Bestrijding van *Lyprauta cambria* met geëncapsuleerde insectparasitaire aaltjes

Marjolein Kruidhof en Joop Woelke

Rapport WPR-863

Referaat

Doel van dit project was het ontwikkelen en testen van een attract – en kill methode voor de larven van *Lyprauta cambria*, een plaag in Phalaenopsis potorchideeën, op basis van hydro-colloïde capsules met insectparasitaire aaltjes. Er zijn capsules met 3 soorten aaltjes getest. Er is op basis van gecontroleerde proeven op laboratoriumschaal aangetoond dat a) *Lyprauta cambria* larven eten van Nema-Caps hydro-colloïde capsules, b) er overdracht van insectparasitaire aaltjes kan plaatsvinden vanuit de Nema-Caps capsules naar *Lyprauta cambria*, en c) het effect van Nema-Caps hydro-colloïde capsules met insectparasitaire aaltjes op het percentage doding van *Lyprauta* larven wisselend is. Capsules met een hoge concentratie *Steinernema carpocapsae* aaltjes lijken het meeste perspectief te bieden. Verder is gevonden dat er op labschaal bij hoge RV en een temperatuur van 28°C over een periode van tenminste 2 weken (*Heterorhabditis bacteriophora*) of tenminste 3 weken (*Steinernema feltiae* en *Steinernema carpocapsae*) levende aaltjes vrijkwamen uit de Nema-Caps capsules. In de praktijk bleken de capsules na uitstrooien in de potten na beregening bovenop de bark te blijven liggen, waar ze vervolgens snel uitdroogden. Hierdoor konden er 4 dagen na beregening zowel binnenin de capsules als aan de buitenkant van de capsules geen levende aaltjes meer worden waargenomen. Dit probleem vormt voornamelijk een drempel voor praktijktoepassing van deze capsules.

Abstract

The aim of this project was to develop and test an 'attract- and kill' method for the larvae of *Lyprauta cambria*, a pest in Phalaenopsis orchids, on the basis of hydrocolloid-capsules with entomopathogenic nematodes. Capsules with 3 species of nematodes have been tested. Based on controlled laboratory experiments it has been shown that a) *L. cambria* larvae eat from Nema-Caps alginate-capsules, b) transfer of entomopathogenic nematodes from the Nema-Caps capsules to *Lyprauta cambria* could take place, and c) the effect of Nema-Caps hydrocolloid-capsules with entomopathogenic nematodes on *L. cambria* mortality was variable. Capsules with a high concentration of *Steinernema carpocapsae* nematodes seem to offer the best perspective. Moreover, it was found that at laboratory scale, at high RH and a temperature of 28°C, living nematodes emerged from the Nema-Caps for a period of at least 2 weeks (*Heterorhabditis bacteriophora*) or at least 3 weeks (*Steinernema feltiae* and *S. carpocapsae*). In a commercial greenhouse, Nema-Caps capsules that were spread over the surface of the bark remained on the surface after overhead irrigation, where they quickly dried out. Four days after overhead irrigation no living nematodes could be detected both at the surface and inside these capsules. Solving this problem is necessary before the capsules can be applied at greenhouse-scale.

Rapportgegevens

Rapport WPR-863

Projectnummer: 3742202500

DOI nummer: 10.18174/473587

Thema: Gewasbescherming

Dit project / onderzoek is mede tot stand gekomen door de bijdrage van Stichting TKI Tuinbouw, Ministerie van Landbouw, Natuur en Voedselkwaliteit, Coöperatie Potorchideeën, Stichting Programmafonds Glastuinbouw, Glastuinbouw Nederland en Agrocaps SPRL.

Disclaimer

© 2019 Wageningen, Stichting Wageningen Research, Wageningen Plant Research, Business unit Glastuinbouw, Postbus 20, 2665 MV Bleiswijk T 0317 48 56 06, www.wur.nl/plant-research.

Kamer van Koophandel nr.: 09098104

BTW nr.: NL 8113.83.696.B07

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

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

Adresgegevens

Wageningen University & Research, BU Glastuinbouw

Postbus 20, 2665 ZG Bleiswijk

Violierenweg 1, 2665 MV Bleiswijk

T +31 (0)317 48 56 06

Inhoud

	Samenvatting	5
1	Inleiding	7
	1.1 Aanleiding voor dit onderzoeksproject	7
	1.2 Biologie, gedrag en werkingsmechanisme insectparasitaire aaltjes	8
	1.3 Formulering van aaltjes in hydro-colloïde capsules	9
2	Aantrekkelijkheid en smakelijkheid van de hydro-colloïde capsules voor <i>Lyprauta</i> larven	11
	2.1 Inleiding	11
	2.2 Materiaal en methoden	11
	2.3 Resultaten	12
	2.4 Conclusies	12
3	Effect van hydro-colloïde capsules met verschillende soorten insectparasitaire aaltjes op de doding van <i>Lyprauta</i> larven	13
	3.1 Inleiding	13
	3.2 Materiaal en methoden	13
	3.3 Resultaten	14
	3.4 Conclusies	14
	3.5 Resultaten en discussie	15
4	Tijdperiode waarover insectparasitaire aaltjes vrijkomen uit de hydro-colloïde capsules	19
	4.1 Inleiding	19
	4.2 Materiaal en methoden	19
	4.2.1 Experiment in klimaatkast	19
	4.2.2 Praktijkproef	19
	4.3 Resultaten	21
	4.3.1 Experiment in klimaatkast	21
	4.3.2 Praktijkproef	24
5	Algehele discussie en aanbevelingen voor verder onderzoek	27
	Literatuur	29

