

# Slimme Sluipwespen

Effectieve biologische bestrijding

PPS, Topsector Tuinbouw & Uitgangsmaterialen

LWV20.80, looptijd mei 2021 tot en met december 2024

Eindrapport juli 2025

Auteurs: Jetske G. de Boer & Gordana Đurović

**Koppert**



NEDERLANDS  
INSTITUUT  
VOOR ECOLOGIE  
(NIOO-KNAW)



**Kijk | Kennis in je Kas**  
VOOR EEN DUURZAME VOORSPRONG



## Voorwoord

In dit rapport worden de bevindingen gedeeld van het onderzoek 'Slimme sluipwespen: Effectieve biologische bestrijding'. Het onderzoek is van mei 2020 tot december 2024 uitgevoerd door het Nederlands Instituut voor Ecologie (NIOO-KNAW) als publiek-private samenwerking met subsidie van de Topsector Tuinbouw & Uitgangsmaterialen. Koppert Biological Systems, Pherobank en Glastuinbouw Nederland waren als private partijen en cofinanciers vanuit de sector betrokken. Cofinanciering werd verder geleverd door de Stichting Kennis in je Kas en Stimufiori. Wageningen Universiteit en Research (leerstoelgroep Entomologie en de business unit Glastuinbouw Bleiswijk) vulden het consortium aan als kennisinstellingen. Vanuit de bedrijven, cofinanciers en telers was er actieve betrokkenheid bij de tien consortiumbijeenkomsten die georganiseerd zijn gedurende het project. Verschillende telers van snijroos en potorchidee werden bezocht in het kader van 'Slimme sluipwespen' en deze waren bereid hun kennis en ervaring met de onderzoekers te delen.

Naast de bevindingen van het onderzoek, heeft het project meer opgeleverd. Philippe Belliard, Eleanor Collinson en Max Verheij hebben als onderzoeksassistent werkervaring opgedaan en twee van hen hebben hun wetenschappelijke loopbaan als PhD-kandidaat in het buitenland vervolgd. Adam Kruitwagen en Gordana Đurović werkten als post-doctoraal onderzoeker aan het project en Elena Romero werd gedurende drie maanden getraind op het project als onderdeel van haar PhD (Universitat Politècnica de València, Spanje). Maar liefst acht (internationale) bachelor en master studenten draaiden mee met het onderzoek (van Hogeschool Arnhem Nijmegen, HAS Green Academy, Aeres Hogeschool, Hogeschool Van Hall Larenstein, Wageningen Universiteit; bijlage I voor lijst met titels). Het project bood hen een uitstekende gelegenheid om in een praktijkgericht wetenschappelijk onderzoek mee te doen en hen daarmee voor te bereiden op hun loopbaan. Ruwe data van het onderzoek en studentenverslagen zijn beschikbaar via de projectleider.

Wij bedanken alle samenwerkingspartners, telers, onderzoekers, studenten en collega's hartelijk voor hun bijdrage aan en rol in 'Slimme sluipwespen'.

Jetske de Boer (projectleider) & Gordana Đurović (postdoc)

Wageningen, 14 juli 2025

## Samenvatting

Biologische bestrijding van plaaginsecten is een belangrijk element van gewasbescherming bij de teelt van veel gewassen. Het doel van het Slimme Sluipwespen project was om een gebruiksvriendelijk product te ontwikkelen om wolluis effectiever te bestrijden in snijrozen en potorchideeën. Het idee was om hierbij gebruik te maken van het leervermogen van sluipwespen. De verwachting was dat *Anagyrus* sluipwespen beter in staat zouden zijn om wolluizen te vinden in de kas als ze eerst werden blootgesteld aan geurstoffen van wolluis en/of het gewas. Om dit te onderzoeken werden gedragsproeven met sluipwespen gedaan in het laboratorium met behulp van 2-kamer olfactometers en in een proefopstelling (tent) in de kas. Proeven met geurstoffen bekend uit de literatuur, waaronder seksferomoon van wolluizen, gaven onvoldoende verbetering van het zoekgedrag van *Anagyrus vladimiri*. Het zoekgedrag van deze sluipwespen werd wel flink verbeterd door ze te trainen met de geurstoffen van planten besmet met wolluizen. Een belangrijke bevinding voor de praktische toepassing van het leervermogen van sluipwespen was dat er geen wachttijd nodig is na deze training. Chemische analyse van de geurstoffen van wolluizen en planten besmet met wolluizen leverde vervolgens tientallen nieuwe kandidaat-informatiestoffen voor de training van sluipwespen op. Enkele van deze informatiestoffen werden geselecteerd om te onderzoeken of ze gebruikt konden worden voor de training van sluipwespen. Hierbij werd een methode ontwikkeld om de mummies van *Anagyrus* sluipwespen bloot te stellen aan geurstoffen. Een combinatie van wolluis- en plantgerelateerde stoffen lijkt belangrijk te zijn om het zoekgedrag van *Anagyrus* sluipwespen te verbeteren. Er worden aanbevelingen gedaan voor verder onderzoek naar het trainen van *Anagyrus* om het zoekgedrag van deze sluipwespen en daarmee biologische bestrijding van wolluis te verbeteren. De onderzoekers adviseren ook om de mogelijke oorzaken van een te lage effectiviteit van biologische bestrijding zorgvuldig in kaart te brengen en zo nodig andere oplossingsrichtingen te ontwikkelen.

## Inhoudsopgave

Voorwoord .....	2
Samenvatting.....	3
1. Inleiding .....	6
Biologische bestrijding van wolluis .....	6
Training van sluipwespen .....	6
Doel van het project en keuze van gewassen .....	7
2. Het leervermogen van sluipwespen.....	8
Leren in de natuurlijke context .....	8
Probleembeschrijving: Beperkte gastheerzoekefficiëntie door massakweek .....	9
Lacunes: belemmeringen voor de toepassing van leren in de biologische bestrijding.....	9
3. Enquête wolluisproblematiek en biologische bestrijding in snijroos en potorchidee .....	10
Inleiding .....	10
Methoden.....	10
Resultaten .....	10
Conclusies.....	11
4. Insectenkweken en planten .....	12
Wolluis.....	12
Sluipwespen .....	13
Planten .....	13
Besmetting van planten met wolluis.....	14
5. Quick-screen van bekende geurstoffen op gedrag van <i>A. vladimiri</i> .....	15
Inleiding .....	15
Methoden.....	15
Resultaten .....	18
Conclusies.....	20
6. Training (sensitisatie) van <i>A. vladimiri</i> met seksferomoon .....	21
Inleiding .....	21
Methoden.....	21
Resultaten .....	23
Conclusies.....	26
7. Tentproeven: sensitisatie met wolluis- en plantengeuren .....	27
Inleiding .....	27
Methoden.....	27
Resultaten .....	30

Conclusies .....	33
8. Identificatie en selectie van kandidaatstoffen .....	35
Inleiding .....	35
Methoden .....	35
Resultaten .....	40
Conclusies .....	45
9. Training van <i>A. vladimiri</i> met nieuwe kandidaatstoffen .....	47
Inleiding .....	47
Tweekamer-olfactometer .....	48
Tentproef met rozenolie .....	51
Mummie-proeven .....	52
Conclusies .....	56
10. Gedrag van <i>Anagyris fusciventris</i> .....	59
Inleiding .....	59
Methoden .....	59
Resultaten .....	61
Conclusies .....	62
11. Conclusies en aanbevelingen .....	63
Conclusies .....	63
Aanbevelingen .....	64
Referenties .....	66
Bijlagen .....	68

# 1. Inleiding

## Biologische bestrijding van wolluis

In de sier- en groenteteelt onder glas wordt intensief gebruik gemaakt van chemische gewasbeschermingsmiddelen (Gullino et al. 2020), ondanks de negatieve gevolgen voor o.a. biodiversiteit, milieu en volksgezondheid (Bale et al. 2007). Nu er naast een verbod op het gebruik van neonicotinoïden ook een verbod is op het gebruik van middelen met de werkzame stof pymetrozine, escaleren problemen met floëemzuigende plaaginsecten en zijn er dringend alternatieven nodig die acceptabel zijn wat betreft kosten en risico's (Glastuinbouw Nederland, 2020; Pijnakker et al., 2015). Biologische bestrijding is een voor de hand liggend duurzaam alternatief, maar voor sommige soorten floëemzuigende plaaginsecten, zoals wolluis, is biologische bestrijding niet toereikend (Pijnakker et al., 2009). Commercieel beschikbare biologische bestrijders, zoals roofkevers, sluipwespen en entomopathogene schimmels zijn onvoldoende effectief om het wolluisprobleem op te lossen (Pijnakker en Leman, 2012).

Wolluizen hebben een verborgen levenswijze en detectie van beginnende wolluishaarden is daarom erg lastig. Sluipwespen zijn zeer bedreven in het vinden van deze kleine haarden, waarbij ze gebruik maken van informatie (met name geur- en smaakstoffen) afkomstig van de wolluis en het gewas om zich te oriënteren tijdens het zoeken. Commercieel gekweekte sluipwespen die losgelaten worden in de kas zijn echter nog niet bekend met de geur van het gewas en weten niet dat er zich in het gewas plaaginsecten bevinden waarin zij hun eieren kunnen leggen. Het vermoeden is dat ze hierdoor niet gemotiveerd zijn om in het gewas te gaan zoeken en vaak naar boven vliegen, de hogere luchtlagen in. Deze onbedoelde verspreiding is in de kas gelimiteerd maar tóch gaat vaak een groot deel van de losgelaten sluipwespen direct verloren. Slechts een fractie van de losgelaten sluipwespen vindt hierdoor het plaaginsect in het gewas. Daarnaast kunnen bij de commerciële massakweek van deze sluipwespen belangrijke aspecten van het – in potentie goede – zoekgedrag verloren gaan waardoor de zoek-efficiëntie verminderd en de gewenste bestrijding niet bereikt wordt (Mackauer, 1976; Geden et al. 1992).

## Training van sluipwespen

Om het natuurlijke zoekgedrag te herstellen en stimuleren kunnen sluipwespen 'getraind' worden waarbij ze informatie krijgen over de aanwezigheid van het plaaginsect in het gewas. Fundamenteel onderzoek heeft herhaaldelijk aangetoond dat sluipwespen verrassend snel kunnen leren. Een training, waarbij de sluipwesp eieren legt in een gastheer op de waardplant kan de zoekefficiëntie naar die gastheer op die waardplant 2-4 keer verhogen (Figuur 1.1; zie referenties in Kruidhof et al. 2019). Door dit leerproces gaan meer sluipwespen actief de gastheer zoeken en vinden ze de gastheer veel sneller. Vanwege praktische beperkingen is dit concept tot op heden nog niet toegepast in de biologische bestrijding omdat het te ingewikkeld is om de sluipwespen voor loslating in de kas een gastheer op een waardplant aan te bieden. Recentelijk heeft het onderzoeksteam in het NWO-groen project "Boosting the efficacy of biological control agents of citrus mealybugs through olfactory conditioning" (2016-2020) echter aangetoond dat het zoekgedrag ook kan worden verbeterd door sluipwespen te trainen door ze bloot te stellen aan relatief makkelijk te (re)produceren geur- en smaakstoffen van wolluizen en waardplanten (informatiestoffen). Deze belangrijke doorbraak maakt het mogelijk om met één simpel trainingsprotocol de getrainde sluipwespen in te zetten in diverse gewassen, zonder dat er gastheren nodig zijn voor de training. Deze training heeft een positief effect op de korte termijn, als losgelaten sluipwespen meer wolluizen

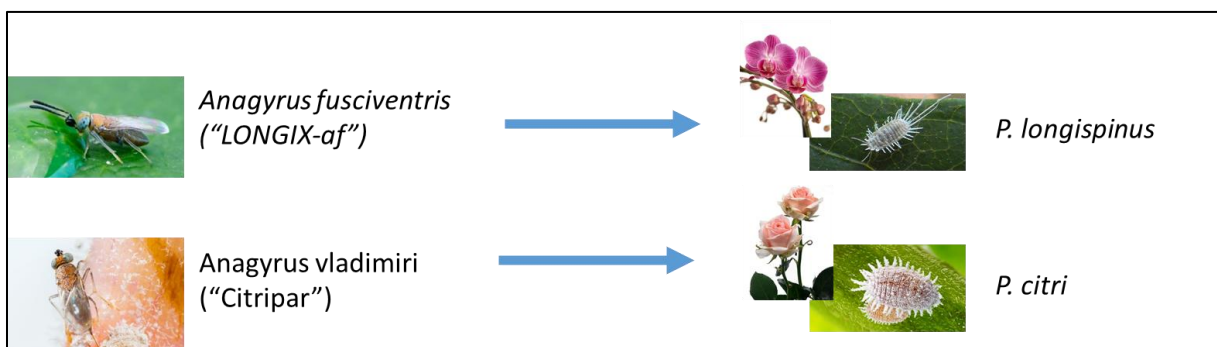
vinden en parasiteren, maar verbetert ook de wolluisbestrijding op de lange termijn door het grotere aantal nakomelingen van deze eerste generatie sluipwespen. Met name in de sierteelt is deze efficiëntieverbetering van groot belang omdat de economische schadedrempel heel laag is, maar ook in andere teeltsystemen is er veel winst te behalen voor biologische bestrijding van plaaginsecten bij lage dichtheden. Deze aanpak heeft daarmee enorme potentie om de effectiviteit van sluipwespen in de biologische bestrijding van wolluis en andere plaaginsecten te verbeteren.



Figuur 1.1. De sluipwesp *Anagyrus vladimiri* legt een ei in haar gastheer, de citruswolluis *Pl. citri*.

### Doel van het project en keuze van gewassen

Het doel van het Slimme Sluipwespen project was om een gebruiksvriendelijk product te ontwikkelen waarmee telers in de kas effectiever wolluis kunnen bestrijden. We richtten ons eerst op wolluisbestrijding in snijroos omdat dit gewas commercieel van belang is, wolluis een belangrijk probleem is, en er dringend behoefte is aan alternatieven voor chemische bestrijding. De citruswolluis *Planococcus citri* is de belangrijkste wolluisplaag op snijroos. De sluipwesp *Anagyrus vladimiri* (Encyrtidae, voorheen bekend als *A. pseudococci*) is een natuurlijke vijand van *P. citri* en is o.a. commercieel verkrijgbaar als product Citripar van Koppert Biological Systems (Berkel & Rodenrijs). In overleg met Glastuinbouw Nederland, de Stichting Kijk en Stimuflori werd potorchidee *Phalaenopsis* als tweede gewas geselecteerd. De langstaartwolluis *Pseudococcus longispinus* is de belangrijkste wolluissoort op potorchidee. De sluipwesp *A. fusciventris* parasiteert langstaartwolluizen en is o.a. commercieel verkrijgbaar als LONGIX-Af bij Entocare (Wageningen).



## 2. Het leervermogen van sluipwespen

### Leren in de natuurlijke context

Zodra de vrouwelijke sluipwesp uit haar cocon komt paart zij met een nabij wachtend mannetje, waarna ze gastheren gaat zoeken om haar eieren in te leggen. Om dit te doen maakt de sluipwesp gebruik van geur- en contactstoffen (informatiestoffen) die de nabijheid van de gastheer aangeven. Een deel van deze informatie is al in de hersenen vastgelegd en daarmee aangeboren, de rest verzamelt zij uit de omgeving tijdens haar larvale ontwikkeling en gedurende haar leven als volwassen sluipwesp. Naast gastheergerelateerde geur- en smaakstoffen gebruiken sluipwespen voor het zoeken op lange afstand ook geurstoffen van de waardplant, zoals (geïnduceerde) plantengeuren (Vet et al. 1995). Deze geurstoffen geven op een indirecte manier de aanwezigheid van de gastheer aan. In de natuur kunnen gastheren echter voorkomen op verschillende soorten planten waardoor het zoekproces een uitdaging blijft. Om efficiënter te kunnen zoeken, verzamelt de sluipwesp informatie uit haar omgeving en slaat dit op in haar geheugen door middel van leren.

Leren is een algemeen vermogen waartoe alle dieren in staat zijn. Zoals Pavlov aan het eind van de 19de eeuw zijn hond trainde met klassiek conditioneren, door het rinkelen van een bel te belonen met de geur van voedsel, kunnen insecten ook getraind worden. Bij sluipwespen werkt dit op de volgende manier: Eerst wordt de sluipwesp blootgesteld aan geuren van de waardplant, waarna ze wordt beloond door contact met de uitwerpselen van de gastheer en eventueel het leggen van een ei in die gastheer (Vet et al. 1995). Deze associatie, tussen geurinformatie van de waardplant en de beloning, wordt opgeslagen in het associatief geheugen van de sluipwesp en kan vervolgens het zoekgedrag van de sluipwesp dagenlang beïnvloeden (Hoedjes et al. 2011). Daarnaast is er het kortere effect van sensitivatie van de sluipwesp door het contact met smaakstoffen afkomstig van de gastheer. Dit zorgt voor een verhoogde zoekactiviteit, onafhankelijk van de specifieke waardplant. We kunnen dus de zoek efficiëntie verhogen door alleen te werken met smaakstoffen van de gastheer (sensitivatie) of door te werken met geurstoffen van de waardplant, gevolgd door smaakstoffen van de gastheer (associatief leren).

Fundamenteel onderzoek in verschillende studiesystemen heeft aangetoond dat leren de gastheerzoek efficiëntie 2-4 maal kan verbeteren. Dit komt omdat er meer sluipwespen zijn die gastheren vinden en deze sluipwespen daarnaast ook sneller zijn in het vinden van deze gastheer (Kruidhof et al. 2019 en referenties daarin). Door de recente positieve leerervaring verwachten deze sluipwespen de aanwezigheid van gastheren in de nabije omgeving, en meer specifiek op het gewas, en dit verhoogt de motivatie om lokaal op het doelgewas te gaan zoeken naar gastheren. Sluipwespen zonder leerervaring, hebben een lagere motivatie om direct te gaan zoeken, en verspreiden zich vaak eerst over grotere afstand om gastheren in verderop gelegen gebieden te zoeken. In de natuur kunnen sluipwespen vervolgens lokaal gaan zoeken, en een gastheer vinden, waardoor ze alsnog een positieve leerervaring opdoen en het zoekgedrag aanpassen aan de lokaal aanwezige gastheren en waardplanten. In een kassysteem daarentegen is de kans aanwezig dat de sluipwespen zich richten op de hogere luchtlagen in de kas en daar niet meer uit komen.

### Probleembeschrijving: Beperkte gastheerzoekefficiëntie door massakweek

In de natuur vindt er natuurlijke selectie plaats voor het optimaliseren van de gastheerzoekefficiëntie omdat alleen de sluipwespen die succesvol gastheren vinden zich ook voort kunnen planten. Dit gebeurt echter in veel mindere mate in massakweek systemen omdat de omstandigheden waaronder sluipwespen massaal geproduceerd worden veel eenvoudiger zijn dan de natuurlijke leefomgeving, en bijvoorbeeld de gastheerdichtheid onnatuurlijk hoog is. Onder deze massakweek omstandigheden kan de gastheerzoekefficiëntie over vele generaties afnemen (Geden et al. 1992; Mackauer 1976). Deze effecten kunnen verminderd worden door regelmatig nieuwe sluipwespen uit het veld te verzamelen en bij de kweek te zetten, maar deze introducties gaan gepaard met risico's zoals de verspreiding van virale infecties in de massakweek.

Naast dit gebrek aan natuurlijke selectie, leren de sluipwespen tijdens hun ontwikkeling in de massakweek ook weinig tot niets over de omgeving waarin zij hun gastheer moeten zoeken. Dit probleem ontstaat doordat de sluipwespen tijdens hun ontwikkeling geen relevante informatie kunnen verzamelen over de omgeving (het gewas) waarin ze later naar de gastheer moeten zoeken. Daarnaast worden de sluipwespen vaak gekweekt op een andere gastheersoort dan het plaaginsect dat bestreden moet worden. Dit leidt ertoe dat de sluipwesp tijdens haar ontwikkeling informatie verzamelt van de verkeerde gastheer en dat kan ervoor zorgen dat de sluipwespen zich fysiek en gedragsmatig gaan aanpassen aan deze alternatieve gastheer. Dit veroorzaakt een verminderde gastheerzoekefficiëntie, een verminderd gastheeracceptatiegedrag en lagere overlevingskansen tijdens de ontwikkeling in het plaaginsect. Het resultaat voor de teler is dat de biologische bestrijding niet betrouwbaar en onvoldoende (kosten)effectief is. Hierin ligt dan ook een uitdaging voor producenten van biologische bestrijders: ze zo goedkoop mogelijk produceren maar wél zodanig dat ze effectief het plaaginsect bestrijden, waarbij niet te veel van het natuurlijk gedrag mag verloren gaan.

### Lacunes: belemmeringen voor de toepassing van leren in de biologische bestrijding

Om de gastheerzoekefficiëntie te verbeteren kan leren worden geïntegreerd in de biologische bestrijding. Dit idee is niet nieuw (Gross et al. 1975), maar het fundamentele concept heeft recentelijk weer meer aandacht gekregen (Giunti et al. 2015; Kruidhof et al. 2019; Little et al. 2019). Praktijkgericht onderzoek is echter zeer schaars. Ondanks de solide fundamentele kennis-basis, is het dus nooit gekomen tot de ontwikkeling van een gebruiksvriendelijk product voor telers waarin het concept van leren wordt toegepast. De belemmeringen liggen voornamelijk in de lage haalbaarheid van het handmatig trainen van sluipwespen met de gastheer en het gewas, een gebrek aan technologische ontwikkelingen om dit op een artificiële en automatische manier te doen en de beperkte financiële middelen voor dit type praktijkonderzoek.

Daarnaast weten telers en producenten van biologische bestrijders weinig over de potentiële verbeteringen die bewerkstelligd kunnen worden door leren toe te passen. Zelfs kortdurende gedragsveranderingen (geïnduceerd door een leerervaring zoals sensitivatie) kunnen al grote winst opleveren wanneer de sluipwespen direct na het loslaten meer gemotiveerd zijn om in het gewas naar de gastheer te zoeken. Ondanks dat het interessant zou zijn om deze training bij de producent van biologische bestrijders te laten plaatsvinden, is dit suboptimaal omdat de sluipwespen gewoonlijk nog in het popstadium zijn als ze bij de teler worden afgeleverd. Als sluipwespen in het larvale stadium getraind worden, is de kans groot dat het gevormde geheugen al is afgebroken voordat de wespen bij de teler arriveren. Het is daarom essentieel dat het trainen op een eenvoudige en automatische manier bij de teler plaatsvindt.

### 3. Enquête wolluisproblematiek en biologische bestrijding in snijroos en potorchidee

#### Inleiding

Om een beeld te krijgen van de wolluisproblematiek en de ervaring met biologische bestrijding in beide doelgewassen werd informatie bij telers opgehaald.

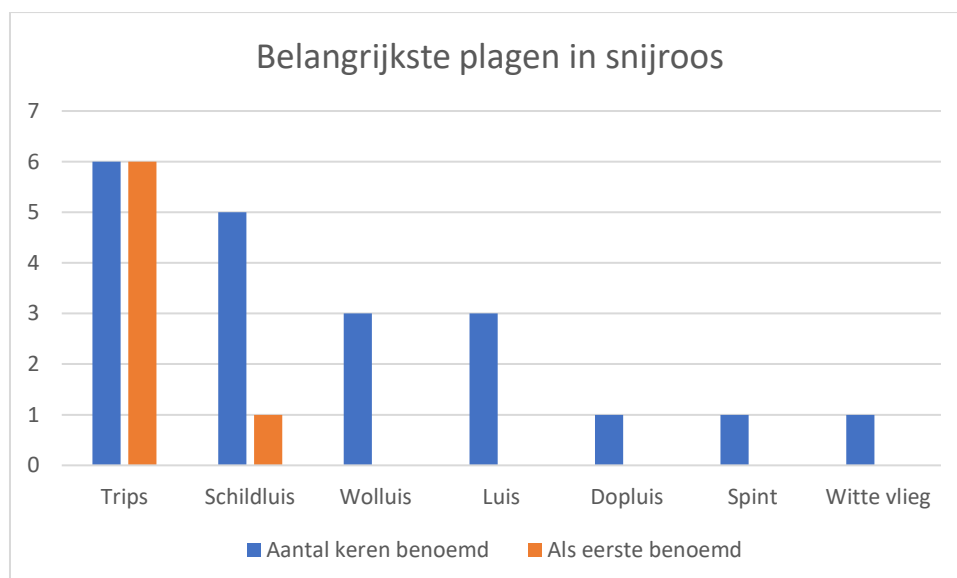
#### Methoden

Een vragenlijst met 20 vragen werd opgesteld (zie bijlage II). Vragen hadden betrekking op het bedrijf- en teeltsysteem, plaagprobleem en de (biologische) plaagbestrijding. Deelnemers werden op de hoogte gesteld dat de verzamelde gegevens anoniem voor onderzoeksdoeleinden werden verwerkt en niet gedeeld met derde partijen. De vragenlijst werd door de gewascoördinatoren per email gedeeld onder ongeveer 25 snijroostelers en 35 potorchideetelers aangesloten bij Glastuinbouw Nederland.

#### Resultaten

Van snijroostelers ontvingen we 7 ingevulde formulieren (28%). Trips werd het vaakst als belangrijke plaag genoemd en ook het vaakst als eerste (Figuur 3.1). Wolluis werd door 3 telers als belangrijke plaag genoemd (43%) maar door geen van de telers als eerste. Vier telers pasten chemische bestrijding van wolluis toe (57%).

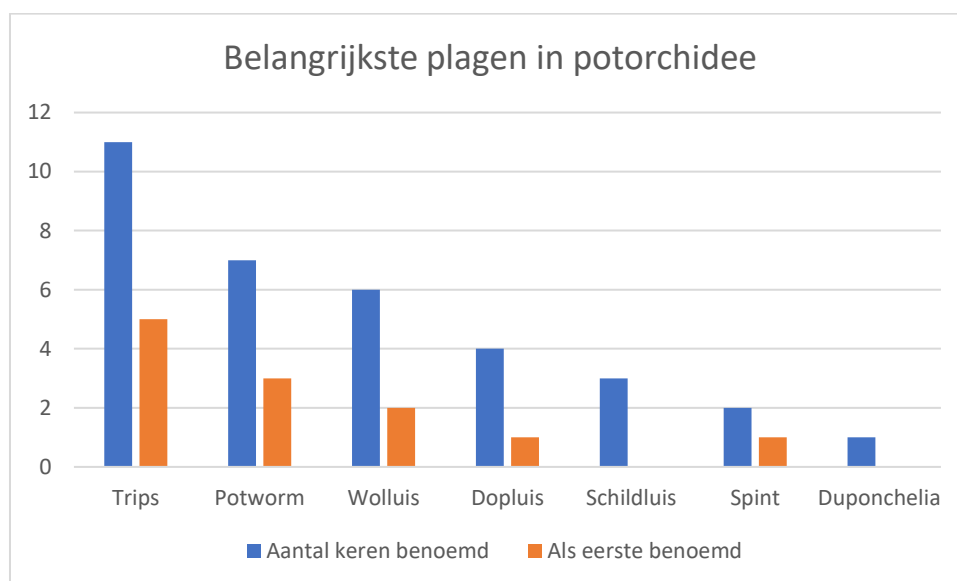
Vier telers waren bekend met biologische bestrijding van wolluis (57%). Ze hadden ervaring met verschillende soorten natuurlijke vijanden: *Cryptolaemus* lieveheersbeestjes (2 telers), *Chrysoperla* gaasvliegen (1 teler), en sluipwespen van verschillende soorten waaronder *Anagyrus vladimiri* en *A. fusciventris* (1 teler). Daarnaast had nog een andere teler ervaring met *Anagyrus* maar deze paste de sluipwespen niet (meer) toe.



Figuur 3.1. Aantal keren dat verschillende plaagsoorten genoemd werden door 7 snijroostelers (blauw) en het aantal keer dat deze plaagsoorten als eerste genoemd werden (oranje).

