur 8.3 Effect van verschillende soorten entomopathogene schimmels op de overleving van *S. tenax* larve tot volwassen oevervlieg.

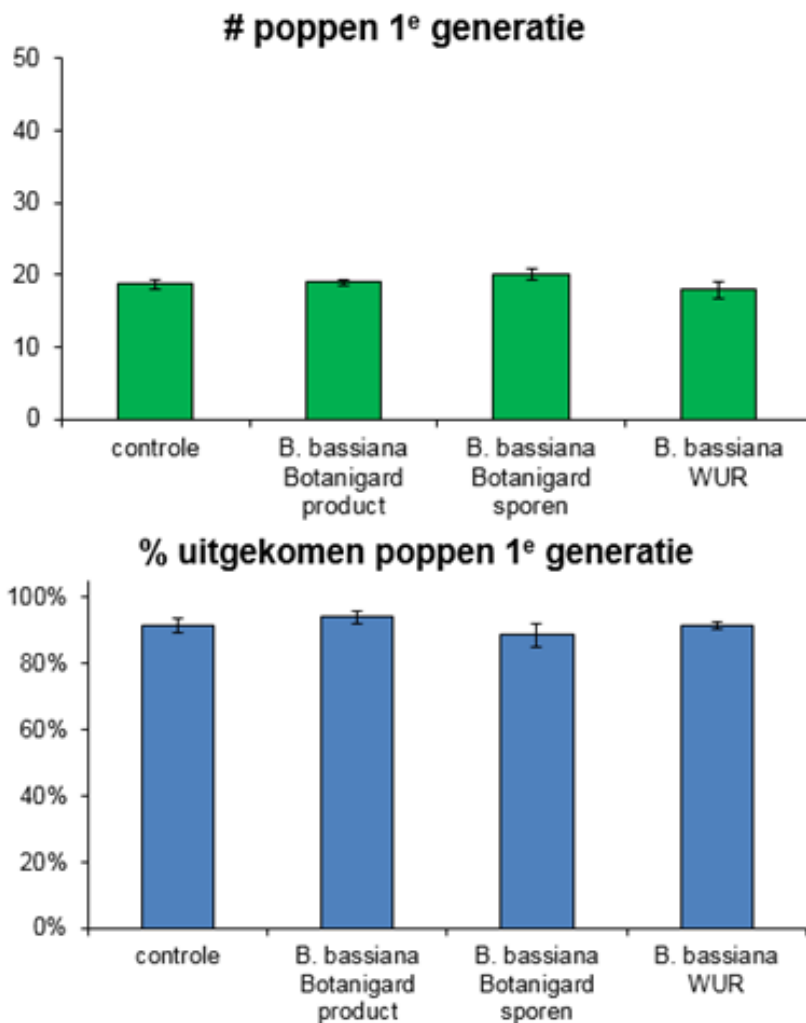


Figuur 8.4 Aantal herhalingen van de verschillende behandelingen waarbij schimmelgroei uit de *S. tenax* pop of adult heeft plaatsgevonden.

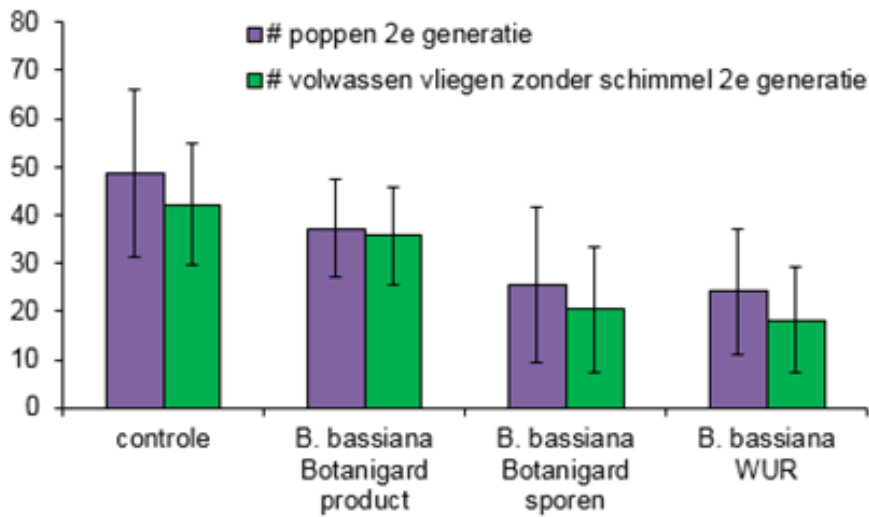


Figuur 8.5 Volwassen *S. tenax* oevervlieg met uitgroei *B. bassiana* WUR isolaat (A), en oevervlieg pop met uitgroei schimmel uit *B. bassiana* Botanigard product (B).

