Bioinsekticider- Insektspatogena svampar i biologisk bekämpning mot skadeinsekter i köksväxtodling

Karolina Åsman, Institutionen för Entomologi, 750 07 Uppsala, SLU

Sammanfattning: En kombination av laboratorie, växthus och fältstudier användes för att hitta bioinsekticider att använda som biologisk kontroll mot bladlöss i sallat. Svampisolat insamlade bl.a. i Danmark och kommersiella preparat BotaniGaard, aktiv org. *Beauveria bassiana,* PreFeral, *Paecilomyces fumosoroseus*, Mycotal, *Lecanicillium muscarium* och Vertalec, *L. longisporum* ingick i studien. Aspekter på värd specificitet, utvecklingsstadium hos värddjuret och patogenicitet i relation till insektspatogena svampar från olika släkten, vid olika temperaturer studerades. Dessutom studerades interaktionen mellan *B. bassiana* (BotaniGaard) och en parasitstekel. Alla preparaten var patogena mot sallatsbladlus *Nasonovia ribisnigri*, persikbladlus *Myzus persicae* och *Macrosiphum euphorbiae,* men de vuxna vingade bladlössen var mer mottagliga och dog i högre utsträckning än nymferna. Förutom Mycotal fungerade alla bioinsekticiderna, bra vid 25ºC men vid 10ºC orsakade Vertalec en högre dödlighet. BotaniGaard, Vertalec och en av *Lecanicillium* sp stammarna från den första studien valdes därefter ut för att testas i fältförsök avseende deras effekt på bladlöss i isbergssallat. 14 dagar efter applicering hade alla tre bioinsekticiderna reducerat bladluspopulationen i jämförelse med den obehandlade kontrollen. På bladprover insamlade i sallatsfältet hittades levande svampsporer i upp till 14 dagar efter applicering. Bladlöss som placerades på de kontaminerade bladen blev infekterade med respektive svamp. Den insektspatogena svampen *B. bassiana* (BotaniGaard ES) verkade inte ha någon negativ inverkan på parasitsteklarnas avkomma i växthusförsöket, men om BotaniGaard eller något av de andra isolaten ska användas i större skala behöver effekten på andra naturliga fiender i sallats fält utvärderas.

Bakgrund och syfte

De stora problem som användning av pesticider har medfört t.ex. resistens, miljöpåverkan, hälsorisker har lett till ett ökat intresse och ett behov av att utveckla nya alternativa metoder för kontroll av skadeinsekter. De flesta grönsakskulturer karakteriseras av en hög kosmetisk standard och angrepp av sugande insekter som bladlöss är för närvarande svåra att bekämpa på grund av utvecklad resistens mot pesticider. Bladlöss i frilandsodlad sallat är ett stort problem i södra Sverige där 90 % av den svenska isbergssallaten odlas. Ett komplex av flera olika arter angriper sallat men Sallatsbladlusen *Nasonovia ribisnigri* är den allvarligaste skadegöraren eftersom den föredrar de yngsta bladen och därför snabbt koloniserar de inre delarna av sallatshuvudet. I en tidigare studie gjordes inventeringar i sallatsfält för att identifiera när det är störst risk för kolonisering och vilka bladlusarter som är vanligast i frilandsodlad sallat i Sverige.

Inventeringarna gjordes under två säsonger (2002 och 2003) från april till oktober. För att fånga upp inflygande bladlöss placerades gula skålar med vatten och lite såpa ut i fälten. De bladlusarter som hittades i större mängd i de gula vattenfällorna eller på grödan var Sallatsbladlusen *N. ribisnigri,* persikbladlusen *M. persicae* och *M. euphorbiae* (svenskt namn saknas). Sallatsbladlusen var den dominerande arten i fälten speciellt under den senare delen av säsongen (Åsman, 2006a).

