

# Bestrijding van turkse mot met een nieuw baculovirus

G.J. Messelink, M.A. van Slooten en S.E.F. van Steenpaal

Praktijkonderzoek Plant & Omgeving

M.M. van Oers en J.M. Vlak, Laboratorium voor Virologie, Wageningen Universiteit

© 2005 Wageningen, Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V.

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 Praktijkonderzoek Plant & Omgeving.

Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V. is niet aansprakelijk voor eventuele schadelijke gevolgen die kunnen ontstaan bij gebruik van gegevens uit deze uitgave.



Projectnummer PT: 11.335  
Projectnummer PPO: 41203709

**Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V.**

Business Unit Glastuinbouw

Adres : Kruisbroekweg 5  
: Postbus 8, 2670 AA Naaldwijk  
Tel. : 0174 - 636700  
Fax : 0174 - 636835  
E-mail : [info.ppo@wur.nl](mailto:info.ppo@wur.nl)  
Internet : [www.ppo.wur.nl](http://www.ppo.wur.nl)

# Inhoudsopgave

SAMENVATTING.....	5
1 INLEIDING .....	7
2 ORIËNTERENDE KASPROEF IN PAPRIKA IN 2002 .....	9
2.1 Inleiding .....	9
2.2 Materiaal en methoden.....	9
2.3 Resultaten en discussie.....	9
3 IDENTIFICATIE VAN EEN NIEUW BACULOVIRUS .....	11
3.1 Inleiding .....	11
3.2 Materiaal en methoden.....	11
3.3 Resultaten.....	12
3.4 Discussie en Conclusies .....	14
4 GASTHEERSPECIFICITEIT VAN CHCHNPV.....	15
4.1 Inleiding .....	15
4.2 materiaal en methoden.....	15
4.3 Resultaten & discussie .....	15
4.4 Conclusie .....	16
5 EFFECTIVITEITSBEPALING IN KASPROEVEN IN 2003 .....	17
5.1 Inleiding .....	17
5.2 Materiaal en methode.....	17
5.2.1 kasproef 1 in tomaat.....	17
5.2.2 kasproef 2 in tomaat.....	18
5.2.3 Statistische verwerking .....	18
5.3 Resultaten.....	19
5.3.1 kasproef 1 op tomaat .....	19
5.3.2 kasproef 2 op tomaat .....	20
5.4 Discussie en conclusies .....	21
6 EFFECTIVITEITSBEPALING IN KASPROEVEN IN 2004 .....	23
6.1 Inleiding .....	23
6.2 Materiaal en methode.....	23
6.2.1 kasproef 3 in paprika .....	23
6.2.2 kasproef 4 in tomaat.....	24
6.2.3 Statistische verwerking .....	24
6.3 Resultaten.....	25
6.3.1 kasproef 3 op paprika .....	25
6.3.2 kasproef 4 op tomaat .....	26
6.4 Discussie en conclusies .....	27
7 PERSISTENTIE VAN CHCHNPV .....	29
7.1 Inleiding .....	29
7.2 Materiaal en methoden.....	29
7.3 Resultaten & discussie .....	30
7.4 Conclusie .....	31
8 WAARDPLANTEFFECT OP CHCHNPV .....	33
8.1 Inleiding .....	33
8.2 Materiaal en methoden.....	33

8.3	Resultaten & discussie .....	34
9	EFFECTIVITEIT VAN CHCHNPV TEGEN TURKSE MOT OP GERBERA .....	35
9.1	Inleiding .....	35
9.2	Materiaal en methoden.....	35
9.3	Resultaten & discussie .....	35
10	CONCLUSIES EN DISCUSSIE .....	37
11	LITERATUUR .....	39
	BIJLAGE 1, VERKLARENDE WOORDENLIJST .....	41
	BIJLAGE 2. INFORMATIE HELPDESK CTB.....	43
	BIJLAGE 3, PLATTEGROND KASPROEF 1 IN TOMAAT .....	47
	BIJLAGE 4: KLIMAATGEGEVENS KASPROEF 1 OP TOMAAT .....	49
	BIJLAGE 5, PLATTEGROND KASPROEF 2 IN TOMAAT .....	51
	BIJLAGE 6: KLIMAATGEGEVENS KASPROEF 2 OP TOMAAT .....	53
	BIJLAGE 7, PLATTEGROND KASPROEF 3 IN PAPRIKA .....	55
	BIJLAGE 8: KLIMAATGEGEVENS KASPROEF 3 OP PAPRIKA .....	57
	BIJLAGE 9, PLATTEGROND KASPROEF 4 IN TOMAAT .....	59
	BIJLAGE 10: KLIMAATGEGEVENS KASPROEF 4 OP TOMAAT .....	61
	BIJLAGE 11: INSTRALING TIJDENS PERSISTENTIEPROEF.....	63

# Samenvatting

Baculovirussen behoren tot een groep van virussen die fatale ziekten veroorzaken bij insecten. De virussen zijn zeer specifiek en vooral bekend als ziekteverwekkers binnen de orde Lepidoptera (vlinderachtigen). Deze ziekteverwekkers kunnen worden ingezet als biologisch bestrijdingsmiddel tegen rupsen. In de Nederlandse glastuinbouw is het kernpolyedervirus van floridamot, *Spodoptera exigua*, (SeNPV) in de handel verkrijgbaar onder de naam SpodX®. Ook in de fruitteelt is een aantal baculovirussen commercieel verkrijgbaar voor de bestrijding van de fruitmot, *Cydia pomonella*.

In 2002 werd een nieuw virus gevonden in een kweek van turkse mot, *Chrysodeixis chalcites*, op het PPO in Naaldwijk. Het virus werd door het Laboratorium voor Virologie van Wageningen Universiteit geïdentificeerd als een uniek en nog niet eerder beschreven virus en bleek te horen tot de groep van de baculovirussen. Een oriënterende kasproef in paprika liet zien dat het virus zeer infectieus was. Slechts één bespuiting van rupsen, van verschillende stadia, van turkse mot, resulteerde in 100 procent doding. Daarnaast deden terugkerende problemen van virusinfecties bij een kweek van turkse mot, vermoeden dat het om een zeer infectieus en persistent virus ging.

In 2003 is een tweejarig projectvoorstel gestart met als doel een nieuw biologisch middel tegen turkse mot te ontwikkelen, op basis van dit baculovirus. Daarvoor is de identiteit, effectiviteit, selectiviteit en persistentie van het virus bepaald (registratie-eisen). Bij nauwkeurige identificatietesten bleek dat rupsen van turkse mot geïnfecteerd waren met een nog niet eerder beschreven virus, dat ChchNPV is genoemd. Het meest verwante virus is een baculovirus geïsoleerd uit *Trichoplusia ni*, een schadelijke rups uit Noord-Amerika. Een PCR detectiemethode is opgezet waarmee ChchNPV onderscheiden kan worden van andere baculovirussen.

Het baculovirus ChchNPV bleek zeer selectief te zijn en is daardoor volledig veilig voor natuurlijke vijanden en hommels en bijen in kassen. Totaal werden 14 rupsensoorten uit zeven verschillende families getoetst op vatbaarheid voor ChchNPV. Van de in Nederland voorkomende schadelijke vlindersoorten zijn alleen turkse mot, *Chrysodeixis chalcites*, en de daarmee verwante gamma-uil, *Autographa gamma* vatbaar. Daarnaast bleek de Noordamerikaanse 'cabbage looper' *Trichoplusia ni* vatbaar te zijn. Al deze soorten behoren tot de subfamilie van de *Plusiinae*.

Deugdelijkheidsproeven met ChchNPV zijn uitgevoerd in kassen op tomaat en paprika. In deze proeven werd het virus altijd vergeleken met een standaard biologisch middel, *Bacillus thuringiensis* (Bt), en een standaard chemisch middel, namelijk teflubenzuron (Nomolt). De resultaten van ChchNPV op tomaat vielen tegen, ook wanneer hogere virusdoseringen werden toegediend. De werking was slechter dan de standaardmiddelen Bt en teflubenzuron. Kasproeven op paprika gaven een ander beeld. Het virus had een goede werking op rupsen van turkse mot, maar scoorde niet beter dan Bt en teflubenzuron. In een kasproef op gerbera was ChchNPV zeer effectief met 100 procent doding van rupsen van turkse mot. De werking was echter trager dan bij de andere middelen. De experimenten laten zien dat de waardplant bepalend kan zijn voor de effectiviteit van het virus.

Opvallend bij de kasproeven was dat een bespuiting met ChchNPV leidde tot meer bladeren met vraatschade. Een verklaring hiervoor kan zijn dat de virusinfectie het gedrag van de rupsen beïnvloedt. Het lijkt er op dat met virus besmette rupsen de neiging hebben naar de top van de plant te lopen. Dit is een gunstige eigenschap, omdat het virus uit de dode rupsen zo weer op het onderliggende gewas uitvloeit.

De persistentie van ChchNPV werd in een kasexperiment op paprika vergeleken met Bt en teflubenzuron. Overduidelijk was dat teflubenzuron het meest persistente middel is. Zelfs 17 dagen na het spuiten gaf het middel 100 procent doding van rupsen van turkse mot. Zowel de virusbehandeling als de Bt-behandeling gaven vanaf tien dagen een verminderde mortaliteit bij rupsen van turkse mot. Het virus ChchNPV lijkt iets persistenter te zijn dan Bt. Zeventien dagen nadat het middel gespoten was op paprikaplanten, had het nog steeds een significant effect op rupsen, terwijl dat bij Bt niet het geval was.

Samenvattend kan gesteld worden dat ChchNPV zeer effectief kan zijn, selectief is voor een beperkt aantal maar wel zeer schadelijke insectensoorten, op alle rupsenstadia werkt en iets persistenter is dan Bt. Beperkend aan het virus is, dat het niet werkt tegen alle schadelijke rupsensoorten en kennelijk niet onder alle kasomstandigheden even effectief is. Opvallend is de slechte werking op tomaat. De onderzoeksresultaten met ChchNPV bieden op dit moment onvoldoende perspectief om te investeren in

toelating als gewasbeschermingsmiddel. Meer fundamenteel onderzoek, met eventueel een andere gastheer van ChchNPV en onder diverse kasomstandigheden, biedt mogelijk meer kansen om de potenties van het virus als bestrijdingsmiddel zichtbaar te maken. Het is wenselijk dat zeer selectieve middelen als baculovirussen in de toekomst een andere status krijgen met lagere registratiekosten. Bij verandering van deze status is het goed mogelijk dat ChchNPV wel mogelijkheden biedt als gewasbeschermingsmiddel, zeker wanneer de lage productiekosten in ogenschouw worden genomen.

# 1 Inleiding

Rupsen van de turkse mot, *Chrysodeixis chalcites*, worden algemeen beschouwd als de meest voorkomende en schadelijke rupsen in de Nederlandse glastuinbouw. Bestrijding van rupsen met chemische middelen als Nomolt en Decis is niet compatibel met natuurlijke vijanden die ingezet worden tegen andere plaagorganismen. Preparaten op basis van het Bt-toxine *Bacillus thuringiensis* (Dipel, Turex, Xentari) gaan goed samen met natuurlijke vijanden, maar werken niet in alle gevallen afdoende. De noodzaak tot frequente bespuitingen maakt deze preparaten arbeidsintensief en kostbaar. Daarnaast kunnen insecten resistentie ontwikkelen tegen Bt. Ontwikkeling van een nieuw biologische middel tegen de turkse mot, dat effectiever en persistenter is dan Bt, is zeer wenselijk.

Het PPO in Naaldwijk is tijdens onderzoek aan turkse mot gestuit op een nieuw baculovirus van deze mot. Wanneer rupsen het virus binnenkrijgen, verslijmen ze binnen korte tijd. Terugkerende problemen van virusinfecties bij een kweek van turkse mot, deden vermoeden dat het om een zeer infectieus en persistent virus ging. Onderzoekers van de leerstoelgroep Virologie van Wageningen Universiteit hebben het virus in 2002 geïdentificeerd, waaruit bleek dat het waarschijnlijk om een nieuw virus ging. Dit virus zal in dit verslag verder benoemd worden als ChchNPV (zie hfdst 3). Veel termen die aan de orde komen bij virologisch onderzoek zullen wellicht onbekend zijn. In dit rapport is daarom een verklarende woordenlijst opgenomen om het een en ander toe te lichten (Bijlage 1). Eind 2002 is een kasproef uitgevoerd op paprika (zonder herhalingen). Het nieuwe virus had een verbluffende werking met 100 procent doding van turkse mot (hfdst 2). Deze resultaten waren aanleiding voor de start van een tweejarig onderzoeksproject aan ChchNPV.

Het doel van dit project was een nieuw biologisch middel tegen turkse mot te ontwikkelen, op basis van een baculovirus. Voor een toelating van dit baculovirus als bestrijdingsmiddel is kennis nodig over de identiteit, effectiviteit en veiligheid.

Het onderzoek bestond uit de volgende onderdelen:

- bepalen van de effectiviteit en persistentie van het virus in laboratorium- en kasexperimenten
- identificatie en karakterisering van het virus (uitgevoerd door leerstoelgroep Virologie, Wageningen universiteit)
- bepalen van de specificiteit van het virus (toetsen op andere schadelijke en onschadelijke rupsen)

Voor de verdere invulling van dit onderzoeksproject is ondersteunende informatie opgevraagd bij de 'Helpdesk Toelatingen' van het CTB (College voor de Toelating van Bestrijdingsmiddelen). Aan deze organisatie zijn de volgende vragen gesteld:

1. In welke mate moet de effectiviteit van het baculovirus worden aangetoond met bioassay's en kasproeven?
2. In hoeverre moet de gastheerspecificiteit worden bepaald en volgens welke protocollen?
3. Kunnen de toxicologische gegevens van het baculovirus SpodX gebruikt worden voor het toelatingsdossier van ChchNPV, het baculovirus van turkse mot?
4. Tot op welk niveau moet het virus worden gekarakteriseerd? Is een volledige sequencing een vereiste?
5. Bestaan er protocollen voor het uitvoeren en aanleveren van gegevens over de persistentie van het virus. Wat is noodzakelijk voor een dossier?

De antwoorden van het CTB zijn weergegeven in Bijlage 2 en de informatie is verwerkt bij de opzet van de in dit rapport beschreven onderzoeken aan ChchNPV.





## 2 Oriënterende kasproef in paprika in 2002

### 2.1 Inleiding

In 2002 heeft PPO een nieuw baculovirus van turkse mot, *Chrysodeixis chalcites*, ontdekt. In november 2002 waren drie identieke kasafdelingen met paprika zwaar besmet met rupsen van turkse mot. PPO heeft van deze gelegenheid gebruik gemaakt door één kasafdeling te spuiten met het nieuwe virus en te vergelijken met een bespuiting met *Bacillus thuringiensis* en met een onbehandelde kas.

### 2.2 Materiaal en methoden

Drie kasafdelingen met paprika van 76 m<sup>2</sup> waren in november 2002 besmet met verschillende rupsenstadia en eieren van turkse mot. De paprikaplanten waren geteeld volgens een tweestengelsysteem en waren gemiddeld 2 meter lang. De ingestelde dag- en nachttemperatuur was tijdens het experiment 22°C. Op 15 november werd een voortelling gedaan. In elke afdeling werden 25 paprikaplanten gemarkeerd volgens een gelijkmatig verdeeld patroon. Van deze planten werd één stengeldeel beoordeeld op het aantal aanwezige rupsen en eieren van turkse mot.

Na de voortelling, werd één van de volgende behandelingen in een kasafdeling uitgevoerd:

- A. Onbehandeld (waterbespuiting)
- B. *Bacillus thuringiensis* (Bt) (Turex), 0.05%
- C. ChchNPV, 4\*10<sup>6</sup> polyeders/ml

Per kasafdeling werd met 16 liter spuitvloeistof gespoten, wat neerkomt op 2000l/ha. Een week na het spuiten, op 22 november, werd het aantal levende rupsen op de gemarkeerde planten opnieuw geteld.

### 2.3 Resultaten en discussie

De bespuiting met het nieuwe baculovirus had een verbluffende werking op turkse mot. Een week na de bespuiting werd géén enkele levende rups meer teruggevonden (tabel 1). Opvallend was dat veel rupsen boven in de gewasdraden hingen om daar vervolgens te verslijmen. De bespuiting met Bt had vergeleken met het virus een matige werking met 44 procent bestrijding (tabel 1). Een mogelijke verklaring is dat in de kasafdeling ook oudere rupsenstadia aanwezig waren, die minder gevoelig zijn voor Bt.

Tabel 1. Gemiddeld aantal (+se) levende rupsen en eieren van turkse mot voor en na spuitbehandelingen en het daaraan gekoppelde bestrijdingspercentage van een behandeling

Behandeling	# rupsen op 15-11	# eieren op 15-11	# rupsen op 22-11	% bestrijding*
onbehandeld	13.84 (1.42)	24.56 (2.52)	19.20 (1.99)	0
Bt	26.56 (2.98)	38.21 (7.64)	18.16 (2.02)	44
ChchNPV	66.84 (4.68)	34.28 (2.51)	0 (0)	100

\* = 100\*(1-(fractie/fractie onbehandeld)), fractie = # rupsen op 22-11 / ( # rupsen + eieren op 15-11)



## 3 Identificatie van een nieuw baculovirus

### 3.1 Inleiding

De verschijnselen, die waargenomen werden in rupsen van turkse mot, mortaliteit gepaard gaand met verslijming en lichtmicroscopisch waarneembare kernpolyeders, deed een sterk vermoeden uitgaan naar een infectie met een baculovirus. Baculovirussen vormen een familie van insectpathogene virussen met doorgaans een zeer beperkt gastheerbereik. Wereldwijd worden baculovirussen gebruikt als biologisch bestrijdingsmiddel en meer dan 600 soorten zijn inmiddels bekend.