Samenvatting

Doel van dit project was het ontwikkelen en testen van een attract – en kill methode voor de larven van *Lyprauta cambria* in potorchideeën op basis van hydro-colloïde capsules met insectparasitaire aaltjes. Deze aaltjescapsules zijn getest met betrekking tot de volgende 3 criteria: a) aantrekkelijkheid en smakelijkheid van hydro-colloïde capsules voor *Lyprauta* larven, b) effect hydro-colloïde capsules met verschillende soorten insectparasitaire aaltjes op doding van *Lyprauta* larven, c) tijdsperiode waarover insectparasitaire aaltjes vrijkomen uit de hydro-colloïde capsules in het microklimaat van het barksubstraat in de Phalaenopsis teelt. Op basis van gecontroleerde labproeven is aangetoond dat a) *Lyprauta cambria* larven eten van Nema-Caps hydro-colloïde capsules met insectparasitaire aaltjes, b) er overdracht van insectparasitaire aaltjes kan plaatsvinden vanuit de Nema-Caps capsules naar *Lyprauta cambria* larven, en c) dat het effect van de Nema-Caps hydro-colloïde capsules met aaltjes op het percentage doding van *Lyprauta* larven wisselend is, en afhankelijk van de concentratie van de aaltjes in de capsules en het soort aaltje. Capsules met een hoge concentratie *Steinernema carpocapsae* aaltjes lijken het meeste perspectief te bieden. Verder is gevonden dat er op labschaal bij hoge RV en een temperatuur van 28°C over een periode van tenminste 2 weken (*Heterorhabditis bacteriophora*) of tenminste 3 weken (*Steinernema feltiae* en *Steinernema carpocapsae*) levende aaltjes vrijkwamen uit de capsules. In de praktijk bleken de capsules na uitstrooien in de potten na beregening bovenop de bark te blijven liggen, waar ze vervolgens snel uitdroogden. Hierdoor konden er 4 dagen na beregening zowel binnenin de capsules als aan de buitenkant van de capsules geen levende aaltjes meer worden waargenomen. Dit probleem vormt vooralsnog een drempel voor de toepassing van de capsules in de praktijk. Als hiervoor een praktische oplossing kan worden gevonden, kan het interessant zijn om verder te onderzoeken in hoeverre de *Lyprauta* larven op praktijkschaal kunnen worden bestreden met de aaltjescapsules.

1 Inleiding

1.1 Aanleiding voor dit onderzoeksproject

Op basis van de nieuwe inzichten in de biologie van *Lyprauta cambria* die het onderzoek binnen de PPS 'Nieuwe methoden voor bestrijding van bodemplagen in de glastuinbouw en zomerbloemen' (looptijd 2015 t/m eind 2017) heeft opgeleverd is een nieuwe, perspectievolle, oplossingsrichting naar voren gekomen: namelijk het ontwikkelen van een attract- en kill methode voor de larven van *Lyprauta cambria*. Er is namelijk ontdekt dat *L. cambria* larven hun dieet van kleine prooien (mijten, sciaridae larven, springstaarten) aanvullen met koolhydraten. Een eerste aanwijzing hiervoor was de waarneming dat *L. cambria* larven van slakkenkorrels eten, welke voornamelijk uit zetmeel bestaan. In het lab is dit bevestigd door de larven puur zetmeel aan te bieden, waaraan een voedingskleurstof was toegevoegd. Koolhydraten en/of suikers zouden daarom als lokstof/ voedings-stimulant kunnen worden gebruikt in de 'attract' (oftewel 'lok') component van een 'attract & kill' methode voor de *L. cambria* larven.

Insectparasitaire aaltjes lijken de meest perspectievolle oplossingsrichting voor bestrijding ('kill' component) in een 'attract & kill' methode. Uit eerder onderzoek is gebleken dat insectparasitaire aaltjes *Lyprauta cambria* larven konden infecteren in een geforceerde lab-opstelling. Slechts 25% van de *L. cambria* larven overleefde de behandeling met *Steinernema feltiae* of *Heterorhabditis bacteriophora* aaltjes t.o.v. 92% in de controlebehandelingen (Pijnakker *et al.* 2006). Directe toevoeging van insectparasitaire aaltjes aan de bark was echter niet succesvol (Pijnakker and Leman 2013). Ten eerste kunnen deze aaltjes slecht in het barksubstraat overleven. Bovendien kunnen ze ook makkelijk weer uit het substraat spoelen met de watergift. Tenslotte komen de aaltjes moeilijk in aanraking met *L. cambria* larven. Dit komt omdat de aaltjes zich voornamelijk op de bark bevinden, terwijl de *L. cambria* larven zelden in aanraking komen met het barksubstraat. *Lyprauta cambria* larven bewegen zich namelijk langs de draden van hun web, welke ze als een soort 'snelweg' gebruiken. Hierdoor kunnen de aaltjes die zich op de bark bevinden moeilijk in contact komen met de *L. cambria* larven. Door de aaltjes in capsules te formuleren zou a) de overleving van de aaltjes in de bark kunnen worden verbeterd, en b) *Lyprauta* onder toevoeging van een voedings-stimulant/ lokstof kunnen worden gestimuleerd om van de capsules te eten. Op deze manier wordt er een situatie gecreëerd waarbij de *L. cambria* larve in de buurt komt van de insectparasitaire aaltjes, en waarbij mogelijk infectie van *Lyprauta* door de aaltjes kan plaatsvinden.

Figuur 1.1 *Lyprauta cambria* larve in eigen web welke een prooimijt opeet.

