



Gewasbescherming uit siergewassen

Eric Poot, Kirsten Leiss en Ric de Vos

Rapport WPR-1087

Referaat

Wageningen University & Research heeft een aantal extracten van siergewassen getest op de bestrijding van trips. Hieruit kwam Extract B011 naar voren als meest interessante kandidaat om tot gewasbeschermingsmiddel te worden opgewerkt. In het extract lijken de stoffen FI-A en FI-L mede verantwoordelijk te zijn voor de trips bestrijding; het gehele extract werkte echter het beste. De werking werd verbeterd door combinatie met koolzaadolie. Een kostprijsberekening laat zien dat de voor het onderzoek gebruikte extractiemethode tot een te duur middel leidt. Het businessmodel lijkt verbeterd te kunnen worden door veredeling en/of selectie op rassen met een hogere effectiviteit van bestrijding. Mogelijk kan dat ook door toepassing van bepaalde lichtspectra tijdens de teelt, maar dat kon in een verkennende proef nog niet aangetoond worden.

Abstract

Wageningen University & Research has tested a number of extracts from ornamental plants to control thrips. Extract B011 emerged as the most interesting candidate for the development of a marketable plant protection product. In the Extract B011, the molecules FI-A and FI-L seem to be partly responsible for thrips control; however, the entire extract was most effective. The effect was improved by the combination with rapeseed oil. Cost calculation showed that the extraction method used, leads to a too high price compared with commercially available products. The business model can be improved by breeding and/or selecting varieties with a more effective pest control. This might also be possible by applying certain light spectra during cultivation, but this could not be proved in an exploratory test within this project.

Rapportgegevens

Rapport WPR-1087

Projectnummer: 3742239200

PT nummer: DOI: 10.18174/556869

Thema: Nieuwe verdienmodellen

Dit onderzoek is mede tot stand gekomen door de bijdrage van Topsector T&U, Royal FloraHolland, Kwekers, Kenniscentrum Plantenstoffen, Vereniging Artemis en Rabobank Westland.

Disclaimer

© 2022 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	9
	1.1 Aanleiding	9
	1.1.1 Voorafgaand onderzoek	9
	1.2 Doel	10
2	Aanpak	11
	2.1 Focus aanbrengen	11
	2.2 Ontwikkeling bioassay	11
	2.3 Bepalen werkzame moleculen	11
	2.3.1 Fractionering	11
	2.4 Testen extracten, fracties en moleculen in bioassay	13
	2.5 Experiment bij Proeftuin Zwaagdijk	13
	2.6 Verkenning samenwerking met Kimatec	13
	2.7 Registratietraject	14
	2.8 Kostprijs	14
	2.9 Beïnvloeden inhoudsstoffen	15
	2.9.1 Beïnvloeden inhoudsstoffen via de genetica	15
	2.9.2 Beïnvloeden inhoudsstoffen door het lichtspectrum	15
3	Resultaten	17
	3.1 Keuze plaagorganisme	17
	3.2 Bioassay	17
	3.2.1 Voorbeelden van ontwikkelde en geteste bioassays	17
	3.2.2 Protocol bioassay trips	18
	3.3 Fractionering en identificatie	18
	3.4 Resultaten van verschillende combinaties extracten en stoffen in de bioassay	22
	3.5 Resultaten Proeftuin Zwaagdijk	30
	3.6 Resultaten proef door Kimatec	31
	3.7 Registratietraject	31
	3.7.1 Verkennend gesprek met Ecstyle	31
	3.7.2 Advies Artemis	32
	3.7.3 Informatie van Linge Agroconsultancy	32
	3.7.4 EFSA lijst	32
	3.7.5 Pesticide database	34
	3.8 Kostprijs analyse	34
	3.9 Beïnvloeden inhoudsstoffen	38
	3.9.1 Resultaten van extracten van verschillende rassen op bestrijding trips	38
	3.9.2 Resultaten van verschillende lichtspectra	39

4	Conclusies en aanbevelingen	43
	Dankwoord	45
	Literatuur	47
	Bijlage 1 Verslag Proeftuin Zwaagdijk	49
	Bijlage 1.1 Proefveld details	57
	Bijlage 1.2 Resultaten per veldje	61

Samenvatting

In het Topsector T&U project “Groene gewasbescherming met sierteeltextracten” is onderzoek gedaan naar aspecten die bijdragen aan de ontwikkeling van groene gewasbeschermingsmiddelen uit extracten van siergewassen. Enerzijds kan dit een nieuw businessmodel voor Nederlandse (siergewas) kwekers opleveren, anderzijds biedt het kansen om het verschrallende middelenpakket met nieuwe groene middelen aan te vullen. Het borduurt voort op de PPS “Sierteelt in de Biobased Economy” (Poot *et al.* 2016). In deze voorgaande PPS zijn een groot aantal extracten uit siergewassen gemaakt, waarvan een aantal goede bestrijding van de belangrijkste ziekten en plagen in de glastuinbouw lieten zien. Het bood perspectief voor verdere ontwikkeling, en dat is in onderhavige PPS opgepakt.

Om de extracten door te ontwikkelen naar gewasbeschermingsmiddelen die door de commerciële markt opgenomen kunnen worden, moeten er een aantal zaken onderzocht worden: (1) De extracten moeten qua effectiviteit van bestrijding herhaalbaar zijn. (2) Idealiter moet worden opgehelderd, welke moleculen of combinatie van moleculen werkzaam zijn. (3) Er moet worden nagegaan of er problemen met eco-toxiciteit en/of humane toxiciteit te verwachten zijn.

Tevens is er in onderhavige PPS onderzoek gedaan naar: (4) De ontwikkeling van een biotoets die sneller (bij voorkeur ‘high-throughput’) en met veel minder spuitvloeistof werkt, dan de in het vorige onderzoek gebruikte toets op jonge planten. (5) De kostprijs van het middel op basis van de extractiemethode zoals die in voorgaand onderzoek is toegepast, alsmede een inschatting van het areaal aan siergewassen om voldoende gewasbeschermingsmiddel te kunnen produceren. (6) Een indicatie van de mogelijkheden om met behulp van veredeling en teeltmaatregelen (met name lichtkleuren) de gehalten van de werkzame inhoudsstoffen te verhogen.

Om binnen de ruimte van de PPS aan te kunnen tonen dat het in principe mogelijk is om uit siergewassen gewasbeschermingsmiddelen te kunnen winnen, zijn keuzes gemaakt ten aanzien van de te bestrijden ziekte of plaag, en de siergewassen die in eerder onderzoek de beste bestrijding van het betreffende organisme lieten zien. Het consortium heeft gekozen voor trips; één van de economische belangrijkste plagen in de glastuinbouw (Californische trips of Western Flower thrips: *Frankliniella occidentalis*). Het extract dat hiertegen de beste bestrijding liet zien, was het extract uit de groene delen van B011.

Als eerste is een nieuwe blad biotoets ontwikkeld om de effectiviteit van de extracten op trips bestrijding vast te stellen (bovengenoemde doel 4). Na een groot aantal opties onderzocht te hebben, zijn we uiteindelijk uitgekomen bij ronde plastic kokertjes, die aan één kant afgedicht zijn met (luchtdoorlatend) gaas en aan de andere kant met parafilm. Voor de werking van deze biotoets is een protocol ontwikkeld.

Vervolgens is er een reeks proeven gedaan, die gericht waren op het identificeren van de werkzame stoffen in het Extract B011 (doel 2). Hiertoe is het extract in fracties “uit elkaar getrokken”. De fracties zijn in de biotoets getest. De meest werkzame fracties zijn met Vloeistofchromatografie gekoppeld aan massa spectrometrie (in kort: LCMS) geanalyseerd. Uit deze analyse kwamen als meest waarschijnlijke werkzame stoffen FI-A en FI-L, beide behorende tot de biochemische klasse van flavonoiden, te voorschijn. Vervolgens zijn er proeven gedaan waarin zuiver FI-A en FI-L zijn getest, in verschillende concentraties en vergeleken met het Extract B011 en controles. Deze proeven toonden aan dat deze stoffen inderdaad trips kunnen bestrijden, hoewel de resultaten van verschillende proeven niet altijd eenduidig waren. Echter het complete extract bleek in elke toets beter werkzaam dan deze individuele stoffen.

Deze proeven zijn op verschillende momenten in het jaar uitgevoerd (doel 1). Het bleek dat met name in de winter de bestrijding van trips over de hele linie zeer matige resultaten opleverde. Er zijn een aantal proeven gedaan om te kijken of de herkomst van de trips een rol speelde, en dat bleek inderdaad het geval te zijn. Tevens zijn behandelingen toegepast met koolzaadolie als hulpstof. Uit deze proeven konden de volgende conclusies worden getrokken: koolzaadolie als hulpstof was effectief; FI-A en FI-L werken wel in koolzaadolie, maar niet in alcohol; de praktijkreferentie Raptol deed het altijd goed, echter nooit 100% doding; in sommige proeven werkte het Extract B011 of fracties ervan net zo goed als Raptol. De meest veelbelovende behandelingen lijken te zijn: het totale Extract B011 in alcohol (zonder koolzaadolie); het totale Extract B011 gedroogd en opgenomen in koolzaadolie. Een pilot-experiment met een alcohol extract van Extract B005 bleek ook veelbelovend (zonder koolzaadolie).

Behalve de proeven die door WUR in de zelf ontwikkelde biotoets zijn uitgevoerd, zijn er ook proeven door externe partijen uitgevoerd. De proeven van Proeftuin Zwaagdijk leverde matige resultaten op qua trips bestrijding. Het Extract B011 deed het beter dan middelen op basis van Extract B005. De matige resultaten golden echter ook voor de praktijkreferentie Raptol. De uitkomsten kunnen daarom in lijn worden gesteld met die van de WUR proeven. Proeven door het Spaanse gewasbeschermingsmiddelen bedrijf Kimatec leverden veelbelovende resultaten op: het Extract B011 scoorde beter dan een praktijkreferentie (Spintor), en net iets minder dan een experimenteel middel van Kimatec zelf.

Door middel van een aantal gesprekken met experts is gebleken welke eisen er in het toelatingstraject naar registratie van een gewasbeschermingsmiddel worden gesteld (doel 3). Twee belangrijke checks die gedaan kunnen worden in het stadium waarin zich de middelen uit het project zich bevinden, zijn (a) een check in de EFSA database of er humane toxiciteit gemeld wordt, en (b) het checken van de Pesticiden database of het middel al als gewasbeschermingsmiddel geregistreerd is. In de EFSA database (a) worden op één gewas na (B017) alle siergewassen genoemd. B011 bevat de stof colchicine die boven een bepaalde waarde toxisch is voor mensen. Colchicine is overigens ook een bekend medicijn tegen jicht. Dit geeft aan dat het genoemd zijn in de EFSA database op zichzelf geen probleem voor toelating van een plantenstof hoeft te zijn. Wat echter wel het geval is, is dat een middel op basis van Extract B011 niet als 'laag risico middel' kan worden aangemerkt. Dit heeft als consequentie dat er een langer (en duurder) registratietraject doorlopen dient te worden. In de Pesticiden database (b) zijn noch B011, noch de stoffen FI-A en FI-L geregistreerd. Deze flavonoïden komen ook algemeen voor in voedingsgewassen. Sterker nog: beiden worden als voedingssupplementen met een anti-oxidatieve werking verkocht. Hier lijkt dus geen blokkade voor een eventueel registratietraject te zitten.

De focus in de kostenberekening (doel 5) lag op de extractiekosten en op de mogelijkheden voor efficiëntieverbetering. Er is een rekenmodel opgesteld, dat onder meer rekening houdt met de volgende aspecten: de invloed van het droge stof gehalte van het gewas, de benodigde hoeveelheid alcohol (ethanol), de marktprijs van ethanol, de kosten van arbeid en apparatuur voor extractie, en het kostenniveau vergeleken met chemische middelen. De eindconclusie van deze economische studie is dat het protocol zoals dat voor het onderzoek is gebruikt om extracten van siergewassen te maken, teveel kost voor opschaling naar de praktijk. Met de in het onderzoek gebruikte extractiemethode zou dit ruim 30 keer meer zijn dan dat voor praktijk referenties wordt betaald. Ook na verrekening van efficiencyverbeteringen en schaalvoordelen bij opschaling, lijken middelen op basis van deze extractiemethode nog steeds ruim 3 keer duurder te zijn dan praktijk referenties. Dit zit deels in de kosten van ethanol, maar vooral in de kosten voor arbeid en apparatuur om het extract te maken. Het meest kansrijk lijken gewassen met grote volumes restmateriaal en lage percentages droge stof.

De businesscase zal sterk kunnen verbeteren als de gehaltes aan werkzame inhoudsstoffen kunnen worden verhoogd. In oriënterende proeven is verkend in hoeverre dit met veredeling en teeltmaatregelen mogelijk is (doel 6). Er zijn van gewas B017 van zeven verschillende rassen extracten gemaakt (één extract per ras), die getest zijn op de bestrijding van trips. Er werden inderdaad verschillen tussen rassen qua effectiviteit van trips bestrijding gevonden, al konden deze door de proefopzet niet als statistisch betrouwbaar worden verklaard. Wel sluit de gevonden trend aan bij resultaten uit ander onderzoek, waardoor verwacht mag worden dat via veredeling hogere gehaltes aan werkzame inhoudsstoffen kunnen worden behaald.

In een andere proef is verkend in hoeverre door teeltmaatregelen de werkzame stoffen kunnen worden beïnvloed. In dit geval is gekeken of door lichtkleuren de effectiviteit tegen fusarium kon worden beïnvloed. Met behulp van LED lampen zijn vier verschillende lightspectra gecreëerd. Hieronder zijn zowel B001 als B006 gekweekt. Gedurende de teelt zijn op meerdere momenten op niet-destructieve wijze flavonoiden gemeten. Deze bleken tussen de verschillende lichtbehandelingen te variëren. Uit metabolomics analyses bleken er ook verschillen in inhoudsstoffen te zijn ontstaan. In het bioassay lieten de extracten echter geen verschil zien in effectiviteit tegen fusarium.

1 Inleiding

1.1 Aanleiding

Het is voor de Nederlandse tuinbouwsector van groot belang dat er nieuwe verdienmodellen ontwikkeld worden, vanwege de gebleken gevoeligheid voor overproductie op de traditionele markten van vrijwel alle belangrijke glastuinbouwgewassen. Vanuit diverse hoogwaardige markten is er vraag naar 'groene' moleculen: stoffen die door planten worden aangemaakt. Een van deze markten is die van de Agrochemie, en dan specifiek die van de gewasbeschermingsmiddelen. De Nederlandse sierteelt beschikt in potentie over een groot aantal werkzame plantenstoffen voor deze markt, en kan daarmee een nieuw verdienmodel ontwikkelen: 'Groene gewasbeschermingsmiddelen op basis van siergewasextracten'.

Aan de andere kant staat het gewasbeschermingsmiddelen pakket voor de tuinbouw onder druk. Het gebruik van bepaalde middelen zijn of worden op termijn niet meer toegestaan, en ook verschaalt het pakket doordat een aantal middelen aan effectiviteit verliest. Het is voor het behoud van een effectief middelenpakket van groot belang, dat er nieuwe middelen op de markt komen. Groene gewasbeschermingsmiddelen zijn vanwege hun 'low risk' profiel geschikt voor duurzame integrale gewasbeschermingsstrategieën (IPM).

Het PPS project "Groene gewasbescherming met sierteeltextracten" beoogt de protocollen te ontwikkelen, waarmee groene gewasbeschermingsmiddelen uit extracten van siergewassen geproduceerd kunnen worden, tegen trips en tegen meeldauw.

Dit PPS project borduurt voort op de PPS "Sierteelt in de Biobased Economy" (Poot *et al.* 2016), die van 2014 t/m 2016 heeft gelopen. In dat project zijn een aantal extracten gevonden met werking tegen meeldauw, botrytis, bladluis, spint en trips. Om de stap naar een commercieel product te kunnen maken, moeten er nog een aantal zaken onderzocht en ontwikkeld worden. Het gaat dan onder meer om de stabiliteit en reproduceerbaarheid: de middelen dienen herhaaldelijk een stabiele, effectieve bestrijding van de ziekten of plagen te laten zien.

1.1.1 Voorafgaand onderzoek

Van 2014 tot en met 2016 is de door Topsector T&U en Royal FloraHolland gefinancierde PPS "Sierteelt in de Biobased Economy" uitgevoerd. In deze PPS, die mede werd uitgevoerd door WUR en Kenniscentrum Plantenstoffen, zijn nieuwe toepassingen voor siergewassen onderzocht, waarbij de nadruk lag op gewasbescherming. De belangrijkste conclusies uit dit onderzoek (Poot *et al.* 2016) waren:

- Tegen elk van de vijf belangrijkste ziekten en plagen in de glastuinbouw, te weten trips, spint, luis, meeldauw en botrytis, zijn sierteeltextracten gevonden die bioactiviteit vertoonden die tussen de 50 en 75% remming scoorden. De chemische controles scoorden meestal 100% of net iets minder. Toch bieden de scores van meer dan 50% remming in dit stadium van het onderzoek perspectief voor nader onderzoek en ontwikkeling, zo is door enkele bedrijven uit de gewasbeschermingssector bevestigd.
- Voor verder onderzoek zou een high-throughput screeningsmethode een welkom alternatief zijn voor het in het project gebruikte klassieke bioassay (jonge planten).
- Qua timing bevindt het project zich in een fase dat de businesscase goed doordacht moet worden.
- Plantversterkingstoetsen lieten nauwelijks verschillen zien. Mogelijk speelt hierbij een rol dat de extracten op basis van ethanol zijn toegepast. In eventueel vervolgonderzoek zouden ook andere oplosmiddelen gebruikt moeten worden. De aanbeveling was om dan ook naar genexpressie en de aanmaak van beschermende eiwitten te kijken.
- De screening op activiteit tegen obesitas (in het modelorganisme *C. elegans*) leverde drie extracten op met een positief effect (aanwijzingen dat de vetopbouw geremd werd), maar ook één met een opvallend negatief effect (bevorderde juist de vetopbouw). De resultaten uit deze oriënterende screening zouden in een breder opgezet onderzoeksprogramma meegenomen kunnen worden.

1.2 Doel

De status van de in het onderzoek 'Sierteelt in de biobased economy' onderzochte middelen was nog niet zodanig, dat deze aan professionele partijen in de gewasbeschermingssector kunnen worden overgedragen. De belangrijkste opgave is dat er extracten met een stabiele functionaliteit worden gemaakt, dat wil zeggen dat de resultaten qua effectiviteit van bestrijding herhaalbaar moet zijn. Idealiter moet worden opgehelderd welke moleculen of combinatie van moleculen werkzaam zijn.

Een belangrijke nevenopgave is dat moet worden nagegaan, of er problemen met eco-toxiciteit en/of humane toxiciteit te verwachten zijn. Tenslotte moet de interesse van een professionele partij uit de gewasbeschermingssector worden gewekt, die met een of meerdere van de gevonden middelen het traject naar daadwerkelijke marktintroductie in gaat (registratietraject). Het registratietraject zelf is een gangbare activiteit voor een commercieel bedrijf, en valt derhalve buiten de scope van het project.

Het doel van deze PPS is derhalve het opwerken van de methodiek om uit siergewassen groene gewasbeschermingsmiddelen te maken tot een dusdanig niveau, dat de industrie het op kan pakken voor daadwerkelijke praktijkvalidatie, registratie en marktintroductie.

2 Aanpak

2.1 Focus aanbrengen

In dit project is ervoor gekozen om focus aan te brengen in de te bestrijden ziekten en/of plagen, en de sierteeltgewassen waaruit de potentiële gewasbeschermingsmiddelen gewonnen moeten worden. Uit voorgaand project (Poot *et al.* 2016) is gebleken dat onder meer het uitvoeren van biotoetsen een tijdrovende en kostbare activiteit is. Om binnen het beschikbare budget aan te kunnen tonen dat het in principe mogelijk is om uit siergewassen gewasbeschermingsmiddelen gewonnen kunnen worden, moesten er derhalve keuzes gemaakt worden. Keuzes zijn gemaakt op basis van de criteria urgentie in de (glas-)tuinbouw om een bepaalde ziekte of plaag te bestrijden, en op basis van de in eerder onderzoek gevonden effectiviteit van bepaalde siergewassen in de bestrijding van het betreffende organisme.

2.2 Ontwikkeling bioassay

In het voorgaande project Sierteelt in de Biobased Economy is de effectiviteit van de bestrijding van ziekten en plagen vastgesteld aan de hand van de destijds standaard methode voor deugdelijkheidsonderzoek, namelijk op jonge planten. Zie voor een uitgebreide beschrijving (Poot *et al.* 2016). In een verkennende fase bleek deze manier van toetsen erg tijdrovend en kostbaar. Bovendien werken deze toetsen niet in ieder jaargetijde even goed. En er is relatief veel spuitvloeistof nodig. Aanbevolen werd om na te gaan, of er een goedkoper en sneller alternatief kon worden ingezet.

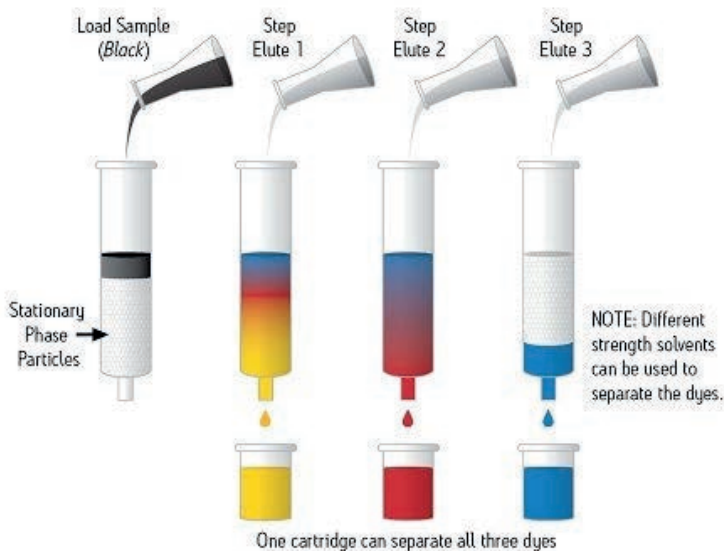
Het is afhankelijk van het target organisme, hoe een dergelijk bioassay moet functioneren. Gaat het bijvoorbeeld om een ziekte of plaag, om een biotroof of necrotroof organisme, wat zijn de afmetingen, hoe beweeglijk is het, is het mogelijk om het schadebeeld voor de screening te gebruiken? Et cetera. Echte high throughput essays zijn alleen voor een paar ziekten beschikbaar. Voor anderen is dat niet het geval, of in ieder geval niet iets dat kant-en-klaar aangeschaft kan worden, en moet het zelf worden ontwikkeld.