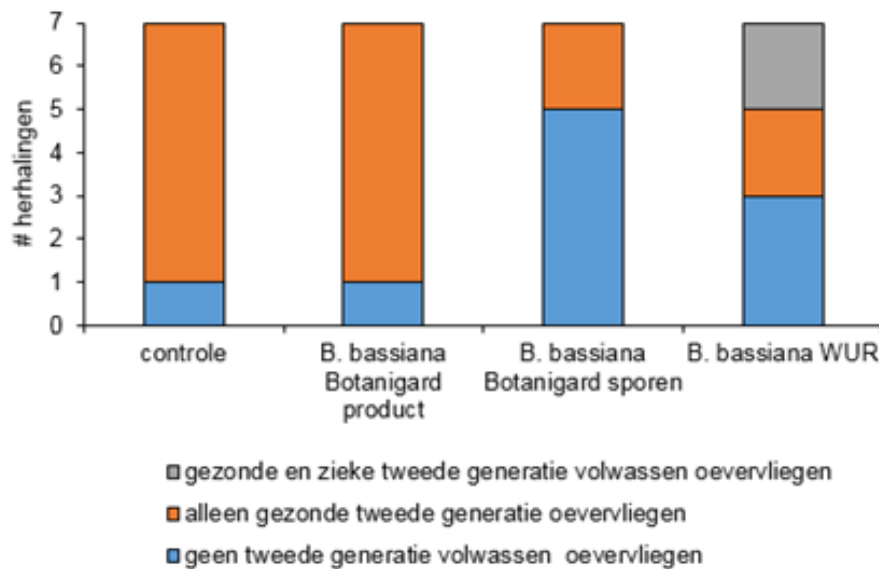
In de tweede proef hadden de entomopathogene schimmels, welke eenmalig in het larvale stadium van de oevervliegen waren toegediend, geen effect op de ontwikkeling van larve tot volwassen oevervlieg van de eerste generatie oevervliegen (zie Figuur 8.6). Wel was het aantal tweede generatie volwassen vliegen dat zich had ontwikkeld twee keer zo laag in de behandelingen met *B. bassiana* Botanigard en *B. bassiana* WUR isolaat sporenoplossingen uit eigen kweek dan in de controlebehandeling (zie Figuur 8.7). Echter was de variatie tussen de herhalingen zo groot dat dit effect niet statistisch significant was. In respectievelijk 5 en 3 van de in totaal 7 herhalingen van de behandelingen met *B. bassiana* Botanigard en *B. bassiana* WUR isolaat sporenoplossingen uit eigen kweek hadden de oevervliegen zich helemaal niet meer voortgeplant (zie Figuur 8.8). In 2 van de 4 herhalingen van de behandeling met en *B. bassiana* WUR isolaat was ook schimmeluitgroei uit de volwassen vliegen opgetreden. Hierbij groeide in de 'nieuwe' algenbakjes (waaraan nooit schimmelsporen waren toegediend) van één herhaling uit 100% van de volwassen oevervliegen het *B. bassiana* WUR isolaat, en groeide van een tweede herhaling uit 30% van de volwassen oevervliegen het *B. bassiana* WUR isolaat. De overleving van oevervlieg pop tot adult was onafhankelijk van de behandeling, en van het soort algenbakje ('oud' of 'nieuw') waar de oevervlieg zich in had ontwikkeld (zie Figuur 8.9).



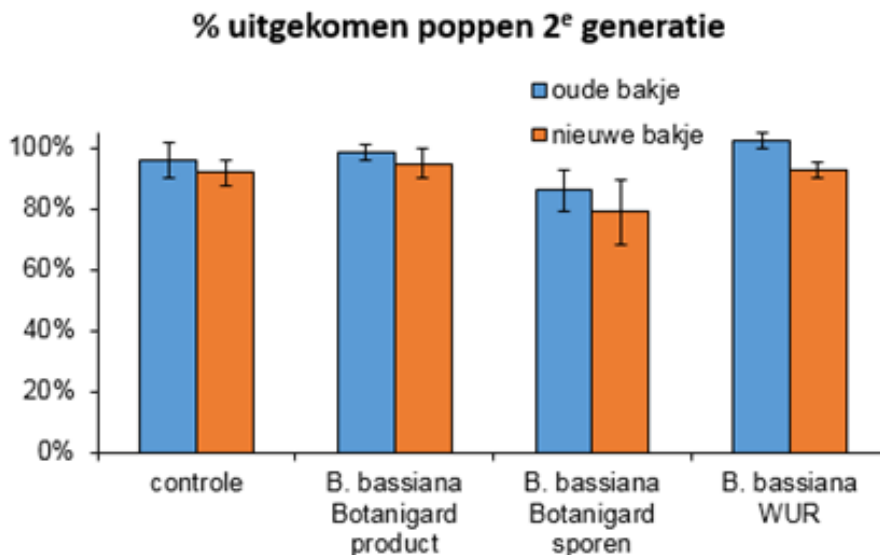
Figuur 8.6 Het aantal (van de 20 geïntroduceerde) eerste generatie oevervlieg larven dat zich heeft ontwikkeld tot pop (boven) en het percentage eerste generatie oevervlieg poppen waaruit een volwassen oevervlieg is gekomen (onder) voor alle 4 behandelingen.