Baculovirussen worden met het voedsel opgenomen en starten hun infectiecyclus in de darm van vatbare rupsen. Aan het eind van de infectiecyclus is de rups geheel gevuld met grote hoeveelheden virale insluitlichamen, grote eiwitcapsules, die nieuwe virusdeeltjes bevatten. De rupsen verslijmen en de virussen komen vrij en contamineren de planten, waardoor de cyclus zich kan herhalen. De familie *Baculoviridae* is onderverdeeld in de genera Nucleopolyhedrovirus (NPV) en Granulovirus (GV) (Van Regenmortel et al., 2000). Deze indeling wordt gemaakt op grond van de vorm van de virale insluitingen die men lichtmicroscopisch kan waarnemen in de kern (polyeders versus granula). De NPVs worden verder onderverdeeld in Group I en Group II op basis van fylogenetische eigenschappen (Bulach et al., 1999). Baculovirussen hebben een groot circulair, dubbelstrengs DNA genoom (80-200 kbp) en vermenigvuldigen zich in de kern van insectencellen. Alle baculovirussen bezitten een set van geconserveerde 29 genen. Daarnaast hebben ze nog een groot aantal genen, dat slechts in een aantal virussen voorkomt. Andere genen zijn zelfs uniek voor een bepaald virus. De totale set genen geeft aan elk virus zijn specifieke eigenschappen.

Identificatie van deze virussen vindt in eerste instantie plaats door ze te bekijken met een elektronenmicroscop. Vervolgens wordt een PCR detectie uitgevoerd met baculovirus specifieke primers op geconserveerde delen van het virale genoom. Analyse van de geamplificeerde sequenties geeft dan de mogelijkheid het gevonden virus te vergelijken met reeds bekende baculovirussen. De naamgeving van baculovirussen is gebaseerd op de afkorting van de Latijnse naam van de gastheer waarin het virus voor het eerst ontdekt is, gevolgd door de aanduiding NPV of GV, om aan te geven tot welk type (genus) het virus behoort. De officiële naam van het virus ontdekt in turkse mot is *Chrysodeixis chalcites* nucleopolyhedro-virus (ChchNPV).

Na het bekend worden van virusspecifieke sequentie-informatie kunnen PCR testen worden opgezet die doorgaans een hogere gevoeligheid hebben en waarmee direct kan worden bepaald met welk baculovirus men te maken heeft. Een dergelijke test kan zeer nuttig zijn om te bepalen of rupsen virusvrij zijn, bijvoorbeeld wanneer daar infectieproeven mee worden ingezet. In geval van het optreden van mortaliteit kan getest worden of een bepaald virus hiervoor verantwoordelijk is. Dit is nuttig voor het bevestigen van vatbaarheidstoetsen.

### 3.2 Materiaal en methoden

Om het virus te zuiveren werden in de kas dode rupsen van turkse mot verzameld (2002) en gehomogeniseerd in water. Het homogenaat werd gefiltreerd over kaasdoek. Het filtraat werd nog enkele malen gewassen met water om een relatief schone polyedersuspensie te verkrijgen. Met dit filtraat werden rupsen van turkse mot in het vierde ontwikkelingsstadium geïnfecteerd voor electronenmicroscopische analyse.

Om te bepalen of we hier met een nieuw of een reeds bekend baculovirus te maken hadden werd met

behulp van PCR een drietal geconserveerde genen (lef-8, pif-2 en polyhedrin) opgepikt en gekloneerd. Vervolgens werd de DNA sequentie bepaald en werden fylogenetische analyses uitgevoerd om het virus te classificeren.

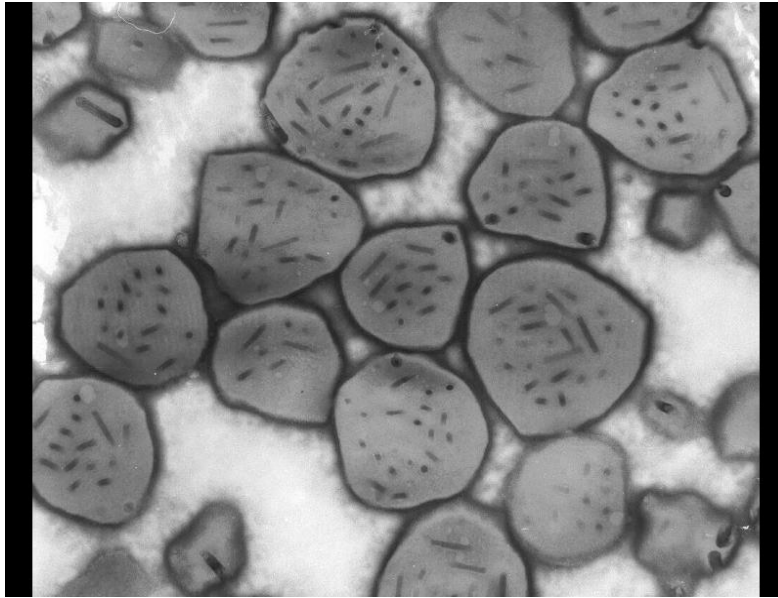
Verdere analyse betrof het kloneren van een aantal genomische fragmenten en het uitvoeren van een aantal sequentie-reacties hierop. Uiteindelijk is in samenwerking met R. Klein Lankhorst, Greenomics, Plant Research International, de DNA sequentie van het hele ChchNPV genoom opgehelderd. Deze specifieke sequentie-informatie werd gebruikt om een virus specifieke PCR test op te zetten gebaseerd op een gen dat tot dusver alleen in ChchNPV werd gevonden.

### 3.3 Resultaten

Na infectie van rupsen van turkse mot met het geïsoleerde virus, werden de rupsen traag en bleek, en uiteindelijk werden de rupsen bruin en verslijmde. Verslijmde rupsen hingen aan de achterste poten (pseudo-poten) aan de onderzijde van het blad met de kop naar beneden en droogden uiteindelijk helemaal uit (figuur 1).



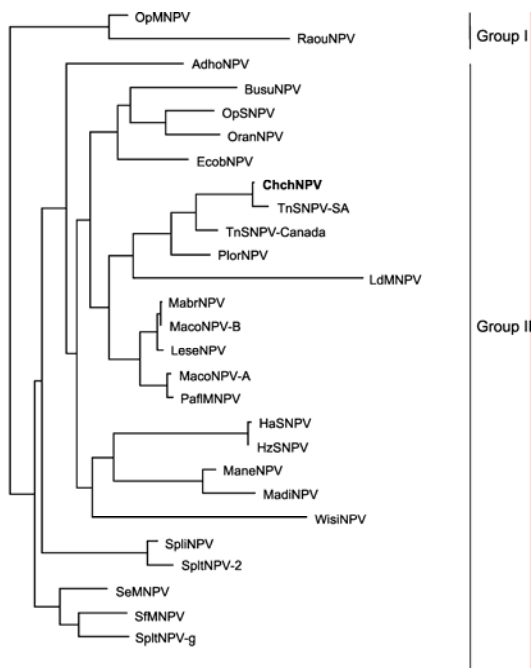
Figuur 1. Linksonder gezonde rups van *Chrysodeixis chalcites* (turkse mot), rechtsonder, linksonder en rechtsonder drie opeenvolgende stadia van infectie van rupsen van *C. chalcites* met ChchNPV.



Figuur 2. Foto met de elektronenmicroscop van ChchNPV.

Electronenmicroscopische analyse van dunne coupes van geïnfecteerde rupsen liet duidelijk polyeders zien met daarin virusdeeltjes. Deze virusdeeltjes bevatten één nucleocapside (DNA +eiwitten) en we hebben dus te maken met een zogenaamd "single-nucleocapsid" NPV (Figuur 2).

Met behulp van PCR werden geselecteerde genen (polyhedrine, lef-8 en pif-2 ) geanalyseerd. Deze genen worden standaard gebruikt voor het bepalen van de taxonomische positie van baculovirussen. Daaruit bleek dat het hier om een nieuw virus gaat, dat sterke verwantschap vertoont met *Trichoplusia ni* SNPV (Figuur 3). *Trichoplusia ni* (cabbage looper) behoort tot dezelfde subfamilie van insecten als *C. chalcites*, maar komt in Nederland niet voor. Recentelijk is de sequentie van het hele ChchNPV genoom bepaald en bevestigd dat het hier om een nieuw virus gaat met verwantschap met TniSNPV.



Figuur 3. De positie van ChchNPV binnen groep II NPVs op grond van vergelijking van polyhedrine sequenties.

Tevens werd een PCR test ontwikkeld waarmee dit virus specifiek kan worden aangetoond. Deze test is gebaseerd op amplificatie van een uniek gen in ChchNPV.

### 3.4 Discussie en Conclusies

In turkse mot is een nieuw baculovirus gevonden dat ChchNPV is genoemd. Het virus heeft de hoogste verwantschap met een baculovirus geïsoleerd uit *Trichoplusia ni*. Een PCR detectiemethode is opgezet waarmee dit virus onderscheiden kan worden van andere baculovirussen. Dit deel van het werk is gepubliceerd in *Virology* 330 (2004), 460-470. De volledige DNA sequentie van dit virus is in 2004 opgehelderd.

## 4 Gastheerspecificiteit van ChchNPV

### 4.1 Inleiding

Voor een eventuele toelating van het kernpolyedervirus ChchNPV (familie Baculovirussen) in de Nederlandse glastuinbouw, is het noodzakelijk een toelatingsdossier aan te leggen met daarin informatie over de effectiviteit, karakterisering, gastheerspecificiteit en persistentie van het virus. Voor wat betreft de gastheerspecificiteit is het een vereiste om alle beschikbare informatie te vermelden inzake het effect op niet-doelorganismen in het gebied waar het micro-organisme wordt verspreid (Anonymous, 2001).

In Nederland bestaat reeds een toelating voor een baculovirus van *Spodoptera exigua* (SeMNPV) en het virus is verkrijgbaar onder de naam SpodX. Baculovirussen zijn specifieke pathogenen van insecten en zijn niet in staat zich te vermeerderen in zoogdiercellen (Possee et al., 1993). Het is dan ook overbodig uitgebreide toxicologische toetsen met ChchNPV bij zoogdieren uit te voeren. Bovendien zijn de gegevens uit het dossier van SpodX mogelijk bruikbaar voor een eventuele toelating van ChchNPV. In deze studie beperken we ons daarom tot het bepalen van de gastheerspecificiteit binnen de orde Lepidoptera (vlinderachtigen).

### 4.2 materiaal en methoden

Totaal werden 14 rupsensoorten uit zeven verschillende families getoetst op vatbaarheid voor ChchNPV. De meeste rupsen waren afkomstig van bestaande kweken, of waren verzameld in het veld (tabel 2). Enkele soorten werden in kassen verzameld en in klimaatcellen verder doorgekweekt totdat voldoende eieren beschikbaar waren voor onderzoek. Van iedere rupsensoort werden 150 exemplaren van het tweede larvale stadium ingezet voor een vatbaarheidstoets. 50 rupsen werden blootgesteld aan een dosering van  $10^4$  en 50 aan een dosering van  $10^6$  polyeders per individu. De virussen werden toegediend via een klein stukje voedingsmedium of via blad. 50 rupsen werden ingezet in een controlebehandeling met voedingsmedium met water. Bij de rupsensoorten die verzameld waren in het veld (tabel 2) werden bovengenoemde aantal niet altijd gehaald. Alleen de rupsen die het volledige stukje voedingsmedium / blad hadden opgegeten, werden doorgekweekt op schoon virusvrij medium, totdat de rupsen doodgingen of verpopten. Dode rupsen werden gecontroleerd op besmetting met virussen door het lichaamsvocht te bekijken onder een lichtmicroscop en te beoordelen op aanwezigheid van kernpolyeders. Voor alle toetsen werd virus van eenzelfde batch gebruikt.

De toetsen met *Pieris brassicae* en *Inachis io* werden uitgevoerd op bladponsjes met een diameter van 10 mm van respectievelijk *Brassica oleracea* var. *capitata* (witte kool) en *Urtica dioica* (grote brandnetel). Een rupsensoort werd als vatbaar voor ChchNPV gescoord wanneer verslijming optrad bij  $10^4$  polyeders en als semi-vatbaar wanneer verslijming pas optrad bij een dosering van  $10^6$  polyeders. Wanneer géén doding plaats vond bij de hoge virusdosering, werd een soort als niet vatbaar bestempeld (Possee et al., 1993).

### 4.3 Resultaten & discussie

Van de getoetste rupsensoorten bleek naast *Chrysodeixis chalcites* alleen *Trichoplusia ni* ook vatbaar te zijn voor ChchNPV (tabel 2). Beide soorten behoren tot de subfamilie *Plusiinae*, binnen de *Noctuidae* en zijn daardoor zeer verwant. Ook de gamma-uil, *Autographa gamma* behoort tot deze subfamilie. Vatbaarheid kon in deze experimenten niet goed worden aangetoond, maar lijkt niet uitgesloten te zijn vanwege de sterke verwantschap met *C. chalcites* en *T. ni*.

Door de uiterst selectieve werking van ChchNPV is het virus volledig veilig voor andere insecten in kassen.

Tabel 2. Vatbaarheid en bron van getoetste rupsensoorten (Lepidoptera) voor ChchNPV (- = niet vatbaar, + = vatbaar).

familie	wetenschappelijke naam	Nederlandse naam	bron	vatbaarheid
Geometridae	<i>Eupithecia assimilata</i>	kleine bessenspanrups	veld	-
Noctuidae	<i>Agrotis ipsilon</i>	aardrups	veld	-
	<i>Autographa gamma</i>	gamma-uil	veld	-/+ (?)
	<i>Chrysodeixis chalcites</i>	turkse mot	kweek op planten	+
	<i>Helicoverpa armigera</i>	katoenrups	kweek op medium	-
	<i>Mamestra brassicae</i>	kooluil	veld	-
	<i>Spodoptera exigua</i>	floridamot	kweek op medium	-
	<i>Trichoplusia ni</i>	(cabbage looper)	kweek op medium	+
Nymphalidae	<i>Inachis io</i>	dagpauwoog	veld	-
Pieridae	<i>Pieris brassicae</i>	koolwitje	veld	-
Plutellidae	<i>Plutella xylostella</i>	koolmot	veld	-
Pyralidea	<i>Duponchelia fovealis</i>	Duponchelia	kweek op medium	-
	<i>Galleria mellonella</i>	wasmot	kweek op medium	-
Yponomeutidae	<i>Yponomeuta viridana</i>	appelstippelmot	veld	-

## 4.4 Conclusie

Het baculovirus ChchNPV is zeer selectief en daardoor volledig veilig voor natuurlijke vijanden en hommels en bijen in kassen. Voor de Nederlandse glastuinbouw is ChchNPV interessant als biologisch bestrijdingsmiddel tegen turkse mot, *Chrysodeixis chalcites*, en de gamma-uil, *Autographa gamma*. De vatbare *Trichoplusia ni* (cabbage looper) is een belangrijke rupsenplaag in de Nooramerikaanse glastuinbouw.



## 5 Effectiviteitsbepaling in kasproeven in 2003

### 5.1 Inleiding

Voor een toelating van het kernpolyedervirus ChchNPV (familie Baculovirussen) in de Nederlandse glastuinbouw, is het noodzakelijk een toelatingsdossier aan te leggen met daarin informatie over de effectiviteit, karakterisering, gastheerspecificiteit en persistentie van het virus. In dit onderzoek is de effectiviteit van het virus als bestrijder van rupsen van turkse mot, *C. chalcites*, getoetst in een kasproef met tomaat. De werking werd vergeleken met een gangbaar chemisch en biologisch middel tegen rupsen.

### 5.2 Materiaal en methode

#### 5.2.1 kasproef 1 in tomaat

Een eerste kasproef om de effectiviteit van het virus ChchNPV te bepalen werd uitgevoerd in twee kasafdelingen van kassencomplex 103 van PPO in Naaldwijk. Deze afdelingen bestaan uit drie kappen van 3 x 3,2m en zijn 14,5 m diep, wat neer komt op een oppervlakte van 139m<sup>2</sup>. Per afdeling stonden twaalf rijen van twintig tomatenplanten. De tomatenplanten, cultivar Cedrico, waren gezaaid op 18 juni 2003 en werden geplant in week 30 van 2003. De effectiviteit van het virus werd in twee concentratiedichtheden getoetst. Totaal waren er vijf behandelingen:

- A. controle
- B. ChchNPV,  $2 \cdot 10^6$  viruspolyeders/ml
- C. ChchNPV,  $8 \cdot 10^6$  viruspolyeders/ml
- D. chemische controle, teflubenzuron (Nomolt<sup>R</sup>), 0,1%
- E. microbiologische controle, *Bacillus thuringiensis* (Turex 50 WP<sup>R</sup>), 0,05%

Per behandeling waren er vier herhalingen. De kasproef werd opgezet als een volledig gewarde blokkenproef met twee blokken over de breedte per kasafdeling (bijlage 3). Een veldje bestond uit twee rijen van 8 planten, waarvan op twee rijen van 6 planten rupsen werden uitgezet en acht planten beoordeeld werden (netto-veldje van 8 planten). Tussen de veldjes was een dubbele rij bufferplanten aanwezig volgens EPPO-richtlijnen PP1/135 (Anonymous, 1999).

Op 7 augustus werd op 12 planten binnen het veldje totaal 120 eieren van turkse mot uitgezet, 10 per plant. De eieren waren afkomstig van een kweek op tomaat. De eieren waren één tot drie dagen oud bij het aanbrengen op de planten. Dit werd gedaan door stukjes blad met de eieren uit te knippen en deze, met het stukje blad boven op de bladeren van de planten te leggen. Ca. 50 eieren werden apart uitgekweekt op een tomatenplant. De L1-L2 stadia van deze uitgekomen eieren van turkse mot werden individueel opgeslagen voor latere PCR-analyses, om de eventuele aanwezigheid van ChchNPV aan te tonen.

Op 11 augustus werd bij 8 willekeurig gekozen planten het aantal uitgekomen eieren geteld. Op 13 augustus werd van ieder plant het aantal bladeren met rupsenvraat geteld. Een dag later, op 14 augustus, werden de middelen gespoten. De rupsen hadden toen het tweede larvale stadium bereikt.

Het verspuiten gebeurde met een pulverisator (Mesto Resistent 3560) met een holle spuitdop en een spuihoek van 65°. De spuitsnelheid was 1,24 l/minuut bij een gemiddelde druk van 3 bar. De planten werden zowel op de bovenkant als de onderkant van de bladeren bespoten. De tomatenplanten waren tijdens het toedienen van de middelen ongeveer 1,5 meter hoog. De totale hoeveelheid spuitvloeistof per plant was 50 ml, wat neerkomt op 900 l/ha. Totaal werd 3,2 l per behandeling gespoten. Voor het vullen van de spuit tanks werd een stockoplossing gemaakt van 1 liter. Deze werd in de tank aangevuld tot 3,2 l.