2.3 Bepalen werkzame moleculen

2.3.1 Fractionering

Binnen de extracten van siergewassen die binnen het voorgaande project Sierteelt in de Biobased Economy getest zijn, zijn een aantal veelbelovende bioactieve extracten gevonden. De phytochemische samenstelling van alle extracten is, zoals verwacht, zeer complex, met vele stoffen die nog nooit eerder beschreven zijn waardoor de identificatie onnodig veel tijd kost als deze stoffen niet de bioactieve componenten blijken te zijn. Het is dus zinvol om de verdere onderzoeksactiviteiten eerst te richten op fractionering van bioactieve extracten en de verkregen fracties apart te testen op bioactiviteit (ook wel "assay-guided fractionation" genoemd), om daarna gericht de stoffen aanwezig in de specifieke bioactieve fractie(s) te identificeren. Hierbij geldt: des te fijner de fractionering, des te minder stoffen er aanwezig zullen zijn in de bioactieve fractie en dus des te groter de zekerheid dat de bioactieve stof tussen de geïdentificeerde stoffen van de bioactieve fractie zit. Echter: als de bioactiviteit het gevolg is van een combinatie van stoffen, is de kans dat je de combinatie in één fractie vangt kleiner naarmate de fractionering fijner is. Ook betekent dit dat je relatief weinig materiaal per fractie krijgt voor biotoetsen. Fractionering van extracten omvat altijd een, of meerdere, indroogstappen om te concentreren en gebruikte apolaire oplosmiddelen kwijt te raken.

Als methode is gekozen voor 'solid phase extractie' (SPE). Bij deze methode vindt scheiding plaats op basis van verschillen in affiniteit van deze stoffen voor de mobiele fase en de vaste stof (de stationaire fase) in een kolom.



Figuur 1 Schematische weergave solid phase extractie (http://www.waters.com/waters/en_GB/Solid-Phase-Extraction-SPE-Guide/nav.htm?cid=134721476&locale=en_GB).

Voor de solid phase extractie is gebruik gemaakt van het systeem van Reveleris, met een kolom C18 (12 gram). Elutie van de aan de C18-kolom gebonden stoffen gebeurde met toenemende verhoudingen van ethanol in water. Een 'Electro Light Scattering Detector' (ELSD) was gebruikt om eluerende componenten te detecteren bij 254 en 280 nm. Deze fractionering is uitgevoerd door Wageningen Food & Biobased Research.



Figuur 2 Weergave van een Reveleris systeem voor solid phase extractie.

De gevolgde methode is als volgt. Een bepaald volume van het totaal extract (in 80% ethanol) is in zes SPE-fracties met toenemende concentraties ethanol in water gefractioneerd. Deze SPE-fracties zijn ingedampt om het eluens te verwijderen en vervolgens is het gedroogde materiaal opgenomen in het oorspronkelijke volume 80% (v/v) ethanol. De fracties zijn gebruikt voor het identificeren van de aanwezige componenten (door Wageningen Plant Research, BU BioScience) met behulp van een HPLC-PDA-Q Exactive FTMS instrument. Zie voor een meer uitgebreide beschrijving van de identificatiemethode (Poot *et al.* 2016). Ter controle zijn originele gevriesdroogde (totaal) extracten gebruikt uit het vorige project.

2.4 Testen extracten, fracties en moleculen in bioassay

De totaal extracten, de SPE-fracties en de kandidaat moleculen zijn getest op bio-activiteit door Wageningen Plant Research BU Glastuinbouw. Zie paragraaf 2.2 voor de beschrijving van de ontwikkeling van de bioassay.

2.5 Experiment bij Proeftuin Zwaagdijk

Ten behoeve van de registratie van een gewasbeschermingsmiddel moet bewijsvoering worden aangeleverd ten aanzien van de effectiviteit van de werking. Dit moet volgens bepaalde procedures en formats worden geleverd. Een bedrijf dat gespecialiseerd is in het testen van gewasbeschermingsmiddelen voor toelating, is Proeftuin Zwaagdijk (inmiddels Verify geheten: www.verify.nl). Besloten is om Proeftuin Zwaagdijk een proef te laten doen, zodat de rapportage hiervan ook ten behoeve van de registratie gebruikt kan worden.

Er zijn twee middelen aangeleverd, het ethanol extract van B011 dat ook in het kader van het project was gemaakt, en een etherische olie van B005 afkomstig van een projectpartner. Bij de B005 olie waren twee verschillende uitvloeiers meegeleverd. Zodoende waren er drie behandelingen. Zwaagdijk heeft deze behandelingen vergeleken met een controle en de praktijkreferentie Raptol (pyrethrinen+koolzaadolie; 4,59+825,3 g/L; EC). De objecten zijn samengevat in onderstaande tabel.

De proef is uitgevoerd op Chrysant met als doelorganisme Californische trips (*Frankliniella occidentalis*). Na het planten is de trips in het gewas gebracht. Enkele dagen na het inbrengen is een eerste toepassing gedaan. Herhaalde toepassingen zijn uitgevoerd met een interval van 3-4 dagen. De toepassingen zijn uitgevoerd als gewasbespuiting over het gewas. Het spuitvolume was 1000 L/ha. Aan het einde van de proef zijn de planten opnieuw behandeld met hetzelfde schema. Het spuitinterval was toen 1 week.

Tabel 1

Behandelingen effectiviteitsonderzoek Proeftuin Zwaagdijk.

	Object	Dosering
1	Onbehandeld	-
2	Extract B011 in 80% ethanol	200 ml/Liter water
3	Extract B005 etherische olie + uitvloeier G	2% + 0,1%
4	Extract B005 etherische olie + uitvloeier M	0,03% + 0,1%
5	Raptol	1%

Waarnemingen zijn uitgevoerd op het aantal larven en adulten op een monster van 10 scheuten per veldje. De scheuten zijn uit het gewas gehaald en gespoeld in alcohol om te insecten af te doden. Na filteren zijn de aantallen larven en adulten apart geteld. De resultaten van de waarnemingen zijn statistisch getoetst op verschillen (LSD test; 95%). Daarnaast zijn waarnemingen gedaan op gewasveiligheid.

2.6 Verkenning samenwerking met Kimatec

In het Europese netwerk van WUR is contact gelegd met het Spaanse bedrijf Kimatec (www.kimatec.com). Het bedrijf ontwikkelt zelf nieuwe gewasbeschermingsmiddelen, en is ook geïnteresseerd in de extracten die in het kader van dit onderzoek zijn ontwikkeld. Met Kimatec is een Material Transfer Agreement overeengekomen. Vanuit het project is het Extract B011 onder code aangeleverd bij Kimatec. Kimatec heeft dit extract getest in hun bioassay. Ze heeft het vergeleken met water verdund ethanol, het commercieel verkrijgbare product Spintor, en een nog in de ontwikkelingsfase bevindend middel van Kimatec zelf. Ook hier is de effectiviteit tegen *Frankliniella occidentalis* getest. De effectiviteit is bepaald aan de hand van de schade (zilverblad) die de trips op het blad van levende planten veroorzaakt.

2.7 Registratietraject

Om de stap naar een vermarktbare product te kunnen maken, moet een registratietraject worden doorlopen. Hiervoor moeten bewijzen worden aangeleverd dat het middel werkt, en dat er geen risico's zijn voor mens, dier en milieu. Het traject om tot een toegelaten product te komen, is complex, langdurig en kostbaar. In het kader van dit project is gesproken met een aantal experts om meer inzicht te krijgen in de eisen die aan toelating worden gesteld.

2.8 Kostprijs

Met dit onderzoek willen we bijdragen aan de ontwikkeling van een nieuw verdienmodel voor de sierteeltsector. Dit betekent dat als er business wordt gegenereerd, een deel van de revenuen terug moet vloeien naar de sector. Aan de andere kant zijn we ons ervan bewust dat we voor het traject naar de markt een bedrijf in gewasbeschermingsmiddelen nodig hebben, die nog een stuk productontwikkeling voor haar rekening zal moeten nemen. Er moet dus een goed doordacht businessmodel ontworpen worden, dat recht doet aan de inspanningen en wensen van de sierteeltsector, maar ook interessant genoeg is voor een gewasbeschermingsmiddelen fabrikant. Een belangrijk onderdeel van het businessmodel is de kostprijs van het product. Omdat in het voorgaande project alleen gewerkt is aan een 'proof-of-principle', was er nog geen idee over de kosten van een extract als basis voor een gewasbeschermingsmiddel. Het is evident dat voor een haalbare businesscase de prijs niet heel veel hoger mag liggen dan wat er voor commercieel verkrijgbare producten betaald moet worden.

Wageningen Economic Research heeft een oriënterende desk studie gedaan om inzicht te krijgen in dergelijke getallen. Ze heeft zich hierbij gebaseerd op de resultaten uit het voorgaande onderzoek, en heeft bij diverse experts op biologisch en technisch gebied informatie opgevraagd. Voor de economische berekeningen zijn kostenindicaties verkregen van extractiebedrijven, zoals DuSart Pharma in Nederland en Herbamed in Zwitserland.

De focus in de kostenberekening lag op de extractiekosten en op de mogelijkheden voor efficiëntieverbetering. De kosten van vers plantmateriaal, formulering, toelating als gewasbeschermingsmiddel, marketing en distributie zijn buiten beschouwing gelaten. Een indicatie voor de niet-beschouwde kosten (multiplier) is te vinden in (Buurma, 2013).

Voor het maken van een inschatting van de productiekosten van sierteeltextracten, uitgedrukt in euro's per bespuiting, was de hoofdvraag: van hoeveel kg vers gewas maak je hoeveel liter extract, en wat kost dat? De deelvragen die daarvoor onderzocht zijn, waren:

- Wat is de invloed van het droge stof gehalte van een gewas?
- Wat zijn de benodigde ethanol-/volume gehalten?
- Waar zitten de afweerstoffen in de plantencel?
- Wat is de verhouding vacuolevocht / ethanol?
- Wat is de marktprijs van ethanol?
- Wat zijn de kosten van arbeid en apparatuur voor extractie?
- Wat is het kostenniveau vergeleken met chemische middelen?

Voor de beantwoording van de onderzoeksvraag is een spreadsheetmodel ontwikkeld. Het model is opgebouwd uit drie onderdelen. (1) In het eerste onderdeel worden volumes berekend die nodig zijn voor de extractie van het plantmateriaal en die na extractie beschikbaar komen voor gebruik. (2) In het tweede onderdeel worden de extractiekosten berekend, opgesplitst naar kosten voor ethanol en kosten voor arbeid en extractieapparatuur. Deze worden vervolgens omgerekend naar kosten per bespuiting en vergeleken met de aankoop van een chemisch gewasbeschermingsmiddel. (3) In het derde onderdeel wordt berekend welke productiearealen nodig zijn voor de productie van afweerstoffen.

In overleg met het consortium zijn vier gewassen gekozen: B001, B005, B014 en B017. Deze vier geven de diversiteit van alle gewassen zoals die door het consortium worden geteeld, goed weer. Voor deze gewassen zijn de berekeningen gemaakt.

2.9 Beïnvloeden inhoudsstoffen

De hoeveelheid inhoudsstoffen in planten die werkzaam zijn tegen ziekten en plagen, kunnen op verschillende manieren beïnvloed worden. In het kader van dit project zijn twee manieren verkend:

1. Via de genetica. Verschilt de effectiviteit van extracten die gemaakt zijn van verschillende cultivars? Zo ja, dan biedt veredeling en selectie van rassen potentie om de effectiviteit van bestrijding te beïnvloeden. We hebben commerciële rassen gebruikt. Deze zijn over het algemeen vooral veredeld op zaken als sierwaarde, maar niet (bewust) op gehaltes van de bioactieve inhoudsstoffen. In een eventueel vervolgetraject zou ook naar natuurlijke biodiversiteit gekeken moeten worden, dus ook ouderlijnen en wilde verwanten, om te kijken hoe groot de genetische variatie is.
2. Via teeltmaatregelen. Vanuit de literatuur is bekend dat de afweer van planten tegen ziekten en plagen beïnvloed kan worden door teeltmaatregelen. Onder andere door klimaatomstandigheden zoals temperatuur en licht, door plantenvoeding en door toevoeging van zogenaamde elicitors. In onderhavig onderzoek hebben we gekeken of de effectiviteit van extracten beïnvloed kan worden door planten onder verschillende lichtspectra te telen.

2.9.1 Beïnvloeden inhoudsstoffen via de genetica

Telers hebben praktijkervaring met verschillen in vatbaarheid dan wel weerbaarheid van verschillende rassen tegen ziekten en plagen. In het consortium werd dan ook geopperd om te onderzoeken of de extracten van verschillende rassen van hetzelfde gewas een verschil in bestrijding zou laten zien. Recent heeft onderzoek inderdaad aangetoond, dat verschillende rassen verschillende mate van inhoudsstoffen kunnen hebben, die een verschil in weerbaarheid kunnen verklaren. (K. Leiss, 2021) heeft dit aangetoond bij gerbera (*Gerbera hybrida*), waarbij de stof gerberine verantwoordelijk bleek te zijn voor een verschil in weerbaarheid tegen meeldauw.

In het kader van onderhavig onderzoek is een verkenning gedaan naar de effectiviteit van de bestrijding van trips door extracten die gemaakt zijn uit zeven verschillende B017 rassen. Het materiaal was afkomstig van een van de partijen uit het consortium, die de planten in dezelfde kas onder dezelfde omstandigheden had gekweekt. Hierdoor is de invloed van teeltmaatregelen geminimaliseerd. Van de bloemen, het blad, de stengels en de knollen zijn extracten gemaakt volgens het protocol zoals dat beschreven is in Poot *et al.* (2016). De proef is in twee herhalingen uitgevoerd, op jonge planten volgens het protocol zoals beschreven in Poot *et al.* (2016). In de 1^e proef waren leidingwater en een chemische controle (toen Spruzit) de controles en is de mate van bestrijding vergeleken met de behandeling met water. In de 2^e proef is ook een onbehandelde controle meegenomen (niet bespoten), naast water en de chemische controle, en zijn de resultaten vergeleken met de onbehandelde controle. Deze proef had slechts een verkennend karakter; de dataset was niet geschikt om uitspraken over statistisch betrouwbare verschillen te doen.

2.9.2 Beïnvloeden inhoudsstoffen door het lichtspectrum

Voorafgaand aan onderhavig onderzoek waren er al verschillende onderzoeken gedaan naar de invloed van licht op het afweersysteem van planten. Zo is er in verschillende onderzoeken al aangetoond dat rood en verrood licht deze processen beïnvloeden (Ballaré, 2009) (Wang *et al.* 2010). Daarnaast blijkt ook UV-B licht een sterke invloed te hebben op de aanmaak van metabolieten welke bijdragen aan het afweersysteem van de plant. Behandeling met UVB had een significante vermindering van schade door plaagorganismen tot gevolg (Escobar-Bravo *et al.* 2019) (M. Schreiner *et al.* 2012) (Hideg, Jansen, & Strid, 2013) (Mazza, Giménez, Kantolic, & Ballaré, 2013) (Monika Schreiner, Krumbein, Mewis, Ulrichs, & Huyskens-Keil, 2009). Ook blauw licht is interessant in dit aspect (Ouzounis, Razi Parjikolaei, Fretté, Rosenqvist, & Ottosen, 2015) (Kopsell, Sams, & Morrow, 2015).

In een aanpalend onderzoek is een verkenning uitgevoerd naar de mogelijkheden om teeltonderzoek met LED belichting van WPR Glastuinbouw te koppelen aan een bioassay voor fusarium (van WPR Biointeracties) en aan metaboliet profielen (WPR Bioscience). Hierbij is gebruik gemaakt van plantmateriaal van partijen uit het consortium van onderhavig onderzoek. Dit is gedaan met de gewassen B001 en B006. De keuze voor deze planten is gemaakt op basis van de resultaten van het literatuuronderzoek van Fytagoras, zoals dat door Poot *et al.* (2016) gerapporteerd is.

Gedurende vijf weken zijn er B001 planten en B006 planten van enkele weken oud geteeld onder verschillende lichtbehandelingen. Er waren vier behandelingen (één behandeling per tafel) met elk drie herhalingen, in totaal dus 12 tafels in dezelfde kas. De vier verschillende behandelingen bestonden uit verschillende licht spectra: (1) Standaard (rood, blauw en verrood), (2) extra blauw, (3) extra UVB, en (4) geen verrood. De lampen waren zo ingesteld dat de lichtintensiteiten (PAR) nagenoeg gelijk waren. Zie Tabel 2.

Tabel 2

De lichtintensiteiten van de verschillende kleuren licht per behandeling.

	PAR ($\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$)	Verrood ($\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$)	Rood ($\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$)	Blauw ($\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$)	UVB ($\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$)
Standaard	90.25	61.32	78.66	10.94	-
- Verrood	89.59	0.54	76.57	12.47	-
+ Blauw	92.40	36.52	50.77	41.04	-
+ UVB	88.94	60.83	78.25	10.21	0.73

Het dag/nacht ritme dat werd aangehouden was 16 uur dag en 8 uur nacht. Dit om voldoende Daily Light Integral (DLI) te halen en om korte dag plant B006 uit de bloei te houden. In tegenstelling tot de andere lampen stond het UVB licht niet 16 uur per dag aan. De eerste week bleek namelijk al dat er teveel schade werd veroorzaakt door het UVB licht. Hierna zijn er aanpassingen uitgevoerd aan de lampen om de intensiteit te verminderen naar een gemiddelde van 0,73 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$. Dit is gedaan door een soort gaas voor de lampen te bevestigen. Tevens werd de belichtingsduur teruggeschroefd van 4 naar 1 uur per dag.

Aan de planten zijn gedurende de teelt lengtemetingen gedaan. Bij B001 is ook de aanmaak van bladeren geteld. Ook is het relatieve flavonoïd gehalte gemeten met een Force-A Dualux Scientific+™ Polyphenol & Chlorophyll-Meter (Type DX17720). Deze meter meet alleen die flavonoïden die (voor de mens zichtbaar) pigment hebben, zoals anthocyanen, en niet de pigmentloze (onzichtbare) flavonoïden. Voor deze meting zijn er jonge bladeren gemeten, omdat verwacht werd dat hier het hoogste gehalte aan zichtbare flavonoïden in zou zitten. Al snel werd duidelijk dat de oudere bladeren van de B001 een hoger gehalte aan flavonoïden bevatten, dus zijn er bij de B001 planten zowel jonge (< 3 cm) als oude bladeren (> 3 cm) gemeten. Van de B006 planten zijn alleen jonge bladeren gebruikt. Aan het einde van de teelt zijn van de meetplanten het vers- en drooggewicht bepaald. Tevens zijn er bladmonsters ingevroren bij -80°C en opgestuurd naar de labs van WPR Biointeractions en WPR Bioscience.

Biointeracties heeft de monsters getoetst in een in-vitro bio assay, waarin remming van de groei van fusarium met behulp van GFP (green fluorescence protein) screening is onderzocht. Bioscience heeft de monsters met de LC-MS geanalyseerd. De gecombineerde werkwijzen van Bioscience en Biointeracties lenen zich voor high-throughput analyses. Hierdoor zou het mogelijk moeten zijn om de kandidaat inhoudsstoffen die verantwoordelijk zijn voor de bestrijding van fusarium, te detecteren.

3 Resultaten

3.1 Keuze plaagorganisme

Op basis van expertconsultatie bij onder meer Glastuinbouw Nederland en Artemis en uitvraag bij de kwekers in het projectconsortium, is besloten om in de zoektocht naar een gewasbeschermingsmiddel uit siergewassen te kiezen voor trips (Californische trips of Western Flower thrips: *Frankliniella occidentalis*) als een van de economisch belangrijkste plagen in de glastuinbouw.

3.2 Bioassay

Een rondgang bij collega's van WUR leverde geen kant en klaar bruikbare 'high-throughput' bioassay op. Bij WPR Bioscience was men bezig met de ontwikkeling van een assay op basis van video-tracking van insectgedrag en camera vision detectie van vraatschade van trips. Deze werd met name ontwikkeld om de aantrekkelijkheid (of anders gezegd: de resistentie dan wel weerbaarheid) van verschillende plantenrassen tegen trips te onderzoeken. Voor ons onderzoek was dat niet helemaal wat we zochten. Bovendien was het assay nog niet uitontwikkeld en beschikbaar binnen dit project.

Er is daarom door het projectteam tijd gestoken in het zelf ontwikkelen van een sneller alternatief dan de in het eerdere project gebruikte methode, voor het toetsen van de werkzaamheid van een gewasbeschermingsmiddel tegen trips. Dat bleek niet eenvoudig: trips is een zeer klein beestje en een meester in het ontsnappen uit allerlei vormen van kooitjes waarin het bestudeerd kan worden. Voorkomen moet worden dat trips stikt vanwege het luchtdicht afsluiten van het kooitje. Ook moet voorkomen worden dat de tripsen te weinig vocht krijgen en uitdrogen.

3.2.1 Voorbeelden van ontwikkelde en geteste bioassays

De volgende foto's geven een indruk van de verschillende constructies die ontwikkeld en getest zijn.

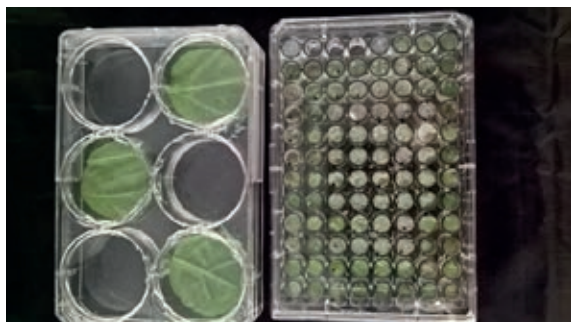


Foto 1 Drie constructies tbv het bioassay: (1) plastic schalen met 6 grote en 96 kleine ruimtes met daarin bladponsjes, trips en middel, afgesloten door een hard plastic deksel; (2) cupjes met maatvoering en zacht plastic deksels; (3) twee kunststof platen met daartussen het bladponsje met trips en middel, op elkaar geklemd met elastiek. Alle drie de constructies bleken niet bruikbaar.

Uiteindelijk konden WUR collega's plastic ringen leveren. Aan de ene kant waren deze ringen afgesloten met zeer fijnmazig gaas (gelijmd op de ringen). Aan de andere kant kon de ring worden afgesloten met parafilm. De kant met gaas moest naar beneden worden geplaatst; om te zorgen dat zuurstof de ringen in kon, zijn de ringen op rekjes geplaatst. Deze constructie bleek uiteindelijk bruikbaar.

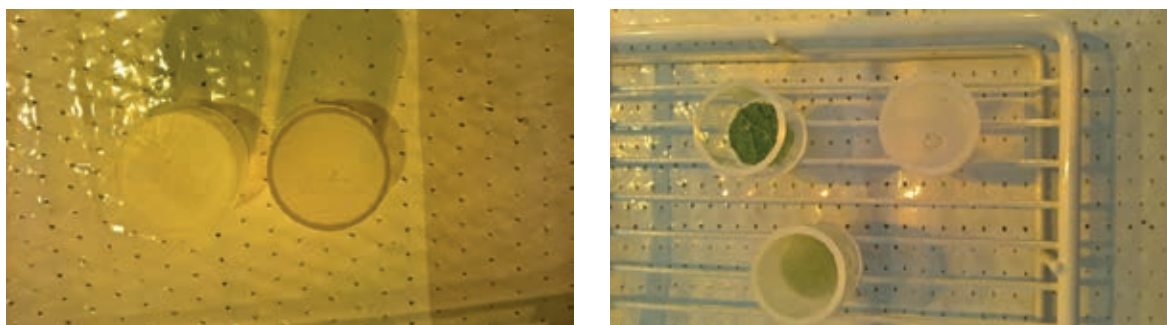


Foto 2 Plastic ring, afgesloten met gaas (vast verlijmd) en parafilm.

3.2.2 Protocol bioassay trips

Benodigd:

- Tripskweek (op Chrysant) - Western Flower Thrips; per keer zijn er circa 4000 tripsen nodig. Er worden altijd een aantal reserve kooitjes gemaakt.
- Jonge komkommerplanten. Vier weken voor een proef worden 20 plantjes gezaaid. De planten mogen niet bespoten worden!
- Kooitjes: 10 per behandeling.
- Parafilm.
- Extracten, chemische controle, etc.
- Plantenspuitjes.
- Rekjes.
- Pipetten en tips.

