

# IMPACT VAN DE INTERACTIE TUSSEN MIEREN EN BLADLUIZEN OP BIOLOGISCHE PLAAGBEHEERSING

Aantal woorden: 27.725

Marie Van Hoeyweghen

Stamnummer: 01605854

Promotoren: Prof. dr. ir. Patrick De Clercq en dr. ir. Joachim Moens

Tutoren: dr. ir. Annelies De Roissart en ir. Christophe Noppe

Masterproef voorgelegd voor het behalen van de graad in Master of Science in de biowetenschappen:  
land- en tuinbouwkunde - afstudeerrichting plantaardige en dierlijke productie

Academiejaar: 2020 – 2021



# **IMPACT VAN DE INTERACTIE TUSSEN MIEREN EN BLADLUIZEN OP BIOLOGISCHE PLAAGBEHEERSING**

Aantal woorden: 27.725

**Marie Van Hoeyweghen**

Stamnummer: 01605854

Promotoren: Prof. dr. ir. Patrick De Clercq en dr. ir. Joachim Moens

Tutoren: dr. ir. Annelies De Roissart en ir. Christophe Noppe

Masterproef voorgelegd voor het behalen van de graad in Master of Science in de biowetenschappen:  
land- en tuinbouwkunde - afstudeerrichting plantaardige en dierlijke productie

Academiejaar: 2020 – 2021

## Auteursrecht

De auteur en promotoren geven de toelating deze scriptie voor consultatie beschikbaar te stellen en delen van de transcriptie te kopiëren voor persoonlijk gebruik. Elk ander gebruik valt onder de beperkingen van het auteursrecht, in het bijzonder met betrekking tot de verplichting de bron uitdrukkelijk te vermelden bij het aanhalen van de resultaten uit deze scriptie.

The author and the promoters give the permission to use this thesis for consultation and to copy parts of it for personal use. Every other use is subject to the copyright laws, more specifically the source must be extensively specified when using the results from this thesis.

21 mei, 2021

Marie Van Hoeyweghen

Prof. dr. ir. Patrick De Clercq

dr. ir. Joachim Moens

## Woord vooraf

Het onderwerp van deze masterproef was voor mij onbekend terrein. Ik heb een inkijk gekregen in de wonderlijke insectenwereld die me keer op keer blijft verbazen. Ik ben dankbaar dat ik de kans heb gekregen om me in het mutualisme tussen mier en bladluis te verdiepen om zo mogelijk bij te dragen aan de biologische bestrijding van bladluizen.

Langs deze weg wil ik iedereen bedanken die mij geholpen en gesteund heeft bij het verwezenlijken van deze masterproef. Ik kon mij geen betere begeleiding voorstellen bij het onderzoeken en schrijven er van.

Eerst vooral bedank ik Prof. dr. ir. Patrick De Clercq van harte voor het interessante onderwerp, de tijd die gespendeerd werd aan het nalezen en het waardevolle advies over deze masterproef.

Vervolgens wil ik graag dr. ir. Joachim Moens uitgebreid bedanken voor de begeleiding en informatie tijdens de veldproef en voor het nalezen en adviseren van deze masterproef. Het handje hulp dat werd toegestoken tijdens het monitoren om het werk wat lichter te maken apprecieerde ik van harte.

Daarnaast een uitgebreid dankwoord aan Christophe Noppe voor het toewerken naar, begeleiden en opvolgen van de laboproef. Hartelijk dank voor het uitvoerig nalezen en de uitgebreide feedback. Ook een welgemeende dankjewel om de kennis en het enthousiasme over mieren met mij te delen.

Tenslotte bedank ik Annelies De Roissart voor de hulp en de heldere uitleg bij het statistisch verwerken van de data van de veldproef.

## Samenvatting

De biologische beheersing van bladluizen op bomen in de sierteelt en het openbaar groen wordt bemoeilijkt door het mutualisme tussen mier en bladluis. Mieren beschermen bladluizen tegenover hun natuurlijke vijanden in ruil voor suikerrijke honingdauw. Aan de hand van een labo- en veldproef werd nagegaan in welke mate het mutualisme verstoord kan worden door middel van het aanbieden van de alternatieve suikerbron Biogluc® aan mieren. Zowel voor de laboproef als de veldproef werden significante resultaten ( $p < 0,05$ ) bekomen.

De veldproef vond plaats in augustus (2020). Deze werd uitgevoerd op *Tilia cordata*, *Quercus palustris* en *Acer pseudoplatanus* waar telkens een behandeling met Biogluc® vergeleken werd met een controlebehandeling zonder Biogluc®. Bij de veldproef werden significante invloeden waargenomen op de vier gemonitorde parameters. Er werd verwacht dat de mieractiviteit positief, het mierbezoek negatief, het aantal bladluizen negatief en het aantal natuurlijke vijanden positief beïnvloed zouden worden. Deze combinatie werd echter op geen van de drie boomsoorten verwezenlijkt. Het gemonitorde aantal bladluizen en natuurlijke vijanden lag relatief laag. Daarnaast waren *T. cordata* en *A. pseudoplatanus* geïnfecteerd met bladluissoorten waar mieren geen mutualisme mee aangaan. Deze factoren maken de resultaten weinig representatief. Wel kan geconcludeerd worden dat een alternatieve suikerbron veranderingen teweegbrengt die verder onderzocht dienen te worden.

Tijdens de laboproef werd onderzocht of de aanwezigheid van *Crematogaster scutellaris* een effect had op de populatiegroei van *Acyrtosiphon pisum* op *Vicia faba*. Bovendien werd nagegaan of bij het aanbieden van Biogluc® een verschillend resultaat merkbaar zou zijn. Dit werd nagegaan aan de hand van het vergelijken van de parameters bladluizen aantal en aantal dode mieren op dag 8 tussen een behandeling waarbij *C. scutellaris* Biogluc® werd aangeboden, een behandeling met *C. scutellaris* zonder de aanwezigheid van Biogluc® en een controle zonder *C. scutellaris* en zonder Biogluc®. De onderzochte parameters van de behandelingen en de controle vertoonden onderling significante verschillen. Het positief effect van Biogluc® om bladluizenkolonies onder controle te houden als gevolg van predatie van *C. scutellaris* op *A. pisum* kon hiermee worden aangetoond. Na twee dagen werden in de microkosmosen waarin geen Biogluc® aanwezig was geen bladluizen meer waargenomen. Ook bij de controle zonder Biogluc® werd het beheersen van bladluizen door *C. scutellaris* vastgesteld, maar in minder mate dan wanneer Biogluc® wel ter beschikking was. Ondanks het uitblijven van een mutualisme tussen mier en *A. pisum*, kon worden geconcludeerd dat *C. scutellaris* baat had bij de blijvende aanwezigheid van deze bladluis.

**Kernwoorden:** mieren, bladluizen, mutualisme, alternatieve suikerbron, biologische bestrijding

## Abstract

The biological pest control of aphids on trees in horticulture and in public green spaces is complicated by the mutualism between ants and aphids. Ants protect aphids from their natural enemies in exchange for sugar-rich honeydew. By means of a laboratory experiment and a field experiment, it was examined to what extent this mutualism could be disrupted by offering ants the alternative sugar source Biogluc®. Significant results ( $p < 0,05$ ) were obtained for both the laboratory and field experiment.

The field experiment took place in August (2020). It was performed on *Tilia cordata*, *Quercus palustris* and *Acer pseudoplatanus* on which for each a treatment with Biogluc® was compared with a control treatment without Biogluc®. During the field experiment significant influences were observed on the four monitored parameters. It was expected that the ant activity would be positively, the ant visitation negatively, the number of aphids negatively and the number of natural enemies positively influenced. However, this combination was not achieved on any of the three tree species. In addition, *T. cordata* and *A. pseudoplatanus* were infected with aphid species that ants do not have a mutualistic relationship with. These factors make the results less representative. However, it can be concluded that an alternative sugar source causes changes that require further investigation.

During the laboratory experiment the effect of the presence of *Crematogaster scutellaris* on the population growth of *Acyrtosiphon pisum* on *Vicia faba* was examined. Furthermore, it was checked whether the availability of Biogluc® would lead to different results. This was determined by comparing the parameters the number of aphids and the number of dead ants on day 8 between a treatment in which *C. scutellaris* was offered Biogluc®, a treatment in which *C. scutellaris* did not have Biogluc® at its disposal, and a control treatment without any ants and no Biogluc®. The obtained results of the measured parameters were significant in between both treatments and the control. A positive effect of Biogluc® in controlling aphid colonies resulting from predation by *C. scutellaris* on *A. pisum* was recorded. After two days, aphids were no longer observed in the microcosms that contained Biogluc®. *C. scutellaris* controlled the number *A. pisum* when Biogluc® was absent, though to a lesser extent. Despite the lack of mutualism between ants and *A. pisum*, it was concluded that *C. scutellaris* benefited from the continued presence of this aphid.

**Key words:** ants, aphids, mutualism, alternative sugar source, biological pest control

# Inhoudstafel

Auteursrecht .....	I
Woord vooraf .....	II
Samenvatting .....	III
Abstract .....	IV
Lijst met figuren.....	3
Lijst met tabellen.....	5
Inleiding.....	6
Literatuurstudie .....	7
1. Bladluizen ( <i>Aphididae</i> ).....	7
1.1. Taxonomie .....	7
1.2. Morfologie .....	8
1.3. Levenswijze .....	9
1.4. Honingdauw.....	10
1.5. Schadebeeld.....	13
1.6. <i>Acyrtosiphon pisum</i> .....	14
2. Mieren ( <i>Formicidae</i> ).....	15
2.1. Taxonomie .....	15
2.2. Morfologie .....	16
2.3. Ontwikkeling tot kolonie.....	17
2.4. Levenswijze .....	19
2.5. Ecologische rol.....	21
2.6. <i>Crematogaster scutellaris</i> .....	22
3. Mutualisme tussen mier en bladluis.....	23
3.1. Beschrijving .....	23
3.2. Co-evolutie.....	23
3.3. Mier en bladluis .....	24
3.4. Mier en plant.....	25
3.5. Bladluis en plant.....	27
3.6. Natuurlijke vijanden .....	27
4. Biologische bestrijding van bladluizen.....	29
4.1. Kleverige barrière .....	31
4.2. Substituant voor honingdauw.....	31
4.2.1. Veldproeven.....	32
4.2.2. Laboproeven.....	33



4.2.3. Invloedfactoren.....	34
Veldproef.....	36
1. Doelstelling .....	36
2. Materiaal en methoden .....	36
3. Dataverwerking .....	39
4. Resultaten.....	41
4.1. <i>Tilia cordata</i> .....	41
4.2. <i>Quercus palustris</i> .....	42
4.3. <i>Acer pseudoplatanus</i> .....	44
4.4. Samenvatting.....	46
4.5. Determinatie .....	47
5. Discussie.....	48
Laboproef.....	54
1. Doelstelling .....	54
2. Materiaal en methoden .....	54
2.1. Proefopzet.....	54
2.2. Kweek van de studie-organismen.....	56
2.2.1. <i>Lasius niger</i> .....	56
2.2.2. <i>CreMATogaster scutellaris</i> .....	57
2.2.3. <i>Acyrthosiphon pisum</i> .....	57
3. Dataverwerking .....	59
4. Resultaten.....	60
5. Discussie.....	62
Algemeen besluit .....	66
Toekomstperspectieven.....	68
Literatuurlijst .....	69
Bijlagen.....	78