Vier dagen na het spuiten van de middelen werden levende en dode rupsen in de veldjes geteld. Daarnaast werd de eventuele gewasschade bepaald door het aantal bladeren met vraat te scoren. Dit werd eenmaal voor en vier dagen na een bespuiting gedaan. Tijdens de proef werd de temperatuur en relatieve

luchtvochtigheid in de kasafdelingen geregistreerd (bijlage 4).

### 5.2.2 kasproef 2 in tomaat

Een tweede kasproef met het virus ChchNPV werd opnieuw uitgevoerd in twee kasafdelingen van kassencomplex 103 van PPO in Naaldwijk. Dit waren andere afdelingen dan die van de eerste kasproef op tomaat, om eventuele contaminatie met achtergebleven virusrestanten te kunnen uitsluiten. De tomatenplanten, cultivar Cedrico, werden geplant op 4 september 2003. Het virus ChchNPV werd dit maal in hogere dichtheden getoetst dan in kasproef 1. Totaal waren er opnieuw vijf behandelingen:

- A. controle
- B. ChchNPV,  $8 \cdot 10^6$  viruspolyeders/ml
- C. ChchNPV,  $2 \cdot 10^7$  viruspolyeders/ml
- D. chemische controle, teflubenzuron (Nomolt<sup>®</sup>), 0,1%
- E. microbiologische controle, *Bacillus thuringiensis* (Turex 50 WP<sup>®</sup>), 0,05%

De opzet was identiek aan kasproef 1, maar met een andere warring van de behandelingen (bijlage 5). Op 17 oktober werden 15 eieren van turkse mot uitgezet per plant op gelijke wijze als in kasproef 1. Op 22 oktober werd bij 12 willekeurig gekozen planten het aantal uitgekomen eieren geteld. Op 3 november werd van ieder plant het aantal bladeren met rupsenvraat geteld. Een dag later, op 4 november, werden de middelen gespoten met dezelfde spuitapparatuur als in kasproef 1.

De totale hoeveelheid spuitvloeistof per plant was 60 ml, wat neerkomt op 1080 l/ha. Totaal werd 3,84 l per behandeling gespoten. Voor het vullen van de spuit tanks werd een stockoplossing gemaakt van 1 liter. Deze werd in de tank aangevuld tot 3,84 l. Bij de behandelingen met ChchNPV werd een bufferoplossing van 0.001% PBS toegevoegd. Voor het spuiten werd de pH van de spuitvloeistof gecontroleerd. De rupsen hadden op 4 november het tweede larvale stadium bereikt. De tomatenplanten waren tijdens het toedienen van de middelen ongeveer 2 meter hoog.

Zeven dagen na het spuiten van de middelen werden levende en dode rupsen in de veldjes geteld. Daarnaast werd de gewasschade beoordeeld door het aantal bladeren met vraat te scoren. Tijdens de proef werd de temperatuur en relatieve luchtvochtigheid in de kasafdelingen geregistreerd (bijlage 6).

### 5.2.3 Statistische verwerking

De tellingen van dode en levende rupsen van kasproef 1 en 2 werden getransformeerd naar een LOG-schaal en geanalyseerd met ANOVA door gebruik te maken van GenStat Release 6.1. De cijfers van de vraattoename werden zonder transformatie met ANOVA geanalyseerd. Statistische verschillen werden bepaald door gebruik te maken van de lsd-methode (least significant difference).

## 5.3 Resultaten

### 5.3.1 kasproef 1 op tomaat

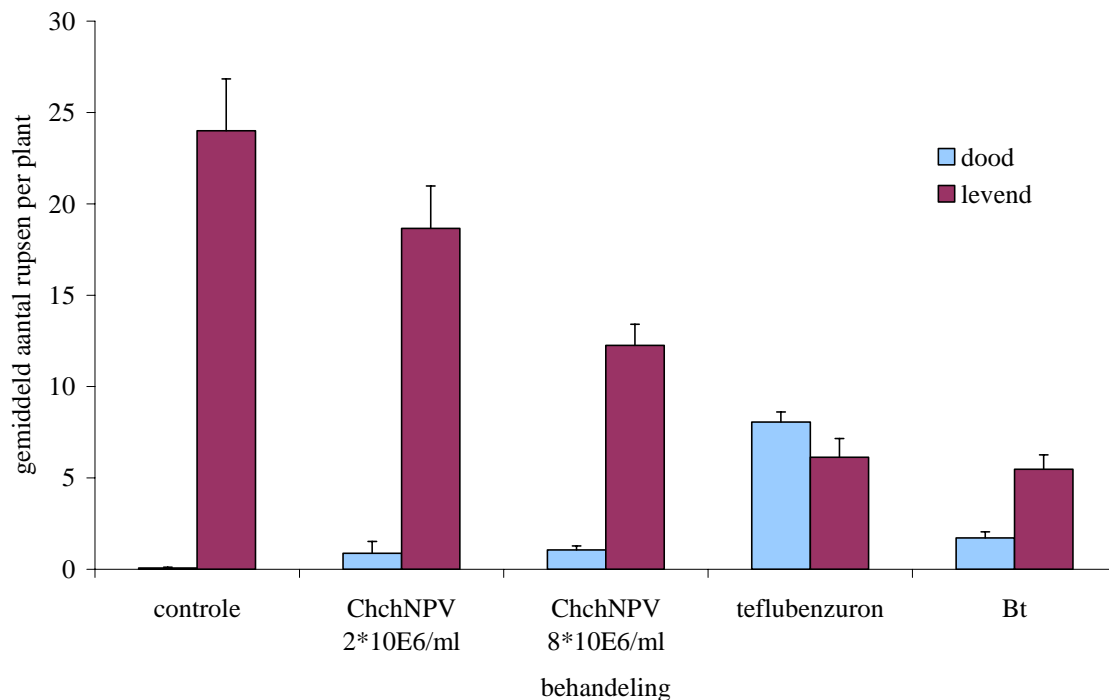
Vier dagen na het aanbrengen van de eieren van turkse mot (10/plant) werd gemiddeld 8.5 rups per plant teruggevonden. Dus gemiddeld is 85% van de aangebrachte eieren daadwerkelijk uitgekomen. Het uiteindelijke aantal teruggevonden rupsen in de controlebehandeling lag stukken hoger. Dit werd waarschijnlijk veroorzaakt door spontane invlieg van turkse mot. Vliegende motten werden vijf dagen voor de eindbeoordeling waargenomen.

Van de twee getoetste virusdoseringen, had alleen de dosering van  $8 \cdot 10^6$  polyeders per ml een significant effect op turkse mot (tabel 3, figuur 4). Bt en teflubenzuron deden het significant beter, maar verschilden onderling niet. De meeste dode rupsen werden teruggevonden bij planten die waren behandeld met teflubenzuron. De meeste schade door rupsenvraat werd waargenomen bij de behandeling met de lage virusdosering. De overige behandelingen lieten significant minder vraatschade zien ten opzichte van onbehandeld (tabel 3).

Tabel 3. Gemiddeld aantal dode en levende rupsen (se) van turkse mot en het gemiddeld aantal toegenomen bladeren met vraat (se) bij verschillende behandelingen bij kasproef 1 op tomaat in 2003.

behandeling	dode rupsen*			levende rupsen*			vraattoename (bladeren)*		
controle	0.06	(0.04)	c	24.00	(2.84)	a	5.69	(0.67)	b
ChchNPV $2 \cdot 10^6$	0.88	(0.64)	c	18.65	(2.33)	a	7.06	(0.62)	a
ChchNPV $8 \cdot 10^6$	1.06	(0.22)	b	12.25	(1.16)	b	4.44	(0.43)	c
teflubenzuron	8.06	(0.55)	a	6.13	(1.02)	c	2.56	(0.39)	d
Bt	1.72	(0.32)	b	5.47	(0.79)	c	2.56	(0.44)	d

\* verschillende letters duiden op statistisch significante verschillen ( $P < 0.05$ )



Figuur 4. Gemiddeld aantal dode en levende rupsen van *C. chalcites* per plant (+ se) bij kasproef 1 op tomaat in 2003.

### 5.3.2 kasproef 2 op tomaat

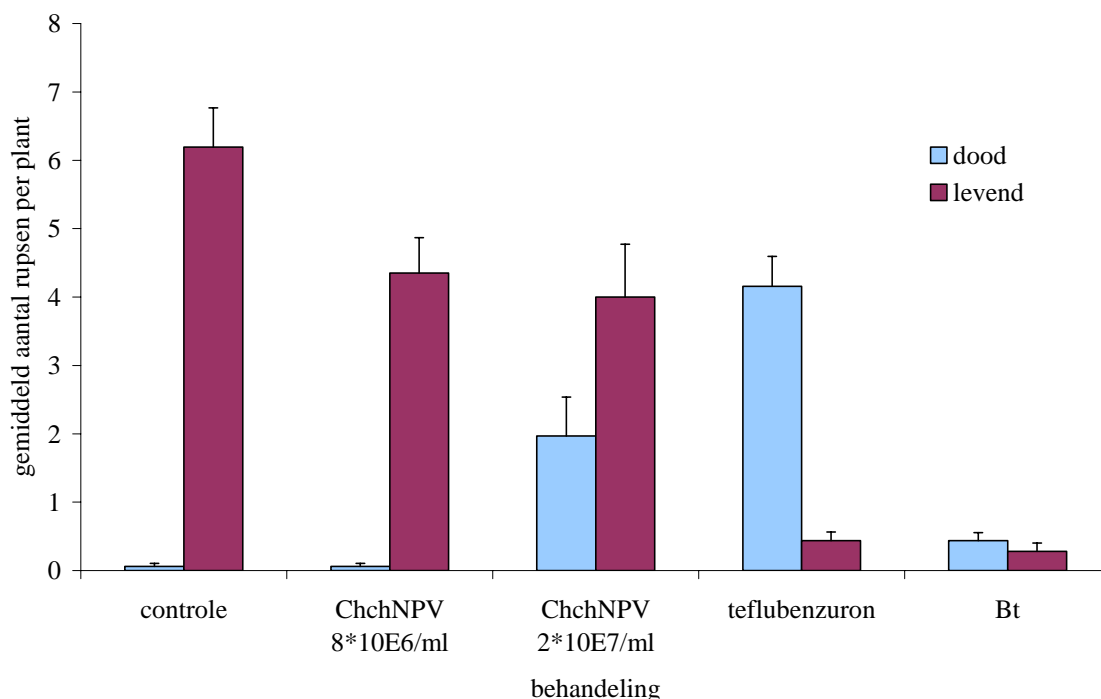
Vijf dagen na het aanbrengen van de eieren van turkse mot (15/plant) werd gemiddeld 5.7 rupsen per plant teruggevonden. Dus gemiddeld is 38 procent van de aangebrachte eieren daadwerkelijk uitgekomen. Dit is een stuk lager dan bij de eerste kasproef op tomaat. Het aantal uitgekomen eieren komt goed overeen met het aantal rupsen (gemiddeld 6.2) dat bij de eindbeoordeling in de controlebehandelingen werd teruggevonden (tabel 4).

De behandelingen Bt en teflubenzuron hadden een significant betere werking op rupsen dan onbehandeld en de lage virusdosering (minder levende rupsen) (tabel 4, figuur 5). De spuitbehandelingen met ChchNPV hadden géén significant effect op rupsen van turkse mot. Opvallend was wel dat bij één herhaling van de virusbehandeling 100 % doding werd waargenomen, terwijl in de andere herhalingen nauwelijks sterfte werd waargenomen. De meeste dode rupsen werden teruggevonden bij planten die waren behandeld met teflubenzuron, gevolgd door de behandeling met de hoge virusdosering en Bt (tabel 4, figuur 5). De meeste schade door rupsenvraat werd waargenomen bij de behandeling met de hoogste virusdosering. Alleen de behandeling met Bt liet significant minder vraatschade zien ten opzichte van onbehandeld (tabel 4).

Tabel 4. Gemiddeld aantal dode en levende rupsen (se) van turkse mot en het gemiddeld aantal toegenomen bladeren met vraat (se) bij verschillende behandelingen bij kasproef 2 op tomaat in 2003.

behandeling	dode rupsen*			levende rupsen*		vraattoename (bladeren)*	
contrôle	0.06	(0.04)	c	6.19	(0.57)	a	3.75 (0.52) b
ChchNPV $8 \cdot 10^6$	0.06	(0.04)	c	4.35	(0.52)	a	4.23 (0.58) b
ChchNPV $2 \cdot 10^7$	1.97	(0.57)	b	4.00	(0.77)	ab	6.50 (0.57) a
teflubenzuron	4.16	(0.44)	a	0.44	(0.13)	bc	2.66 (0.39) bc
Bt	0.44	(0.12)	b	0.28	(0.12)	c	2.09 (0.33) c

\* verschillende letters duiden op statistisch significante verschillen ( $P < 0.05$ )



Figuur 5. Gemiddeld aantal dode en levende rupsen van *C. chalcites* per plant (+ se) bij kasproef 2 op tomaat in 2003.

## 5.4 Discussie en conclusies

De resultaten van de eerste kasproef lieten zien dat ChchNPV onvoldoende effectief was tegen turkse mot op tomaat. Alleen de dosering van  $8 \cdot 10^6$  polyeders per ml had een significante werking op turkse mot. Dit is opvallend, want een lagere dosering van  $4 \cdot 10^6$  polyeders/ml gaf 100 procent doding in paprika (hfdst. 2). De eerste kasproef laat duidelijk een doseringseffect zien. In een tweede kasproef is daarom de dosering verhoogd naar een maximum van  $2 \cdot 10^7$  polyeders/ml. Ook deze dosering bleek onvoldoende effectief. In beide experimenten scoorden Bt en teflubenzuron beter, waardoor daar minder levende rupsen werden teruggevonden. De meeste dode rupsen werden in beide experimenten bij teflubenzuron waargenomen. Mogelijk dat bij een iets trager dodingsproces de dode rupsen makkelijker terug te vinden zijn. Bij snelle doding (zoals Bt) kan het zijn dat kleine rupsjes van de plant vallen en spoorloos verdwijnen.

Opvallend in beide experimenten is dat een bespuiting met ChchNPV leidde tot meer bladeren met vraatschade. Dit betekent niet dat het percentage bladoppervlakte met vraat bij deze behandelingen ook het grootst was. Het percentage bladoppervlakte met vraat is niet gemeten. Een verklaring voor de toename in aantal bladeren met vraat bij de virusbespuitingen kan zijn, dat het virus het gedrag van de rupsen beïnvloedt. Ook bij de oriënterende kasproef in paprika werd vastgesteld dat veel zieke rupsen naar de top van de plant liepen. Vanuit het virus gezien is dit gunstig, omdat verslijming van rupsen hoog in een plant leidt tot een betere verspreiding van het virus.



## 6 Effectiviteitsbepaling in kasproeven in 2004

### 6.1 Inleiding

Eind 2002 gaf het nieuwe baculovirus ChchNPV een zeer goede bestrijding van turkse mot in een oriënterende kasproef met paprika. In twee deugdelijkheidsproeven op tomaat in 2003 viel de werking van het virus erg tegen. Een mogelijke verklaring hiervoor is dat de effectiviteit van het virus mede bepaald wordt door de waardplant. In 2004 is daarom gestart met een kasproef op paprika, om te kijken of dezelfde effectieve werking als in 2002 kon worden behaald, maar nu in een kasproef volgens de standaard richtlijnen voor deugdelijkheidsonderzoek. Een tweede kasproef werd opnieuw uitgevoerd op tomaat bij nog hogere virusdichtheden dan in 2003. In beide experimenten is het baculovirus (ChchNPV) vergeleken met een standaard biologisch middel (*Bacillus thuringiensis*) en een standaard chemisch middel (teflubenzuron).

### 6.2 Materiaal en methode

#### 6.2.1 kasproef 3 in paprika

De derde deugdelijkheidsproef met ChchNPV werd uitgevoerd in twee kasafdelingen met paprika van 139 m<sup>2</sup> (PPO Naaldwijk, 103 10 en 103 11). Paprikaplanten, cultivar Express, waren gezaaid op 25 juni 2004 en werden geplant op 21 juli 2004 met per afdeling 12 rijen van 24 paprikaplanten. De volgende vijf behandelingen werden vergeleken:

- A. controle
- B. ChchNPV,  $9 \cdot 10^8$  viruspolyeders/ml
- C. ChchNPV,  $9 \cdot 10^9$  viruspolyeders/ml
- D. chemische controle, teflubenzuron (Nomolt<sup>R</sup>), 0,1%
- E. microbiologische controle, *Bacillus thuringiensis* (Turex 50 WP<sup>R</sup>), 0,05%

Het virus was afkomstig van zieke rupsen die waren verzameld op 16 augustus 2004.

Per behandeling waren er vier herhalingen. De kasproef werd opgezet als een volledig gewarde blokkenproef met twee blokken over de breedte per kasafdeling (bijlage 7). Een veldje bestond uit twee rijen van 8 planten, waarvan op twee rijen van 6 planten rupsen werden uitgezet en acht planten beoordeeld werden (netto-veldje van 8 planten).

Op 31 augustus werden op iedere plant, twaalf planten per veldje, 20 eieren van de turkse mot gezet. De eieren waren afkomstig uit een kweek van PPO en waren één dag voor het uitzetten gelegd. Zes dagen later, op 6 september, werd in ieder afdeling op 4 willekeurig gekozen planten het aantal uitgekomen rupsjes geteld.

Op 9 september werd van ieder plant het aantal bladeren met rupsenvraat geteld. Een dag later, op 10 september, werden de middelen gespoten. De rupsen hadden toen het tweede larvale stadium bereikt.

Het verspuiten gebeurde met een rugspuit (GLORIA 172 RT, Gloria-Werke, Wadersich, Duitsland) met een holle spuitdop en een spuithoek van 65°. De spuitsnelheid was 1,24 l/minuut bij een gemiddelde druk van 3 bar. De planten werden zowel op de bovenkant als de onderkant van de bladeren bespoten. De paprikaplanten waren tijdens het toedienen van de middelen ongeveer 1,3 meter hoog. De totale hoeveelheid spuitvloeistof per plant was 100 ml, wat neerkomt op 2000 l/ha. Totaal werd 6,4 l per behandeling gespoten. Voor het vullen van de spuit tanks werd een stockoplossing gemaakt van 1 liter. Deze werd in de tank aangevuld tot 6,4 l.