Van potorchideetelers ontvingen we 15 ingevulde formulieren (43%). Trips werd het vaakst als belangrijke plaag genoemd en ook het vaakst als eerste (Figuur 3.2). Wolluis werd door 6 van de 15 telers (40%) als belangrijke plaag genoemd, waarvan als eerste door 2 telers. Negen van de 15 telers pasten chemische bestrijding toe tegen wolluis (60%).

Zes telers waren bekend met biologische bestrijding van wolluis (40%). Ze hadden ervaring met verschillende soorten natuurlijke vijanden: *Cryptolaemus* lieveheersbeestjes (3 telers), *Chrysoperla* gaasvliegen (2 telers), *Nephus* lieveheersbeestjes, *Micromus* gaasvlieg en *Anagyrus vladimiri* sluipwespen (elk 1 teler). Twee telers hadden voorheen *A. fusciventris* sluipwespen gebruikt maar waren daar mee gestopt.



Figuur 3.2. Aantal keren dat verschillende plaagsoorten genoemd werden door 15 potorchideetelers (blauw) en het aantal keer dat deze plaagsoorten als eerste genoemd werden (oranje).

## Conclusies

De reacties van telers bevestigen het beeld dat wolluis een belangrijke plaag is in snijroos maar met name ook in potorchidee. Ongeveer de helft van de telers was al bekend met biologische bestrijding van wolluis hoewel slechts een paar telers bekend waren met *Anagyrus* sluipwespen. Dit geeft aan dat er ruimte is voor verbetering van biologische bestrijding met *Anagyrus*. Telers noemden daarbij als aandachtspunten: verhogen van de effectiviteit van biologische bestrijding en het meetbaar maken ervan, robuuste bestrijder, presteren onder alle omstandigheden in het jaar, betaalbaarheid en goed zoekgedrag van de natuurlijke vijanden.

## 4. Insectenkweken en planten

### Wolluis

Wolluizen werden op aardappelspruiten gekweekt. Om spruiten aan te maken werden pootaardappelen enkele weken in het donker bij 15°C gelegd voordat ze in de kweekbakken werden gedaan. Wolluizen werden gekweekt in klimaatkasten bij 25°C en ongeveer 70% luchtvochtigheid in het donker. Solani wolluis werd bij 22°C gekweekt.

Plastic bakken van twee verschillende groottes werden gebruikt voor de kweken. In de kleinere bak (B46 x D30 x H8,5 cm) werden 15-20 spruitende aardappelen geplaatst. Deze bak stond in een grotere bak (B59 x D40 x H6,5 cm) die gevuld was met water met een klein beetje afwasmiddel om te voorkomen dat wolluizen konden ontsnappen (Figuur 4.1). Een nieuwe kweekbak werd gestart door 1<sup>e</sup> stadium nimfen (kruipers) te verzamelen (zie 'Besmetting van planten met wolluis') of door aardappelspruiten die goed bevolkt waren met volwassenen te verplaatsen naar een nieuwe kweekbak. Kweekbakken werden wekelijks gewassen en oude of schimmelende aardappels werden verwijderd. Nieuwe spruitende aardappelen werden toegevoegd.



Figuur 4.1. Bakken waarin wolluis gekweekt werd op aardappelspruiten (links) en een klimaat waarin de bakken met wolluis geplaatst werden.

De kweken van de drie soorten wolluis (citruswolluis *Planococcus citri*, langstaartwolluis *Pseudococcus longispinus* en Solani wolluis *Phenacoccus solani*) werden in 2021 gestart met materiaal van Koppert. In september 2023 werd gestopt met de kweken van de Solani wolluis en van de langstaartwolluis.

In december 2023 werd een nieuwe *Ps. longispinus* kweek gestart met *Phalaenopsis* planten die met langstaartwolluis besmet waren (verkregen van verschillende telers). De langstaartwolluis werd sindsdien op pororchidee gekweekt in de kas (zie omstandigheden bij 'Planten'). De geïnfesteerde orchideeënplanten stonden in een grote kooi. Elke 3 à 4 weken werd een geïnfesteerde plant in

delen geknipt en verdeeld over 4 schone orchideeënplanten om de kweek te verzorgen. Oude planten werden verwijderd.

## Sluipwespen

*Anagyrus vladimiri* werd geleverd door Koppert als het Citripar product. De flesjes met mummies werden in kooien (Bugdorm, 160 µm mesh) gezet in een klimaatkast bij 22°C en ongeveer 60% luchtvochtigheid bij 16h licht : 8h donker.

*Anagyrus fusciventris* werd geleverd door Entocare (Wageningen) als Longix-Af product. Dit product bevat per unit 25 volwassen sluipwespen waarvan ongeveer 50% vrouwtjes. De voorgeschiedenis van de sluipwespen is niet precies bekend. Dat wil zeggen dat de sluipwespen niet als volledig naïef beschouwd kunnen worden maar mogelijk tijdens hun volwassen leven al zijn blootgesteld aan informatie van de wolluizen waar ze op gekweekt zijn. De flesjes met sluipwespen werden in kooien met water en honing gezet onder dezelfde omstandigheden als *A. vladimiri*.

## Planten

Potrozen van het ras *Alaska wit* werden geleverd door Kordana (Leo van der Harg BV Potrozen, Vierpolders, Nederland). Planten waren vrij van plaaginsecten. Bij de kwekerij werden planten behandeld met Tepekki tegen bladluis, Scelta tegen spint, en (preventief) met fungiciden (Switch, RanmanTop en Previcur). Deze middelen werden ten minste twee weken voor levering niet meer toegepast. Elke pot (10,5 cm doorsnede) bevatte vier rozenplanten van 10-17 cm die nog niet bloeiden. De planten werden op het NIOO in een kas geplaatst bij een dagtemperatuur van 21°C (±1°C), een nachttemperatuur van 16°C (±1°C), 60% luchtvochtigheid. De kas werd 16 uur verlicht (daglicht aangevuld met high-pressure Sodium lampen, 6000W SON-T GP, Philips, Nederland), de overige 8 uur was het donker. Alle planten stonden op matten op tafels.

De rozenplanten kregen tenminste twee keer per week water. Als de rozen begonnen te bloeien, werden de bloemstengels gesnoeid. Bij aankomst en wanneer nodig werd Osmocote Exact Mini toegevoegd aan elke pot als meststof.

Wekelijks werden de plakkaarten die boven de planten hingen geïnspecteerd evenals de planten zelf. Wanneer nodig werden de planten met biologische methoden tegen plagen behandeld. Californische trips (*Frankliniella occidentalis*) werd eerst behandeld met roofmijten Montdo-Mite (Koppert). Enkele malen werd de tripsdruk te hoog en werden de planten behandeld met SILTAC® SF (ICBpharma). Deze behandeling vond plaats tenminste 6 dagen voordat de kas en de planten weer werden gebruikt voor een experiment. Echte meeldauw (*Podosphaera pannosa*) werd behandeld door met meeldauw geïnfecteerde bladeren te verwijderen en Meltotox® (5076N, BASF) te spuiten. Dit fungicide werd slechts 2 keer toegepast in de gehele looptijd van het project. Het werd dan minimaal 6 dagen voordat de kas zou worden gebruikt voor een experiment gespoten omdat de toepassing nadelige gevolgen voor natuurlijke vijanden kan hebben.

*Phalaenopsis* planten werden geleverd door GreenBalanZ (Kudelstaart, Nederland). Verschillende rassen werden gebruikt voor de experimenten. In alle gevallen werden bloeiende planten geleverd die vrij waren van plaaginsecten en (zichtbare) ziekten. De planten werden op het NIOO in een kas geplaatst onder dezelfde omstandigheden als potroos. Alle planten stonden op matten op tafels.

## Besmetting van planten met wolluis

Voor de besmetting van de rozenplanten werden verschillende methoden gebruikt: besmetting met kruipers of besmetting door een aardappelspruit met wolluis te verplaatsen. Door de looptijd van het project heen werden drie verschillende technieken gebruikt om kruipers te verzamelen, al naar gelang hoeveel crawlers beschikbaar waren in de wolluiskweek: (1) afborstelen van de rand van de bak en opvangen in een Petrischaal of op een vel papier; (2) aardappels voorzichtig optillen en de kruipers eraf tikken op een wit vel papier met een pincet; (3) met behulp van een zaklamp; de zaklamp werd boven een stukje wit papier gehangen dat in de kweekbak lag. De kruipers verzamelden zichzelf dan op natuurlijke wijze op het verlichte papier. Het papiertje met kruipers werd na 30-60 minuten opgetild met een pincet en overgebracht naar een nieuwe kweekbak of gebruikt om rozenplanten te besmetten die nodig waren voor experiment. Rozenplanten werden eenmaal per week besmet met kruipers of met een stukje van een geïnfesteerde aardappelspruit gedurende een periode van 3 à 4 weken om een wolluispopulatie op te bouwen bestaande uit volwassenen en gemengde ontwikkelingsstadia. Hierna werden de planten nog een week bewaard voordat ze in experimenten gebruikt werden. De geïnfesteerde planten werden onder dezelfde omstandigheden als gezonde planten in de kas gekweekt en stonden in kooien.

Orchideeënplanten werden besmet met stukjes geïnfesteerde orchidee uit de kweek van langstaartwolluis op orchidee. Dit proces werd gedurende enkele weken herhaald om de gewenste besmetting te realiseren voor de experimenten.

## 5. Quick-screen van bekende geurstoffen op gedrag van *A. vladimiri*

### Inleiding

Uit de literatuur is bekend dat sluipwespen informatiestoffen van verschillende geurbronnen gebruiken in hun zoekgedrag. Informatiestoffen kunnen direct afkomstig zijn van de gastheer van de sluipwesp. Hoewel deze stoffen heel specifiek de aanwezigheid van de gastheer aanduiden zijn ze vaak in zeer lage concentraties aanwezig omdat de plaaginsecten erg klein zijn (Vet & Dicke 1992). Seksferomonen zijn een voorbeeld van gastheer-gerelateerde informatie voor sluipwespen. De seksferomonen van enkele wolluissoorten, waaronder *Pl. citri* en *Pl. ficus*, zijn commercieel verkrijgbaar. Deze stoffen zijn zeer specifiek voor de twee belangrijkste gastheren van *A. vladimiri*, dus een aangeboren reactie op deze informatiestoffen is te verwachten. Voor *P. ficus* is dit eerder aangetoond (Franco et al., 2008).

Naast informatie van de gastheer, worden verschillende soorten sluipwespen aangetrokken door geurstoffen van planten wanneer deze aangevallen worden door herbivoren. Deze stoffen worden herbivoor-geïnduceerde plantengeurstoffen genoemd. Hoewel de precieze samenstelling van het geurboeket van elke plant-plaag combinatie verschillend is, zijn er ook stoffen die vaak voorkomen. Voorbeelden hiervan zijn de terpenen  $\alpha$ -farneseen en  $\beta$ -ocimeen die onder andere afgegeven worden door rozen als reactie op vraat door spintmijten *Tetranychus urticae* (Sousa et al., 2020). Limoneen is een terpeen dat constitutief wordt afgegeven door citrusplanten en ook een veelvoorkomende herbivoor-geïnduceerde plantgeurstof is. Deze drie informatiestoffen spelen mogelijk ook een rol bij de reactie van planten op wolluis en kunnen daardoor interessant zijn voor *A. vladimiri*.

Het doel van dit experiment was om vast te stellen of *A. vladimiri* reageert op deze vijf bekende geurstoffen. Met behulp van een contact-experiment werden de vijf stoffen gescreend om vervolgens met een 2-kamer olfactometer te onderzoeken of de sluipwespen getraind konden worden met de meest interessante geurstoffen.

### Methoden

#### Contact-experiment

Het contact-experiment was bedoeld om snel te screenen op mogelijke aangeboren interesse van *A. vladimiri* in vijf informatiestoffen:  $\alpha$ -farneseen (mengsel van isomeren),  $\beta$ -ocimeen, en limoneen en de seksferomonen van *P. citri* en *P. ficus*. Informatiestoffen (verkregen van Pherobank in 1 mg/ml, met uitzondering van limoneen (Sigma-Aldrich, zuiverheid 97%)) werden gebruikt in twee verschillende concentraties (0,1 en 1 mg/ml in hexaan). 5  $\mu$ l van de oplossing werd gepipetteerd op siliconen blokjes (2x3 mm) in een plastic petrischaal waarna het oplosmiddel gedurende 1 uur kon verdampen onder de afzuigkap. De controlebehandelingen bestond uit siliconenblokjes met alleen 5  $\mu$ l hexaan (n-hexaan, EMPLURA).

Vijf siliconenblokken die met dezelfde informatiestof waren behandeld, werden in een vijfhoekige opstelling in een glazen petrischaal van 5 cm ( $\varnothing$ ) geplaatst. Per testronde werd één vrouwelijke wesp in het midden van de petrischaal geïntroduceerd, d.w.z. in het midden van de vijf siliconenblokken. Dit werd gedaan door de sluipwesp in een injectiespuit te vangen waar de punt vanaf geknipt was. Na het introduceren van de wesp werd de schaal gesloten en onmiddellijk ondersteboven gedraaid,

waarbij de siliconenblokjes aan het plafond bleven plakken. Wespen mochten de arena vijf minuten lang verkennen, waarbij vier verschillende gedragingen van de wesp werden gescoord: contact (fysiek contact met een siliconenblokje), klimmen (de wesp zit of loopt op een siliconenblokje), antenneren (de wesp betast een siliconenblokje met haar antennes), en ovipositie (de wesp draait haar lichaam 180° t.o.v. een siliconenblokje en steekt haar legboor uit). Na vijf minuten werd de wesp uit de petrischaal gehaald en apart gehouden van ongebruikte wespen. De vijf verschillende informatiestoffen en de controlebehandeling werden achtereenvolgens getest, één per testronde, en in dezelfde volgorde herhaald gedurende het experiment. Tussen de testrondes werden siliconenblokjes verversen en werden de petrischalen gereinigd met 70% ethanol. Bovendien werden de petrischalen gemarkeerd, zodat er slechts één informatiestof per petrischaal werd getest. Experimenten werden herhaald gedurende 3 experimentele dagen totdat er 15 replicaties waren gedaan voor elke informatiestof in beide concentraties, waarbij 24-36 wespen per dag werden getest.

Alle gedragsexperimenten werden uitgevoerd bij kamertemperatuur ( $19 \pm 2$  °C, 40-70% RV) met T5-lampen boven de opstellingen.

#### *Tweekamer-olfactometer experiment*

Op basis van de resultaten van het contact-experiment werden limoneen en het *P. ficus* seksferomoon geselecteerd voor een vervolgent experiment. Een tweekamer-olfactometer experiment werd uitgevoerd om vast te stellen of training met deze informatiestoffen een effect had op de aantrekking van *A. vladimiri* naar *Pl. citri* wolluizen. Sluipwespen werden 'getraind' door ze in groepen van 6-10 vrouwtjes in een 50 ml-buis te plaatsen met een aspirator. De buizen bevatten 1/8 deel van een filtreerpapiertje (Grade 1, 85 mm diameter, Whatman™) waarop 20 µl van *P. ficus* feromoon of limoneen (beide 1 mg/ml in hexaan) werd gepipetteerd (Figuur 5.1). Na 1 uur werden de wespen vrijgelaten in een kleine insectenkooi (Bugdorm, 160 µm maaswijdte). Naïeve sluipwespen werden tegelijkertijd in een lege 50 ml-buis gehouden en na 1 uur in een aparte insectenkooi geplaatst. In dit experiment werden naïeve sluipwespen niet blootgesteld aan het oplosmiddel hexaan.

De gebruikte tweekamer-olfactometers zijn gebaseerd op het ontwerp van Zhu et al. (2014). Deze olfactometer bestond uit een grote witte schaal (Ø 14 cm) gemaakt van polyoxymethyleen (Delrin), waarin twee ronde kamers waren geplaatst (Ø 3,5 cm) om de geurbronnen vast te houden. De twee binnenkamers waren gemaakt van polycarbonaatbuizen die in een cirkelvormige groef pasten die in de bodem en het deksel van de grote schaal was gemaakt. De wanden van de binnenkamers waren semi-transparant (d.m.v. kogelstralen) om visuele signalen te minimaliseren. Een transparant plexiglas (polymethylmethacrylaat) deksel werd gebruikt om de grote schaal af te dekken. Elk van de twee binnenkamers had acht gaatjes (Ø 0,3 cm) op gelijke afstanden in de wand, net boven het oppervlak van de grote arena, waardoor sluipwespen toegang hadden tot deze binnenkamers. De tweekamer-olfactometers werden tussen testdagen schoongemaakt met 70% ethanol.



*Figuur 5.1. 50 ml-buis met filtreerpapier die gebruikt werd voor de training van *A. vladimiri* sluiwespes met informatiestoffen.*



*Figuur 5.2. Opstelling van acht tweekamer-olfactometers (links), met tenten voor getrainde en naïeve sluiwespes erachter. Rechts een close-up van een tweekamer-olfactometer.*

In een van de twee kamers van de olfactometer werden vijf wolluizen (2e nymf stadium tot volwassen stadium) geplaatst onder een gazen klemkooi; de andere kamer bleef leeg zonder klemkooi omdat werd aangenomen dat de aanwezigheid van de klemkooi geen invloed zou hebben op het gedrag van *A. vladimiri*. Wolluizen werden niet verwijderd tussen testrondes die op dezelfde dag werden uitgevoerd, en bleven dus de hele dag in de opstelling. Per testronde werden acht tweekamer-olfactometers tegelijkertijd gebruikt, waarbij vier naïeve en vier getrainde wespen per ronde werden getest. Sluiwespes die eerder waren blootgesteld aan *P. ficus*-seksferomoon en limoneen werden afwisselend getest in verschillende rondes, elk met hun eigen controleset van naïeve sluiwespes. Eén sluiwesp werd losgelaten per olfactometer, op gelijke afstanden van de

twee kamers. Na het loslaten werd de wesp gedurende 30 minuten geobserveerd. Wanneer de sluipwesp een kamer volledig binnenging via een van de toegangsgaten werd dit als een keuze voor de betreffende kamer genoteerd. Wanneer een sluipwesp gedurende 30 minuten geen van de kamers binnenging, werd dit beoordeeld als geen keuze (=geen respons). Na 30 minuten werden alle sluipwespen verwijderd met een zuigbuis.

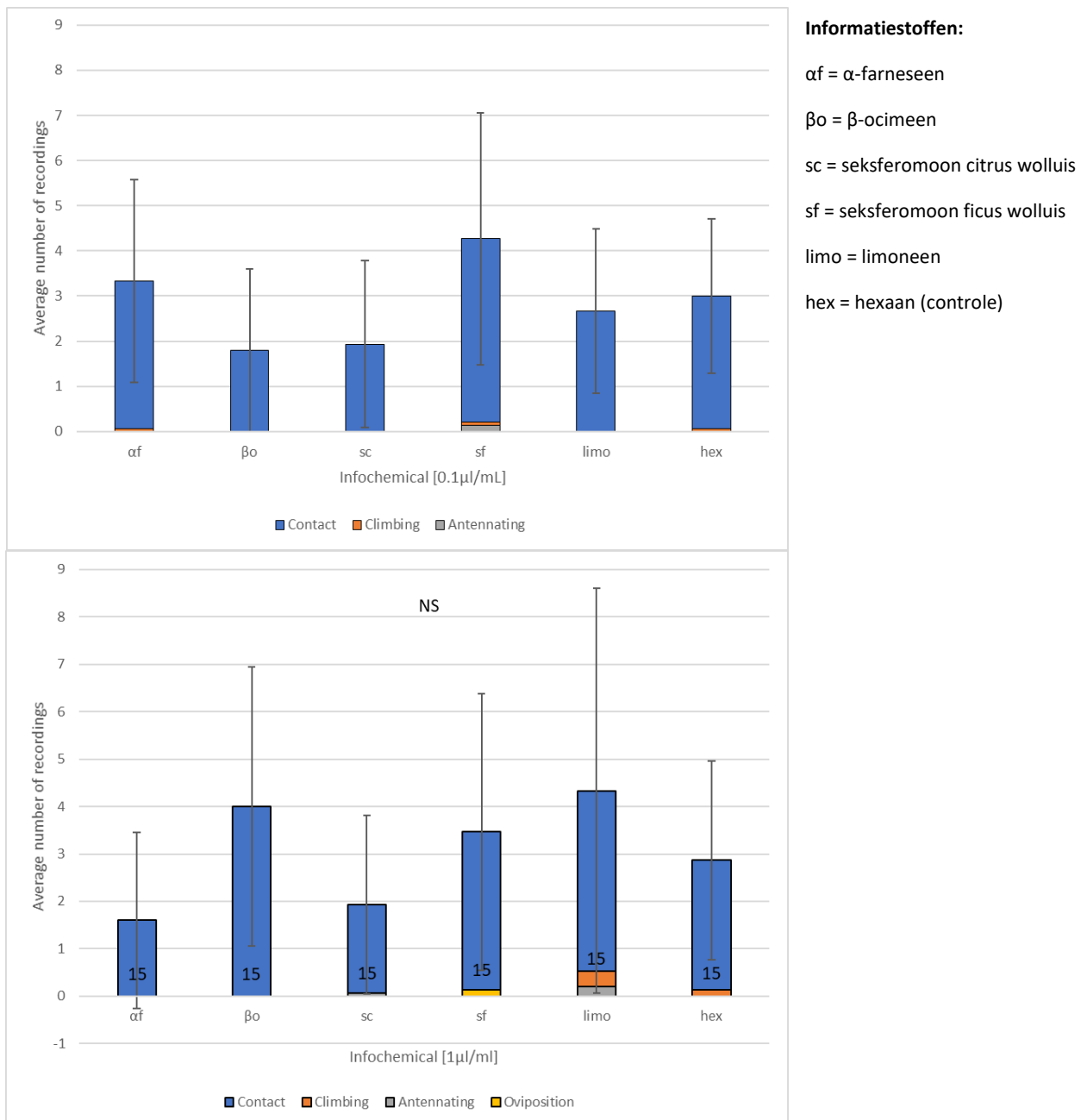
Olfactometers werden 180 graden gedraaid per twee rondes, en posities van olfactometers met naïeve versus getrainde wespen werden ook afgewisseld. Experimenten werden herhaald gedurende 5 experimentele dagen totdat N = 40 werd bereikt voor zowel limoneen als *P. ficus* feromoon. Het pipetteren van infochemicaliën op filtreerpapier voor training werd twee keer per dag gedaan, om de variatie in de tijd tussen behandeling en gebruik van het filtreerpapier te verminderen.

## Resultaten

### *Contact-experiment*

Wespen kwamen gemiddeld 1,6 tot 4,3 keer in contact met de siliconenblokjes met de verschillende informatiestoffen tijdens de observatieperiode van 5 minuten (Figuur 5.3). Wespen kwamen ongeveer 3 keer in contact met de controlesiliconenblokjes. Ten opzichte van de controles, was er relatief vaak contact tussen wespen en siliconenblokjes met *P. ficus* feromoon bij beide concentraties (gemiddeld 4,3 keer voor 0,1 µl/ml en 3,5 keer voor 1 µl/ml), voor α-farneseen bij 0,1 µl/ml (gemiddeld 3,3 keer) en voor β-ocimeen en limoneen bij 1 µl/ml (respectievelijk gemiddeld 4,0 en 4,3 keer), hoewel geen van deze informatiestoffen significant verschilde van de controle (Dunnett's test,  $P = 0,89 - 1$ ).

Wespen antenneerden en/of vertoonden ovipositiegedrag als reactie op *P. ficus*-seksferomoon (0,1 mg/ml en 1 mg/ml, Figuur 5.3), limoneen (1 mg/ml) en *P. citri*-seksferomoon (1 mg/ml). Er werd geen statistische analyse uitgevoerd voor deze gedragingen, ondanks dat ze betekenisvoller zijn in termen van aangeboren aantrekkingskracht dan het aantal contactmomenten, omdat ze bij slechts 1-2 wespen per informatiestof per concentratie werden waargenomen.



**Figuur 5.3.** Het gemiddelde aantal momenten (y-as) per wesp binnen een testperiode van vijf minuten voor verschillende gedragsreacties van *A. vladimiri* op siliconenblokjes behandeld met 5  $\mu$ l van een van de vijf informatiestoffen of een controle (Infochemical, x-as) bij een concentratie van 0,1 mg/ml (paneel boven) en 1 mg/ml (paneel onder). Afkortingen van de informatiestoffen zijn rechts van de panelen weergegeven. Foutbalken geven standaarddeviaties bij het gemiddeld aantal contactmomenten weer. Foutbalken voor de andere gedragingen zijn niet opgenomen, omdat deze gedragingen zelden werden waargenomen. Per combinatie werden 15 wespen getest.

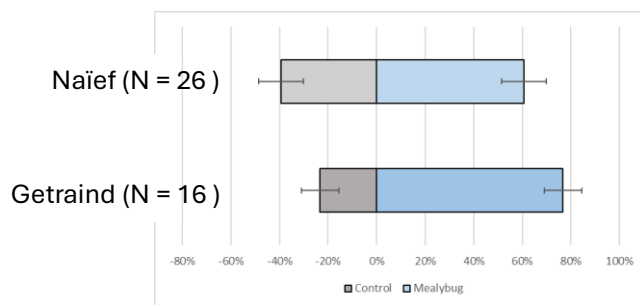
#### Tweekamer-olfactometer experiment

*A. vladimiri* sluipwespen die eerder waren blootgesteld aan het seksferomoon van *P. ficus* hadden een significante voorkeur voor de kamers met wolluis (binomiale test,  $P = 0,005$ , Figuur 5.4), net als *A. vladimiri* die eerder waren blootgesteld aan limoneen (binomiale test,  $P = 0,036$ , Figuur 5.4). De beide groepen naïeve sluipwespen hebben geen significante voorkeur voor de kamers met wolluis

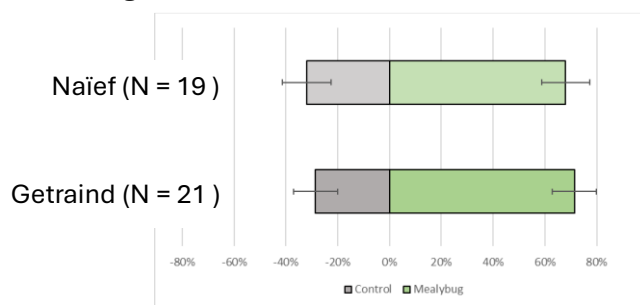
ten opzichte van de controle-kamer (binomiale tests,  $p > 0.05$ ). Wanneer de voorkeur van de getrainde wespen werd vergeleken met de naïeve wespen was er echter geen significant effect van training (GLM, *P. ficus* feromoon:  $P = 0,24$ ; limoneen:  $P = 0,65$ ).

In deze experimenten maakte 65-75% van de sluipwespen een keuze voor een van de twee kamers in de olfactometer.

#### A: Training met seksferomoon van *Pl. ficus*



#### B: Training met limoneen



*Figuur 5.4. Het percentage A. vladimiri sluipwespen (x-as) dat een keuze maakte voor de kamer met Pl. citri wolluis (blauw of groen) versus de controle-kamer (grijs). In het bovenste paneel werden naïeve (zonder eerdere ervaring met informatiestoffen) vergeleken met aan Pl. ficus feromoon blootgestelde wespen. In het onderste paneel werden naïeve sluipwespen vergeleken met aan limoneen blootgestelde sluipwespen. N vertegenwoordigt het totale aantal wespen dat een keuze maakte per behandeling. Foutbalken geven de standaardafwijking weer.*

### Conclusies

Van de vijf onderzochte informatiestoffen lijken het seksferomoon van *Pl. ficus* en limoneen potentieel het zoekgedrag van *A. vladimiri* sluipwespen te beïnvloeden hoewel er geen significant verschil was met de naïeve controle sluipwespen. De andere drie stoffen zouden ook potentie kunnen hebben maar werden niet in de tweekamer-olfactometer onderzocht.