Dag 1:

- Ca 20 trips in het kooitje brengen.
- Afdichten met parafilm.
- Druppel water op parafilm (100 μ l).
- Kooitje met gaas naar beneden op rekje zetten (moet zuurstof bij kunnen). Rekjes niet in de felle zon zetten.

Dag 2:

- Maken van ponsjes van komkommerblad. Voor standaardisatie is het belangrijk om altijd hetzelfde blad (jong of oud) te nemen. Ponsjes moeten passen op de bodem van het kooitje.
- Ponsje bespuiten. Per behandeling is in totaal, om boven- en onderkant te bespuiten, 7 ml vloeistof nodig: 2 ml extract en 5 ml water.
- Ponsje in kooitje leggen.
- Kooitje met trips openen en trips in kooitje met bespoten ponsje overzetten.
- Afdichten met parafilm.
- Kooitje met gaas naar beneden op rekje zetten (moet zuurstof bij kunnen). Rekjes niet in de felle zon zetten.

Dag 3:

- Tellen levende en dode tripsen.

3.3 Fractionering en identificatie

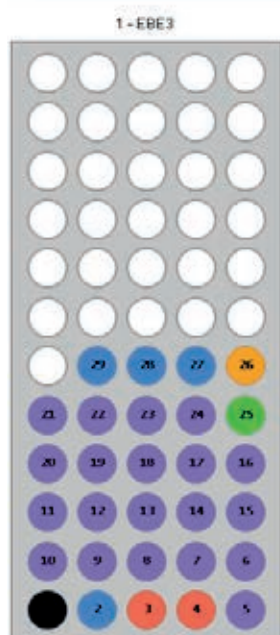
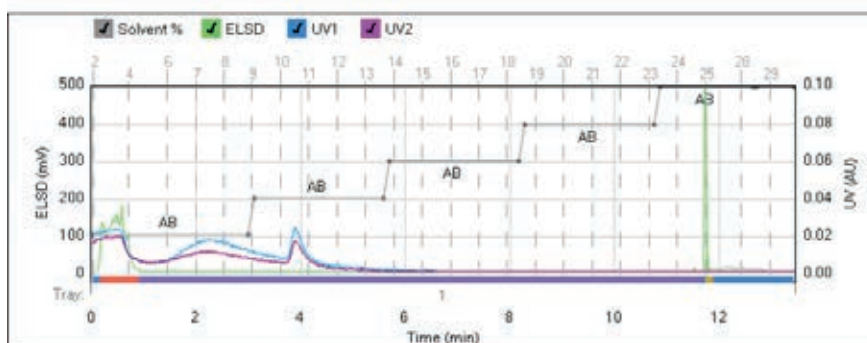
In deze paragraaf wordt aan de hand van Extract B011 toegelicht, hoe de procedure van fractionering en identificatie is verlopen. Het volgende figuur geeft aan, hoe de fractionering van dit extract is verlopen.

Column: Generic C18 12g
Flow Rate: 28 mL/min
Equilibration: 3.0 min
Run Length: 13.5 min
Air Purge Time: 0 min

Slope Detection: Off
ELSD Threshold: 20 mV
UV Threshold: 0.05 AU
UV1 Wavelength: 254 nm
UV2 Wavelength: 280 nm

Collection Mode: Collect All
Per-Vial Volume: 15 mL
Non-Peaks: 15 mL
Injection Type: Manual

ELSD Carrier: Iso-propanol
Solvent A: Water
Solvent B: Ethanol
Solvent C: <No solvent chosen>
Solvent D: <No solvent chosen>

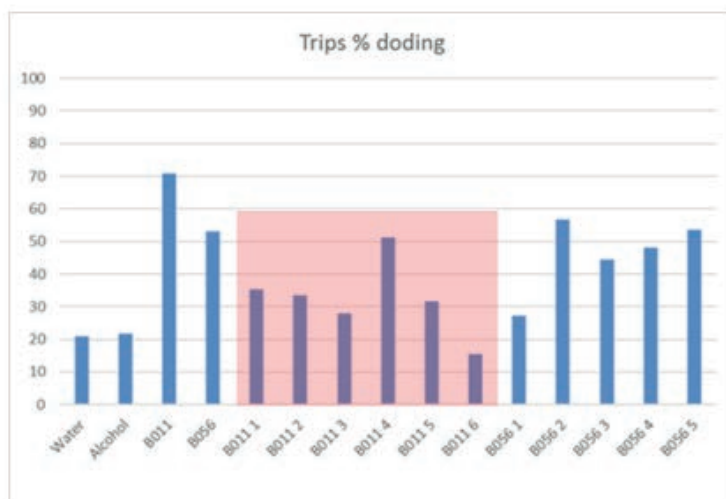


Gradient Table			
	Min	Solvents	% 2nd
1	0.0	AB	20
2	3.0	AB	20
3	0.1	AB	40
4	2.5	AB	40
5	0.1	AB	60
6	2.5	AB	60
7	0.1	AB	80
8	2.5	AB	80
9	0.1	AB	100
10	1.8	AB	100
11	0.1	AB	100
12	0.7	AB	100

Vial Mapping Table		
Peak #	Start Tray/Vial	End Tray/Vial
1	1:3	1:4
2	1:25	1:25
3	1:26	1:26

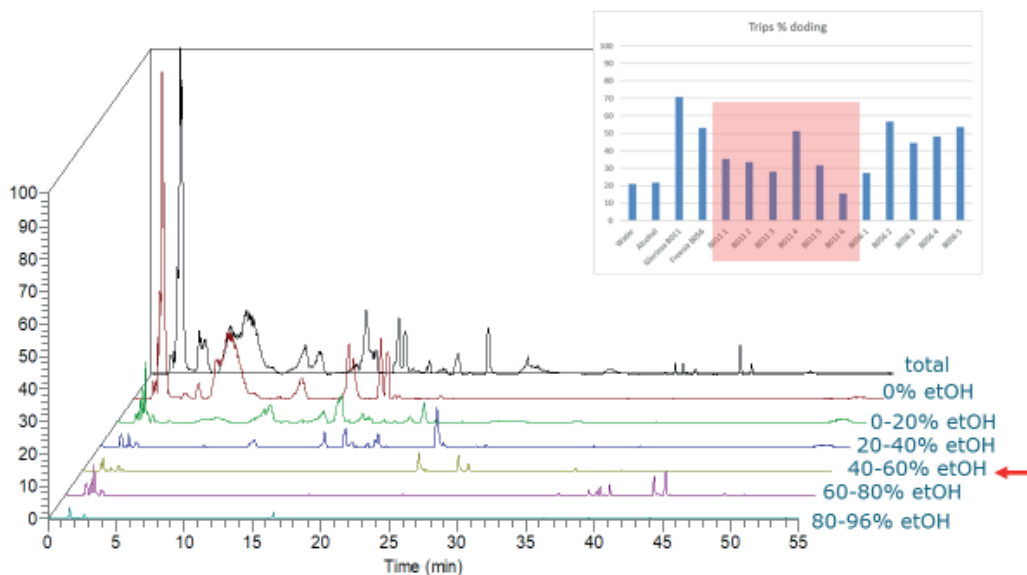
Figuur 3 Grafische weergave van het resultaat van de fractionering van extract B011.

De met behulp van Solid Phase Extractie verkregen zes fracties, van de SPE-kolom afgewassen met respectievelijk 0, 20, 40, 60, 80 en 96% ethanol in water, zijn in de ontwikkelde bioassay getest. De resultaten staan in de volgende figuur. Zoomen we in op Extract B011, dan zien we dat het totale extract de meeste doding gaf. Van de fracties gaf het 4^e extract (60% ethanol) de meeste doding.

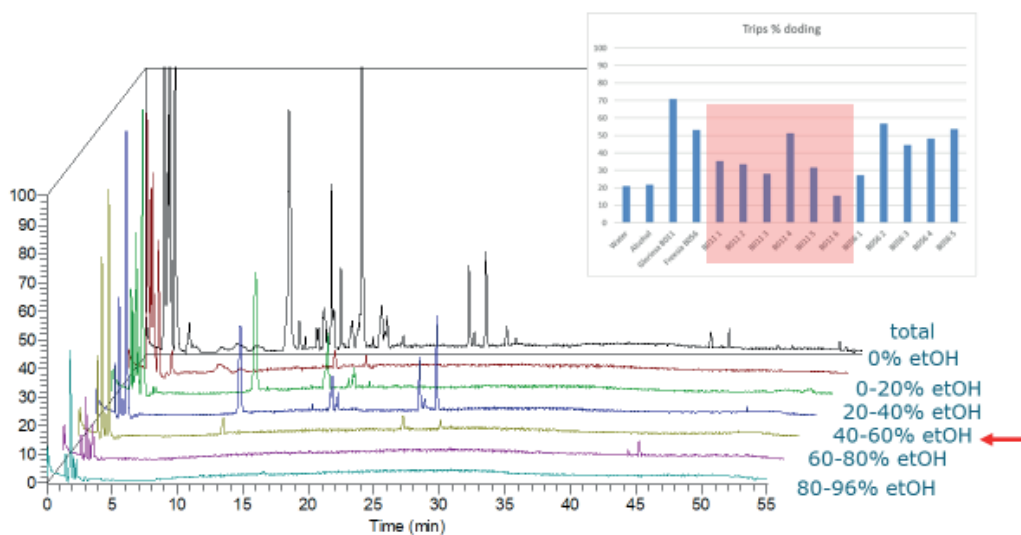


Figuur 4 Percentage dode tripsen na bespuiting met extracten B011 en B056 (zelfde als B017), gefractioneerde extracten (6 fracties van Extract B011 en 5 van Extract B056) en controles.

Het Extract B011 en de zes fracties zijn geanalyseerd met de LCMS. De volgende figuren geven de profielen van respectievelijk de negatieve en de positieve ionen. De rode pijl aan de rechterkant wijst de 4^e fractie (40-60% ethanol) aan.

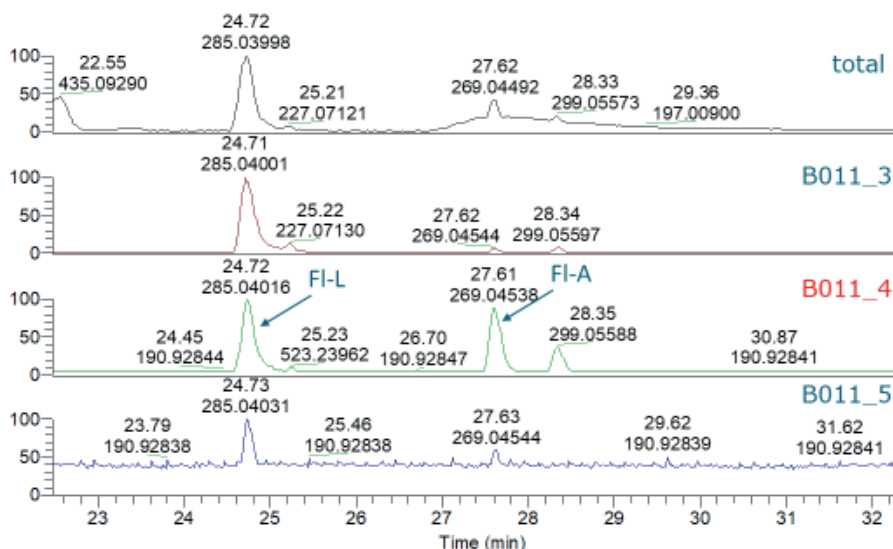


Figuur 5 Extract B011: LCMS profielen, negatieve ionen.



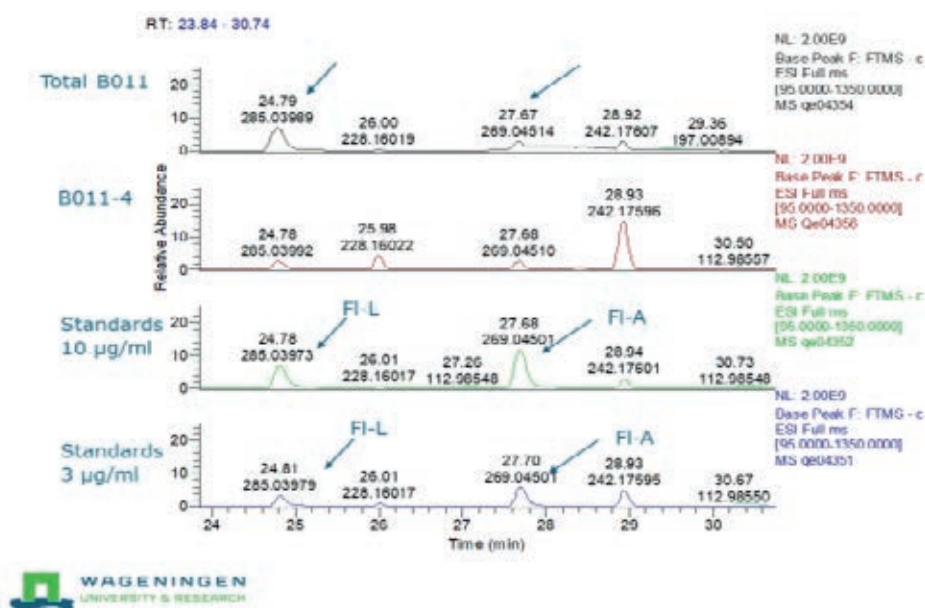
Figuur 6 Extract B011: LCMS profielen, positieve ionen.

Vervolgens is ingezoomd op de chromatografische pieken van de negatieve ionen in de 4^e fractie. Het resultaat staat in de volgende figuur.



Figuur 7 Detail van pieken van negatieve ionen in de 4^e fractie van B011. Boven de pieken staan de retentietijden (minuten) van de LC en de accurate massa (m/z negatieve ionen) van de MS.

In de meest bioactieve, 4^e SPE fractie zijn 2 pieken te zien. Op basis van de LCMS gegevens is de verwachting dat het hier om de moleculen FI-L (massa 285.040) en FI-A (massa 269.045) gaat. Deze stoffen zijn flavon-type flavonoiden. Ze waren nog niet beschreven in de metaboliëten database van Extract B011, maar wel bekend van andere sier- en groentegewassen. Om zeker te zijn dat het om deze stoffen gaat, is daarom een vergelijking gemaakt met een oplossing waarin de commercieel verkrijgbare standaarden voor FI-L en FI-A zijn opgenomen. Het resultaat staat in de volgende figuur.



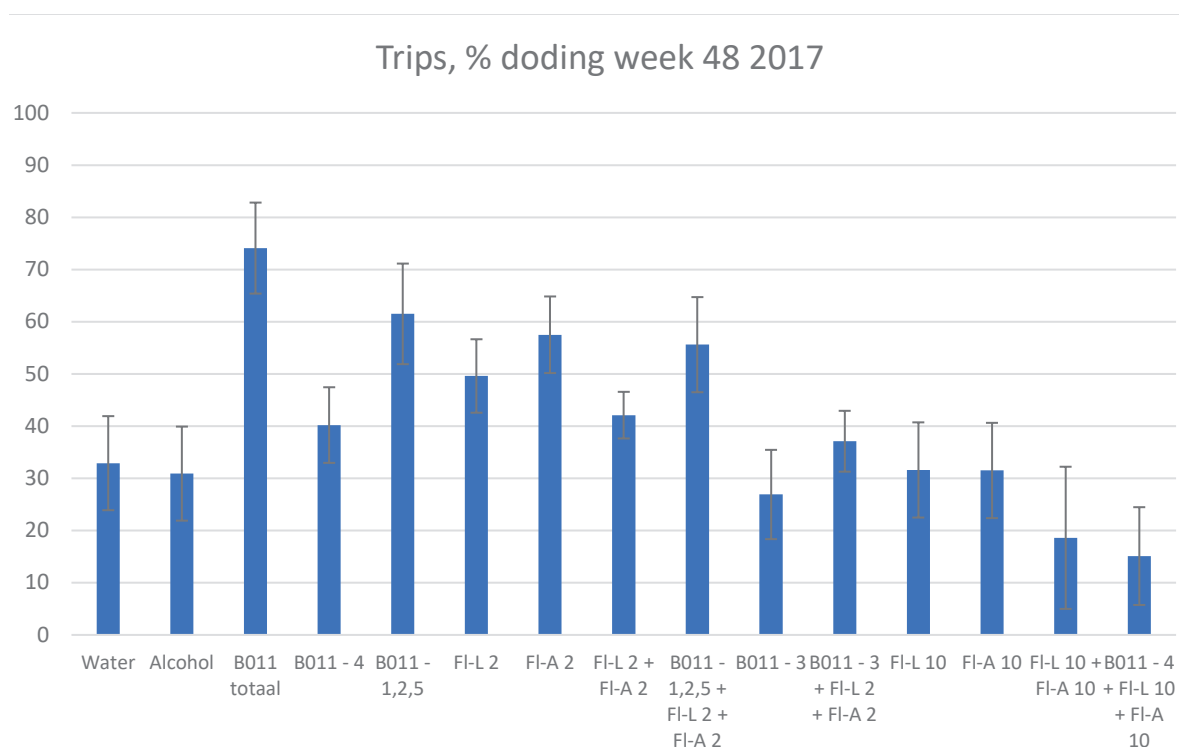
Figuur 8 Vergelijking met standaarden FI-L en FI-A in B011_4.

Het blijkt dat de pieken voor de standaarden FI-L en FI-A inderdaad samen vallen met de pieken in zowel het totale extract als de 4^e SPE-fractie ervan. Via de gebruikte concentraties van deze standaarden kon de concentratie van beide stoffen in het totaal Extract B011 worden geschat: dat was 2 µg/ml voor zowel FI-L als FI-A. We mogen daarom concluderen dat deze procedure van fractioneren en identificeren van het Extract B011 twee kandidaat moleculen heeft opgeleverd, die verantwoordelijk kunnen zijn voor de waargenomen doding van de trips. FI-L is al eerder waargenomen als een tegen trips actieve stof (Leiss *et al.* 2013). Het zou kunnen dat dit één van beide moleculen is, maar het kan ook zijn dat de combinatie voor een beter resultaat zorgt. Omdat het totale, niet gefractioneerde, extract van Extract B011 voor een betere doding zorgde dan alleen fractie 4, ligt het voor de hand dat een combinatie van deze twee moleculen met nog een aantal andere voor het effect van het totale extract hebben gezorgd. Niettemin zijn deze twee moleculen zeer interessante kandidaten. In het vervolg van het onderzoek zijn we ons daarom gaan richten op de bio-activiteit van deze moleculen, in verschillende combinaties.

3.4 Resultaten van verschillende combinaties extracten en stoffen in de bioassay

In week 48 in 2017 is een serie van combinaties van het Extract B011 in het bioassay getest. Het ging om de volgende behandelingen:

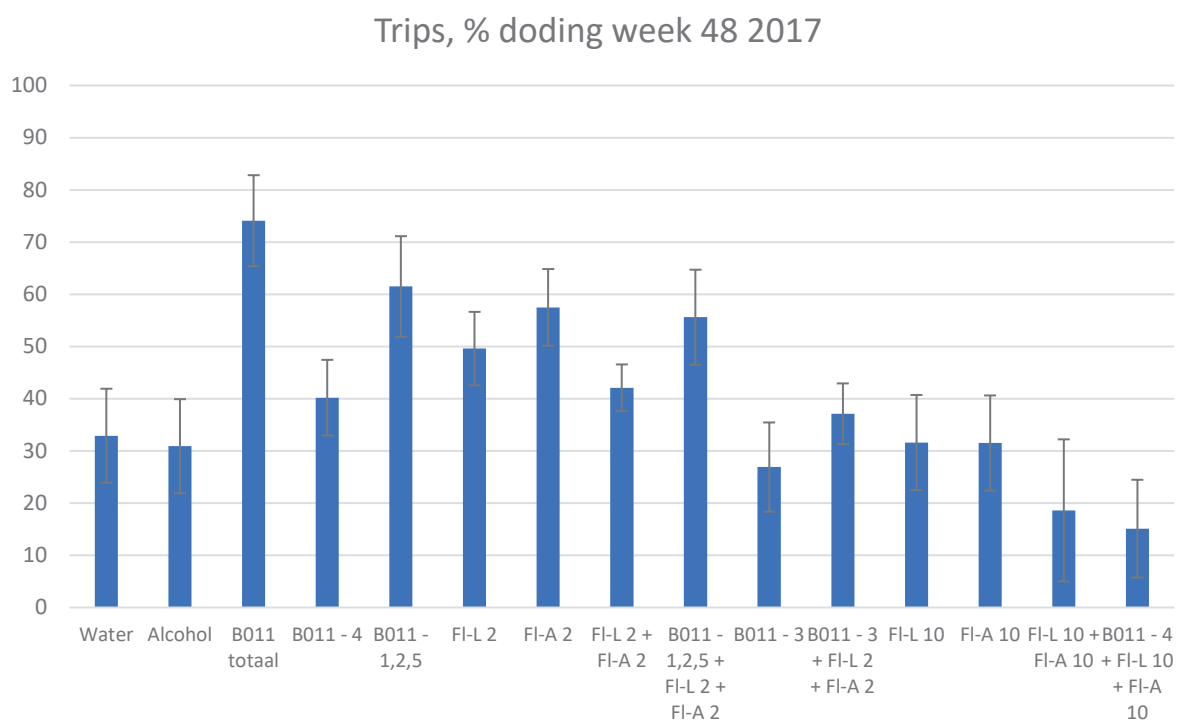
- B011 totaal: het gehele Extract B011
- B011_4: de 4^e fractie uit het Extract B011. In deze fractie zijn de moleculen FI-L en FI-A aanwezig.
- Een combinatie van de 1^e, 2^e en 5^e fractie van het Extract B011. Deze bevatten géén FI-L en FI-A. De hypothese was dat deze combinatie een lagere tripsdoding zou geven. Idem voor fractie B011_3, hoewel hierin wel FI-L maar veel minder FI-A aanwezig is dan in de 4^e fractie (zie figuur 7).
- Combinaties met 2 en 10 µg / ml FI-L en FI-A in 80% ethanol, dus ook in hun concentraties zoals aanwezig in het totaal extract van Extract B011 (2 µg/ml).
- Controles water en (80%) ethanol.



Figuur 9 Resultaat tripsproef week 48 2017.

Uit de proef kwam wederom dat het totale extract de meeste trips doodde. De combinatie van de fracties B011 1, 2 en 5 (zonder FI-L en FI-A) scoorde echter ook hoog, evenals zuiver FI-L en FI-A bij 2 µg/ml. Het toevoegen van FI-L en FI-A aan de gecombineerde 1,2,5-fracties van B011 leverde geen significante verbetering op. Hogere concentraties FI-A en FI-L (10 µg/ml) gaven een lagere score.