Dertien dagen na het spuiten van de middelen, op 22 september 2004, werden levende en dode rupsen in de veldjes geteld. Daarnaast werd per plant opnieuw het aantal bladeren met vraat geteld. Tijdens de proef werd de temperatuur en relatieve luchtvochtigheid in de kasafdelingen geregistreerd (bijlage 8).

### 6.2.2 kasproef 4 in tomaat

Een vierde kasproef met het virus ChchNPV werd opnieuw uitgevoerd in twee kasafdelingen van 186 m<sup>2</sup> van kassencomplex 103 van PPO in Naaldwijk (afdeling 16 en 18). De tomatenplanten, cultivar Spranco, waren gezaaid op 2 september en werden geplant op 29 september 2004. De volgende behandelingen werden uitgevoerd:

- A. controle
- B. ChchNPV,  $9 \cdot 10^8$  viruspolyeders/ml
- C. ChchNPV,  $9 \cdot 10^9$  viruspolyeders/ml
- D. chemische controle, teflubenzuron (Nomolt<sup>R</sup>), 0,1%
- E. microbiologische controle, *Bacillus thuringiensis* (Turex 50 WP<sup>R</sup>), 0,05%

Het virus was afkomstig van zieke rupsen die waren verzameld op 16 augustus 2004.

De opzet van de proef was identiek aan kasproef 1 en 2 van 2003, maar met een andere warring van de behandelingen (bijlage 9). Op 8 oktober werden 20 eieren van turkse mot per plant uitgezet. Op 14 oktober werd bij 8 willekeurig gekozen planten het aantal uitgekomen eieren geteld. Op 19 oktober werd van ieder plant het aantal bladeren met rupsenvraat geteld. Een dag later, op 20 oktober, werden de middelen gespoten met dezelfde spuitapparatuur als in kasproef 3.

De totale hoeveelheid spuitvloeistof was 100 ml per plant, wat neerkomt op 1800 l/ha. Totaal werd 6,4 l per behandeling gespoten. Voor het vullen van de spuit tanks werd een stockoplossing gemaakt van 1 liter. Deze werd in de tank aangevuld tot 6,4 l. Bij de behandelingen met ChchNPV werd een bufferoplossing van 0.001% PBS toegevoegd. Voor het spuiten werd de pH van de spuitvloeistof gecontroleerd. De rupsen hadden op 20 oktober het tweede larvale stadium bereikt. De tomatenplanten waren tijdens het toedienen van de middelen ongeveer 2 meter hoog.

Acht dagen na het spuiten van de middelen, op 28 oktober, werden levende en dode rupsen in de veldjes geteld. Daarnaast werd de gewasschade beoordeeld door het aantal bladeren met vraat te scoren. Tijdens de proef werd de temperatuur en relatieve luchtvochtigheid in de kasafdelingen geregistreerd (bijlage 10).

### 6.2.3 Statistische verwerking

De tellingen van dode en levende rupsen van kasproef 3 en 4 werden getransformeerd naar een LOG-schaal en geanalyseerd met ANOVA door gebruik te maken van GenStat Release 6.1. De cijfers van de vraattoename werden zonder transformatie met ANOVA geanalyseerd. Statistische verschillen werden bepaald door gebruik te maken van de lsd-methode (least significant difference).



## 6.3 Resultaten

### 6.3.1 kasproef 3 op paprika

Zes dagen na het aanbrengen van de eieren van turkse mot (20/plant) werd gemiddeld 4.6 rups per plant teruggevonden. Dus gemiddeld is 23 procent van de aangebrachte eieren daadwerkelijk uitgekomen. Het uiteindelijke aantal rupsen dat bij de eindbeoordeling in de controlebehandelingen werd teruggevonden lag nog lager met gemiddeld 1.8 rups/plant (tabel 6, 14.75 rups/8 planten). Bij de eindbeoordeling werden ook zeer kleine rupsen gevonden, veroorzaakt door invlieg. Deze zijn apart geteld een weergegeven (tabel 5).

De behandelingen met ChchNPV, Bt en teflubenzuron hadden allemaal een significant effect op turkse mot, maar verschilden onderling niet (tabel 5, figuur 6). Bij al deze behandelingen werd lage aantallen levende rupsen teruggevonden. De meeste dode rupsen werden teruggevonden bij de behandeling met teflubenzuron. Het aantal toegenomen bladeren met rupsenvraat was alleen lager ten opzicht van onbehandeld bij de Bt-behandeling (tabel 6)

Tabel 5. Gemiddeld aantal dode en levende rupsen (se) en levende kleine rupsen (L1-L2, van invlieg) (se) van turkse mot per veldje (8 planten) bij verschillende behandelingen bij kasproef 3 op paprika in 2003.

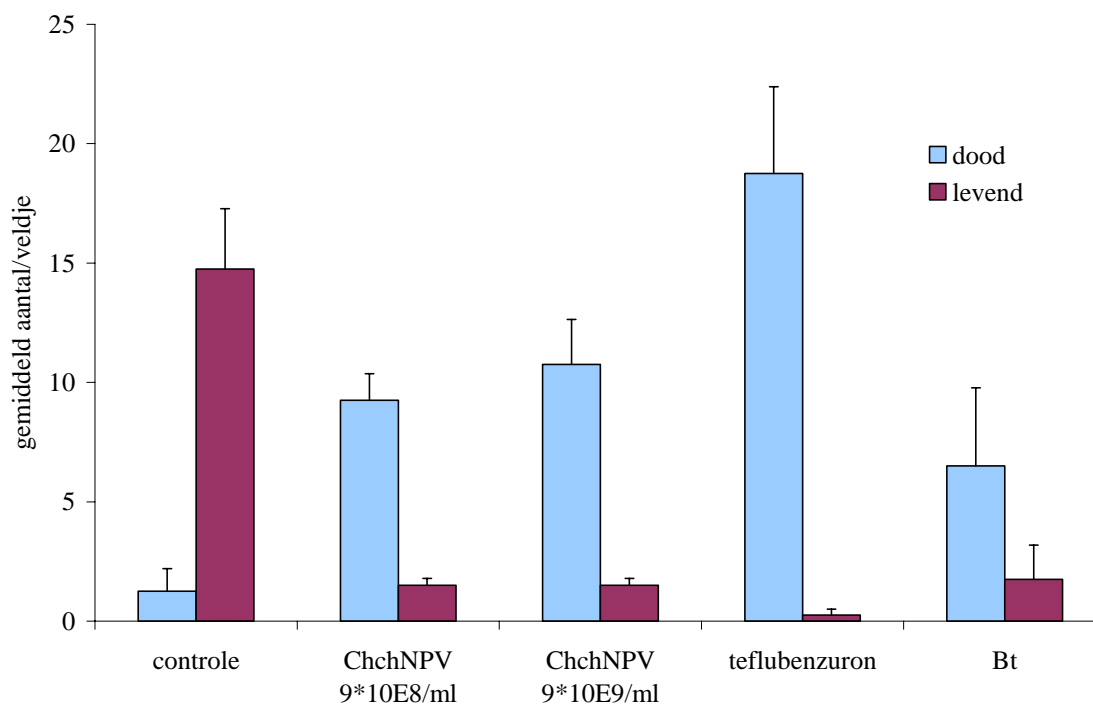
behandeling	dode rupsen*			levende rupsen*		levende kleine rupsen*	
controle	1.25	(0.95)	c	14.75	(2.53)	a	28 (8.92) a
ChchNPV $9 \times 10^8$	9.25	(1.11)	b	1.5	(0.29)	b	13 (5.97) b
ChchNPV $9 \times 10^9$	10.75	(1.89)	b	1.5	(0.29)	b	11.75 (5.41) b
teflubenzuron	18.75	(3.64)	a	0.25	(0.25)	b	14.5 (9.56) b
Bt	6.5	(3.28)	bc	1.75	(1.44)	b	10.25 (2.72) b

\* verschillende letters duiden op statistisch significante verschillen ( $P < 0.05$ )

Tabel 6. Gemiddeld aantal toegenomen bladeren met vraat per veldje (8 planten) (se) bij verschillende behandelingen bij kasproef 3 op paprika in 2003.

behandeling	vraattoename (bladeren)*		
controle	471	(31.36)	a
ChchNPV $9 \times 10^8$	447	(25.66)	a
ChchNPV $9 \times 10^9$	415	(33.66)	a
teflubenzuron	382	(31.26)	ab
Bt	316	(58.92)	b

\* verschillende letters duiden op statistisch significante verschillen ( $P < 0.05$ )



Figuur 6. Gemiddeld aantal dode en levende rupsen van *C. chalcites* per veldje van acht planten (+ s.e.) bij kasproef 3 op paprika in 2004.

### 6.3.2 kasproef 4 op tomaat

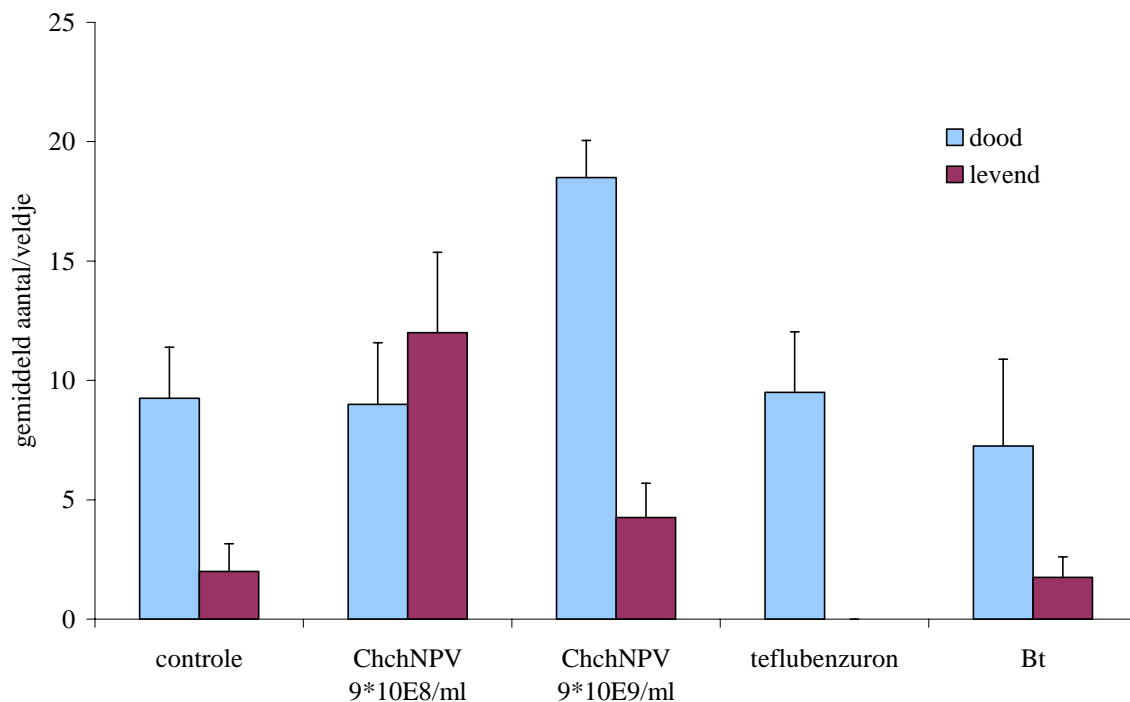
Vijf dagen na het aanbrengen van de eieren van turkse mot (20/plant) werd gemiddeld 3.6 rups per plant teruggevonden. Dus gemiddeld is 18 procent van de aangebrachte eieren daadwerkelijk uitgekomen. Het uiteindelijke aantal rupsen dat bij de eindbeoordeling in de controlebehandelingen werd teruggevonden was zeer laag met gemiddeld 0.25 rups/plant (tabel 8, 14.75 rups/8 planten).

In alle behandelingen werden veel dode, verslijmde rupsen teruggevonden en er waren géén significante verschillen in aantallen dode rupsen tussen de behandelingen (tabel 7, figuur 7). Op de planten die waren bespoten met teflubenzuron was geen enkele levende rups meer terug te vinden. Dit was de enige behandeling waar statistisch significant minder levende rupsen werden teruggevonden dan bij de controle-behandeling. Bij deze behandeling werd eveneens de minste toename waargenomen in het aantal bladeren met rupsenvraat. Bij de twee virusbehandelingen werd significant meer vraattoename waargenomen dan bij de controlebehandeling (tabel 7).

Tabel 7. Gemiddeld aantal dode en levende rupsen (se) van turkse mot per veldje (8 planten) en het gemiddeld aantal toegenomen bladeren met vraat (se) per veldje bij verschillende behandelingen bij kasproef 4 op tomaat in 2004.

behandeling	dode rupsen*			levende rupsen*			vraattoename (bladeren)*		
controle	9.25	(2.14)	a	2	(1.15)	bc	27.75	(9.63)	c
ChchNPV 9*10 <sup>8</sup>	9	(2.58)	a	12	(3.37)	a	97.75	(14.23)	a
ChchNPV 9*10 <sup>9</sup>	18.5	(1.55)	a	4.25	(1.44)	ab	119.5	(17.60)	a
teflubenzuron	9.5	(2.53)	a	0	(0.00)	c	23	(7.68)	c
Bt	7.25	(3.64)	a	1.75	(0.85)	bc	57.5	(23.67)	b

\* verschillende letters duiden op statistisch significante verschillen (P<0.05)



Figuur 7. Gemiddeld aantal dode en levende rupsen van *C. chalcites* per veldje van acht planten (+ se) bij kasproef 4 op tomaat in 2004.

## 6.4 Discussie en conclusies

De twee deugdelijkheidsproeven in 2004 bevestigen het idee dat de waardplant een belangrijke rol speelt bij de effectiviteit van ChchNPV. Op paprika is de werking van het virus opnieuw goed, terwijl de werking op tomaat duidelijk onvoldoende is. Op paprika waren de virusbehandelingen dit maal echter niet beter dan de chemische (teflubenzuron) en biologische (Bt) controle-behandelingen.

Opvallend in deze twee experimenten was de hoge mortaliteit bij de eieren van turkse mot. Net als in 2003 zien we dat later in het seizoen de mortaliteitspercentages hoger liggen dan midden in de zomer. Op paprika kan een hogere mortaliteit verklaard worden door een lager luchtvochtigheid op de gladde bladeren in vergelijking met tomaat. In een kas met zowel tomatenplanten als paprikaplanten, hebben vrouwtjesmotten van turkse mot waarschijnlijk daarom de voorkeur om eieren af te zetten op tomaat (waarnemingen kweek PPO). Tijdens de laatste kasproef op tomaat werd veel sterfte waargenomen in de controle-behandeling. Sommige rupsen verslijmde daar op identieke wijze als bij een besmetting met ChchNPV. PCR-analyses van een deel van de rupsen vlak voor de bespuitingen (L2-stadium), heeft echter niet kunnen aantonen dat ChchNPV al latent aanwezig was in de rupsenpopulatie.

Later in het seizoen is de daglengte korter wat van invloed is op de ontwikkelingssnelheid en vitaliteit van de rupsen. Onder deze omstandigheden zijn de rupsen mogelijk meer vatbaar voor ChchNPV.

Net als bij de experimenten in 2003 werd gevonden, dat een bespuiting met ChchNPV leidde tot meer bladeren met vraatschade. Daarmee wordt de theorie bevestigd dat ChchNPV ook het gedrag van de rupsen van turkse mot beïnvloedt.



## 7 Persistentie van ChchNPV

### 7.1 Inleiding

De persistentie van een gewasbeschermingsmiddel is een belangrijke eigenschap. Bij een lange werkingsduur, dus een hoge mate van persistentie, kan de toedieningsfrequentie immers lager zijn dan bij stoffen met een korte werkingsduur. Van de chemische stof teflubenzuron (Nomolt) is bekend dat de werkingsduur langer is dan de toxinen van het biologische preparaat *Bacillus thuringiensis* (Bt). Dit betekent in de praktijk dat voor rupsenbestrijding bij hoge plaagdruk in de zomer een tweewekelijkse bespuiting met teflubenzuron voldoende is, terwijl Bt wekelijks moet worden gespoten. Zeker voor grote bedrijven zijn wekelijkse bespuitingen tijdrovend en kostbaar. Persistentie is dus een gunstige eigenschap, maar alleen voor stoffen die heel selectief zijn. Nieuwe chemische bestrijdingsmiddelen worden steeds selectiever, maar vrijwel altijd moet rekening worden gehouden met een nevenwerking op natuurlijke vijanden. Een te lange werkingsduur van een middel is dan niet gewenst in verband met de compatibiliteit met natuurlijke vijanden. De stof teflubenzuron is een insectengroeieregulator (IGR) en grijpt in op de vervelling van insecten. Het is relatief onschadelijk voor (roof)mijten en voor endoparasitaire sluipwespen, waarvan de larven beschermd worden door het lichaam van de gastheer, maar andere natuurlijke vijanden zoals roofwantsen (*Orius*, *Macrolophus*) en galmuggen (*Aphidoletes*, *Feltiella*) zijn wel vatbaar voor deze stof.

Persistentie van een bestrijdingsmiddel is dus wenselijk zolang de stof zeer selectief is. Biologische middelen op basis van Bt of baculovirussen zijn zeer selectief. Er zijn goede aanwijzingen dat het nieuwe virus ChchNPV persistenter is dan Bt. In een recente studie is gevonden dat ChchNPV een uniek fotolyase-gen bevat dat staat voor de codering van enzymen die betrokken zijn bij reparatie van DNA (van Oers *et al.*, 2004). Virussen bestaan uit strengen DNA met een eiwitmantel en worden afgebroken onder invloed van UV-straling. Een reparatiegen zou de werkingsduur enorm kunnen verbeteren. Dit gen is tot nu toe niet eerder gevonden bij baculovirussen.

In dit onderzoek is de persistentie van ChchNPV vergeleken met teflubenzuron en Bt op paprika.