Figuur 8.7 Het totaal aantal poppen en volwassen vliegen zonder schimmelduitgroei van de tweede generatie oevervliegen voor alle 4 behandelingen.



Figuur 8.8 Het aantal herhalingen waar geen tweede generatie volwassen oevervliegen is ontwikkeld (blauwe balken), alleen gezonde tweede generatie oevervliegen zijn ontwikkeld (oranje balken), en naast gezonde oevervliegen ook oevervliegen zijn ontwikkeld met schimmelduitgroei (grijze balk) voor alle 4 behandelingen.



Figuur 8.9 Het percentage tweede generatie oevervlieg poppen waaruit een volwassen oevervlieg is gekomen, voor de poppen die zijn ontwikkeld in de 'oude' algenbakjes en de 'nieuwe' algenbakjes voor alle 4 behandelingen.

8.4 Conclusies en discussie

In de eerste proef kon alleen Botanigard in productvorm voor een significante reductie in het aantal rouwmuggen dat zich van larve tot adult kon ontwikkelen zorgen. Ook konden bij Botanigard in productvorm, net als in mindere mate bij Naturalis, in een deel van de herhalingen poppen met schimmeluitgroei worden gevonden. Schimmelgroei uit oevervliegen was echter het meest duidelijk voor het WUR isolaat, welke niet uit de poppen maar uit de volwassen vliegen groeide. Omdat het effect van het WUR isolaat pas in het volwassen stadium tot expressie kwam, was het logisch dat er voor dit isolaat geen reductie in het aantal larven dat zich tot adult had ontwikkeld kon worden waargenomen. Wanneer zieke vliegen zich niet voortplanten, zou een effect zich pas in een tweede generatie oevervliegen manifesteren. Een sterke schimmelgroei uit oevervliegen is zeer wenselijk vanuit het oogpunt van de continuering en verspreiding van besmetting in de kas, en dit maakt het WUR isolaat een goede kandidaat voor de ontwikkeling van een 'attract- en kill' methode zoals beschreven in de introductie van dit hoofdstuk.

Opvallend was dat in de tweede proef voor geen van de Botanigard behandelingen een effect kon worden waargenomen op de ontwikkeling van de eerste generatie larven tot volwassen oevervliegen. In de eerste proef werden de entomopathogene schimmels zowel in het larvenstadium als in het popstadium toegediend, terwijl in de tweede proef de entomopathogene schimmels alleen in het larvenstadium werden toegediend. Ook is de tweede proef op 22 °C uitgevoerd in plaats van 20 °C. Entomopathogene schimmels infecteren insecten m.b.v. sporen die door de insectenhuid groeien. Oevervlieg larven vervellen heel snel, zeker bij hogere temperaturen. Bij 22 °C duurde het larvenstadium ongeveer 4 dagen, waarbinnen de larven maar liefst 3 keer vervellen. Het popstadium duurt echter ook 4 dagen, zonder tussentijdse vervelling. Mogelijk kunnen de entomopathogene schimmels bij een snelle vervelling moeilijker het lichaam van de oevervliegen binnendringen, en is het popstadium hierdoor ook gevoeliger voor binnendringing van de schimmels. Wel was het aantal tweede generatie volwassen vliegen dat zich had ontwikkeld twee keer zo laag in de behandelingen met *B. bassiana* Botanigard en *B. bassiana* WUR isolaat sporenoplossingen uit eigen kweek dan in de controlebehandeling, hoewel dit effect niet significant was door de grote variatie tussen de herhalingen van elke behandeling. Voor het WUR isolaat werd in de helft van de 4 herhalingen waar nog tweede generatie volwassen vliegen zijn ontwikkeld relatief veel schimmeluitgroei waargenomen. Deze schimmeluitgroei is waargenomen in de 'nieuwe' algenbakjes waar geen entomopathogene schimmels waren toegediend. Dit duidt erop dat het effect van het WUR isolaat kan worden gecontinueerd en verspreid. In proeven in grotere kooien en over meerdere generaties zal duidelijk moeten worden hoe de populatie oevervliegen zich over meerdere generaties ontwikkelt in de aanwezigheid van lokbakken met *B. bassiana* Botanigard en WUR isolaat schimmels, en of besmetting optreedt van oevervliegen die zich ontwikkelen in algenbakjes waar geen entomopathogene schimmels zijn toegediend.