De hoeveelheid seksferomoon die gebruikt werd voor de training van sluipwespen was in deze experimenten onnatuurlijk hoog: 20  $\mu\text{g}$ . De vervolggexperimenten die in het volgende hoofdstuk worden gepresenteerd, werden uitgevoerd met een meer realistische concentratie. Deze werd gebaseerd op geschatte hoeveelheden van 1-2 ng per wolluis per uur, afhankelijk van (tijdstip van de) dag, leeftijd, etc. (range 0,2 – 2,4 ng/wolluis) (Levi-Zada et al., 2014). Dat wil zeggen dat de gebruikte hoeveelheid in de hierboven beschreven experimenten een factor 1000 te hoog was.

## 6. Training (sensitisatie) van *A. vladimiri* met seksferomoon

### Inleiding

Vanwege de potentie van trainen met het seksferomoon van *Pl. ficus* (hoofdstuk 5) werd uitgebreider onderzoek gedaan naar de mogelijkheid om *A. vladimiri* met dit feromoon te trainen. Van dit seksferomoon is uit de literatuur bekend dat *A. vladimiri* ertoe aangetrokken wordt (Franco et al. 2008) en dat parasitering van wolluizen erdoor verhoogd is in aanwezigheid van het feromoon (Franco et al. 2011). In deze onderzoeken werd geen effect gevonden van het seksferomoon van *Pl. citri* hoewel dit wel een gastheer is van *A. vladimiri*.

Het doel van ons experiment was om vast te stellen of het gastheerzoekgedrag van *A. vladimiri* door middel van sensitisatie met *Pl. ficus* seksferomoon beïnvloed kan worden. Training met informatiestoffen van de gastheer heeft dat als voordeel dat de toepassing niet gewasspecifiek zou zijn en dus in meerdere gewassen gebruikt kan worden.

Sensitisatie treedt op na blootstelling aan een (biologisch relevante) stimulus, resulterend in de activering van een bepaalde "gedragsmodule" (bijv. voortplanting of eten). Sensitisatie resulteert niet alleen in een verhoogde respons op de informatiestof waarmee getraind wordt, maar ook op andere informatiestoffen. De verwachting was daarom dat sensitisatie met *Pl. ficus* seksferomoon leidt tot verhoogde aantrekking tot het feromoon maar ook tot verhoogde aantrekking tot wolluizen en tot wolluis-geïnfesteerde rozenplanten.

### Methoden

#### *Tweekamer-olfactometer experimenten*

Eerst werd met behulp van een tweekamer-olfactometer vastgesteld of naïeve *A. vladimiri* aangetrokken werden door drie verschillende lage concentraties van het seksferomoon. *Pl. ficus* seksferomoon werd door Pherobank geleverd in een concentratie van 1 mg/ml. Via een verdunningsreeks werd het tot een concentratie van respectievelijk 10 ng/ml, 0,1 ng/ml en 0,01 ng/ml in hexaan. Vervolgens werd 20 µl van deze oplossingen gepipetteerd op een achtste deel van een filtreerpapier (Whatman Grade 1, diameter 85 mm). Na enkele minuten uitdampen werden de filtreerpapierjes gevouwen zodat ze in de binnenkamer van de olfactometer pasten. De testhoeveelheden waren dus 0,2 ng, 0,002 ng en 0,0002 ng *Pl. ficus* seksferomoon. Als controle werd hexaan gebruikt.

In het tweede experiment werden *A. vladimiri* sluipwespen getraind met een lage concentraties van het *Pl. ficus* seksferomoon. De training vond plaats in 50 ml buizen met 1/8<sup>e</sup> deel van een filtreerpapier waarop het feromoon gepipetteerd was. De training duurde 30 minuten waarna de sluipwespen 30-60 minuten rusttijd hadden in een schone kooi voor de test. In de binnenkamers van de olfactometer werd respectievelijk 0,0002 ng *Pl. ficus* seksferomoon en hexaan als controle aangeboden. De verwachting was dat naïeve sluipwespen, die als controlegroep gebruikt werden, niet werden aangetrokken tot deze laagste concentratie.

In het derde experiment werden *A. vladimiri* sluipwespen getraind met 0,2 ng van het *Pl. ficus* seksferomoon. In de olfactometer kregen ze de keuze tussen een lege binnenkamer en een binnenkamer met vijf *Pl. citri* wolluizen. De keuze van getrainde sluipwespen werd vergeleken met naïeve sluipwespen.

De tweekamer-olfactometer experimenten werden uitgevoerd zoals in hoofdstuk 5 beschreven. De deksels van de olfactometers hadden echter in deze experimenten ventilatiegaten boven elke binnenkamer om ophoping van de geurstoffen in de olfactometer te voorkomen waardoor de sluipwespen mogelijk geen onderscheid tussen de kamers meer zouden kunnen maken (Figuur 6.1). Voor elke ronde tests werden nieuwe filtreerpapierjes met feromoon gebruikt (een uitgebreid protocol van deze experimenten is door een student geschreven en beschikbaar op aanvraag, zie bijlage I).



*Figuur 6.1. aanpassing van de tweekamer-olfactometer met ventilatiegaten boven elke kamer om verzadiging van de olfactometer met de testgeuren te voorkomen.*

#### *Kleine kooiproef*

Opklapbare insectenkooien werden gebruikt in deze proef (60 × 60 × 90 cm, 96 × 26 polyester gaas, maaswijdte: 680 μm). De kooien werden plat neergelegd. Elke kooi bevat acht potrozenplanten (potdiameter 10,5 cm), zonder bloemen die in een grote bak waren geplaatst (Figuur 6.2). Om sluipwespen aan te trekken werd in elke kooi een kunstmatig besmette aardappel met spruiten met 20-30 derde nymf stadium tot volwassen wolluizen aangeboden. Deze aardappel werd in een kleine plastic bak zonder deksel op de grond geplaatst naast een rozenplant. Een op maat geknipte gele plakval werd horizontaal op het bakje geplaatst. Alle sluipwespen die het bakje in wilden om de wolluis te bereiken, werden zo gevangen op de gele plakval. Alle sluipwespen op de val en in het bakje werden geteld 1, 3, 5, 21 en 24 uur na het loslaten van de sluipwespen.

Sluipwespen werden getraind met 0,2 ng *Pl. ficus* seksferomoon per groepje van 12-15 in een 50 ml buis met een filtreerpapierje zoals boven beschreven. Sluipwespen werden gedurende 30 of 5 minuten getraind. Elke groep werd vergeleken met een naïeve controle groep van sluipwespen. Na een korte rustperiode (ongeveer 30 minuten) in een insectenkooi werden de sluipwespen per groepje van 6 in een plastic buisje verzameld en losgelaten per kooi zo ver mogelijk van de met wolluis besmette aardappel vandaan. Achttien kooien werden tegelijkertijd gebruikt waarbij in de helft van de kooien getrainde en in de andere helft naïeve sluipwespen werden losgelaten. Trainingstijden van 5 en 30 minuten werden in een aparte serie getest met respectievelijk 48 en 45 herhalingen.

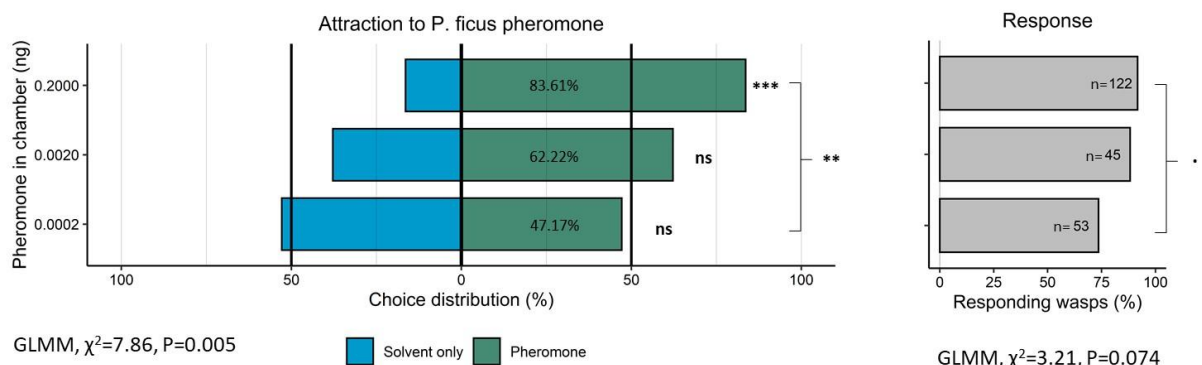


Figuur 6.2. Opstelling van de kleine kooien in de kas (links) met 6 kooien op elk van drie lange tafels. In elke kooi stonden 8 rozenplanten en een plastic bakje met een wolluis-besmette aardappel. Bovenop dit bakje werd een plakval geplaatst om sluipwespen te vangen. Deze werden na 1, 3, 5, 21 en 24 uur geteld. Per kooi werden 6 getrainde of naïeve sluipwespen losgelaten vanuit een buisje dat zover mogelijk van het bakje met aardappel vandaan geplaatst werd.

## Resultaten

### Tweekamer-olfactometer experimenten

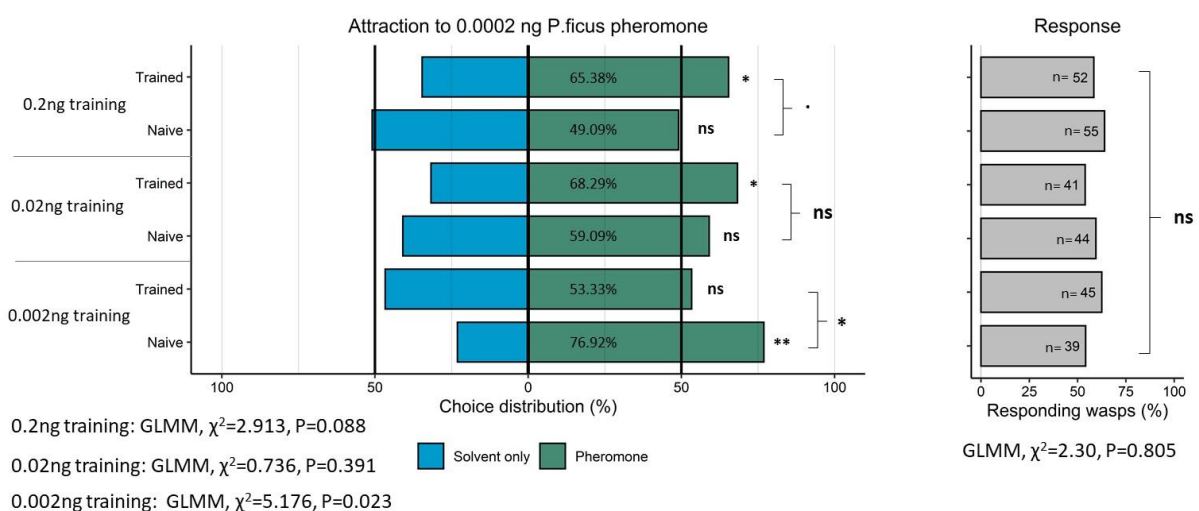
Naïeve *A. vladimiri* sluipwespen werden aangetrokken tot een lage concentratie van 0,2 ng van het *Pl. ficus* seksferomoon (Figuur 6.3). Lagere concentraties van 0,002 en 0,0002 ng waren niet aantrekkelijk. De concentratie had een significant effect op de keuze van de sluipwespen. Het percentage sluipwespen dat een keuze maakt tussen de twee kamers in de olfactometer nam toe naarmate de concentratie van het feromoon hoger werd, hoewel dit effect niet significant was.



Figuur 6.3. Reactie van *A. vladimiri* op verschillende concentraties *Pl. ficus* seksferomoon in een tweekamer-olfactometer experiment. Het linker paneel laat de keuze van de sluipwespen zien (blauw: controle; groen: feromoon). Het rechter paneel laat het percentage en het aantal (n) sluipwespen zien

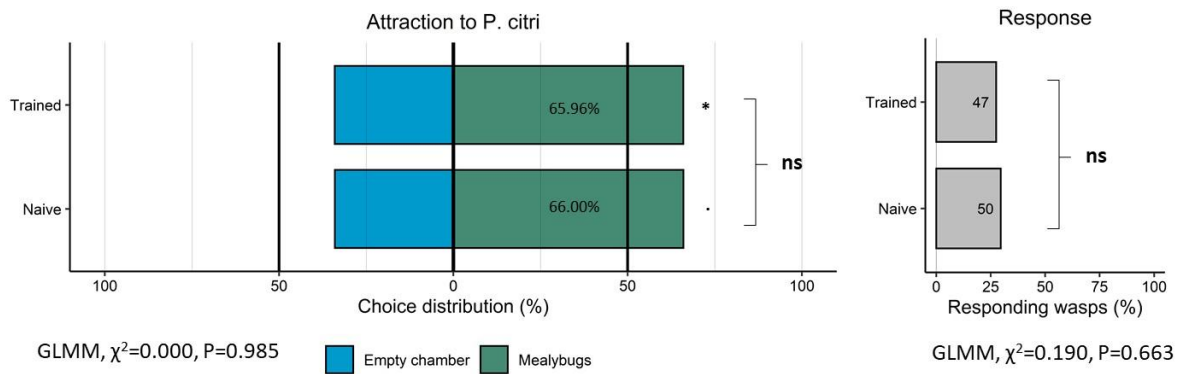
dat een keuze maakte voor een van de binnenkamers per concentratie (bij de hoogste concentratie werd het experiment op meer dagen herhaald). Per concentratie werd met een binomiaal toets vastgesteld of sluipwespen aangetrokken waren tot het feromoon; de aantrekking en respons tot verschillende concentraties werd vergeleken met een generalized linear mixed model (GLMM; ns  $P > 0,05$ ; .  $P < 0,1$ ; \*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ ; \*\*\*  $P < 0,001$ ).

Wanneer sluipwespen 30 minuten getraind werden met 0,2 ng of 0,02 ng *Pl. ficus* seksferomoon waren ze significant aangetrokken tot het feromoon bij een zeer lage concentratie (0,0002 ng) terwijl de naïeve sluipwespen niet werden aangetrokken (Figuur 6.4). De training met 0,2 ng seksferomoon had een bijna significant effect ( $P = 0,088$ ) terwijl het effect bij 0,02 ng niet significant was. Verrassend was dat de naïeve controle sluipwespen significant aangetrokken waren tot de zeer lage concentratie seksferomoon in het experiment waarbij met de laagste concentratie van 0,002 ng seksferomoon getraind werd. De aantrekking van de naïeve sluipwespen was in dit experiment significant verschillend van de getrainde sluipwespen die geen onderscheid maakten tussen de twee binnenkamers. Training met verschillende concentraties van het feromoon had geen effect op het percentage sluipwespen dat een keuze maakte voor een van de kamers in de olfactometer (Figuur 6.4).



**Figuur 6.4.** Reactie van *A. vladimiri* op *Pl. ficus* seksferomoon in de tweekamer-olfactometer na training met verschillende concentraties van het feromoon. Elke groep getrainde sluipwespen werd vergeleken met een controle groep van naïeve (ongetrainde) sluipwespen. Voor verdere uitleg zie figuur 6.3.

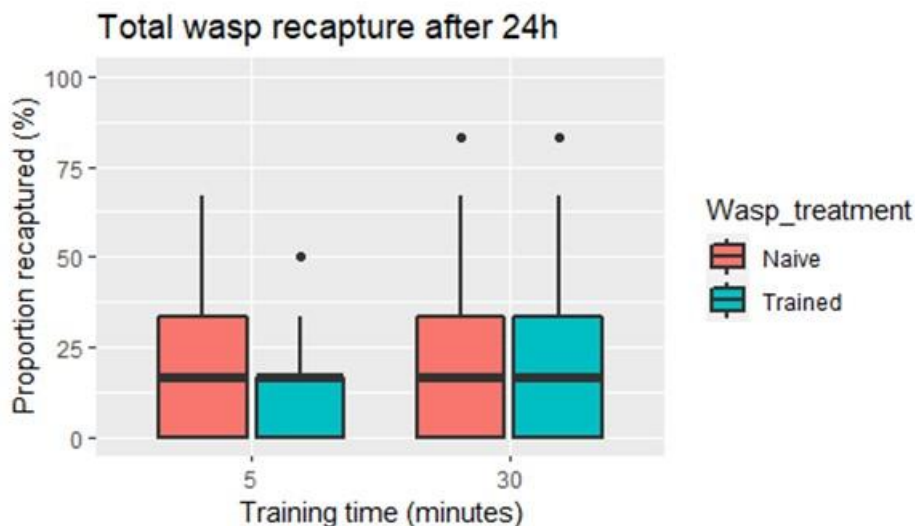
Sluipwespen die gedurende 30 minuten getraind waren met 0,2 ng van het *Pl. ficus* seksferomoon waren significant aangetrokken tot *Pl. citri* wolluizen in de tweekamer-olfactometer (Figuur 6.5). Deze aantrekking verschilde echter niet van die van naïeve controle sluipwespen. Het percentage sluipwespen dat een keuze maakte was laag in dit experiment (ongeveer 30%) maar verschilde niet onder invloed van training.



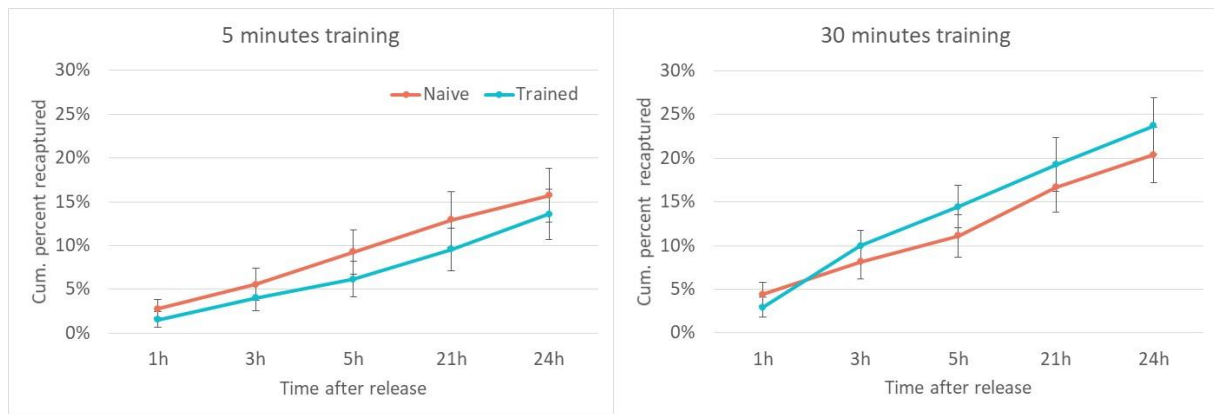
*Figuur 6.5. Effect van training met het seksferomoon op de reactie van A. vladimiri op vijf Pl. citri wolluizen in de tweekamer-olfactometer. Getrainde sluipwespen werden vergeleken met een controle groep van naïeve (ongetrainde) sluipwespen. Voor verdere uitleg zie figuur 6.3.*

#### *Kleine koopproef*

In de kleine koopproef werd geen effect gevonden van training met *Pl. ficus* seksferomoon voor 5 of 30 minuten op de aantrekking van *A. vladimiri* tot een aardappel besmet met *Pl. citri* wolluizen (Figuur 6.6). Training had ook geen effect op de snelheid waarmee *A. vladimiri* de wolluizen vonden (Figuur 6.7). Gemiddeld werd slechts 13 tot 24 % van de sluipwespen teruggevangen na 24 h in de kleine koopproeven.



*Figuur 6.6. Effect van training met Pl. ficus seksferomoon op aantrekking van A. vladimiri sluipwespen tot de met wolluis-besmette aardappel in de kleine koopproeven. Sluipwespen werden getraind met 0,2 ng seksferomoon voor 5 of 30 minuten en hun gedrag werd vergeleken met dat van naïeve sluipwespen. N = 48 voor de trainingstijd van 5 minuten; N = 45 voor de trainingstijd van 30 minuten. Figuur geeft een boxplot weer van het cumulatief percentage teruggevangen sluipwespen 24 uur na loslaten.*



Figuur 6.7. Effect van training met *Pl. ficus* seksferomoon op aantrekking van *A. vladimiri* sluipwespen tot de met wolluis-besmette aardappel in de kleine kooiproeven. Sluipwespen werden 1, 3, 5, 21 en 24 uur na loslaten geteld op de gele vangplaten en in het bakje met de aardappel.

## Conclusies

*Anagyrus vladimiri* sluipwespen worden aangetrokken tot *Pl. ficus* seksferomoon. Er is een licht positief effect van training (sensitisatie) met het seksferomoon op aantrekking tot dezelfde stof. Getrainde sluipwespen lijken het seksferomoon bij een lagere concentratie waar te kunnen nemen. Er was geen positief effect van training met het seksferomoon op aantrekking van de sluipwespen naar wolluizen in de tweekamer-olfactometer en ook niet in een kooiproef. Hierbij moet opgemerkt worden dat er tussen de olfactometer experimenten variatie was in de aantrekking van naïeve sluipwespen en dat er in de kooiproef geen positieve controle meegenomen was wat het aantonen van een effect van training bemoeilijkt. Hoewel de kleine kooiproef een aantrekkelijke set-up is om een flink aantal herhalingen uit te voeren concluderen we dat de set-up eigenlijk te klein is en werd besloten in vervollexperimenten grotere tenten te gebruiken.

Desondanks concluderen we dat uit deze experimenten blijkt dat training met alleen het *Pl. ficus* seksferomoon onvoldoende verbetering van het zoekgedrag van *A. vladimiri* geeft. Er moest dus gezocht worden naar aanvullende kandidaatstoffen en/of geurbronnen om de sluipwespen mee te trainen.

## 7. Tentproeven: sensitisatie met wolluis- en plantengeuren

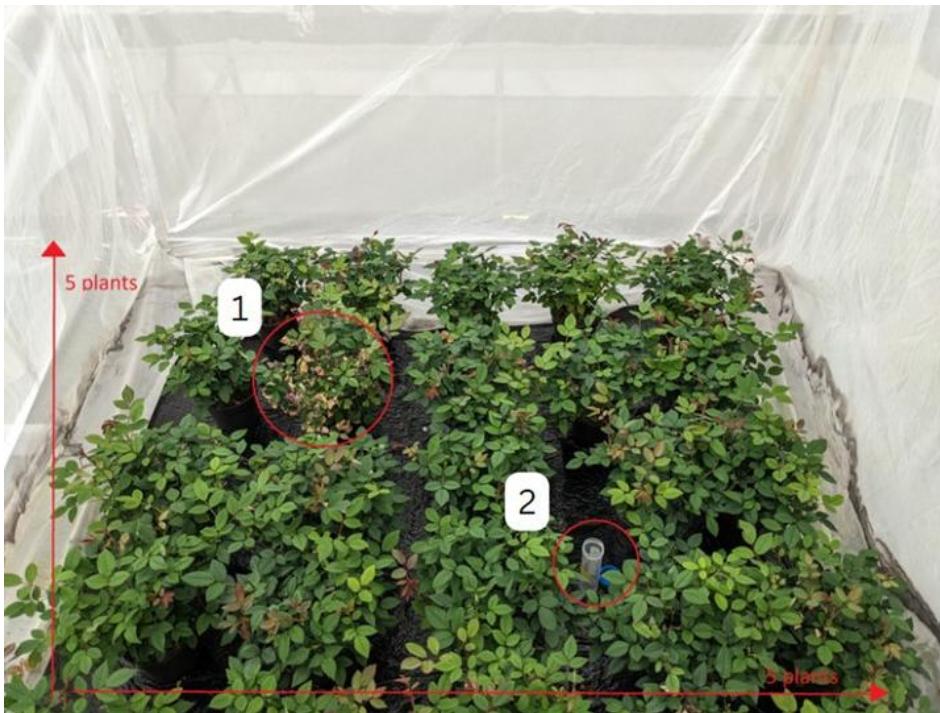
### Inleiding

Omdat training met reeds bekende informatiestoffen niet voldoende verbetering opleverde in het zoekgedrag van *A. vladimiri*, was de volgende stap in het onderzoek om vast te stellen welke geurbronnen verder onderzocht moesten worden. Het was al bekend uit het voorgaande Boost-project dat zowel de geur van met wolluis-besmette rozenplanten als de lichaamsgeur van wolluizen het gedrag van *A. vladimiri* kunnen beïnvloeden. Echter werd er in het Boost-project bij bijna alle experimenten gewerkt met een rustperiode van 24 uur na training. In deze periode kan associatief geheugen gevormd worden bij de sluipwespen waardoor een sterker effect op gedragsverandering verwacht mag worden. Deze wachtperiode van 24 uur is echter niet realistisch bij het ontwikkelen van een toepassing voor de praktijk. Een andere belangrijke stap was om te onderzoeken of contact met wolluis-besmette rozenplanten noodzakelijk is voor een positief effect op het zoekgedrag van *A. vladimiri*. Dit bepaalde namelijk *hoe* de geurboeketten van deze planten verzameld moesten worden in het volgende hoofdstuk.

De doelen van de experimenten in dit hoofdstuk waren daarom om te bepalen: (1) wat het effect van de wachttijd van 24 uur na training met plantengeuren is; (2) wat de relatieve bijdrage van plantengeuren t.o.v. wolluisgeuren is; en (3) wat het effect is van contact met wolluis-besmette rozenplanten. Tot slot werd ook onderzocht of het prototype loslaatsysteem ontwikkeld door Koppert, de "Pointer", gebruikt kon worden in een experimentele set-up. Dit werd onderzocht in grote tentproeven in de kas van het NIOO-KNAW.

### Methoden

Negen experimentele tenten (140 × 140 × 140 cm, nylon gaas, maaswijdte: 680 µm) werden verspreid over drie tafels in de kas. Per tent werden 25 niet bloeiende potrozenplanten geplaatst met tussenruimten van 20 cm. Een van de planten was geïnfesteerd met wolluizen (zie hoofdstuk 4), de andere 24 waren niet geïnfesteerd (Figuur 7.1). Per tent werden 16 getrainde of ongetrainde sluipwespen losgelaten uit een 50 ml buis die in diagonale richting vanaf de wolluis-geïnfesteerde plant werd geplaatst (Figuur 7.1). Na introductie van de sluipwespen werd de besmette plant gecontroleerd op de aanwezigheid van sluipwespen. Dit gebeurde 1, 2, 4 en 24 uur na de introductie van de parasiet. Voor elke telling werd de besmette plant uit de tent gehaald en in een pop-upkooi (40 × 40 × 60 cm) geplaatst. De sluipwespen die zich op de plant bevonden, werden opgezogen met een aspirator en geteld. De plant werd teruggeplaatst in de experimentele tent tot de volgende telling. Na de 24-uurs telling en de laatste observatie bleef de besmette plant nog 24 uur in de pop-upkooi gehouden om de volgende dag nogmaals te worden gecontroleerd op eventueel achtergebleven sluipwespen, deze werden opgeteld bij de sluipwespen die na 24 uur gevonden waren op de plant. Hierna werd de wolluis-geïnfesteerde plant weggegooid. De resterende planten werden gecontroleerd op wolluis. Indien aanwezig, werden ze vervangen door nieuwe planten. De planten in de tenten werden goed bewaterd en er werden plakvallen geplaatst om de sluipwespen te vangen die waren achtergebleven. Hiermee werd één cyclus van het kasexperiment voltooid. Een cyclus duurde een week en werd wekelijks herhaald. In elke tent werd een van de trainingsbehandelingen getest.