## Lijst met figuren

Figuur 1. Algemene morfologie van een bladluis (A: zuigstekel, B: antennen, C: complexoog, D: twee tarsale segmenten, E: uniform vliesachtig vleugeloppervlak, F: sifuncelen) (Dixon, 2012).....	8
Figuur 2. Algemene éénhuizige (a) en tweehuizige cyclus (b) van een bladluis (Williams & Dixon, 2007).....	9
Figuur 3. Schematisch overzicht van de verschillende fysiologische mechanismen voor de osmoregulatie bij bladluizen (MG: middendarm, HG: einddarm) (Nalam <i>et al.</i> , 2020).....	12
Figuur 4. Algemene morfologie van een Formicinae werkster (Boer, 2015).....	16
Figuur 5. Typische levenscyclus van een kolonie mieren. Factor A en B zijn bepaalde biotische en abiotische omgevingsfactoren (Peeters & Molet, 2010).....	17
Figuur 6. Veranderingen in de demografie van een kolonie in functie van de tijd (Peeters & Molet, 2010).....	18
Figuur 7. Schematische voorstelling van opeenvolgende gebeurtenissen tijdens het volgen van een feromonenspoor na het ontdekken van een voedselbron (Billen, 2006).....	20
Figuur 8. Schematisch overzicht van de interactie tussen mier, Homoptera, plant en andere insecten (Delabie, 2001).....	24
Figuur 9. Kaart met verschillende locaties van de boomsoorten te Zele (1: <i>Tilia cordata</i> , 2: <i>Quercus palustris</i> en 3: <i>Acer pseudoplatanus</i> ) (ArcGIS Online, z.j.).....	37
Figuur 10. De behandeling met een alternatieve suikerbron voor <i>Tilia cordata</i> (links boven), <i>Acer pseudoplatanus</i> (links onder) en <i>Quercus palustris</i> (rechts) op een gemiddelde hoogte van resp. $77,6 \pm 19,2$ cm, $99,8 \pm 38,0$ cm en $192,4 \pm 52,9$ cm. De proef op <i>Acer pseudoplatanus</i> vond als laatste plaats, waardoor niet genoeg Biogluc® beschikbaar was om de zak volledig te vullen.....	38
Figuur 11. Invloed van de suikertoevoeging op de mieractiviteit ( $0,52$ mieren $\pm 0,08$ ) op <i>Tilia cordata</i> .....	41
Figuur 12. Geen invloed van de suikertoevoeging op het percentage kolonies met mieren in aanwezig per boom ( $p = 0,1564$ ) op <i>Tilia cordata</i> .....	41
Figuur 13. Invloed van de suikertoevoeging op de gemiddelde bladluizenkoloniegrootte van ( $2,89$ bladluizen $\pm 0,94$ ) op <i>Tilia cordata</i> .....	42
Figuur 14. Invloed van de suikertoevoeging op het gemiddelde aantal natuurlijke vijanden per boom ( $3,32$ natuurlijke vijanden $\pm 0,63$ ) op <i>Tilia cordata</i> .....	42
Figuur 15. Invloed van de suikertoevoeging op de mieractiviteit ( $4,22$ mieren $\pm 0,69$ ) op <i>Quercus palustris</i> .....	43
Figuur 16. Invloed van de suikertoevoeging op het percentage kolonies met mieren in aanwezig per boom ( $35,4\% \pm 5,21$ ) op <i>Quercus palustris</i> .....	43

Figuur 17. Invloed van de suikertoevoeging op de gemiddelde bladluizenkoloniegrootte van (1,67 bladluizen $\pm$ 0,21) op <i>Quercus palustris</i> .....	44
Figuur 18. Invloed van de suikertoevoeging op de mieractiviteit (2,45 mieren $\pm$ 0,58) op <i>Acer pseudoplatanus</i> .....	44
Figuur 19. Invloed van de suikertoevoeging op het percentage kolonies met mieren in aanwezig per boom (13,5% $\pm$ 4,39) op <i>Acer pseudoplatanus</i> .....	45
Figuur 20. Invloed van de suikertoevoeging op de gemiddelde bladluizenkoloniegrootte van (1,54 bladluizen $\pm$ 0,12) op <i>Acer pseudoplatanus</i> .....	45
Figuur 21. Invloed van de suikertoevoeging op het gemiddelde aantal natuurlijke vijanden per boom (3,56 natuurlijke vijanden $\pm$ 0,55) op <i>Acer pseudoplatanus</i> .....	46
Figuur 22. Aanwezigheid van wespen op de alternatieve suikerbron bij <i>Acer pseudoplatanus</i> op dag 8 (links). Vanaf valavond krijgen mieren de kans om zich ongestoord te voeden met de alternatieve suikerbron op <i>Acer pseudoplatanus</i> . Vanaf dit moment zijn er namelijk geen wespen meer aanwezig (rechts).....	51
Figuur 23. Dispensers met daarin Biogluc® met (rechts) en zonder (links) beschermhoes die de wiek afschermt voor wespen. ....	51
Figuur 24. Het artificieel nest met <i>Crematogaster scutellaris</i> werd verbonden aan de microkosmos van <i>Acyrtosiphon pisum</i> op zijn waardplant <i>Vicia faba</i> (links). Een close-up van de suikeroplossing Biogluc® in de microkosmos van <i>Acyrtosiphon pisum</i> (rechts).....	55
Figuur 25. Invloed van suikertoevoeging op de mediaan van het aantal <i>Acyrtosiphon pisum</i> per dag voor de behandeling met Biogluc®, de behandeling zonder Biogluc® en de controle .....	61
Figuur 26. Invloed van suikertoevoeging op de mediaan van het aantal <i>Acyrtosiphon pisum</i> per dag voor de behandeling met Biogluc® en de behandeling zonder Biogluc®.....	61
Figuur 27. <i>Vicia faba</i> planten na het aflopen van de proef in de behandeling met Biogluc® en <i>Crematogaster scutellaris</i> (links), in de behandeling met <i>Crematogaster scutellaris</i> zonder Biogluc® (midden) en in de controle zonder <i>Crematogaster scutellaris</i> (rechts)....	62
Figuur 28. <i>Crematogaster scutellaris</i> predateert op <i>Acyrtosiphon pisum</i> . Deze predatie is minder uitgesproken bij wanneer de suikeroplossing Biogluc® niet wordt aangeboden.....	63
Figuur 29. Plantendelen van <i>Vicia faba</i> werden aangevreten door <i>Crematogaster scutellaris</i> . .....	65

## Lijst met tabellen

Tabel 1. Informatie over de bomen waarop gemonitord werd. ....	36
Tabel 2. Overzicht van het effect van een alternatieve suikerbron op de mieractiviteit, het mierbezoek, de grootte van de bladluizenkolonies en het aantal natuurlijke vijanden tijdens de veldproef (+: positieve invloed, - : negatieve invloed, 0: neutrale invloed).....	46
Tabel 3. Overzicht mier- en bladluissoorten per boomsoort. ....	47
Tabel 4. Overzicht van de behandelingen en de controle waar de laboproef uit opgebouwd is. ....	55
Tabel 5. Significantie (p-waarden) tussen de twee behandelingen en de controle per monitoringsdag volgens de Dunn test.....	60
Tabel 6. De mediaan van het aantal <i>Acyrtosiphon pisum</i> per dag voor de behandeling met Biogluc®, de behandeling zonder Biogluc® en de controle. ....	60

## Inleiding

Mieren en bladluizen leven reeds miljoenen jaren in mutualisme met elkaar (Depa *et al.*, 2020). Deze samenlevingsvorm levert voordelen op voor beide partijen. Mieren oogsten honingdauw afkomstig van bladluizen. In ruil daarvoor beschermen ze de bladluizen tegen hun natuurlijke vijanden (Way, 1963). Bladluizen dienen bestreden te worden aangezien ze schade veroorzaken aan de plant wanneer ze zich met floëem voeden. Bovendien bezorgt de productie van honingdauw overlast aan de teler, buurtbewoner en omgeving.

Alle professionele gebruikers van gewasbeschermingsmiddelen dienen sinds 1 januari 2014 de principes van geïntegreerde plaagbestrijding (*Integrated Pest Management*, IPM) toe te passen (Van Liefferinge, 2016). Sinds 1 januari 2015 geldt een verbod op het gebruik van pesticiden op alle terreinen die horen bij een openbare dienst (VMM, 2014). De biologische bestrijding van bladluizen is dus een noodzaak. Echter bemoeilijkt het mutualisme tussen mier en bladluis deze biologische beheersing op bomen in de sierteelt en het openbaar groen. Mieren zelf zijn een geschikt biologisch controle organismen binnen IPM (Offenberg, 2015). Door ze volledig te elimineren wordt hun bijdrage aan een geïntegreerde plaagbestrijding uitgeschakeld, waardoor verschillende plagen in omvang kunnen toenemen. Daarom is het interessanter het evenwicht tussen mier en plaagorganisme te verschuiven van het verzorgen van de bladluizen naar de predatie ervan.

Tijdens dit onderzoek worden de interacties tussen mieren en bladluizen op bomen bestudeerd. De impact van deze samenlevingsvorm op biologische plaagbeheersing wordt in kaart gebracht. Daarnaast wordt nagegaan in welke mate het mutualisme verstoord kan worden door mieren een alternatieve suikerbron aan te bieden waardoor ze bladluizen geen bescherming meer bieden. Als gevolg neemt de predatie van bladluizen door natuurlijke vijanden toe.

Deze masterproef is opgebouwd uit drie delen, namelijk een literatuurstudie, een veldproef en een laboproef. De literatuurstudie vangt aan met een algemene schetsing van de bladluis en de mier. Vervolgens worden deze twee insecten samengebracht bij het bespreken van hun mutualisme. Er wordt getracht de onderlinge interacties tussen mier, bladluis, plant en natuurlijke vijanden van de bladluis kort te beschrijven. Tenslotte komt de biologische bestrijding van de bladluis aan bod door het mutualisme tussen mier en bladluis te verbreken met de focus op een substituant voor honingdauw.

De veldproef vond plaats tijdens de maand augustus (2020). Dezelfde proef werd telkens herhaald op drie verschillende boomsoorten op percelen te Zele van het bedrijf Greentraders bvba. Deze veldproef had als doel het effect van een alternatieve suikerbron Biogluc® van het bedrijf Biobest bvba op het mutualisme tussen mieren en bladluizen te monitoren. Bovendien werd nagegaan of de suikertoevoeging een impact had op de biologische beheersing van bladluizen. Bij de laboproef werd onderzocht of *Crematogaster scutellaris* in staat is de bladluizenpopulatie onder controle te houden. En verder, welke invloed het aanbieden van de alternatieve suikerbron Biogluc® hier op heeft.

# Literatuurstudie

## 1. Bladluizen (*Aphididae*)

Bladluizen komen voornamelijk voor in gematigde gebieden in de noordelijke hemisfeer (Podsiadlowski, 2016). De meest voorkomende bladluisoorten of soorten met het meeste economisch belang in de sierteelt zijn de katoenluis (*Aphis gossypii*), de boterbloemluis (*Aulacorthum solani*), de aardappeltopluis (*Macrosiphum euphorbiae*) en de groene perzikluis (*Myzus persicae*). Daarnaast behoren de zwarte bonenluis (*Aphis fabae*), de gevlekte bladluis (*Aulacorthum circumflexum*), de groene kortstaartluis (*Brachycaudus helichrysi*), de melige koolluis (*Brevicoryne brassicae*), de gewone rozenluis (*Macrosiphum rosae*), de sjalottenluis (*Myzus ascalonicus*), de tabaksperzikluis (*Myzus nicotianae*), *Myzus ornatus*, de groene slaluis (*Nasonovia ribisnigri*) en de gele rozeluis (*Rhodobium porosum*) ook tot de belangrijkste soorten (Syngenta, z.j.; Viridaxis, z.j.). Binnen de boomteelt komen bladluizen vooral voor in lindebomen, maar ook in esdoorns, haagbeuken en eikenbomen (De Witt, 2014).

### 1.1. Taxonomie

Bladluizen worden als volgt geclassificeerd volgens *the Integrated Taxonomic Information System* (ITIS):

<b>Fylum</b>	<i>Arthropoda</i>
<b>Subfylum</b>	<i>Hexapoda</i>
<b>Klasse</b>	<i>Insecta</i>
<b>Orde</b>	<i>Hemiptera</i>
<b>Onderorde</b>	<i>Homoptera</i>
<b>Subgroep</b>	<i>Sternorrhyncha</i>
<b>Superfamilie</b>	<i>Aphidoidea</i>
<b>Familie</b>	<i>Aphididae</i>

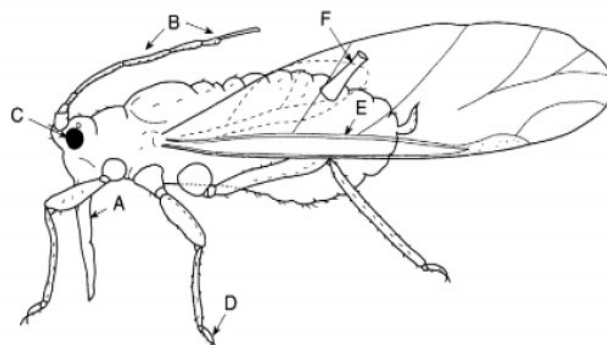
Bladluizen behoren tot de orde van Hemiptera of de snavelinsecten. Naast bladluizen behoren ook wantsen en cicaden hiertoe.

Sorensen (2009) omschrijft de taxonomie binnen de *Aphididae* als complex. Over de afbakening van subfamilies wordt namelijk veel gediscussieerd. De meeste subfamilies zijn klein, maar enkelen zijn groter en meer van belang. De subfamilie *Chaitophorinae* koloniseert *Salicaceae* (wilgen) en *Poaceae* (grassen). De nauw verwante subfamilies *Myzocallidinae*, *Drepanosiphinae* en *Phyllaphidinae* leven meestal op dicotyle bomen, *Fabaceae* (vlinderbloemigen) en bamboe. Naast *Pinaceae* (dennen), worden ook *Fagaceae* (beuken),

*Rosaceae* (rozen) en de wortels van *Asteraceae* (composieten) gekoloniseerd door de subfamilie *Lachninae*. Tot slot leven bladluizen van de subfamilie *Pemphiginae* meestal op wortels en alterneren ze tussen dicotyle bomen.