9 Ontwikkeling 'attract- en kill' strategie voor oevervliegen (*Scatella* spp.): kasproef in kooien

9.1 Introductie

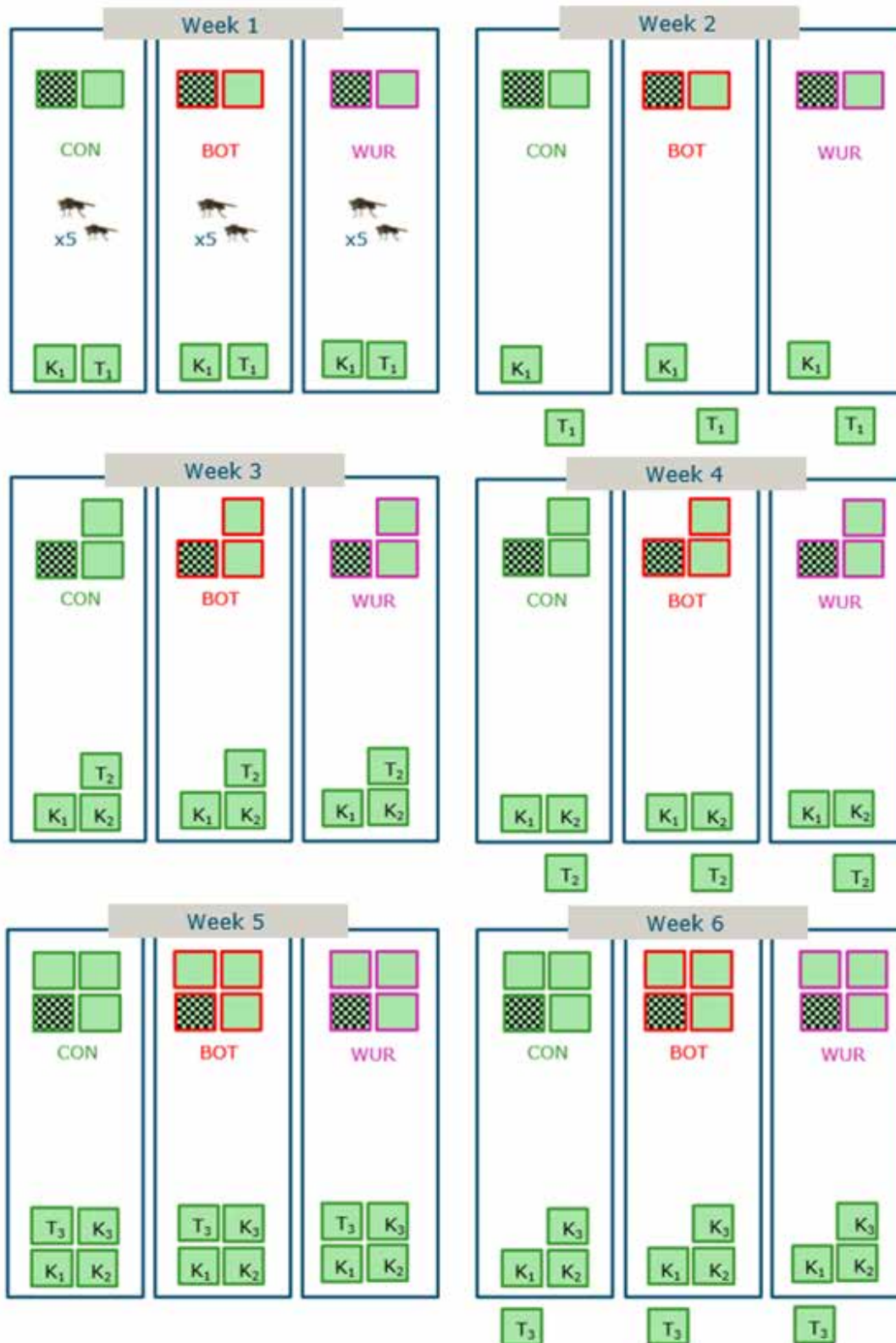
In een kooiproef is over een periode van 7 weken onderzocht wat het effect is van de aanwezigheid van 'attract- en kill' algenbakjes met entomopathogene schimmels op de ontwikkelings van de oevervliegpopulatie.