### 7.2 Materiaal en methoden

In dit onderzoek is gekeken naar de persistentie van rupsenmiddelen door de volgende behandelingen te vergelijken:

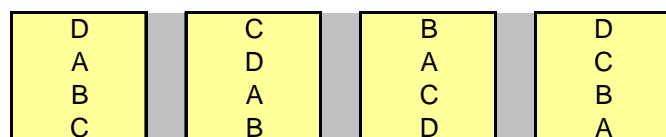
- A. controle (onbehandeld)
- B. *Bacillus thuringiensis* (Turex 50 WPR; 0.05%)
- C. teflubenzuron (Nomolt; 0.1%)
- D. ChchNPV;  $9 \cdot 10^9$  viruspolyeders/ml

Op 7 september 2004 werden per behandeling 30 paprikaplanten in steenwolblokken, cultivar Mazurka, behandeld met de rupsenmiddelen. Per plant werd 100 ml spuitvloeistof toegediend met behulp van een rugspuit (GLORIA 172 RT, Gloria-Werke, Wadersich, Duitsland) bij een druk van 3-4 bar. De 30 controleplanten werden niet behandeld. De planten stonden per behandeling op afzonderlijke teelttafels.

De werking van de verspoten middelen werd na 1, 3, 6, 10 en 17 dagen getest. Op elk van deze vijf waarnemingsmomenten, werd per behandeling een groepje van vier planten bij de 30 behandelde planten weggehaald. Deze planten werden als een gewarde blokkenproef weggezet in vier herhalingen door de planten te verdelen over vier teelttafels in twee kasjes van elk 10 m<sup>2</sup> (figuur 8). Na het wegzetten van de planten werden per plant 10 rupsen (L2 stadium) op de bladeren geplaatst. Op de planten die 17 dagen na het spuiten in de kassen werden verdeeld werden 5 rupsen per plant toegevoegd.

De kasjes van 10 m<sup>2</sup> waren voorzien van watertafels, waarop eenmaal per dag water en voeding werd gepompt en het overvloedige water kon worden afgevoerd. Driemaal per week, op maandag, woensdag en

vrijdag werden de planten waargenomen, waarbij het aantal levende en dode rupsen en poppen werden genoteerd. Tien dagen na het opzetten van de rupsen werden de planten gestript, alle bladeren van de plant werden van beneden naar boven van de plant afgebroken en bekeken.



Figuur 8. Opzet kasproef voor persistentiebepaling.

De gemiddelde stralingsom per dag tijdens het experiment was 952 J/cm<sup>2</sup>. De dagfluctuaties zijn weergegeven in Bijlage 11.

### 7.3 Resultaten & discussie

De persistentie-experimenten op paprika laten overduidelijk zien dat teflubenzuron (Nomolt) het meest persistente middel is. Zelfs 17 dagen na het spuiten gaf het middel 100 procent doding (tabel 8). De virusbehandeling en Bt-behandeling daarentegen, vertonen na tien dagen een duidelijk verminderde werking (tabel 8, figuur 9). Teflubenzuron bleek gedurende het hele experiment het beste middel en gaf bij een 'pre-plaagperiode' van 3, 10 en 17 dagen significant minder levende rupsen dan de andere behandelingen (tabel 8). Het virus ChchNPV lijkt iets persistenter te zijn dan Bt. 17 dagen nadat het middel gespoten was op paprikaplanten, had het nog steeds een significant effect op rupsen, terwijl dat bij Bt niet het geval was (tabel 8).

De meeste dode rupsen werden altijd gevonden bij de planten die waren gespoten met teflubenzuron, gevolgd door de virus-behandeling (tabel 9). Beide middelen voorkomen vervelling van de rupsen, waardoor de werking trager is dan directe toxische effecten van bijvoorbeeld Bt-toxinen. Door de snelle werking van Bt zijn daar de kleine dode rupsen al gauw niet meer terug te vinden. Een enkele keer werd bij de onbehandelde een verslijmde rups aangetroffen, vermoedelijk veroorzaakt door een virusinfectie (tabel 9).

Tabel 8. Gemiddeld aantal levende rupsen (se) bij vier behandelingen bij verschillende periodeduur van spuiten tot introductie van de plaag (pre-plaagperiode).

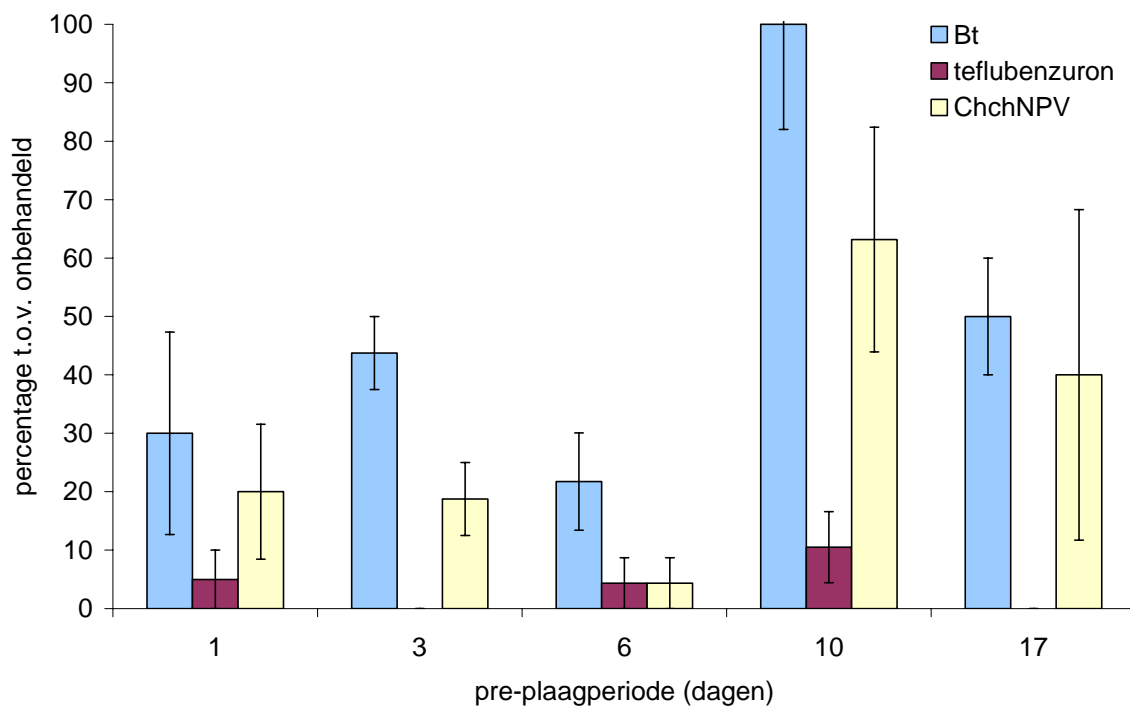
behandeling	pre-plaagperiode*														
	1		3		6		10		17						
contrôle	5.0	(0.91)	a	8.0	(1.35)	a	5.8	(1.11)	a	4.8	(0.48)	a	2.5	(0.29)	a
Bt	1.5	(0.87)	b	3.5	(0.50)	b	1.3	(0.48)	b	4.8	(0.85)	a	1.3	(0.25)	ab
teflubenzuron	0.3	(0.25)	b	0.0	(0.00)	c	0.3	(0.25)	b	0.5	(0.29)	b	0.0	(0.00)	c
ChchNPV	1.0	(0.58)	b	1.5	(0.50)	bc	0.3	(0.25)	b	3.0	(0.91)	a	1.0	(0.71)	bc

\* verschillende letters duiden op statistisch significante verschillen (P<0.05)

Tabel 9. Gemiddeld aantal dode rupsen (se) bij vier behandelingen bij verschillende periodeduur van spuiten tot introductie van de plaag (pre-plaagperiode).

behandeling	pre-plaagperiode*														
	1		3		6		10		17						
controle	1.0	(0.00)	b	0.5	(0.29)	b	0.5	(0.29)	b	1.0	(0.00)	ab	0.8	(0.48)	a
Bt	1.8	(1.11)	b	0.5	(0.29)	b	0.5	(0.50)	b	0.5	(0.29)	b	0.8	(0.75)	a
teflubenzuron	4.3	(0.48)	a	3.0	(0.41)	a	3.3	(0.48)	a	2.3	(0.63)	a	2.0	(0.71)	a
ChchNPV	3.0	(0.58)	ab	1.0	(0.00)	b	2.8	(0.25)	a	1.5	(0.29)	ab	1.0	(0.00)	a

\* verschillende letters duiden op statistisch significante verschillen (P<0.05)



Figuur 9. Percentage levende rupsen van *C. chalcites* ten opzichte van onbehandeld ( $\pm$ se), tien dagen na het plaatsen van L2-stadia op planten met een verschillende 'pre-plaagperiode'.

## 7.4 Conclusie

Het chemische bestrijdingsmiddel teflubenzuron (Nomolt) was in vergelijking met in vergelijking met *Bacillus thuringiensis* (Bt) en het virus ChchNPV het meest persistent. Zeventien dagen na het spuiten gaf deze stof nog steeds 100 procent doding van rupsen van turkse mot. Zowel de virusbehandeling als de Bt-behandeling gaven vanaf tien dagen een verminderde mortaliteit bij rupsen van turkse mot. Het virus ChchNPV lijkt iets persistenter te zijn dan Bt. Zeventien dagen nadat het middel gespoten was op paprikaplanten, had het nog steeds een significant effect op rupsen, terwijl dat bij Bt niet het geval was.





## 8 Waardplanteffect op ChchNPV

### 8.1 Inleiding

De kasproeven van 2003 en 2004 laten zien dat ChchNPV onvoldoende effectief is op tomaat. Op paprika was de werking van het virus beter. Ook een oriënterende kasproef in november 2002 liet een perfecte werking zien op paprika. Uit onderzoek met andere baculovirussen was al bekend dat de waardplant waarop rupsen zich bevinden, bepalend kan zijn voor de effectiviteit van het virus. In dit onderzoek is de werking van ChchNPV bij twee doseringen gelijktijdig op paprika en tomaat getoetst, om daarmee een eventueel waardplanteffect te bevestigen.

### 8.2 Materiaal en methoden

In dit onderzoek werden de volgende behandelingen getest op tomaat en paprika:

- A. onbehandeld (bespuiting met water)
- B. ChchNPV  $2 \cdot 10^6$  viruspolyeders/ml
- C. ChchNPV  $8 \cdot 10^6$  viruspolyeders/ml

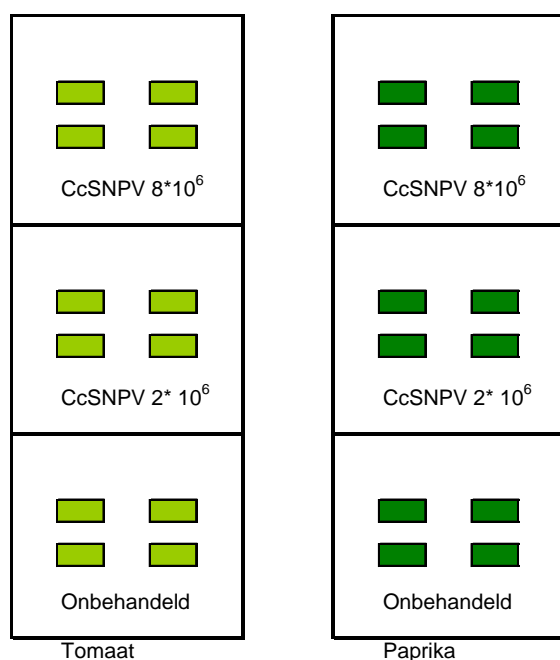
Het virus was afkomstig van een stockoplossing van viruszieke rupsen van 22 april 2002 met 50% glycerol. De virussuspensie was gedurende anderhalf jaar bewaard bij 5°C. De proef werd uitgevoerd bij PPO in Naaldwijk, in één kasje van 10 m<sup>2</sup>. Hiervoor werden op 28 mei 2004 12 tomatenplanten cultivar Moneydor en 12 paprikaplantjes cultivar Doobey in groepjes van 3 X 4 neergezet op watertafels (figuur 10). Alle planten werden gezaaid in potjes met potgrond. Op de tafels werd eenmaal per dag automatisch water en voeding gepompt en er was een overstort aanwezig zodat het teveel aan water werd weggevoerd.

Gedurende de gehele proef werd geen gewasverzorging uitgevoerd, waardoor de planten 'bossig' uitgroeiden. Om te voorkomen dat de rupsen van de ene groep naar de andere konden overlopen werd er tussen de groepen planten een plastic zeil gespannen.

Op 22 juni werden op iedere plant 30 eieren van de turkse mot gezet. De eieren waren afkomstig uit een kweek van PPO en waren één dag oud.

Op 2 juli werd het L2 stadium bereikt en werd het aantal rupsen per plant geteld. Vervolgens werd per plant 100 ml spuitvloeistof gespoten met één van de drie behandelingen. De spuitvloeistof werd toegediend met plantenspuitjes met een inhoud van 770 ml.

Drie weken na de bespuitingen werd op iedere plant het aantal levende rupsen en poppen geteld door alle bladeren één voor één te plukken en te bekijken.



Figuur 10. Overzicht kasproef met tomaat en paprika.

### 8.3 Resultaten & discussie

Bij de voortelling op 2 juli werden iets meer rupsen teruggevonden op de tomatenplanten. Een verklaring kan zijn dat minder mortaliteit bij het uitkomen van de eieren optreedt bij een iets hogere luchtvochtigheid in de bladlaag. Tomatenbladeren zijn sterk behaard, terwijl paprikabladeren volledig glad zijn en daardoor ook een lagere luchtvochtigheid in de bladlaag hebben. De eindtelling op 23 juli was nauwkeuriger doordat alle bladeren geplukt en bekeken werden. Dat verklaart waarom bij de eindtelling soms meer rupsen worden teruggevonden dan bij de voortelling.

De virusbespuitingen op tomaat hadden géén effect op de rupsen van turkse mot. Bij paprika lijkt alleen de hoge dosering een effect te hebben, echter bij de voortelling lagen de aantallen ook al laag (tabel 10). Slechts enkele dode rupsen werden gevonden, wat aangeeft dat in beide gewassen het virus onvoldoende heeft gewerkt. Door deze slechte werking kon het waardplanteffect in dit experiment niet worden aangetoond. De slechte werking van het virus is mogelijk toe te schrijven aan de bewaaromstandigheden van de stockoplossing. Dezelfde bewaaromstandigheden hebben géén effect op het virus van floridamot (SeNPV). Bij andere experimenten werd ChchNPV bij lagere temperaturen bewaard (-20°C), wat waarschijnlijk beter is om de werking van het virus te kunnen waarborgen.

Tabel 10. Totaal aantal teruggevonden rupsen en levende poppen op 2 juli, vlak voor de bespuiting van het L2-stadium, en bij de eindebeoordeling op 23 juli.

behandeling	tomaat		paprika	
	2 juli	23 juli	2 juli	23 juli
onbehandeld	50	44	43	47
ChchNPV 2*10 <sup>6</sup>	38	52	41	40
ChchNPV 8*10 <sup>6</sup>	52	42	33	31

## 9 Effectiviteit van ChchNPV tegen turkse mot op gerbera

### 9.1 Inleiding

In de hiervoor beschreven kasproeven is ChchNPV getoetst op werkzaamheid tegen turkse mot op tomaat en paprika. Daaruit bleek al dat de waardplant een bepalende rol kan spelen bij de effectiviteit van het virus. De firma Certis is bereid gevonden het nieuwe virus te toetsen als behandeling tegen turkse mot op gerbera. Gerbera is een belangrijk sierteeltgewas waar veel problemen kunnen optreden met turkse mot. Vanwege de vertrouwelijke status van het onderzoek van Certis, zijn hier alleen de resultaten van de virusbehandeling en de controlebehandeling gepresenteerd.

### 9.2 Materiaal en methoden

Op een proeflocatie in Horst is een kasproef opgezet met potgerbera (verschillende cultivars door elkaar) en turkse mot. ChchNPV werd als één van de tien behandelingen meegenomen. De tien behandelingen werden in driefout als een gewarde blokkenproef aangelegd. Per plot waren 10 planten beschikbaar, waarop totaal 30 rupsen van turkse mot werden uitgezet, namelijk 15 L1 en 15 L2. De rupsen werden uitgezet op 24 maart 2004. Op 26 maart en 2 april werden de behandelingen gespoten met een spuitpistool bij 5 bar druk en een volume van omgerekend 1000 l/ha. ChchNPV werd gespoten in een dosering van  $4 \cdot 10^6$  viruspolyeders/ml. De kastemperatuur was ingesteld op een dagtemperatuur van 20 °C en een nachttemperatuur van 18 °C.

Het aantal bladeren met vraat en het percentage bladoppervlakte met vraat werd per plant beoordeeld op 26 maart, 2 april en 9 april in 2004. Het aantal levende en dode rupsen werd per plot geteld op 2 en 9 april 2004.

### 9.3 Resultaten & discussie

De kasproef op gerbera laat zien dat de virusbehandeling qua vraatschade niet verschilt van de controlebehandeling (tabel 11). De cijfers zijn statistisch niet significant verschillend. Dit is te verklaren door de trage werkzaamheid van het virus in deze proef. Dode rupsen werden pas aan het einde van de proef waargenomen (tabel 12). Het virus was uiteindelijk zeer effectief met 100 procent doding (tabel 12).

Tabel 11. Vraatschade van turkse mot bij gerberaplanten op drie beoordelingsmomenten.

behandeling	gemiddeld # bladeren met vraat/plant			gemiddeld % bladoppervlakte met vraat		
	26-mrt	02-apr	09-apr	26-mrt	02-apr	09-apr
controle	4.1	12.5	28.6	4.7	10.0	7.7
ChchNPV $4 \cdot 10^6$	3.6	13.1	20.8	3.3	10.0	7.3

Tabel 12. Aantal levende en dode rupsen van turkse mot bij gerberaplanten op twee beoordelingsmomenten.

behandeling	gemiddeld # levende rupsen/plot		gemiddeld # dode rupsen/plot	
	02-apr*	09-apr*	02-apr*	09-apr*
controle	4.7 a	5.0 a	1.3 a	1.0 b
ChchNPV $4 \cdot 10^6$	5.0 a	0.0 b	0.7 a	11.0 a

\* Verschillende letters duiden op statistisch betrouwbare verschillen ( $p < 0.05$ )



## 10 Conclusies en discussie

In dit onderzoek is een nieuw, nog niet eerder beschreven baculovirus van turkse mot, *Chrysodeixis chalcites*, onderzocht. In een overzichtstabel (tabel 13) zijn de eigenschappen van ChchNPV weergegeven ten opzichte van een standaard biologisch middel, *Bacillus thuringiensis*, en een standaard chemisch middel, namelijk teflubenzuron (Nomolt).

