



Biologische bestrijding van varroa met behulp van schimmels

PPO Bijen, Lonne Gerritsen en Bram Cornelissen

Sinds enkele jaren blijkt er interesse te zijn in de bestrijding van varroamijt met behulp van insectpathogene schimmels (Chandler *et al.*, 2001; Davidson *et al.* 2003; Kanga *et al.* 2002 en 2003; Peng *et al.* 2002; Shaw *et al.* 2002). Insectpathogene schimmels zijn schimmels die insecten en mijten ziek maken en doden. Als een schimmelspore (conidium) op een insect of mijt terecht komt zal de spore kiemen en in de mijt binnendringen. In de mijt vermeerdt de schimmel zich, doodt de mijt en verteert de mijt van binnen. Als er niks meer te eten is groeit de schimmel weer naar buiten en maakt daar nieuwe sporen. Deze sporen komen weer op een andere mijt of een insect terecht en de cyclus begint opnieuw.

Deze schimmels zijn gespecialiseerd op insecten en mijten en zullen dus geen planten of mensen kunnen infecteren. Sommige schimmels kunnen zelfs maar één soort insect of mijt infecteren en laten andere soorten ongemoeid.

Omdat er geen schimmels bekend zijn die specifiek op varroamijt parasiteren is men gaan kijken of bekende insectenpathogene schimmels ook tegen varroa werken. Shaw *et al.* (2002) hebben 40 schimmelstammen getest op pathogeniteit tegen varroa in een laboratoriumtoets. De schimmels behoren tot de families *Metarhizium*, *Lecanicillium* (voorheen *Verticillium*) *Beauveria*, *Paecilomyces* en *Hirsutella*. Bij 25 °C kunnen veel van deze schimmels varroamijten parasiteren en binnen een paar dagen doden. Bij 30 °C zijn er al minder schimmels nog in staat de mijt te doden.

Rond het broed in de bijenkast heerst een temperatuur van 35 °C. Davidson *et al.* (2003) hebben getest welke schimmels nog bij 35 °C konden groeien op agarplaten met kunstmatig medium. Dit waren er al weer minder. Kanga *et al.* (2002) hebben, na een laboratoriumtoets waarin een duidelijk effect van de schimmel op de mijt werd aangetoond, meteen een veldtoets ingezet. Dit bleek heel succesvol. Ze gebruikten de schimmel *Metarhizium anisopliae* in een poedervorm. Dit poeder werd door de bijenkast verstoven of op een strip gecoat en in het volk gehangen. De strips gaven een even goede bestrijding als Apistan (mijten hadden geen Apistan-resistentie).

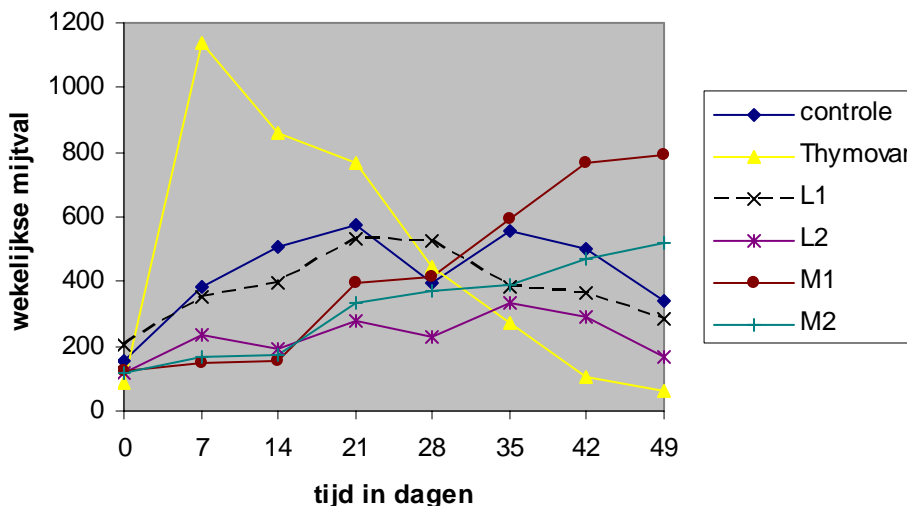


Figuur 1. MiniBeute kastjes met bijenval. Raten met bijen worden bespoten.