1.2 Biologie, gedrag en werkingsmechanisme insectparasitaire aaltjes

Levenscyclus insectparasitaire aaltjes. Insectparasitaire aaltjes van de families Steinernematidae en Heterorhabditis zijn belangrijke bestrijders van vele plaagsoorten. Ze zijn de dragers van dodelijke bacteriën, waarmee ze nauw samenwerken voor zowel het doden van hun insectenslachtoffers als voor het omzetten van het insectenweefsel in voor deze aaltjes goed verteerbaar voedsel. Steinernema en Heterorhabditis aaltjes zijn dragers van respectievelijk Xenorhabdus en Photorhabdus bacteriën. Deze insectparasitaire aaltjes hebben één vrijlevend stadium, welke het "infectieve juveniele" oftewel het 'ij' stadium wordt genoemd. Alleen deze vrijlevende juvenielen gaan op zoek naar nieuwe insectenslachtoffers. Tijdens dit stadium eten ze niet, maar maken gebruik van hun opgeslagen energiereserves. Wanneer ze een geschikt slachtoffer hebben gevonden, dringen ze het lichaam van het insect binnen door de mond, anus of ademhalingsopeningen. Eenmaal binnen het lichaam van het insect, scheiden de aaltjes cellen uit van de dodelijke Xenorhabdus of Photorhabdus bacteriën, welke het afweersysteem van het insect moeten overwinnen om zich vervolgens binnen het insect te kunnen vermenigvuldigen. In aaltjes-gevoelige insecten doden de bacteriën het insect normaliter binnen 2 dagen. Vervolgens voeden de juveniele aaltjes zich met de bacteriën en het verteerde lichaam van het insect. Op deze manier ontwikkelen ze zich tot volwassen aaltjes. Afhankelijk van de hoeveelheid voedsel die het insect biedt, kunnen zich één of meerdere generaties aaltjes binnen het insect ontwikkelen. Echter planten de aaltjes zich niet altijd voort, en voortplanting van de aaltjes binnen het insect is ook niet noodzakelijk voor een dodende werking van de aaltjes. In principe kan een enkel aaltje dat het lichaam van de larve binnendringt al dodelijk zijn door de bacteriën die deze uitscheidt. Welke dosis dodelijke bacteriecellen nodig zijn om een insect te doden is afhankelijk van zowel het soort insect dat wordt aangevallen als van de soort bacterie.

Gedrag insectparasitaire aaltjes. Het gedrag dat de infectieve juveniele aaltjes vertonen om hun slachtoffers te vinden is sterk afhankelijk van het soort aaltje, en loopt uiteen tussen een echte 'hinderlaag-strategie' en een 'zoek-strategie'. Bij de hinderlaag-strategie wacht het insectparasitaire aaltje tot een geschikt slachtoffer voorbij komt, waarna de aanval wordt ingezet. Hierbij kunnen ze het slachtoffer letterlijk bespringen. Het aaltje vertoont hierbij typisch gedrag, waarbij het vrijwel het gehele lichaam optilt van het substraat, en heen en weer 'kwispelt'. Deze strategie is vooral effectief om bewegende insecten te infecteren. *Steinernema carpocapsae* is een soort dat deze hinderlaag strategie gebruikt. *Heterorhabditis bacteriophora*, daarentegen, is een echte zoeker, welke ook goed werkt tegen plaagstadia die minder of niet bewegen. *Steinernema feltiae* houdt een middenweg tussen deze twee strategieën, en vertoont geen springgedrag.

Overleving insectparasitaire aaltjes in het teeltsubstraat. Onder gunstige omstandigheden kunnen aaltjes maandenlang in de bodem overleven, en hebben ze hiervoor een hele reeks aanpassingen ontwikkeld zoals hoge niveaus van energie-reserves en een bescherm laag. Wel zijn aaltjes erg gevoelig voor uitdroging, UV licht en te hoge temperaturen. In te natte grond kan een tekort aan zuurstof juist weer een probleem vormen voor de aaltjes. Bovendien staan aaltjes in de bodem bloot aan een heel scala potentiële ziektes en natuurlijke vijanden waardoor hun aantallen kunnen afnemen. Van de drie bovengenoemde commercieel beschikbare soorten heeft *S. carpocapsae* de hoogste tolerantie tegen uitdroging. Dit zou kunnen samenhangen met het feit dat dit aaltje voornamelijk in de bovenlaag van de grond op insecten jaagt. Temperaturen boven de 30 °C verhinderen infectie van insecten door verschillende soorten entomopathogene aaltjes. Wat temperatuur betreft blijkt uit verschillende literatuurstudies dat *H. bacteriophora* en *S. carpocapsae* aaltjes het beter doen bij hogere temperaturen dan *S. feltiae* aaltjes (Molyneux 1986, Rohde *et al.* 2010, Evans *et al.* 2015). Voor meer informatie over de biologie en ecologie van insectparasitaire aaltjes, zie Griffin *et al.* (2005).

Tabel 1.1

Eigenschappen van 3 soort commercieel beschikbare insectparasitaire aaltjes.

	Steinernema carpocapsae	Steinernema feltiae	Heterorhabditis bacteriophora
Dodelijke symbiotische bacteriesoort	Xenorhabdus nematophila	Xenorhabdus bovienii	Photorhabdus luminescens
Zoek-strategie	Hinderlaag-strategie	Middenweg tussen hinderlaag-strategie en zoek-strategie	Zoek-strategie
Temperatuur-range	Ook goed bij T = 25-30 °C	Optimaal bij T < 25 °C	Ook goed bij T = 25-30 °C
Bijzonderheden	Hogere tolerantie tegen uitdroging t.o.v. andere 2 soorten		

1.3 Formulering van aaltjes in hydro-colloïde capsules

In de standaard formuleringen zijn aaltjes slechts beperkt houdbaar. In de jaren 80 is er reeds door Kaya and Nelsen (1985) geëxperimenteerd met het formuleren met aaltjes in hydro-colloïde capsules. Chen and Glazer (2005) hebben hier op voortgeborduurd en een methode beschreven om de aaltjes langer te kunnen bewaren bij kamertemperatuur. Deze methode bestaat uit het in een ruststadium brengen van infectieve juveniele aaltjes door ze gecontroleerd te laten dehydrateren in een osmotische oplossing, en ze vervolgens te encapsuleren in hydro-colloïde capsules. Bij een RV van 100% binnenin de capsules konden de aaltjes, wanneer opgeslagen bij kamertemperatuur, meerdere maanden overleven. Wanneer de capsules worden bevochtigd, worden de aaltjes weer actief. Hiltpold *et al.* (2012), een onderzoeksgroep van de Universiteit in Neuchâtel in Zwitserland, hebben dit principe ook gebruikt voor het maken van hydro-colloïde capsules met het insectparasitaire aaltje *Heterorhabditis bacteriophora*, welke ze in het veld hebben getest tegen de maïswortelboorder *Diabrotica virgifera virgifera*. Dezelfde Zwitserse onderzoeksgroep heeft verder onderzoek gedaan naar de optimalisatie van de houdbaarheid van de hydro-colloïde capsules (Kim *et al.* 2015). De hydro-colloïde capsules met insectparasitaire aaltjes die we testen in dit onderzoek, zijn doorontwikkeld door het bedrijf Agrocaps, waarmee we voor dit project een samenwerkingsverband zijn aangegaan. Dit bedrijf heeft eerder een samenwerkingsverband gehad met bovengenoemde onderzoeksgroep van de Universiteit van Neuchâtel.