## 1.2. Morfologie

Bladluizen zijn relatief kleine (1–10 mm) insecten die een week, peervormig lichaam hebben. Figuur 1 duidt de meest kenmerkende morfologische eigenschappen van de bladluis aan. Typisch voor insecten behorend tot de orde Hemiptera is dat het labrum en labium vergroeid zijn tot één geheel, namelijk het rostrum (A). Verder zijn in dit rostrum steekborstels of stiletten aanwezig, die samen de zuigbuis en speekselbuis vormen. Deze structuren vormen samen de zuigsnavel. Met behulp van dit orgaan kan de bladluis makkelijk plantensap opzuigen. Het rostrum zorgt voor de bescherming van onderliggende structuren. Daarnaast heeft de bladluis twee lange, weinig gesegmenteerde antennes (B) en twee complexogen, die samengesteld zijn uit drie lenzen (C). Bladluizen worden verder ingedeeld op basis van de aan- of afwezigheid van een uniform vliesachtig vleugeloppervlak (E). Bladluizen waarvan de gevleugelde dochters (alatae) dit vleugeloppervlak bezitten, worden onderverdeeld onder de *Homoptera* of gelijkvleugeligen. In rust liggen de vleugels dakpansgewijs op het lichaam. Tot slot bezitten bladluizen op de bovenzijde van het vijfde of zesde tergiet een paar hoorntjes, sifonen of siphunculi (F) (Dixon, 2012). Dit kunnen poriën verspreid over het oppervlak van het abdomen of opgerichte, open buisjes zijn (Sorensen, 2009). Deze structuren staan in voor de productie van twee soorten defensieve vloeistoffen. Als eerste kunnen ze alarmferomonen produceren die zorgen voor een chemische waarschuwing naar soortgenoten bij gevaar. Daarnaast worden kleverige druppels gevormd. Deze druppels kleven aan de aanhangsels en monddelen van de predator (Alfaress *et al.*, 2018). Tenslotte kan de cauda of staartje als laatste kenmerk aangehaald worden. Deze structuur kan sterk variëren in vorm en is het uiteinde van het laatste abdominaal segment (Sorensen, 2009). Door snelle bewegingen te maken met de cauda wordt de honingdauw uitgeworpen. Op deze manier komt het niet over het insect zelf of de kolonie heen (Sorensen, 2009; Stewart-Jones *et al.*, 2008).



Figuur 1. Algemene morfologie van een bladluis (A: zuigstengel, B: antennes, C: complexoog, D: twee tarsale segmenten, E: uniform vliesachtig vleugeloppervlak, F: sifuncelen) (Dixon, 2012).

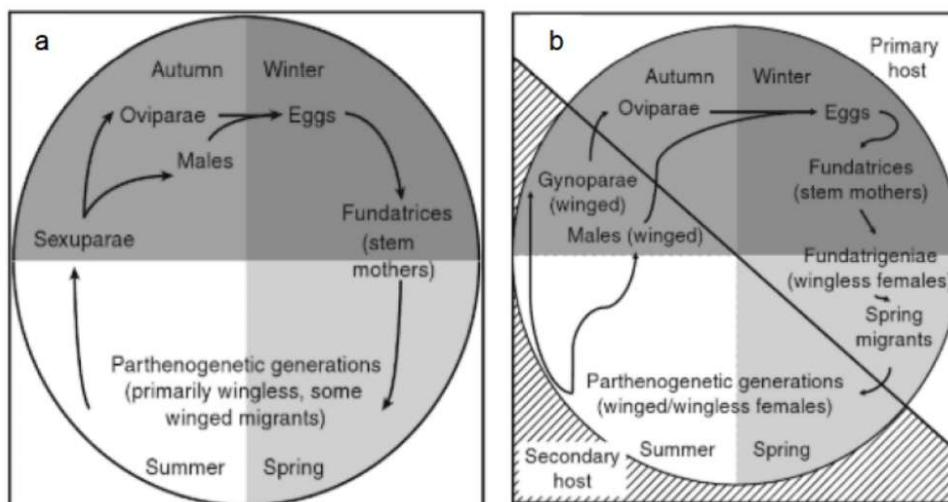
### 1.3. Levenswijze

Bladluizen hebben doorheen de evolutie twee interessante aanpassingen ontwikkeld. Ten eerste beschikken ze over een uitzonderlijk hoge reproductiesnelheid. Daarnaast kunnen ze zich passief verplaatsen door middel van de wind. Deze twee factoren hebben er tot geleid dat bladluizen tot onze belangrijkste concurrenten behoren sinds de mens met landbouw startte (Sorensen, 2009).

Er worden bij bladluizen twee types levenscyclussen waargenomen afhankelijk van het aantal verschillende waardplanten waar de bladluis op leeft doorheen het jaar, namelijk de éénhuizige (mono-oecische) cyclus en de meerhuizige (hetero-oecische) cyclus, zoals de tweehuizige (di-oecische) cyclus.

Eénhuizige bladluizen (Figuur 2a) hebben een levenscyclus die zich afspeelt op eenzelfde plantensoort. Hier staat de stammoeder in voor de volgende generaties (Williams & Dixon, 2007). Alatae of gevleugelde bladluizen zijn hierbij niet vanzelfsprekend, maar als deze zich toch ontwikkelen vliegen ze naar een soortgelijke plant (Rabbinge, 1980). De voortplanting gebeurt op parthenogenetische wijze. In de herfst vindt de paring van mannetjes en vrouwtjes (oviparae) plaats met als gevolg de vorming van eitjes.

Een tweehuizige levenscyclus (Figuur 2b) speelt zich af op een primaire of winterwaardplant alsook op een secundaire of zomerwaardplant. Seksuele voortplanting gebeurt hier steeds in de herfst met de productie van eitjes. Deze fase vindt plaats op de winterwaardplant. Pas in de lente ontstaan uit deze eitjes de vleugellose moeders of fundatrix. De secundaire waardplant wordt bereikt door de alatae. Hier vindt gedurende de zomer parthenogenetische voortplanting plaats. Op het einde van de zomer vliegen de gevleugelde mannetjes en de parthenogenetische moeders die de seksuele generatie zullen voortbrengen (gynoparae) terug naar hun winterwaardplant (Williams & Dixon, 2007).



Figuur 2. Algemene éénhuizige (a) en tweehuizige cyclus (b) van een bladluis (Williams & Dixon, 2007).



Soorten die nooit eitjes produceren worden anholocyclisch genoemd. Holocyclische soorten kunnen zich zowel seksueel als parthenogenetisch voorplanten. Bladluizen zijn dus gedurende het grootste deel van hun leven levendbarend, ook wel vivipaar genoemd (Sorensen, 2009).

Bladluizen voeden zich met het floëmsap van hun waardplant. Het suiker in floëem bestaat bijna uitsluitend uit sucrose. De stiletten zijn bedekt met dat het enzym pectinase bevat. Dit pectine-afbrekend enzym maakt dat de binding tussen plantencellen verbroken wordt. Zo bereiken de stiletten de zeefvaten om het sap te extraheren zonder plantencellen te penetreren. Het floëmsap wordt via het voedingskanaal (*food canal*) opgenomen om vervolgens via de middendarm (MG) de einddarm (HG) van de luis te bereiken (Figuur 3). Hierbij worden de voedingsstoffen doorheen het darmepitheel richting de hemolymfe getransporteerd. Het darmepitheel treedt hierbij als selectieve barrière op voor de gecontroleerde uitwisseling van ionen en water, terwijl toxische stoffen en micro-organismen worden geweerd (J.-H. Huang et al., 2015). De circulerende vloeistof of 'bloed' van een insect wordt gedefinieerd als hemolymfe. Het bestaat voornamelijk uit water dat als solvent voor allerlei moleculen fungeert (Kanost, 2009). De hemolymfe van een bladluis beschikt over een gespecialiseerde groep cellen, mycometa genaamd. Deze groep cellen wordt gekoloniseerd door *Rickettsia-achtige* bacteriën (Francis et al., 2010; Sorensen, 2009). Daarnaast is ook de bacteriesoort *Buchnera* als primaire endosymbiont aanwezig in de bladluis (Douglas, 2006; Francis et al., 2010). De reden dat deze symbiotische micro-organismen aanwezig zijn wordt gelinkt aan de hoge verhouding niet-essentiële/essentiële aminozuren in het floëmsap. Deze symbiotische bacteriën helpen bij de synthese en de voorziening van essentiële aminozuren voor de luis (Douglas, 2006; Woodring et al., 2004).

Bladluizen communiceren door middel van feromonen en geluid (Sorensen, 2009). Feromonen zijn chemische signaalmoleculen die geproduceerd worden door de exocriene klieren van de insecten (Billen & Morgan, 1998). Wanneer een bladluis in contact komt met een parasiet of predator verspreidt het een alarmferomoon via de sifunculen. Als reactie hierop laten bladluizen in de omgeving zich vallen als ontsnappingspoging. Daarnaast kunnen vrouwelijke individuen via gespecialiseerde poriën op de tibiae seksferomonen verspreiden om zo mannelijke individuen te lokken (Sorensen, 2009).

#### 1.4. Honingdauw

Honingdauw is een uitscheidingsproduct van wortel-, stam- of schildluizen en overige *Homoptera* en bestaat voornamelijk uit water, koolhydraten en aminozuren (Boer, 2015). Het is een zoet afvalproduct als gevolg van het suikerrijke maar aminozuurarme floëmsap waar deze insecten zich mee voeden (Fischer & Shingleton, 2001). Het is een waterig mengsel dat uit verschillende chemische componenten bestaat waarvan verschillende suikers (90 - 98% van de droge stof) en aminozuren de belangrijkste zijn (Leroy et al., 2011; Völkl et al., 1999). Veel dieren, zoals vogels, mieren, bijen, wespen, fruitvliegen, zweefvliegen en slakken, nuttigen honingdauw als voedselbron (Moir et al., 2018; Way, 1963).

Leroy *et al.* (2011) concluderen dat er zeven factoren zijn die de samenstelling van honingdauw beïnvloeden: (1) de waardplant, (2) de nutritionele toestand van de plant, (3) de bladluisoort en ontwikkelingsfase van het insect, (4) de snelheid en de duur van de bladluisbesmetting, (5) de aanwezigheid van mieren, (6) de aanwezigheid van bacteriële intracellulaire symbionten en (7) de graad van parasitisme en de aanwezigheid van secundaire plantmetabolieten. De aanwezige aminozuren in de honingdauw hangen naast het voedsel van de bladluis af van de endosymbionten aanwezig in het insect (Woodring *et al.*, 2004).

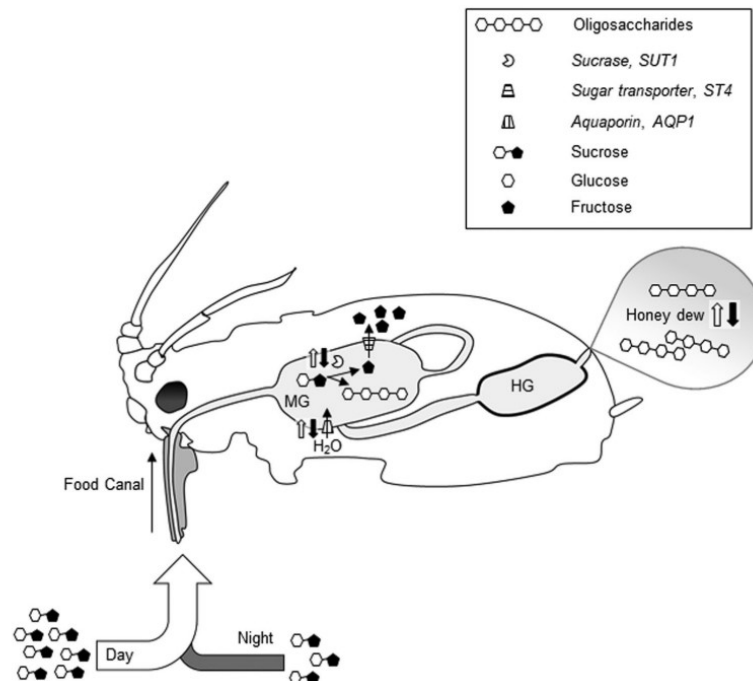
De suikersamenstelling van honingdauw weerspiegelt de samenstelling van het floëem van de waardplant. Zo zijn glucose, fructose, sucrose en maltose universeel aanwezig in zowel floëemsap als in honingdauw (Woodring *et al.*, 2004). Enerzijds wordt een deel van de sucrose en maltose door het insect afgebroken, anderzijds worden complexe suikers in de darm geassimileerd. De trisachariden melezitose, fructomaltose en raffinose en de disachariden trehalose en trehalulose zijn hier voorbeelden van (Mittler, 1958).