*Figuur 7.1. Opstelling van de rozenplanten in de tentproeven (boven). Per tent werden 25 rozenplanten geplaatst op 20 cm afstand van elkaar. De plant op positie 1 was geïnfesteerd met wolluizen. Sluipwespen (16 per tent) werden losgelaten uit een 50 ml buis op positie 2. In de kas werden 9 tenten op tafels opgesteld (onder).*

In het eerste experiment werden vier trainingsbehandelingen vergeleken:

- WL-Roos-24: Training gedurende 1 uur van een groep van 60 sluipwespen op een wolluis-besmette rozenplant in een pop-up kooi (40 × 40 × 60 cm, maaswijdte: 680 μm) (Figuur 7.2). Deze sluipwespen werden dus blootgesteld aan wolluislichaamsgeur en herbivoorgeïnduceerde plantengeuren en konden contact maken met plant en wolluizen. Er was ook de mogelijkheid dat ze een wolluis parasiteerden. Deze training werd daarom als positieve

controle beschouwd. Na een uur werden eerst de wespen die op de wand of bodem van de kooi zaten verwijderd met een zuigbuis en apart gezet omdat ze als niet getraind werden beschouwd. Wespen werden als getraind beschouwd als ze werden gevonden in of op de met wolluis besmette rozenplant. Na de training werden de sluipwespen voor 24 uur in een schone insectenkooi geplaatst met honing (W24.5 x D24.5 x H24.5 cm).

- WL-Roos-1: De training van sluipwespen was hetzelfde als die van WL-Roos-24 met het verschil dat de sluipwespen na training 1 uur in een schone insectenkooi geplaatst werden.
- WL-1: Training gedurende 1 uur van een groep van 60 sluipwespen in een kooi waarin een bakje (W18 x D13 x H6 cm) met 40-60 tweede en derde stadium wolluizen was geplaatst (Figuur 7.2). Hierna werden de sluipwespen gedurende 1 uur in een schone insectenkooi geplaatst.
- Naïef: Deze sluipwespen werden niet getraind maar verder behandeld zoals de andere sluipwespen. Deze behandeling werd als de negatieve controle beschouwd.



*Figuur 7.2. Opstelling voor de training van A. vladimiri wespen. Links een kooi met een wolluis-geïnfesteerde rozenplant (WL-Roos-24 en WL-Roos-1) en rechts een kooi waarin een bakje met wolluizen was geplaatst (WL-1).*

In het tweede experiment werden drie behandelingen vergeleken:

- WL-Roos-1: zie hierboven. In dit experiment werd deze training als de positieve controle beschouwd.
- Geur (WL-Roos-1): Bij deze training werd de wolluis geïnfesteerde rozenplant afgedekt met een nylon gaas (Figuur 7.3) om te voorkomen dat sluipwespen contact konden maken met de plant en de wolluizen. Er was in deze training dus geen beloning in de vorm van een ovipositie mogelijk. Sluipwespen werden als getraind beschouwd als ze werden gevonden op het nylon gaas.
- Naïef: zie hierboven.



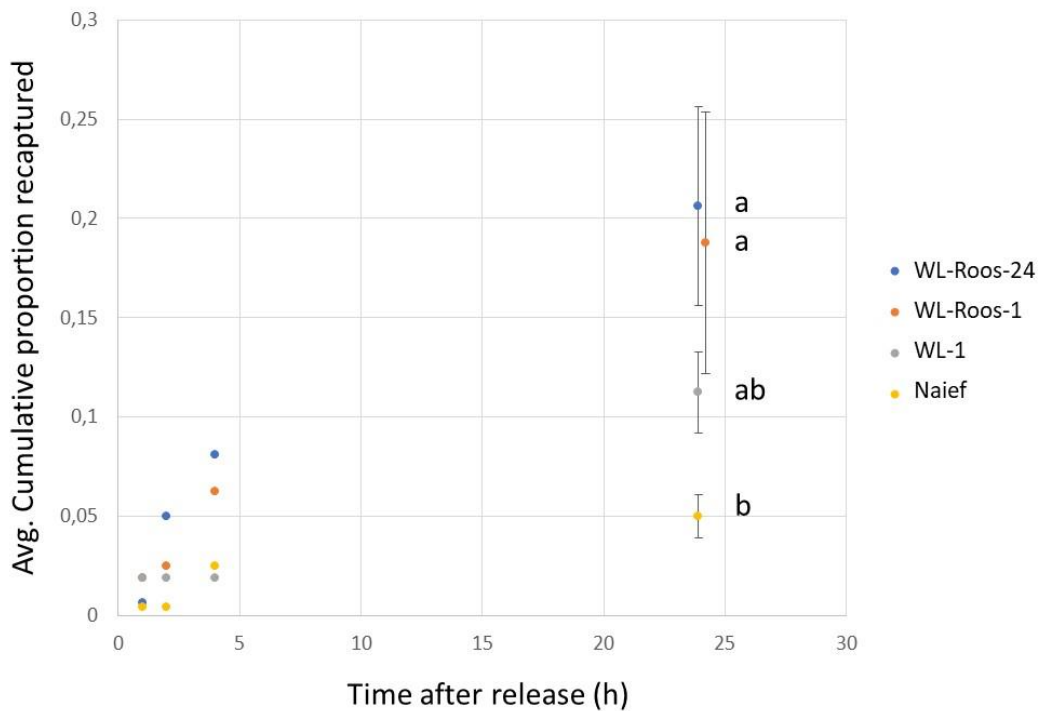
*Figuur 7.3. Opstelling voor de training van *A. vladimiri* wespen waarbij de sluipwespen geen contact konden maken met de wolluis geïnfesteerde rozenplant (Geur (WL-Roos-1)).*

In het derde experiment werd het prototype loslaatsysteem de “Pointer” getest, en het zoekgedrag van sluipwespen vergeleken met de positieve (WL-Roos-1) en negatieve (Naïef) controle zoals beschreven bij experiment 1. De Pointer is een prototype trainingsstation voor sluipwespen ontwikkeld door Koppert. De Pointer bestaat uit een kartonnen koker met een schaalte aan de onderkant waar mummies van sluipwespen in geplaatst worden. Wanneer de volwassen sluipwespen uitkomen lopen ze door een trainingsruimte naar de uitgang van de Pointer. In de trainingsruimte worden de sluipwespen aan informatiestoffen blootgesteld en kan suiker aangeboden worden. Omdat niet gepland kan worden wanneer mummies uitkomen werd in dit experiment met volwassen *A. vladimiri* gewerkt. Voordat de vrouwtjes in de Pointer geplaatst werden, werden enkele stengels van een wolluis-geïnfesteerde rozenplant afgeknipt en in de trainingsruimte gelegd. Na 1 uur training werden de vrouwtjes eruit gehaald en kregen ze een uur rust in een schone insectenkooi.

## Resultaten

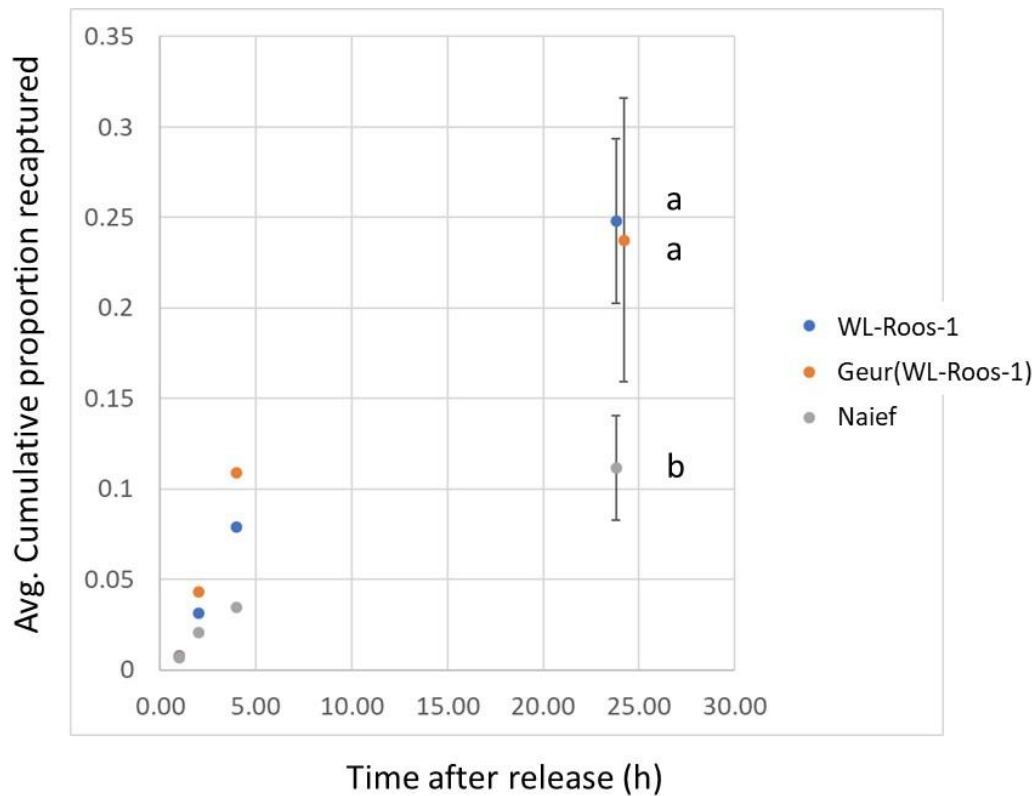
In de positieve controle werd na 24 uur ruim 20% van de losgelaten sluipwespen teruggevonden op de wolluis geïnfesteerde rozenplant. Dit percentage verschilde significant van de negatieve controle (naïeve sluipwespen) waarbij slechts 5% van de sluipwespen werd teruggevonden na 24 uur. Training met het volledige informatiepakket van een wolluis geïnfesteerde rozenplant heeft het verwachte positieve effect op het zoekgedrag van *A. vladimiri*. Verkorten van de wachtstap na training van 24 uur (WL-Roos-24) tot 1 uur (WL-Roos-1) had evenzo een significant positief effect op het percentage sluipwespen dat werd teruggevonden (Figuur 7.4). Het percentage sluipwespen dat op de wolluis-besmette plant werd teruggevonden na training met alleen de wolluis (WL-1) was met 12% hoger

dan dat van de negatieve controle en lager dan dat van de positieve controle (Figuur 7.4) maar verschilde niet significant van alle andere behandelingen.



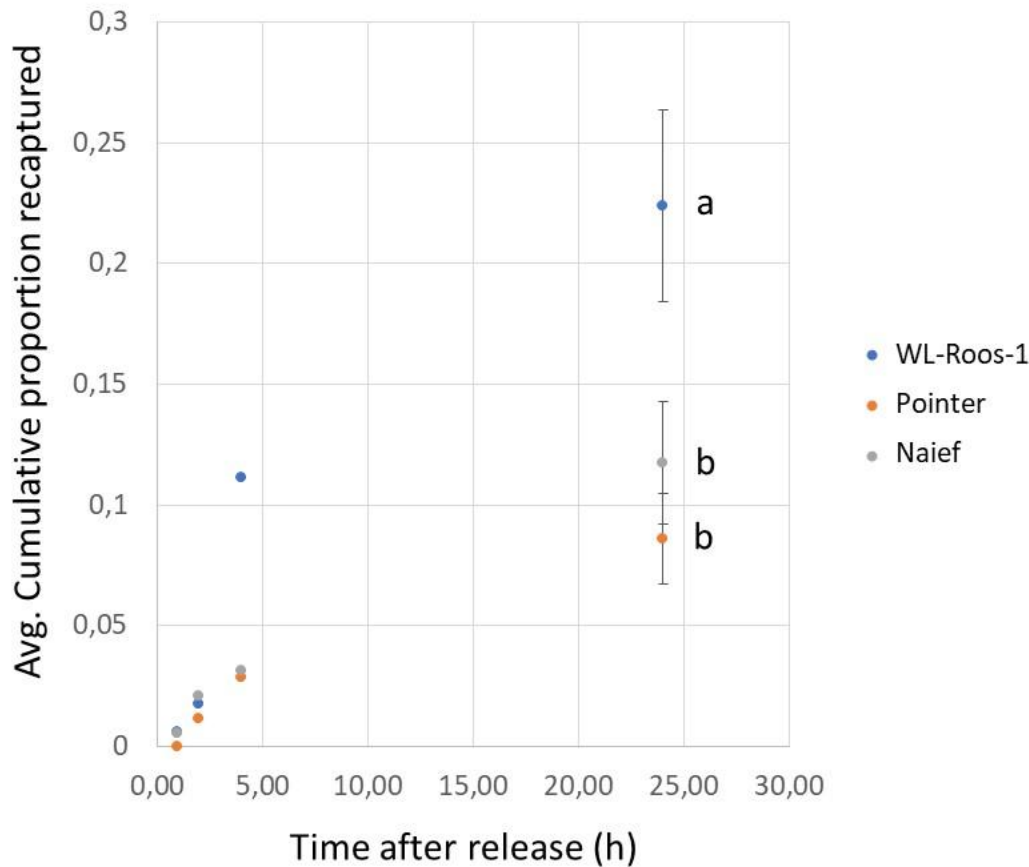
*Figuur 7.4. Effect van training op de fractie teruggevonden sluipwespen op de wolluis-geïnfesteerde rozenplant in een tentproef met 25 rozenplanten. Punten geven de gemiddelde cumulatieve fractie sluipwespen aan die teruggevonden werden op de wolluis-geïnfesteerde rozenplant over een periode van 24 uur na loslaten. Bij het 24-uurs tijdpunt geven foutbalken de standaardfout van het gemiddelde aan (N = 15 voor "Naïef"; N = 10 voor de overige trainingsbehandelingen) en verschillende letters (a, b) geven significante verschillen tussen de fracties sluipwespen aan (P < 0,05). Sluipwespen werden niet getraind (Naïef) of werden getraind op een wolluis-geïnfesteerde rozenplant (WL-Roos-24 en WL-Roos-1 voor respectievelijk 24 uur en 1 uur wachttijd na de training) of op wolluis zonder plant (WL-1).*

In het tweede experiment werd gemiddeld bijna 25% van de sluipwespen teruggevonden op de wolluis-besmette rozenplant in de tenten als ze getraind waren op een wolluis-geïnfesteerde rozenplant (positieve controle) maar ook als ze alleen de geur daarvan konden ruiken. Het zoekgedrag van getrainde sluipwespen van beide behandelingen was daarmee significant beter dan dat van de negatieve controle (Figuur 7.5).



Figuur 7.5. Effect van training op de fractie teruggevonden sluipwespen op de wolluis geïnfesteeerde rozenplant in een tentproef met 25 rozenplanten. Punten geven de gemiddelde cumulatieve fractie sluipwespen aan die teruggevonden werden op de wolluis-geïnfesteeerde rozenplant over een periode van 24 uur na loslaten. Bij het 24-uurs tijdpunt geven foutbalken de standaardfout van het gemiddelde aan ( $N = 8-9$ ) en verschillende letters (a, b) geven significante verschillen tussen de fracties sluipwespen aan ( $P < 0,05$ ). Sluipwespen werden niet getraind (Naief) of werden getraind op een wolluis-geïnfesteeerde rozenplant (WL-Roos-1) of op de geur van een wolluis-geïnfesteeerde rozenplant (Geur(WL-Roos-1)).

Tot slot zagen we dat training van volwassen *A. vladimiri* vrouwtjes in het prototype loslaatsysteem “Pointer” met wolluis-geïnfesteeerde roos niet leidde tot een hoger percentage sluipwespen dat na 24 uur de wolluis-besmette plant bereikte in de tentproef (Figuur 7.6).



Figuur 7.6. Effect van training op de proportie teruggevonden sluipwespen op de wolluis geïnfesteerde rozenplant in een tentproef met 25 rozenplanten. Punten geven de gemiddelde cumulatieve fractie sluipwespen aan die teruggevonden werden op de wolluis-geïnfesteerde rozenplant over een periode van 24 uur na loslaten. Bij het 24-uurs tijdpunt geven foutbalken de **standaard**fout van het gemiddelde aan ( $N = 11-12$ ), en verschillende letters (a, b) geven significante verschillen tussen de fracties sluipwespen aan ( $P < 0,05$ ). Sluipwespen werden niet getraind (Naïef) of werden getraind op een wolluis-geïnfesteerde rozenplant (WL-Roos-1) of met afgeknipte stukjes van een wolluis-geïnfesteerde rozenplant in het prototype loslaatsysteem Pointer (Pointer).

## Conclusies

De tentproeven leverden belangrijke conclusies op:

1. Training met het volledige informatiepakket van wolluis-geïnfesteerde rozenplant geeft een substantiële verbetering van het zoekgedrag van *A. vladimiri*: 2 tot 4 keer zoveel sluipwespen werden teruggevangen op de wolluis-geïnfesteerde rozenplanten t.o.v. naïeve sluipwespen. Dit effect werd gevonden zowel na 24 uur als na 1 uur wachttijd na de training. Dat wil zeggen dat een lange wachttijd niet nodig is om de training effectief te laten zijn.
2. Na training met alleen informatie van de wolluis werden ruim 2 keer zoveel sluipwespen teruggevangen maar deze verbetering van het zoekgedrag was niet significant t.o.v. naïeve sluipwespen.
3. Training met alleen de geuren van wolluis-geïnfesteerde rozenplanten geeft een net zo sterke verbetering van het zoekgedrag als training met het volledige informatiepakket: 2 keer

zoveel sluipwespen werden teruggevangen op de wolluis-geïnfesteeerde planten t.o.v. naïeve sluipwespen.

4. Het prototype loslaatsysteem "Pointer" is niet geschikt om volwassen sluipwespen in te trainen en zal pas weer gebruikt worden wanneer we kunnen starten vanuit het mummie-stadium, waar het systeem voor ontworpen is (zie hoofdstuk 9). Mogelijk is het plaatsen van de sluipwesp vrouwtjes in de Pointer dusdanig stressvol dat het een negatief effect op het zoekgedrag in de tentproef heeft.

De tentproeven uitgevoerd in dit hoofdstuk laten de potentie van verbetering van het zoekgedrag van *A. vladimiri* door training met informatiestoffen goed zien. In de verschillende proeven zagen we dat training met het volledige informatiepakket leidde tot ongeveer 2 tot 4 keer meer getrainde dan ongetrainde sluipwespen op de wolluis-besmette plant in de set-up na 24 uur.

## 8. Identificatie en selectie van kandidaatstoffen

### Inleiding

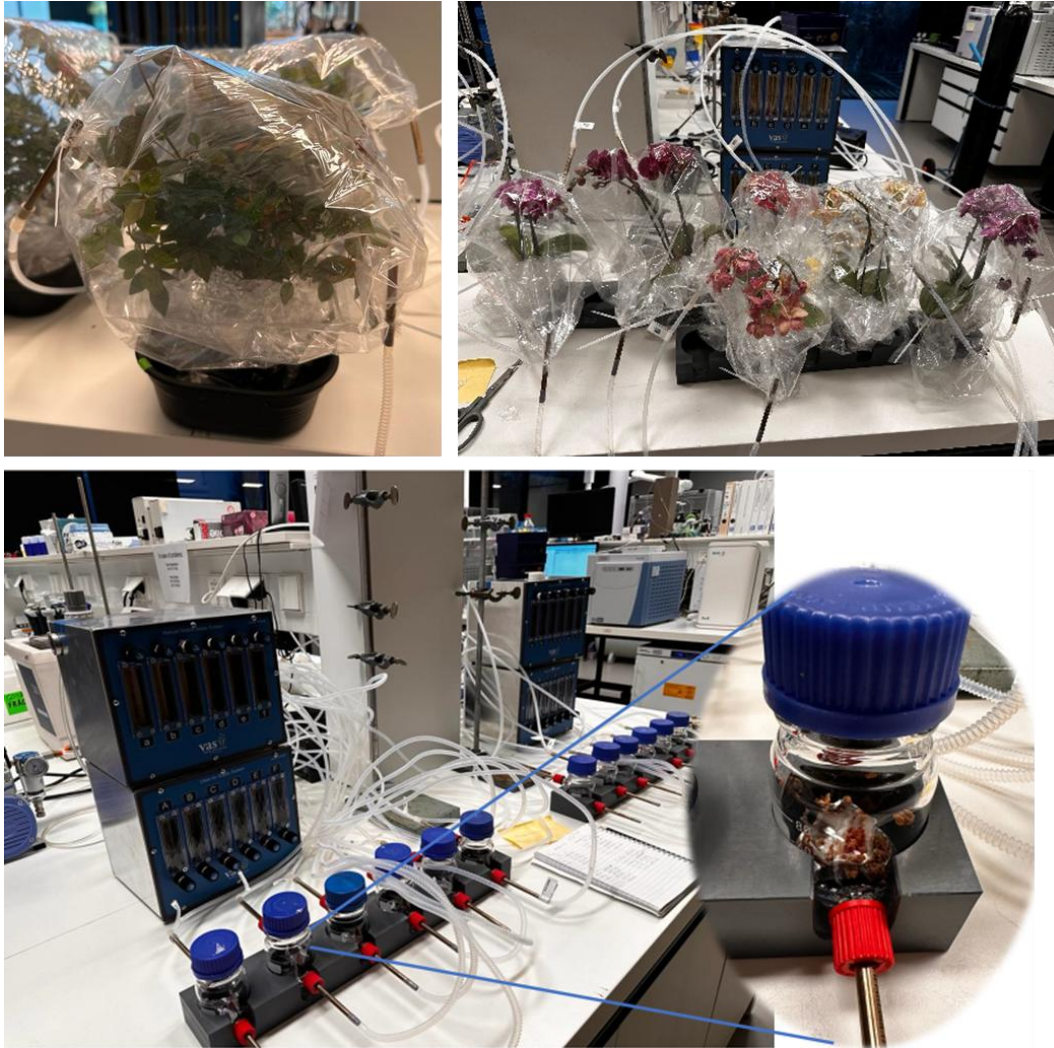
In hoofdstuk 5 en 6 werd vastgesteld dat training met uit de literatuur bekende informatiestoffen, waaronder seksferomonen van wolluizen, niet voldoende verbetering van het zoekgedrag van *A. vladimiri* opleverde. Daarna werd vastgesteld dat zowel plantengeuren als lichaamsgeur van wolluizen van belang zijn bij de training van de sluipwespen (hoofdstuk 7). In dit hoofdstuk was daarom het doel om kandidaat informatiestoffen voor training te genereren uit deze beide geurbronnen, dat wil zeggen *Pl. citri* wolluis en wolluis-besmette rozenplanten. Omdat orchidee het tweede gewas in dit project was, werd ook het geurprofiel van *Ps. longispinus*-geïnfesteerde orchideeënplanten verzameld.

### Methoden

#### *Algemene aanpak*

Voor elk van de drie geurbronnen werd het geurprofiel verzameld via zogenaamde headspace-verzameling. Dat wil zeggen dat de vluchtige organische verbindingen uit de lucht rondom de geurbron verzameld werden. Informatiestoffen die niet vluchtig zijn omdat ze bijvoorbeeld te zwaar zijn, worden hierbij dus niet verzameld. Voor alle geurbronnen werd Tenax® materiaal gebruikt om de informatiestoffen op te vangen. De Tenax-vallen (type TA 60/80, Markes International Ltd, Llantrisant, UK) werden eerst geconditioneerd met hoge temperatuur en stikstof.

Er werd een dynamisch luchtverzamelingsysteem gebruikt, waarbij met pompen een constante luchtstroom en gecontroleerde druk door de Tenax-vallen gepompt werd (VAS, <https://www.vassays.com/volatile-collection/portable>). De flowmeters die aan elk van de zes kanalen van dit systeem gekoppeld waren, werden ingesteld op 1 liter/minuut voor het verzamelen van plantengeuren. Voor het verzamelen van wolluisgeur was de luchtstroom lager (0,75 l/min) omdat de luchtruimte in die potten kleiner was (Figuur 8.1).



Figuur 8.1. Opstelling waarmee de geurstoffen verzameld werden. Planten werden in Teflon zakken gewikkeld (linksboven roos, rechtsboven orchidee). Wolluizen werden in glazen flesjes geplaatst voor het verzamelen van hun lichaamsgeur (onder). Met het systeem konden geurbronnen op 6 kanalen tegelijk verzameld worden (dit systeem is twee keer aanwezig op het NIOO, zie foto onder).

#### Geurbronnen

Wolluis: Voor de geurstoffen verzameling van wolluizen werd 0,5 g levende *Pl. citri* wolluis van verschillende ontwikkelingsstadia verzameld van de kweek op aardappels. De wolluizen werden in gesteriliseerde glazen potten van 150 ml geplaatst (Figuur 8.1). Deze glazen potten werden eerst gewassen met gedemineraliseerd water, vervolgens gespoeld met twee soorten oplosmiddelen, polair (aceton) en niet-polair (hexaan), en vervolgens 's nachts gedroogd in een oven op 120°C. Wolluis lichaamsgeur werd gedurende een periode van 24 uur verzameld. We voerden zes testverzamelingen uit. Vijf lege flessen dienden als controles.

Wolluis-geïnfesteerde rozenplant: Planten werden in Teflon-zakken gewikkeld voor de verzameling van geurstoffen. Deze Teflon-zakken werden eerst voor 24 uur in een oven van 120 °C gehouden om ze te steriliseren. In deze opstelling werd de grond bedekt met aluminiumfolie om de geurstoffen van de grond te minimaliseren voordat de Teflon-zak om de plant werd gewikkeld (Figuur 8.1). We hebben geurstoffen verzameld van 5 gezonde rozenplanten en 5 wolluis-geïnfesteerde planten. Na 2 uur werden alle Tenax-vallen vervangen en nieuwe Tenax-vallen werden aangesloten om geurstoffen

van dezelfde planten nog eens 6 uur te verzamelen (serie 2). Een maand later werden geurstoffen van een nieuwe serie wolluis-besmette rozenplanten verzameld met dezelfde methode. In de derde serie werden geurstoffen werden voor 24 uur verzameld. Door een technisch probleem met de TOF (zie hieronder) veranderden de retentietijd en de kolomlengte. Daarom konden de drie series niet worden gecombineerd voor statistische analyses.

Wolluis-geïnfesteerde potorchidee: Er werd twee keer geurstoffen verzameld van wolluis-besmette orchideeën planten. In de eerste serie hadden we kleine bloeiende planten (dwerg *Phalaenopsis* met een potdoorsnede van 6 cm) waarvan er 6 met wolluis besmet waren en 5 gezond. In de tweede serie hadden we grote *Phalaenopsis* planten (potdoorsnede 10 cm, variëteit Narbonne). De bloemstengels werden 4 weken voor de geurverzameling afgesneden om bloemgeuren uit te sluiten en een duidelijker beeld te krijgen van wolluis-geïnduceerde plantengeuren. Geurstoffen werden voor 24 uur verzameld. Tijdens de GC-QTOF-run had een van de Tenax-vallen een lek, waardoor er geen chromatografische pieken zichtbaar waren. We hadden daarom 4 controlemonsters en 5 monsters van wolluis-besmette planten.

#### *Analyse van geurprofielen*

De analyse-methoden staan uitgebreid beschreven in het chemierapport (Engelstalig, op aanvraag beschikbaar bij de projectleider J. de Boer) en zijn gebaseerd op eerdere publicaties (bijv. Gulati et al. 2020). Hier worden de belangrijke stappen in het kort uitgelegd. We gebruikten een GC-QTOF-systeem (Agilent 7890B GC en Agilent 7200AB QTOF, Santa Clara, CA, VS) met een DB-5MS-ultra-inerte kolom (30 m lang, 0,25 mm interne diameter, 0,25 µm filmdikte, Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, VS). De analyse werd uitgevoerd met een looptijd van 35,6 min en een constante stroom van 1,2 ml/min.