9.2 Materiaal en methoden

De proef is uitgevoerd in langwerpige kooien in een kas van 22 °C en 70% RV. Er zijn 3 behandelingen in 5 herhalingen uitgevoerd:

- a. controlebehandeling
- b. *B. bassiana* GHA vanuit eigen kweek (Botanigard)
- c. *B. bassiana* WUR isolaat vanuit eigen kweek

In de kooien is een situatie in de kas gesimuleerd. Bij de start van de proef is in elke kooi een lokbakje met 20 oevervlieglarven geplaatst dat voor behandeling b en c meteen is behandeld met 1 ml 10^9 sporenoplossing van de entomopathogene schimmels. Tevens zijn er bij de start van de proef 5 paartjes volwassen oevervliegen per kooi geïntroduceerd, welke model staan voor een populatie gezonde vliegen in de kas. Vervolgens is er elke 2 weken een lokbakje met verse algen in de kooi geplaatst, waaraan wekelijks 1 ml 10^9 sporenoplossing van de entomopathogene schimmels is toegediend. Naast de lokbakjes zijn ook elke 2 weken verse algenbakjes in de kooi geplaatst waaraan geen entomopathogene schimmels zijn toegediend. Deze bakjes stonden model voor onbehandelde algenplekken in de kas. Verder is er elke 2 weken een zogenaamd testbakje met algen in de kooi geplaatst, welke na een week weer uit de kooi is verwijderd en verder is uitgekweekt in de klimaatkast bij 22 °C en 70% RV. Van deze testbakjes is steeds 3 weken na de introductie van de bakjes in de kooien het aantal gezonde en zieke oevervlieg larven, poppen en adulten bepaald. Aan het einde van de proef (na 7 weken) is het totaal aantal levende en dode vliegen in elke kooi geteld. In Figuur 9.1 is schematisch weergegeven welke bakjes er in de kooien stonden. In Figuur 9.2 staan foto's van de kooien in de kas, en foto's van de algenbakjes in de klimaatkast.



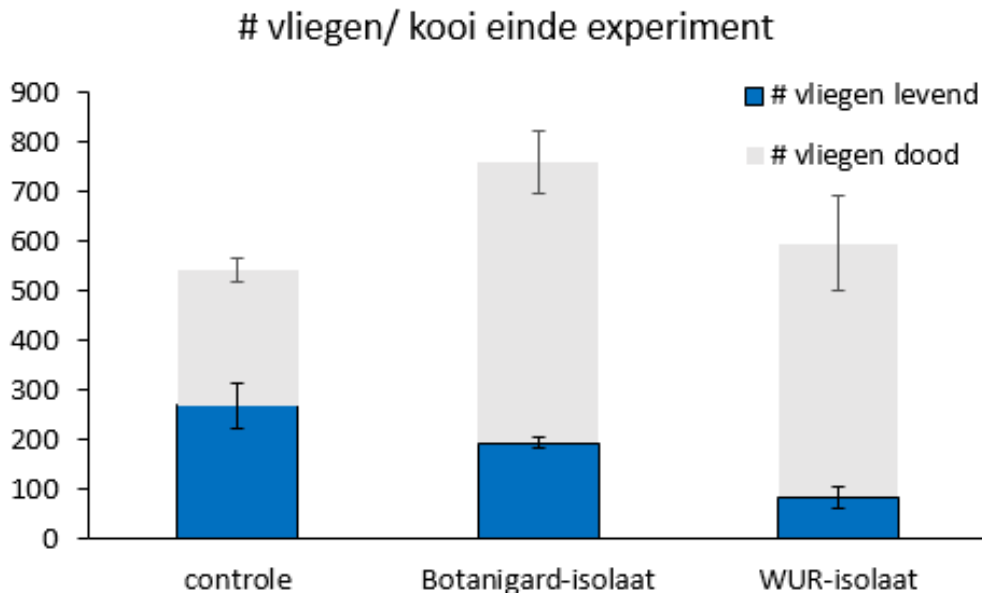
Figuur 9.1 Schematische weergave van de aantallen en soorten algenbakjes in de kooien van elk van de 3 behandelingen. CON = controlebehandeling, BOT = *B. bassiana* GHA (Botanigard) en WUR = *B. bassiana* WUR isolaat. De rood-omlijnde vierkanten zijn algenbakjes waaraan de Botanigard sporenoplossingen zijn toegediend, de roze-omlijnde vierkanten zijn algenbakjes waaraan de WUR isolaat sporenoplossingen zijn toegediend en in de groen-omlijnde vierkanten zijn geen sporenoplossingen van entomopathogene schimmels toegediend. Vierkanten met de letter T, zijn de testbakjes, welke eens per 2 weken zijn geïntroduceerd in elke kooi, en na een week weer zijn verwijderd en overgeplaatst naar een klimaatkast voor het uitkweken van de oevervliegen. Vierkanten met de letter K zijn kasbakjes, welke eens per 2 weken zijn geïntroduceerd en welke model staan voor onbehandelde algenplekken in de kas.