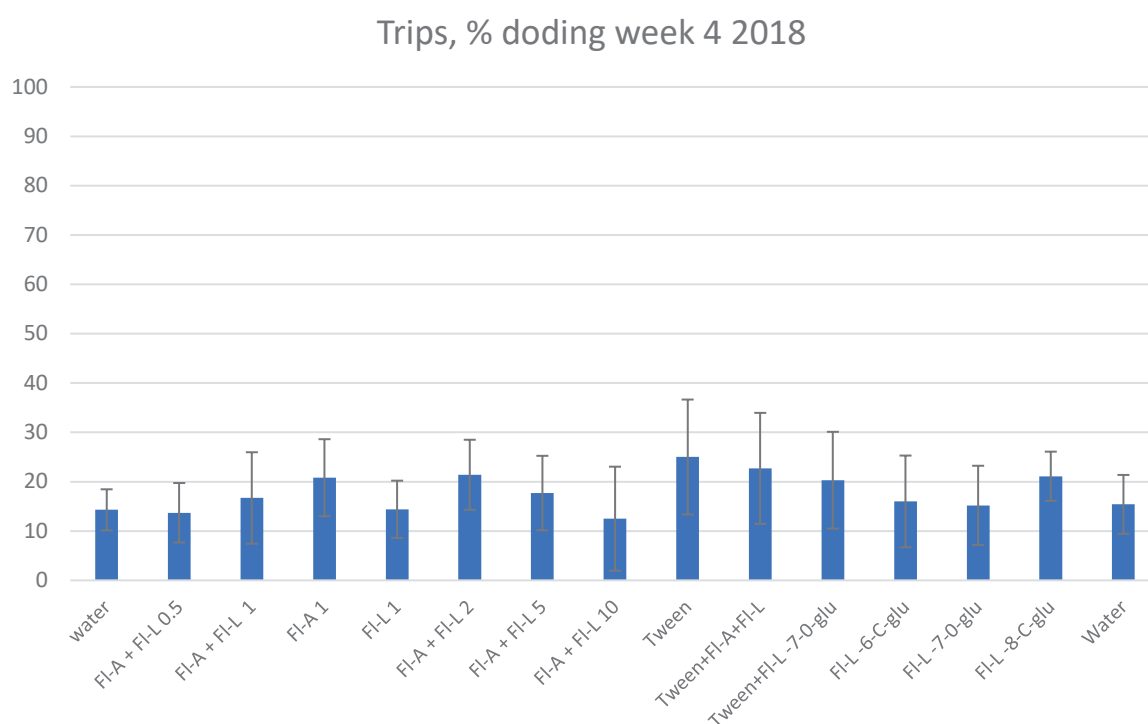
In week 51 van 2017 is de proef met deze behandelingen herhaald. De resultaten staan in de onderstaande figuur.



Figuur 10 Resultaat tripsproef week 51 2017.

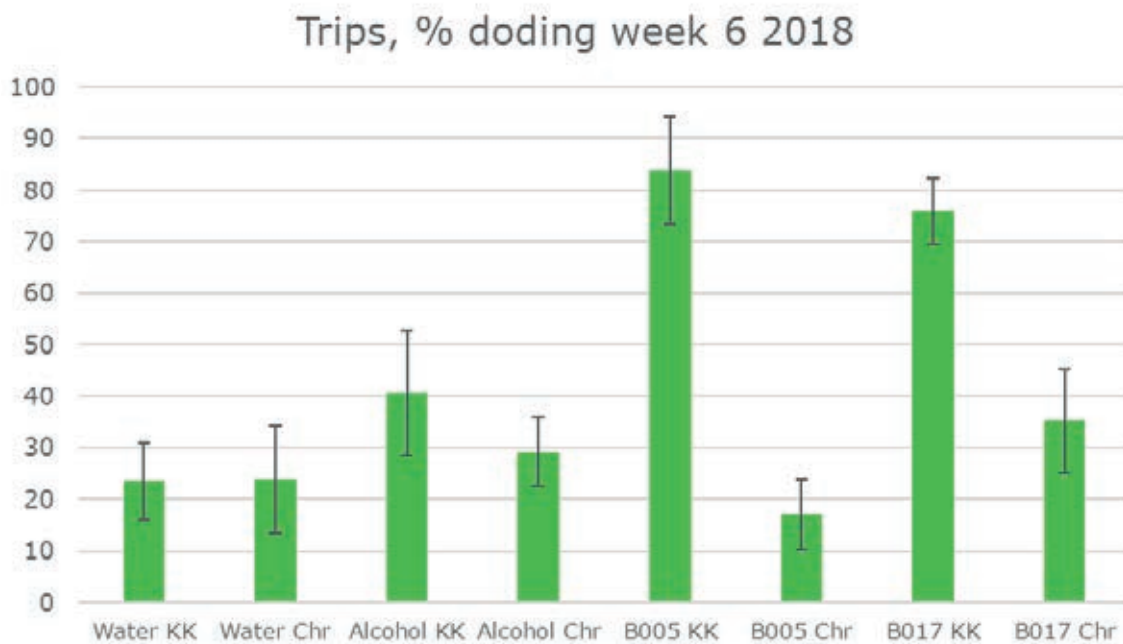
Het moge duidelijk zijn dat de doding van de trips in deze proef over de hele linie erg laag was.

Besloten is om in week 4 van 2018 opnieuw een proef te doen. In deze proef is meer gevarieerd met de concentratie van FI-L en FI-A. Omdat uit eerdere proeven bleek dat hogere concentratie een lagere effectiviteit opleverde, was de hypothese dat een nog lagere concentratie wellicht voor een betere effectiviteit zou zorgen. Tevens is geëxperimenteerd met Tween, een zeep-achtig middel dat als additief voor een betere oppervlakteverspreiding van de extracten voor een beter resultaat zou kunnen zorgen. De resultaten staan in de volgende figuur (Figuur 11).

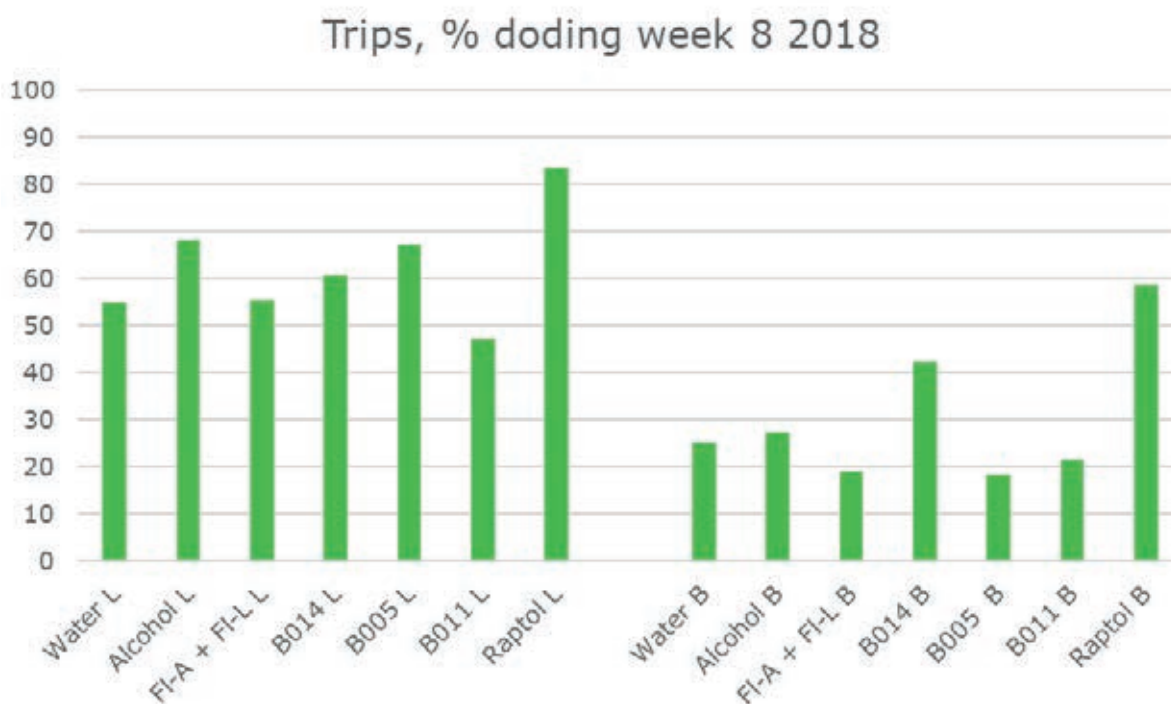


Figuur 11 Resultaten tripsproef week 4 2018.

Uit de resultaten bleek dat ook in deze periode de tripsdoding niet erg effectief was. Wellicht speelt de bevattelijkheid van trips tegen de middelen een rol. De bevattelijkheid van trips is onderzocht door de toets op trips van verschillende oorsprong toe te passen. In week 6 2018 is een vergelijking gemaakt van trips uit een kweek op chrysant met trips uit een kweek uit komkommer, beide kweken uit Bleiswijk. Van de Universiteit van Leiden konden we trips gekweekt op snijchrysant verkrijgen; deze is in week 8 vergeleken met trips uit Bleiswijk (uit de kweek op chrysant). Vanwege praktische redenen, namelijk dat in week 6 het extract van B011 geheel opgebruikt was, is in week 6 met extracten van andere gewassen gewerkt. Intussen werd er nieuw extract van B011 gemaakt, dat in week 8 kon worden ingezet.



Figuur 12 Resultaten van behandelingen tegen trips gekweekt op komkommer ('KK') en chrysant ('Chr') in week 6 van 2018.



Figuur 13 Resultaten van behandelingen tegen trips afkomstig uit Leiden ('L') en tegen trips uit Bleiswijk ('B') in week 8 van 2018.

Beide figuren laten inderdaad zien dat de oorsprong van de trips veel uitmaakt voor de effectiviteit van de middelen. De trips afkomstig van komkommer werd in hogere mate gedood dan die van de chrysant, en de trips uit Leiden bleek (veel) bevattelijker dan de trips uit Bleiswijk. Bij deze laatste proef moeten we in ogenschouw nemen dat de trips vrij kort voor de uitvoering van de proef zijn vervoerd van Leiden naar Bleiswijk; mogelijk heeft het transport voor stress gezorgd en daarmee voor een hogere vatbaarheid.

Naast de herkomst van de trips speelde ongetwijfeld het tijdstip in het jaar een rol voor wat betreft de effectiviteit van de bestrijding. In de wintermaanden was de trips wellicht veel minder actief, en daarmee veel minder bevattelijk voor de middelen. Helaas is in een deel van deze proeven de standaard praktijk referentie (Raptol) niet meegenomen. We kunnen dus niets zeggen of onze behandelingen slechter waren dan als we de praktijkreferentie zouden hebben gebruikt. Alleen in de proeven in week 8 van 2018 is Raptol wel als controle meegenomen: in deze proef scoorde Raptol beter dan de verschillende plantextracten, waaronder die van Extract B011.

Samengevat waren zijn de conclusies uit deze serie proeven als volgt:

- We hebben in de winter, binnen enkele weken, een grote teruggang in doding van trips gezien. Dit was over de hele linie, niet alleen door de extracten, maar ook door de controles water en alcohol. De hypothese is dat de trips in de winter veel minder actief is, en daardoor veel minder gevoelig. Dit werd onderschreven door praktijkervaringen, waar verschillen van wel 30 tot 50% tussen zomer en winter worden waargenomen en zelfs ook verschillen tussen tijdstippen van bespuiting op de dag.
- Helaas is niet altijd de industriële benchmark (Raptol) meegenomen. Raptol bestaat uit (plantaardige) pyrethroïden opgelost in koolzaadolie en ongetwijfeld nog een aantal andere (geheime) stoffen. De koolzaadolie zorgt voor een betere werking van de pyrethroïden doordat het de huid van de trips weker maakt (Vissers, 2014).
- We hebben hier een zeepachtig oplosmiddel Tween toegevoegd: dat gaf geen verbetering van de resultaten.
- We zagen een groot verschil in gevoeligheid bij trips die op chrysant waren opgekweekt, en trips die op komkommer was opgekweekt. Dit gold ook voor Raptol: de werking tegen trips van chrysant was niet geweldig, tegen trips van komkommer een stuk beter. Conclusie is dus ook dat Raptol niet altijd even goed werkt.
- We zagen een groot verschil tussen trips uit Bleiswijk en trips uit Leiden, beiden opgekweekt op chrysant: die uit Leiden waren veel gevoeliger. Dit was echter ook voor water het geval; mogelijk speelde hier stress van de verhuizing naar Bleiswijk een rol.
- Bij proeven met materiaal op basis van Extract B005 (olie door stoomdestillatie en een hydrolaat) zagen we met name bij de olie hele goede bestrijding. Ook hier kan dus de formulering van het middel van belang zijn. Echter hierbij moet in ogenschouw worden genomen dat destillatie olie ook een andere samenstelling van inhoudsstoffen heeft dan een hydrolaat: olie-oplosbare versus water-oplosbare stoffen.

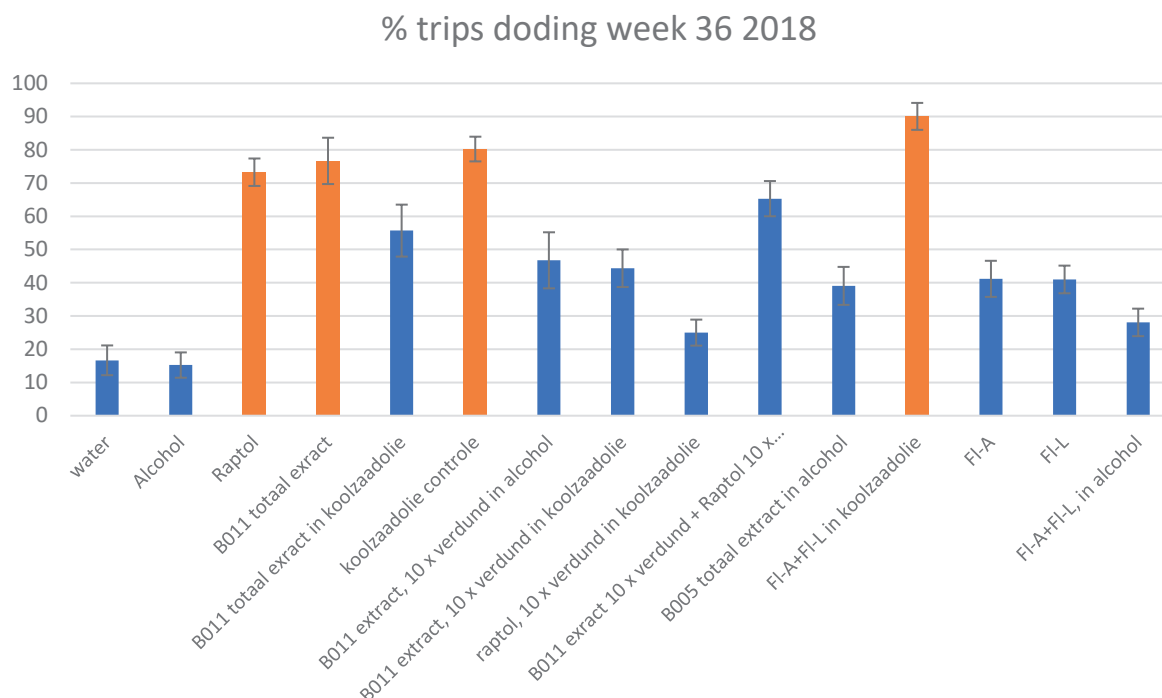
Op basis van deze resultaten en conclusies heeft het consortium besloten een 'go' te geven voor een nieuwe serie proeven met de bioassay. In 2018 zijn daarom nog vier proeven uitgevoerd, voor de vergelijkbaarheid zoveel mogelijk in dezelfde weken als 2017:

- Week 36 (begin september): nazomer omstandigheden
- Week 42 (medio oktober): herfst omstandigheden
- Week 49 (begin december): winter omstandigheden waarbij in 2017 nog wel goede resultaten waren behaald
- Week 51 (midden december): winter omstandigheden waarbij in 2017 opeens geen goede resultaten meer werden behaald.

Per proef zijn maximaal 15 verschillende behandelingen uitgevoerd. Deze zijn:

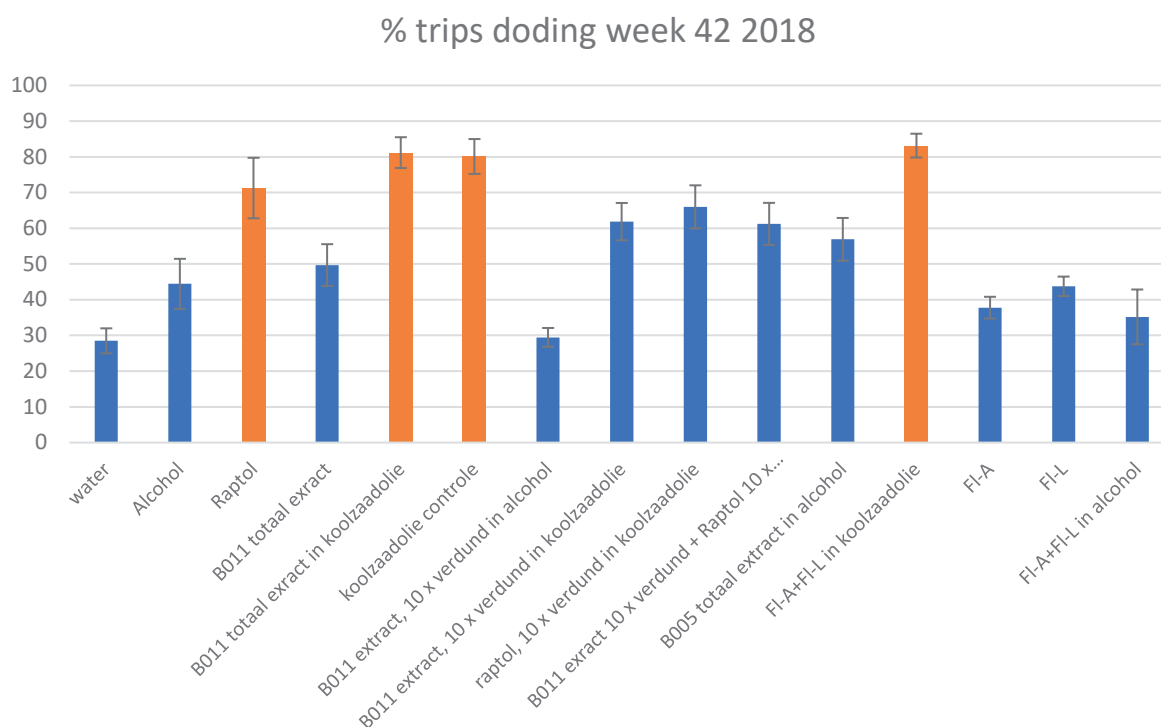
Nr	Sample	Opmerking
1	Water	controle
2	Alcohol	controle
3	Raptol, chemische positieve controle	pyrethrines in koolzaadolie
4	Extract B011 totaal extract, in alcohol	
5	Extract B011 totaal extract, gedroogd en opgenomen in koolzaadolie	
6	Koolzaadolie controle	controle
7	Extract B011, 10 x verdund in alcohol	
8	Extract B011, 10 x verdund in koolzaadolie	
9	Raptol, 10 x verdund in koolzaadolie	
10	Extract B011 10 x verdund + Raptol 10 x verdund, beide in koolzaadolie	
11	Extract B005 totaal extract in alcohol	
12	Extract B005 destillaat (olie)	
13	FI-A	2 ug / ml in alcohol
14	FI-L	2 ug / ml in alcohol
15	FI-A + FI-L, in alcohol	2 ug/ml elk, in alcohol

De resultaten van deze proeven worden hieronder weergegeven.



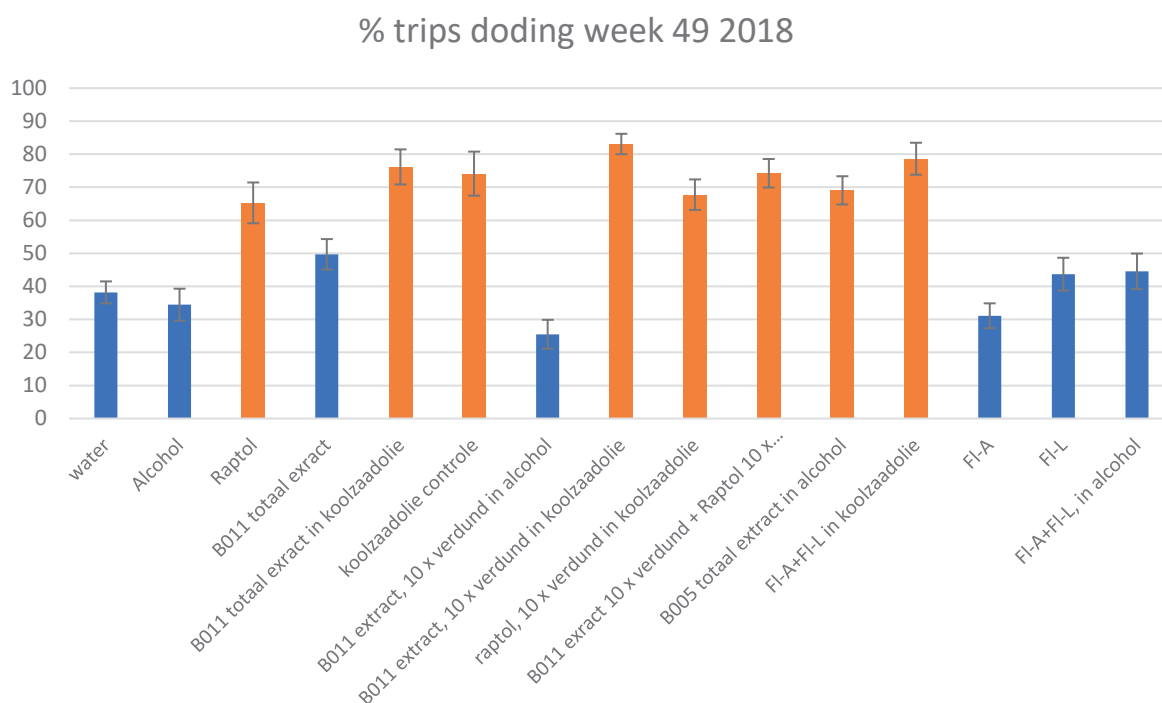
Figuur 14 Resultaten tripsproef week 36 2018.

In deze proef deed het ExtractB011 het weer goed. Raptol deed het ook goed, maar scoorde geen 100% doding. Koolzaadolie met FI-L en FI-A deed het goed, maar opvallend genoeg gold dat ook voor 'pure' koolzaadolie.



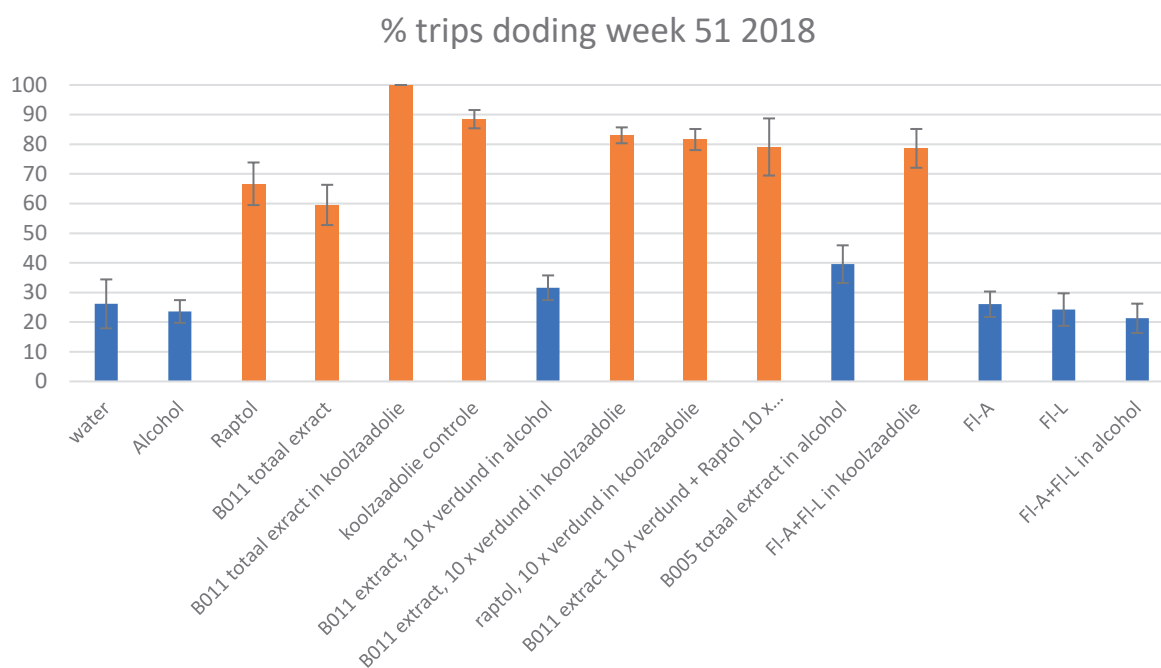
Figuur 15 Resultaten tripsproef week 42 2018.