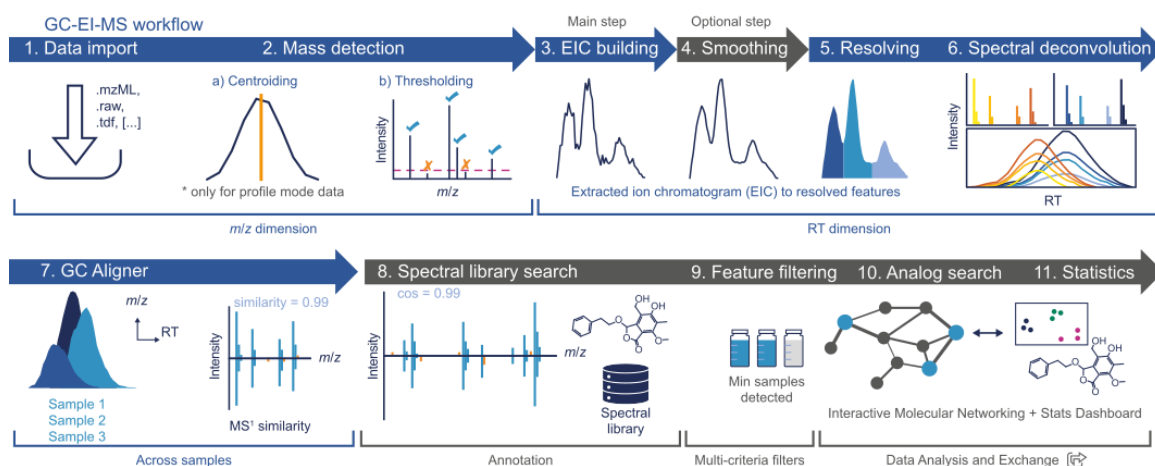
De geurstoffen werden van de Tenax-buizen afgehaald met behulp van een automatische thermische desorptie-eenheid (Unity TD-100, Markes International, Llantrisant, VK), met heliumgas (50 ml/min) bij 240 °C gedurende 8 min. De vrijgekomen geurstoffen werden gevangen met een koude val (-10 °C) en vervolgens opnieuw verwarmd (280 °C gedurende 5 min). Een gedeelte van de vluchtige stoffen werd overgebracht naar de GC-QTOF.

Het temperatuurprogramma van de GC-QTOF werd als volgt ingesteld: 39 °C gedurende 1 min, verhogen met 10 °C/min tot 315 °C, vasthouden bij 315 °C gedurende 7 min. Detectie met de GC-QTOF werd uitgevoerd in elektronenionisatie (EI)-modus (70 eV) met een brontemperatuur van 230°C. De massaspectra van de geurstoffen werden verkregen in full-scan-modus ( $m/z$  30–400, 4 scans/s, 2 GHz Extended Dynamic Range). De retentie-index (RI)-kalibratie werd uitgevoerd met behulp van een referentie-alkaanstandaardoplossing. Van deze oplossing werd 1 µL geïnjecteerd in een lege Tenax-val en gemeten onder identieke GC-QTOF-omstandigheden. Identificatie van de stoffen werd uitgevoerd met behulp van de NIOO-pijplijn voor GC-QTOF-gegevensanalyse, MassHunter-software, de NIST 20 bibliotheek (National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, VS) en een interne database.

#### *Verwerking van ruwe gegevens en analyse-stappen*

GC/Q-TOF ruwe data werden vertaald en geïmporteerd in MzMine v 3.9.0 (Pluskal et al., 2020, 2010) voor verdere analyse (Figuur 8.2). Een geautomatiseerd algoritme werd gebruikt om chromatogrammen op te bouwen, pieken en spectra te ontrafelen (deconvolueren) en uitlijningsstappen uit te voeren (Du et al., 2020). Deconvolutie is een stap om overlappende of co-

eluerende pieken te ontrafelen, d.w.z. wanneer twee of meer verbindingen tegelijkertijd worden gedetecteerd of bijna dezelfde retentietijden hebben.



**Figuur 8.2.** Schematisch overzicht van de workflow om complexe ruwe data van GC-Q-TOF te bewerken voor identificatie van geurstoffen en statistische analyse (bron: [mzmine documentation](#)). De stappen die in dit project genomen zijn, zijn uitgebreid verder toegelicht in het chemierapport dat op aanvraag beschikbaar is.

Nadat alle stappen waren uitgevoerd in MZMine, werd een piekintensiteitstabel gegenereerd met een lange lijst van alle gedetecteerde pieken in elk monster, met de retentietijd, prominente ionen en het piekoppervlak in elk monster. De resulterende tabel werd handmatig aangepast om verbindingen uit te sluiten die niet relevant zijn voor ons onderzoek, zoals bekende verontreinigingen uit de luchtinlaat of van de GC-kolom. Deze tabel wordt gebruikt voor statistische analyses zoals *Principal component analysis* (PCA), clustering en dergelijke.

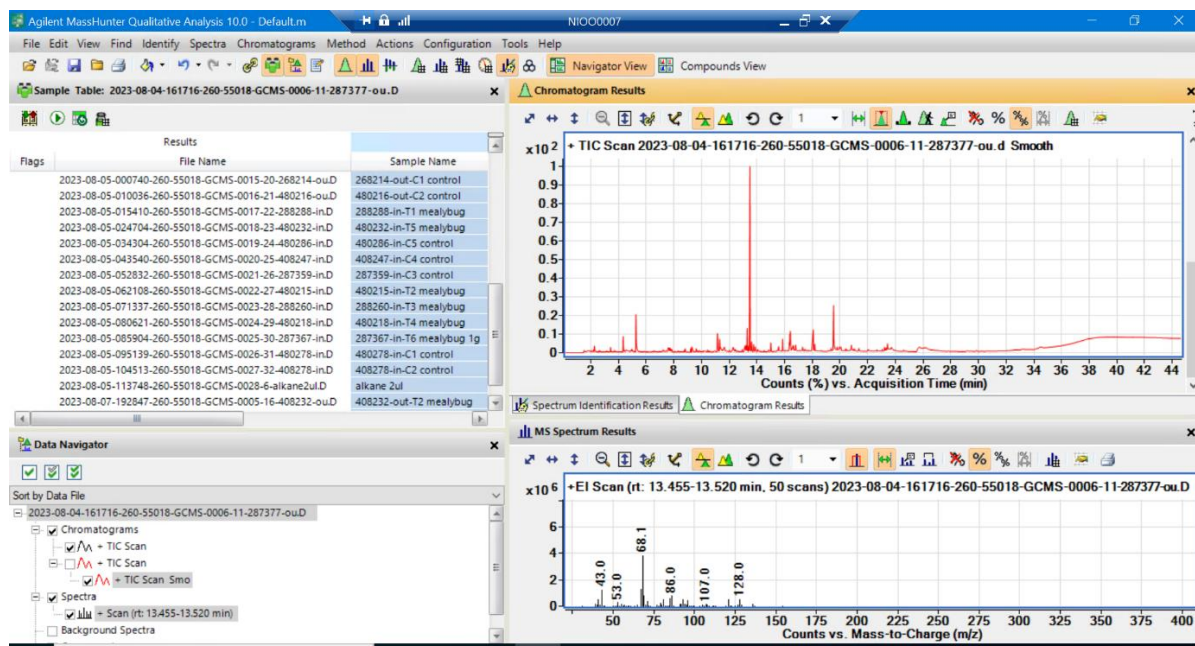
Alle gegevens werden eerst geanalyseerd in MetaboAnalyst V6.0 waaronder normalisatie (Pareto-scaling: een gemiddelde van nul en een variantie die evenredig is met de wortel van de standaarddeviatie) en logaritmische ( $\log_{10}$ ) transformatie (Pang et al., 2021). Getransformeerde gegevens werden geëxporteerd en de statistische significantie van verbindingen werd getest in R Studio. Intensiteit van pieken werden getest met een one-way-ANOVA voor verschillen tussen behandelingen (post-hoc analyse werd uitgevoerd met de Tukey-HSD-test). Voor vergelijkingen tussen twee groepen werd een t-test gebruikt als de gegevens voldeden aan parametrische aannames. In gevallen waarin de gegevens niet aan deze aannames voldeden, werd een Wilcoxon-rangsomtest (een niet-parametrisch alternatief) gebruikt.

### Annotatie van geurstoffen

Pieken werden geselecteerd voor kwalitatieve analyse (annotatie) wanneer ze aanwezig waren in ten minste drie van de vijf replicaties en als ze afwezig waren in de Tenax-vallen die in de inlaten waren gemonteerd, om ervoor te zorgen dat de verbindingen alleen door de geurbronnen zelf worden uitgestoten en niet in de lucht van het laboratorium aanwezig zijn. Identificatie van pieken werd uitgevoerd met behulp van Mass Hunter (Figuur 8.3) door retentie-index (RI) en massaspectrum te vergelijken met de NIST 2020 V2.20 (National Institute of Standards and Technology, Verenigde Staten), die bestaat uit meer dan 300,000 spectra die meer dan 300,000 unieke verbindingen

vertegenwoordigen. Verbindingen met een RI-verschil groter dan 10 indexeenheden werden niet overwogen (Babushok et al., 2011). Bovendien was de identificatie van de verbinding gebaseerd op de metabolietidentificatiecategorieën beschreven door Sumner et al. (2007): Kort gezegd, we hebben een verbindingsnaam toegewezen wanneer deze overeenkwam met het massaspectrum en de retentie-index (RI) van de NIST-bibliotheek, anders beschreven we deze als "onbekend" en wordt de piek niet opgenomen in de resultatensectie.

Verbindingen die in sommige monsters aanwezig zijn maar onder de ingestelde parameterdrempels liggen, worden mogelijk niet gedetecteerd. Daarom was het cruciaal om chromatogrammen handmatig naast elkaar te leggen en visueel te inspecteren - een tijdrovende maar essentiële stap in de metabolische analyse in dit project.

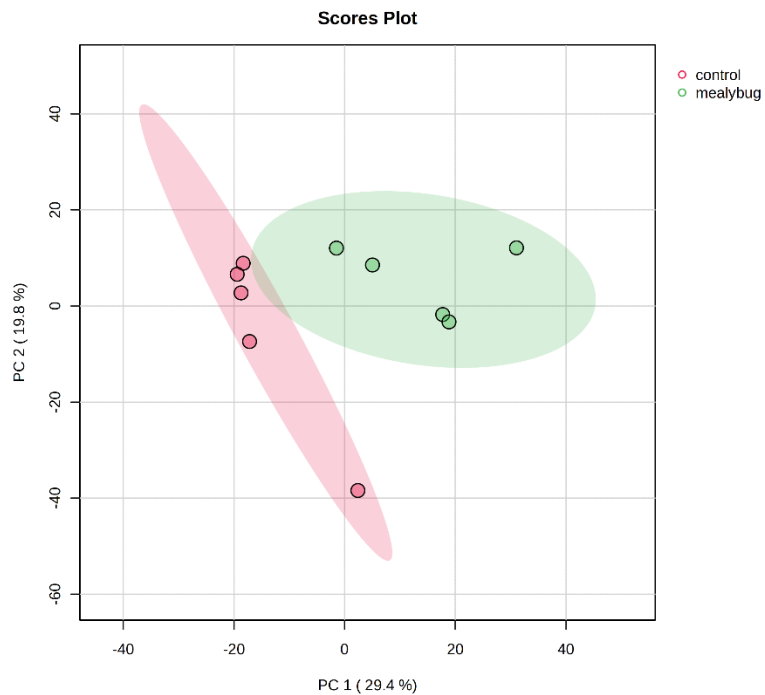


Figuur 8.3. Weergave in Mass Hunter van een van de geurmonsters van wolluis (screenshot van Mass Hunter, Qualitative Analysis v10 en v.8, Agilent Technologies Inc.). Rechtsboven zijn de pieken van het chromatogram te zien met op de X-as de retentietijd (RT, tijd die de stof nodig heeft om door de kolom te bewegen) en op de Y-as de intensiteit (een weergave van de hoeveelheid van de stof). Omdat de retentietijd afhangt van het systeem wordt deze omgezet in de retentie-index (RI), die systeemonafhankelijk is en kan worden vergeleken met online of interne chemische bibliotheken tijdens de identificatie van verbindingen. De RI van een verbinding werd berekend met behulp van de retentietijden van de verbinding en de n-alkanen (bijv. C8, C9, C10, enz.) die onder dezelfde chromatografische omstandigheden werden gerund. In dit onderzoek is gebruik gemaakt van de Kovats-retentie-index voor isotherme omstandigheden. Rechtsonder is het massaspectrum van een van de pieken te zien, met op de X-as de massa-tot-ladingverhouding ( $m/z$ ) van ionen die zijn gedetecteerd in een massaspectrometer, en op de Y-as de intensiteit van elk ion. Bij massaspectrometrie vindt ionisatie plaats waardoor ionen gescheiden kunnen worden op basis van hun  $m/z$ -waarde. Omdat  $z$  bijna altijd 1 is bij GC/Q-TOF, wordt de  $m/z$ -waarde vaak beschouwd als de massa. Massakenmerken verwijzen naar de afzonderlijke pieken of ionsignalen die in een massaspectrum worden waargenomen en omvatten de  $m/z$ -waarde van gedetecteerde ionen, samen met hun relatieve intensiteit, isotopische patronen en fragmentatiegedrag.

## Resultaten

### Wolluis

In de monsters van wolluis-lichaamsgeur werden honderden pieken gedetecteerd. Na bewerking in MZMine werden er zelfs 576 geteld. In figuur 8.4 is te zien dat de geurstofprofielen van de wolluis-monsters duidelijk verschillen van de controle-monsters (schone lucht).



*Figuur 8.4. PCA-plot van de geurmonsters van wolluis (*Pl. citri*, groen,  $N = 5$ ) in vergelijking met lege flesjes (rood,  $N = 5$ ). De PCA-plots zijn gebaseerd op de tabellen met piekintensiteit (oppervlakte) van gefilterde massakenmerken verkregen met MetaboAnalyst v 5.0 (Pang et al., 2021).*

Statistische analyse liet vervolgens zien dat 110 pieken significant meer aanwezig waren in de wolluislichaamsgeur ( $P = 0,05$ , t-test en Wilcoxon rank sum test). Deze 110 pieken werden geannoteerd. Tabel 8.1 laat 16 van de 31 pieken zien die met voldoende zekerheid geannoteerd konden worden en bij een striktere statistische grens verhoogd aanwezig waren in de lichaamsgeur van wolluis ( $P = 0,01$ ). De overige pieken konden niet geannoteerd worden en blijven dus onbekend.

Tabel 8.1. Geurstoffen die consistent en significant verhoogd voorkomen in lichaamsgeur van de wolluis *Pl. citri*. Van links naar rechts geven de kolommen: het nummer van de piek (uit MZmine analyse<sup>#</sup>); het dominante mz-getal van de piek; de retentietijd (RT); de retentie-index (Kovats RI); de naam van de geurstof; de RI uit de NIST-bibliotheek; en het CAS-nummer van de stof.

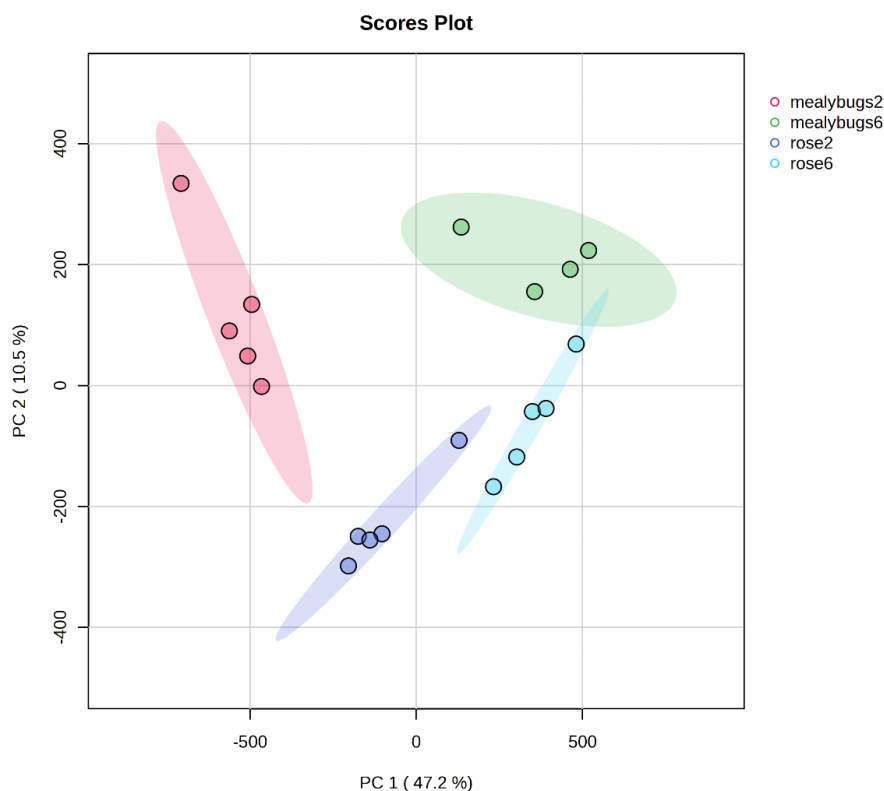
Significant Compounds	Mz	RT	RI	Best Match	RI NIST	CAS
224	57.0000mz	9.85min	1114,4	nonanal	1102	124-19-6
38	67.0000mz	3.72min	779,48	Benzene, methyl-	784	108-88-3
127	120.0000mz	7.17min	978,32	Benzaldehyde	982	100-52-7
491	177.0000mz	16.42min	1486	1-Pentadecene	1492	13360-61-7
468	109.0000mz	15.52min	1450,6	TRANS- $\alpha$ -BERGAMOTENE	1438	13474-59-4
233	123.0000mz	10.17min	1130,9	4-Acetyl-1-methylcyclohexene	1137	1-9-6090
659	104.9000mz	23.60min	2000,8	Phthalic acid, isobutyl 2-methylpent-3-yl ester	2003	nist 356907
173	121.0000mz	8.47min	1044	1-Hexanol, 2-ethyl-	1028	104-76-7
357	82.0000mz	12.89min	1277	2,6-Dimethyl-1,6-heptadien-4-ol acetate	1264	70187-91-6
524	125.0000mz	17.20min	1535,8	5,7-Dimethyl-1,3-adamantanediol	1523	10347-01-0
72	80.0000mz	4.97min	861,04	1H-Pyrrole, 2-methyl-	850	636-41-9
404	206.9000mz	13.78min	1327,3	Geranyl acetate	1331	105-87-3
302	57.0000mz	11.75min	1214,5	Decanal	1209	112-31-2
558	149.0000mz	18.60min	1628,5	1,2-Benzenedicarboxylic acid, diethyl ester	1639	84-66-2
130	125.9000mz	7.28min	983,89	Dimethyl trisulfide	977	3658-80-8
5	43.0000mz	2.10min	624,9	Hexane	618	110-54-3

<sup>#</sup> Het is belangrijk om te vermelden dat MZmine meer pieken registreert dan er stoffen in een geurmonster zitten. Dat komt doordat het algoritme onderscheid maakt op basis van massakenmerken waaronder de m/z-waarde van (dominante) ionen. In deze tabel zijn de dubbele pieken verwijderd en worden alleen een unieke geurstoffen vermeld.

Naast deze statistische analyses werden chromatogrammen handmatig beoordeeld. Prominente pieken die hierbij opvielen waren: 1H-indool (RT 13.85, CAS 110-54-3), (R)-( $\pm$ )-lavandulylacetaat (RT 13.445, CAS 20777-39-3), geraniol (RT 13.225, CAS 624-15-7); nerolidol (RT 16.23, CAS 40716-66-3). Enkele andere pieken die ook te zien waren in tenminste 3 van de monsters zijn:  $\gamma$ -Terpinyl acetate (RT 13.612, CAS 10235-63-9), tridecane (RT 8.76, CAS 629-50-5), trans-2-decenoic acid (RT 15.67, CAS 334-49-6), n-Decanoic acid (RT 14.84, CAS 334-48-5), (E)-2-Octenoic acid (RT 12.26, CAS 1871-67-6), Dodecanoic acid (Laurinezuur, RT 18.043, CAS 143-07-7).

#### Roos met wolluis

Geurmonsters van rozenplanten werden verzameld over een periode van 2 en 6 uur. De geurprofielen van rozenplanten met en zonder wolluizen waren duidelijk verschillend en er waren ook verschillen tussen de monsters die gedurende 2 of 6 uur verzameld werden (Figuur 8.5).



*Figuur 8.5. PCA-plot van de geurmonsters van wolluis-besmette rozenplanten (rood 2 uur, groen 6 uur, N = 5) in vergelijking met onbesmette rozenplanten (donkerblauw 2 uur, lichtblauw 6 uur, N = 5). De PCA-plots zijn gebaseerd op de tabellen met piekintensiteit (oppervlakte) van gefilterde massakenmerken verkregen met MetaboAnalyst v 5.0 (Pang et al., 2021).*

De gegevens van deze datasets werden gecombineerd voor de statistische vergelijking en annotatie van geurstoffen om een duidelijker beeld te krijgen. In totaal werden na normalisatie 324 verschillende pieken gedetecteerd in de geurmonsters van wolluis-besmette rozenplanten. Statistische analyse liet zien dat 184 van deze pieken significant verschillend waren (meer of minder aanwezig) in wolluis-besmette rozenplanten in vergelijking met onbesmette planten bij een P-waarde van 0,05 (posthoc Tukey-toets). Van de 99 pieken die bij een striktere P-waarde van 0,01 significant verschillend waren, werden 49 unieke geurstoffen geannoteerd (Tabel 8.2). De andere pieken bleven onbekend of betroffen dubbele pieken.

Geurmonsters van rozenplanten werden ook gedurende 24 uur verzameld. De gegevens van twee runs op de GC-QTOF (split ratio T10 en T50) werden gezamenlijk verwerkt. Statistische analyse liet zien dat 232 van pieken significant verschillend waren (meer of minder aanwezig) in wolluis-besmette rozenplanten in vergelijking met onbesmette planten bij een P-waarde van 0,05 (posthoc Tukey-toets). Van de 173 pieken die bij een striktere P-waarde van 0,01 significant verschillend waren, konden er 51 geannoteerd als unieke geurstoffen (Tabel 8.3). De andere pieken bleven onbekend of waren dubbele pieken.

Tabel 8.2. Geurstoffen die consistent en significant verschillend voorkomen in wolluis-besmette rozenplanten (2 en 6 uur) t.o.v. onbesmette planten. Voor de uitleg van de kolommen, zie tabel 8.1. Dikgedrukte namen van stoffen geven aan dat er een grote mate van zekerheid is, wanneer namen niet dikgedrukt zijn is er meer onzekerheid over de identificatie (door een groter verschil in RI en RI in de NIST-bibliotheek).

Peak number	m/z value	RT	RI	Best Match	RI NIST	CAS
28	91.0524mz	8.87min	864	Ethylbenzene	855	100-41-4
30	91.0525mz	9.09min	872,8	<b>Benzene, 1,2-dimethyl-</b>	886	95-47-6
37	91.0524mz	10.52min	928	<b><math>\alpha</math>-Pinene</b>	937	80-56-8
56	93.0685mz	11.99min	982,5	<b>Sabinene</b>	974	3387-41-5
59	43.0502mz	12.08min	985,9	<b>Butanoic acid, 2-ethyl-, 2-propenyl ester</b>	995	7493-69-8
62	93.0681mz	12.17min	989,2	<b><math>\beta</math>-Pinene</b>	979	127-91-3
64	93.0651mz	12.20min	990,3	<b>Sabinene</b>	984	3387-41-5
66	105.0586mz	12.40min	998	<b>Benzene, 1,2,4-trimethyl-</b>	990	95-63-6
76	119.0838mz	13.25min	1030	<b>p-Cymene or o-cymene</b>	1025	99-87-6
77	67.0542mz	13.33min	1032,7	<b>D-Limonene</b>	1031	5989-27-5
79	91.0530mz	13.40min	1035	<b>trans-<math>\beta</math>-Ocimene</b>	1038	3779-61-1
84	91.0535mz	13.72min	1047	<b>trans-<math>\beta</math>-Ocimene or another isomer</b>	1049	3779-61-1
92	91.0524mz	14.85min	1091	<b>Cyclohexene, 1-methyl-4-(1-methylethylidene)-</b>	1088	586-62-9
95	117.0679mz	15.01min	1097	Benzene, 2-ethenyl-1,4-dimethyl-	1090	2039-89-6
98	91.0523mz	15.16min	1102,7	<b>2-Cyclohexen-1-ol, 1-methyl-4-(1-methylethyl)-, cis-</b>	1111	29803-82-5
117	138.0667mz	16.99min	1175,3	<b>Benzene, 1,3-dimethoxy-</b>	1169	151-10-0
118	128.0604mz	17.58min	1199,4	Naphthalene	1182	91-20-3
123	120.0230mz	17.71min	1205	<b>Methyl salicylate</b>	1198	119-36-8
127	135.0122mz	18.65min	1244	Benzothiazole	1228	95-16-9
131	152.0819mz	19.38min	1275	3,5-Dimethoxytoluene	1274	4179-19-5
138	43.0538mz	19.93min	1,298,732	<b>Tridecane</b>	1300	629-50-5
144	147.0790mz	20.53min	1325	<b>4-(t-Butyl)benzaldehyde</b>	1329	939-97-9
155	81.0684mz	22.09min	1395,4	<b><math>\beta</math> BOURBONENE</b>	1389	5208-59-3
166	129.0732mz	22.95min	1435,5	AROMADENDRENE	1441	489-39-4
166	129.0732mz	22.95min	1435,5	<b><math>\alpha</math>-Guaiene</b>	1439	01/12/3691
172	107.0835mz	23.31min	1452,5	5,9-Undecadien-2-one, 6,10-dimethyl-, (E)-	1453	3796-70-1
181	93.0680mz	23.72min	1472,2	<b><math>\beta</math>-Chamigrene</b>	1476	18431-82-8
183	161.1315mz	23.99min	1485	<b><math>\gamma</math>-Muurolene or another isomer</b>	1485	483-75-0
184	161.1312mz	24.04min	1488	$\gamma$ -Muurolene	1477	30021-74-0
185	91.0523mz	24.04min	1488	$\alpha$ -Muurolene	1495	31983-22-9
190	43.0509mz	24.23min	1496,9	<b><math>\beta</math>-Guaiene</b>	1493	88-84-6
195	161.1313mz	24.50min	1510	<b><math>\alpha</math>-Farnesene</b>	1508	502-61-4
196	119.0836mz	24.86min	1528,0	$\delta$ -Cadinene	1527	483-76-1
201	91.0524mz	25.05min	1537	cis-Calamenene	1531	72937-55-4
203	91.0525mz	25.24min	1547,0	Naphthalene, 1,2,3,4,4a,7-hexahydro-1,6-dimethyl-4-(1-methylethyl)-	1537	16728-99-7
209	57.0690mz	26.22min	1597	Decane, 1-bromo-2-methyl-	1598	127839-47-8
211	149.0220mz	26.28min	1600	<b>Diethyl Phthalate</b>	1594	84-66-2
217	91.0525mz	26.96min	1636	<b>Benzene, (1-butylheptyl)-</b>	1632	4537-15-9
221	71.0802mz	27.46min	1662	<b>Tetradecane, 1-chloro-</b>	1666	2425-54-9
234	91.0525mz	28.70min	1730	<b>Benzene, (1-pentylheptyl)-</b>	1726	2719-62-2
237	43.0538mz	28.90min	1741	<b>Benzene, (1-propylnonyl)-</b>	1742	2719-64-4
245	57.0691mz	29.90min	1798	7-Hexadecenal, (Z)-	1798	56797-40-1
248	120.0187mz	30.22min	1816,5	<b>2-Ethylhexyl salicylate</b>	1809	118-60-5
251	91.0523mz	30.56min	1836,3	<b>Benzene, (1-butylnonyl)-</b>	1826	4534-50-3
254	243.1756mz	30.98min	1861,1	7-Acetyl-6-ethyl-1,1,4,4-tetramethyltetralin	1857	88-29-9
257	91.0525mz	31.23min	1876,0	<b>Benzene, (1-ethylundecyl)-</b>	1865	4534-52-5
261	105.0679mz	31.91min	1917	<b>Benzene, (1-methylododecyl)-</b>	1916	4534-53-6
280	257.2278mz	33.98min	2048	<b>Epimanool</b>	2056	1438-62-6
282	67.0530mz	34.57min	2087	Thunbergol	2073	25269-17-4

Tabel 8.3. Geurstoffen die consistent en significant verschillend voorkomen in wolluis-besmette rozenplanten (24 uur) t.o.v. onbesmette planten.