I grödor med korta kulturtider är det dessutom extra svårt att använda pesticider eftersom de kemiska restsubstanserna måste vara ett minimum vid skörde-tillfället. En möjlighet kan vara att använda sig av parasitsteklar (Abrahamsson, 2006) och predatorer men den korta kulturtiden i sallat gör det svårt att etablera och att helt förlita sig på dessa macro organismer.

Biologisk kontroll med insektspatogener, svamp, bakterier och virus har stor potential och ligger i forskningsfronten i forskningsprojekt i flera delar av världen. Appliceringstekniken är likartad som för insekticider och kan därför relativt lätt inkorporeras i bekämpningsprogram. Om dessutom insektspatogenen ifråga är mindre farlig mot andra naturliga fiender än kemiska pesticider, kan kontroll effekten optimeras. Bladlöss äter genom att sticka hål på växtvävnaden och suga upp växtsaft direkt ifrån floemet. Floemet innehåller inga mikroorganismer som kan orsaka sjukdomar hos insekten och därför har endast patogener med förmågan att penetrera insektens kutikula potential som en mikrobiell kontroll faktor hos en sugande insekt. Bland de olika insektspatogena grupperna är det endast svamp som har denna möjlighet (Inglis, *et al.* 2001).

Svampsjukdomar hos insekter är mycket vanligt förekommande och är ofta orsak till stora decimeringar av insektspopulationer. I allmänhet kan man inte förlita sig på att de naturligt förekommande svamparna ska räcka till för att hålla en skadedjurspopulation på en acceptabel nivå. En lyckad biologisk bekämpning med insektspatogena svampar kräver därför direkt applicering av svampen och/eller att man gynnar naturligt förekommande insektspatogena svampar med olika kulturella åtgärder. Majoriteten av insektspatogena svampar med kontroll potential tillhör klassen Hyfomyceter eller ordningen Entomophtorales. Nästan alla arter som har registrerats kommersiellt tillhör gruppen hyphomyceter. Svampar inom klassen hyphomyceter betraktade som bladlus patogener är *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana*, *Paecilomyces fumosoroseus*, *P. farinosus* och *Verticillium lecanii* (Hajek, 1997).

I Sverige finns två preparat registrerade för användning i växthus, BotaniGard och PreFeRal med *Beauveria bassiana* och *Paecilomyces fumosoroseus* som aktiva organismer. Den enda hyphomycet som vanligtvis hittas på bladlöss är *V. lecanii.* Den har utvecklats till bioinsekticiderna Mycotal (*Lecanicillium muscarium*) och Vertalec (aktiv organism *L. longisporum*, Koppert) som framförallt har använts i växthus. *Verticillium* släktet har på senare tid klassificerats om och kallas numera för *Lecanicillum* (Gams, and Zare, 2001). Tidigare studier i laboratorie och växthus har visat att de tre arterna *M. euphorbiae*, *M. persicae* och *N. ribisnigri* är mottagliga för Vertalec men dödligheten var störst hos *N. ribisnigri* (Fournier and Brodeur, 2000; Åsman 2006a). I en tidigare studie jämfördes Bioinsekticiden Vertalec som orsakade en dödlighet på 67±6 % (sallatsbladlusen) respektive 63±4 % (*M. euphorbiae)* med 12 svamp isolat från fyra olika släkten huvudsakligen insamlade i Danmark (*Beauveria bassiana, Metarhizium anisopliae, Paecilomyses farinoseus, P. fumosoroseus* och *Lecanicillium sp.).* Bland de 12 isolaten som testades i laboratoriet visade sig tre stycken *Lecanicillium* stammar (*KVL*98-056, *KVL*98-067 and *KVL*98-034) mer lovande att använda som bioinsekticider än Vertalec (orsakade en dödlighet på över 90 % hos både *N. ribisnigri* och *M. euphorbiae*) (Åsman 2006a). Även om Vertalec orsakade en hög dödlighet bland bladlössen i laboratorie studien var effekterna i fält inte lika uttalade. Vid applicering i fält kunde ingen signifikant reduktion på bladluspopulationen påvisas. Däremot fick man i ett av de två fältförsöken en högre mortalitet bland bladlus nymferna där Vertalec applicerats (Åsman, 2006a). Resultatet kan bero på många olika faktorer och ett problem med Vertalec är att tiden från applicering tills bladlössen börjar dö är ganska lång. Användning av en mer virulent stam skulle därför vara av högsta intresse.