De melezitose aanwezig in honingdauw speelt een belangrijke rol in het mutualisme tussen mier en bladluis (Völkl *et al.*, 1999). Het wordt gevormd in de darm van de bladluis en bestaat uit twee moleculen glucose en één molecule fructose. Fisher *et al.* (1984) toonden aan dat de hoeveelheid melezitose in de honingdauw van de groene perzikluis (*Myzus persicae*) afhangt van de kwaliteit van het dieet waar de luis zich mee voedt. De concentratie melezitose neemt toe bij een toenemende concentratie sucrose in het dieet. Fischer en Shingleton (2001) bekwamen gelijkaardige concentraties in de honingdauw van bladluizen op de populieren *Populus tremula* en *P. alba*. Aangezien melezitose steeds aanwezig was in de honingdauw van de verschillende bladluisoorten concluderen Fischer en Shingleton (2001) dat de trisacharide naast het aantrekken van mieren een bijkomende rol moet hebben, namelijk osmoregulatie. Dit wordt verklaard in een onderzoek van Fisher, Wright en Mittler (1984) naar de fysiologische rol van oligosachariden in honingdauw. De osmolaliteit van plantenfloëem varieert van 828 naar 1800 milliosmolal, terwijl de osmolaliteit van honingdauw relatief constant blijft rond een waarde van 500 milliosmolal. Een te hoge concentratie aan sucrose in de darm van het insect zou aan omliggend weefsel water onttrekken. Dit zou zeker het geval zijn als alle aanwezige suikers als monosachariden aanwezig zijn (Woodring *et al.*, 2004). Nalam *et al.* (2020) besluiten dat een reeks fysiologische mechanismen (Figuur 3) en gedragingen bladluizen in staat stellen om hoge osmotische stress te verdragen en het suikerrijke floëemsap te nuttigen.

In de eerste plaats worden sucrose gehydrolyseerd, fructose geassimileerd en glucosemoleculen gepolymeriseerd tot oligosachariden dankzij het enzym sucrase aanwezig in de darm. Ten tweede draagt de watercyclus vanuit de distale naar de proximale regio's van de darm bij tot de osmoregulatie. De hoge waterflux wordt gemedieerd door membraangebonden aquaporines. Deze verdunning van de darminhoud leidt vervolgens tot de productie en uitscheiding van honingdauw. Ten slotte zuigen bladluizen geregeld xyleemsap op. Dit heeft een lage osmolaliteit en helpt het osmotisch potentiaal in de darm te regelen.

Het vermogen van bladluizen om trisacchariden in de darm te synthetiseren uit monosacchariden is waarschijnlijk geëvolueerd om dit osmotisch onevenwicht te reduceren (Woodring *et al.*, 2004). Dit osmoregulerend vermogen wordt verwezenlijkt door de variatie in het gemiddeld moleculair gewicht van de gesynthetiseerde oligosacchariden waaronder melezitose (Fisher *et al.*, 1984).

Honingdauw van de polyfage bladluisoort *Aphis fabae* vertoont volgens Douglas (1993) op verschillende waardplanten verschillende aminozuurpatronen. Asparagine en glutamine zijn de twee meest voorkomende aminozuren in honingdauw geproduceerd door de meeste bladluisoorten (Leroy *et al.*, 2011; Woodring *et al.*, 2004).



Figuur 3. Schematisch overzicht van de verschillende fysiologische mechanismen voor de osmoregulatie bij bladluizen (MG: middendarm, HG: einddarm) (Nalam *et al.*, 2020).

Woodring *et al.* (2004) constateerden een onverwacht sterke correlatie tussen de totale aminozuurconcentratie en de totale concentratie aan suiker in honingdauw. Dit suggereert dat bladluizen meer floëmsap opnemen dan nodig om aan hun aminozuurbehoefte te voldoen. Op deze manier zijn ze in staat grote hoeveelheden suikerrijke honingdauw te produceren om zo mieren aan te trekken ter bescherming tegen natuurlijke vijanden.

Bladluizen die geen symbiose aangaan met mieren nemen een minimale hoeveelheid plantensap op om aan hun aminozuurbehoefte te voldoen. Zij hebben geen nood aan grote hoeveelheden honingdauw. De erwtbladluis (*Acyrtosiphon pisum*) is een bladluisoort die niet verzorgd wordt door mieren (Blanchard *et al.*, 2019; Oliver *et al.*, 2007; Völkl *et al.*, 1999).

## 1.5. Schadebeeld

Wanneer bladluizen zich voeden met floëem veroorzaken ze zelf schade aan de plant, terwijl de productie van honingdauw overlast bezorgt aan de teler, buurtbewoner en omgeving. Nadelen veroorzaakt door bladluizen kunnen zo opgedeeld worden in primaire en secundaire schade. Zeker in systemen met een geringe diversiteit zoals serres, akkers en boomgaarden kan de aanwezigheid van Homoptera leiden tot grote gewasschade (Beattie, 1985).

Sommige bladluizen zijn in staat de planten te verwonden waardoor ze directe schade zoals bladgallen, bladvervormingen en bladnecrose veroorzaken. Op die manier wordt de waardplant gemanipuleerd zodat het insect beschermd wordt en toegang krijgt tot een verhoogde hoeveelheid nutriënten (Sorensen, 2009). Fytohormonen zijn vaak het doelwit van organismen die planten manipuleren. Deze hormonen zijn belangrijke regulatoren van plantengroei, -differentiatie en -verdediging, waardoor ze als sleutelfactoren beschouwd worden voor de galdifferentiatie (Giron *et al.*, 2016; Tooker & Helms, 2014). Door effectoren aanwezig in het speeksel van Hemiptera worden de verdedigingsreacties van de plant op een actieve manier onderdrukt. Naast deze onderdrukking worden wijzigingen in de plantenontwikkeling en manipulatie van plantendelen veroorzaakt door deze effectoren (Giron *et al.*, 2016; Hogenhout & Bos, 2011). Daarnaast wordt door het onttrekken van voedingsstoffen door larven en volwassen bladluizen de groeihormonenbalans van de plant verstoord. In het vroege voorjaar kan dit groeiremming als gevolg hebben (Van der Horst, 1998).

Bladluizen zijn belangrijke vectoren van plantenvirussen. Deze virussen worden via het speeksel van het insect in de plant geïnjecteerd wanneer het zich voedt met floëem (Delabie, 2001). Eén van de belangrijkste overbrenger van virusziekten is de groene perzikluis (*Myzus persicae*). Deze bladluis kan meer dan 100 verschillende virussen overbrengen. Daarnaast zijn de katoenluis (*Aphis gossypii*), de zwarte bonenluis (*Aphis fabae*) en de zwarte kersenluis (*Myzus cerasi*) vectoren van virussen in de boomkwekerij (Van der Horst, 1998).

De secundaire gevolgen van de aanwezigheid van bladluizen worden veroorzaakt door de productie van honingdauw. Het leidt op verschillende vlakken tot schade en/of overlast. Zo is honingdauw een groeimedium voor roetdauwschimmels. Deze schimmels doen het fotosynthetisch oppervlak en de gasuitwisseling van de bladeren afnemen. Het kleurt het oppervlakte zwart zonder een infectie te veroorzaken. Roetdauwschimmels zijn namelijk niet-pathogeen en niet-parasitair. Ze overleven saprofytisch als mycelium of als sporen op onder meer plantenresten (Nelson, 2006). Vervolgens kunnen ze andere schimmelziekten bevorderen (Sorensen, 2009). Deze factoren leiden naast een opbrengstderving van landbouwgewassen ook tot een daling in cosmetische waarde bij sierplanten en geogste groenten en fruit. Wat resulteert in een verlaagde marktwaarde (Moir *et al.*, 2018; Nelson, 2006).

Daarnaast kan de productie van honingdauw tot grote overlast voor de omgeving en buurtbewoners leiden. Het uitscheidingsproduct komt op alles wat eronder staat terecht:

auto's, zitmeubilair, terrassen, beplanting enzovoort met als gevolg dat dit kleverig en smerig wordt (De Witt, 2014).

De omvang van deze negatieve gevolgen hangt onder andere af van de heersende omstandigheden in het voorjaar; een warm voorjaar zal er toe leiden dat de wintereitjes van de bladluizen reeds vroeg ontwikkelen. De hieropvolgende generatie zal zich ook weer sneller ontwikkelen wanneer het voorjaar voldoende warm blijft. Verder speelt het aantal wintereitjes op de bomen een rol (Joosten & Lansink, 2010).

### 1.6. *Acyrtosiphon pisum*

*Acyrtosiphon pisum* of de erwtenbladluis behoort tot de veertien belangrijkste bladluisplagen op landbouwgewassen. Deze groene bladluis leeft op peulvruchten. Meestal behoren zijn waardplanten tot de familie Fabaceae. In koudgematigde streken is *A. pisum* holocyclisch, er is dus geen echte waardwissel, en produceert deze bladluis oviparae en mannetjes. In de herfst produceren ze in Europa alate sexuparae en mannetjes. De geslachtelijke fase vindt plaats op *Vicia* (Blackman & Eastop, 2007). Deze bladluissoort wordt in laboratoria gebruikt voor genetische en fysiologische onderzoeken. Voordelen van deze soort zijn dat ze holocyclisch zijn en dat parthenogenetische lijnen in groeikamers permanent in stand kunnen gehouden worden (Brisson & Stern, 2006). *A. pisum* doorloopt vier nimfale stadia waarna ze vervelt tot adult (Blackman, 1987).

Deze bladluizensoort werd gebruikt om de laboproef mee uit te voeren.

## 2. Mieren (*Formicidae*)

Biogeografisch gezien zijn *Formicidae* verspreid over heel de wereld. Slechts op Antarctica, IJsland, Groenland, verschillende delen van Polynesië en enkele verafgelegen eilanden in de Atlantische en Indische oceaan komen geen inheemse *Formicidae* voor. Ze vertegenwoordigen bijna 15% van de dierlijke biomassa op land (Hölldobler & Wilson, 1990).

Op basis van verzamelingen, veldonderzoek en literatuur werd in 2002 de database FORMIDABEL samengesteld die de populatie mieren in België in kaart bracht. Sindsdien wordt FORMIDABEL tweemaal per jaar aangevuld. Volgens de database kunnen er in België 76 inheemse en 9 geïntroduceerde mierensoorten aangetroffen worden. De meest voorkomende subfamilies zijn *Formicinae* (49,4%) en *Myrmicinae* (48,7%). De subfamilies *Dolichoderinae* (0,9%) en *Ponerinae* (0,8%) komen slechts zelden voor. Vervolgens zijn de vijf meest voorkomende soorten in België de wegmier (*Lasius niger*), de gewone steekmier (*Myrmica rubra*), de moerassteekmier (*Myrmica scabrinodis*), de grauwwarte renmier (*Formica fusca*) en de zandsteekmier (*Myrmica sabuleti*) (Dekoninck *et al.*, 2003).

### 2.1. Taxonomie

Mieren worden als volgt geclassificeerd door ITIS:

<b>Fylum</b>	<i>Arthropoda</i>
<b>Subfylum</b>	<i>Hexapoda</i>
<b>Klasse</b>	<i>Insecta</i>
<b>Orde</b>	<i>Hymenoptera</i>
<b>Onderorde</b>	<i>Apocrita</i>
<b>Superfamilie</b>	<i>Vespoidea</i>
<b>Familie</b>	<i>Formicidae</i>
<b>Subfamilie*</b>	<i>Dolichoderinae, Formicinae, Myrmicinae, Ponerinae</i>
<b>Genus*</b>	<i>Anergates, Aphaenogaster, Camponotus, Dolichoderus, Formica, Formicoxenus, Harpagoxenus, Hypoponera, Lasius, Leptothorax, Linepithema, Manica, Monomorium, Myrmecina, Myrmica, Plagiolepis, Polyergus, Poneria, Solenopsis, Stenammas, Strongylognathus, Tapinoma, Technomyrmex, Temnothorax en Tetramorium.</i>

\*Opsomming van de meest voorkomende subfamilies en geslachten in België (Dekoninck *et al.*, 2003).