Positief aan ChchNPV is dat het zeer effectief kan zijn, zeer selectief is, op alle rupsenstadia werkt en iets persistenter is dan Bt. Beperkend aan het virus is dat het niet werkt tegen alle schadelijke rupsensoorten en kennelijk niet onder alle omstandigheden even effectief is. Opvallend is de slechte werking op tomaat. De onderzoeksresultaten met ChchNPV bieden op dit moment onvoldoende perspectief om te investeren in toelating als gewasbeschermingsmiddel. Meer fundamenteel onderzoek, met eventueel een andere gastheer van ChchNPV en onder diverse kasomstandigheden, biedt mogelijk meer kansen om de potenties van het virus als bestrijdingsmiddel zichtbaar te maken. Het is wenselijk dat zeer selectieve middelen als baculovirussen, in de toekomst een andere status krijgen met lagere registratiekosten. Bij verandering van deze status is het goed mogelijk dat ChchNPV wel mogelijkheden biedt als gewasbeschermingsmiddel, zeker wanneer de lage productiekosten in ogenschouw worden genomen.

Tabel 13. Overzicht van eigenschappen van de middelen Bt, ChchNPV en teflubenzuron. **Vetgedrukte tekst** geeft een beperkende eigenschap aan.

eigenschappen	<i>Bacillus thuringiensis</i>	ChchNPV	teflubenzuron
werkingsmechanisme	enkele uren na inname van Bt-toxinen een vraatstop	virus vermeerdert zich in darm, rups sterft door uithongering	grijpt in op vervellingsmechanisme
werkingsduur	zeer snel	<b>iets trager dan Bt, afhankelijk van dosis, soms zeer traag</b>	iets trager dan Bt
compatibiliteit met natuurlijke vijanden	volledig compatibel	volledig compatibel	<b>niet compatibel met roofwantsen en galmuggen</b>
compatibiliteit met gewas gastheerspectrum (= marktpotentie)	werkt gewasonafhankelijk brede werking, floridamot, <i>Spodoptera exigua</i> , minder gevoelig	<b>slechtere werking op tomaat beperkt tot Plusiinae: <i>Chrysodeixis chalcites</i> <i>Autographa gamma</i> <i>Trichoplusia ni</i></b>	werkt gewasonafhankelijk werkzaam tegen alle rupsensoorten
vatbare rupsenstadia	<b>alleen jonge stadia</b>	alle stadia	alle stadia
resistentie	<b>is mogelijk, nog niet geconstateerd</b>	niet mogelijk	<b>is mogelijk, nog niet geconstateerd</b>
persistentie	<b>afhankelijk van instraling ca. 1 week werkzaam</b>	iets persistenter dan Bt, in dit onderzoek is een werkzaamheid van tenminste 17 dagen is vastgesteld	zeer persistent, in dit onderzoek is een werkzaamheid van tenminste 17 dagen is vastgesteld
beschikbaarheid betrouwbaarheid	toegelaten <b>afhankelijk van rupsenstadia en instraling</b>	<b>nog niet toegelaten afhankelijk van instraling en gewas</b>	toegelaten zeer betrouwbaar
kosten per ha bij éénmalige bespuiting	ca. 30-35 €/ha	nog niet bekend	ca. 125 €/ha



# 11 Literatuur

- Anonymous. 1999. Guideline for the efficacy evaluation of plant protection products. PP1/152(2). Design and analyses of efficacy evaluation trials. p37-51.
- Anonymous. 2001. Criteria for evaluation and authorisation of plant protection products containing micro-organisms. Draft annex VI microbial pesticides. Draft guidance document. European Commission. sanc/1023. 71p.
- Bulach, D. M., Kumar, C. A., Zaia, A., Liang, B. & Tribe, D. E. (1999). Group II nucleopolyhedrovirus subgroups revealed by phylogenetic analysis of polyhedrin and DNA polymerase gene sequences. *Journal of Invertebrate Pathology* 73, 59-73.
- Possee, R.D., Hirst, M., Jones, L.D., Bishop, D.H.L., Cayley, P.J. 1993. Field tests of genetically engineered baculoviruses. BCPC Monograph no 55: 23-36.
- Oers, M. M. van., Herniou, E.A., Usmany, M., Messelink, G.J., Vlak, J.M. 2004. Identification and characterization of a DNA photolyase-containing baculovirus from *Chrysodeixis chalcites*. *Virology* 330: 460-470.
- Van Regenmortel, M. H. V., Fauquet, C. M., Bishop, D. H. L., Carstens, E. H., Estes, M. K., Lemon, S. M., Maniloff, J., Mayo, M. A., McGeoch, D., Pringle, C. & Wickner, R. B. (2000). Virus taxonomy, classification and nomenclature of viruses. Seventh report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. San Diego: Academic Press, Inc.,.





## Bijlage 1, Verklarende woordenlijst

baculovirus =	bepaald type virus dat een fatale ziekte veroorzaakt in insecten
DNA =	desoxyribonucleïnezuur, het hoofdbestanddeel van chromosomen en de drager van de erfelijke informatie van organismen
filtraat =	datgene wat bij filtreren het filter passeert.
fylogenie =	de evolutionaire geschiedenis van een groep organismen
gen =	eenheid van erfelijk materiaal, die alleen of met andere genen een eigenschap van een organisme bepaald
genoom =	de totale set van chromosomen met daarop alle erfelijke informatie
homogenaat =	datgene wat na homogenisatie overblijft
homogeniseren =	fijnmaken en mengen
kernpolyeders =	eiwitomhulsel van een baculovirus
PCR =	polymerase chain reaction, een methode om DNA te vermeerderen in de reageerbuis
polyeders =	veelvlak, door vier of meer vlakken begrensd lichaam
primer =	klein stukje DNA, dat gelijk is aan een bepaald stukje erfelijk materiaal en gebruikt wordt om dit DNA te vermeerderen
sequencing =	Het ontrafelen van de erfelijke informatie
virus =	een klein deel erfelijk materiaal, omgeven door een eiwitmantel, dat ziekten bij planten, dieren of mensen kan veroorzaken. Virussen kunnen zich alleen in levende weefsels vermeerderen.



## Bijlage 2. Informatie Helpdesk CTB

Behandeld door dhr. ir. A.W.H.M. Meijs doorkiesnummer 471862

Datum 3 april 2003

Betreft: Verzoek Helpdesk, verzoeknummer HD2003-06  
ChchNPV *Chrysodeixis chalcites*

In antwoord op uw bovengenoemd verzoek aan de Helpdesk Toelatingen d.d.10 februari 2003 deel ik u het volgende mede.

Het betreft een baculovirus van *Chrysodeixis chalcites* dat mogelijk gebruikt zou kunnen worden in de bestrijding van *Chrysodeixis chalcites*, turkse mot, in de tuinbouw.

In zijn algemeenheid kan m.b.t. het baculovirus het volgende worden gezegd:

ChchNPV is een baculovirus van de turkse mot (*Chrysodeixis chalcites*), dat toegepast kan worden in de glastuinbouw ter bestrijding van turkse mot. .

Van baculovirussen is bekend dat ze zeer gastheerspecifiek zijn. In het onderhavige geval betreft het een baculovirus uit turkse mot, dat pathogeen is. Uit de adviesaanvraag wordt opgemaakt dat de werking van het virus nog onvoldoende bekend is.

De dossiervereisten voor een microbiologisch middel zijn vastgelegd in aanvraagformulier M, hetgeen volledig gelijk is aan de Europese dossiervereisten als vastgelegd in doc 2001/36/EG.

Volledigheidshalve verwijs ik daar naar. Voor het uitvoeren van studies met micro organismen wordt hierin verwezen naar de US-EPA richtlijnen, series 885 (te vinden op [www.epa.gov/opptsfrs/OPPTS\\_Harmonized/885\\_Microbial\\_Pesticide\\_Test\\_Guidelines/Series/](http://www.epa.gov/opptsfrs/OPPTS_Harmonized/885_Microbial_Pesticide_Test_Guidelines/Series/)).

In dit stadium hebt u specifieke vragen in relatie tot de reeds bekende kennis van het baculovirus en het reeds toegelaten middel Spod-X GH, toelatingsnummer 11334 N. Voor zover overigens gegevens uit dat dossier gebruikt kunnen worden vindt u in onderstaande toelating aangegeven. Ik wijs er wel op dat de indiener van de aanvraag toestemming moet hebben van de toelatinghouder van Spod X GH om die gegevens ook voor het dossier *Chrysodeixis chalcites* te mogen gebruiken. Aangezien het hier een nieuw agens betreft zal een aanvraag tot plaatsing op Annex I van 91/414/EEG gedaan moeten worden en zal de Europese procedure hiervoor gevolgd moeten worden.

Gevraagd wordt - ter voorbereiding van een mogelijk in te dienen aanvraag - naar antwoorden op de volgende vragen:

### **1. in welke mate moet de effectiviteit van het middel worden aangetoond met bioassay's en kasproeven?**

Antwoord:

De microbiologische dossiervereisten gaan niet expliciet in op de werking.

Voor een chemisch middel gelden regulier de volgende vereisten: 3-4 geslaagde proeven per gewas of representatieve gewasgroep, herhaald over een periode van twee jaar. Sinds enkele jaren is het beleid om met een set van aangepaste vereisten te werken voor microbiologische middelen. De lijn is hierbij dat het minimaal noodzakelijke pakket aan gegevens als vereiste is gesteld. In dit geval is het een baculovirus-turkse mot-gewas-complex. Omdat het geformuleerde viruspreparaat in de regel toegepast zal gaan worden in een gewas, zijn gegevens over de werking en nevenwerkingen noodzakelijk. Aangeraden wordt om het meest kwetsbare gewas als toetsgewas te kiezen, gedacht wordt aan een twee- tot drietal proeven in komkommer of tomaat en een twee- tot drietal proeven in een siergewas (roos of chrysant). Immers bepalend voor de werking (met uiteindelijk doel het beperken van de schade) is de snelheid waarmee de rupsen geïnfecteerd en geparasiteerd worden en

sterven. Indien de rupsen nog lang in leven blijven, kunnen ze –hoewel verzwakt- nog steeds vreeschade aanrichten.

De werking kan ten dele in laboratorium- en –kasproeven worden onderzocht, met name ook zaken als afbraak door licht en UV. Enkele (semi) praktijkproeven zijn voor de beoordeling van de werking onder praktijkomstandigheden noodzakelijk.

De vraag zou beantwoord kunnen worden door middel van een drie- tot viertal proeven uitgevoerd in komkommer of tomaat en een drie- tot viertal proeven uitgevoerd in chrysant of roos, ter bepaling van de werking en mogelijke fytotoxiciteit.

## **2. in hoeverre moet de gastheerspecificiteit worden bepaald en volgens welke protocollen?**

Antwoord:

De vraag naar gastheerspecificiteit is ook van belang voor de milieubeoordeling, met name de effecten op niet-doelwit planten en dieren (waaronder arthropoden). Vooral voor dit onderdeel zouden de vragen door een goede literatuurstudie beantwoord kunnen worden. Hierbij wordt gedacht aan bv. bevindingen van (internationale) collega onderzoekers (vb. S.M. Thiem van Michigan State University etc.). Mogelijk dat een snelle toets voorhanden is. Vraag P.06.6.4 van het aanvraagformulier vraagt expliciet naar de (neven)effecten op nuttige en niet-doelwit organismen. Overeenkomstig de vraag voor gewasbeschermingsmiddelen wordt hier voornamelijk naar de effecten op natuurlijke vijanden in geïntegreerde teeltsystemen gevraagd. Een onbedoelde bestrijding van nuttige organismen als gevolg van de behandeling kan resulteren in het ontstaan van een nieuwe ziekte- of plaaguitbraak.

De vraag zou beantwoord kunnen worden door middel van een gedegen literatuurstudie naar gastheerspecificiteit;

## **3. kunnen de toxicologische gegevens van het baculovirus SpodX gebruikt worden voor het toelatingsdossier van ChchNPV, het baculovirus van turkse mot?**

Antwoord:

Voor het baculovirus van *Spodoptera exigua*, SeNPV, is plaatsing op Annex I van 91/414 aangevraagd. De 'stof' bevindt zich in de eindfase van de behandeling. Het dossier was volledig verklaard; in zgn. 'expert-meetings' is echter besloten dat nog een aantal gegevens geleverd moeten worden.

Het toxicologische dossier van SeNPV bestaat grotendeels uit studies en openbare literatuur met NPV's, die specifiek zijn voor andere insectensoorten dan *S. exigua*. In de laatste EU-vergadering is besloten dat nog een aantal studies, specifiek uitgevoerd met SeNPV, geleverd moeten worden. Dit komt voort uit het feit dat het virus wordt geleverd in een rupsensoort specifieke formulering. De 'rupsenbestanddelen' kunnen een specifieke toxiciteit hebben, waarover gegevens geleverd moeten worden (toxiciteit van de formulering; zie vraag 4.1 van Bijlage I: acuut orale toxiciteit/pathogeniteit van het geformuleerde product). Daarnaast kunnen de studies met andere NPV's worden gebruikt; de infectiviteit en pathogeniteit van het virus kan worden geëvalueerd op basis van studies met verschillende NPV soorten, daar de verschillende soorten een zeer smalle gastheerspecificiteit vertonen.

De inschatting van het CTB is dat het Europese dossier van SeNPV grotendeels gebruikt kan worden voor het toelatingsdossier van ChchNPV. Daarnaast zullen een aantal specifieke studies met ChchNPV geleverd moeten worden.

Naar aanleiding van EU-beslissingen m.b.t. SeNPV staan voor dit virus nog een aantal vragen open. De bijgesloten tabel (Bijlage I) geeft hiervan een overzicht. Deze tabel geeft een indruk van welke gegevens in elk geval ook voor ChchNPV geleverd zullen moeten worden.

Bijlage II geeft een overzicht van de studies in het dossier van SeNPV.

## **4. tot op welk niveau moet het virus worden gekarakteriseerd? Is een volledige sequencing een vereiste?**

Antwoord:

Volgens Richtlijn 2001/36/EG dient de stam van het organisme te worden geïdentificeerd en gekarakteriseerd met behulp van de beste technieken die daarvoor beschikbaar zijn.

Ervaringen met de twee toegelaten baculovirussen in Nederland (Spod-X en Madex) zijn er

identificatie technieken gebruikt die gebaseerd zijn op morfologie van het virus, biochemische en serologische karakteristieken en restriction endonuclease (REN) patronen van het DNA. Ook de specifieke werking is een karakteristiek. Al deze eigenschappen bij elkaar geven een goede karakterisering van het virus.

In het wetenschappelijk onderzoek naar baculovirussen wordt de volgorde van de base paren van het DNA in kaart gebracht (sequencing). Dit is naar de huidige stand van de techniek de beste methode voor de identificatie. Om dit als een vereiste voor een toelating verplicht te stellen gaat op dit moment wat ver.

REN patronen is voorlopig voldoende voor de identificatie van baculovirussen.

##### **5. bestaan er protocollen voor het uitvoeren en aanleveren van gegevens over de persistentie van het virus. Wat is noodzakelijk voor een dossier?**

Antwoord:

In Bijlage I van 2001/36/EG wordt onder 2.5 gevraagd naar de persistentie van het micro-organisme. Hiermee wordt gevraagd hoelang het micro-organisme na toediening volgens het gebruiksvorschrift op het behandelingsobject aanwezig en werkzaam blijft.

Er bestaat geen protocol voor het uitvoeren van het onderzoek.

De gegevens geleverd bij Spod-X zijn experimentele gegevens op planten met het floridamotvirus.

Verder is dit in de verschillende dossiers onderbouwd met literatuur gegevens over andere baculovirussen m.b.t. effecten van zonlicht, UV-straling, temperatuur, water en chemicaliën).

Voor een nieuwe aanvraag is experimenteel onderzoek op planten met het aangevraagde virus gewenst. Dit kan verder ondersteund worden met gegevens uit de literatuur over de invloed van factoren (zoals temperatuur, vocht, zonlicht en pH) die de overleving van het micro-organisme op het bladoppervlak kunnen beïnvloeden.

De informatie en aanbevelingen in deze brief zijn met de grootste zorg samengesteld, op basis van de beschikbaar gestelde gegevens en de huidige stand van de wetenschap, zonder rekening te houden met in de toekomst te stellen (dossier)vereisten, dan wel dat het de mening van het CTB weergeeft omtrent een in te dienen aanvraag tot toelating van een bestrijdingsmiddel. De informatie en aanbevelingen in deze brief zijn bedoeld om de toekomstige aanvrager te ondersteunen, maar zijn niet juridisch bindend.