De resultaten van week 42 zijn redelijk in lijn met die van week 36. Er zijn een paar verschillen. De meest opmerkelijke: de effecten van het ExtractB011 (in alcohol) en het ExtractB011 opgenomen in koolzaadolie zijn precies andersom vergeleken met de 1^e keer. We hebben geen verklaring hiervoor. Er zijn precies dezelfde extracten gebruikt.



Figuur 16 Resultaten tripsproef week 49 2018.

De resultaten in deze proef zijn wederom in lijn met de resultaten van de vorige twee proeven.



Figuur 17 Resultaten tripsproef week 51 2018.

En ook de resultaten in deze 'winter' proef zijn in dezelfde lijn. Vergeleken met de resultaten uit 2017 is er geen sprake van de grote terugval die in 2017 is gezien. In 2017 kwam geen van de behandelingen boven de 20% en veel niet eens boven de 10%; nu scoort alles boven de 20% doding. Wel lijken er grotere verschillen tussen de verschillende behandelingen. Opvallend is de 100% score van het Extract B011 in koolzaad olie. Maar ook de andere behandelingen met koolzaad en/of Extract B011 scoorden hoog.

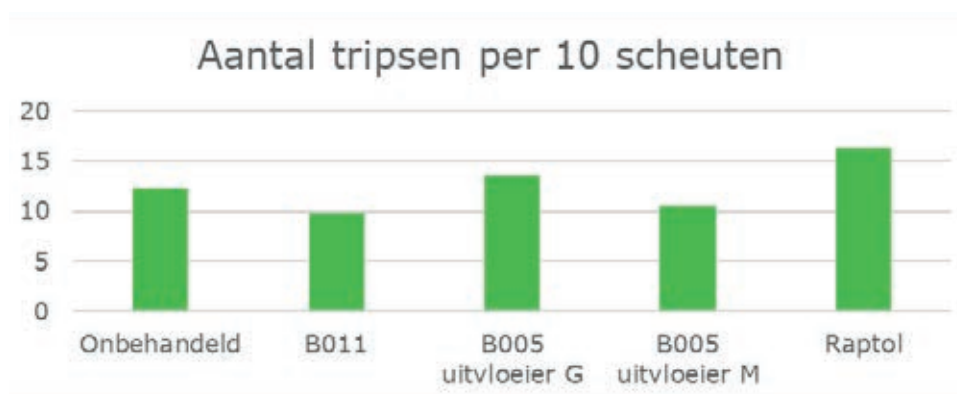
Samengevat trekken we de volgende conclusies:

- We zien niet de teruggang in mortaliteit zoals in 2017.
- Koolzaadolie zelf werkt ook.
- Zuiver FI-A en FI-L werken wel in koolzaadolie, maar niet in alcohol.
- Raptol doet het altijd behoorlijk goed, echter nooit 100% doding.
- Sommige extracten werken soms net zo goed als Raptol.
- De meest veelbelovende behandelingen lijken te zijn:
 - Extract B011 totaal extract in alcohol (behandeling 4) (zonder koolzaadolie).
 - Extract B005 totaal extract in alcohol (behandeling 11) (zonder koolzaadolie).
 - Extract B011 totaal extract, gedroogd en opgenomen in koolzaadolie (behandeling 5).

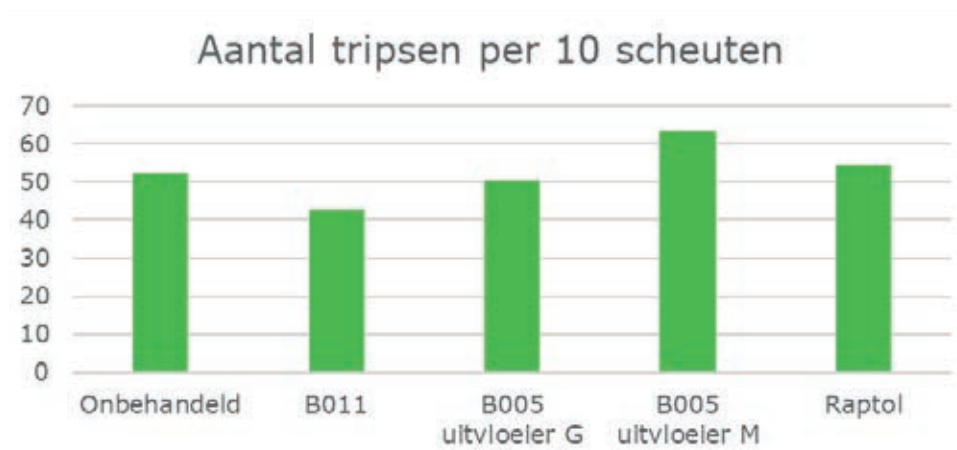
3.5 Resultaten Proeftuin Zwaagdijk

De proef bij Proeftuin Zwaagdijk is gestart met het planten van chrysant op 16-6-2020. Op 17-6-2020 is trips in het gewas gebracht. Er is een 1^e fase van vier bespuitingen gedaan met steeds drie of vier dagen ertussen. Er zijn zeven keer waarnemingen gedaan, de laatste waarneming twee weken na de laatste bespuiting. Een week later is gestart met een tweede fase van drie bespuitingen op dezelfde planten, met een interval van een week. Hierbij is zes keer beoordeeld, de laatste keer drie dagen na de laatste bespuiting.

Bij de start van het onderzoek is een lage tripsdruk gemeten. Gedurende het onderzoek nam de populatie met trips in de onbehandelde velden toe tot een matige aantasting. Op het moment dat de druk toenam, in de tweede fase van het onderzoek, is effectiviteit gemeten met het Extract B011. Hoewel verschillen niet statistisch betrouwbaar waren, scoorde het Extract B011 beter dan de referentie Raptol. Met geen van de andere objecten is effectiviteit gemeten. Ook het referentieproduct Raptol was niet beter dan de onbehandelde veldjes. Zie Figuur 18 en Figuur 19. (NB anders dan de eerder gepresenteerde grafieken staan hier de getelde levende larven en adulten per 10 scheuten weergegeven). Ondanks dat de proef in een heel warme periode is uitgevoerd, kon Proeftuin Zwaagdijk geen verband vinden tussen spuitomstandigheden en effectiviteit.



Figuur 18 Resultaten 1e fase door Proeftuin Zwaagdijk uitgevoerde proef.



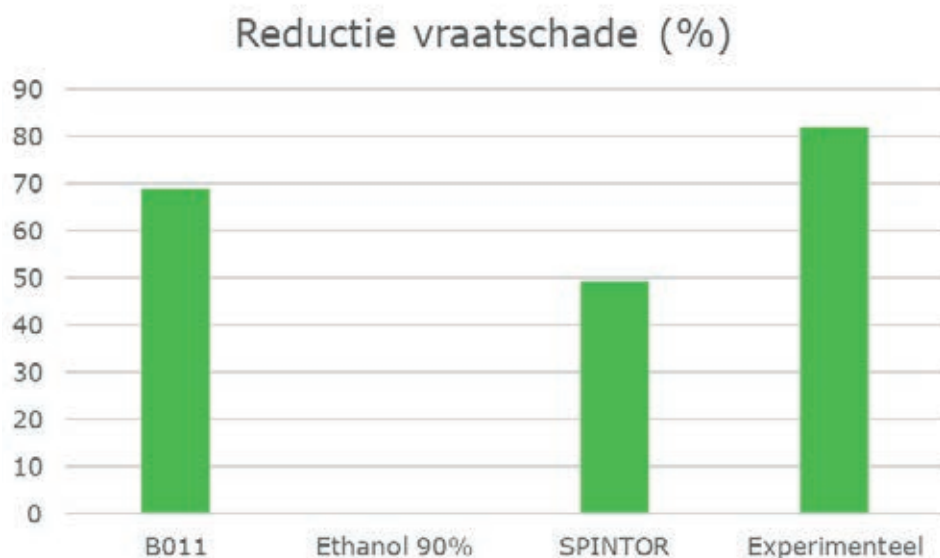
Figuur 19 Resultaten 2^e fase door Proeftuin Zwaagdijk uitgevoerde proef.

Met geen van de middelen is na de bespuitingen gewasschade gezien. Met Raptol is behoorlijk veel spuitresidu gevonden. Bij een van de Extract B005 olie behandelingen is een kleine hoeveelheid spuitresidu gevonden.

Zie Bijlage 1 voor een integrale weergave van het verslag van de proef door Proeftuin Zwaagdijk.

3.6 Resultaten proef door Kimatec

Kimatec heeft het Extract B011 vergeleken met het commercieel verkrijgbare product Spintor, een eigen product van Kimatec dat nog in ontwikkeling was, en een controle van 2 ml ethanol 90% aangevuld met water tot 5 ml. Ten opzichte van de controle gaf het Extract B011 een significant lagere vraatschade. Het Extract B011 leverde minder vraatschade op dan Spintor. Het experimentele middel van Kimatec gaf een nog hogere reductie van vraatschade. Zie Figuur 20.



Figuur 20 Resultaten door Kimatec uitgevoerde proef.

Kimatec heeft geen fytotoxische schade op de planten geconstateerd.

Kimatec heeft de volgende aanbevelingen geformuleerd:

- Test verschillende formuleringen om de benodigde dosis van het extract te verminderen,
- Voer dosis-respons studies uit,
- Test het extract in mixen voor synergistisch effecten.

3.7 Registratietraject

3.7.1 Verkennend gesprek met Ecostyle

In het kader van gesprekken met bedrijven die mogelijk geïnteresseerd zijn in het opwerken tot een commercieel product, is op 26 juni 2019 gesproken met EcoStyle (www.ecostyle.nl). EcoStyle is gericht op de distributie van biologische gewasbeschermingsmiddelen in Nederland. In dit gesprek is ingegaan op het traject om tot registratie van een gewasbeschermingsmiddel te komen.

Ecostyle beschreef de indeling van stoffen voor registratie volgens de EU-richtlijn 1107. Er zijn 4 basis categorieën: 1. Actieve stoffen, 2. Regulier gewasbescherming, 3. Lage risicostoffen en 4. Basisstoffen. Alle categorieën behalve de basisstoffen moeten de reguliere registratie door lopen, waarvoor volgens de inschatting van Ecostyle een traject van circa 10 jaar en 10 miljoen euro nodig is. Voor dit traject is het aan te bevelen om samen te werken met een grote speler zoals Bayer, Syngenta of Neudorff als potentieel toelatingshouder. Een dergelijk bedrijf is waarschijnlijk vooral geïnteresseerd in toepassing bij gewassen met een grote marktomvang, zoals granen, aardappel of druiven. Basisstoffen zijn stoffen die een andere toepassing dan naast gewasbescherming hebben maar ook voor deze gebruikt kunnen worden. Er is dus geen toetsing van elk actieve stof nodig. Basisstoffen hebben geen IP-bescherming. Ecostyle leidt zelf geen werkzame stoffen naar categorie 3 toe, maar verzorgt voor grotere fabrikanten, die de toelatingen hebben verzorgd, de vermarkting en begeleiding in Nederland, België, Deense en Oostenrijkse markten.

Het toetsen van de effectiviteit van alle actieve stoffen is belangrijk voor toelating in de EU. Dit kan een probleem zijn als we met hele plantenextracten werken. Verder zijn specificiteit toetsen belangrijk en veiligheid voor mens en ecosysteem.

Ecostyle ziet een grote potentie voor fungiciden als ook voor middelen tegen trips op de Nederlandse en de EU-markt. Ze denkt dat biologische gewasbeschermingsmiddelen uit restafval van planten binnen de circulaire economie van LNV een grote rol kunnen spelen.

3.7.2 Advies Artemis

Projectpartner Artemis adviseert om te gaan voor registratie in categorie 3: laag risicostoffen. Artemis schat in dat je voor deze categorie ongeveer de helft van de tijd kwijt zult zijn (5 ipv de door Ecostyle genoemde 10 jaar) en navenant ook veel minder kosten. Artemis geeft aan dat er 2 registraties nodig zijn: die van de werkzame stof, dit gebeurt Europees door EFSA, en die van het middel (de werkzame stof plus de hulpstoffen - de 'formulering'), dit gebeurt nationaal door CTGB. Artemis adviseerde om informatie in te winnen bij een gespecialiseerd bureau, en beval Linge Agroconsultancy aan.

3.7.3 Informatie van Linge Agroconsultancy

Linge Agroconsultancy (www.lingeagroconsultancy.nl) is gespecialiseerd in registratietrajecten voor gewasbeschermingsmiddelen. Op 1 oktober 2019 is gesproken met twee specialisten van dit bedrijf. In het gesprek met hen gaven ze als 1^e aan, wat de definitie van een laag risico middel is: dit is een niet "geclassificeerd" middel. Een middel is niet geclassificeerd als dat gevaar voor mens of milieu oplevert (het bekende gevarendriehoekje op het etiket). Het is niet mogelijk is om een procedure aan te vragen om een middel als 'laag risico' geregistreerd te krijgen. Wat wel kan, is een goed dossier aanleveren waaruit het lage risico blijkt, en dit bij de aanvraag te melden.

De EFSA heeft een lijst met planten die sowieso niet in aanmerking komen voor een 'laag risico' middel. Het is verstandig om die lijst eerst te raadplegen. Wat ook in het begin moet worden nagekeken, is of een extract al niet is geregistreerd in de zgn. Pesticide Database.

Daarnaast is het aan te bevelen om in de literatuur na te zoeken, wat er van de betreffende planten bekend is over zaken als toxiciteit, afbraaksnelheid etc. Voor het dossier voor EFSA moet op zeer grondige wijze, volgens een streng protocol (de Guidelines van EFSA) , de literatuur nagezocht worden, waarbij geen artikel uit de laatste 10 jaar mag worden vergeten. Dit is een dienst dat Linge Agroconsultancy kan leveren. Het is mogelijk om extracten aan te melden als gewasbeschermingsmiddel. Belangrijk is dat de extracten reproduceerbaar moeten zijn.

Linge Agroconsultancy adviseert om als een van de 1^e stappen na het scannen van de EFSA lijst en de literatuur, een effectiviteitsonderzoek te laten uitvoeren. De uitslag moet bevestigen wat in de biotoetsen is gevonden, namelijk dat het werkt (op -semi- praktijkschaal). Het resultaat van een dergelijk onderzoek is van belang om bedrijven zoals Neudorff te overtuigen van de potentie van het middel. Een bedrijf dat naast de door Ecostyle genoemde (grote) bedrijven ook middelen laat registreren, is Certis.

3.7.4 EFSA lijst

De EFSA lijst (EuropeanFoodSafetyAuthority, 2012) is doorgenomen, waarbij gekeken is welke gewassen die door het projectconsortium worden geteeld, in deze lijst zijn opgenomen. De resultaten zijn samengevat in Tabel 3.

Tabel 3

Samenvatting EFSA lijst van gewassen uit het projectconsortium, op risico's voor de humane gezondheid.

Plant	Parts of plants of possible concern	Chemical of concern	Remarks on toxic/adverse effect(s) not known to be related to the identified chemical(s) of concern	Specific References
B006	Flower	Essential oil: monoterpene etheroxide: 1,8-cineole and bicyclic monoterpene: camphor.		Shunying Z <i>et al.</i> 2005. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of B006
B011	Whole plant	Genus in which species may contain tropolone alkaloids: e.g. colchicine	Extract B011 superba L. (G. simplex L.): colchicine in flower (1.05-1.18%), leaf (0.87-2.36%) and tuber (0.66-0.92%)	Ntahomvukiye D. <i>et al.</i> 1984. Quantitative determination of colchicine simplex Liliaceae of Rwanda Central Africa. <i>Plantes Medicinales et Phytotherapie</i> . 18(1), 24-27.
B001	Aerial part	Leaf: triterpenoid saponins (2.5%-5.7%); e.g. alpha-hederin,	Intoxication caused by the fruits ('berries').	Cooper M.R. and Johnson A.W. 1998. Poisonous plants and fungi in Britain. Animal and human poisoning. The Stationery Office. ISBN 0-11-242981-5. Frohne D, Pfänder HJ and Anton R. 2009. <i>Plantes à risques</i> , Ed. Tec et Doc-Lavoisier, ISBN: 978-2-7430-0907-1
B005	Fruit and leaf	Essential oil from leaf: phenylpropanoids: e.g. methyleugenol (1.7-11.8%) and monoterpene etheroxide: 1,8-cineole (34-53%)		Council of Europe. 2000. <i>Natural Sources of Flavourings</i> , Rep No.1, ISBN 978-92-871-4324-2
B014	Bulb	Bulb reported to contain steroidal saponins and steroidal alkaloids and a protein: e.g. liliin,		Mimaki Y. and Sashida Y. 1990. Steroidal saponins and alkaloids from the bulbs of <i>Lilium brownii</i> var. <i>colchesteri</i> . <i>Chem. Pharm. Bull.</i> 38, 3055-3059. Wang H. and Ng T.B. 2002. Isolation of liliin, a novel arginine - and glutamate-rich protein with potent antifungal and mitogenic activities from lily bulbs. <i>Life. Sci.</i> 70, 1075-1084

De conclusie is dat van de in onderhavig project onderzochte gewassen, alleen B017 niet genoemd wordt. De bevindingen zijn voorgelegd aan Linge Agroconsultancy met de vraag wat hiervan de consequenties zijn. Het is zeker niet uitgesloten dat extracten van de vijf in de lijst genoemde gewassen uiteindelijk toch als gewasbeschermingsmiddel geregistreerd kunnen worden. Het is zelfs niet uitgesloten dat deze middelen zonder beschermende middelen toegediend kunnen worden. Vanwege het feit dat de gewassen wel genoemd staan in de lijst, is het echter vrijwel uitgesloten dat ze als 'low risk' middelen de trajecten van registratie kunnen doorlopen. Overigens is het ook niet zo dat omdat B017 niet genoemd staat in de EFSA lijst, B017 per definitie tot de low risk middelen zal behoren.

Er zijn 2 trajecten: de registratie van de werkzame stof op Europees niveau, en de registratie van het middel met formulering, hulpstoffen etc. op Nederlands niveau. Winst voor low risk middelen in doorlooptijd en kosten zijn met name te verwachten in het 2^e door Nederland te beoordelen traject.

Een snelle berekening aan de gehalten colchicine in Extract B011 en de hoeveelheden die voor mensen als toxisch worden beschouwd, geeft geen optimistisch beeld: je hoeft maar de inhoud van een klein beetje Extract B011 binnen te krijgen, of je komt boven de veiligheidsniveaus die EFSA noemt. Er zou meer bekend moeten zijn van hoeveel van een middel mensen binnen krijgen als ze een bespuiting in het gewas doen, om iets over het risico te kunnen zeggen.

3.7.5 Pesticide database

De pesticide database (ec.europa.eu/food/plants/pesticides, 2019) is onderzocht op het voorkomen van extracten van de gewassen van het project consortium. De extracten staan er niet in. Ook niet de inhoudsstoffen die mogelijk voor de bestrijding van trips verantwoordelijk zijn, zoals FI-L en FI-A, staan niet in deze database. Dat is op zich goed nieuws: als deze namelijk wel in de database hadden gestaan, was er geen mogelijkheid meer om de stoffen te (laten) registreren.

3.8 Kostprijs analyse

In het extractie protocol (zie Poot *et al.* 2016, blz. 14) werd uitgegaan van 100 gram vers plantmateriaal. Aan dit verse plantmateriaal werd 500 ml ethanol 96% toegevoegd. Na extractie kon ongeveer 400 ml extract met een ethanolgehalte van 80% worden afgevuld. Voor de vertaling naar productiekosten van sierteeltextracten is deze werkwijze in de afgebeelde spreadsheet rekenkundig gereconstrueerd voor verschillende droge stof gehalten, zie Tabel 4.

Tabel 4

Berekening van het afvulbaar volume.

Extract	B017	B001	B014	B005
Input				
Vers plantmateriaal (g)	100	100	100	100
Droge stof gehalte 9%)	10%	20%	40%	60%
Vocht in materiaal (ml)	90	80	60	40
Solvens>>ethanol (%)	96%	96%	96%	96%
Solvens>>ethanol (ml)	500	500	500	500
Extract>>bruto volume (ml)	590	580	560	540
Ethanolgehalte na extractie (%)	81%	83%	86%	89%
Afvulbaar>>volume %	80%	80%	80%	80%
Afvulbaar>>netto volume (ml)	472	464	448	432

De conclusie van deze berekening is dat producten met een lager drogestof gehalte een groter afvulbaar volume opleveren.

De afvulbare volumes en ethanolgehaltes blijken licht behoudend te zijn ingeschat. In de rekenkundige reconstructie komen de ethanolgehaltes en de afvulbare volumes ongeveer 10% hoger uit. In een productiecontext zit hier ruimte voor efficiëntieverbetering.

In het extractie protocol van Poot *et al.* (2016) werd geen rekening gehouden met verschillen in droge stof gehalten. Het waarom van 80% afvulbaar bleef een black box. Bij een zoektocht op Wikipedia ([https://nl.wikipedia.org/wiki/Cel_\(biologie\)](https://nl.wikipedia.org/wiki/Cel_(biologie))) naar de samenstelling van plantencellen en de opslag van inhoudsstoffen kwam opslag van afweerstoffen (alkaloïden) in vacuolenvocht naar voren. In die context kan extraheren worden uitgelegd als het openbreken van plantencellen en het oplossen van vacuolenvocht en inhoudsstoffen in ethanol. Dat geeft aansluiting naar drogestofgehalten en de binding van ethanol aan droge stof ('sponswerking') waardoor het afvulbare volume wordt beperkt. Verder blijken alkaloiden goed oplosbaar zijn in ethanol 50-70%. Kennelijk bevat het protocol van ethanol 80% (na extractie) een behoudend element.

Toevoeging van ethanol 70% volstaat voor een ethanolgehalte na extractie van 60%. Door het vacuolenvocht als onderdeel van het extract te beschouwen, is minder oplosmiddel (410-460 liter per 100 kg vers plantmateriaal) nodig om tot 500 liter extract te komen. Bij de sponswerking is uitgegaan van de zogenaamde *random loose packing* (suikerkorrels in een suikerpot). 60% van de ruimte wordt ingenomen door korrels en 40% van de ruimte door lucht. In ons geval wordt de ruimte tussen de drogestofkorrels ingenomen door extract en kan deze niet worden afgevuld. Vanwege een mogelijk minder optimale pakking dan bij suiker is voor de sponswerking van de droge stof een factor 2 ingebouwd. Bij tien eenheden droge stof zijn dan dertien eenheden extract onbereikbaar voor winning. Volgens deze benadering kan bij lage drogestofgehalten (10-20%) ongeveer 95% worden afgevuld. Bij hoge drogestofgehalten (40-60%) kan ongeveer 85% worden afgevuld (zie Tabel 5).