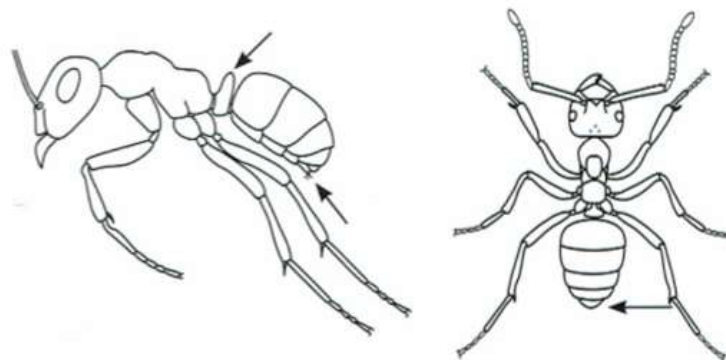
De wegmier (*Lasius niger*), ook wel bruine wegmier, zwarte wegmier, zwartbruine wegmier of tuinmier (Boer, 2015), is een wijd verspreide inheemse soort binnen West-Europa, zowel in stedelijke als landelijke gebieden. *L. niger* wordt daarom in deze literatuurstudie als typevoorbeeld beschreven. Het is een eurytope soort. De koningin is monogyn en leeft in een monodoom. Een gevolg hiervan is dat wanneer de koningin sterft de hele kolonie kans loopt ook te sterven. Ze wordt bevrucht door één of twee, zeer zelden meer, mannetjes. De natuurlijke habitat van deze soort is een dynamische zandbodem. Het nest bevindt zich onder de grond. Volgens Boer (2015) valt de periode met waarneembare bruidsvluchten in Nederland tussen eind juni en eind september. Wanneer de weersomstandigheden gunstig zijn, vliegen zowel de mannetjes als de gynen of nieuwe koninginnen uit, beiden zijn immers gevleugeld. Bij *L. niger* gebeurt dit op een zonnige, zwoele, windstille dag (Schoeters & Vankerkhoven, 2001).

## 2.2. Morfologie

De wegmier behoort tot de subfamilie *Formicinae*, oftewel de schubmieren (Figuur 4). Deze subfamilie dankt zijn naam aan de knoop, schub of petiolus die zich tussen het mesosoma en het gaster bevindt. Achteraan het gaster bevindt zich een acidoporus met daarrond een krans van setae. De koningin is gevleugeld of vertoont na het afwerpen van de vleugels vleugellittekens op de thorax. Ze beschikt over ocellen en van bovenaf zijn vijf rugplaten van het mesosoma zichtbaar. De werksters van schubmieren zijn ongevleugeld en beschikken over geen of slechts kleine ocellen. Van bovenaf zijn eveneens vijf tergieten van het gaster zichtbaar. Bij de steeds gevleugelde mannetjes zijn de copulatieorganen opvallend, ze beschikken over ocellen en tellen van bovenaf zes tergieten (Boer, 2015).

De soortnaam van *L. niger* slaat op het kleur zwart. De eerste nakomelingen van een nieuwe *L. niger* koningin zijn inderdaad zwart. De daaropvolgende werksters zijn mat zwart tot grauwdonkerbruin en hebben een overvloedige, fijne beharing.

In het geval van deze mierensoort zijn koninginnen groter (7-9 mm) dan hun werksters (2,5-5 mm). Een koningin heeft een gemiddelde levensduur van 20 jaar, terwijl haar werksters gemiddeld 3 jaar leven. In tegenstelling tot andere soorten is *L. niger* monomorf. De foeragerende werksters en de werksters die verzorgende taken op zich nemen kennen een uniforme morfologie (Quque *et al.*, 2019).



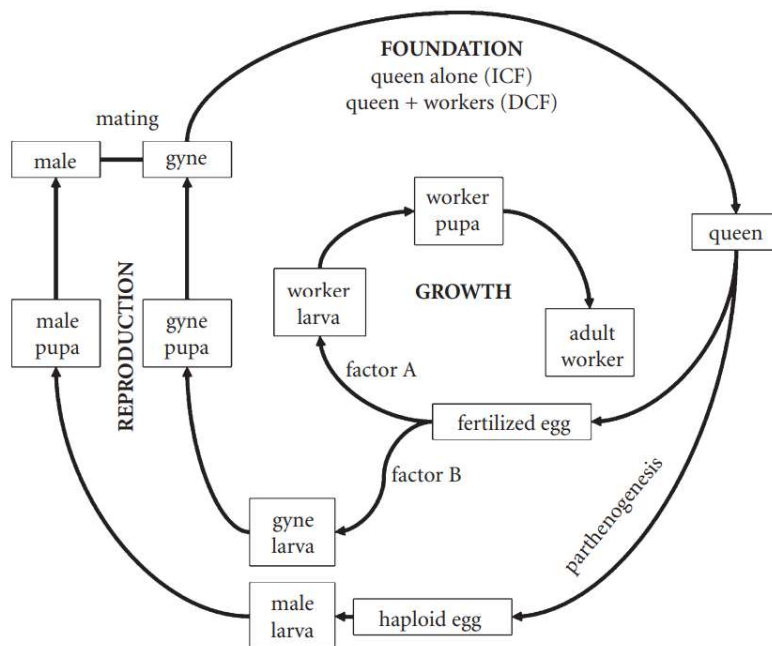
Figuur 4. Algemene morfologie van een *Formicinae* werkster (Boer, 2015).

### 2.3. Ontwikkeling tot kolonie

Mieren zijn sociale insecten en leven in kolonies. De term kolonie kan als volgt worden gedefinieerd: 'verschillende individuele organismen (vooral van dezelfde soort) die in nauw verband met elkaar samenleven'. In het geval van mieren is dit vergaand. Een kolonie mieren wordt gezien als een superorganisme, waar de taakverdeling uiterst gespecialiseerd is en waar individuen op zichzelf niet in staat zijn lang te overleven. Mieren zijn eusociaal. Eusocialiteit is een evolutionair vergevorderde sociale samenlevingsvorm. Het wordt gekarakteriseerd door overlappende generaties, een coöperatieve broedzorg en gespecialiseerde reproductieve en non-reproductieve kasten (Wilson & Hölldobler, 2005).

Een kolonie bestaat uit een koningin, werksters en broed. Afhankelijk van het seizoen zijn er mannetjes en jong gevleugelde gynen aanwezig. De specialisatie van taken binnen de kolonie leidt tot intraspecifieke verschillen in gedrag, morfologie, fysiologie en levensduur van een individu binnen een kaste. De grootste kaste is deze van de steriele wijfjes of de werksters. Werksters kunnen een verkennende, foeragerende of verzorgende taak binnen het nest opnemen (Quque *et al.*, 2019).

De ontwikkelingscyclus van broed tot adult verloopt voor werksters anders dan voor mannetjes en gynen (Figuur 5). Werkstereieren worden gedurende het ganse jaar door gelegd, uitgezonderd tijdens de winterperiode. Larven die gegroeid zijn uit eieren afgelegd in het najaar, overwinteren in het nest. Er zijn dus steeds werksters aanwezig in de kolonie. Mannetjes en jonge gynen worden slechts tijdens een bepaalde periode van het jaar geproduceerd. In het noordelijk halfrond gebeurt dit tijdens de zomerperiode beginnend vanaf de maand april. Externe omstandigheden bepalen het exacte moment waarop de mannetjes

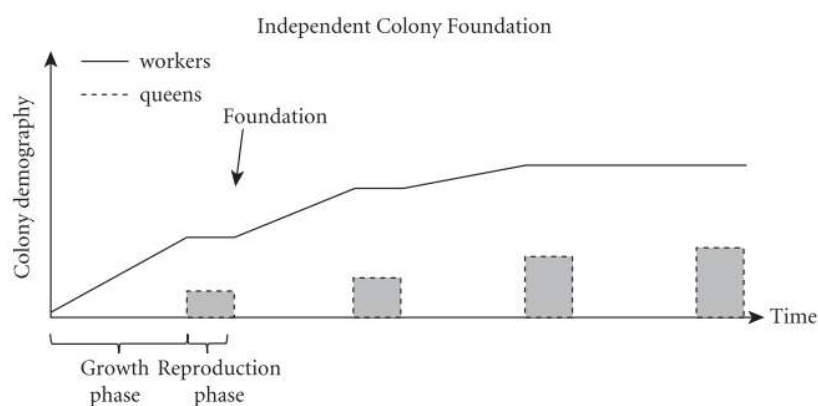


Figuur 5. Typische levenscyclus van een kolonie mieren. Factor A en B zijn bepaalde biotische en abiotische omgevingsfactoren (Peeters & Molet, 2010).



en de wijfjes elkaar zoeken. Tijdens deze vlucht wordt gepaard. Dit wordt een bruidsvlucht of zwermvlucht genoemd. De levensduur van de mannetjes is hooguit tot één dag na deze vlucht (Boer, 2015). Er zijn soorten die andere methodes hanteren om te paren.

Een kolonie doorloopt drie stadia en neemt sterk toe in omvang over de jaren heen (Figuur 6). De eerste fase, de stichtingsfase, begint na het paren. De jonge koningin copuleert gebeurt afhankelijk van de soort door één of meerdere mannetjes. Voor het stichten van een nieuwe kolonie worden twee strategieën beschreven. De levenscyclus van een kolonie is afhankelijk van deze strategie. De onafhankelijke koloniestichting, waar de koningin alleen een nieuwe kolonie sticht, is de meest verspreide strategie over alle taxonomische groepen. Sommige mierensoorten hanteren daarentegen de afhankelijke koloniestichting, waar de koningin geen kolonie kan stichten zonder de hulp van werksters uit haar geboortekolonie.



Figuur 6. Veranderingen in de demografie van een kolonie in functie van de tijd (Peeters & Molet, 2010).

De stichting van een *L. niger* kolonie verloopt volgens de onafhankelijke koloniestichting. De jonge koningin komt na de paring terug op de grond terecht, breekt haar vleugels met haar poten af en graaft een eerste, afgesloten kamer om een kolonie te stichten. Dit wordt een claustrale of gesloten koloniestichting genoemd. Al snel worden de eerste eitjes afgelegd. De mier wordt, als vertegenwoordiger van de Hymenoptera, geclassificeerd onder Holometabola. Dit zijn gevleugelde insecten die een holometabole of volledige gedaanteverwisseling ondergaan. In de ontwikkeling van ei tot adult zijn drie fasen te onderscheiden. De eerste fase is het ei waaruit de tweede fase, de larve, zich ontwikkelt. De larve wordt gedurende enkele weken gevoed. Het gewicht van de larve neemt tijdens deze periode continu toe, terwijl de grootte van de larve discreet toeneemt. De larve groeit namelijk door te vervellen. Afhankelijk van de soort worden drie tot vijf larvale stadia onderscheiden. Eens de kritische grootte is bereikt, ondergaat de larve een metamorfose. Ondertussen bepalen omgevingsfactoren, zoals koude en beschikbaar voedsel of een vrouwelijke larve al dan niet naar een werkster of een gyne evolueert. Uit het laatste larvale stadium ontwikkelt zich het imago dat geen verdere groei ondergaat (Peeters & Molet, 2010). Bij *L. niger* neemt dit proces ongeveer acht weken in beslag.

De eerste werksters of nanitici, meestal slechts een tiental exemplaren, zijn opmerkelijk kleiner dan de daaropvolgende werksters. Het beperkt aantal en de kleine grootte van de nanitici zijn twee gevolgen van de beperkte voedingswaarde die op dat moment binnen het nest beschikbaar is. Deze eerste larven worden gevoed door gemobiliseerde voedingsstoffen van de koningin. Een grote hoeveelheid lipiden is afkomstig uit het vetlichaam in het gaster van de koningin (Peeters & Molet, 2010). Proteïnen zijn afkomstig van de histolyse van de vleugelspijeren. Van zodra de eerste werksters zijn uitgekomen, nemen zij de verzorgingstaak op zich. Ze verzorgen het broed en gaan op zoek naar voedsel en water om zowel de koningin als de volgende larven te voeden (Schoeters & Vankerhoven, 2001).

De volgende fase is de groeifase van de kolonie. Tijdens deze fase neemt de productie van werksters toe. Een mierenkolonie werkt volgens een uiterst gebalanceerde systeem. Hölldobler en Wilson (1990) beschrijven de levenscyclus van een mierenkolonie als volgt: “*an orchestration of energy investments, in which workers are multiplied until [...] it is profitable to convert part of the net yield into new queens and males*”. Dit is reeds vroeg in de ontwikkeling van de kolonie duidelijk. De eerste werksters zijn stukken kleiner en zwakker in vergelijking met de daaropvolgende werksters. Dit is het resultaat van een vooraf geplande verdeling van de voedselbronnen. Hoe meer werksters, hoe effectiever de kolonie. Het aantal nakomelingen en hun kwaliteit (zoals grootte, gewicht en metabolische reserves) hebben grote gevolgen op de capaciteit van de kolonie om zich te verspreiden in hun habitat en nieuwe territoria te verkennen (Peeters & Molet, 2010). Daarom bestaat een beginnende kolonie uit een groter aantal werksters van lagere kwaliteit dan een klein aantal van hoge kwaliteit. Wanneer het aantal werksters en voedselbronnen toenemen, zullen er zich meer en grotere werksters ontwikkelen. Daarnaast passen de werksters hun gedrag aan naarmate de kolonie groeit. De eerste werksters zijn meer terughoudend aangezien ieder individu een grote rol speelt tijdens deze fase, terwijl latere kolonies makkelijk een individu opofferen om van een natuurlijke vijand af te geraken. De koningin heeft vanaf deze fase slechts één taak, namelijk het leggen van eieren. Vanaf dit moment is ze afhankelijk van haar werksters.