Het doel van dit project was het ontwikkelen en testen van een attract – en kill methode voor de larven van *Lyprauta cambria* in potorchideeën op basis van het aanbieden van hydro-colloïde capsules met insectparasitaire aaltjes welke voor *Lyprauta cambria* larven aantrekkelijk zijn om van te eten.

De hydro-colloïde capsules met insectparasitaire aaltjes zijn getest met betrekking tot de volgende 3 criteria:
 Aantrekkelijkheid en smakelijkheid van hydro-colloïde capsules voor *Lyprauta* larven
 Effect hydro-colloïde capsules met verschillende soorten insectparasitaire aaltjes op doding van *Lyprauta* larven
 Tijdsperiode waarover insectparasitaire aaltjes vrijkomen uit de hydro-colloïde capsules in het microklimaat van het barksubstraat in de Phalaenopsis teelt

2 Aantrekkelijkheid en smakelijkheid van de hydro-colloïde capsules voor *Lyprauta* larven

2.1 Inleiding

Als eerste is de smakelijkheid van Nema-Caps (hydro-colloïde capsules volgens het recept van het bedrijf Agrocaps) voor *Lyprauta cambria* larven getoetst, en vergeleken met alginaatcapsules zonder toevoegingen en alginaatcapsules met zetmeel als toevoeging.

2.2 Materiaal en methoden

De proef is uitgevoerd in de standaard kweekbakjes voor *L. cambria* larven. De alginaatcapsules zonder toevoegingen zijn bereid door op basis van de methode beschreven in Kaya and Nelsen (1985). De alginaatcapsules met zetmeel zijn op dezelfde manier bereid, onder toevoeging van 10% zetmeel. Tevens is aan alle capsules een rode kleurstof toegevoegd (zie Figuur 2.1 A), waardoor het mogelijk werd om uit de verkleuring van het maagdarm stelsel van de *L. cambria* larven af te leiden of ze van de capsules hadden gegeten. Aan elk kweekbakje is één alginaatcapsule of Nema-Caps capsule op een stukje bark geplaatst (zie Figuur 2.1 B), en is vervolgens één *L. cambria* larve geïntroduceerd. De *L. cambria* larven zijn vervolgens de standaard wijze gekweekt, en driemaal per week (maandag, woensdag en vrijdag) bijgevoerd met prooimijten. Op dezelfde dagen werd genoteerd of er al in het kweekbakje een draad was gespannen naar de plek op de bark waar de capsule zich bevond, en b) het maagdarm stelsel van de *L. cambria* larve rood was gekleurd. In totaal zijn er 14 *L. cambria* larven getest op alginaatcapsules zonder toevoegingen, 8 *L. cambria* larven op alginaatcapsules met zetmeel, 16 *L. cambria* larven op Nema-Caps in een eerste toets, en vervolgens nogmaals 6 relatief jonge en 4 relatief oude *L. cambria* larven, en 2 *Proceroplatus trinidadensis* larven op Nema-Caps in een tweede toets.

Figuur 2.1 Gekleurde Nema-Caps capsules (links) en gekleurde Nema-Caps capsule in *L. cambria* kweekbakje (rechts).

2.3 Resultaten

Figuur 2.2 Aantallen *L. cambria* (en *P. trinidadensis*) larven die wel/niet van verschillende soorten capsules hadden gegeten.

De alginaatcapsules zonder toevoegingen bleken vrijwel niet te worden gegeten door *Lyprauta cambria* larven. Toevoeging van zetmeel maakte de capsules aantrekkelijker voor *L. cambria* larven; maar liefst 75% van de larven hadden van deze capsules gegeten. De Nema-Caps bleken erg aantrekkelijk, vrijwel alle larven hadden binnen 3 dagen van deze capsules gegeten. De capsules bleken smakelijk voor zowel oude als jonge *L. cambria* larven. Ook *Proceroplatus trinidadensis* larven hadden van de capsules gegeten.

2.4 Conclusies

De commerciële samenstelling van de Nema-Caps capsules bleken, in tegenstelling tot standaard alginaatcapsules zonder toevoegingen, smakelijk voor de *L. cambria* larven te zijn. Hiermee is aan het eerste criterium van de capsules voldaan.

3 Effect van hydro-colloïde capsules met verschillende soorten insectparasitaire aaltjes op de doding van *Lyprauta* larven

3.1 Inleiding

Als tweede is het effect van Nema-Caps hydro-colloïde capsules met 3 verschillende soorten insectparasitaire aaltjes, namelijk *S. feltiae*, *S. carpocapsae* en *H. bacteriophora*, op de doding van *Lyprauta cambria* larven getoetst. Dit is gedaan in 4 opeenvolgende experimenten, waarbij tussen de experimenten de concentratie van aaltjes in de capsules werd gewijzigd.

3.2 Materiaal en methoden

Alle 4 de experimenten zijn uitgevoerd in de standaard kweekbakjes voor *L. cambria* larven in een klimaatkast bij een temperatuur van 28°C, RV van 85% en een licht/donker cyclus van 16 uur licht en 8 uur donker. Net voor het inzetten in de kweekbakjes zijn de Nema-Caps voor een periode van 1 uur in een bakje met een dun laagje water geplaatst om de aaltjes in de capsules te activeren. In elk kweekbakje is steeds één Nema-Caps capsule op een stukje bark geplaatst, op de wijze zoals beschreven in hoofdstuk 2. Er is geen voedingskleurstof toegevoegd aan de capsules. Voor het inzetten van de Nema-Caps capsules zijn deze bevochtigd om de aaltjes in de capsules te activeren. Van een sub-monster van elke batch capsules is steeds voor gebruik in de experimenten de activiteit van de aaltjes in de capsules getoetst door 1 uur voor het controleren van de capsules enkele druppels water aan de capsules toe te voegen. Voor alle experimenten zijn *L. cambria* larven verzameld uit de praktijkteelt van potorchideeën. Per kweekbakje is steeds één *L. cambria* larve overgezet, welke volgens is doorgekweekt tot volwassen mug op de standaard manier, waarbij 3x per week is bijgevoerd met prooimijten.