Tabel 5

Redenering vanuit vacuolevocht.

Extract	B017	B001	B014	B005
Input				
Vers plantmateriaal (g)	100	100	100	100
Droge stof gehalte 9%)	10%	20%	40%	60%
Vocht in materiaal (ml)	90	80	60	40
Solvens>>ethanol (%)	70%	70%	70%	70%
Solvens>>ethanol (ml)	410	420	440	460
Extract>>bruto volume (ml)	500	500	500	500
Ethanolgehalte na extractie (%)	57%	59%	62%	64%
Afvulbaar>>volume %	13	27	54	80
Afvulbaar>>netto volume (ml)	487	473	446	420

Tabel 6 geeft de berekening van de kostprijs weer. Hierin staat een specificatie van de ethanolkosten en de bewerkingskosten (arbeid en apparatuur) van extractie. Voor ethanol 96% is uitgegaan van een wereldmarktprijs van € 0,50 per liter (bron: EUBIA -European Biomass Industry Association). Via verdunning naar ethanol 70% en verlies door sponswerking komen de ethanolkosten op € 0,31-€ 0,40 per liter extract. Op de prijsopgave van DuSart Pharma (€ 15,00 per liter extract) zijn de ethanolkosten in mindering gebracht, resulterend in de bewerkingskosten per liter extract. Uit het overzicht kan worden afgelezen dat de bewerkingskosten (arbeid/apparatuur) bepalend zijn voor de kostprijs.

Tabel 6

Kostprijs berekening.

Kostprijs van extract	B017	B001	B014	B005
Marktprijs ethanol (€/l) 96%	0.50	0.50	0.50	0.50
Kosten solvens (€/l) 70%	0.36	0.36	0.36	0.36
Gebruikt volume (l)	410	420	440	460
Ethanol kosten extractie (€/l)	149	153	160	168
Afgevuld volume (l)	487	473	446	420
Ethanol kosten extract (€/l)	0.31	0.32	0.36	0.40
Prijsopgave fabrikant (€/l)	15	15	15	15
Bewerkingskosten (€/100 kg)	5800	5800	5800	5800
Afvulbaar volume extract (l)	487	473	446	420
Bewerkingskosten extract (€/l)	11.92	12.58	12.99	13.82
Kostprijs afgevuld extract (€/l)	12.23	12.58	13.35	14.22

Uit de berekening blijkt dat de kostprijs van een extract voor 2,5% bestaat uit de kosten van ethanol, en voor 97,5% uit kosten voor arbeid en apparatuur.

In Tabel 7 is gerekend vanuit de prijsopgave en het protocol van Herbamed. Herbamed werkt met ethanolvolumes gebaseerd op het gewicht aan vocht in het verse plantmateriaal. Dit resulteert in lagere volumes (350 liter i.p.v. 480 liter bij 10-20% droge stof) en navenant hogere concentraties van afweerstoffen in het extract. Op de prijsopgave van Herbamed (SFR 10,00 = € 9,00 per liter extract) zijn de ethanolkosten in mindering gebracht, resulterend in de bewerkingskosten per liter extract. Dat resulteert in bewerkingskosten per liter extract die ongeveer 40% lager liggen dan bij DuSart Pharma. Het protocol van Herbamed pakt nadelig (uitgedrukt in afgevlude volumes) uit voor plantmateriaal met hoge drogestofgehaltes. Door de koppeling aan de vochtinhoud van het plantmateriaal wordt er weinig ethanol toegevoegd en blijft er door de sponswerking een klein afgevuld volume over.

Tabel 7

Kostprijs bij lagere bewerkingskosten.

Kostprijs van extract	B017	B001	B014	B005
Marktprijs ethanol (€/l) 96%	0.50	0.50	0.50	0.50
Kosten solvens (€/l) 70%	0.42	0.42	0.42	0.42
Gebruikt volume (l)	321	286	214	143
Ethanol kosten extractie (€/l)	134	119	89	60
Afgevuld volume (l)	398	339	221	102
Ethanol kosten extract (€/l)	0.34	0.35	0.40	0.58
Prijsopgave fabrikant (€/l)	9	9	9	9
Bewerkingskosten (€/100 kg)	2580	2580	2580	2580
Afvulbaar volume extract (l)	398	339	221	102
Bewerkingskosten extract (€/l)	6.48	7.62	11.70	25.20
Kostprijs afgevuld extract (€/l)	6.82	7.97	12.10	25.78

In Tabel 8 zijn de ethanolkosten per bespuiting (uitgaande van plantmateriaal met 20% droge stof) vanuit verschillende protocollen samengebracht. Bij optimalisatie van het ethanolgebruik nemen de concentraties aan afweerstoffen toe. De dosering in liter per ha kan daarom omlaag in vergelijking met het oorspronkelijke protocol (van Prisna/Phytoconsult en WUR; zie Poot *et al.* 2016). In de laatste regel (dubbel actieve stof) is verondersteld dat de concentratie aan afweerstoffen in het verse plantmateriaal via teeltmaatregelen en veredeling kan worden verdubbeld. In dat geval kan met een gehalveerde dosering (90 l/ha i.p.v. 180 l/ha) worden volstaan. Het overzicht laat zien dat de ethanolkosten per bespuiting kunnen worden gereduceerd van € 160/ha tot € 35/ha. Vergeleken met de praktijk referentie van € 100/bespuiting is dat een bemoedigend resultaat. De uitdaging is om de concentratie aan afweerstoffen in het verse plantmateriaal omhoog te krijgen door veredeling, teeltmaatregelen en selectie van de juiste plantendelen.

Tabel 8

Ethanolkosten per bespuiting

Protocol	Ethanol (l/100 kg)	Ethanol		Variabele kosten (€/l)	Dosering (l/ha)	Var. kosten (€/spuitbeurt)
		% in	% uit			
Prisna/Phytoconsult	500	96%	83%	0.54	300	162
Geoptimaliseerd I	500	67%	58%	0.32	300	95
Geoptimaliseerd II	420	70%	59%	0.32	250	81
Herbamed	286	80%	62%	0.35	180	63
Dubbel actieve stof	286	80%	62%	0.35	90	32
Referentie praktijk						100

In Tabel 9 zijn de extractiekosten per bespuiting (uitgaande van plantmateriaal met 20% droge stof) vanuit verschillende protocollen samengebracht. Bij optimalisatie van het extractieproces nemen de bewerkingskosten af en de concentraties aan afweerstoffen in het extract toe. Door dat laatste kan de dosering in liter per ha omlaag. In de regel 'halve offerteprijs' is verondersteld dat de bewerkingskosten door schaalvergroting kunnen worden gehalveerd. Het overzicht laat zien dat de extractiekosten/bespuiting kunnen worden gereduceerd van € 3.750/ha tot € 337/ha, een decimering. Vergeleken met de huidige € 100/bespuiting blijven de extractiekosten een obstakel voor een succesvolle introductie van sierteeltextracten als gewasbeschermingsmiddel. De vraag is of er goedkopere extractie-/scheidingsmethoden te vinden zijn.

Tabel 9

Extractiekosten per bespuiting.

Protocol	Offerte (€/l tinctuur)	Vertaling (€/100 kg)	Tinctuur (l)	Vaste kosten (€/l)	Dosering (l/ ha)	Vaste kosten (€/spuitbeurt)
Prisna/Phytoconsult	15	5800	464	12.50	300	3750
Geoptimaliseerd I	15	5800	543	10.68	300	3203
Geoptimaliseerd II	15	5800	463	12.52	250	3130
Herbamed	9	2580	329	7.85	180	1412
Dubbel actieve stof	4.5	1230	329	3.74	90	337
Referentie praktijk						100

In Tabel 10 zijn de benodigde arealen voor de productie van afweerstoffen samengebracht. Deze zijn berekend voor het meest gunstige scenario (dubbel actieve stof). Cruciaal zijn de hoeveelheden vers materiaal die worden verwacht. Gewassen die veel plantmateriaal met lage drogestof gehaltes produceren, zijn in het voordeel. De afweerstoffen zijn dan gemakkelijker te winnen en er zijn kleinere productiearealen voor nodig.

Tabel 10

Benodigde arealen.

Vers materiaal benodigd voor extract toepassing in 1 ha siergewas				
Kengetal	B017	B001	B014	B005
Aantal bespuitingen	3	3	3	3
Benodigd per spuitbeurt (l/ha)	90	90	90	90
Benodigd per seizoen (l/ha)	270	270	270	270
Benodigd vers materiaal (kg/ha)	69	82	135	373
Prognose vers materiaal (kg/ha)	50000	1000	10000	330
Benodigd gewasareaal (ha)	0.001	0.08	0.013	1.13

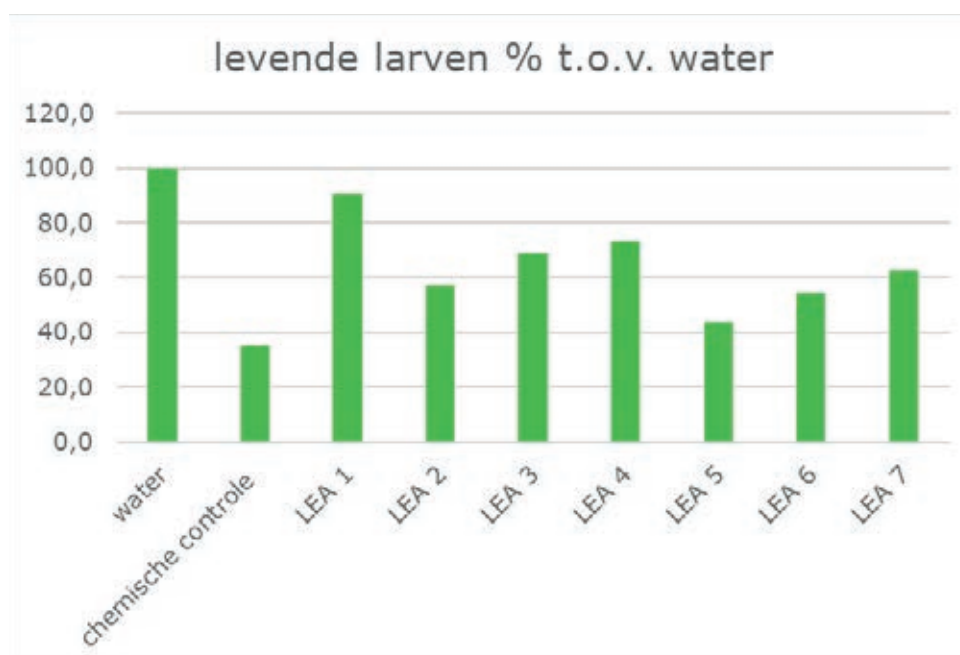
De eindconclusie van deze economische studie is dat het protocol zoals dat voor het onderzoek is gebruikt om extracten te maken, teveel kost voor opschaling naar de praktijk. Het meest kansrijk lijken gewassen met grote volumes restmateriaal en lage percentages drogestof.

Zie voor het volledige verslag van de economische studie (Buurma, 2018).

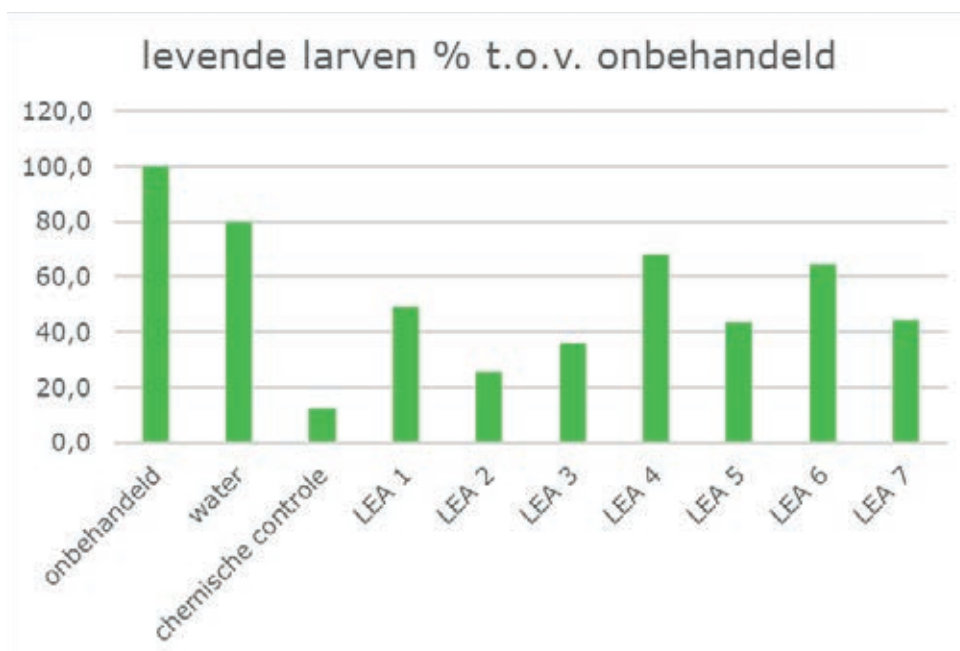
3.9 Beïnvloeden inhoudsstoffen

3.9.1 Resultaten van extracten van verschillende rassen op bestrijding trips

De zeven rassen van gewas B017 zijn in twee spuitproeven vergeleken met verschillende controles: onbehandeld (alleen de 2^e proef), water en een chemische referentie (Spruzit). Van zowel de bloemen als het blad, de stengels en de knollen zijn aparte extracten gemaakt. Conform het eerdere onderzoek zoals gerapporteerd door Poot *et al.* (2016), bleek het extract van blad ('LEA') de beste bestrijding van trips op te leveren. Voor de overzichtelijkheid worden daarom alleen de resultaten van deze extracten getoond, zie Figuur 21 en Figuur 22. De resultaten met de extracten van de andere plantorganen lieten dezelfde patronen zien, alleen bij lagere effectiviteit (hogere % levende larven).



Figuur 21 Effect van bespuiting met extracten van bladeren van verschillende rassen op het aantal levende tripslarven, ten opzichte van water (1e proef).



Figuur 22 Effect van bespuiting met extracten van bladeren van verschillende rassen op het aantal levende tripslarven, ten opzichte van onbehandeld (2^e proef).

De dataset was niet geschikt om statistisch significante verschillen aan te tonen (geen herhalingen). In beide gevallen was de chemische controle het meest effectief, hoewel geen volledige doding van de larven werd bereikt. Tussen de verschillende rassen werden verschillen gevonden, maar de patronen verschilden enigszins tussen de beide proeven. Er is voor dit materiaal geen metaboliet analyse gedaan. Er kunnen dus ook geen relaties gelegd worden met inhoudsstoffen en de gehalten ervan, die voor de bestrijding van trips verantwoordelijk kunnen zijn.

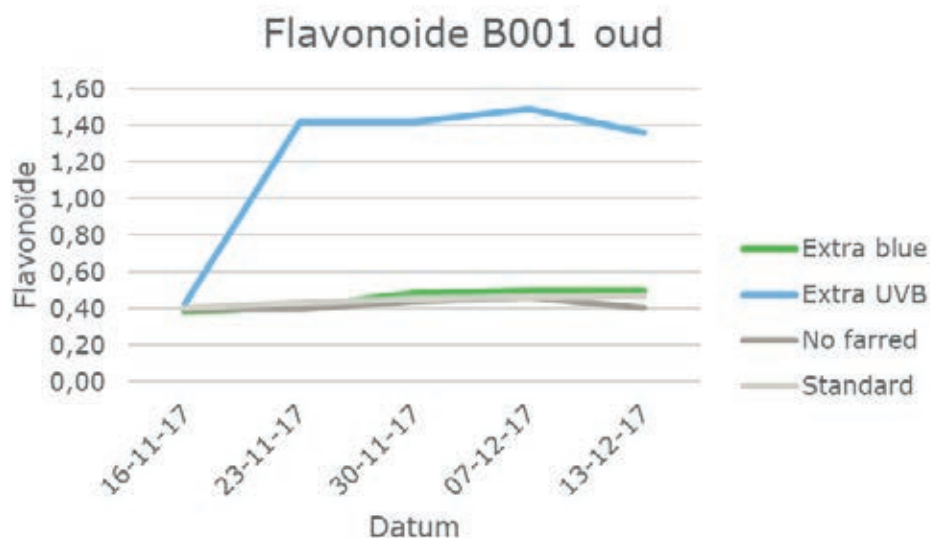
Hoewel er geen harde uitspraken gedaan kunnen worden, lijkt het er op dat via de genetica (veredeling) potentieel effectiever werkende extracten gemaakt kunnen worden. Dit ligt in lijn met de onderzoeksresultaten van (K. A. Leiss, Maltese, Choi, Verpoorte, & Klinkhamer, 2009) en (K. Leiss, 2021). In deze studies werden respectievelijk verschillen gevonden in gehalten van chlorogenic acid in verschillende chrysantenrassen, en verschillen in gerberine gehalten tussen verschillende gerbera gewassen, die verantwoordelijk bleken te zijn voor de bestrijding van respectievelijk trips en meeldauw. Grote verschillen in inhoudsstoffen betrokken bij trips resistentie zijn ook gevonden tussen verschillende rassen van Gladiolus (Wahyuni, Choi, Leiss, & Klinkhamer, 2021), tomaat (Mirnezhad *et al.* 2010) en wortels (K. A. Leiss, Cristofori, van Steenis, Verpoorte, & Klinkhamer, 2013). Genetische variatie in planteninhoudsstoffen met antibacteriële, antischimmel en/of anti-insecten werkingen (met name secundaire metabolieten, ook wel genoemd 'specialised metabolites') is overigens een algemeen verschijnsel binnen het plantenrijk, inclusief voedings- en siergewassen, en vormt de grondslag voor veredeling op resistenties tegen ziektes en plagen (e.g. (Sogbohossou, Achigan-Dako, Mumm, Vos, & Schranz, 2020), (Vosman *et al.* 2019), (Maharajaya *et al.* 2019)).

3.9.2 Resultaten van verschillende lichtspectra

Het lichtspectrum zonder verrood had significant invloed op de lengtegroei van de plant. Opvallend genoeg werden de B001 planten het langste onder deze behandeling, terwijl de B006 het kortste bleef. De drie andere lichtkleur combinaties lieten ten opzichte van elkaar geen significante verschillen zien. De B001 zonder verrood had ook de meeste bladeren geproduceerd, onder UVB de minste.

Voor zowel de B001 planten als de B006 planten is gebleken dat het hoogste versgewicht behaald werd onder de behandeling zonder verrood. Bij beide planten werd het laagste versgewicht behaald bij de behandeling met extra UVB, en was het vers gewicht van de standaard en extra blauw behandeling zo goed als gelijk. B001 onder extra UVB scoorde een significant lager drooggewicht dan bij de andere behandelingen. De andere behandelingen leverden vergelijkbare drooggewichten op.

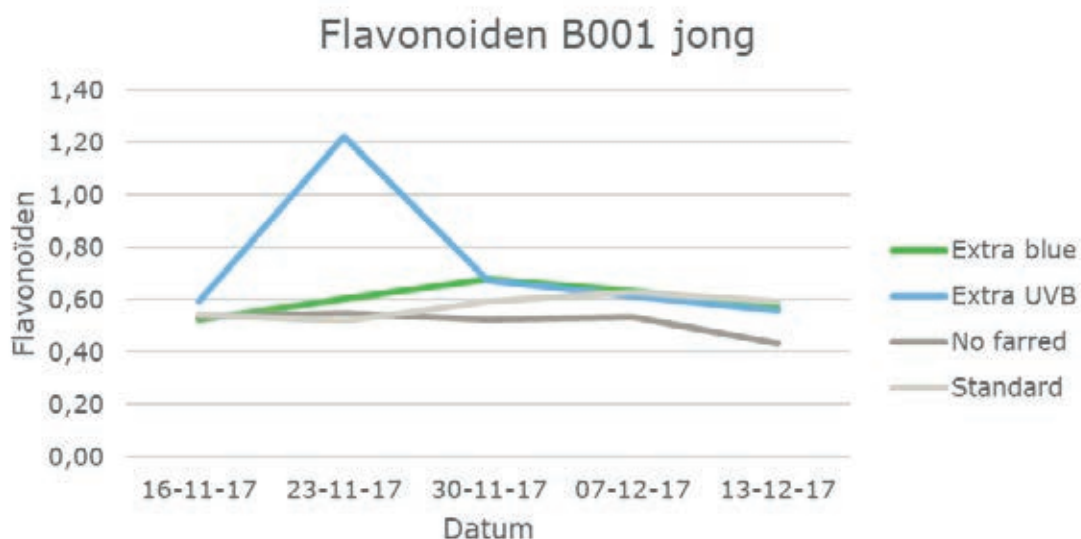
Uit de Dualex metingen is gebleken dat het hoogste gehalte (zichtbare) flavonoïden gevonden werd in bladeren die onder een spectrum met UVB hadden gestaan. Bij oude B001 bladeren was na een week het gehalte al ruim drie keer zo hoog dan bij de andere behandelingen. Bij de overige behandelingen zijn er geen verschillen gevonden in flavonoïde gehalte bij oude B001 bladeren.



Figuur 23 Flavonoïd gehalte in oud B001 blad in de loop van de teelt.

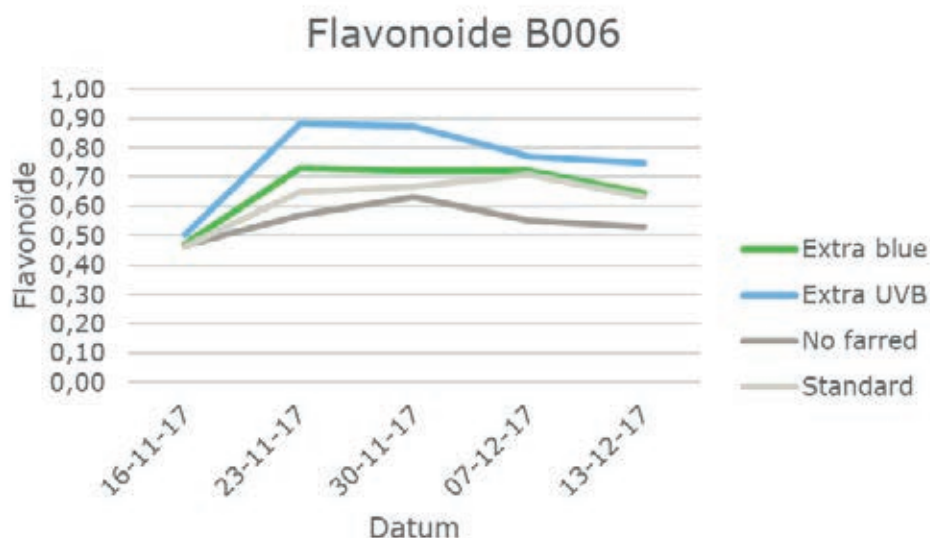
De sterke stijging in de 1^e week was onder omstandigheden waarin de hoeveelheid UVB te hoog leek (er trad gewasschade op). Na een week is de hoeveelheid UVB sterk verminderd. Dit lijkt gepaard te gaan met een afvlakking van het flavonoïden gehalte.