Peak number	m/z value	RT	RI	Best Match	RI NIST	CAS
28	91.0524mz	8.87min	864	Ethylbenzene	855	100-41-4
30	91.0525mz	9.09min	872,8	Benzene, 1,2-dimethyl- (CAS)	886	95-47-6
37	91.0524mz	10.52min	928	$\alpha$ -Pinene	937	80-56-8
54	57.0309mz	11.93min	980,3	Cyclohexane, 1-methylene-4-(1-methylethenyl)-	993	499-97-8
56	93.0685mz	11.99min	982,5	Sabinene	974	3387-41-5
59	43.0502mz	12.08min	985,9	Butanoic acid, 2-ethyl-, 2-propenyl ester	995	7493-69-8
62	93.0681mz	12.17min	989,2	$\beta$ -Pinene	979	127-91-3
66	105.0586mz	12.40min	998	Benzene, 1,2,4-trimethyl-	990	95-63-6
76	119.0838mz	13.25min	1030	p-Cymene or o-cymene	1025	99-87-6
77	67.0542mz	13.33min	1032,7	D-Limonene	1031	5989-27-5
79	91.0530mz	13.40min	1035	trans- $\beta$ -Ocimene	1038	3779-61-1
92	91.0524mz	14.85min	1091	Cyclohexene, 1-methyl-4-(1-methylethylidene)-	1088	586-62-9
95	117.0679mz	15.01min	1097	Benzene, 2-ethenyl-1,4-dimethyl-	1090	2039-89-6
97	57.0690mz	15.06min	1099	Benzene, 1-methyl-4-(1-methylethenyl)-	1112	1195-32-0
98	91.0523mz	15.16min	1102,7	2-Cyclohexen-1-ol, 1-methyl-4-(1-methylethyl)-, cis-	1111	29803-82-5
101	67.0532mz	15.27min	1107	1-Undecyne	1117	2243-98-3
115	65.0379mz	16.95min	1174	Benzene, 1,3-dimethoxy-	1168	151-10-0
118	128.0604mz	17.58min	1199,4	Naphthalene	1182	91-20-3
123	120.0230mz	17.71min	1205	Methyl salicylate	1198	119-36-8
125	67.0532mz	17.81min	1209	3-Dodecyne	1218	6790-27-8
127	135.0122mz	18.65min	1244	Benzothiazole	1228	95-16-9
131	152.0819mz	19.38min	1275	3,5-Dimethoxytoluene	1274	4179-19-5
138	43.0538mz	19.93min	1298,7	Tridecane	1300	629-50-5
144	147.0790mz	20.53min	1325	4-(t-Butyl)benzaldehyde	1329	939-97-9
155	81.0684mz	22.09min	1395,4	$\beta$ BOURBONENE	1389	5208-59-3
166	129.0732mz	22.95min	1435,5	AROMADENDRENE	1441	489-39-4
166	129.0732mz	22.95min	1435,5	$\alpha$ -Guaiene	1439	01/12/3691
172	107.0835mz	23.31min	1452,5	5,9-Undecadien-2-one, 6,10-dimethyl-, (E)-	1453	3796-70-1
181	93.0680mz	23.72min	1472,2	Spiro[5.5]undec-2-ene, 3,7,7-trimethyl-11-methylene-, (-)-	1476	18431-82-8
183	161.1315mz	23.99min	1485	$\gamma$ -Murolene	1472	30021-74-0
185	91.0523mz	24.04min	1488	$\alpha$ -Murolene	1495	31983-22-9
190	43.0509mz	24.23min	1496,9	$\beta$ -Guaiene	1493	88-84-6
195	161.1313mz	24.50min	1510	$\alpha$ -Farnesene	1508	502-61-4
197	119.0836mz	24.90min	1530,0	$\delta$ -Cadinene	1522	483-76-1
201	91.0524mz	25.05min	1537	cis-Calamenene	1531	72937-55-4
203	91.0525mz	25.24min	1547,0	Naphthalene, 1,2,3,4,4a,7-hexahydro-1,6-dimethyl-4-(1-methylethyl)-	1537	16728-99-7
209	57.0690mz	26.22min	1597	Decane, 1-bromo-2-methyl-	1598	127839-47-8
211	149.0220mz	26.28min	1600	Diethyl Phthalate	1594	84-66-2
217	91.0525mz	26.96min	1636	Benzene, (1-butylheptyl)-	1632	4537-15-9
221	71.0802mz	27.46min	1662	Tetradecane, 1-chloro-	1666	2425-54-9
234	91.0525mz	28.70min	1730	Benzene, (1-pentylheptyl)-	1726	2719-62-2
236	57.0690mz	28.89min	1740,7	Benzene, (1-propylonyl)-	1742	2719-64-4
244	57.0691mz	29.88min	1796,8	7-Hexadecenal, (Z)-	1798	56797-40-1
247	105.0678mz	30.16min	1813,0	5,9-Undecadien-2-one, 6,10-dimethyl-	1452	689-67-8
248	120.0187mz	30.22min	1816,5	2-Ethylhexyl salicylate	1809	118-60-5
250	91.0525mz	30.44min	1829,3	Benzene, (1-butylonyl)-	1819	4534-50-3
254	243.1756mz	30.98min	1861,1	7-Acetyl-6-ethyl-1,1,4,4-tetramethyltetralin/Cyclopenta[g]-2-benzopyran, 1,3,4,6,7,8-hexahydro-4,6,6,7,8,8-hexamethyl	1857	88-29-9
257	91.0525mz	31.23min	1876,0	Benzene, (1-ethylundecyl)-	1865	4534-52-5
261	105.0679mz	31.91min	1917	Benzene, (1-methyldodecyl)-	1916	4534-53-6
280	257.2278mz	33.98min	2048	1-Naphthalenepropanol, $\alpha$ -ethenyldecahydro- $\alpha$ ,5,5,8a-tetramethyl-2-methylene-, [1S-[1 $\alpha$ (R*)],	2056	1438-62-6
282	67.0530mz	34.57min	2087	Thunbergol	2073	25269-17-4

#### Orchidee met wolluis

Gegevens van de dwergorchideeën (serie 1) werden niet volledig verwerkt maar de pijplijn werd wel grotendeels gevolgd: normalisatie met logtransformatie, visualisatie met PCA, en statistische analyse. Pieken werden niet geannoteerd vanwege tijdgebrek.

De gegevens van de geurmonsters van orchideeën met afgesneden bloemen (serie 2) werden verwerkt door PCA uit te voeren en een lijst met statistisch relevante pieken te genereren. In het geurprofiel van wolluis-besmette kwamen 86 pieken voor die significant verschillend waren van onbesmette orchideeën ( $P = 0,05$ ). Deze gegevens zijn niet volledig geannoteerd omdat dit zeer tijdrovend is. Wel zijn handmatig 19 belangrijke pieken geselecteerd en geannoteerd. Dit leverde enkele interessante geurstoffen op die overlappen met stoffen die ook in wolluis-besmette rozen gevonden werden, waaronder  $\gamma$ -Muuroolene, methyl-salicylaat en stoffen die in wolluis gevonden werden zoals geraniol en 1H-indool.

## Conclusies

De chemische analyse van geurstoffen van de belangrijke geurbronnen wolluis (*Pl. Citri*) en wolluis-besmette roos en orchidee leverden een lange lijst van kandidaatstoffen voor de training van sluipwespen. Bij de geannoteerde stoffen van wolluis-lichaamsgeur werden bekende geurstoffen gevonden zoals terpenen (trans- $\alpha$ -bergamoteen) en stoffen die op seksferomonen lijken zoals geranyl acetaat. In de geurprofielen van wolluis-besmette planten kwamen bekende herbivoorgeïnduceerde geurstoffen voor waaronder methyl salicylaat en terpenen (o.a. pineen, ocimeen en farneseen). Deze typen stoffen kwamen zowel in wolluis-besmette rozen als in wolluis-besmette orchideeën voor.

Het is belangrijk om te vermelden dat annotaties van de stoffen als voorlopig beschouwd moeten worden. Om de identificatie te bevestigen, is het nodig om de synthetische stoffen te injecteren in de GC tegelijkertijd met de geurmonsters. Op deze manier kan worden vastgesteld of de synthetische stof een overlappende piek geeft met de geannoteerde piek in het chromatogram. Daarnaast zijn niet alle pieken die in wolluis-besmette orchideeën werden gevonden al geannoteerd. De ruwe gegevens zijn beschikbaar in het data-archief van het NIOO-KNAW voor verder onderzoek.

Met dit grote aantal kandidaatstoffen was het nodig om criteria op te stellen waarmee een selectie gemaakt kon worden voor experimenten met sluipwespen (hoofdstuk 9). Dit was nodig omdat het veel te veel verschillende stoffen waren (en combinaties daarvan) om te onderzoeken of ze het gedrag van *Anagyrus* sluipwespen beïnvloeden. De piekoppervlakte werd bekeken omdat die zich verhoudt tot de mate waarin de stof aanwezig is en de stof moest in tenminste 3 van de biologische replica's aanwezig zijn. Vervolgens werd met behulp van literatuur bekeken of de stoffen bekende biologische activiteit hebben en of ze in eerdere experimenten gebruikt werden in het BOOST-project (NWO-Groen, 2016-2020). Tenslotte is het ook van belang dat de gekozen stoffen niet giftig zijn voor toepassing in de kas.

Een andere manier om kandidaatstoffen te selecteren is GC-EAG (electro-antennografie). Bij deze techniek worden geurmonsters door de kolom van de GC geleid waardoor afzonderlijke geurstoffen (pieken zoals hierboven beschreven) worden gescheiden die daarna over de antennen van insecten geleid worden. Wanneer een stof gedetecteerd wordt door receptoren op de antenne wordt dit zichtbaar via een elektrisch signaal. In het Slimme Sluipwespen project werd een pilot uitgevoerd met EAG (niet gekoppeld aan GC) maar deze techniek bleek te lastig en tijdrovend om met de kleine *Anagyrus* sluipwespen betrouwbaar toegepast te kunnen worden als selectie-manier.

Niet alle pieken die significant verschilden, konden geannoteerd worden. Deze pieken kunnen mogelijk wel van invloed zijn op het gedrag van *Anagyrus* sluipwespen. Om erachter te komen welke stoffen het zijn kunnen andere analytische technieken (zoals NMR) ingezet worden. We moeten ons dan echter realiseren dat er uitdagingen zijn om deze stoffen te gebruiken in een commerciële

toepassing omdat ze mogelijk eerst gesynthetiseerd moeten worden. Dit maakt het erg tijdrovend en kostbaar.

## 9. Training van *A. vladimiri* met nieuwe kandidaatstoffen

### Inleiding

In hoofdstuk 8 werden de geurprofielen van *Pl. citri* wolluis en wolluis-geïnfesteeerde rozenplanten verzameld en geanalyseerd. Deze analyses leverden een flink aantal kandidaatstoffen op om sluipwespen mee te trainen. Uit de literatuur is bekend dat de concentratie van informatiestoffen van belang is voor de gedragsrespons van insecten. Het kan zelfs zo zijn dat informatiestoffen bij een lage concentratie aantrekkelijk zijn maar bij een (te) hoge concentratie afstotend werken. Daarnaast is ook de combinatie van verschillende informatiestoffen belangrijk. In dit hoofdstuk onderzoeken we met welke combinaties van informatiestoffen van wolluis en planten het zoekgedrag van *A. vladimiri* positief beïnvloed kan worden.

Herbivoor-geïnduceerde geurprofielen bestaan over het algemeen uit heel veel verschillende stoffen en de precieze samenstelling is betekenisvol voor de soorten, waaronder sluipwespen, die deze geurprofielen gebruiken. In hoofdstuk 8 vonden we dat het geurprofiel van wolluis-besmette roos voor het overgrote deel bestaat uit dezelfde geurstoffen als dat van onbesmette rozenplanten. De hoeveelheid per stof en de verhouding tussen de verschillende geurstoffen verschilde echter wel. Het namaken van zo'n boeket van geuren is praktisch onmogelijk. Uitzoeken welke minimale set aan geurstoffen een (voor de sluipwesp) realistische benadering vormt van het natuurlijke geurboeket is ook een substantieel project op zich. Op suggestie van het consortium is daarom gewerkt met rozenolie. Dit natuurlijke extract bevat eigenlijk alle geurstoffen die (bloeiende) rozenplanten maken waardoor selectie van potentiële kandidaatstoffen niet nodig is.

Tot slot werd in dit hoofdstuk de stap genomen om sluipwespen vanaf het mummie-stadium te trainen. Net als de meeste soorten sluipwespen die commercieel verkrijgbaar zijn, wordt *Anagyrus* namelijk (meestal) in het popstadium verkocht. Bij *Anagyrus* noemen we het popstadium de mummie. Een uitzondering hierop is *A. fusciventris* van Entocare die in het volwassen stadium verkocht wordt (zie hoofdstuk 4). Om zo dicht mogelijk bij de praktijksituatie te blijven werden in het laatste experiment van dit project de sluipwespen daarom vanuit hun commerciële verpakking (*Citripar* van Koppert) getraind. Dit zorgt ervoor dat de sluipwespen meteen na het uitkomen uit hun mummies blootgesteld worden aan geurstoffen waarmee ze bekend raken met het plaaginsect en/of de geur van het gewas. Deze synthetische stoffen werden aangeboden door ze op 'polymeer' bolletjes en/of filtreerpapiermpjes aan te brengen en deze te mengen met de mummies in de productverpakking. Voor de training werd gebruik gemaakt van een combinatie van informatiestoffen die de meeste potentie hadden om het zoekgedrag te bevorderen.

Samenvattend zijn de drie stappen die we in dit hoofdstuk genomen hebben:

1. Tweekamer-olfactometer tests om de effectiviteit van kandidaatstoffen van wolluis lichaamsgeur en het effect van rozenolie op gedrag van *A. vladimiri* te onderzoeken.
2. Tentproeven om de effectiviteit van rozenolie op het gedrag van *A. vladimiri* te onderzoeken.
3. Mummie-experimenten om te onderzoeken of training vanaf het mummie-stadium van *A. vladimiri* mogelijk is.

Per stap worden de gebruikte methoden en de bevindingen hieronder besproken.

## Tweekamer-olfactometer

### Methoden

Drie verschillende mengsels van informatiestoffen werden gebruikt als trainingsbehandelingen. Met uitzondering van de bekende seksferomonen van *Pl. citri* en *Pl. ficus* waren deze stoffen afkomstig van de lichaamsgeur van *Pl. citri* wolluis zoals vastgesteld in hoofdstuk 8:

(T1) Geraniol, Nerolidol, en (+)-(1R)-cis-2,2-dimethyl-3-isopropenylcyclobutaanmethanolacetaat (*P. citri*-seksferomoon)

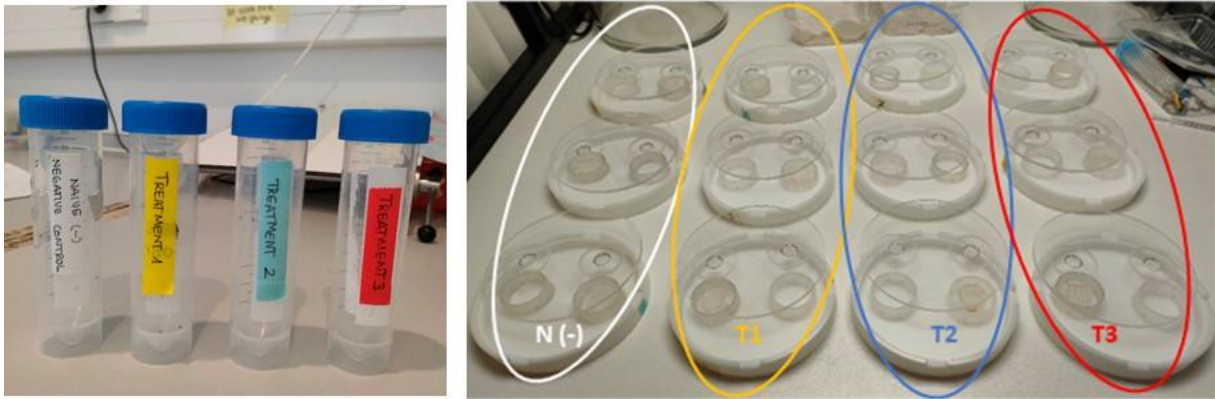
(T2) Geranylacetaat, Laurinezuur, en (±)-lavandulylsenecioaat (*P. ficus*-seksferomoon)

(T3) Geraniol, Laurinezuur, en (R)-lavandulylacetaat

De stoffen werden opgelost in hexaan en gemengd in een verhouding van 1:1:1. Er werden twee verschillende concentraties bereid: de laagste concentratie was 20 ng/ml en de hoogste, 20 µg/ml. Van deze mengsels werd 20 µl gepipetteerd op een filtreerpapier, zodat de totale hoeveelheid informatiestof respectievelijk 0,4 ng en 400 ng bedroeg voor de lagere en de hogere testconcentratie.

*Anagyrus vladimiri* sluipwespen werden getraind in groepen van 5 met de mengsels T1-T3. Vijf vrouwelijke wespen van 1 tot 5 dagen oud werden uit de kooi gehaald en in een 50 ml buisje gestopt (Figuur 9.1). Een stukje filtreerpapier met 400 ng testmengsel zoals hierboven uitgelegd werd vervolgens in het buisje met de wespen gestopt. Als negatieve controle werd 20 µl hexaan gebruikt. Na 30 minuten training werd het filtreerpapier uit de buisjes gehaald en werden de wespen nog 30 minuten met rust gelaten. Na deze periode waren de wespen klaar om te worden gebruikt voor experimenten. Een wolluis-geïnfesteeerde rozenplant werd gebruikt als positieve controle voor training (zie methoden in hoofdstuk 7). Deze positieve controle was niet beschikbaar op elk van de dagen waarop het tweekamer-olfactometer experiment werd uitgevoerd.

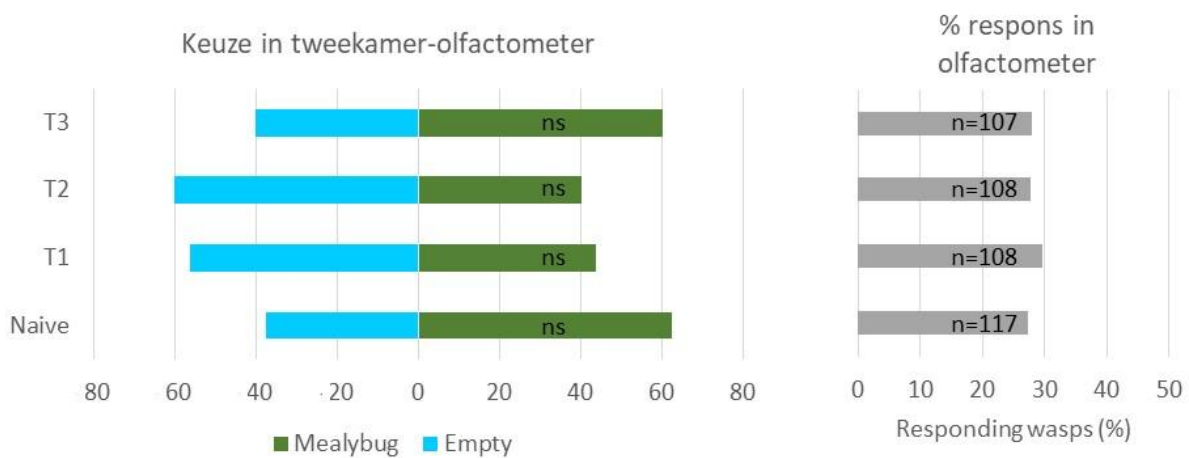
De tweekamer-olfactometer experimenten werden uitgevoerd zoals beschreven in hoofdstuk 6. De getrainde wespen werden met een afgeknipte injectiespuit overgebracht naar de arena's, waarbij ze op gelijke afstand van de twee binnenkamers werden geplaatst. De wespen werden 30 minuten lang met rust gelaten om te foerageren en de toegang tot een van de twee kamers werd als een keuze beschouwd. Als de wespen na 30 minuten geen van beide kamers waren binnengegaan, werd de herhaling geregistreerd als geen respons. Per ronde werden drie herhalingen van elke trainingsbehandeling en de negatieve controle uitgevoerd (Figuur 9.1). De hoge en lage concentratie van de testmengsels werden in een aparte serie van het experiment getest totdat per testmengsel minimaal 30 sluipwespen een keuze hadden gemaakt. Toen de wolluis-geïnfesteeerde rozenplanten beschikbaar kwamen werd de positieve controle per ronde in vier olfactometers getest en de testmengsels en negatieve controle elk in twee olfactometers.



Figuur 9.1. Sluipwespen werden 30 minuten getraind met de testmengsels T1-T3 aangebracht op filtreerpapier in 50 ml buizen (links). Rechts de opstelling van de 12 tweekamer-olfactometers waarbij sluipwespen getraind met elk testmengsel en de negatieve controle tegelijkertijd getest werden. De testmengsels en negatieve controle werden per ronde geroteerd over de kolommen van tweekamer-olfactometers. In deze experimenten werd gebruik gemaakt van tweekamer-olfactometers met ventilatie boven beide kamers (een nieuw ontwerp van het deksel in vergelijking met eerdere hoofdstukken).

### Resultaten

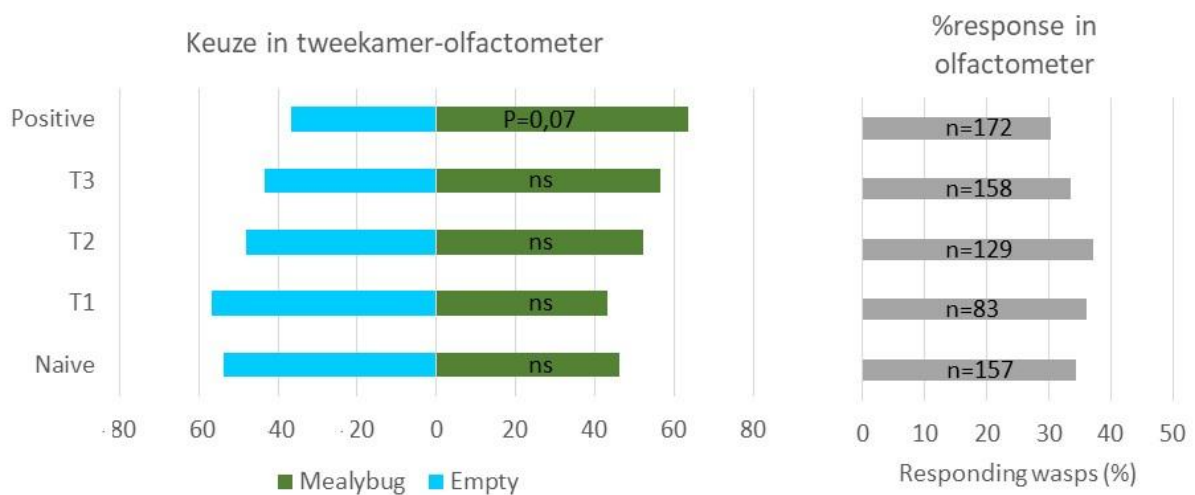
Training met de hoge concentratie van de testmengsels T1-T3 leidde niet tot een verhoogde aantrekking van *A. vladimiri* sluipwespen tot wolluis in de tweekamer-olfactometer (Figuur 9.2). De meeste sluipwespen die getraind waren met mengsels T1 en T2, maakten een keuze voor de lege binnenkamer in plaats van de kamer met wolluis. Sluipwespen die getraind waren met mengsel T3 gingen vaker de kamer met wolluis binnen dan de lege, net als de naïeve sluipwespen van de negatieve controle. Binominale testen werden gebruikt om te testen of de keuze van de wesp significant afweek van een 50:50-verdeling over de geurbronnen ( $p < 0,05$ ): geen van de groepen sluipwespen had een significante voorkeur voor wolluis. Het respons percentage van *A. vladimiri* was minder dan 30% in dit experiment (Figuur 9.2).



Figuur 9.2. Effect van training met de hoge concentratie van de testmengsels T1-T3 gebaseerd op lichaamsgeur van wolluis op het gedrag van de sluipwesp *A. vladimiri* in de tweekamer-olfactometer.

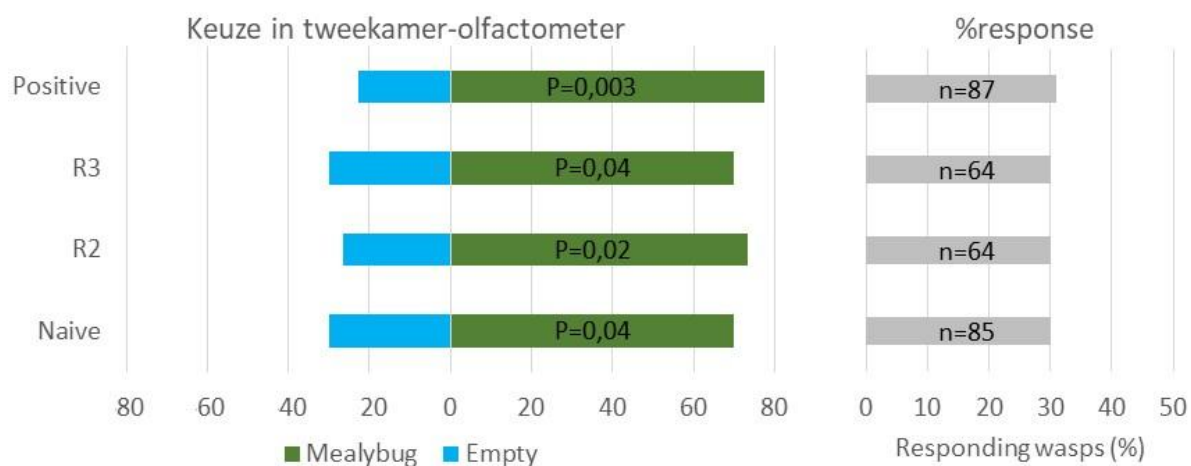
Het linkerpaneel geeft de keuze (in %) van de sluipwespen tussen de binnenkamer met wolluis (mealybug) en de lege kamer (empty). De keuze werd statistisch getest met een binomiaal toets (ns:  $P>0.05$ ). Het rechterpaneel geeft het percentage sluipwespen weer dat een keuze maakte en het totaal aantal geteste sluipwespen per trainingsbehandeling/controle.

Training met de lage concentratie van de testmengsels T1-T3 leidde ook niet tot een significant verhoogde aantrekking van *A. vladimiri* sluipwespen tot wolluis in de tweekamer-olfactometer (Figuur 9.2). De meeste sluipwespen die getraind waren met mengsel T1 maakten een keuze voor de lege binnenkamer in plaats van de kamer met wolluis, voor deze trainingsbehandeling werden daarom minder herhalingen gedaan. Sluipwespen die getraind waren met mengsel T2 waren ongeveer gelijk verdeeld over de twee kamers. Mengsel T3 gaf de beste resultaten omdat bijna 60% van de sluipwespen de kamer met wolluis koos. In dit experiment werd een positieve controle gebruikt – sluipwespen getraind op wolluis-geïnfesteeerde rozenplant – en deze sluipwespen waren bijna significant aangetrokken tot wolluis (Figuur 9.3). De andere groepen sluipwespen hadden geen significante voorkeur voor wolluis ( $P>0,05$ ). Het respons percentage van *A. vladimiri* lag iets hoger dan 30% in dit experiment (Figuur 9.3).



Figuur 9.3. Effect van training met de lage concentratie van de testmengsels T1-T3 gebaseerd op lichaamsgeur van wolluis op het gedrag van de sluipwesp *A. vladimiri* in de tweekamer-olfactometer. Het linkerpaneel geeft de keuze (in %) van de sluipwespen tussen de binnenkamer met wolluis (mealybug) en de lege kamer (empty). De keuze werd statistisch getest met een binomiaal toets (ns:  $P>0.05$ ). Het rechterpaneel geeft het percentage sluipwespen weer dat een keuze maakte en het totaal aantal geteste sluipwespen per trainingsbehandeling/controle.