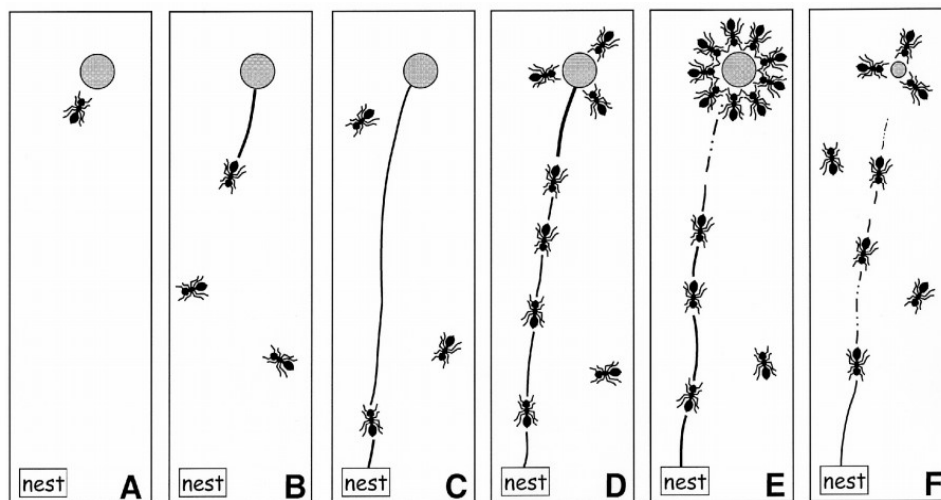
Wanneer de grootte van de kolonie een bepaald niveau, dat afhankelijk is van biotische en abiotische omgevingsfactoren, overstijgt, gaat het over naar de volgende fase, de reproductiefase. De kolonie start met gevleugelde mieren (gynen en mannetjes) voort te brengen (Hölldobler & Wilson, 1990). Mannetjes komen voort uit parthenogenese of ongeslachtelijke voortplanting (Peeters & Molet, 2010). Wanneer de mannetjes en de gynen het nest verlaten, herhaalt de cyclus zich.

## 2.4. Levenswijze

Mieren communiceren, net zoals bladluizen, met elkaar via feromonen. Feromonen worden onderverdeeld in twee groepen naargelang het effect dat ze veroorzaken: primerferomonen en releaseferomonen. De eerste groep leidt tot een metabole of morfogenetische verandering. De tweede groep wekt rechtstreeks een bepaald gedragspatroon op. Feromonen van de eerste groep zijn onomkeerbaar, terwijl feromonen van de tweede groep dat wel zijn. Tal van

releaseferomonen zijn gedefinieerd. Hiertoe behoren seksferomonen, alarmferomonen, broedferomonen, verzamelferomonen (Vander Meer & Alonso, 1998) en spoorferomonen. De hoeveelheid feromoon en de componenten waaruit het feromoon is opgebouwd, bepalen het gedrag dat de stof kan uitlokken (Morgan, 2009).

Figuur 7 schetst de situatie wanneer een verkennende werkster een voedselbron ontdekt (A). De mier in kwestie laat een feromonenspoor achter terwijl het terugkeert naar het nest (B). Werkster in het nest en de omgeving vangen het spoor op en volgen het tot aan de voedselbron (C). Ook deze werksters laten onderweg een feromonenspoor achter, waardoor het initiële spoor versterkt wordt (D). Als gevolg worden meer mieren aangetrokken tot de voedselbron totdat deze uitgeput is (E en F) (Billen, 2006).



Figuur 7. Schematische voorstelling van opeenvolgende gebeurtenissen tijdens het volgen van een feromonenspoor na het ontdekken van een voedselbron (Billen, 2006).

De twee macronutriënten waar mieren naar op zoek gaan zijn koolhydraten en proteïnen. Werksters hebben voornamelijk nood aan koolhydraten voor energieproductie, terwijl koninginnen en larven vooral nood hebben aan proteïnen om resp. eieren te leggen en te groeien (Hölldobler & Wilson, 1990). Om aan proteïnen tegemoet te komen, doen mieren aan predatie of zijn het aaseters van invertebraten die behoren tot de Arthropoda en de Annelida. De meeste mierensoorten zijn generalisten op vlak van voedsel. Slechts enkele soorten die nestelen en foerageren op de grond zijn strikte predatoren. Prooi of aas wordt naar het nest gedragen. Mieren nuttigen (extraflorale) nectar of plantenexudaten en honingdauw, geproduceerd door insecten van de orde Hemiptera, om aan de vraag van koolhydraten te voldoen (Cerde & Dejean, 2011).

Werksters hebben een sociale maag (krop) waarin vloeibaar voedsel zoals nectar en honingdauw wordt opgeslagen. Vervolgens wordt dit via trophallaxis van mond-op-mond gedeeld via de werksters naar elkaar, de larven, de koningin(nen), de mannetjes en de jonge gynen als deze daar om 'vragen' (Boer, 2015; Hamilton *et al.*, 2011). Samen met deze nutriënten worden ook koolwaterstoffen doorgegeven die van belang zijn voor het herkennen van medenest-individuen (Hamilton *et al.*, 2011). Dussutour en Simpson (2009) stelden vast dat het voedingspatroon van een kolonie afhangt van het type voedsel en de eventuele aanwezigheid van broed binnen het nest. Zij vergeleken kolonies met broed met kolonies

zonder broed. De kolonies met broed verzamelden meer voedsel dan de kolonies zonder. De hoeveelheid koolhydraten verschilde niet voor beide kolonies. De hoeveelheid proteïnen daarentegen wel. De kolonies met broed deden grotere inspanningen om de inname van proteïnen van de kolonie op peil te houden.

Sociale insecten maken op basis van individuele waarnemingen van de foeragerende individuen collectieve beslissingen omtrent voedselbronnen (Arganda *et al.*, 2014; Billen, 2006). Het voedingsgedrag van mieren is aangepast aan de energetische en ecologische waarde, de concentratie en de samenstelling van de natuurlijke suikerbron. Foeragerende mieren beschikken over fysiologische vaardigheden, zoals sensorische receptoren, om de meest interessante bron te selecteren. Hoewel voorkeuren verschillen van soort tot soort worden melezitose, sucrose, fructose en glucose regelmatig geconsumeerd door het merendeel van de mieren (Detrain & Prieur, 2014). Een hoge concentratie melezitose trekt mieren aan omwille van de associatie met suikerrijke honingdauw (Woodring *et al.*, 2004). Wanneer ze geconfronteerd worden met bronnen die variëren in kwaliteit, kunnen ze de beste voedselbron selecteren met behulp van feromoonsporen. In een onderzoek van Arganda *et al.* (2014) werd vastgesteld dat mieren een voedselbron met vrije aminozuren verkiezen boven een voedselbron met proteïnen in hun geheel. Dit is een gevolg van het feit dat mieren maar een beperkte mogelijkheid hebben om volledige proteïnen te verteren. De redenen hiervoor zijn de smalle petiolus tussen het mesosoma en het gaster en de kleine hoeveelheid proteasen aanwezig in de middendarm.

## 2.5. Ecologische rol

Formicidae vormen een diverse groep binnen de Insecta en spelen een cruciale rol in tal van natuurlijke processen zoals het verspreiden van zaden (myrmecochorie) (Handel & Beattie, 1990), de predatie op invertebraten (Cerde & Dejean, 2011) en het afbreken van organisch materiaal. Ze vormen een groot deel van de dierlijke biomassa. Daarnaast treden mieren op als zogenaamde 'ecosysteemingenieurs' (Folgarait, 1998). Zo zijn mieren betrokken bij bioturbatie van de bodem en helpen ze met koolstoffixatie in de bodem (Parr *et al.*, 2016). Mieren dragen plantaardige en dierlijke resten naar hun nest. Deze materialen worden vermengd met aarde in en rond het nest, wat er voor zorgt dat deze zones veel koolstof, stikstof en fosfor bevatten. Dit leidt op zijn beurt tot een mozaïekverdeling van plantengroei (Hölldobler & Wilson, 1990). Door het graven van gangen en nesten treden er fysische en chemische veranderingen van de ondergrond op. Dit leidt tot toename in drainage, porositeit en beluchting, wat decompositie van organisch materiaal bevordert (Folgarait, 1998).

Mieren treden in symbiose met tal van organismen. Er zijn symbiotische relaties vastgesteld met meer dan 465 plantensoorten uit meer dan 52 verschillende families, met duizenden Arthropoda en met een onbekend aantal Fungi en micro-organismen (Jolivet, 1986). Heel wat organismen halen dus voordeel uit de aanwezigheid van mierenkolonies.

Omdat mieren belangrijke predatoren zijn van Arthropoda in terrestrische ecosystemen, zeker in de tropen (Tiede *et al.*, 2017), kan dit leiden tot een *top-down trophic cascade*. Hierdoor

kunnen bepaalde functionele groepen toenemen in omvang omdat een zeker aantal van hun natuurlijke vijanden wegvallen door de predatie ervan door mieren (Sanders & van Veen, 2011).

Tot slot vormen mieren zelf een bron van proteïnen voor een groot aantal diersoorten. Enkele voorbeelden zijn de zwarte galspin (*Lasaeola tristis*), padden (Bufonidae), de fazant (*Phasianus colchicus*), de draaihals (*Jynx torquilla*) en spechten (Picidae) (Boer, 2015).

## 2.6. *Crematogaster scutellaris*

*Crematogaster scutellaris* of de rode schorpioenmier behoort tot de subfamilie Myrmicinae. Ze komt voor in Europa, in het Nabije Oosten en in Noord-Afrika. Deze mieren hebben een roodkleurige kop, het mesosoma en het gaster zijn zwart. Het gaster heeft een typische vorm dat naar het einde toe spits uitloopt.

Een kolonie wordt op een onafhankelijke wijze gesticht, heeft een monogyne koningin en maakt kartonnesten in bomen en dood hout (Boer, 2015). Kartonnesten worden opgebouwd door (vermolmd) hout tot pulp te knagen en te vermengen met speeksel en/of honingdauw. Hierop groeit een schimmel die zorgt voor de stevigheid van het nest (Peeters *et al.*, 2004).

*C. scutellaris* gedraagt zich zeer agressief tegenover concurrenten. De postpetiolus is op de bovenzijde van het gaster aangehecht zodat deze laatste omhoog en naar voren omklapbaar is in de aanwezigheid van een aanvaller. De stompe angel wordt hierbij uitgestoken waarop zich een druppel afweerstof vormt die bij contact op het lichaam van de aanvaller achterblijft (Boer, 2015; Peeters *et al.*, 2004).

Deze mierensoort werd gebruikt om de laboproef mee uit te voeren.

## 3. Mutualisme tussen mier en bladluis

### 3.1. Beschrijving

Een symbiose is een geëvolueerde interactie of nauw samenleven tussen ten minste twee organismen van verschillende soorten. Meestal haalt minstens één van hen een individueel voordeel uit de relatie. Een symbiose kan obligaat of facultatief zijn. In het eerste geval zijn de organismen levensnoodzakelijk afhankelijk van elkaar. Elk van de organismen kan niet leven zonder de ander. Bij het tweede type is dat wel nog het geval. Er zijn vier soorten van een symbiotische relatie beschreven (Keeton & Gould, 1986).

Bij een mutualisme halen beide symbiotische partners voordeel uit de interactie. Het kan gaan om middelen, diensten of een combinatie van de twee (Holland & Bronstein, 2008).