In experiment A zijn Nema-Caps met *Steinernema feltiae* aaltjes getest tegen Nema-Caps zonder aaltjes als controlebehandeling. Voor experiment B en C zijn vier behandelingen getest, namelijk i) Nema-Caps met *S. feltiae* aaltjes, ii) Nema-Caps met *S. carpocapsae* aaltjes, iii) Nema-Caps met *H. bacteriophora* aaltjes, en iv) Nema-Caps zonder aaltjes (controle). Voor experiment D zijn op basis van de resultaten van experiment A-C alleen Nema-Caps met de 2 soorten *Steinernema* aaltjes geselecteerd en vergeleken met de controlebehandeling.

Voor experiment A en B zijn Nema-Caps gebruikt met een concentratie van ongeveer 1500 aaltjes per capsule. Voor experiment C zijn Nema-Caps gebruikt met een concentratie van ongeveer 3000 aaltjes per capsule, en voor experiment D zijn Nema-Caps gebruikt met een concentratie van ongeveer 10.000 aaltjes per capsule.

Van elk *L. cambria* larve is bijgehouden of er een draad was gespannen naar de Nema-Caps capsule, in welk stadium de larve is doodgegaan (als larve, pop of adult), en hoelang na inzetten de larve is doodgegaan (als indicatie van de leeftijd van de larve). Dode larven en poppen die nog voldoende intact waren zijn nagekeken op de aanwezigheid van insectparasitaire aaltjes.

Om het bestrijdende effect van de verschillende soorten Nema-Caps op *Lyprauta cambria* te bepalen is het percentage larven dat in elke behandeling is doodgegaan statistisch geanalyseerd met een GLM model met binomiale verdeling. Statistische analyses zijn zowel voor de totale dataset van elk experiment gedaan, als voor een subset van gegevens waarin de oudere larven - die binnen 5 dagen na introductie in de kweekbakjes waren verpopt - zijn weggelaten. Deze additionele analyses zijn uitgevoerd omdat deze oudere larven minder tijd hadden om via voeding in aanraking te komen met de capsules, met als gevolg een kleinere kans op overdracht van de insectparasitaire aaltjes.

3.3 Resultaten

Figuur 3.1 Nema-Caps hydro-colloïde capsules zonder aaltjes (als controle) en met *S. feltiae* aaltjes, *S. carpocapsae* aaltjes en *H. bacteriophora* aaltjes, met ongeveer 1500 aaltjes per capsule, welke zijn gebruikt in experiment B.

3.4 Conclusies

Figuur 3.2 Nema-Caps hydro-colloïde capsules met een hoge concentratie *S. feltiae* of *S. carpocapsae* aaltjes (10.000 aaltjes/ capsule), welke zijn gebruikt in experiment D.

3.5 Resultaten en discussie

In experiment A hadden alle larven een draad gespannen naar de alginaatcapsule. Van de *L. cambria* larven in de controlebehandeling had 100% zich ontwikkeld tot adult, tegen slechts 25% van de *L. cambria* larven in de behandeling met *S. feltiae* hydro-colloïde capsules ($P < 0.001$) (zie Tabel 3.1 en Figuur 3.3 Experiment A). Dit verschil bleef significant wanneer de oudere larven, die binnen 5 dagen waren verpopt, uit de analyse werden weggelaten ($P < 0.001$). Het percentage larven dat was doodgegaan als larve lag met 38% ook significant hoger als in de controlebehandeling ($P = 0.032$), maar was net niet meer significant wanneer de oudere larven uit de analyse werden weggelaten ($P = 0.051$). Omdat dode *L. cambria* larven en poppen zeer snel ontbinden konden slechts 4 van de dode larven en poppen worden nagekeken op de aanwezigheid van insectparasitaire aaltjes. In één van de dode poppen werden meerdere insectparasitaire gevonden.

In experiment B, waar naast hydro-colloïde capsules met *S. feltiae* aaltjes ook capsules met *H. bacteriophora* aaltjes en capsules met *S. carpocapsae* aaltjes zijn getest, werd een hoge mortaliteit van *Lyprauta* poppen in de controlebehandeling gevonden (zie Tabel 3.1 en Figuur 3.3 Experiment B). Hiervoor kon geen goede verklaring worden gevonden. De effectiviteit van de aaltjes kon hierdoor moeilijk worden bepaald. Opvallend was dat er in alle behandelingen onder de larven juist een lage mortaliteit was. Verschillen in algehele mortaliteit tussen de behandelingen waren niet significant ($P = 0.226$), ook niet wanneer de oudere larven uit de analyse waren weggelaten ($P = 0.201$). Wel hadden alle *L. cambria* larven een draad gespannen naar de plek waar de alginaatcapsule lag, en werden er voor alle drie behandelingen met insectparasitaire aaltjes een of meerdere dode *L. cambria* larven met geïnfecteerde aaltjes teruggevonden (zie Tabel 3.1 en Figuur 3.4 Experiment B).

In experiment C was voor alle 4 behandelingen de overleving van *L. cambria* larve tot adult zeer hoog, en er waren geen verschillen tussen de behandelingen (zie Tabel 3.1 en Figuur 3.3 Experiment C). In één dode *L. cambria* pop, uit de behandeling met *H. bacteriophora*, zijn aaltjes teruggevonden. De kwaliteit van de NemCaps was echter wel goed (zie hoofdstuk 4).