Training met rozenolie leidde niet tot een hoger percentage sluipwespen dat voor de kamers met wolluis koos in het laatste tweekamer-olfactometer experiment (Figuur 9.4). In dit experiment waren de sluipwespen in beide trainingsbehandelingen R2 en R3 alsook de sluipwespen van de positieve en negatieve controle aangetrokken tot de kamer met wolluis (binomiaal toetsen,  $P<0,05$ ). Het percentage aantrekking varieerde tussen 70 en 77% en er was dus geen duidelijk verschil tussen de behandelingen. Het percentage sluipwespen dat een keuze maakte voor een van beide kamers lag rond de 30% voor alle behandelingen.



Figuur 9.4. Effect van training met rozenolie R2 en R3 op het gedrag van de sluipwesp *A. vladimiri* in de tweekamer-olfactometer. Het linkerpaneel geeft de keuze (in %) van de sluipwespen tussen de binnenkamer met wolluis (*mealybug*) en de lege kamer (*empty*). De keuze werd statistisch getest met een binomiaal toets per behandeling. Het rechterpaneel geeft het percentage sluipwespen weer dat een keuze maakte en het totaal aantal geteste sluipwespen per trainingsbehandeling/controle.

## Tentproef met rozenolie

### Methoden

In een tentproef in de kas werd ook onderzocht wat het effect van training met rozenolie was op het gedrag van *A. vladimiri*. Training werd uitgevoerd zoals hierboven beschreven in de tweekamer-olfactometer experimenten maar met meer sluipwespen per 50-ml buis. Twee concentraties rozenolie werden getest: 5  $\mu\text{L}/\text{ml}$  (R1) en 0,5  $\mu\text{L}/\text{ml}$  (R2) opgelost in demiwater. Van deze oplossing werd 20  $\mu\text{L}$  op een filtreerpapierje gepipetteerd. De training duurde 30 minuten waarna de sluipwespen 30 minuten rusttijd hadden. De trainingsbehandelingen werden vergeleken met een negatieve en een positieve controle.

De tentproef werd uitgevoerd zoals beschreven in hoofdstuk 7 met 16 sluipwespen per tent. Vanwege de slechte terugvangsten werd het experiment na 5 herhalingen gestopt.

### Resultaten

In deze tentproef werden opvallend weinig sluipwespen teruggevonden op de wolluis-besmette plant in de opstelling, gemiddeld minder dan 1 sluipwesp per tent bij alle behandelingen. Ook bij de positieve controle was het percentage sluipwespen op de plant met wolluis na 24 uur slechts 5% in tegenstelling tot ruim 20% in de proeven beschreven in hoofdstuk 7. Dit experiment werd daarom voortijdig gestopt en er konden geen conclusies worden verbonden aan de bevindingen.

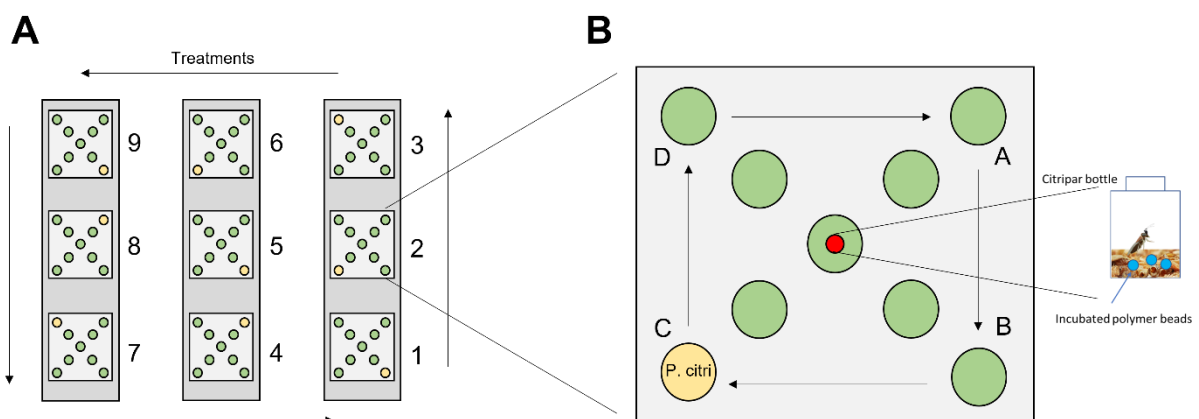
## Mummie-proeven

### Methoden

Proeven werden uitgevoerd in tenten in de kas van het NIOO-KNAW zoals beschreven in hoofdstuk 7 (een Engelstalig stappenplan voor de mummie-proeven is op aanvraag beschikbaar). In deze experimenten werden echter geen 25 maar 9 potroosplanten in elke tent geplaatst (Figuur 9.4). Een van de vier planten in de hoek van de tent was geïnfesteerd met *Pl. citri* wolluis. Boven elk van de vier planten in de hoeken werd een gele plakval gepositioneerd om sluipwespen mee te vangen. De positie van de geïnfesteerde plant verschilde tussen de tenten en per tent werd de positie van de geïnfesteerde plant tussen de experimentele dagen met de klok mee geroteerd. Per tent werd een trainingsbehandeling getest (zie onder en tabel 9.1). Deze behandelingen werden tussen de experimentele dagen steeds een tent opgeschoven tegen de richting van de klok in.

Per tent werd één unit Citripar (Koppert, 500 mummies van *A. vladimiri*) rechtop in de middelste potroos geplaatst (Figuur 9.4). De trainingsbehandelingen werden net hiervoor toegepast in de flessen (zie hieronder). Citripar units werden gebruikt op de dag van levering waarna op drie momenten metingen werden gedaan: na 72, 96 en 120 uur. Omdat bleek dat bij het eerste meetmoment vooral mannetjes uitgekomen waren, werd besloten in de tweede serie van de proef het Citripar product 3 dagen na levering te gebruiken. Tot de start van het experiment werden de flessen open in een insectenkooi gezet zodat de reeds uitgekomen sluipwespen verwijderd konden worden. Vervolgens werden op twee momenten metingen gedaan: na 24 en 48 uur (ten opzichte van de 'leeftijd' van het Citripar product komen deze momenten overeen met de tijdstippen 96 en 120 uur in serie 1).

Per meetmoment werden per kooi de sluipwespen op de planten en de plakvallen in de vier hoeken van de tent geteld. Hiertoe werden de planten uit de kooi gehaald en geïnspecteerd. Sluipwespen op de planten werden verwijderd met een zuigbuis. Voordat de planten teruggeplaatst werden, werd een nieuwe plakval boven de plant gepositioneerd. Mannetjes en vrouwtjes *A. vladimiri* werden apart geteld. Na het laatste meetmoment werden de wolluis-geïnfesteerde rozenplanten weggegooid en alle overige planten gecontroleerd op de aanwezigheid van wolluis of andere insecten. Zo nodig werden ze vervangen voor de volgende herhaling.



Figuur 9.4. Opstelling van de tenten in de kas (A) en van de planten in elke tent (B). Groene cirkels representeren potroosplanten. De plant op positie C was geïnfesteerd met citruswolluis. Een fles Citripar (500 *A. vladimiri* mummies) werd in de middelste positie neergezet. Boven de planten op

posities A-D werd een gele plakval gepositioneerd. Op 2 of 3 tijdstippen na de start werden de planten op posities A-D en de gele plakvallen gecontroleerd op de aanwezigheid van sluipwespen waarbij mannetjes en vrouwtjes onderscheiden werden. Sluipwespen werden van de planten afgevangen en planten werden teruggeplaatst.

Twee series experimenten met verschillende trainingsbehandelingen, d.w.z. sets aan geurstoffen, werden uitgevoerd. In elke serie werd ook een negatieve controle meegenomen. Dat wil zeggen dat de mummies niet blootgesteld werden aan synthetische geurstoffen. In tabel 9.1 is weergegeven welke combinaties van geurstoffen werden gebruikt.

Tabel 9.1. De experimentele trainingsbehandelingen die in de twee series mummie-proeven getest werden. Rozenolie werd in paraffineolie<sup>#</sup> opgelost en op filterpapier aangeboden. De overige synthetische informatiestoffen werden opgelost in aceton en op polymeer bolletjes geïmpregneerd.

Serie 1		Serie 2	
Behandeling	Kandidaat informatiestoffen	Behandeling	Kandidaat informatiestoffen
Negatieve controle	Geen	Negatieve controle	Geen
M1	Rozenolie (0,5 µL/ml)	M4	(±)-lavandulyl acetaat (7,5 ng/ml) Laurinezuur (2,5 ng/ml) Geraniol (5 ng/ml) Rozenolie (0,5 µL/ml)
M2	<i>P. ficus</i> feromoon (8ng/ml) Rozenolie (0,5 µL/ml)	M5	(±)-lavandulyl acetate (7,5 ng/ml) Laurinezuur (2,5 ng/ml) Geraniol (5 ng/ml) Methyl salicylaat (2,5 ng/ml) (E)- β Farneseen (2,5 ng/ml)
M3	<i>P. ficus</i> feromoon (8 ng/ml) Laurinezuur (2 ng/ml) Geranyl acetaat (2 ng/ml) Methyl salicylaat (4 ng/ml) D-limoneen (2 ng/ml) (E)- β Farneseen (2 ng/ml) trans-β-Ocimeen (2 ng/ml)		

<sup>#</sup> Rozenolie werd opgelost in paraffineolie in plaats van demiwater zodat de geurstoffen langzamer verdampen, passend bij de duur van dit experiment.

Voor elk flesje Citripar werden drie bolletjes gebruikt. Voordat deze aan de fles werden toegevoegd werden ze in een schone en open schaal onder de vacuümkap gezet (gescheiden per behandeling). Tegelijkertijd werd 20 µl rozenolie opgelost in paraffineolie (0,5 µL/ml) en op een klein stukje filterpapier gepipetteerd voor de trainingsbehandelingen waarin rozenolie werd gebruikt (zie Tabel 9.1). Filterpapiertjes met rozenolie werden ook in een schone en open schaal gelegd onder de vacuümkap voor ongeveer 20 minuten om het oplosmiddel te laten verdampen. Voor de negatieve controle werden bolletjes met aceton gebruikt. Bolletjes en filterpapiertjes werden in de eerste serie experimenten na 72 uur vervangen. In serie 1 werden de drie trainingsbehandelingen M1-M3

en de negatieve controle in totaal 9 keer herhaald (op vier verschillende dagen met 2-3 herhalingen per behandeling per dag). In serie 2 werden de twee trainingsbehandelingen M4 en M5 en de negatieve controle in totaal 6 keer herhaald (op 2 verschillende dagen met 3 herhalingen per behandeling per dag).

Per tent werd het totaal aantal vrouwelijke en mannelijke sluipwespen opgeteld dat op de verschillende meetmomenten werd aangetroffen op de 3 gezonde en op de wolluis-besmette plant en de plakvallen die boven de planten gepositioneerd waren. Vervolgens werd de fractie vrouwelijke sluipwespen berekend: [vrouwelijke sluipwespen op wolluis-besmette plant/totaal aantal vrouwelijke sluipwespen]. Wanneer de sluipwespen zich vanuit het loslaatpunt in het midden van de tent gelijk verdelen over de vier hoeken dan zou deze fractie 0,25 zijn. Wanneer de sluipwespen worden aangetrokken door de wolluis-besmette plant zal deze fractie hoger dan 0,25 zijn. De verwachting was dat de trainingsbehandelingen de fractie op de besmette plant zou verhogen ten opzichte van de fractie in de negatieve controle.

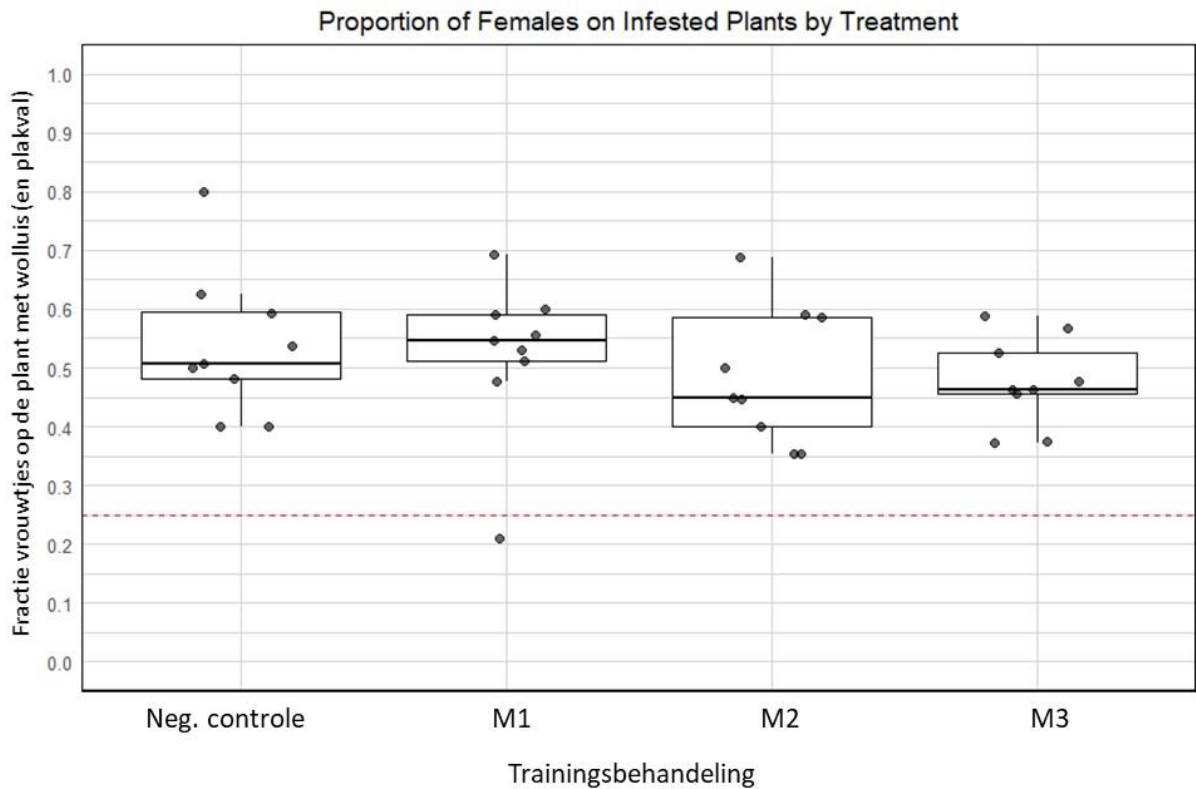
### *Resultaten*

In serie 1 werden in totaal bijna 2500 sluipwespen geteld, waarvan de helft vrouwtjes. Van deze vrouwtjes werden er 706 op de planten geteld en 520 op de plakvallen.

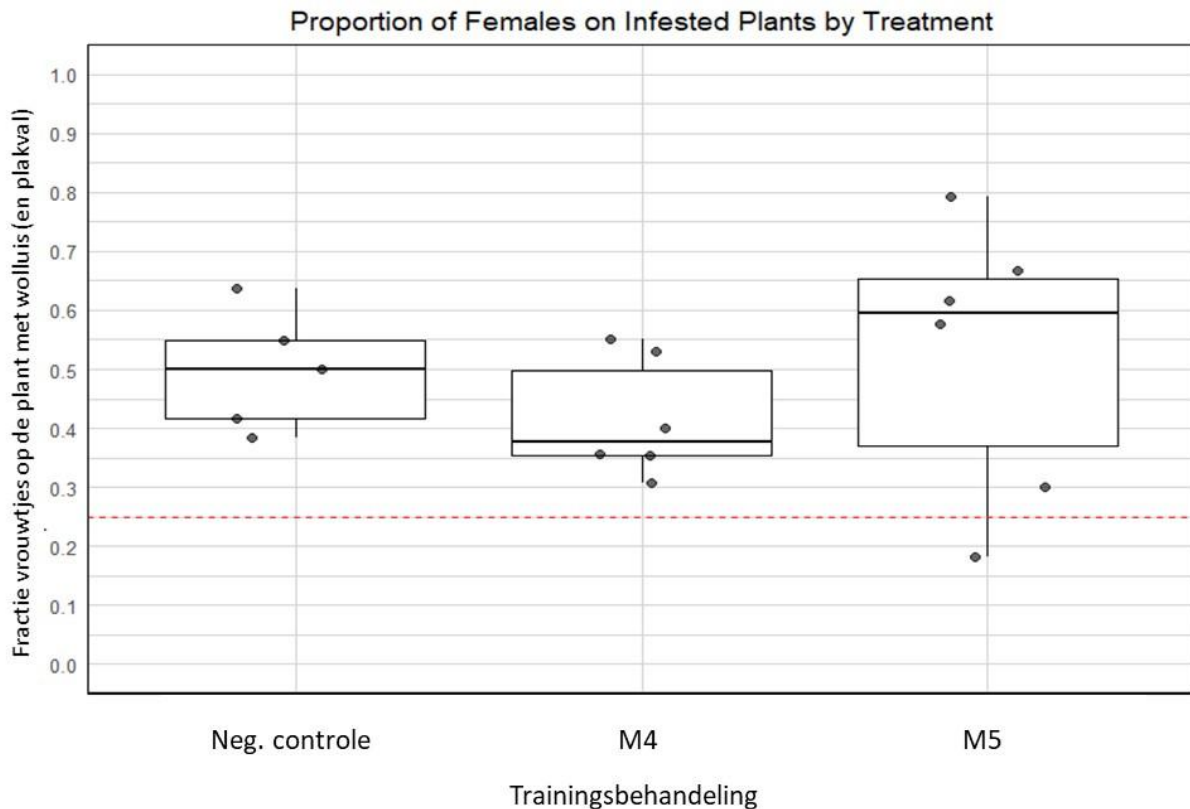
Gemiddeld was de fractie vrouwelijke sluipwespen op de wolluis-besmette plant 0,47 tot 0,54. Dat is significant hoger dan de verwachte fractie van 0,25 wanneer de sluipwespen zich gelijk zouden verdelen over de hoeken van de tent (Chi<sup>2</sup> tests, P<0,001). Dit betekent dat de naïeve sluipwespen maar ook de sluipwespen van alle trainingsbehandelingen aangetrokken werden door de wolluis-besmette plant. Er was geen significant effect van de trainingsbehandelingen op de verdeling van de vrouwelijke sluipwespen over de wolluis-besmette versus de gezonde rozenplanten (Chi<sup>2</sup> test, P = 0,17).

Voor de wolluis-besmette plant werd ook het percentage vrouwelijke sluipwespen op de plant uitgerekend (versus het percentage op de plakval). Dit percentage varieerde tussen 73% en 77% bij de verschillende trainingsbehandelingen. Het percentage vrouwelijke sluipwespen op de plant was veel lager in de hoeken waar een gezonde plant stond (tussen 36% en 48%). Dit bevestigt dat de *A. vladimiri* vrouwtjes inderdaad gemotiveerd waren om naar wolluizen te zoeken op de geïnfesteeerde plant.

Wanneer alleen de vrouwtjes geteld op de planten geanalyseerd worden (en de sluipwespen op de plakvallen buiten beschouwing worden gelaten), dan is de fractie op de wolluis-besmette plant het hoogst in de negatieve controle (0,71) en het laagst bij trainingsbehandeling M3 (0,59).



*Figuur 9.5. Effect van trainingsbehandelingen M1-M3 (zie tabel 9.1) op het zoekgedrag van *A. vladimiri* sluipwespen in tentproeven. Boxplots geven de fractie vrouwelijke sluipwespen aan die werd aangetroffen op de wolluis-geïnfesteerde plant (en plakval gepositioneerd boven de plant). Stippen geven de fractie van individuele herhalingen aan. De rode stippellijn geeft een fractie van 0,25 aan wanneer de sluipwespen zich vanuit het midden gelijk over de vier hoeken van de tent zouden verspreiden.*



Figuur 9.6. Effect van trainingsbehandelingen M4 en M5 (zie tabel 9.1) op het zoekgedrag van *A. vladimiri* sluipwespen in tentproeven. Boxplots geven de fractie vrouwelijke sluipwespen aan die werd aangetroffen op de wolluis-geïnfesteeerde plant (en plakval gepositioneerd boven de plant). Stippen geven de fractie van individuele herhalingen aan. De rode stippellijn geeft een fractie van 0,25 aan wanneer de sluipwespen zich vanuit het midden gelijk over de vier hoeken van de tent zouden verspreiden.

## Conclusies

In de tweekamer-olfactometer experimenten bleek dat het percentage naïeve sluipwespen dat een keuze maakt voor de binnenkamer met de wolluis nogal variabel was tussen dagen en experimenten (Figuren 9.2-9.4). Bovendien kon in het eerste experiment (hoge concentratie T1-T3) geen positieve controle mee worden genomen. Dit maakt het lastig om conclusies te trekken ten aanzien van het effect van de trainingsbehandelingen. Desondanks werd de meeste potentie gezien in trainingsbehandeling T3. Deze combinatie van informatiestoffen afkomstig van wolluis werd ook opgenomen in trainingsbehandeling M5 in de mummieproeven. Een aanbeveling voor vervolgonderzoek is om gebruik te maken van wolluizen die op roos gekweekt zijn in twee-kamer olfactometer experimenten. In de experimenten in dit onderzoek werd gebruik gemaakt van wolluizen die op aardappelspruiten werden gekweekt. Het is mogelijk dat de sluipwespen sterker aangetrokken zouden zijn tot wolluis die op roos gekweekt was.

De experimenten waarbij getraind werd met rozenolie verliepen niet zoals verwacht. In de tweekamer-olfactometer bleken de naïeve sluipwespen ook significant te worden aangetrokken tot wolluis in tegenstelling tot de verwachting dat dit aantal wolluizen onder de detectiegrens voor naïeve sluipwespen lag (op basis van eerdere experimenten). Hoewel de sluipwespen na trainingsbehandelingen R2 en R3 ook significant werden aangetrokken tot wolluis kan dit dus niet

worden toegeschreven aan de training. Omdat in de tweekamer-olfactometer geen plantengeuren aanwezig waren, werd besloten om het effect van training met rozenolie ook in een tentproef te onderzoeken. Helaas was in dit experiment de respons van de sluipwespen dusdanig laag (rond de 5% werd teruggevonden op de wolluis-besmette planten) dat werd besloten het experiment voortijdig te stoppen.

Rozenolie werd ook gebruikt in de mummieproeven in trainingsbehandeling M1 en in combinatie met wolluis-gerelateerde informatiestoffen in mengsels M2 en M4 (Tabel 9.1). Van deze trainingsbehandelingen kon geen positief effect op het zoekgedrag van *A. vladimiri* worden vastgesteld in de mummieproeven (Figuren 9.6-9.7). De beste resultaten werden gevonden met trainingsbehandeling M5 waarin dezelfde wolluis-gerelateerde informatiestoffen opgenomen waren als in trainingsbehandeling T3. Deze drie wolluis-gerelateerde informatiestoffen werden gevonden door middel van de analyse van wolluis lichaamsgeur in hoofdstuk 8. Hiernaast werden ook twee plant-gerelateerde informatiestoffen opgenomen. Deze geurstoffen waren in hoge mate aanwezig in het geurboekje van wolluis-geïnfesteeerde rozenplanten in ons onderzoek (hoofdstuk 8) en zijn ook uit de literatuur bekend als belangrijke informatiestoffen voor insecten.

In dit project werd voor de eerste keer geëxperimenteerd met het trainen van sluipwesp mummies in de commerciële verpakking. Hoewel er geen significante effecten van de trainingsbehandelingen (M1-M5) werden gevonden, was het een succesvol experiment waar in de toekomst verder op gebouwd kan worden. De methode was succesvol te noemen omdat er voldoende sluipwespen uitkwamen en teruggevangen werden op de vangplaten in de tijdsperiode van het experiment zodat een uitspraak gedaan kan worden over aantrekking tot de besmette planten en het effect van training. Tegelijkertijd bleven we zo dicht mogelijk bij de praktijk door de sluipwespen in de loslaatflesjes bloot te stellen aan informatiestoffen. De methode kan nog verder ontwikkeld worden door te variëren met de grootte van de set-up, het aantal planten en de afstand om de praktijksituatie nog beter na te bootsen en/of het meten van een effect te optimaliseren.

In onze proeven vond 50% van de naïeve sluipwespen (negatieve controle) die in de hoeken van de tent werden geteld de wolluis-geïnfesteeerde rozenplant. Hieruit kan worden geconcludeerd dat het eigenlijk te 'makkelijk' was voor *A. vladimiri* om de wolluisen te vinden in de aangeboden opstelling. De opzet van de mummieproef kan worden aangepast om het moeilijker te maken voor de naïeve sluipwespen en zo duidelijker te kunnen onderzoeken of er een effect van de training is.

In de mummieproeven blijven bovendien veel factoren onbekend omdat het minder gecontroleerd was dan de eerdere tentproeven waarbij volwassen sluipwespen getraind werden met informatiestoffen. Zo hebben we niet vastgesteld: (1) of de informatiestoffen al worden waargenomen in het mummie stadium; (2) of de uitgekomen sluipwespen contact hebben met de polymeer bolletjes en/of filtreerpapierjes waarop de informatiestoffen werden aangeboden; (3) hoelang de volwassen sluipwespen in het flesje blijven voordat ze het verlaten, en dus hoelang ze zijn blootgesteld aan de informatiestoffen. Deze factoren kunnen in vervolgonderzoek geadresseerd worden om de effecten van training te optimaliseren.

Tot slot zijn er nog tal van mogelijkheden om verder te experimenteren met de kandidaat informatiestoffen in de trainingsbehandelingen. In de mummieproeven is maar met 1 concentratie van de mengsels gewerkt waarbij we geen informatie hadden over de precieze opname van de informatiestoffen op de polymeer bolletjes en vervolgens de verdamping. Het is dus nog niet bekend hoelang de informatiestoffen aanwezig blijven. Verder is slechts een klein aantal van de in hoofdstuk 8 gevonden kandidaat informatiestoffen onderzocht. Met de overige kandidaatstoffen in tabellen

8.1-8.3 kunnen ook mummieproeven gedaan worden en kunnen er nog allerlei combinaties van informatiestoffen (en verschillende concentraties) gemaakt worden om te onderzoeken.

## 10. Gedrag van *Anagyrus fusciventris*

### Inleiding

Potorchidee was het tweede focusgewas in het project. Op deze planten zijn langstaartwolluizen de meest voorkomende wolluisplaag. Langstaartwolluis *Pseudococcus longispinus* wordt geparasiteerd door de sluipwesp *Anagyrus fusciventris*. Deze is commercieel verkrijgbaar, onder andere als Longix-Af bij Entocare N.V. *Anagyrus fusciventris* wordt nog niet op grote schaal toegepast in de commerciële teelt van potorchideeën omdat de schadedrempel voor wolluis heel erg laag is. In feite is er sprake van een nultolerantie (zie ook hoofdstuk 3).

In tegenstelling tot *A. vladimiri* was *A. fusciventris* een nieuwe soort sluipwesp in het gedragsonderzoek binnen dit consortium. Als eerste verkenning is een experiment uitgevoerd in de Y-buis olfactometer om te onderzoeken of er aantrekking naar (herbivoor-geïnduceerde) geuren van orchidee besmet met wolluis is. Daarnaast werd onderzocht of training met het wolluis-orchidee complex, geurstoffen daarvan of het feromoon van *Ps. longispinus* effect heeft op het gedrag van *A. fusciventris*.