Naar aanleiding van dit succes heeft PPO Bijen ook een toets ingezet met insectpathogene schimmels. Omdat de registratie van middelen op basis van schimmels een dure en langdurige zaak

is, werd besloten om eerst de mogelijkheden van de bestaande Nederlandse schimmelpreparaten (gebruikt tegen insecten in land- en tuinbouw) voor de bestrijding van varroa te testen. De geteste middelen waren Vertalec en Mycotal van Koppert Biological Systems B.V., beide op basis van *Lecanicillium lecanii*, en BIO 1020 van Bayer Cropsience B.V. op basis van *Metarhizium anisopliae*. Om deze schimmelproducten te vergelijken met de gangbare bestrijding van varroa werd een behandeling met Thymovar gedaan. Thymovar is een product op basis van de etherische olie thymol, die een dampwerking heeft in de bijenkast. Voor de proef werden bijenvolken in "MiniBeute" kastjes (polystyreenkastjes 30x30x60hcm, 3000 tot 5000 bijen) gebruikt met een vergelijkbare varroa-aantasting. Per behandeling werden 7 volken ingezet. Er werden 6 behandelingen uitgevoerd waarbij de sporen over de raten werden gespoten of gecoat aan rijstkorrels in het volk werden gestrooid. Onder figuur 2 zijn de verschillende behandelingen beschreven.

De concentratie van de sporensuspensie bleek nogal uiteen te lopen; van zeventienduizend ($1,7 \cdot 10^4$) tot meer dan tien miljoen (10^7) sporen per ml (figuur 2, onderschrift). Normaal horen Mycotal en Vertalec ook meer dan tien miljoen sporen per ml te bevatten. Het aantal dode mijten tijdens de behandeling werd geregistreerd door de mijten op bodemplanken te verzamelen en te tellen. Op de bodemplanken lag een lijmplaat, waar de mijten aan vast bleven plakken. De bijensterfte werd vastgesteld door dode bijen te verzamelen in een speciaal daarvoor ontworpen vanginrichting. Deze bijenvallen werden één dag voor de behandeling van de volken voor de kasten geplaatst. Omdat er voor MiniBeute kasten geen bijenvallen op de markt zijn werd er een bijenvall ontworpen door Jeannette van der Aa (figuur 1).



Figuur 2. Het effect van verschillende behandelingen op de mijt *Varroa destructor*.

M1= een suspensie van BIO 1020 *Metarhizium*-sporen in water met 0,01% Triton X-100 (een uitvloeier die zorgt dat de sporen beter suspenderen). De suspensie bevatte meer dan 10^7 sporen/ml. **M2**= per volk werd 40 gram BIO 1020 rijstkorrels met *Metarhizium*-sporen boven op de raten in de kast gestrooid. **L1**= een sporensuspensies van Mycotal op basis van *Lecanicillium lecanii* (bereid volgens de beschrijving op de verpakkingen). De concentratie van de suspensie bedroeg $1,5 \cdot 10^6$ sporen/ml. **L2**= een sporensuspensies Vertalec op basis van *L. lecanii* (bereid volgens de beschrijving op de verpakkingen). De concentratie van de suspensie bedroeg $1,7 \cdot 10^4$ sporen/ml. **Controle**= geen behandeling. **Thymovar**= per volk werd een $\frac{1}{2}$ plaatje Thymovar op de raten gelegd. Na 3 weken werd het plaatje vervangen. Na 6 weken werden de plaatjes verwijderd. Voor de behandelingen M1, L1 en L2 werd per volk 50 ml van de suspensie over de raten en bijen gespreid (figuur 1). Behandeling M1 en M2 bevatten dezelfde *M. anisopliae* stam. Behandelingen L1 en L2 bevatten verschillende *L. lecanii* stammen.

Figuur 2 geeft de resultaten van deze proef weer. Per week is bepaald hoeveel dode mijten er op de bodemplank gevallen zijn. Het effect van Thymovar op varroa is goed te zien. Direct na de behandeling vallen er heel veel dode mijten, daarna neemt de mijtval af. Het aantal mijten (mijtpopulatie) in deze volken neemt constant af doordat de mijten sterven aan de thymol. In de controlevolken die niet behandeld zijn neemt de mijtval iets toe en blijft dan constant. Helaas is er geen effect van de schimmelbehandelingen te zien. Als de schimmelbehandelingen effect zouden hebben is te verwachten dat er in de beginperiode veel dode mijten (mijtval) zouden zijn en dat dit aantal aan het eind zou afnemen. De begin-mijtval zou niet zo vroeg en zo extreem zijn als bij

Thymovar, omdat het even duurt voordat de schimmel zijn werk heeft gedaan. Dit patroon treedt bij geen van de schimmelbehandelingen op. Bij beide *Metarhizium*-behandelingen neemt de mijtval langzaam toe. Bij beide *Lecanicillium*-behandelingen blijft de mijtval nagenoeg constant, net als bij de onbehandelde controle. Geen van de schimmels heeft een aantoonbaar effect op de varroamijt.

Tabel 1. Groei en pathogeniteit van verschillende schimmelstammen bij verschillende temperaturen: vergelijking literatuur en PPO onderzoek.