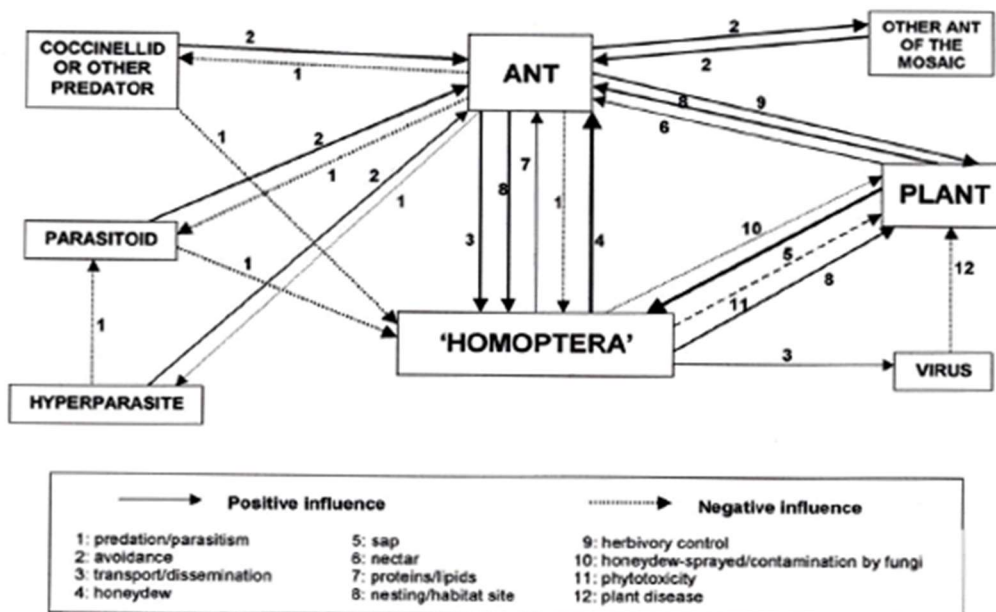
Commensalisme is een symbiose waarbij slechts één van de partners profiteert van de gevolgen van de relatie. Meestal is dit organisme compleet afhankelijk van de ander op vlak van voedsel, beschutting of voortbeweging. De andere partij wordt hierdoor niet beïnvloed (Keeton & Gould, 1986). Het tegenovergestelde is amensalisme. In dit geval wordt één partner belemmerd of geschaad door de ander die er geen voordeel uithaalt. Competitie valt onder deze term (Kitching & Harmsen, 2008).

Bij parasitisme leeft één partner ten koste van de andere partner. Dit leidt niet noodzakelijk tot de onmiddellijke dood van de ander, in tegenstelling tot predatie. Vaak is het voor de levenscyclus van de parasiet nodig dat de gastheer juist in leven blijft. Soms sterft de gastheer af door de parasitaire invasie (Keeton & Gould, 1986).

### 3.2. Co-evolutie

De ontwikkeling en stabilisatie van het mutualisme tussen mieren en bladluizen heeft naar schatting 40 miljoen jaar geduurd. Dit begon aan het eind van het Krijt (*ca.* 75 miljoen jaar geleden) en heeft zijn huidige vorm bereikt aan het eind van het Eoceen (*ca.* 35 miljoen jaar geleden) (Depa *et al.*, 2020). Figuur 8 geeft een schematisch overzicht van de complexe relatie die doorheen de tijd tot stand is gekomen tussen mier, Homoptera, plant en andere insecten (zoals natuurlijke vijanden van de bladluis).

Volgens Yao (2014) wijst het evolutionaire verloop van de interactie tussen de twee insecten er op dat dit mutualisme onstabiel is. Deze onderzoeker concludeert dat het feit dat bladluizen verzorgd door mieren geen monofyletische groep vormen er op wijst dat het mutualisme tussen de twee insecten slechts een fragiele, onstabiele connectie is. Rico-Gray en Oliveira (2007) hebben het over één van de meest facultatieve, opportunistische en variabele associaties met een grote onzekerheid over het effect van de aanwezigheid van mieren op de plant.



Figuur 8. Schematisch overzicht van de interactie tussen mier, Homoptera, plant en andere insecten (Delabie, 2001).

### 3.3. Mier en bladluis

De mutualistische interactie tussen mier en bladluis werd al een lange tijd terug vastgesteld en werd bijna 60 jaar geleden door Way (1963) uitgebreid gedocumenteerd. De symbiose tussen mieren en bladluizen omvat het hele spectrum van mutualisme tot predatie. Mieren verlenen diensten aan de bladluizen in ruil voor honingdauw. Wanneer er voedsel wordt verkregen en/of verstrekt tussen organismen, wordt gesproken over een trofobiose. De diensten bestaan voornamelijk uit het verminderen van de predatie en parasitisme op bladluizen en een verminderd aantal schimmelinfecties (Völkl *et al.*, 1999; Woodring *et al.*, 2004). In het geval van predatie kan de mier gezien worden als een natuurlijke vijand van de bladluis. Er wordt vanuit gegaan dat de predatie bepaald wordt door het evenwicht tussen de behoefte van de mier aan koolhydraten (honingdauw) en proteïnen (bladluis zelf) (Sakata, 1994). De behoefte aan proteïnen hangt af van de koloniegrootte, de aanwezigheid van een koningin en de hoeveelheid larven aanwezig in het nest (Porter, 1989; Portha *et al.*, 2002). Daarnaast neemt de predatie van bladluizen toe naarmate de bladluizenpopulatie toeneemt (Sakata, 1994; 1995).

Nagy, Cross en Markó (2015) beschrijven zes verschillende factoren waarvan de intensiteit van de fragiele, onstabiele connectie tussen mier en bladluis (Yao, 2014) afhangt. (1) De dichtheid van de bladluizenpopulatie speelt een rol. Ook (2) de kwantiteit en kwaliteit van de honingdauw die deze organismen produceren is van belang. Zo reageren mieren sterker op honingdauw producerende kolonies naarmate het volume honingdauw groter is en de aanwezigheid van gewenste aminozuren of suikers (Fischer & Shingleton, 2001; Woodring *et al.*, 2004). Wat de waarde van honingdauw voor *Formicidae* doet toenemen is de aanwezigheid van het suiker melezitose en een hogere complexiteit van honingdauw. Dit laatste slaat op de excretiesnelheid en de totale concentratie aan suikers uitgedrukt in  $\mu\text{g}$  totale

suikers per bladluis per uur (Völkl *et al.*, 1999; Woodring *et al.*, 2004). Fischer en Shingleton (2001) onderzochten welke factoren de samenstelling van honingdauw van drie *Chaitophorus* bladluizen op twee populiersoorten (*Populus*) beïnvloeden. Ze concluderen dat veranderingen in de aanwezigheid van mieren mogelijks zowel een oorzaak als een gevolg van de veranderingen in de biochemie van honingdauw kunnen zijn.

Vervolgens zijn (3) de gastheerplant, (4) de soortspecifieke verschillen tussen de betrokken mier- en bladluissoorten, (5) de seizoensgebonden verschillen in de vraag naar honingdauw door mieren en (6) de verschillen in afstand tussen de voedselbron en het nest van belang.

Bristow (1991) stelde zich als eerste de vraag waarom, ondanks de voordelen voor beide partijen, niet een groter aantal bladluissoorten een mutualistische relatie hebben met mieren. De onderzoeker toonde aan dat slechts 117 van 479 (24,4%) bladluissoorten in de omgeving van de Rocky Mountains, Amerika bezocht werden door mieren. Er wordt vanuit gegaan dat de predatie van mieren op bladluizen de mogelijke verklaring is voor het uitblijven van deze mutualistische relaties (Yao, 2014). Daarom stellen verschillende studies waaronder die van Bronstein (1994) voor dit mutualisme te benaderen als een balans tussen kosten en baten, die afhankelijk is van tijd en ruimte. Alleen op die manier zouden de dynamica tussen mier en Hemiptera en de mogelijke uitkomsten te begrijpen zijn (Rico-Gray & Oliveira, 2007). Zo ondervinden bepaalde bladluizen naast de bescherming van de mieren nog enkele baten, namelijk verhoogde fertiliteit en reproductiesnelheid. Echter hangen er een aantal kosten aan vast die niet meteen opvallen. Door de aanwezigheid van mieren verhoogt de excretiesnelheid van de honingdauw waardoor de bladluizen het floëmsap minder goed assimileren. Daarnaast is er een afname in lichaamsgrootte en het aantal embryo's (Yao, 2014). Mieren die in ruil voor honingdauw bescherming tegen natuurlijke vijanden bieden, betalen dan weer een kost in de vorm van tijd, energie en een verhoogd risico op sterfte (Stadler & Dixon, 2005). Wanneer een mier deze honingdauw wilt 'oogsten', streelt de mier de bladluis met zijn antennes. De bladluis reageert hierop door zijn cauda op te tillen en een druppel honingdauw uit te werpen. Deze druppel kan weer teruggetrokken worden wanneer de mier het excretieproduct niet aanvaardt (Sorensen, 2009).

### 3.4. Mier en plant

Een myrmecofyt is een plant die een directe mutualistische relatie aangaat met mieren. Interacties tussen mieren en planten zijn gebaseerd op een reeks voorzieningen die de plant aanbiedt. Hiervoor bezit de plant structurele aanpassingen die mieren voorzien van voedsel of een schuilplaats. Deze gespecialiseerde structuren worden door Rosumek *et al.* (2009) samen gevat. (1) Holle verdikkingen in de stam, tak, stengel of wortel voorzien mieren van schuil- of nestplaatsen voor de kolonie. Deze verdikkingen worden *domatia* genoemd. (2) Voedsellichamen zijn kleine epidermale structuren geproduceerd door de plant. Ze bevatten verschillende nutriënten. Mieren verwijderen deze structuren om ze vervolgens te consumeren (Rico-Gray & Oliveira, 2007). (3) Extraflorale nectariën (EFN) zijn gespecialiseerde klieren die buiten de bloem liggen en nectar afscheiden. Ze komen voor bij meer dan 66 plantenfamilies (Hölldobler & Wilson, 1990). Mieren consumeren deze nectar. Tuinboon (*Vicia faba*) is een



éénjarige plant die aan de basis van de bovenste bladeren over EFN beschikt (*Engel et al.*, 2001). Eigenschappen gerelateerd aan EFN zoals de samenstelling van de nectar en nectar- en suikerproductie zijn als gevolg van selectie geëvolueerd uit populaties die veel schade ervaarden door herbivoren (*Rios et al.*, 2008). In ruil voor deze voorzieningen kunnen mieren bijdragen aan de verspreiding van zaden (myrmecochorie) (*Handel & Beattie*, 1990), bestuiving (*Gómez & Zamora*, 1992), bescherming tegen herbivoren (*Buckley*, 1987) en het aanleveren van nutriënten (myrmecotrofie). In het geval van myrmecochorie lokt de plant mieren door elaiosomen te produceren. Een elaiosoom is een vetlichaam aan of bij een zaadje dat als voedingsbron kan dienen voor mieren. Een werkster draagt op die manier zowel het vetlichaam als het zaadje mee naar het nest, waar de elaiosoom geconsumeerd wordt en het zaadje ongedeerd achter blijft (*Handel & Beattie*, 1990). Bij myrmecotrofie absorbeert de plant nutriënten afkomstig van het afvalmateriaal van de mierenkolonie die de plant bewoont (*Beattie*, 1989). *Rios et al.* (2008) vat samen dat de voordelen voor de plant bij dit mutualisme afhangen van de talrijkheid van de mieren en herbivoren, de betrokken soorten en de tolerantie van de plant ten opzichte van schade veroorzaakt door herbivoren.

Het mutualisme tussen mier en bladluis heeft verschillende ecologische effecten op de waardplant. Deze effecten zijn meer uitgesproken in tropische en subtropische regio's (*Rosumek et al.*, 2009; *Zhang et al.*, 2012). *Rosumek et al.* (2009) concluderen dat mieren een voorname rol spelen in de biotische bescherming van de plant. Op planten zonder mieren komen 50% meer herbivoren voor, met als gevolg dat deze planten bijna tweemaal zoveel schade ondervinden dan planten met mieren. Bij planten zonder mieren werd als gevolg een reductie in biomassa (-23,7%), bladoppervlakte (-51,8%) en reproductie (-24,3%) vastgesteld. Dit leidde tot een verlaagde fitness van de plant. *Rios et al.* (2008) en *Trager et al.* (2010) concluderen hetzelfde. *Zhang et al.* (2012) daarentegen spreken dit deels tegen. Volgens deze onderzoekers worden groei en reproductie van planten niet significant beïnvloed door het mutualisme. Wel zou het tempo waarmee vruchten van bomen vallen gereduceerd worden. Volgens *Rico-Gray en Oliveira* (2007) is de interactie tussen mier en Hemiptera op planten zo facultatief en variabel, dat de effecten ervan op de fitness van de plant als relatief zwak beschouwd kunnen worden. Hetzelfde zou gelden voor de interactie tussen mier en plant (*Trager et al.*, 2010).

Planten die mieren aantrekken ter bescherming zouden chemisch minder beschermend zijn tegen herbivoren in vergelijking met nauwe verwanten die deze relatie niet ontwikkelden (*Rehr et al.*, 1973; *Rios et al.*, 2008). Bij een directe relatie tussen mier en plant blijkt dat planten over bepaalde mechanismen beschikken ter bescherming van de gevolgen van de aanwezigheid van mieren. De mate van waarmee deze bescherming van de plant tot uiting komt, is afhankelijk van de locatie. Daarnaast kan de plant aanpassingen hebben om mieren juist te bevoordelen. Dit bepaalt namelijk het voorkomen van herbivoren en predatoren van zaden. *Rios et al.* (2008) halen hier een voorbeeld bij. Planten die ter bescherming met mieren in mutualisme treden, hebben een beperkte bladbeharig. Er wordt verondersteld dat dit het bewegen van mieren vergemakkelijkt. In het geval van planten zonder mieren dient deze

behering als mechanische bescherming tegen herbivoren. Bij een indirecte relatie, gemedieerd door Hemiptera, zijn dergelijke mechanismen niet gedetecteerd (Zhang *et al.*, 2012).