In experiment D, waar het effect van hydro-colloïde capsules met een hoge concentratie *S. feltiae* of *S. carpocapsae* (10.000 aaltjes per capsule) tegen een controlebehandeling van capsules zonder aaltjes zijn getest, was de overleving van larve tot volwassen mug significant verschillend tussen de behandelingen ($P = 0.044$) (zie Tabel 3.1 en Figuur 3.3 Experiment D). Dit verschil zat voornamelijk in het percentage *L. cambria* larven dat was doodgegaan ($P = 0.002$), en dit percentage dode larven lag het hoogste in de behandeling met *S. carpocapsae* aaltjes. Ook werden in deze *S. carpocapsae* behandeling in maar liefst 86% van de teruggevonden dode *L. cambria* (in 4 dode larven en 2 dode poppen) insectparasitaire aaltjes teruggevonden (zie Tabel 3.1 en Figuur 3.4 Experiment D). De kwaliteit van de Nema-Caps was goed, uit beide soorten Steinernema aaltjes zijn vrijwel tot het einde van de proef aaltjes vrijgekomen. Ook viel op dat de *S. carpocapsae* aaltjes zeer actief waren, zowel aan de buitenkant van de hydro-colloïde capsules als op het stukje bark waar de capsule lag. In de behandeling met *S. feltiae* werden slechts in twee van de vijf teruggevonden dode poppen aaltjes gesignaleerd. Onverwachts werden ook in enkele van de dode poppen in de controlebehandeling aaltjes teruggevonden. Het is onduidelijk hoe deze infectie heeft kunnen optreden. De blanco Nema-Caps zijn na de proef gecontroleerd, maar bevatten geen aaltjes.

Tabel 3.1

Resultaten van alle vier experimenten waarin het effect van Nema-Caps hydro-colloïde capsules met insectparasitaire aaltjes op overleving van *L. cambria* larven is getest.

	# aaltjes per capsule	# Lyprauta larven getest	% dood als larve	% dood als pop	% adult	# dode Lyprauta gecheckt op aanwezigheid aaltjes	# Lyprauta aan-toonbaar geïnfecteerd met aaltjes
Experiment A							
<i>Steinernema feltiae</i> 1500		16	38%	38%	25%	4	1
Controle	0	6	0%	0%	100%	x	x
Experiment B							
<i>Steinernema feltiae</i> 1500		14	7%	36%	57%	4	1
<i>Steinernema carpocapsae</i> 1500		14	14%	57%	29%	6	2
<i>Heterorhabditis bacteriophora</i> 1500		14	0%	57%	43%	6	3
Controle	0	14	7%	72%	21%	x	x
Experiment C							
<i>Steinernema feltiae</i> 3000		14	0%	21%	79%	3	0
<i>Steinernema carpocapsae</i> 3000		14	7%	7%	86%	2	0
<i>Heterorhabditis bacteriophora</i> 3000		14	0%	7%	93%	1	1
Controle	0	14	0%	14%	86%	x	x
Experiment D							
<i>Steinernema feltiae</i> 10.000		19	0%	32%	68%	5	2
<i>Steinernema carpocapsae</i> 10.000		19	42%	32%	26%	7	6
Controle	0	18	17%	39%	44%	6	3

Figuur 3.3 Percentage *L. cambria* dat is doodgegaan als larve, pop of adult in de 4 opeenvolgende experimenten met Nema-Caps met insectparasitaire aaltjes.

Figuur 3.4 Aantal dode *L. cambria* larven en poppen die waren geïnfecteerd met insectparasitaire aaltjes afgezet tegen aantal dode *L. cambria* larven en poppen die voldoende intact waren om hierop te worden onderzocht, weergegeven voor Experiment B en D. In Experiment A en C was er steeds slechts één geïnfecteerde *L. cambria* pop gevonden, respectievelijk in de behandeling met *S. feltiae* en *H. bacteriophora*.

4 Tijdsperiode waarover insectparasitaire aaltjes vrijkomen uit de hydro-colloïde capsules

4.1 Inleiding

Als derde onderdeel is de tijdsperiode waarover insectparasitaire aaltjes vrijkomen uit de hydro-colloïde capsules in het microklimaat van het barksubstraat in de Phalaenopsis teelt getoetst. Dit is belangrijk omdat het aangeeft hoe frequent de capsules moeten worden toegediend om een constante aanwezigheid van actieve insectparasitaire aaltjes in het barksubstraat te bewerkstelligen. Er zijn twee toetsen gedaan met Nema-Caps van de 3 verschillende soorten insectparasitaire aaltjes *S. feltiae*, *S. carpocapsae* en *H. bacteriophora*. : a) een toets in de klimaatkast bij een temperatuur van 28°C en RV van 85%, uitgevoerd in dezelfde kweekbakjes als gebruikt voor de experimenten in hoofdstuk 2 en 3, en b) een toets uitgevoerd bij een commercieel Phalaenopsis bedrijf in de opkweek bij 28°C.

4.2 Materiaal en methoden

4.2.1 Experiment in klimaatkast

Om te toetsen over welke tijdsperiode de 3 soorten insectparasitaire aaltjes vrijkomen uit de Nema-Caps capsules in een klimaatkast bij een temperatuur van 28°C en RV van 85%, zijn proeven uitgevoerd in kweekbakjes. Deze proeven hebben parallel gelopen met experimenten C en D die zijn beschreven in hoofdstuk 3, en hiervoor zijn dezelfde capsules gebruikt. In de proef parallel aan experiment C zijn voor elk van de drie soorten insectparasitaire aaltjes (*S. feltiae*, *S. carpocapsae* en *H. bacteriophora*) kweekbakjes ingezet met capsules die op dezelfde positie op de bark in het kweekbakje zijn geplaatst als voor de proeven met *L. cambria*. Wederom zijn de capsules net voor het inzetten in de kweekbakjes voor een periode van 1 uur in een bakje met een dun laagje water geplaatst om de aaltjes in de capsules te activeren. Over een periode van 24 dagen zijn er elke 2-4 dagen 3 Nema-Caps per soort aaltje onderzocht op de aantallen actieve aaltjes binnenin de capsules en aan de buitenkant van de capsules. In de proef parallel aan experiment D, zijn er van zowel de Nema-Caps met *S. feltiae* als van de Nema-Caps met *S. carpocapsae* elke 2-4 dagen 3 capsules onderzocht op aantallen actieve aaltjes over een periode van 19 dagen. Er is een indeling gemaakt naar capsules met hoog aantal, gemiddeld aantal, laag aantal en geen actieve aaltjes.