Insektspatogena svampar kräver hög fuktighet för att sporulera, gro och infektera. Därför har det varit svårt att använda dem som bioinsekticider på friland, men Prommer and Mendgen (1992) fann att man genom att tillföra substanser som polysackarider och phospholipider till bioinsekticiden kunde åstadkomma kontroll av kålbladlus på frilandsodlad kål. Förändring av miljöförhållanden, som extra bevattning, för att gynna naturligt förekommande insektspatogena svampar och också kommersiella bioinsekticider, är en annan möjlig metod. Eftersom de flesta sallatsodlare har bevattning tillgängligt skulle detta vara en möjlig strategi för att gynna en biologisk kontroll med insektspatogena svampar. Olika arter och stammar av insektspatogena svampar kan ha olika temperaturoptima (Yeo et al., 2002). Temperatur är en faktor som man inte kan påverka i fält och är därför extra viktigt att studera vid

utvärdering av en bioinsekticid som ska användas i fält. I ett system där olika bladlus arter koloniserar grödan är det också viktigt att studera om de olika insektspatogena svamparna är mer eller mindre virulenta med avseende på bladlusart och utvecklingsstadium och om effekten som påvisas i laboratorie studier också kan påvisas i fält försök.

Metoder

En kombination av laboratorie, växthus och fältstudier användes för att hitta bioinsekticider att använda som biologisk kontroll mot bladlöss i sallat. Svampisolat insamlade främst i Danmark, från flera olika släkten (*B. bassiana*, *Lecanicillium* sp, *M. anisopliae* och *P. fumosoroseus*) och kommersiella preparat BotaniGaard, aktiv org. *B. bassiana,* PreFeral *P. fumosoroseus*, Mycotal *L. muscarium* och Vertalec *L. longisporum* ingick i studien. Aspekter på värd specificitet, utvecklingsstadium hos värddjuret och patogenicitet i relation till insektspatogena svampar från olika släkten, vid olika temperaturer studerades i laboratorie och växthus försök. Dessutom studerade Malin Abrahamsson i ett examens arbete vid inst. för entomologi, interaktionen mellan en av de insektspatogena svamparna *B. bassiana* (BotaniGaard) och en parasitstekel (Abrahamsson, 2006). De mest virulenta bioinsekticiderna, svamp isolaten valdes därefter ut för att testas i fältförsök avseende deras effekt på bladlöss i isbergssallat.

Tidigare i projektet (2002, 2003) deltog jag i flera sallatsmöten arrangerade av GRO och berättade om mitt projekt. Sommaren 2002, 2003 och 2004 lades fältförsöken ut på gårdar i skåne och på så sätt upprätthölls en nära kontakt med odlingen. Tyvärr var koloniseringen av bladlöss så låg i fälten att försöken fick avbrytas sommaren 2004. På grund av detta lades huvudförsöket sommaren 2005 ut i Uppsala och plantorna infekterades med bladlöss från en växthusodling. Ett fältförsök för att jämföra appliceringsteknik planerades också att utföras på en gård i skåne i samarbete med lantbruksteknik, Alnarp, men även om bladlöss förekom så etablerade de sig aldrig i fältet.