Bijlage I : opgave van aanvullende vragen Europese dossier Spodoptera exigua

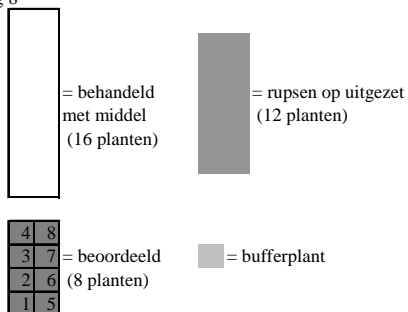
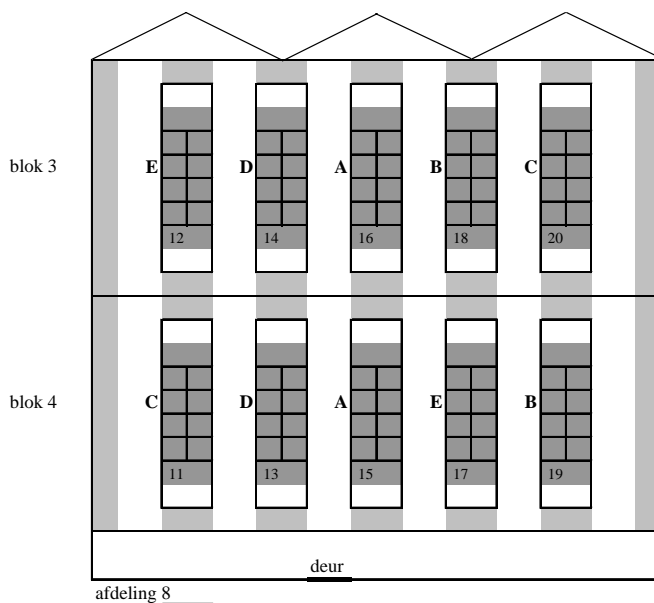
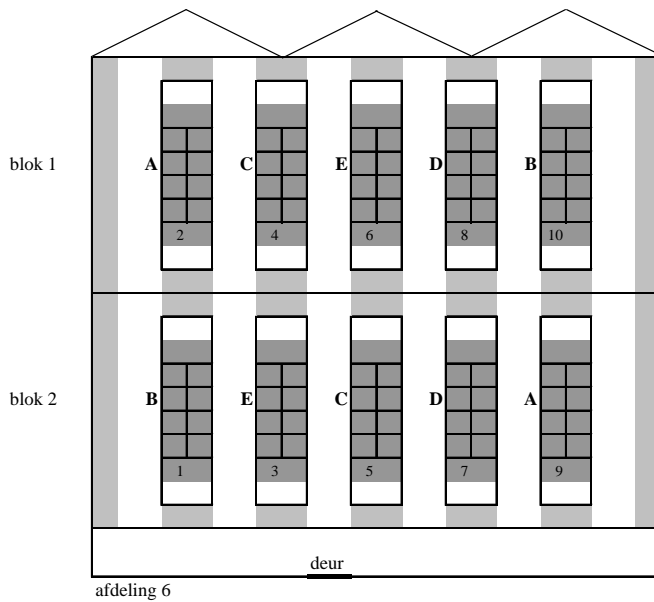
Bijlage II : overzicht gegevens in Europese dossier Spodoptera exigua

dhr. ir. A.W.H.M. Meijs



# Bijlage 3, plattegrond kasproef 1 in tomaat

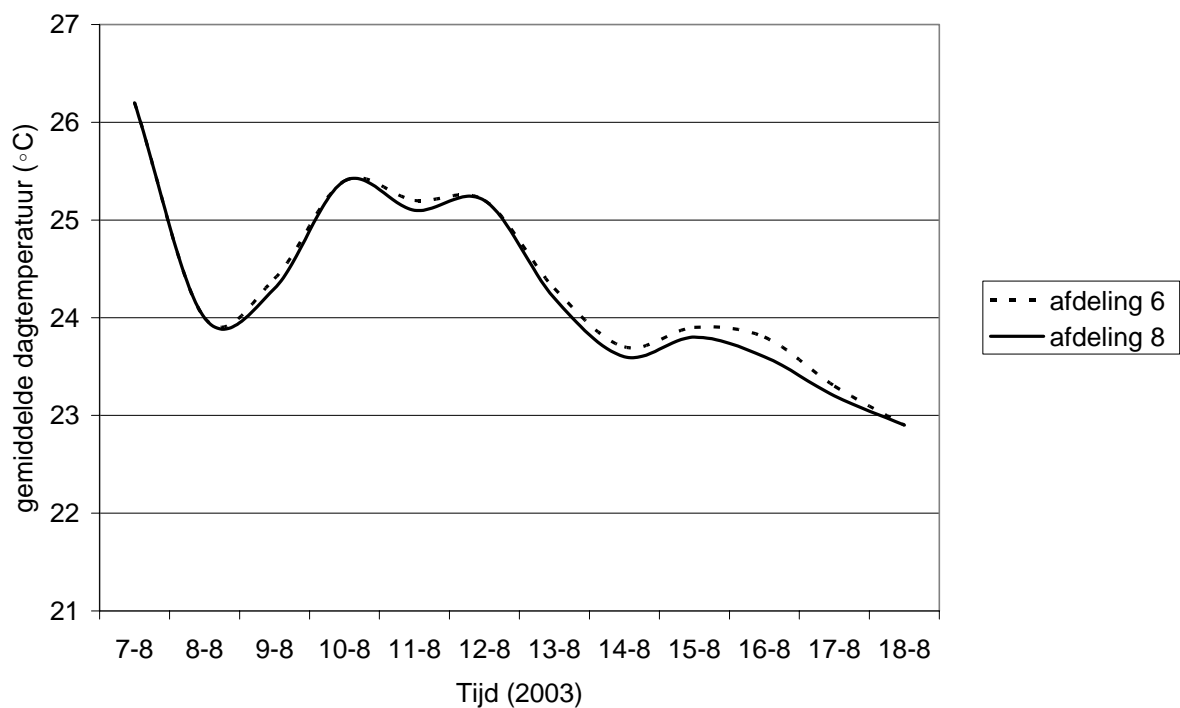
Kassencomplex 103 afdeling 6 en 8, afmetingen per afdeling: 9,6 bij 14,5m = 139m<sup>2</sup>, 12 plantrijen met 20 tomatenplanten per rij.



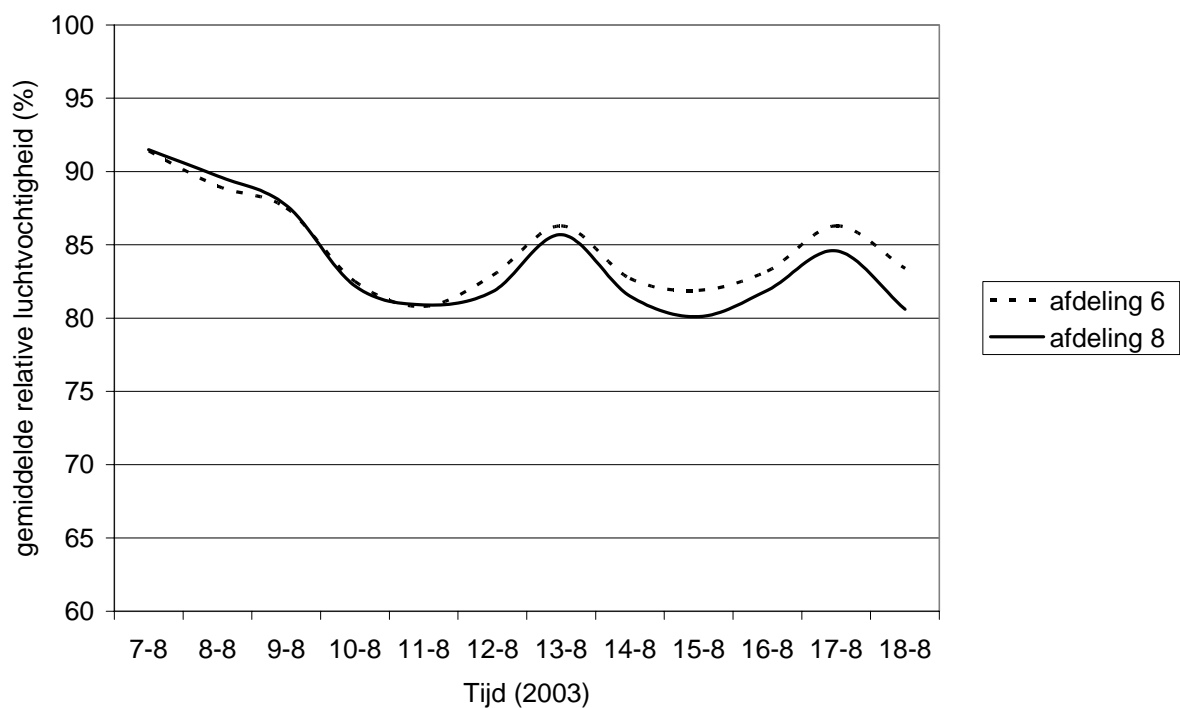




## Bijlage 4: klimaatgegevens kasproef 1 op tomaat



Figuur 11. gemiddelde dagtemperatuur in twee kasafdelingen tijdens kasproef 1 op tomaat.

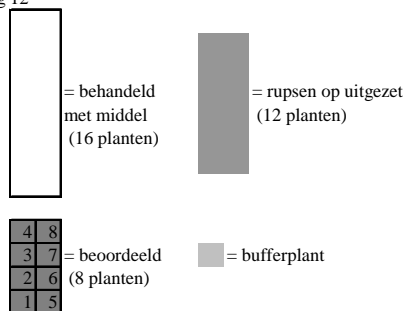
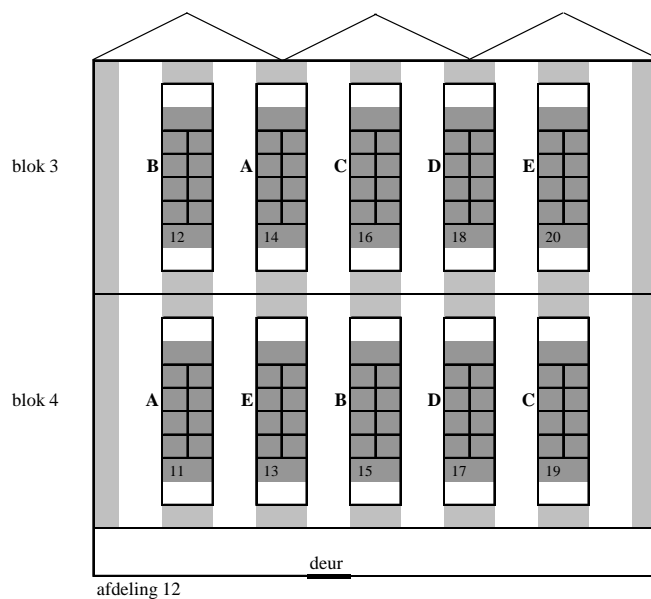
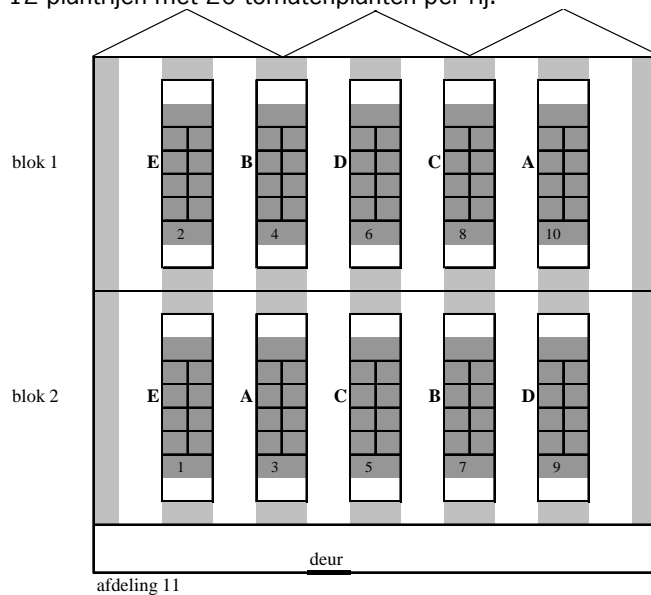


Figuur 12. Gemiddelde rv in twee kasafdelingen tijdens kasproef 1 op tomaat



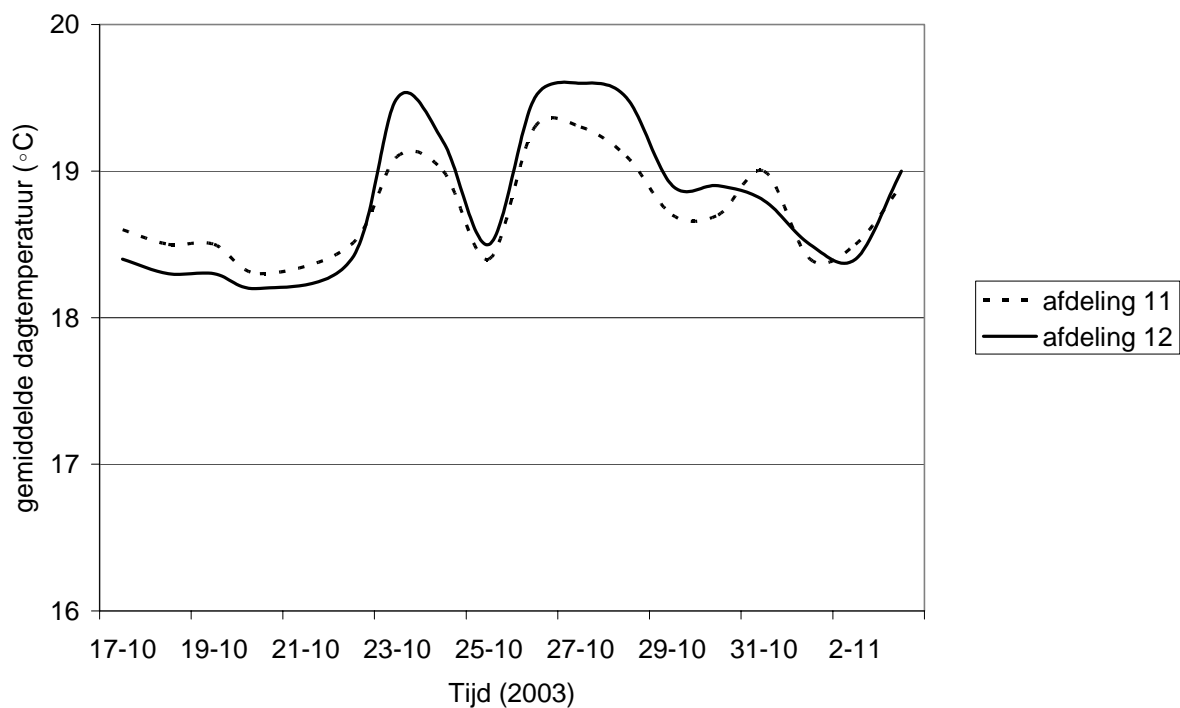
## Bijlage 5, plattegrond kasproef 2 in tomaat

Kassencomplex 103 afdeling 11 en 12, afmetingen per afdeling: 9,6 bij 14,5m = 139m<sup>2</sup>,  
12 plantrijen met 20 tomatenplanten per rij.

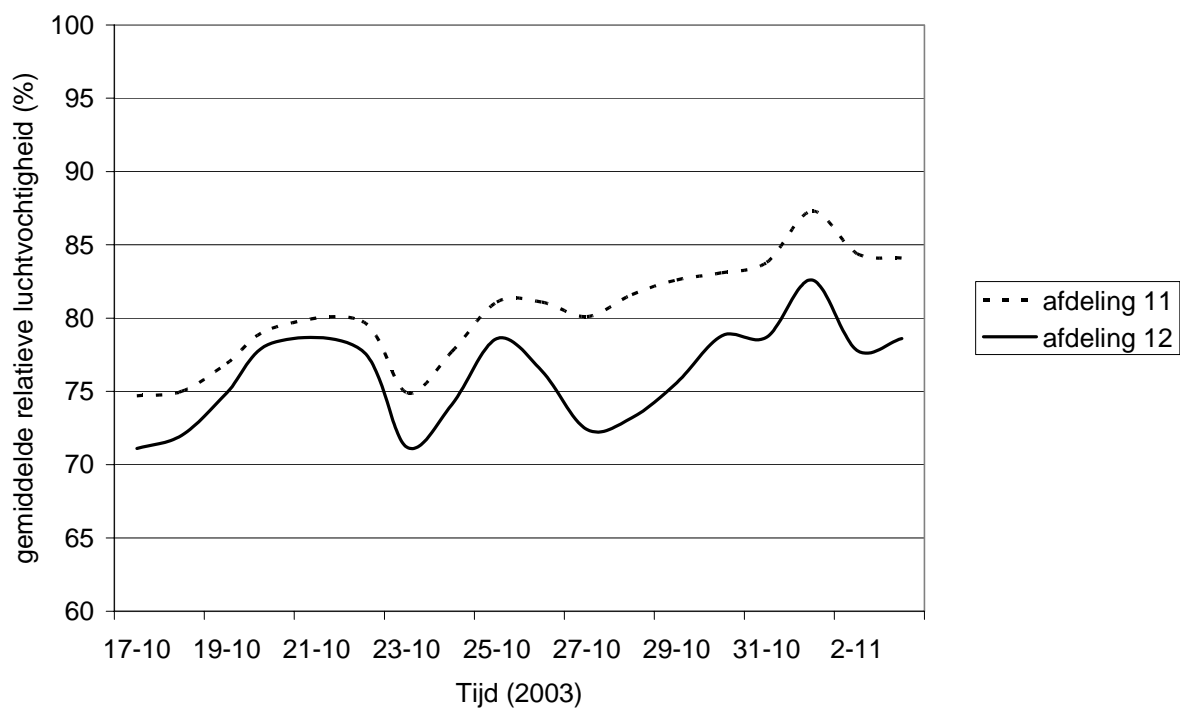




## Bijlage 6: klimaatgegevens kasproef 2 op tomaat



Figuur 13. gemiddelde dagtemperatuur in twee kasafdelingen tijdens kasproef 2 op tomaat.