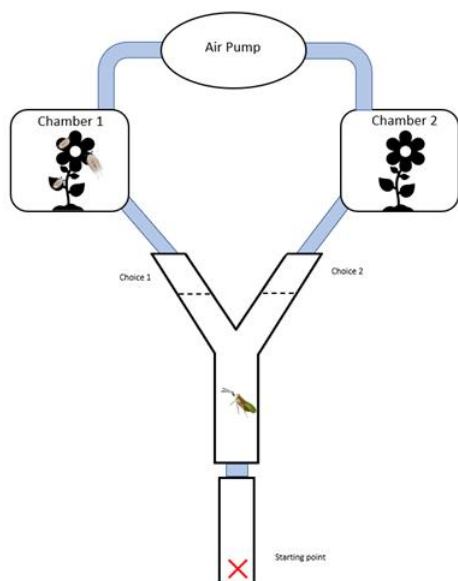
### Methoden

In dit hoofdstuk werd gebruikt gemaakt van een Y-buis olfactometer om het gedrag van *A. fusciventris* te onderzoeken. Dit is een variant op de eerder beschreven 2-kamer olfactometer met het verschil dat er bij een Y-buis olfactometer gebruik gemaakt wordt van een actieve luchtstroom (Figuur 10.1). We hebben de keuze voor deze opstelling gemaakt omdat hierin gebruik gemaakt kan worden van een volledige plant besmet met wolluizen als geurbron. Van *A. fusciventris* wisten we namelijk nog niet of deze sluipwesp gebruik maakt van geuren van de gastheer, van de waardplant of een combinatie daarvan (herbivoor-geïnduceerde geuren). Het nadeel van de Y-buis is dat er slechts 1 sluipwesp tegelijkertijd onderzocht kan worden.

#### *Y-buis olfactometer*

De glazen Y-tube olfactometer (8 cm armen, 9 cm stam, 1 cm diameter, gebouwd volgens Fatouros et al., 2012) was verbonden met perslucht van het gebouw en werd met een snelheid van 150 ml/min door elke arm van de olfactometer gepompt. Vanuit twee glazen potten (5 liter) werden de geurstoffen via PTFE buizen naar beide zijden van de Y-buis olfactometer geleid. De glazen Y-buis stond schuin omhoog onder een hoek van 20° ten opzichte van de tafel. De temperatuur van de kamer was  $19 \pm 2^\circ\text{C}$ . Tijdens de experimenten werd een T5-groeilamp boven de opstelling gebruikt om daglicht te simuleren.

Vrouwelijke sluipwespen werden individueel losgelaten aan de basis van het glazen Y-stuk om te testen of ze de geur van een plant met wolluis prefereert. De keuze van de wesp werd genoteerd nadat ze een denkbeeldige finishlijn in de Y-buis zijn gepasseerd (zie figuur 10.1). Als de sluipwesp de lijn niet binnen 10 minuten had bereikt, werd dit genoteerd als 'geen keuze'. Na elke 5 sluipwespen werden de geurbronnen verwisseld door de PTFE buizen aangesloten op de armen van de Y-buis te verwisselen. Na een pauze van 5 minuten werd de volgende serie sluipwespen getest. Elke dag werden nieuwe planten gebruikt en elke sluipwesp werd slechts eenmaal gebruikt. Sluipwespen van verschillende behandelingen (zie training) werden op dezelfde dag met dezelfde geurbronnen getest.



Figuur 10.1. Schematisch overzicht en foto van de Y-buis olfactometer opstelling. Perslucht werd gesplitst in twee gelijke luchtstromen en door twee glazen potten geleid waarna de lucht door de twee armen van de Y-buis stroomde. De luchtstroom werd gezuiverd door een actieve koolfilter en bevochtigd door het door demiwater te laten stromen voordat het in glazen potten met geurbronnen werd geleid. Individuele sluipwespen werden losgelaten aan de basis van het glazen Y-stuk en kregen maximaal 10 minuten om tegen de luchtstroom in te lopen en een keuze voor een van beide geurbronnen te maken wanneer de denkbeeldige finishlijn gepasseerd werd.

### Planten

Bloeiende planten van potorchidee variëteit *Anthura nazare* werden gebruikt in dit hoofdstuk. Planten werden besmet met *Ps. longispinus* door afgeknipte delen van besmette planten uit de kweek op de testplanten te plaatsen enkele weken voor de experimenten. Na een week werden de afgeknipte delen verwijderd om schimmelgroei tegen te gaan.

### Training en verwachtingen

In het eerste experiment werden 4 trainingsbehandelingen gebruikt voor de sluipwespen: (1) naïeve (negatieve) controle: de wespen werden in een 50 ml buis geplaatst met een vochtig stukje filtreerpapier; (2) positieve controle: de wespen werden op een wolluis-besmette orchidee geplaatst en konden dus alle informatie en een beloning verkrijgen (ruiken, aanraken en ovipositie in een wolluis, Figuur 10.2); (3) feromoon: de wespen werden in een 50 ml buis geplaatst met een filtreerpapier met 20  $\mu\text{l}$  (0,02  $\mu\text{g/ml}$  in hexaan) seksferomoon van *Ps. longispinus*; (4) orchidee-geur: de wespen werden in een kleine gazen kooi (15x15cm, 160 $\mu\text{m}$  maaswijdte) geplaatst in de kooi met een wolluis-besmette orchidee zodat ze wel de geur konden ruiken maar de plant niet konden aanraken en geen ovipositie in een wolluis kon plaatsvinden (Figuur 10.2). Alle trainingen duurden 30 minuten waarna de sluipwespen 30 minuten in een schone kooi geplaatst werden voor de start van de experimenten. Per trainingsbehandeling werden 29-36 sluipwespen getest. In het eerste experiment werd in een van de glazen potten een wolluis-besmette orchidee geplaatst en in de andere een onbesmette orchidee. De verwachting was dat de getrainde sluipwespen een voorkeur

zouden hebben tot de besmette plant ten opzichte van de gezonde plant, en dat hoe meer informatie tijdens de training aangeboden werd, hoe sterker de voorkeur zou zijn (positieve controle > orchidee-geur > feromoon).



*Figuur 10.2. Sluipwespen van de positieve controle konden vrij loslopen over de wolluis-besmette orchidee terwijl sluipwespen in het kleine kooitje rechts alleen de geur konden waarnemen van de plant.*

In het tweede experiment werden alleen de positieve en negatieve (naïeve) controle sluipwespen gebruikt, gebaseerd op de uitkomsten van het eerste experiment. De trainingstijd werd verhoogd naar 60 minuten. Per groep werden 51 sluipwespen getest. In het tweede experiment werd een van de glazen potten in de Y-buis opstelling leeg gelaten en in de andere een wolluis-besmette orchidee geplaatst. Om te voorkomen dat in dit experiment een visueel verschil aan beide kanten van de Y-buis ontstond, werden de glazen potten afgeschermd met grote witte vellen papier. De verwachting was dat de getrainde sluipwespen een voorkeur zouden hebben voor de wolluis-besmette plant.

## Resultaten

In tegenstelling tot de verwachting waren de sluipwespen van geen van de trainingsbehandelingen aangetrokken tot de geur van wolluis-besmette planten in het eerste experiment (Figuur 10.3). Sluipwespen die met orchidee-geur getraind waren, hadden een significante voorkeur voor de geur van de gezonde plant; slechts 22% van de sluipwespen maakte een keuze voor de geur van de besmette plant (binomiaal toets,  $P = 0.001$ ,  $N = 36$ ). Sluipwespen van de negatieve en positieve controle groepen en wespen getraind met feromoon maakten geen significant onderscheid tussen beide geurbronnen ( $P > 0.05$ ,  $N = 29-33$ ). Met deze resultaten was het niet zinvol om te testen of er een effect van de trainingsbehandeling was op de voorkeur van de sluipwespen voor wolluis-besmette orchidee.

In het tweede experiment hadden de getrainde sluipwespen (positieve controle) een significante voorkeur voor de geur van wolluis-besmette orchidee: 80 % van de sluipwespen maakte een keuze voor de plantengeur in de Y-buis opstelling (binomiaal toets,  $P < 0.001$ ,  $N = 51$ , Figuur 10.4). Van de naïeve sluipwespen (negatieve controle) werd 62% aangetrokken tot de geur van wolluis-besmette orchidee ( $P = 0.09$ ,  $N = 51$ ).

## Conclusies

Alleen wanneer schone lucht een alternatief was en wanneer de sluipwespen getraind waren met de volledige informatie van wolluis-besmette planten (positieve controle), werd *A. fusciventris* aangetrokken tot de geur van wolluis-besmette potorchidee. Sluipwespen van de positieve controle groep hadden geen voorkeur voor deze geur wanneer het alternatief de geur van een gezonde orchidee was (hoewel hierbij opgemerkt moet worden dat de training 30 in plaats van 60 minuten was in het eerste experiment). Deze bevinding was onverwacht omdat bekend is dat andere soorten *Anagyrus*, waaronder *A. vladimiri*, aangetrokken worden door de (herbivoor-geïnduceerde) geur van het gastheer-waardplant complex.

We kunnen echter uit deze beperkte set experimenten niet concluderen of *A. fusciventris* altijd een training nodig heeft om aangetrokken te worden naar wolluis-besmette planten. Het is mogelijk dat de grote hoeveelheid bloemen op de planten die werden gebruikt, de herbivoor-geïnduceerde plantengeuren heeft overschaduwde. Daarnaast is het mogelijk dat de sluipwespen zich op kortere afstand oriënteren op lichaamsgeur van de wolluis. Om dit verder te onderzoeken kunnen experimenten met wolluis in een tweekamer olfactometer uitgevoerd worden.

Omdat in het tweede experiment alleen een vergelijking werd gemaakt tussen naïeve sluipwespen en sluipwespen getraind met de volledige informatie (positieve controle) kunnen nog geen uitspraken gedaan worden over de effecten van training zonder dat sluipwespen een beloning krijgen in de vorm van ovipositie in een wolluis.

## 11. Conclusies en aanbevelingen

In dit hoofdstuk worden de belangrijkste conclusies van het onderzoek samengevat. We geven ook denkrichtingen en aanbevelingen voor vervolgonderzoek en de praktijk. De aanbevelingen gaan zowel over het concept van het trainen van sluipwespen om biologische bestrijding te verbeteren als over het specifieke systeem van biologische bestrijding van wolluis door *Anagyrus* sluipwespen.

### Conclusies

Het onderzoek heeft bevestigd dat wolluis inderdaad een van de belangrijkste plagen is in zowel snijroos als potorchidee (Hoofdstuk 3). Biologische bestrijding wordt door een deel van de telers wel toegepast maar kennis over *Anagyrus* sluipwespen lijkt beperkt. Telers geven aan dat het van groot belang is dat natuurlijke vijanden effectief, robuust en betaalbaar zijn en dat ze onder alle omstandigheden presteren. Deze wens van telers sluit goed aan bij de ambitie van het consortium in het Slimme Sluipwespen project: een gebruiksvriendelijk product ontwikkelen waarmee telers in de kas effectiever wolluis kunnen bestrijden. Het concept dat hiervoor verder ontwikkeld werd, was het gebruiken van het leervermogen van sluipwespen door ze te trainen met informatiestoffen.

In tentproeven werd onderzocht welke geurbronnen belangrijke informatie bevatten om sluipwespen te trainen (Hoofdstuk 7). Training met de geur van met wolluis besmette planten resulteerde in 2 tot 4 keer meer sluipwespen op de besmette planten, zowel in de situatie dat sluipwespen fysiek contact konden maken met de plant als wanneer ze dat niet konden en alleen aan de geur blootgesteld werden. Training met alleen wolluis zonder plantgeur had een minder sterk effect op het zoekgedrag. Een belangrijke conclusie uit de tentproeven is dat er geen wachttijd nodig is na de training van sluipwespen met informatiestoffen (Hoofdstuk 7). Dit is cruciaal voor de ontwikkeling van een praktische toepassing omdat sluipwespen niet 'vastgehouden' kunnen worden in het trainingsstation.

Een essentiële stap in het ontwikkelen van een praktische toepassing is het synthetisch kunnen aanbieden van de informatiestoffen die het zoekgedrag van de sluipwespen verbeteren. Eerst werd ingezet op training met reeds bekende informatiestoffen zoals seksferomonen van wolluizen en herbivoor-geïnduceerde plantengeurstoffen (Hoofdstuk 5 en 6). Hoewel de sluipwesp *A. vladimiri* reageerde op enkele van deze informatiestoffen, werden geen duidelijke effecten van training aangetoond. De uitzondering hierop was de bevinding dat training met het seksferomoon van *Pl. ficus* de gevoeligheid van *A. vladimiri* voor dit feromoon verhoogt. Er was echter geen verbetering in de aantrekking van sluipwespen tot wolluizen of besmette planten in grotere proefopstellingen. We concluderen daarom dat een feromoon alleen onvoldoende is voor effectieve training.

Vervolgens werden de geurprofielen van wolluis en wolluis-besmette planten (roos en orchidee) chemisch geanalyseerd. Deze analyses (Hoofdstuk 8) bevestigden de rijkdom aan geurstoffen afkomstig van deze belangrijke natuurlijke geurbronnen. Honderden pieken werden gevonden in de geurprofielen, waarvan er tientallen geannoteerd konden worden. Deze lange lijst van geurstoffen maakte het onmogelijk om het effect van alle kandidaat-informatiestoffen op het gedrag van *A. vladimiri* en *A. fusciventris* te onderzoeken (Hoofdstuk 9). Met behulp van opgestelde selectiecriteria (Hoofdstuk 8 en 9) werden enkele testmengsels gemaakt van wolluis-gerelateerde en plantgerelateerde informatiestoffen om *A. vladimiri* te trainen. Vanwege de complexiteit van het geurprofiel van wolluis-besmette rozenplanten en de uitdaging om dat geurprofiel synthetisch na te bootsen, werd gewerkt met een commercieel verkrijgbare rozenolie, welke echter geen duidelijk

positief effect had op het gedrag van *A. vladimiri*. In hoofdstuk 9 werd een methode ontwikkeld om mummies te gebruiken voor de training. Dit is een belangrijke stap in het onderzoek omdat dit de praktijksituatie het best benaderd. De beste resultaten werden verkregen met een combinatie van geurstoffen van wolluis en roos waarbij er nog veel ruimte is om andere combinaties van wolluis- en plantengeuren te testen om de effectiviteit van *A. vladimiri* verder te verhogen.

Met de sluipwesp *A. fusciventris* (natuurlijke vijand van langstaartwolluis op orchidee) is in dit onderzoek slechts een eerste stap gemaakt. Deze soort lijkt net als *A. vladimiri* het vermogen tot leren te hebben omdat getrainde sluipwespen sterker aangetrokken werden tot wolluis-besmette orchideeën dan naïeve sluipwespen (Hoofdstuk 10). De soort is echter nog niet zo goed onderzocht als *A. vladimiri* dus vervolgonderzoek moet uitwijzen welke geurbronnen belangrijke informatiestoffen voor training bevatten. Een eerste stap is gezet in het ontdekken welke plantengeuren door wolluis geïnduceerd worden in potorchidee waarbij enkele bekende informatiestoffen gevonden werden (Hoofdstuk 8). Vervolgonderzoek kan nog veel meer geurstoffen opleveren van wolluis-besmette orchidee omdat de pieken niet volledig geannoteerd konden worden.

## Aanbevelingen

Om het 'Proof of concept' onderzoek van training van sluipwespen voort te zetten, hebben we de volgende aanbevelingen:

- (1) Bepaal *hoeveel* effectiever de sluipwespen moeten worden via training en de meerkosten die gemaakt mogen worden voor training en maak dan een keuze voor een relevant biologisch systeem waarin deze balans haalbaar is. Beoordeel of gebrek aan motivatie en informatie inderdaad een belangrijke oorzaak is van een lage effectiviteit van de gekozen biologische bestrijder.
- (2) Blijf zo dicht mogelijk bij de praktijksituatie door te werken met mummies die blootgesteld worden aan informatiestoffen, en de sluipwespen vrouwtjes kort na uitkomen te testen.
- (3) Investeer in een 'high-throughput systeem' waarmee het effect van training op het gedrag van sluipwespen onderzocht kan worden voor een groot aantal kandidaatgeurstoffen en mengsels bij verschillende concentraties. Hierbij is van belang dat het systeem past bij het gedrag van de sluipwesp. *Anagyrus* sluipwespen springen bijvoorbeeld veel en dit gedrag zou kunnen leiden tot 'random' keuzes wanneer het systeem niet goed ontworpen is. Bovendien is het belangrijk te onderzoeken hoe het effect van training op kleine schaal in een high-throughput systeem zich verhoudt tot het effect van training in een tentproef of kas.
- (4) Stel een duidelijke lijst van criteria op waarmee kandidaatgeurstoffen geselecteerd kunnen worden.
- (5) Onderzoek de mogelijkheid om sluipwespen te trainen met 'afvalmateriaal' van het kweekstelsel. Hier zit waarschijnlijk veel informatie in van de gastheer.
- (6) Onderzoek de effectiviteit van training met generieke mengsels van herbivoor-geïnduceerde plantengeuren op het zoekgedrag van sluipwespen.
- (7) Onderzoek het effect van het aanbieden van voedsel in het trainingsstation op de effectiviteit van training. Hoewel zowel voedsel als informatiestoffen een positief effect kunnen hebben op de effectiviteit van sluipwespen, is het mogelijk dat de combinatie niet positief uitwerkt.
- (8) Investeer in een loslaatsysteem dat simpel is. Onderzoek of sluipwespen effectief getraind kunnen worden als de informatiestoffen worden geïmpregneerd op het dragermateriaal waar de mummies in vervoerd worden (of op een ander materiaal dat hiermee gemengd wordt, zie ook

Hoofdstuk 9). Op deze manier wordt zo min mogelijk extra afval geproduceerd en is het product het meest vergelijkbaar met het product dat de telers al kennen.

Uit dit onderzoek is gebleken dat er naast het trainen van *Anagyrus* andere mogelijkheden zijn om de effectiviteit van biologische bestrijding van wolluis door deze sluipwespen te verbeteren. Een belangrijke aanbeveling is daarom om de mogelijke oorzaken van een te lage effectiviteit van biologische bestrijding zorgvuldig in kaart te brengen voordat een oplossingsrichting gekozen wordt. Bij de biologische bestrijding van wolluis door *Anagyrus* sluipwespen is het bijvoorbeeld belangrijk om te onderzoeken in hoeverre de effectiviteit van de sluipwespen beïnvloedt wordt door het uitkomstpercentage van sluipwespummies of door de virulentie van de specifieke stam van sluipwespen.

## Referenties

- Babushok, V.I., P.J. Linstrom, and I.G. Zenkevich. 2011. Retention indices for frequently reported compounds of plant essential oils'. *Journal of Physical and Chemical Reference Data* 40, no. 4: 1–47.
- Bale JS, Van Lenteren JC and Bigler F. 2008. Biological control and sustainable food production. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 363(1492): 761-776.
- Franco, J.c., E.b. Silva, E. Cortegano, L. Campos, M. Branco, A. Zada, and Z. Mendel. 2008. Kairomonal response of the parasitoid *Anagyrus* spec. nov. near *pseudococci* to the sex pheromone of the vine mealybug. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 126, no. 2: 122–30.
- Franco, J.C., E. Borges da Silva, T. Fortuna, E. Cortegano, M. Branco, P. Suma, I. La Torre, et al. 2011. Vine mealybug sex pheromone increases citrus mealybug parasitism by *Anagyrus* sp. near *pseudococci* (Girault). *Biological Control* 58, no. 3: 230–38.
- Geden, C.J., Smith, L., Long, S.J. and Rutz, D.A., 1992. Rapid deterioration of searching behavior, host destruction, and fecundity of the parasitoid *Muscidifurax raptor* (Hymenoptera: Pteromalidae) in culture. *Annals of the Entomological Society of America*, 85(2):179-187.
- Giunti G, Canale A, Messing RH, Donati E, Stefanini C, Michaud JP, Benelli G. 2015. Parasitoid learning: Current knowledge and implications for biological control *Biological Control* 90:208-219
- Glastuinbouw Nederland. 2020. Knelpuntenlijst 2020 glastuinbouw. [https://www.glastuinbouwnederland.nl/content/glastuinbouwnederland/docs/themas/Plantgezondheid/03\\_middelenpakket/Knelpuntenlijst\\_2020.pdf](https://www.glastuinbouwnederland.nl/content/glastuinbouwnederland/docs/themas/Plantgezondheid/03_middelenpakket/Knelpuntenlijst_2020.pdf)
- Gross, H. R., Lewis, W. J., Jones, R. L., and Nordlund, D. A. 1975. Kairomones and their use for management of entomophagous insects: III. Stimulation of *Trichogramma achaeae*, *T. pretiosum*, and *Microplitis croceipes* with hostseeking stimuli at time of release to improve their efficiency. *Journal of Chemical Ecology* 1, 431–438.
- Gulati, Sneha, Max-Bernhard Ballhausen, Purva Kulkarni, Rita Grosch, and Paolina Garbeva. 2020. A non-invasive soil-based setup to study tomato root volatiles released by healthy and infected roots. *Scientific Reports* 10, no. 1: 12704.
- Gullino, M.L., Albajes, R. and Nicot, P.C. (eds.), 2020. Integrated pest and disease management in greenhouse crops. Springer International Publishing.
- Hoedjes KM, Kruidhof HM, Huigens ME, Dicke M, Vet LEM, Smid HM. 2011. Natural variation in learning rate and memory dynamics in parasitoid wasps: opportunities for converging ecology and neuroscience. *Proceedings Biological sciences / The Royal Society* 278:889-897
- Kruidhof HM, Kostenko O, Smid HM, Vet LEM. 2019. Integrating parasitoid olfactory conditioning in augmentative biological control: Potential impact, possibilities, and challenges. *Frontiers in Ecology and Evolution* 7
- Little CM, Chapman TW, Hillier NK. 2019. Considerations for insect learning in integrated pest management *Journal of Insect Science* 19
- Mackauer M. 1976. Genetic problems in the production of biological control agents. *Annual review of entomology* 21:369-385
- Pang, Z., J. Chong, G. Zhou, D. Anderson de Lima Morais, L. Chang, M. Barrette, C. Gauthier, P.E. Jacques, S. Li, and J. Xia. 2021. MetaboAnalyst 5.0: Narrowing the gap between raw spectra and functional insights. *Nucleic Acids Research* 49, no. W1: W388–96.
- Pijnakker, J. and P. M. J. Ramakers. 2009. Development of integrated pest management in greenhouse cut roses (in the Netherlands). *Floriculture and Ornamental Biotechnology* 3.1, 117-120.
- Pijnakker, J. en Leman A. 2012. Bestrijding van citruswolluis in potplanten. Wageningen UR Glastuinbouw, rapport GTB-1181
- Pijnakker J, Verbeek M, Vreugdenhil J. 2015. Inventarisatie problematiek wolluis in de glasgroenteteelt. Productschap Tuinbouw, Biobest Nederland, De Lier.

- Sumner, L. W., A. Amberg, D. Barrett, M. H. Beale, R. Beger, C. A. Daykin, T. W. M. Fan, et al. 2007. Proposed minimum reporting standards for chemical analysis. *Metabolomics* 3, no. 3: 211–21.
- Vet LEM, Lewis WJ, Carde RT. 1995. Parasitoid foraging and learning. In: *Chemical ecology of insects 2*. Springer, pp 65-101

## Bijlagen

Bijlage I: Studentenverslagen

De volgende (Engelstalige) stageverslagen en theses van studenten zijn op aanvraag beschikbaar via de projectleider Jetske de Boer ([j.de.boer@aeres.nl](mailto:j.de.boer@aeres.nl)).

**Julia van Leemput** (Wageningen Universiteit, MSc stage): Exploring the potential of synthetic infochemicals to improve host-searching behaviour by *Anagyryus vladimiri* directly after exposure (juli 2021).

**Karthick Gajendiran** (Wageningen Universiteit, vrijwillige stage na afstuderen): Parasitoid olfactory conditioning: a foundation for making them “SMART” (januari 2022 – presentatie, geen verslag).

**Gijs van den Boom** (Hogeschool Arnhem Nijmegen, stage): Effect of olfactory conditioning of *Anagyryus vladimiri* with host-related cues on their host-searching behavior (februari 2022).

**Wadi Bishara** (Universita degli studi di Perugia, Erasmus+ traineeship): geen verslag beschikbaar (september 2022).

**Nathali Nacev** (Aeres Hogeschool Almere, stage): Protocol chamber experimenten. Project Slimme sluipwesp (oktober 2022).

**Andreas Buben** (HAS Green Academy, stage): Host-parasitoid relationship & olfactory conditioning of parasitoids (augustus 2023).

**Nishat Tasnim** (Wageningen Universiteit, MSc stage): Sensitization of *Anagyryus vladimiri* wasps to improve host searching efficiency (februari 2024).

**Martijn Groenendijk** (Hogeschool Van Hall Larenstein, stage): Testing the effectiveness of volatile treatments on *Anagyryus fusciventris* (november 2024).

Ten tijde van het onderzoek waren er ongeveer 53 rozen bedrijven en 61 orchidee bedrijven in Nederland (CBS, 2021). De vragenlijst is rondgestuurd via de coördinatoren van de betreffende gewaskringen.

## Wolluizen in de sierteelt: plaagproblematiek en bestrijdingsstrategieën

*Bij het Nederlands Instituut voor de Ecologie (NIOO-KNAW) wordt onderzoek gedaan naar het verbeteren van wolluisbestrijding met sluipwespen. Met deze enquête willen we meer inzicht krijgen in de wolluisproblematiek in de sierteelt en huidige bestrijdingsstrategieën.*

*De vragenlijst bestaat uit 20 vragen en duurt ongeveer 10 minuten. De verzamelde gegevens worden anoniem voor onderzoeksdoeleinden verwerkt en niet gedeeld met derde partijen.*

*Alvast bedankt voor uw respons!*

### I - Bedrijf en teeltsysteem

1. Bedrijf: ..... Locatie: ..... Aantal ha: .....

2. Welk(e) gewas(sen) teelt u?

.....

3. Klimaatomstandigheden (gemiddeld)

	Temperatuur	Luchtvochtigheid	Daglengte
Zomer: .....	.....	.....	.....
Winter: .....	.....	.....	.....

### II - Plaagprobleem

4. Welke plagen zijn het meest problematisch in uw teeltsysteem?

.....

5. In hoeverre zijn wolluizen een plaag?

.....

a. Is dat ras-afhankelijk?

.....

b. Welke wolluissoorten zijn aanwezig?

.....

6. Zijn wolluizen jaarrond aanwezig? In welke maanden is de wolluis plaagdruk het hoogst/laagst?

.....

7. Hoe en hoe vaak wordt er gescout om wolluis-haarden te identificeren?

.....

8. Hoe is de spreiding van wolluizen in de kas?

.....

### III - Plaagbestrijding

9. Welke chemische middelen worden gebruikt tegen wolluizen en met welke frequentie?

.....

10. Worden feromoonvallen, vangplaten, insectengaas o.i.d. gebruikt?

.....

11. Wordt biologische bestrijding d.m.v. natuurlijke vijanden toegepast tegen wolluizen?  
Waarom niet / Welke natuurlijke vijanden?

.....

12. Heeft u ervaring met sluipwespen zoals *Anagyrus vladimiri* (Citripar) of *Anagyrus fusciventris* tegen wolluis?

.....

13. Hoe worden natuurlijke vijanden uitgezet? (aantallen, frequentie, locatie, methode...)

.....

14. Hoe effectief zijn de natuurlijke vijanden?

.....

a. Waarom zijn de natuurlijke vijanden wel/niet effectief?

.....

b. Is de effectiviteit afhankelijk van het seizoen en/of de wolluisdruk?

.....

15. Verschilt de bestrijdingsmethode bij hoge vs. lage wolluisdruk?

.....

16. Welke andere bestrijdingsmaatregelen (biologisch of chemisch) worden genomen tegen andere plagen en ziektes (bv. meeldauw)?

.....

17. Wat zijn de belangrijkste uitdagingen bij het beheren/bestrijden van wolluizen en het gebruik van biologische bestrijding?

.....

18. Wat is volgens u nodig om het gebruik en/of de effectiviteit van biologische bestrijding tegen wolluis te verhogen?

.....

19. Zou u mee willen doen aan praktijkonderzoek over wolluisbestrijding met *Anagyrus* sluipwespen?

20. Mogen we in de toekomst contact opnemen voor verdere vragen en onderzoek?

Naam: .....

Email: .....

Telefoon: .....

Adres: .....