1) Patogenicitet studie:I en laboratorie studie utvärderades hur mottagliga de tre bladlusarterna *N. ribisnigri*, *M. persicae* and *M. euphorbiae* är för fyra kommersiella preparat baserade på insektspatogena svampar (BotaniGard, PreFeRal, Mycotal och Vertalec). Insekterna exponerades för fyra olika koncentrationer 1×10^{7}, 1×10^{6}, 1×10^{5}, and 1×10^{4} konidier/ml av de olika preparaten. 10-15 bladlöss i sista nymfstadiet eller ovingade vuxna doppades i konidie lösningen i 5 sekunder. Därefter fick bladlössen torka lite innan de placerades på ett sallatsblad i en petriskål av glas. Antal döda räknades och plockades bort varje dag i en vecka. Kontrollen bestod av insekter doppade i enbart vatten men med samma procentandel vätningsmedel som användes i konidielösningarna.

2) Effekt av utvecklingsstadium på patogenicitet av svamp mot *M euphorbiae* och *N. ribisnigri*: I ett växthusförsök studerades effekten av de fyra kommersiella preparaten på två av bladlusarterna *Macrosiphum euphorbiae* och *Nasonovia ribisnigri* och på två av dess utvecklingsstadium en dag gamla vingade bladlöss och andra-tredje nymfstadiet. Bladlössen sprayades med de doser som rekommenderas av tillverkaren (Vertalec 2g/l, PreFeral 1g/l, BotaniGaard 1,25 g/l and Mycotal 1g/l). Därefter placerades bladlössen i små ”clipburar” som sattes fast på ett blad på en sallatsplanta. Antal döda bladlöss räknades och plockades bort varannan dag i nio dagar. De döda bladlössen placerades fuktigt och eventuell svampsporulering kontrollerades två dagar senare.

3) Temperatur studie: I klimatkammare studerades effekten av temperatur på de fyra kommersiella preparaten och en av *Lecanicillium* sp. stammarna (KVL 98056) från den tidigare studien (Åsman 2006a). För att skapa ett spann av medel temperaturer för fältförhållanden i Sverige från april till oktober valdes tre temperaturer 10, 16, och 25ºC. Både

in vitro koloni tillväxt av svampen på agar och *in vivo* patogenicitet på två av bladlusarterna *N. ribisnigri* och *M. euphorbiae* studerades.

Kolonitillväxt (in vitro) av insektspatogen svamp på agar platta: En 10 µl stor droppe av svampisolatet (koncentration av 1×10^6 konidier/ml) placerades i mitten av en platta med, potatis dextros agar. Därefter förslöts plattorna med parafilm och placerades mörkt i separata klimatskåp vid fyra olika temperaturer (10 16 20 25ºC). Radien på varje svampisolat mättes efter 25 dagar.

Patogenicitet (in vivo) av svamp mot M euphorbiae och N. ribisnigri: Lösningar av fem olika svampisolat applicerades på *M euphorbiae* and *N. ribisnigri*. Antal döda bladlöss räknades en gång varje dag hos bladlöss inkuberade i 16 respektive 25ºC och en gång varannan dag bland bladlössen inkuberade i 10ºC. Bladlössen fick nya fräscha sallatsblad varannan dag. Försöket avslutades efter 15 dagar.

4) Utvärdering av bioinsecticidanv. i fält (BotaniGaard ES, Vertalec och *Lecanicillium* sp.:
Sommaren 2005 lades ett fältförsök ut i Uppsala. Vertalec, BotaniGaard ES och en av de lovande *Lecanicillium* sp. (*KVL*98-067) stammarna från den tidigare studien (Åsman, 2006a) valdes ut att testas i fältförsöket mot bladlöss på isbergssallat. För att etablera en bladluspopulation i fält infekterades sallaten med *N. ribisnigri* (från en bladluskoloni i växthus). Fältförsöket bestod av fyra olika behandlingar med fyra upprepningar.
1) Obehandlad kontroll
2) Applicering BotaniGaard ES, dos 2.5 ml/l, (rek.av tillverkaren)
3) Applicering av Vertalec, dos 2g/l (2×10^6 blastosporer/ml), (rek.av tillverkaren) och
4) Applicering av *Lecanicillium* sp. stam KVL98-067, koncentration $2*10^6$ konidier/ ml (samma koncentration som den rek.för Vertalec).
De insektspatogena svamparna applicerades i fält med en ryggspruta och behandlingen upprepades fyra gånger med tre dagars mellanrum. För att utvärdera effekten av de insektspatogena svamparna på bladlössen samlades, 20-30 sallats plantor in 4, 7 och 14 dagar efter att den första appliceringen av bioinsekticiderna gjorts. Dessutom lades ett litet kompletterande försök ut, för att utvärdera om svampsporerna kunde överleva på bladen och fortsätta att infektera bladlöss fram till skörd. I detta försök applicerades de insektspatogena svamparna endast vid ett enda tillfälle. Viabilitet hos svamp konidierna och deras förmåga att infektera bladlöss (*M. persicae*) studerades vid vissa tidsintervaller upp till 14 dagar efter applicering i fält.