Schimmelstam	schimmelgroei bij 30 °C op agar (mm/dag) ¹	schimmelgroei bij 35 °C op agar (mm/dag) ¹	varroa-mortaliteit bij 30 °C in lab toets (%) ²	Bestrijding van varroa in bijenkast (±35 °C)
Mycotal L1	0.20	0.00	47	niet aantoonbaar ⁴
Vertalec L2	0.18	0.00	100	niet aantoonbaar ⁴
BIO1020 M1, M2	0.99	0.00	ng ³	niet aantoonbaar ⁴
Bio-Blast	1.72	0.23	100	zeer goed ⁵

1: overgenomen van Davidson *et al.*, 2003

2: overgenomen uit Shaw *et al.*, 2002

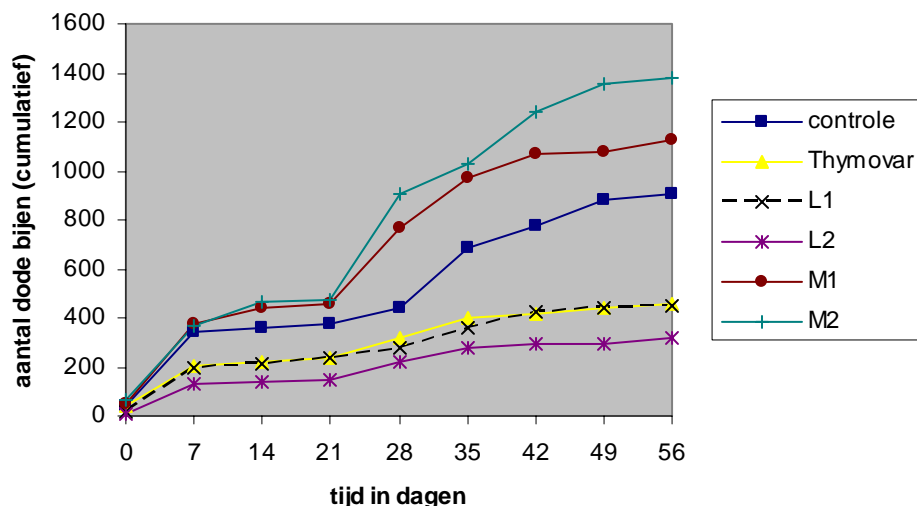
3: ng= niet getoetst

4: PPO onderzoek

5: overgenomen uit Kanga *et al.*, 2003

De gebruikte Nederlandse schimmelproducten zijn in de handel voor bestrijding van insecten in de land- en tuinbouw. *Metarhizium* wordt gebruikt tegen bodeminsecten bij 15 en 20 °C. Beide *Lecanicillium*-producten worden vooral in kassen toegepast bij een temperatuur van 20-25 °C. In de bijenkast heerst een temperatuur van 35 °C (iets lager buiten het broednest). Davidson *et al.* (2003) toonden aan dat de drie gebruikte schimmels niet groeien in een lab-test bij 35 °C (tabel 1). In deze test groeiden de schimmels wel bij 20 en 30 °C. Waarschijnlijk is dit de reden dat er geen effect van de schimmels op mijten te zien is; ze zijn niet actief bij deze temperatuur. Bij 25 °C werken beide *Lecanicillium*-stammen wel goed tegen varroa in labtoetsen; na 7 dagen waren respectievelijk 98% en 100% van de mijten gedood. (Shaw *et al.*, 2002). Vertalec veroorzaakt zelfs bij 30 °C nog 100% doding van de mijten (Shaw *et al.*, 2002). De verwachting was dat, zelfs al werkt de schimmel niet goed in het broed, er toch effect zou zijn van de schimmel op de mijten die op bijen zitten, omdat die ook vaak op plekken met een lagere temperatuur komen. Het is mogelijk dat Vertalec een beter resultaat had gegeven als de sporenconcentratie in de spuitvloeistof hoger was geweest. De concentratie van tienduizend (10⁴) sporen per ml is in vergelijking met de concentratie die Shaw gebruikte, honderdmiljoen (10⁸) sporen per ml, wel erg laag. Kanga *et al.* (2002) gebruikten het product Bio-Blast (EcoScience, New Brunswick, NJ, USA), met een andere *Metarhizium* stam als het werkzame ingrediënt. Deze stam groeide goed bij 35 °C (Davidson *et al.*, 2003) en was heel succesvol in een veldtoets (tabel 1). Bio-Blast is een product in poedervorm en werd verstoven in de bijenkasten of op een strip gecoat en in het volk gehangen. Mogelijk is deze methode van toepassen ook effectiever. Bij deze toepassing kon de schimmel zelfs na 42 dagen nog op de bijen terug gevonden worden. Misschien dat Vertalec in een hogere concentratie en met een andere manier van toepassen wel effectief is.