Figuur 9.2 Langwerpige kooien in de kas (A) en algenbakjes in de klimaatkast (B, C) voor het experiment naar de 'attract- en kill' methode voor oevervliegen.

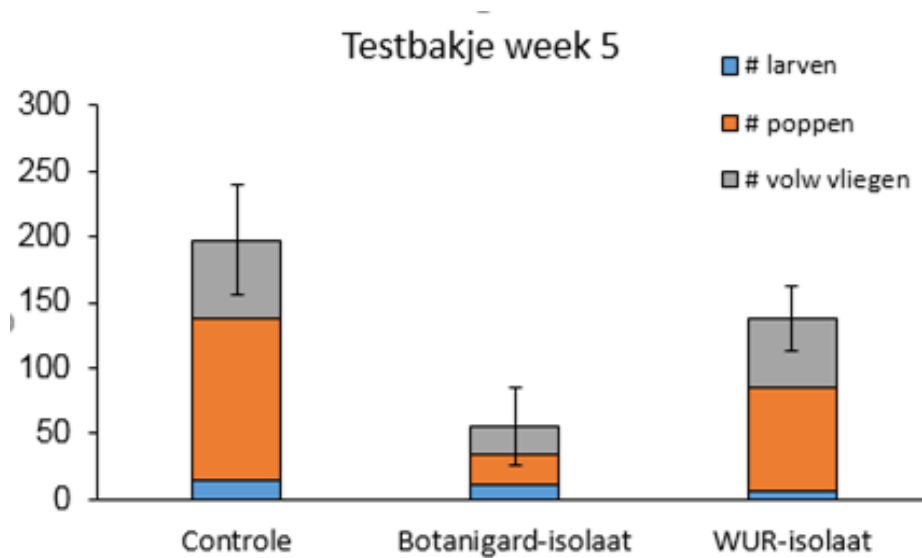
9.3 Resultaten

Het aantal levende vliegen dat bij de eindevaluatie na 7 weken in elke kooi kon worden geteld, lag significant lager in de behandeling met het *B. bassiana* WUR isolaat dan in de controlebehandeling (GLM, $P < 0.001$) en de behandeling met *B. bassiana* Botanigard (GLM, $P = 0.003$). Het totale aantal vliegen per kooi verschilde echter niet tussen de behandelingen (GLM, $P = 0.129$).