Resultat

1-3) Laboratorie och växthusstudier
Alla de kommersiella preparaten, Vertalec, BotaniGaard, Mycotal och PreFeRal var patogena mot alla tre arterna bladlöss, sallatsbladlus, persikbladlus och *M. euphorbiae* men de vuxna vingade bladlössen var mer mottagliga för de insektspatogena svamparna och dog därför i högre utsträckning än nymferna.

Vid den lägsta temperaturen på 10ºC var kolonitillväxten på agar platta sämst för BotaniGaard medan tillväxten vid 20 och 25ºC tillhörde den största. Den stam som hade den bästa tillväxten vid alla fyra temperaturerna var *Lecanicillium* sp. stammen KVL98056. Den proportionella dödligheten (antal döda/totala antalet bladlöss) hos bladlössen ökade med ökande temperatur. Alla bioinsekticiderna skilde sig från dödligheten över tiden i den obehandlade kontrollen utom hos *N. ribisnigri* infekterade med PreFeRal vid den lägsta temperaturen på 10ºC och Mycotal vid de två högre temperaturerna på 16 och 25ºC. Vid 10ºC orsakade Vertalec den högsta dödlighet över tiden hos *N. ribisnigri* och Vertalec tillsammans med PreFeRal och *Lecanicillium* sp. KVL 98056 hos *M. euphorbiae*. Bortsett från Mycotal verkade alla de övriga bioinsekticiderna fungera bra vid höga temperaturer, men vid 25ºC var dödligheten över tiden högst hos *M. euphorbiae* infekterade med BotaniGaard, PreFeRal eller

KVL 98056 och hos *N. ribisnigri* var den högst hos bladlöss infekterade med PreFeRal eller KVL 98056.

4) Utvärdering i fält: Även om tätheten av bladlöss var låg i fält, 14 dagar efter applicering hade alla tre bioinsekticiderna Vertalec, BotaniGaard ES och *Lecanicillium* sp. stammen KVL98067 reducerat den totala bladluspopulationen i jämförelse med den obehandlade kontrollen. Från bladprover insamlade i sallatsfältet hittades levande svampsporer i upp till 14 dagar efter applicering. Bladlöss som placerades på de kontaminerade bladen blev infekterade med respektive svamp. I ett växthusförsök där bladlössen infekterades med *B. bassiana* (BotaniGaard ES) samma dag eller en till fyra dagar innan de exponerades för parasitsteklar hade inte svampen någon negativ effekt på kläckningsgraden hos parasitstekelns avkomma (Abrahamsson 2006).