De schimmels hebben weinig effect op de bijen. Dit was ook te verwachten want de producten waren ten behoeve van de registratie al getest op honingbijen, zowel via orale toediening als direct contact. Het aantal dode bijen is bij L1 en L2 lager dan bij de controlevolken. De behandelingen met *Metarhizium* leverden wat meer dode bijen op dan de controlebehandelingen. Dit werd zeer waarschijnlijk eerder veroorzaakt door de combinatie van locatie en de bijenval dan door de behandeling. De kasten die met *Metarhizium* behandeld waren stonden op een vochtige locatie onder bomen. Hierdoor waren de bakjes onder in de bijenval, waarin de dode bijen werden opgevangen, vaak nat, ondanks de afwatergaten in de bakjes. Levende bijen die in dit bakje terecht kwamen werden soms zo nat dat ze niet meer uit het bakje weg konden komen en als dood geteld werden. Op de andere locaties was het minder vochtig (meer wind, zon) waardoor het aantal dode bijen door de behandelingen niet goed te vergelijken was.



Figuur 3. Het effect van verschillende behandelingen op de bijensterfte (*Apis mellifera*).

L1 en L2 zijn behandeld met *Lecanicillium lecanii*, respectievelijk met Mycotal en Vertalec. M1 en M2 zijn behandeld met *Metarhizium anisopliae* BIO1020, respectievelijk als suspensie- en als rijstkorrel-formulering. Zie voor uitleg het onderschrift van figuur 2.

Conclusie

Concluderend kan gezegd worden dat uit de literatuur blijkt dat insectpathogene schimmels geschikt zijn voor de bestrijding van varroa. Echter, de in Nederland in de handel zijnde schimmels zijn niet geschikt, in ieder geval niet zoals toegepast in deze proef. Voor de bestrijding van varroa zal gezocht moeten worden naar schimmels die werkzaam zijn onder bijenkastomstandigheden: hoge temperatuur en lage luchtvochtigheid. PPO Bijen zal in vervolgonderzoek andere schimmelstammen en andere organismen, zoals bacteriën, toetsen op hun geschiktheid als biologische bestrijder van varroa.

Dankbetuiging

Dank aan Bayer Cropscience B.V. en Koppert Biological Systems B.V. voor het beschikbaar stellen van de schimmels. Dank aan Sjef van der Steen, Tjeerd Blacquièrre en Caroline Koopsen voor het kritisch lezen van het rapport. Dank aan Jeannette van de Aa voor het ontwerpen van de bijenva. Dit onderzoek is een onderdeel van het project "Geïntegreerde duurzame bestrijding van de Varroa-mijtziekte" en werd co-gefinancierd door het "Nationaal programma Honing 2004 Nederland" en LNV programma 397 Gewasbeschermingsmaatregelen.

Referenties

- Chandler, D., K.D. Sunderland, B.V. Ball & G. Davidson, 2001. Prospects of biological control agents of *Varroa destructor* n. sp., an important pest of the European honeybee, *Apis mellifera*. *Biocontrol Science and Technology*, 11: 429-448.
- Davidson, G., K. Phelps, K.D. Sunderland, J.K. Pell, B.V. Ball, Shaw, K.E. & G. Davidson, 2003. Study of temperature-growth interactions of entomopathogenic fungi with potential for control of *Varroa destructor* (Acari: Mesostigmata) using a nonlinear model of poikilotherm development. *Journal of Applied Microbiology*, 94: 816-825.
- Kanga, L.H.B., R.R. James & D.G. Boucias, 2002. *Hirsutella thompsonii* and *Metarhizium anisopliae* as potential microbial control agents of *Varroa destructor*, a honey bee parasite. *J. Invert. Pathol.* 81: 175-184.
- Kanga, L.H.B., W.A. Jones & R.R. James, 2003. Field trials using the fungal pathogen *Metarhizium anisopliae* to control the ectoparasitic mite *Varroa destructor* in honey bee, *Apis mellifera* colonies. *J Econ Entom.* vol 96 :1091-1099.
- Peng, C.Y.S., X. Zhou & H.K. Kaya, 2002. Virulence and site of infection of the fungus *Hirsutella thompsonii* to the honey bee ectoparasitic mite, *Varroa destructor*. *J. Invert. Pathol.* 81: 185-195.
- Shaw, K.E., G. Davidson, S.J. Clark, B.V. Ball, J.K. Pell, D. Chandler & K.D. Sunderland, 2002. Laboratory assays to assess the pathogenicity of mitosporic fungi to *Varroa destructor* an ectoparasite of the honey bee, *Apis mellifera*. *Biological control*, 24: 266-276.