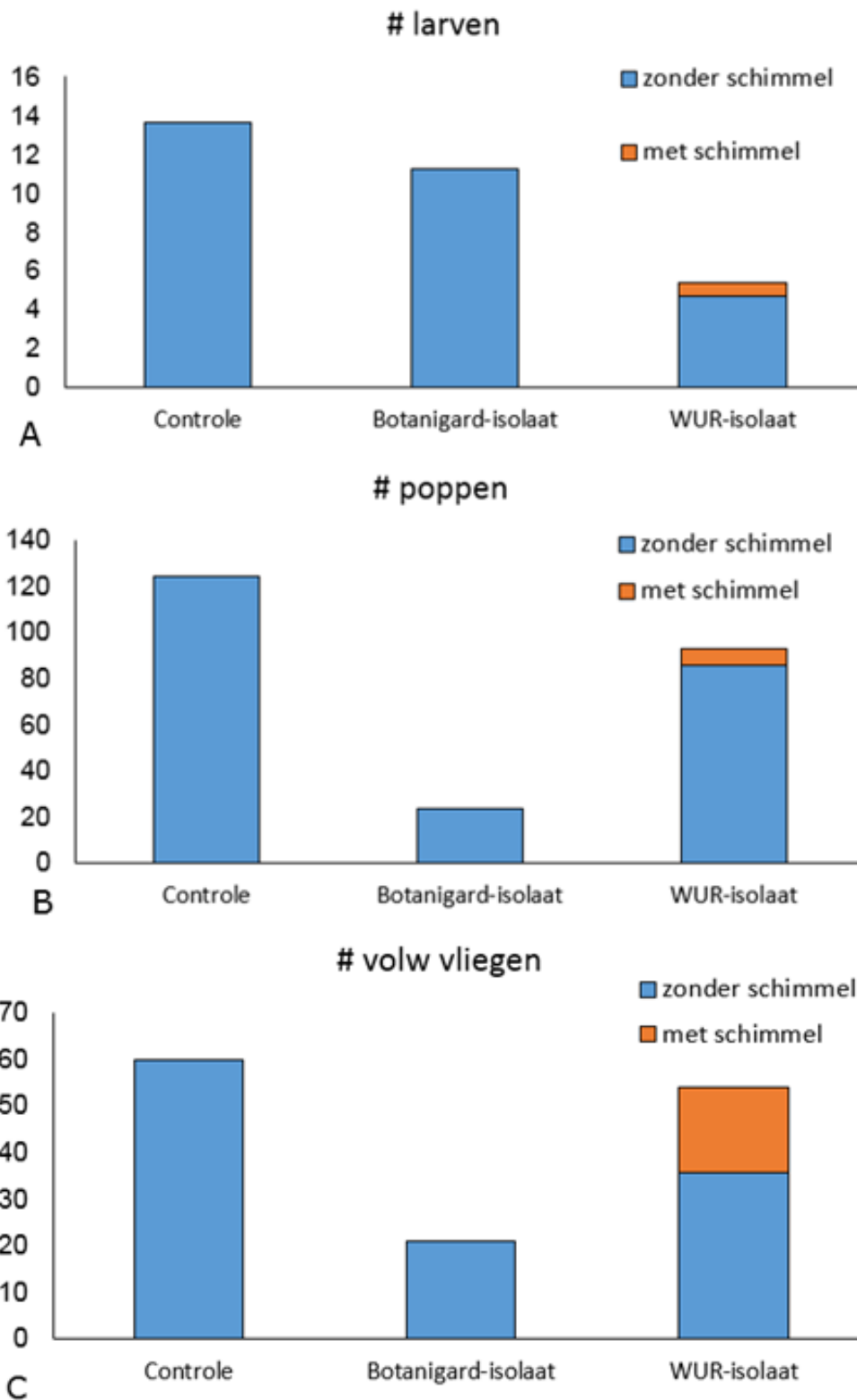


Figuur 9.3 Gemiddeld aantal levende en dode oevervliegen in de kooien van de 3 behandelingen bij de eindevaluatie, 7 weken na de start van de proef.

In de testbakjes die in week 1 en 3 van de proef in de kooien zijn geplaatst hebben zich vrijwel geen oevervliegen ontwikkeld. Deze data zijn daarom niet opgenomen in het rapport. In de testbakjes die in week 5 van de proef in de kooien zijn geplaatst hebben zich wel oevervliegen ontwikkeld. In de behandeling met het Botanigard isolaat hebben zich in totaal minder oevervliegen ontwikkeld dan in de controlebehandeling (GLM, $P = 0.0175$). Dit was niet het geval voor het *B. bassiana* WUR isolaat (GLM, $P = 0.239$) (zie Figuur 9.4). Alleen in de behandeling met *B. bassiana* WUR isolaat werd schimmelduitgroei waargenomen. Van de volwassen oevervliegen, was er in ongeveer een derde van de volwassen oevervliegen schimmel uitgegroeid (zie Figuur 9.5).



Figuur 9.4 Totaal aantal oevervlieg larven dat zich gemiddeld heeft ontwikkeld in de testbakjes van de 3 behandelingen die in week 5 van de proef in de kooien zijn geplaatst, verdeeld over de verschillende ontwikkelingsstadia. De testbakjes zijn 3 weken na plaatsing in de kooien geëvalueerd.



Figuur 9.5 Gemiddeld aantal oevervlieg larven (A), poppen (B) en volwassen vliegen (C) met en zonder uitgroei van *B. bassiana* schimmel die zich hebben ontwikkeld in de testbakjes van de 3 behandelingen die in week 5 van de proef in de kooien zijn geplaatst. De testbakjes zijn 3 weken na de plaatsing in de kooien geëvalueerd.