Diskussion och Slutsatser

Både i växthus och i laboratorieförsöken visade sig *B. bassiana,* (BotaniGaard ES) vara en lovande bladluspatogen, och den fungerade även bra i fält, men det var även fallet med de två *Lecanicillium* arterna, *Lecanicillium longisporum*, (Vertalec) och stammen *Lecanicillium* sp. *KVL*98-067. Resultat från temperaturstudierna tyder dock på att *B. bassiana* har lite högre temperatur optimum än *Lecanicillium* stammarna. Därför kanske Vertalec är att rekommendera tidigt och sent på säsongen medan BotaniGaard fungerar bäst under den varmaste delen av växtsäsongen. Den insektspatogena svampen *B. bassiana* (BotaniGaard ES) verkade inte ha någon negativ inverkan på parasitsteklarnas avkomma i växthusförsöket. Däremot blev den kombinerade mortaliteten dvs. orsakade av svamp och parasitstekel högre när bladlössen infekterades med *B. bassiana* innan de exponerades för parasitekeln än den biologiska kontrollen när de applicerades var för sig (Abrahamsson, 2006). Men om BotaniGaard ES eller något av de andra isolaten ska användas i större skala behöver effekten på andra naturliga fiender i sallats fält utvärderas. Men risken för de naturliga fienderna vid användning av insektspatogena svampar måste sättas i proportion till den pesticid användning som de naturliga fienderna utsätts för i dagens produktion av sallat. Även om infektionsrisken minskade över tiden från appliceringstillfället, visade denna studie att direkt applicering av svamp sporer/konidier på insektskroppen inte är nödvändigt för infektion. Eftersom bladlössen blev infekterade genom kontaminerade blad. Detta är en stor fördel i ett system där den dominerande arten föredrar de inre delarna av sallatshuvudet. En tillämpning med tanke på att svampen kan överleva och infektera bladlöss under flera dagar är därför att applicera bioinsekticiden tidigt i kulturen och på så sätt förebygga etablering av nyanlända vingade bladlöss i sallaten.

Publikationer och övrig resultatsförmedling till näringen

Åsman, K. 2006. Aphid control in lettuce with entomopathogenic fungi: laboratory and field experiments. Submitted.

Abrahamsson, M. and Åsman, K. 2006. Preference of the parasitoid *Aphelinus abdominalis* (Hymenoptera: Aphelinidae) on two aphid species and offspring performance. Submitted

Åsman, K. 2006. Bioinsekticider-alternativ bekämpning mot bladlöss i sallat. Potatis och Grönsaker 3:

Litteratur

Abrahamsson, M. 2006. Utveckling och framgång hos en parasitstekel på två bladlusarter och interaktion med en insektspatogen svamp. Examensarbete i entomologi 2006:3. Institutionen för entomologi, SLU, Uppsala.

Fournier, V. and Brodeur, J. 2000. Dose-response susceptibility of pest aphids (Homoptera: Aphididae) and their control on hydroponically grown lettuce with the entomopatogenic

fungus *Verticillium lecanii*, azadirachtin, and insecticidal soap. Environmental Entomology. 29: (3) 568-578.

Gams, W. & Zare, R. 2001. A revision of *Verticillium* sect. Prostrata. III. Generic classification. Nova Hedvigia 72:329-337.

Hajek, A. E. 1997. Ecology of terrestrial fungal entomopathogens. In: J. G. Jones (ed.), Advances in microbial ecology. New York. Plenum Press, pp. 193-247.

Inglis, G.D., Goettel, M.S., Butt, T.M. and Strasser, H. 2001. Managing insect pests with fungi. In: Fungi as biocontrol agents, Progress, Problems and Potential. Ed. Butt, T.M., Jackson, C.W. and Magan, N. CABI Publishing.

Pfrommer, W. & K. Mendgen, 1992. Control of the cabbage aphid (*Brevicoryne brassicae*) with the entomopathogenic fungus *Verticillium lecanii* in the laboratory and field. Z. Pflanzenkr. Pflanz. 99:209-217.

Yeo, H. J. K. Pell, P. G. Aldersson, S. J. Clark, and B j. Pye, 2002. Laboratory evaluation of temperature effects on the germination and growth of entomopathogenic fungi and on their pathogenicity to two aphid species. Pest Management Science 59:156-165.

Åsman, K. 2006a. Aphid infestation in field grown lettuce and biological control with entomopathogenic fungi (Deuteromycotina: Hyphomycetes). Accepted in Biological Agriculture and Horticulture.