4.2.2 Praktijkproef

Vervolgens is een proef uitgevoerd om te toetsen over welke tijdsperiode de 3 soorten insectparasitaire aaltjes vrijkomen uit de Nema-Caps in de Phalaenopsis teelt in een commerciële kas bij 28°C, en of de capsules tussen de bark zakken na watergift. Er zijn verschillende potten ingezet met en zonder plant in minder grof substraat (70% bark fractie 1 en 30% kokoschips fractie 1) en grof substraat (80% bark fractie 2 en 20% kokoschips fractie 2). Over de oppervlakte van elke pot zijn 50 capsules uitgestrooid. Na het uitstrooien is de berekening uitgevoerd in drie delen van elk 5 liter, totaal 15 liter met 270 L/ min. Na elke 5 liter is gekeken in hoeverre de capsules in de bark waren 'geregend'. Ook is van een subset van potten de overleving en activiteit van de 3 soorten aaltjes aan de binnenkant en de buitenkant van de capsules onderzocht op 2 uur, 1 dag en 4 dagen na de eerste gietbeurt, en nogmaals net na de tweede gietbeurt (5 dagen na de eerste gietbeurt).

Figuur 4.1 Praktijkproef om te toetsen over welke tijdsperiode de 3 soorten insectparasitaire aaltjes vrijkomen uit de Nema-Caps in de Phalaenopsis teelt in een commerciële kas bij 28°C, en of de capsules tussen de bark zakken na watergift.

4.3 Resultaten

4.3.1 Experiment in klimaatkast

In experiment C kwamen er over een periode van tenminste 3 weken (*S. feltiae* en *S. carpocapsae*) of een periode van tenminste 2 weken (*H. bacteriophora*) levende aaltjes vrij uit de Nema-Caps. Wel namen de aantallen actieve aaltjes binnenin de capsules in dit experiment sneller af voor *S. carpocapsae* als voor *S. feltiae*. In experiment D, waarvoor Nema-Caps zijn gebruikt met een drie keer zo hoog aantal aaltjes, was het verloop in activiteit van de *S. feltiae* en *S. carpocapsae* aaltjes binnenin de capsules vrijwel gelijk met experiment C. De aantallen *S. carpocapsae* aaltjes die in dit experiment aan de buitenkant van de capsules en op de bark aangrenzend aan de capsules actief waren, was vele malen hoger dan in experiment C. Dit duidt er op dat de *S. carpocapsae* aaltjes uit deze 'hoge concentratie Nema-caps' snel vrijkwamen. De hoge startconcentratie van *S. feltiae* aaltjes vertaalde zich, in tegenstelling tot *S. carpocapsae*, niet in hogere aantallen aaltjes aan de buitenkant van de capsule en/of op de bark aangrenzend aan de capsule. Mogelijk zou dit deels kunnen worden verklaard door het verschil in gedrag tussen de twee soorten aaltjes. Voor *S. feltiae* aaltjes is bekend dat ze zich sneller verspreiden dan *S. carpocapsae* aaltjes (zie Tabel 1.1).

Figuur 4.2 Aantallen actieve insectparasitaire aaltjes in Nema-Caps gebruikt voor experiment C (beschreven in hoofdstuk 3), voor *S. feltiae* aaltjes binnenin de capsules (A) en aan de buitenkant van de capsules (B), voor *S. carpocapsae* aaltjes binnenin de capsules (C) en aan de buitenkant van de capsules (D), en voor *H. bacteriophora* aaltjes binnenin de capsules (E) en aan de buitenkant van de capsules (F) op verschillende dagen na inzetten en bevochtigen van de capsules.

Een gele kleur betekent geen actieve aaltjes, een grijze kleur betekent een relatief laag aantal actieve aaltjes, en een oranje kleur betekent een gemiddeld aantal actieve aaltjes per capsule. De grafiek dient als volgt te worden gelezen: op de y-as staat het aantal herhalingen; voorbeeld 1) hele balkje = oranje > in alle 3 herhalingen had de capsule had een gemiddeld aantal actieve aaltjes; voorbeeld 2) balkje voor twee-derde grijs en een-derde geel > in 2 herhalingen had de capsule een laag aantal actieve aaltjes en in 1 herhaling had de capsule geen actieve aaltjes.

Figuur 4.3 Aantallen actieve insectparasitaire aaltjes in Nema-Caps capsules gebruikt voor experiment D (beschreven in hoofdstuk 3), voor *S. feltiae* aaltjes binnenin de capsules (A) en aan de buitenkant van de capsules (B), en voor *S. carpocapsae* aaltjes binnenin de capsules (C) en aan de buitenkant van de capsules (D) op verschillende dagen na inzetten en bevochtigen van de capsules. Een gele kleur betekent geen actieve aaltjes, een grijze kleur betekent een relatief laag aantal actieve aaltjes, een oranje kleur betekent een gemiddeld aantal actieve aaltjes, en een blauwe kleur betekent een relatief hoog aantal actieve aaltjes per capsule. De grafiek dient als volgt te worden gelezen: op de y-as staat het aantal herhalingen; voorbeeld 1) hele balkje = oranje > in alle 3 herhalingen had de capsule had een gemiddeld aantal actieve aaltjes; voorbeeld 2) balkje voor twee-derde grijs en een-derde geel > in 2 herhalingen had de capsule een laag aantal actieve aaltjes en in 1 herhaling had de capsule geen actieve aaltjes.

4.3.2 Praktijkproef

In de praktijk bleken de capsules na uitstrooien in de potten na beregening bovenop de bark te blijven liggen. De fractie bark en kokoschips die werden gebruikt maakten hierbij weinig verschil, en ook de tijdsduur van beregening hadden hierop vrijwel geen effect. Doordat alle capsules op de bovenlaag van de bark lagen, droogden ze snel uit. Hierdoor konden er 4 dagen na beregening zowel binnenin de capsules als aan de buitenkant van de capsules geen levende aaltjes meer worden waargenomen. Ook na opnieuw beregenen, 5 dagen na de eerste gietbeurt, werden er niet nogmaals aaltjes uit de capsules geactiveerd.

Figuur 4.4 Verdeling Nema-Caps, aangebracht over de oppervlakte van de bark, na afloop van de beregening (15L).