9.4 Conclusies en discussie

De verwachting was dat het aantal nieuwe oevervliegen in de kooi met het *B. bassiana* WUR isolaat gedurende de proef steeds verder zou afnemen, omdat geleidelijk een groter gedeelte van de populatie besmet zou raken met de schimmel. Het resultaat dat zich aan het einde van de proef significant minder levende oevervliegen in de behandeling met *B. bassiana* WUR isolaat bevond komt met deze verwachting overeen. Echter verschilde het totaal aantal oevervliegen dat zich tijdens de 7 weken van de proef in de kooien had ontwikkeld niet tussen de 3 behandelingen. Het was volgens verwachting dat met de methode niet kon worden voorkomen dat er zich een populatie oevervliegen in elke behandeling zou ontwikkelen. Echter duidt het grote aantal vliegen dat zich in de kooi met het *B. bassiana* WUR isolaat heeft ontwikkeld erop dat de verspreiding van de besmetting van deze entomopathogene schimmel in de populatie oevervliegen zich pas relatief laat in het experiment heeft voorgedaan. Ook de resultaten in de testbakjes die in week 5 in de kooien waren geplaatst duiden hierop. Het aantal vliegen dat zich in deze bakjes had ontwikkeld lag niet lager dan in de controlebehandeling, maar wel vertoonde een derde van de oevervliegen die in de testbakjes van de behandeling met het *B. bassiana* WUR isolaat waren ontwikkeld uitgroei van de *B. bassiana* schimmel, terwijl deze bakjes nooit direct met sporenoplossingen van deze entomopathogene schimmel waren besmet. Het lijkt dus mogelijk dat de schimmel zich naar onbehandelde algenplekken verspreid. Echter lijkt het voor een succesvolle toepassing van deze 'attract- en kill' strategie in de praktijk belangrijk om al te starten met lokbakjes met algenoplossingen waar reeds meerdere vliegenkadavers liggen waar het *B. bassiana* WUR isolaat uitgroeit. Er zal verder in de praktijk moeten worden onderzocht hoe snel een dergelijke strategie kan zorgen voor een verspreiding van de besmetting van de entomopathogene schimmel door de kas en een reductie in de populatie van oevervliegen.

Literatuur

- Anas, O., and R. D. Reeleder. 1988. Feeding habits of larvae of *Bradysia coprophila* on fungi and plant tissue. *Phytoprotection* **69**:73-78.
- Cloyd, R. A., A. Dickinson, R. A. Larson, and K. A. Marley. 2007. Effect of growing media and their constituents on fungus gnat, *Bradysia* sp nr. *coprophila* (Lintner) adults. *Insect Science* **14**:467-475.
- Frouz, J., and A. Novakova. 2001. A new method for rearing the sciarid fly, *Lycoriella ingenua* (Diptera : Sciaridae), in the laboratory: possible implications for the study of fly-fungal interactions. *Pedobiologia* **45**:329-340.
- Jaklitsch, W. M. and H. Voglmayr. 2015. Biodiversity of *Trichoderma* (Hypocreaceae) in Southern Europe and Macaronesia. *Studies in Mycology* 80: 1-87.
- Kühne, S., and H. Heller. 2011. Sciarid fly larvae in growing media - biology, occurrence, substrate and environmental effects and biological control measures. Online Presentatie.
- Olson, D. L., R. D. Oetting, and M. W. van Iersel. 2002. Effect of soilless potting media and water management on development of fungus gnats (Diptera : Sciaridae) and plant growth. *Hortscience* **37**:919-923.
- Pijnakker, J., A. Grosman, A. Leman, A. Van der Linden, and E. de Groot. 2014. Biologische bestrijding van rouwmuggen. Wageningen UR Glastuinbouw, Bleiswijk, Nederland.
- Pijnakker, J., A. Leman, G. Messelink, A. Grosman, and R. van Holstein. 2011. Bestrijding van rouwmuggen en oevervliegen. Interne Projectnummer: 3242070400, PT-number: 13804, Wageningen UR Glastuinbouw, Bleiswijk, Nederland.
- Stanghellini, M. E., and Z. A. El-Hamalawi. 2005. Efficacy of *Beauveria bassiana* on colonized millet seed as a biopesticide for the control of shore flies. *Hortscience* **40**:1384-1388.
- Van Epenhuijsen, C. W., B. B. C. Page, and J. P. Koolaard. 2001. Preventative treatments for control of fungus gnats and shore flies. *New Zealand Plant Protection* **54**:42-46.

To explore
the potential
of nature to
improve the
quality of life



Wageningen University & Research,
BU Glastuinbouw
Postbus 20
2665 ZG Bleiswijk
Violierenweg 1
2665 MV Bleiswijk
T +31 (0)317 48 56 06
F +31 (0) 10 522 51 93
www.wur.nl/glastuinbouw

Rapport WPR-787

De missie van Wageningen University & Research is 'To explore the potential of nature to improve the quality of life'. Binnen Wageningen University & Research bundelen Wageningen University en gespecialiseerde onderzoeksinstituten van Stichting Wageningen Research hun krachten om bij te dragen aan de oplossing van belangrijke vragen in het domein van gezonde voeding en leefomgeving. Met ongeveer 30 vestigingen, 5.000 medewerkers en 10.000 studenten behoort Wageningen University & Research wereldwijd tot de aansprekende kennisinstellingen binnen haar domein. De integrale benadering van de vraagstukken en de samenwerking tussen verschillende disciplines vormen het hart van de unieke Wageningen aanpak.