Bij jonge B001 bladeren was er in de 1^e week ook een sterke stijging van het flavonoïd gehalte. Dit gehalte zakte echter na verlaging van de intensiteit terug naar het niveau dat ook bij de andere behandelingen werd gevonden.



Figuur 24 Flavonoïd gehalte in jong B001 blad in de loop van de teelt.

Bij de B006 lagen de flavonoïd gehalten wat verder uit elkaar. Ook hierbij scoort de extra UVB behandeling het hoogst. Daarna volgen extra blauw en de standaard behandeling, en als laatste de behandeling zonder verrood.

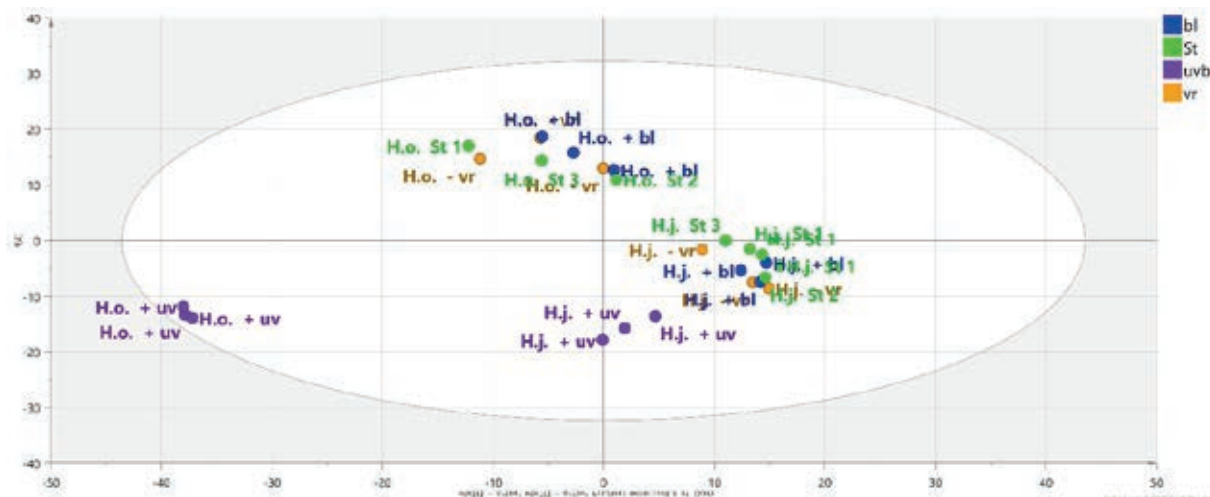


Figuur 25 Flavonoïden gehalte in B006 in de loop van de teelt.

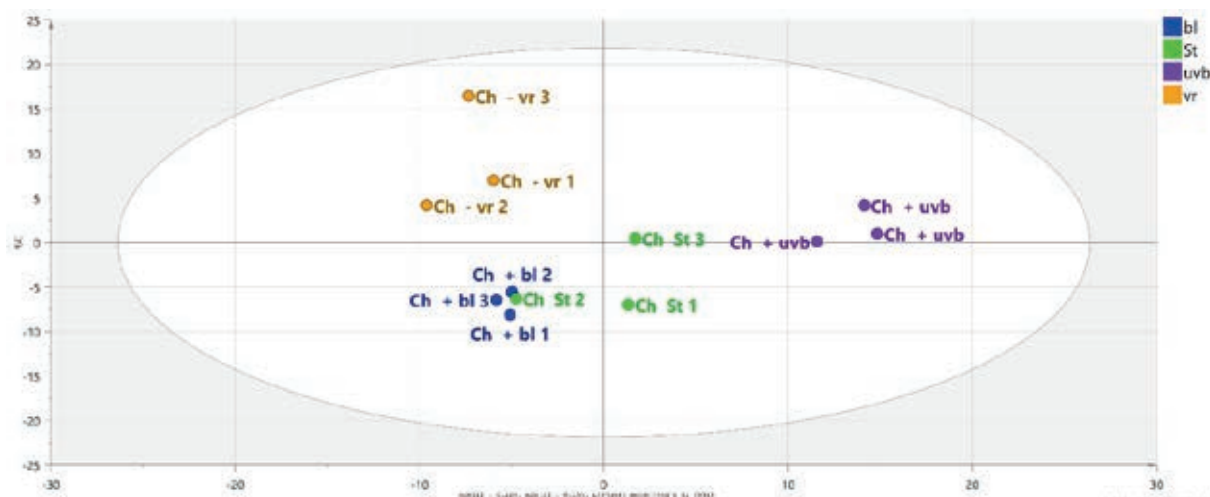
In alle gevallen is het gehalte flavonoïde bij de behandeling zonder verrood het laagst, lager dan de standaard behandeling. Bij B006 is dat het beste zichtbaar, maar ook bij B001 bleek dit het geval.

WPR-Bioscience heeft de verschillende monsters met de LCMS geanalyseerd voor een veel meer gedetailleerd overzicht van verschillen in inhoudsstoffen dan alleen de zichtbare flavonoïden die met de Dualex meter van WPR- Glastuinbouw konden worden gemeten.

Bij B001 is alleen bij extra UVB een duidelijk effect gemeten op het profiel van inhoudsstoffen (Figuur 26), waarbij de oude bladeren sterker reageerden dan de jonge bladeren (grotere afstand tussen UVB en andere behandelingen). De overige monsters zijn wel gescheiden op leeftijd van blad (oud versus jong), maar niet op behandeling. Bij B006 lijken zowel de UVB als de "geen verrood" behandelingen te leiden tot effecten op metabolietensamenstelling, maar elk op een andere manier: UVB in de 1^e dimensie (1^e principale component) en "geen verrood" in de orthogonale 2^e dimensie (2^e principale component) ten opzichte van de standaard lichtbehandeling (Figuur 27).



Figuur 26 Resultaat van een Principale Component Analyse (PCA), op basis van verschillen in LCMS profielen, van monsters van oud (o) en jong (j) blad van B001 (H) planten blootgesteld aan 4 verschillende lichtcondities. Kleurcodes van lichtcondities staan rechtsboven aangegeven: groen (St) = standaard conditie; blauw (bl) = extra blauw; paars (uvb) = extra UV-B; oranje (vr) = geen verrood.



Figuur 27 Resultaat van een Principale Component Analyse (PCA), op basis van verschillen in LCMS profielen, van bladmonsters van B006 (Ch) planten blootgesteld aan 4 verschillende lichtcondities. Kleurcodes van lichtcondities staan rechtsboven aangegeven: groen (St) = standaard conditie; blauw (bl) = extra blauw; paars (uvb) = extra UV-B; oranje (vr) = geen verrood.

Het bioassay van Biointeracties leverde helaas geen extracten met een duidelijke remming van de groei van fusarium op. We moeten daarom concluderen dat de lichtbehandelingen weliswaar hebben geleid tot een verandering in de samenstelling van inhoudsstoffen, die de plant waarschijnlijk beschermen tegen de invloed van UV licht, maar dat deze veranderingen geen significant effect hebben op de groei van fusarium.

4 Conclusies en aanbevelingen

Uit deze studie kunnen de volgende conclusies getrokken worden:

- In herhaaldelijk uitgevoerde proeven is aangetoond dat het extract gemaakt uit de groene delen van de B011 plant, trips effectief lijkt te bestrijden. Dit bleek in vrijwel alle proeven van vergelijkbaar niveau en soms zelfs beter dan de praktijk referentie. Hoewel ook extracten van diverse andere gewassen getoetst zijn tegen trips, bleek Extract B011 het meest effectief.
- De stoffen FI-L en FI-A uit het Extract B011 lijken (mede) verantwoordelijk te zijn voor de werking tegen trips. Het gehele extract werkte echter beter dan deze stoffen als 'single molecule' of in combinatie met elkaar. Het toevoegen van koolzaadolie verbetert de werking van deze moleculen, maar dit geldt ook voor het gehele extract.
- B011 is in de EFSA database opgenomen vanwege de stof colchicine. Hierdoor zal het zeer waarschijnlijk niet mogelijk zijn om een korter (en goedkoper) registratietraject als 'laag risico middel' te doorlopen. In de Pesticiden database zijn noch B011, noch de stoffen FI-A en FI-L geregistreerd. Dit lijkt dus geen blokkade voor registratie te zijn.
- Uit de economische verkenning naar de kostprijs is gebleken dat de extractiemethode zoals die voor deze studie is gebruikt, tot behoorlijk duurdere middelen leidt dan de praktijk referentie. Zelfs na optimalisatie en schaalvoordelen lijkt de prijs ruim drie keer hoger uit te komen. Dit komt vooral door hogere kosten voor arbeid en apparatuur, en in mindere mate door de ethanol.
- Door middel van veredeling lijkt het mogelijk om rassen te ontwikkelen met een hogere effectiviteit van gewasbescherming. De insecten-videotracking bioassays ontwikkeld bij WPR Bioscience zouden dan kunnen worden toegepast om de nakomelingen van kruisingspopulaties op een high-throughput manier te screenen.
- Hoewel in meerdere studies is aangetoond dat de weerbaarheid van planten tegen ziekten en plagen te verhogen is door het toepassen van bepaalde lichtspectra in de kas, konden we in deze studie op deze wijze geen extracten maken met een effectievere bestrijding van fusarium.

Op basis van de resultaten en conclusies komen we tot de volgende aanbevelingen:

- De resultaten van de trips proeven met het Extract B011 zien er qua effectiviteit interessant genoeg uit, om het gesprek aan te gaan met een gewasbeschermingsmiddelen fabrikant.
- De relatief hoge kostprijs zou verlaagd kunnen worden door andere extractiemethoden te onderzoeken, de formulering van het middel te verbeteren zodat er minder extract nodig is, en dosis-respons studies uit te voeren ten behoeve van kosten effectievere toepassing.
- Naast een analyse puur op basis van kostprijs, zou een evaluatie op basis van duurzaamheid aan te bevelen zijn. Door puur naar de economische kostprijs te kijken, komen de meeste groene middelen er slecht uit. Hun voordeel moet liggen in duurzaamheid en bijvoorbeeld circulariteit.
- Het beschikbare assortiment van B011 rassen, genotypen en aanverwante soorten zou gescreend kunnen worden op verschillen in effectiviteit; dit kan handvatten bieden voor veredeling gericht op nieuwe rassen als uitgangspunt voor extracten met een effectievere bestrijding.
- Er zou lichtonderzoek bij B011 uitgevoerd kunnen worden, specifiek gericht op tripsbestrijding. Ook andere teeltmaatregelen zouden onderzocht kunnen worden, bijvoorbeeld de toepassing van elicitors die de weerbaarheid tegen trips verhogen. Bij gewassen die na de laatste oogst geruimd worden, zou dit eventueel in de fase na de oogst kunnen worden gedaan. Het verdient aanbeveling om naast de effectiviteit van de extracten, ook de weerbaarheid van de planten zelf te onderzoeken. Dit om te verifiëren of een weerbaardere plant ook een effectiever extract oplevert.

Dankwoord

Dit onderzoek is het resultaat van een publiek-private samenwerking in het kader van de Topsector Tuinbouw & Uitgangsmaterialen. Naast de bijdrage van de Topsector kon het onderzoek worden uitgevoerd dankzij in-cash en/of en in-kind bijdragen van de private partners in het project, te weten Royal FloraHolland, zes bij Royal FloraHolland aangesloten sierteeltbedrijven, Kenniscentrum Plantenstoffen, Vereniging Artemis en Rabobank Westland.

Wij willen de vertegenwoordigers van deze partijen in het projectconsortium hartelijk danken voor hun constructieve bijdrage in de begeleiding van het project: Wim Brouwer, Charl Goossens, Gerben Ravensbergen, Martin Hoogenboom, Theo Akerboom, Ruud Nederpel, Jan Smits en Piet Boonekamp.

Het project is door onderzoekers van verschillende instituten van Wageningen University & Research uitgevoerd, te weten Marieke van der Staaij, Ada Leman, Anneke Kreuger en Kirsten Leiss (Wageningen Plant Research - Glastuinbouw & Bloembollen), Ric de Vos en Bert Schipper (Wageningen Plant Research - Bioscience), Ben van den Broek, Jan Stoutjesdijk en Marinella van Leeuwen (Wageningen Food & Biobased Research) en Jan Buurma (Wageningen Economic Research).

Albert Haasnoot (penvoerder) – Royal FloraHolland

Eric Poot (projectleider) - Wageningen Plant Research – Glastuinbouw & Bloembollen

Literatuur

Ballaré, C. L. (2009).

Illuminated behaviour: phytochrome as a key regulator of light foraging and plant anti-herbivore defence. *Plant, Cell & Environment*, 32(6), 713-725. doi:10.1111/j.1365-3040.2009.01958.x

Buurma, J. S. (2013).

Glastuinbouw als producent van groene gewasbeschermingsmiddelen. Economische sigarendoos-berekeningen. In (pp. <https://edepot.wur.nl/432086>). De Westlandse Druif, Monster: LEI Wageningen UR.

Buurma, J. S. (2018).

Productiekosten sierteeltextracten: Berekeningen bij Rapport GTB-1387. In: Wageningen Economic Research.

ec.europa.eu/food/plants/pesticides. (2019).

Retrieved from https://ec.europa.eu/food/plants/pesticides/eu-pesticides-database_en. https://ec.europa.eu/food/plants/pesticides/eu-pesticides-database_en

Escobar-Bravo, R. o., Nederpel, C., Naranjo, S. a., Kim, H. K., Rodríguez-López, M. a. J., Chen, G.,

Klinkhamer, P. G. L. (2019).

Ultraviolet radiation modulates both constitutive and inducible plant defenses against thrips but is dose and plant genotype dependent. *Journal of Pest Science*, 94(1), 69-81. doi:10.1007/s10340-019-01166-w

EuropeanFoodSafetyAuthority. (2012).

Compendium of botanicals reported to contain naturally occurring substances of possible concern for human health when used in food and food supplements. *EFSA Journal*, 10(5), 2663. doi:<https://doi.org/10.2903/j.efsa.2012.2663>

Hideg, E., Jansen, M. A., & Strid, A. (2013).

UV-B exposure, ROS, and stress: inseparable companions or loosely linked associates? *Trends in plant science*, 18(2), 107-115. doi:10.1016/j.tplants.2012.09.003

Kopsell, D. A., Sams, C. E., & Morrow, R. C. (2015).

Blue wavelengths from led lighting increase nutritionally important metabolites in specialty crops. *HortScience*, 50(9), 1285-1288.

Leiss, K. (2021).

Vondst gerberine doorbraak in meeldauwbestrijding gerbera. Zoektocht naar plantweerbaarheidsstoffen werpt vruchten af. Retrieved from <https://edepot.wur.nl/550781>

Leiss, K. A., Cristofori, G., van Steenis, R., Verpoorte, R., & Klinkhamer, P. G. L. (2013).

An eco-metabolomic study of host plant resistance to Western flower thrips in cultivated, biofortified and wild carrots. *Phytochemistry*, 93, 63-70. doi:10.1016/j.phytochem.2013.03.011

Leiss, K. A., Maltese, F., Choi, Y. H., Verpoorte, R., & Klinkhamer, P. G. L. (2009).

Identification of Chlorogenic Acid as a Resistance Factor for Thrips in Extract B006hemum. *Plant Physiology*, 150(3), 1567-1575.

Maharijaya, A., Vosman, B., Pelgrom, K., Wahyuni, Y., de Vos, R. C. H., & Voorrips, R. E. (2019).

Genetic variation in phytochemicals in leaves of pepper (<i>Capsicum</i>) in relation to thrips resistance. *Arthropod-Plant Interactions : An international journal devoted to studies on interactions of insects, mites, and other arthropods with plants*, 13(1), 1-9. doi:10.1007/s11829-018-9628-7

Mazza, C. A., Giménez, P. I., Kantolic, A. G., & Ballaré, C. L. (2013).

Beneficial effects of solar UV-B radiation on soybean yield mediated by reduced insect herbivory under field conditions. *Physiologia plantarum*, 147(3), 307-315. doi:10.1111/j.1399-3054.2012.01661.x

Mirnezhad, M., Romero-González, R. R., Leiss, K. A., Choi, Y. H., Verpoorte, R., & Klinkhamer, P. G. (2010).

Metabolomic analysis of host plant resistance to thrips in wild and cultivated tomatoes. *Phytochemical analysis : PCA*, 21(1), 110-117. doi:10.1002/pca.1182

Ouzounis, T., Razi Parjikolaei, B., Fretté, X., Rosenqvist, E., & Ottosen, C. O. (2015).

Predawn and high intensity application of supplemental blue light decreases the quantum yield of PSII and enhances the amount of phenolic acids, flavonoids, and pigments in *Lactuca sativa*. *Frontiers in plant science*, 6, 19. doi:10.3389/fpls.2015.00019

Poot, E., Staaij, M. v. d., Hofland, J., Vos, R. d., Korthout, H., & Schulte, A. (2016).

Sierteelt in de Biobased Economy : screening van siergewasextracten op werking voor de plantgezondheid en de farmacie [1 online resource (PDF, 50 pages) : illustrations.]. Retrieved from <http://edepot.wur.nl/370955>

- Schreiner, M., Krumbein, A., Mewis, I., Ulrichs, C., & Huyskens-Keil, S. (2009). Short-term and moderate UV-B radiation effects on secondary plant metabolism in different organs of nasturtium (*Tropaeolum majus* L.). *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 10(1), 93-96. doi:10.1016/j.ifset.2008.10.001
- Schreiner, M., Mewis, I., Zrenner, R., Krumbein, A., Huyskens-Keil, S., Jansen, M. A. K., O'Brien, N. (2012). UV-B-Induced Secondary Plant Metabolites - Potential Benefits for Plant and Human Health. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 31(3), 229-240. doi:10.1080/07352689.2012.664979
- Sogbohossou, E. O. D., Achigan-Dako, E. G., Mumm, R., Vos, d. C. H., & Schranz, M. E. (2020). Natural variation in specialised metabolites production in the leafy vegetable spider plant (*Gynandropsis gynandra* L. (Briq.)) in Africa and Asia. *Phytochemistry*, 178.
- Vissers, M. (2014). Hoe werken de actuele chemische tripsmiddelen? *Sierteelt&groenvoorziening* 58 (19): 21 - 24. Retrieved from <https://edepot.wur.nl/331060>
- Vosman, B., Kashaninia, A., van't Westende, W., Meijer-Dekens, F., van Eekelen, H. t., Visser, R. G. F., Voorrips, R. E. (2019). QTL mapping of insect resistance components of *Solanum galapagense*. *Theoretical and Applied Genetics : International Journal of Plant Breeding Research*, 132(2), 531-541. doi:10.1007/s00122-018-3239-7
- Wahyuni, D. S. C., Choi, Y. H., Leiss, K. A., & Klinkhamer, P. G. L. (2021). Morphological and chemical factors related to western flower thrips resistance in the ornamental gladiolus. *Plants*, 10(7).
- Wang, H., Jiang, Y. P., Yu, H. J., Xia, X. J., Shi, K., Zhou, Y. H., & Yu, J. Q. (2010). Light quality affects incidence of powdery mildew, expression of defence-related genes and associated metabolism in cucumber plants. *EUROPEAN JOURNAL OF PLANT PATHOLOGY*, 127(1), 125-135.

Bestrijding van trips in chrysant

Proefnummer: 201122

Ing. C. Oostingh

Proeftuin Zwaagdijk

Tolweg 13

NL-1681 ND Zwaagdijk-Oost

Telephone +31(0)228 - 56 31 64

E-mail: proeftuin@proeftuinzwaagdijk.nl

Samenvatting

In 2019 heeft Proeftuin Zwaagdijk een proef uitgevoerd om de effectiviteit en selectiviteit van verschillende extracten te testen voor de bestrijding van trips in sierteeltgewassen.

De extracten zijn vergeleken met de referentie Raptol (pyrethrinen+koolzaadolie; 4,59+825,3 g/L; EC). De proef is uitgevoerd op chrysant met als doelorganisme *Frankliniella occidentalis*.

Na planten zijn chrysanten geïnfecteerd met Californische trips (*Frankliniella occidentalis*). Enkele dagen na infecteren is een eerste toepassing gedaan. Herhaalde toepassingen zijn uitgevoerd met een interval van 3-4 dagen. De toepassingen zijn uitgevoerd als gewasbespuiting over het gewas. Het spuitvolume was 1000 L/ha. De objecten zijn samengevat in onderstaande tabel.

Aan het einde van de proef zijn de planten opnieuw behandeld met hetzelfde schema. Het spuitinterval was toen 1 week.

Object	Dosering
Onbehandeld	-
Extract B011	200 ml/l
B005 etherische olie + uitvloeier G	2% + 0,1%
B005 etherische olie + uitvloeier M	0,03% + 0,1%
Raptol	1%

De spuitoplossingen zijn aangemaakt met kraanwater. Bij het maken van de oplossingen zijn geen onregelmatigheden waargenomen.

Waarnemingen zijn uitgevoerd door het aantal larven en adulten op een monster van 10 scheuten per veldje. De scheuten zijn uit het gewas gehaald en gespoeld in alcohol. Na filteren zijn de aantallen larven en adulten apart geteld.

Daarnaast zijn waarnemingen gedaan op gewasveiligheid.

Bij de start van het onderzoek is een lage infectiedruk gemeten. Gedurende het onderzoek nam de populatie met trips in de onbehandelde velden toe tot een matige aantasting.

Op het moment dat de druk toe nam, in de tweede fase van het onderzoek effectiviteit gemeten met Extract B011. Hoewel verschillen niet statistisch betrouwbaar waren, scoorde B011 beter dan de referentie Raptol. Met geen van de andere objecten is effectiviteit gemeten.

Ook het referentieproduct Raptol was niet beter dan de onbehandelde veldjes. Ondanks dat de proef in een heel warme periode is uitgevoerd, kan geen verband worden gevonden tussen spuitomstandigheden en effectiviteit.

Met geen van de middelen is na de bespuitingen gewasschade gezien.

Met Raptol is behoorlijk veel spuitresidu gevonden. Met B005 etherische olie + uitvloeier M is een kleine hoeveelheid spuitresidu gevonden

1. Introductie

In 2019 heeft Proeftuin Zwaagdijk een proef uitgevoerd om de effectiviteit en selectiviteit van verschillende extracten te testen voor de bestrijding van trips in sierteeltgewassen. De extracten zijn vergeleken met de referentie Raptol (pyrethrinen+koolzaadolie; 4,59+825,3 g/L; EC). De proef is uitgevoerd op chrysant met als doelorganisme *Frankliniella occidentalis*.

2. Methode

Chrysanten zijn in bakken geplant. Elk veldje bestond uit 4 bakken met elk 15 planten (60 planten per veldje). Nadat de planten voldoende hadden geworteld, zijn ze geïnfecteerd met Californische trips (*Frankliniella occidentalis*). Enkele dagen na infecteren is een eerste toepassing gedaan. Herhaalde toepassingen zijn uitgevoerd met een interval van 3-4 dagen. De toepassingen zijn uitgevoerd als gewasbespuiting over het gewas. Het spuitvolume was 1000 L/ha. De objecten zijn samengevat in onderstaande tabel. De proef is uitgevoerd in 4 herhalingen. Aan het einde van de proef zijn de planten opnieuw behandeld met hetzelfde schema. Het spuitinterval was toen 1 week.

Tabel 1
Objecten.