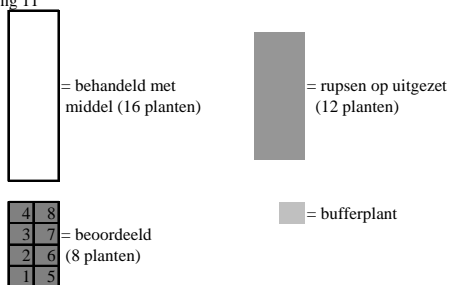
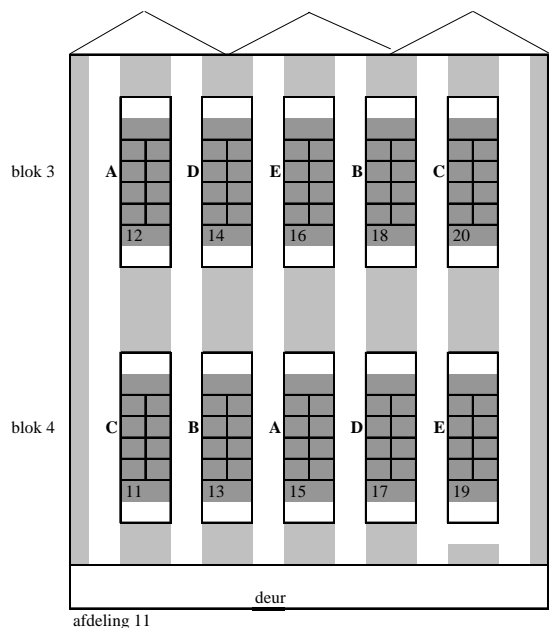
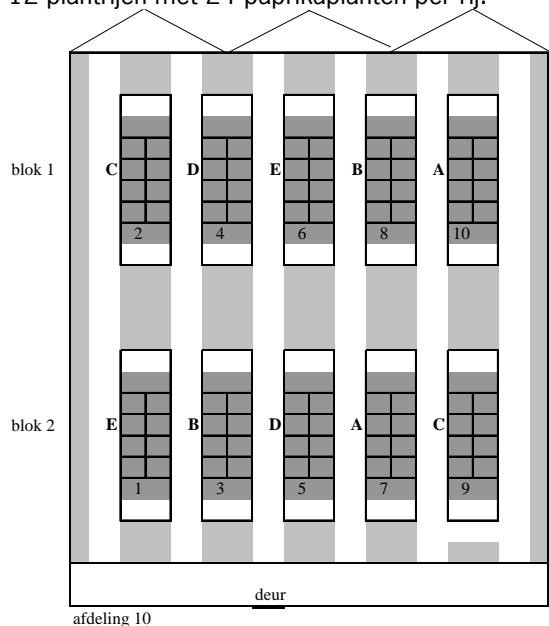


Figuur 14. Gemiddelde rv in twee kasafdelingen tijdens kasproef 2 op tomaat



## Bijlage 7, plattegrond kasproef 3 in paprika

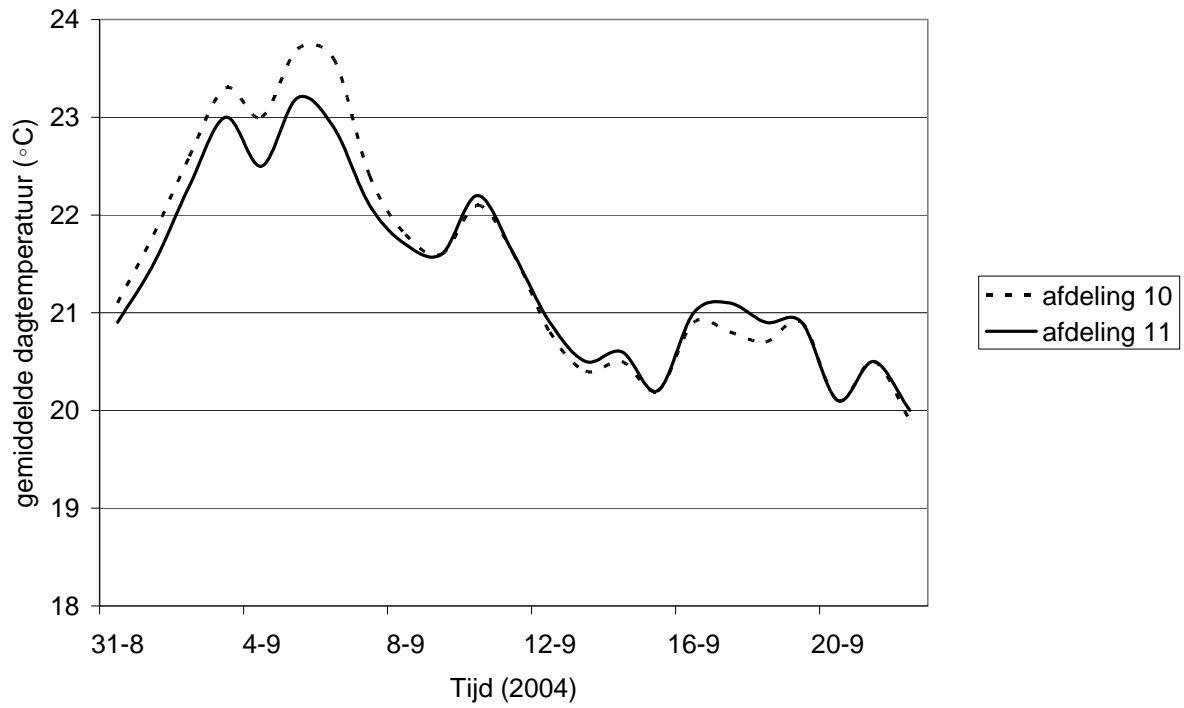
Kassencomplex 103 afdeling 10 en 11, afmetingen per afdeling: 9,6 bij 14,5m = 139m<sup>2</sup>,  
12 plantrijen met 24 paprikaplanten per rij.



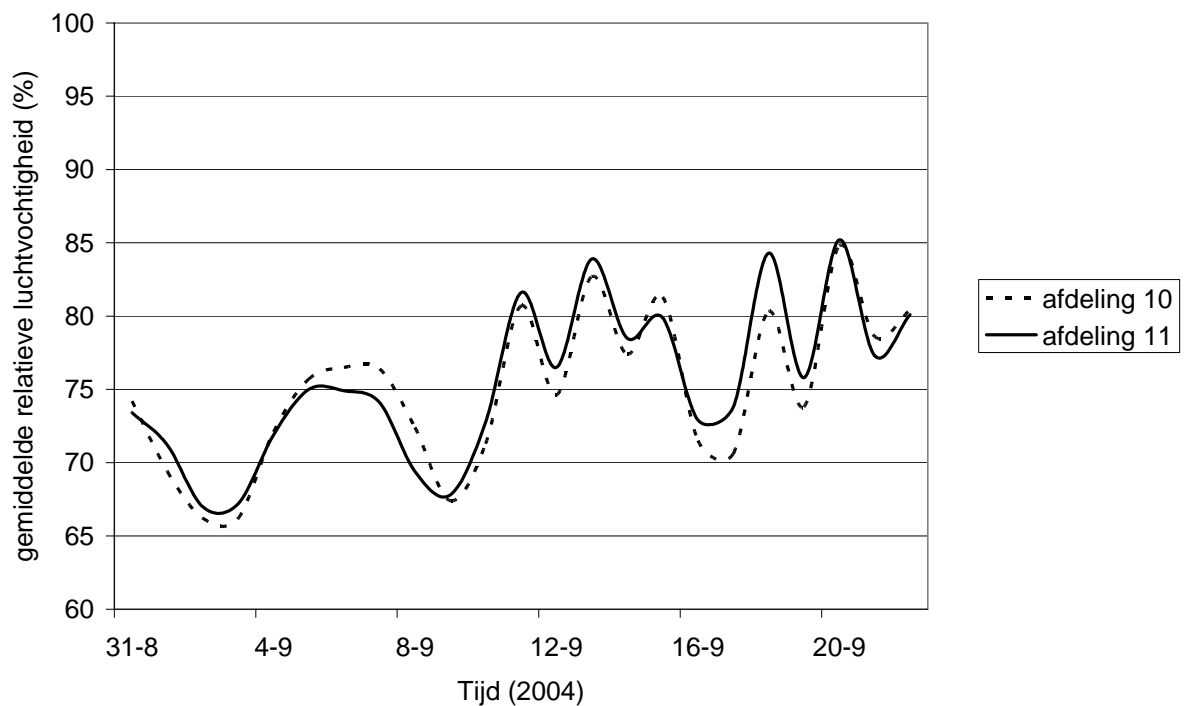




## Bijlage 8: klimaatgegevens kasproef 3 op paprika



Figuur 15. gemiddelde dagtemperatuur in twee kasafdelingen tijdens kasproef 3 op paprika.

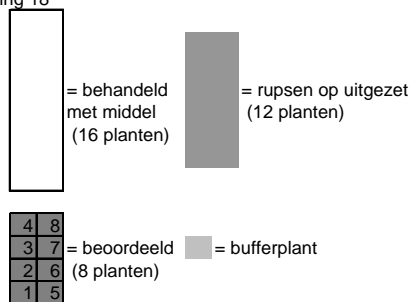
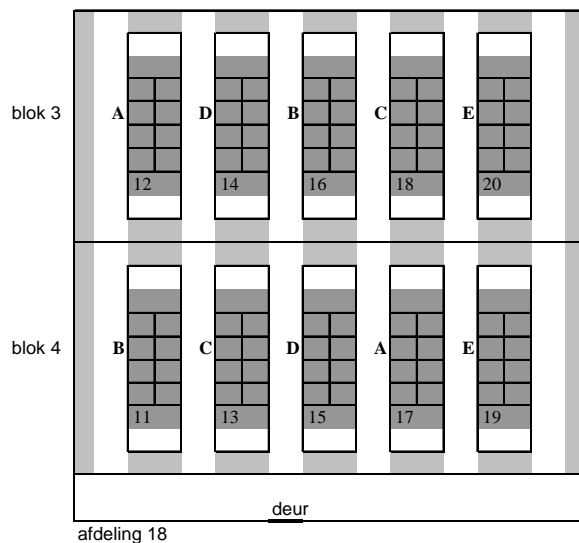
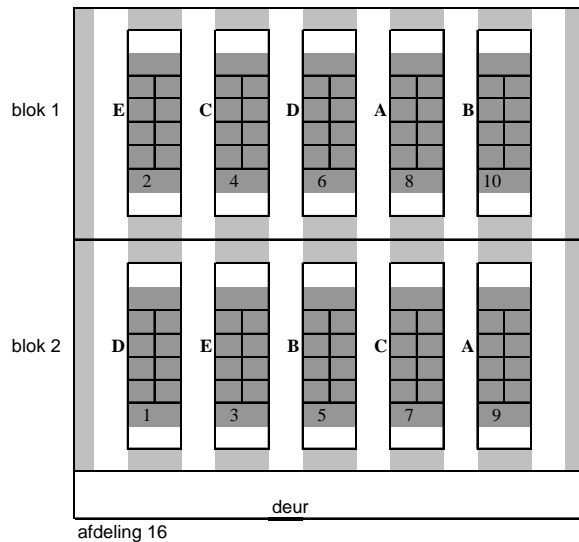


Figuur 16. Gemiddelde rv in twee kasafdelingen tijdens kasproef 3 op paprika



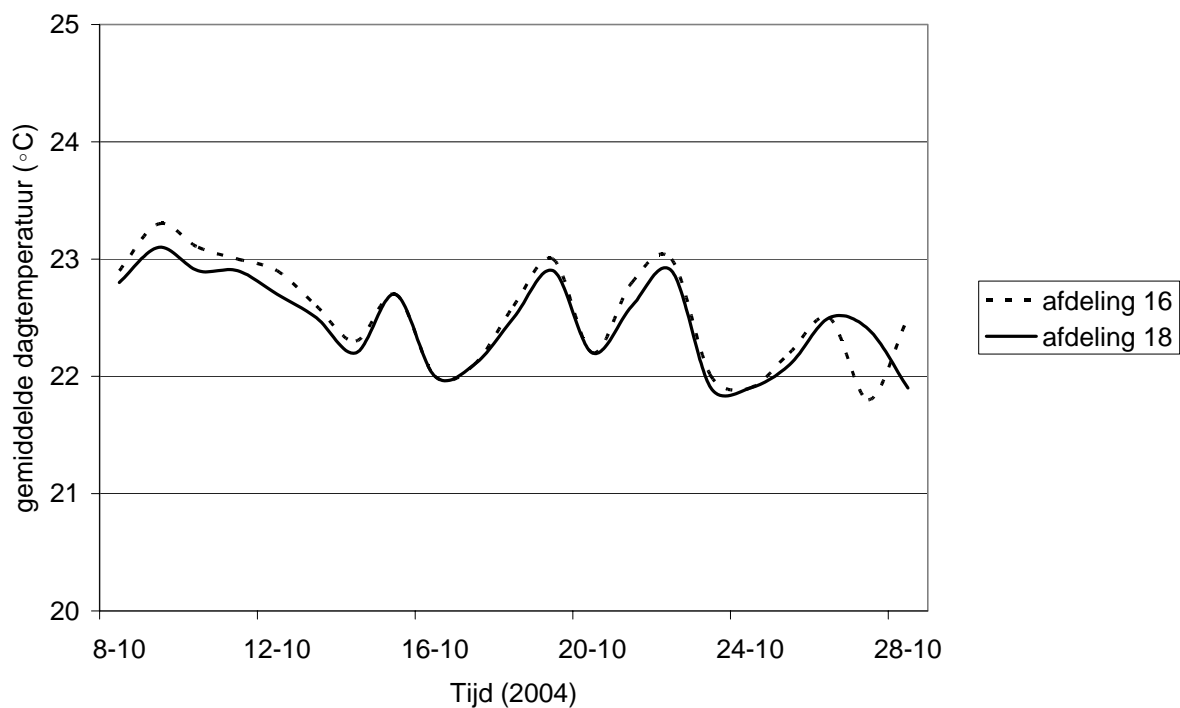
## Bijlage 9, plattegrond kasproef 4 in tomaat

Kassencomplex 103 afdeling 16 en 18, afmetingen per afdeling: 12,8 bij 14,5m = 186m<sup>2</sup>,  
12 plantrijen met 20 paprikaplanten per rij.

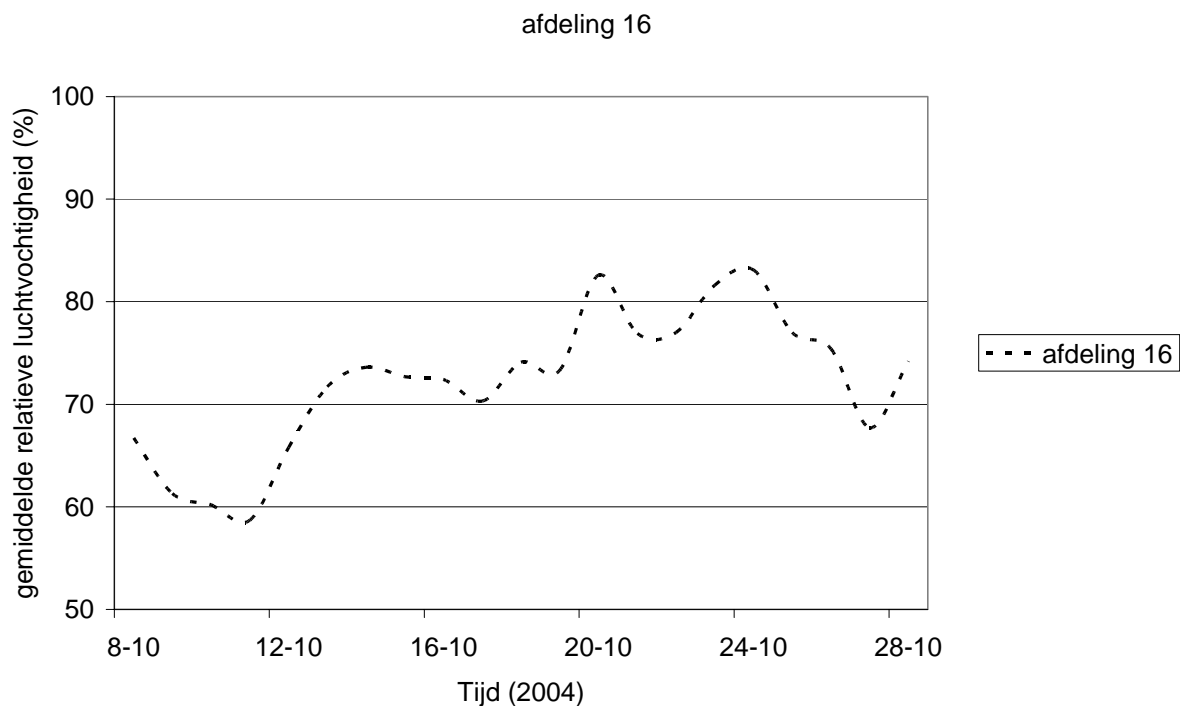




## Bijlage 10: klimaatgegevens kasproef 4 op tomaat



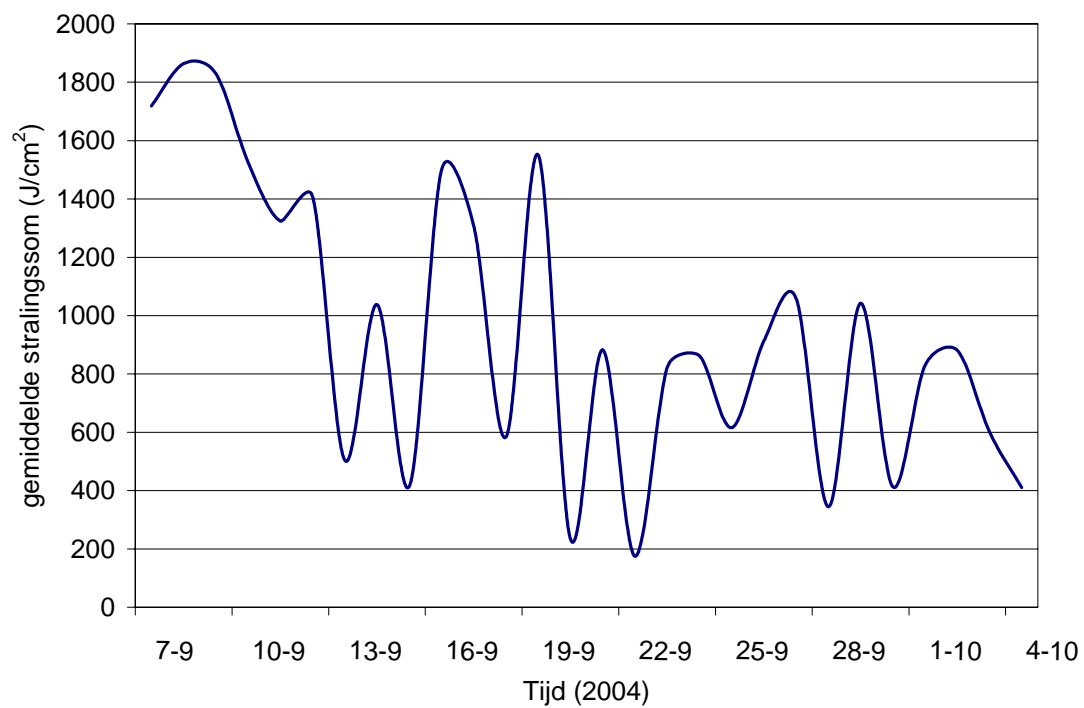
Figuur 17. gemiddelde dagtemperatuur in twee kasafdelingen tijdens kasproef 4 op tomaat.



Figuur 18. Gemiddelde rv in bij afdeling 16 tijdens kasproef 4 op tomaat (rv-meting bij afdeling 18 was verstoord).



## Bijlage 11: instraling tijdens persistentieproef



Figuur 19. Dagfluctuaties van instraling tijdens een persistentieproef.