Figuur 4.5 Aantallen actieve insectparasitaire aaltjes in Nema-Caps capsules voor de praktijkproef, op 2 uur, 1 dag en 4 dagen na de eerste gietbeurt, en nogmaals net na de tweede gietbeurt (5 dagen na de eerste gietbeurt). Links staan grafieken met de aantallen actieve aaltjes binnenin de capsules, en rechts staan de grafieken met de aantallen actieve aaltjes aan de buitenkant van de capsules voor *S. feltiae* (boven), *S. carpocapsae* (midden) en *H. bacteriophora* (beneden). Een gele kleur betekent geen actieve aaltjes, een grijze kleur betekent een relatief laag aantal actieve aaltjes, een oranje kleur betekent een gemiddeld aantal actieve aaltjes, en een blauwe kleur betekent een relatief hoog aantal actieve aaltjes per capsule. De grafiek dient als volgt te worden gelezen: op de y-as staat het aantal herhalingen; voorbeeld 1) hele balkje = blauw > in alle 5 herhalingen had de capsule had een hoog aantal actieve aaltjes; voorbeeld 2) balkje voor vier-vijfde grijs en een-vijfde geel > in 4 herhalingen had de capsule een laag aantal actieve aaltjes en in 1 herhaling had de capsule geen actieve aaltjes.

5 Algehele discussie en aanbevelingen voor verder onderzoek

Doel van dit project was het ontwikkelen en testen van een attract – en kill methode voor de larven van *Lyprauta cambria* in potorchideeën op basis van hydro-colloïde capsules met insectparasitaire aaltjes. Er zijn in dit project belangrijke stappen gemaakt, maar er zijn nog verschillende problemen die moeten worden opgelost om toepassing op praktijkschaal mogelijk te maken.

Op kleine schaal in kweekbakjes is aangetoond dat *Lyprauta cambria* larven van Nema-Caps eten en dat ze infectie van *Lyprauta* kunnen veroorzaken. Alleen Nema-Caps met een hoge concentratie *S. carpocapsae* aaltjes konden de *L. cambria* larven infecteren en verhoogde sterfte onder de larven veroorzaken. Mogelijk kan dit relatief hoge percentage geïnfecteerde *L. cambria* larven worden verklaard door het massale en snelle vrijkomen van de *S. carpocapsae* aaltjes in combinatie met de zogenaamde 'hinderlaag-strategie' die deze soort aaltjes toepassen om hun prooi te infecteren.

Verder is uit de experimenten gebleken dat er over een periode van 2 tot 3 weken actieve aaltjes vrijkomen uit de capsules. De resultaten uit dit project wijzen er echter op dat een lage concentratie actieve aaltjes aan de buitenkant van de capsules niet tot voldoende infectie van *L. cambria* larven leidt, wat zou betekenen dat de capsules frequent moeten worden toegediend om een bestrijdend effect te bewerkstelligen. Wanneer de capsules over het oppervlak van de bark worden gestrooid blijven ze, ook na beregening, aan de oppervlakte liggen en drogen ze snel uit. Dit probleem vormt vooralsnog een drempel voor de toepassing van de capsules in de praktijk. Als hiervoor een praktische oplossing kan worden gevonden, en als het economisch haalbaar blijkt om de Nema-Caps frequent toe te dienen, kan het interessant zijn om verder te onderzoeken in hoeverre de *Lyprauta* larven op praktijkschaal kunnen worden bestreden met de Nema-Caps met een hoge concentratie *S. carpocapsae* aaltjes. Bij deze toetsen zal moeten worden onderzocht wat de ideale verdeling van de capsules in de pot is met betrekking tot behoud van kwaliteit van de capsules en de kans dat *L. cambria* larven de capsules lokaliseren, en welke aantallen capsules nodig zijn om een bestrijdend effect te bewerkstelligen.

Literatuur

- Chen, S. B., and I. Glazer. 2005.
A novel method for long-term storage of the entomopathogenic nematode *Steinernema feltiae* at room temperature. *Biological Control* **32**:104-110.
- Evans, B. G., K. S. Jordan, M. Brownbridge, and R. H. Hallett. 2015.
Effect of Temperature and Host Life Stage on Efficacy of Soil Entomopathogens Against the Swede Midge (Diptera: Cecidomyiidae). *Journal of Economic Entomology* **108**:473-483.
- Griffin, C. T., N. E. Boemare, and E. E. Lewis. 2005.
Biology and behaviour. Pages 47-64 *in* P. S. Grewal, R. U. Ehlers, and D. I. Shapiro-Ilan, editors.
Nematodes as biocontrol agents. CABI Publishing.
- Hiltpold, I., B. E. Hibbard, B. W. French, and T. C. J. Turlings. 2012.
Capsules containing entomopathogenic nematodes as a Trojan horse approach to control the western corn rootworm. *Plant and Soil* **358**:10-24.
- Kaya, H. K., and C. E. Nelsen. 1985.
Encapsulation of Steinernematid and Heterorhabditid nematodes with calcium alginate - a new approach for insect control and other applications. *Environmental Entomology* **14**:572-574.
- Kim, J., G. Jaffuel, and T. C. J. Turlings. 2015.
Enhanced alginate capsule properties as a formulation of entomopathogenic nematodes. *Biocontrol* **60**:527-535.
- Molyneux, A. S. 1986.
Heterorhabditis spp and Steinernema spp - Temperature, and aspects of behavior and infectivity.
Experimental Parasitology **62**:169-180.
- Pijnakker, J., and A. Leman. 2013.
Biologische en chemische bestrijding van *Lyprauta* sp. in Phalaenopsis. Wageningen UR Glastuinbouw, Bleiswijk.
- Pijnakker, J., P. Ramakers, A. Kromwijk, E. d. Groot, and M. v. Slooten. 2006.
Bestrijding van *Lyprauta* spp., geïntroduceerde muggensoorten in Nederlandse potorchideeen.,
Praktijkonderzoek Plant & Omgeving, Glastuinbouw, Wageningen.
- Rohde, C., A. Moino, M. A. T. da Silva, F. D. Carvalho, and C. S. Ferreira. 2010.
Influence of Soil Temperature and Moisture on the Infectivity of Entomopathogenic Nematodes (Rhabditida: Heterorhabditidae, Steinemematidae) against Larvae of *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae). *Neotropical Entomology* **39**:608-611.

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

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

Rapport WPR-863

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