	Object	Dosering
1	Onbehandeld	-
2	Extract B011	200 ml/Liter
3	B005 etherische olie + uitvloeier G	2% + 0,1%
4	B005 etherische olie + uitvloeier M	0,03% + 0,1%
5	Raptol	1%

De spuitoplossingen zijn aangemaakt met kraanwater. Bij het maken van de oplossingen zijn geen onregelmatigheden waargenomen. Gegevens van beide delen van de proef, behandelingen en waarnemingen zijn in onderstaande tabel samengevat. Details rond de bespuitingen zijn in bijlage 1 opgenomen.

Tabel 2
Proefveld details

Trial locatie :	Proeftuin Zwaagdijk Tolweg 13 1681 ND Zwaagdijk	
Gewas :	Chrysant	
Ras:	Chic	
Plantdatum:	12-06-2020	
Infectiedatum:	17-06-2020	
Spuitdatums:	23-06-2020 (A)	24-07-2020 (A)
	26-06-2020 (B)	31-07-2020 (B)
	30-06-2020 (C)	07-08-2020 (C)
	03-07-2020 (D)	
Waarneming datums :	23-06-2020 (0 DA-A)	24-07-2020 (0 DA-A)
	26-06-2020 (0 DA-B)	27-07-2020 (3 DA-A)
	30-06-2020 (0 DA-C)	31-07-2020 (0 DA-B)
	03-07-2020 (0 DA-D)	03-08-2020 (3 DA-B)
	06-07-2020 (3 DA-D)	07-08-2020 (0 DA-C)
	09-07-2020 (6 DA-D)	10-08-2020 (3 DA-C)
	16-07-2020 (13 DA-D)	

Bij elke waarneming zijn het aantal larven en adulten geteld op een monster van 10 scheuten per veldje. De scheuten zijn uit het gewas gehaald en gespoeld in alcohol. Na filteren zijn de aantallen larven en adulten apart geteld. Daarnaast zijn waarnemingen gedaan op gewasveiligheid. Temperatuur en RV gedurende het onderzoek is gemeten door middel van een klimaatcomputer.

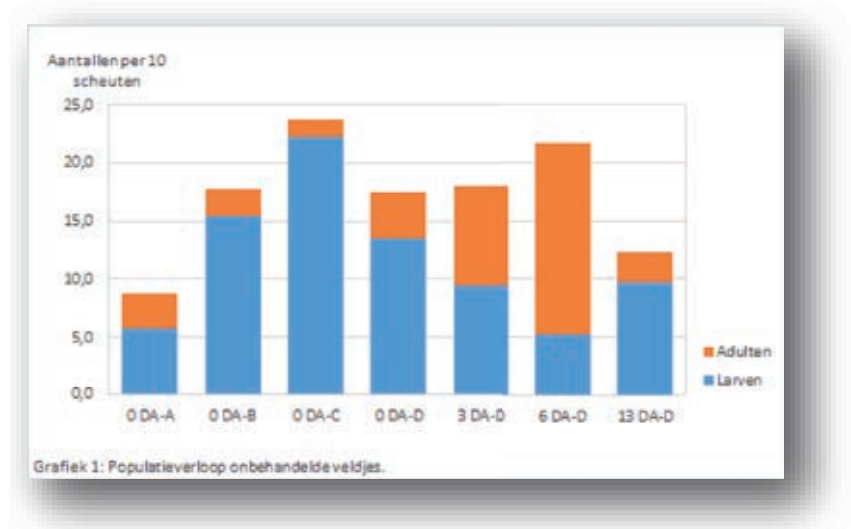
3. Resultaten

De resultaten van de waarnemingen zijn statistisch getoetst (LSD test; 95%). In de tabellen is met de P waarde aangegeven of er statistisch betrouwbare verschillen tussen behandelingen aanwezig zijn ($P < 0,05$). Met de LSD wordt het minimale verschil tussen behandelingen aangegeven waarmee ze statistisch betrouwbaar verschillend van elkaar zijn.

3.1. Effectiviteit

3.1.1 Eerste fase

In grafiek 1 is het verloop van de populatie in de onbehandelde veldjes weergegeven.



Op het moment van de eerste bespuiting was de aantasting laag. Gedurende het verloop van de proef nam de aantasting langzaam toe. De algehele infectiedruk was matig.

De waarnemingen van alle objecten zijn statistisch getoetst met een LSD test. De resultaten van de totale aantallen larven en adulten zijn in tabel 3 samengevat.

Tabel 3

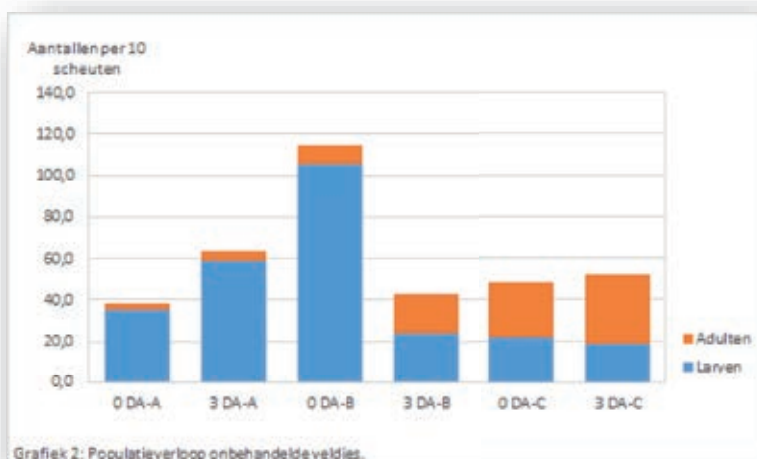
Effectiviteit (eerste fase).

Object	Doserings	Timing	Aantallen per 10 scheuten					
			0 DA-B	0 DA-C	0 DA-D	3 DA-D	6 DA-D	13 DA-D
1 Onbehandeld	-	-	17,8 a	23,8 a	17,5 a	18,0 a	21,8 a	12,3 a
2 Extract B011	200 ml/Liter	ABCD	18,3 a	18,0 a	24,3 a	20,5 a	25,0 a	9,8 a
3 B005 etherische olie + uitvloeier G	2% + 0,1%	ABCD	19,0 a	12,5 a	11,5 a	15,0 a	23,8 a	13,5 a
4 B005 etherische olie + uitvloeier M	0,03% + 0,1%	ABCD	17,0 a	25,0 a	12,8 a	18,8 a	30,5 a	10,5 a
5 Raptol	1%	AC	17,5 a	19,3 a	14,0 a	19,3 a	20,8 a	16,3 a
		P	0,998	0,547	0,141	0,519	0,575	0,321
		LSD	14,5	17,2	10,8	6,9	13,6	7,0

Bij geen van de waarnemingen zijn statistisch betrouwbare verschillen tussen de middelen gevonden. Ondanks de matige infectiedruk is met geen van de middelen een betrouwbare werking tegen trips gemeten.

3.1.2 Tweede fase

In grafiek 2 is het verloop van de populatie in de onbehandelde veldjes weergegeven.



In de tweede fase van de proef was de aantasting hoger dan in de eerste fase. In de eerste week (tot 0 DA-B) nam de populatie heel sterk toe.

De resultaten van de totale aantallen larven en adulten zijn in tabel 4 samengevat.

Tabel 4

Effectiviteit (tweede fase).

				Aantallen per 10 scheuten									
Object		Dosering	Timing	3 DA-A		0 DA-B		3 DA-B		0 DA-C		3 DA-C	
1	Onbehandeld	-	-	63,8	a	114,8	b	43,3	a	48,8	a	52,0	a
2	Extract B011	200 ml/Liter	ABCD	52,0	a	69,8	a	44,5	a	49,5	a	42,5	a
3	B005 eth olie + uitvloeier G	2% + 0,1%	ABCD	82,3	a	99,5	b	47,3	a	40,5	a	50,3	a
4	B005 eth olie + uitvloeier M	0,03% + 0,1%	ABCD	64,8	a	112,0	b	63,8	ab	60,8	a	63,0	a
5	Raptol	1%	AC	67,0	a	118,0	b	78,8	b	70,0	a	54,5	a
			P	0,322		0,009		0,049		0,149		0,770	
			LSD	29,2		25,7		26,2		24,7		34,0	

Alleen op 0 DA-B is een statistisch betrouwbare werking gevonden met Extract B011. Met geen van de overige middelen is een betrouwbare effectiviteit gemeten. Ook met de referentie Raptol is geen betrouwbare effectiviteit gemeten.

3.2. Selectiviteit

Met geen van de middelen is na de bespuitingen gewasschade gezien. Alleen met Raptol is behoorlijk veel spuitresidu gevonden. Ook met B005 etherische olie + uitvloeier M is een kleine hoeveelheid spuitresidu gevonden. De resultaten zijn in tabel 5 samengevat. In de tweede fase is spuitresidu niet meer beoordeeld.

Tabel 5

Sputresidu (eerste fase).

Object	Dosering	Timing	% zichtbaar spuitresidu											
			0 DA-B		0 DA-C		0 DA-D		3 DA-D		6 DA-D		13 DA-D	
1 Onbehandeld	-	-	0,0	a	0,0	a	0,0	a	0,0	a	0,0	a	0,0	a
2 Extract B011	200 ml/Liter	ABCD	0,0	a	0,0	a	0,0	a	0,0	a	0,0	a	0,0	a
3 B005 eth olie + uitvloeier G	2% + 0,1%	ABCD	0,0	a	0,0	a	0,0	a	0,0	a	0,0	a	0,0	a
4 B005 eth olie + uitvloeier M	0,03% + 0,1%	ABCD	5,3	a	0,0	a	0,0	a	0,0	a	2,5	a	2,5	a
5 Raptol	1%	AC	37,5	b	22,5	b	50,0	b	37,5	b	45,0	b	45,0	b
		P	<0,001		<0,001		<0,001		0,001		<0,001		<0,001	
		LSD	5,8		2,0		0,0		17,2		5,6		5,6	

4. Conclusies

Bij de start van het onderzoek is een lage infectiedruk gemeten. Gedurende het onderzoek nam de populatie met trips in de onbehandelde velden toe tot een matige aantasting.

Op het moment dat de druk toe nam, in de tweede fase van het onderzoek effectiviteit gemeten met Extract B011. Hoewel verschillen niet statistisch betrouwbaar waren, scoorde B011 beter dan de referentie Raptol. Met geen van de andere objecten is effectiviteit gemeten. Ook het referentieproduct Raptol was niet beter dan de onbehandelde veldjes. Ondanks dat de proef in een heel warme periode is uitgevoerd, kan geen verband worden gevonden tussen spuitomstandigheden en effectiviteit.

Met geen van de middelen is na de bespuitingen gewasschade gezien. Met Raptol is behoorlijk veel spuitresidu gevonden. Met B005 etherische olie + uitvloeier M is een kleine hoeveelheid spuitresidu gevonden.

Bijlage 1.1 Proefveld details

Bespuitingen:

Fase 1

Toepassing:	A	B	C	D
Datum:	23-06-2020	26-06-2020	30-06-2020	03-07-2020
Tijd:	12:00	9:45	14:00	12:00
Temperatuur:	33 °C	29 °C	20 °C	24 °C
RV:	35%	51%	69%	54%
Bewolking:	0%	0%	90%	70%

Fase 2:

Toepassing:	A	B	C
Datum:	24-07-2020	31-07-2020	07-08-2020
Tijd:	8:30	10:30	6:30
Temperatuur:	25 °C	28 °C	23 °C
RV:	80%	69%	85%
Bewolking:	100%	0%	0%

Plattegrond:

2D	1D	
7	14	
5D	3D	4D
6	13	20
1A	4B	2C
5	12	19
3A	5B	3C
4	11	18
4A	2B	1C
3	10	17
5A	1B	4C
2	9	16
2A	3B	5C
1	8	15

Klimaatgegevens:

Temperatuur en RV gedurende de proef is geregistreerd met een klimaatcomputer. De gegevens per dag zijn in onderstaande tabel samengevat.

Datum	Temperatuur			RV		
	min	max	gem.	min	max	gem.
23-6-2020	17,8	34,6	25,1	28,4	74,9	54,6
24-6-2020	19,2	33,8	26,3	40,4	81,9	58,7
25-6-2020	20,2	35,1	27,1	39,0	77,6	57,2
26-6-2020	21,7	37,4	28,8	37,1	71,2	54,5
27-6-2020	20,4	28,2	23,6	56,1	85,6	71,5
28-6-2020	18,6	24,5	21,2	42,9	72,6	58,5
29-6-2020	17,7	22,8	19,9	42,9	74,8	60,6
30-6-2020	17,7	21,0	18,9	63,7	85,4	73,2
1-7-2020	17,9	24,3	20,5	52,5	91,0	73,9
2-7-2020	18,2	25,2	21,0	46,7	86,8	68,9
3-7-2020	17,6	23,5	20,4	48,5	82,8	66,2
4-7-2020	17,8	21,6	19,4	71,5	91,5	81,9
5-7-2020	17,9	23,8	20,3	55,9	92,6	77,7
6-7-2020	17,5	23,1	20,1	46,7	74,4	60,5
7-7-2020	17,6	25,6	20,0	39,1	78,7	64,3
8-7-2020	17,8	21,7	19,8	62,9	83,6	74,4
9-7-2020	17,8	21,7	19,6	82,1	90,7	85,4
10-7-2020	17,5	23,6	19,8	44,2	92,5	70,1
11-7-2020	17,6	28,6	21,7	36,0	73,9	57,8
12-7-2020	17,6	28,3	22,2	38,2	72,3	55,5
13-7-2020	17,6	33,5	24,2	31,5	73,1	52,0
14-7-2020	18,8	26,4	21,8	60,6	85,2	73,6
15-7-2020	18,6	28,9	23,6	37,0	76,5	55,6
16-7-2020	18,8	27,7	23,0	47,9	82,6	70,0
17-7-2020	18,8	29,1	23,8	49,1	90,9	70,1
18-7-2020	18,8	31,6	24,7	47,5	86,6	68,8
19-7-2020	19,1	30,2	24,4	45,1	85,7	66,0
20-7-2020	18,6	27,3	24,0	39,6	79,3	55,4
21-7-2020	18,8	28,3	24,1	36,7	72,9	52,8
22-7-2020	18,8	27,9	23,8	42,9	71,3	57,2
23-7-2020	18,9	27,7	23,6	46,1	79,4	58,9
24-7-2020	19,5	27,6	23,9	48,5	82,4	65,9
25-7-2020	19,6	25,8	23,0	68,6	86,6	78,2
26-7-2020	20,0	26,9	23,6	48,4	89,1	69,1
27-7-2020	19,0	26,3	23,5	56,5	84,9	72,6

Datum	Temperatuur			RV		
	min	max	gem.	min	max	gem.
28-7-2020	18,9	27,1	23,2	48,9	88,3	72,0
29-7-2020	18,5	26,7	22,6	54,2	79,9	68,0
30-7-2020	18,9	31,7	24,9	44,8	76,4	61,6
31-7-2020	18,9	32,9	26,2	49,6	86,2	68,5
1-8-2020	20,3	28,8	24,7	54,6	86,0	68,6
2-8-2020	18,9	28,2	23,6	40,9	85,5	64,5
3-8-2020	18,8	27,5	22,6	57,4	80,3	73,6
4-8-2020	18,7	28,5	23,6	38,6	80,4	59,8
5-8-2020	18,7	31,3	24,7	45,8	78,9	61,8
6-8-2020	19,2	34,3	26,0	54,8	81,9	68,5
7-8-2020	20,4	35,8	27,6	55,5	90,4	73,8
8-8-2020	21,1	34,7	27,5	50,3	87,0	71,0
9-8-2020	22,0	31,5	26,6	56,6	83,5	72,1
10-8-2020	21,0	33,1	27,0	60,3	86,5	75,1

Bijlage 1.2 Resultaten per veldje

Fase 1

		23-06-2020 (0 DA-A)					26-06-2020 (0 DA-B)				
		#larve	#adulten	Totaal	Spuitschade (%)	Sputresidu (%)	#larve	#adulten	Totaal	Spuitschade (%)	Sputresidu (%)
1	A	1	4	5	0	0	18	3	21	0	0
1	B	7	4	11	0	0	21	3	24	0	0
1	C	11	0	11	0	0	10	1	11	0	0
1	D	4	4	8	0	0	13	2	15	0	0
2	A	21	4	25	0	0	31	2	33	0	0
2	B	7	0	7	0	0	5	6	11	0	0
2	C	6	5	11	0	0	6	1	7	0	0
2	D	20	1	21	0	0	19	3	22	0	0
3	A	17	1	18	0	0	21	1	22	0	0
3	B	11	6	17	0	0	26	3	29	0	0
3	C	5	0	5	0	0	14	4	18	0	0
3	D	0	2	2	0	0	5	2	7	0	0
4	A	13	6	19	0	0	20	0	20	0	0
4	B	3	3	6	0	0	9	3	12	0	1
4	C	15	3	18	0	0	25	1	26	0	5
4	D	11	2	13	0	0	10	0	10	0	15
5	A	7	5	12	0	0	8	2	10	0	40
5	B	3	1	4	0	0	12	1	13	0	40
5	C	10	5	15	0	0	24	7	31	0	30
5	D	7	2	9	0	0	15	1	16	0	40

Fase 1

30-06-2020 (0 DA-C)							03-07-2020 (0 DA-D)				
		#larve	#adulten	Totaal	Spuitschade (%)	Sputresidu (%)	#larve	#adulten	Totaal	Spuitschade (%)	Sputresidu (%)
1	A	19	0	19	0	0	16	1	17	0	0
1	B	37	3	40	0	0	7	0	7	0	0
1	C	14	1	15	0	0	6	10	16	0	0
1	D	19	2	21	0	0	25	5	30	0	0
2	A	11	1	12	0	0	28	16	44	0	0
2	B	17	1	18	0	0	11	6	17	0	0
2	C	8	3	11	0	0	13	5	18	0	0
2	D	29	2	31	0	0	15	3	18	0	0
3	A	13	0	13	0	0	7	4	11	0	0
3	B	15	0	15	0	0	8	3	11	0	0
3	C	13	0	13	0	0	5	2	7	0	0
3	D	7	2	9	0	0	14	3	17	0	0
4	A	16	2	18	0	0	11	4	15	0	0
4	B	9	2	11	0	0	5	2	7	0	0
4	C	20	3	23	0	0	13	0	13	0	0
4	D	47	1	48	0	0	13	3	16	0	0
5	A	28	1	29	0	20	9	4	13	0	50
5	B	7	0	7	0	25	8	3	11	0	50
5	C	22	2	24	0	25	9	6	15	0	50
5	D	15	2	17	0	20	13	4	17	0	50

Fase 1

06-07-2020 (3 DA-D)							09-07-2020 (6 DA-D)				
		#larve	#adulten	Totaal	Spuitschade		#larve	#adulten	Totaal	Spuitschade	
					(%)	(%)				(%)	(%)
1	A	13	8	21	0	0	0	14	14	0	0
1	B	4	10	14	0	0	7	18	25	0	0
1	C	8	10	18	0	0	2	14	16	0	0
1	D	13	6	19	0	0	12	20	32	0	0
2	A	13	15	28	0	0	2	13	15	0	0
2	B	7	12	19	0	0	15	26	41	0	0
2	C	6	6	12	0	0	7	13	20	0	0
2	D	10	13	23	0	0	7	17	24	0	0
3	A	10	9	19	0	0	1	14	15	0	0
3	B	12	8	20	0	0	13	26	39	0	0
3	C	6	6	12	0	0	8	13	21	0	0
3	D	6	3	9	0	0	10	10	20	0	0
4	A	16	10	26	0	0	10	27	37	0	0
4	B	5	7	12	0	0	10	20	30	0	0
4	C	5	13	18	0	0	4	12	16	0	0
4	D	15	4	19	0	0	21	18	39	0	10
5	A	9	11	20	0	50	8	10	18	0	40
5	B	8	10	18	0	50	3	16	19	0	50
5	C	7	16	23	0	50	8	21	29	0	50
5	D									0	40

Fase 1

16-07-2020 (13 DA-D)						
		#larve	#adulten	Totaal	Spuitschade (%)	Spuitresidu (%)
1	A	5	0	5	0	0
1	B	8	5	13	0	0
1	C	9	1	10	0	0
1	D	17	4	21	0	0
2	A	6	2	8	0	0
2	B	3	4	7	0	0
2	C	13	2	15	0	0
2	D	7	2	9	0	0
3	A	9	3	12	0	0
3	B	16	4	20	0	0
3	C	7	3	10	0	0
3	D	9	3	12	0	0
4	A	8	3	11	0	0
4	B	8	2	10	0	0
4	C	4	3	7	0	0
4	D	11	3	14	0	10
5	A	13	1	14	0	40
5	B	18	4	22	0	50
5	C	14	2	16	0	50
5	D	12	1	13	0	40

Fase 2

		24-07-2020 (0 DA-A)			27-07-2020 (3 DA-A)			31-07-2020 (0 DA-B)		
		#larve	#adulten	Totaal	#larve	#adulten	Totaal	#larve	#adulten	Totaal
1	A	26	3	29	46	3	49	86	6	92
1	B	38	5	43	65	7	72	121	18	139
1	C	47	3	50	81	5	86	114	6	120
1	D	30	2	32	45	3	48	100	8	108
2	A	20	2	22	66	5	71	69	1	70
2	B	25	2	27	27	5	32	46	6	52
2	C	32	3	35	38	6	44	70	8	78
2	D	41	2	43	56	5	61	75	4	79
3	A	25	1	26	75	4	79	105	4	109
3	B	40	3	43	78	5	83	81	6	87
3	C	31	5	36	53	5	58	93	7	100
3	D	52	4	56	98	11	109	96	6	102
4	A	36	4	40	62	1	63	125	9	134
4	B	35	3	38	84	5	89	102	8	110
4	C	23	6	29	35	4	39	85	5	90
4	D	36	0	36	63	5	68	110	4	114
5	A	54	6	60	67	7	74	110	6	116
5	B	34	5	39	71	9	80	128	5	133
5	C	22	2	24	40	4	44	96	2	98
5	D	28	1	29	62	8	70	120	5	125

Fase 210-08-2020

		03-08-2020 (3 DA-B)			07-08-2020 (0 DA-C)			10-08-2020 (3 DA-C)		
		#larve	#adulten	Totaal	#larve	#adulten	Totaal	#larve	#adulten	Totaal
1	A	35	23	58	18	28	46	10	35	45
1	B	7	19	26	10	37	47	2	43	45
1	C	18	16	34	15	23	38	4	22	26
1	D	35	20	55	43	21	64	58	34	92
2	A	27	26	53	8	28	36	1	23	24
2	B	23	16	39	18	23	41	8	30	38
2	C	12	19	31	21	40	61	14	61	75
2	D	41	14	55	39	21	60	7	26	33
3	A	36	20	56	15	21	36	18	34	52
3	B	27	15	42	6	22	28	7	21	28
3	C	14	15	29	19	20	39	11	36	47
3	D	49	13	62	23	36	59	40	34	74
4	A	43	21	64	30	32	62	31	33	64
4	B	52	27	79	62	18	80	49	38	87
4	C	15	21	36	11	19	30	7	24	31
4	D	48	28	76	28	43	71	28	42	70
5	A	81	22	103	31	45	76	34	21	55
5	B	39	17	56	33	25	58	36	34	70
5	C	11	16	27	7	28	35	3	36	39
5	D	114	15	129	79	32	111	28	26	54

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
www.wur.nl/glastuinbouw

Rapport WPR-1087

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, 6.800 medewerkers (6.000 fte) en 12.900 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.