### 3.5. Bladluis en plant

Bladluizen zijn gedurende hun hele levenscyclus afhankelijk van planten aangezien ze zich voeden met het floëemsap van de waardplant. Niettemin beschrijven Sadek *et al.* (2013) de interactie tussen plant en bladluis als een dynamisch systeem dat continu onderworpen is aan variatie en veranderingen. Zo is de productie van honingdauw onder andere afhankelijk van de waardplant en zijn nutritionele toestand (Leroy *et al.*, 2011). Waardplanten zijn in staat verschillende biochemische en fysische verdedigingsmechanismen te induceren als respons op de bladluizen die zich voeden op de plant. Bladluizen verworven doorheen de tijd dan weer enzymatische aanpassingen en de mogelijkheid om secundaire metabolieten afkomstig van de plant op te slaan in hun lichaam als verdediging tegen hun natuurlijke vijanden (Sadek *et al.*, 2013).

Bij het kiezen van een koolhydratenbron kunnen mieren de keuze hebben tussen suiker voorzien door de plant in de vorm van (extraflorale) nectar of door Hemiptera in de vorm van suikerrijke excretie (Hölldobler & Wilson, 1990). De aanwezigheid van EFN of Hemiptera zou een relatief gelijkaardig effect hebben op de reductie van het aantal herbivoren door mieren. Hieruit volgt dat deze twee factoren dezelfde ecologische gevolgen hebben op de waardplant (Zhang *et al.*, 2012). Bladluizen concurreren vaker met deze EFN wanneer deze aanwezig zijn dan met andere bladluissoorten voor een mutualisme met mieren (Yao, 2014). Hoewel Engel *et al.* (2001) vaststellen dat er voor een kleine kolonie *Aphis fabae* geen significant competitief effect is tussen de twee suikerbronnen. Ondanks het feit dat EFN aanzienlijk meer suiker bevatten, kiest *Lasius niger* zich te blijven voeden met honingdauw die hoger is in kwaliteit (melezitose) en kwantiteit. Buckley (1983) stelt vast dat de bochelcicade *Sextius virescens* succesvoller is dan de EFN van *Acacia decurrens* in het aantrekken van mieren, met als gevolg dat de bescherming door mieren tegen overige herbivoren verstoord wordt. Dit leidt tot een negatief effect op de plantengroei en zaadzetting van de waardplant.

Daarnaast concluderen Engel *et al.* (2001) dat EFN bij *Vicia faba* een bepaalde graad van bescherming bieden tegen zuigende herbivoren die niet in staat zijn mutualisme aan te gaan met mieren. Door de aanwezigheid van EFN gaat de plant zelf in mutualisme met mieren.

### 3.6. Natuurlijke vijanden

Zoals reeds aangehaald bieden mieren bij mutualisme bescherming aan bladluizen. Het aantal natuurlijke vijanden, andere Arthropoda en herbivoren wordt gereduceerd (Rosumek *et al.*, 2009). Een toenemende rijkdom aan soorten natuurlijke vijanden heeft een reducerend effect op de populatie bladluizen. Hoewel negatieve interacties tussen predatorsoorten kunnen leiden tot negatieve gevolgen voor de biodiversiteit en biologische bestrijding van bladluizen (Alhadidi *et al.*, 2018; Noppe *et al.*, 2012). De juiste combinatie natuurlijke vijanden is dus van belang. Vooral op heesters en bomen worden predatoren significant onderdrukt door mieren die in mutualisme treden met Hemiptera (Zhang *et al.*, 2012).

Daarnaast reageren natuurlijke vijanden zelf op de aanwezigheid van mieren. Oliver *et al.* (2008) gaan er vanuit dat tweestippelige lieveheersbeestjes (*Adalia bipunctata*) die het vermogen niet hebben om in competitie te treden met mieren, in staat zijn plaatsen waar mieren aanwezig zijn te vermijden. Op deze plekken gaan de lieveheersbeestjes niet alleen niet opzoek naar voedsel, ze zullen er ook hun eitjes niet afleggen. Dit gebeurt op basis van de informatie die lieveheersbeestjes halen uit de verspreide feromonen van mieren.

Hoewel mieren bescherming bieden aan bladluizen is het gedrag van mieren tegenover natuurlijke vijanden van de bladluis ter bescherming zelden vastgelegd. Bovendien geldt het vaak enkel voor een bepaalde mierensoort. De reactie van mieren op een natuurlijke vijand van de bladluis zou afhankelijk zijn van de bewegingssnelheid van de vijand. Wanneer het gaat over een snel bewegende parasiet of predator (vaak zijn dit adulten), zoals een parasitaire wesp, zal een mier snel reageren door het ongewenst insect te verjagen of te doden. Terwijl aan langzaam bewegende larven zoals die van zweefvliegen of gaasvliegen, vaak weinig aandacht wordt geschonken (Novgorodova & Gavriljuk, 2012).

## 4. Biologische bestrijding van bladluizen

Mieren worden ingezet om insectenplagen op biologische wijze in de hand te werken. Deze methode werd reeds zo'n 1.700 jaar geleden in het zuiden van China gehanteerd. Kolonies van de wevermier *Oecophylla smaragdina* werden verzameld en verkocht om ze vervolgens te plaatsen in citrusbomen die leden onder plaaginsecten. Deze toepassing is de oudst gekende methode om plaaginsecten biologisch te bestrijden (Huang & Yang, 1987).

Biologische bestrijding is het gebruik van een organisme om de populatiedichtheid van een ander organisme te beheersen. Het wordt toegepast in de bestrijding van schadelijke dieren, onkruiden en ziekten (Bale *et al.*, 2008). Hiervoor worden parasitoïden, predatoren, pathogenen, herbivoren en antagonisten ingeschakeld (Cock *et al.*, 2010). Binnen biologische bestrijding zijn verschillende strategieën voor handen. De Clercq (1999) spreekt over drie strategieën, namelijk klassieke biologische bestrijding, conservatie en vermeerdering.

Bij klassieke biologische bestrijding wordt een natuurlijke vijand van de plaag geïntroduceerd in een gebied waar deze van nature niet aanwezig is. Het doel is dat het geïntroduceerde organisme zich in dit gebied vestigt. De populatie van de natuurlijke vijand kan het schadelijk organisme blijvend onderdrukken. Een éénmalige uitzetting zou in principe moeten volstaan (De Clercq, 1999).

In het geval van conservatie worden populaties van reeds aanwezige nuttige organismen gestimuleerd en beschermd. Dit wordt verwezenlijkt door te voorzien in schuilplaatsen zoals grasbermen of bodembedekkers, door het gebruik van pesticiden te beperken of door extra voedselbronnen aan te bieden (De Clercq, 1999).

Bij vermeerdering wordt een grote hoeveelheid gekweekte natuurlijke vijanden uitgezet in het gewas. Door het gewas op deze manier te overspoelen wordt een verkleining van de populatie plaagorganismen bekomen. Hierbij wordt niet verwacht dat de natuurlijke vijand zich vestigt in het nieuwe gebied met als gevolg dat het gewas meermaals per groeiseizoen overspoeld moet worden door de natuurlijke vijanden (De Clercq, 1999; Cock *et al.*, 2010).

Sluipwespen (*Parasitica*), galmuggen (*Cecidomyiidae*), lieveheersbeestjes (*Coccinellidae*), gaasvliegen (*Chrysopidae*), zweefvliegen (*Syrphidae*) en oorwormen (*Dermaptera*) zijn mogelijk inzetbare natuurlijke vijanden van de bladluis (Biobest, z.j.; Biogroei, z.j.). Door deze insecten te introduceren wordt de strategie vermeerdering toegepast.

Sluipwespen prikken de bladluizen met hun legboor of ovipositor aan, om er vervolgens hun eitjes in af te leggen. Een nieuwe sluipwesp ontwikkelt zich in de gastheer, waardoor de geparasiteerde bladluis opzwellt en een leerachtig, bruin omhulsel rondom de wesp wordt. Dit laatste wordt een mummie genoemd. Wanneer de sluipwesp volwassen is, verlaat ze haar gastheer via een rond gaatje in de mummie. Sluipwespen zijn vrij gastheer-specifiek (Marcipont *et al.*, 2016).

*Aphidoletes aphidimyza* is een galmug in de strijd tegen bladluizen. Een volwassen galmug van deze soort legt haar eitjes af tussen de plaagpopulatie. Wanneer de larven uitkomen, verlammen ze hun prooi met hun giftige speeksel. Hierin werden verschillende enzymen gedetecteerd, maar protease ontbreekt waardoor *A. aphidimyza* wellicht geen extra-intestinale

vertering uitvoert. Vervolgens zuigt larve de lichaamsvloeistoffen van de bladluis op om zich te voeden (Boulanger *et al.*, 2019).

Roofkevers zoals lieveheersbeestjes gaan actief opzoek naar hun prooi. Zowel de larven als de volwassen insecten eten bladluizen (Biogroei, z.j.).

De larven van gaas- en zweefvliegen eet bladluizen op. Bekende vertegenwoordigers zijn de gaasvlieg *Chrysoperla carnea* en de zweefvlieg *Episyrphus balteatus* (Marcipont *et al.*, 2016). Oorwormen nuttigen verschillende insecten, maar de bladluis staat bovenaan de lijst (Biogroei, z.j.).

Functionele biodiversiteit omvat alle organismen met een nutsfunctie in agro-ecosystemen zoals het bodemleven, bestuivers en natuurlijke vijanden (parasieten en predatoren) van ziekten en plagen. Een mogelijke methode is *habitat management* waarbij bestaande omgeving of teeltpraktijken worden aangepast om betere kansen te voorzien voor natuurlijke vijanden. Het is een vorm van conservatie met de nadruk op de preventie van het plaagorganisme door de immuniteit van het agro-ecosysteem aan te sterken. Door de diversiteit binnen zo'n systeem te versterken, ontstaan er meer trofische interacties wat leidt tot een grotere insectenstabiliteit (Haesaert, 2020; Marcipont *et al.*, 2016).

Een eerste mogelijkheid om dit te verwezenlijken is het aanleggen van bloemenranden en/of gemengde hagen in de omgeving van het perceel. Dit biedt de gelegenheid om pollen en nectar aan te leveren aan nuttige insecten (zowel natuurlijke vijanden, als bestuivers). Een volgende mogelijkheid is het aanplanten van bankerplanten. Dit kan gezien worden als eilandjes van bijvoorbeeld gerstplanten verspreid over het productieperceel. Hierop ontwikkelt zich een voor het gewas niet-schadelijke bladluis. Via het afscheiden van honingdauw worden natuurlijke vijanden aangetrokken en onderhouden. Deze mogelijkheden zorgen voor alternatieve voedselbronnen voor de nuttige roofinsecten bij schaarste van het plaaginsect. Dit heeft een efficiëntere natuurlijke plaagonderdrukking als gevolg (Marcipont *et al.*, 2016).

Omdat mieren als superorganismen georganiseerd zijn, bezitten veel mierensoorten bepaalde gewenste eigenschappen waar andere nuttige organismen niet over beschikken. Eerst en vooral zijn deze organismen alom aanwezig in de meeste ecosystemen. Daarnaast beschikken ze over eigenschappen zoals het gebruik van feromonen en hebben de meeste soorten een polyfaag karakter. Dit maakt hen geschikt als biologisch bestrijdingsmiddel binnen geïntegreerde plaagbestrijding (*Integrated Pest Management, IPM*) (Offenberg, 2015). Door mieren volledig te elimineren wordt hun bijdrage aan IPM uitgeschakeld waardoor verschillende plagen in omvang kunnen toenemen. Daarom is het interessanter het evenwicht tussen mier en een plaagorganisme als bladluizen te verschuiven van het verzorgen naar de predatie ervan. Om een insectenplaag in de tropen voldoende onder controle te krijgen met behulp van wevermieren (*Oecophylla*) dient volgens Offenberg (2015) hun dichtheid groter te zijn dan het natuurlijke niveau. Maatregelen die hiervoor toegepast kunnen worden zijn:

- Het gebruik van insecticiden beperken;
- Mierenkolonies verplaatsen in de plantages of boompercelen;
- Zorgen voor een verbinding tussen de kolonie en gastheerboom (met een touw of paal);

- Concurrentie tussen naburige kolonies te vermijden;
- De mieren voorzien van een extra voedingsbron;
- Artificiële nesten aanbieden.

Deze maatregelen zijn relatief eenvoudig en goedkoop, wat vooral interessant is voor ontwikkelingslanden, maar ook in andere gevallen kunnen deze ingrepen hun nut bewijzen.

In de literatuur zijn verschillende pogingen ondernomen om het mutualisme tussen mier en bladluis te verbreken, om zo de biologische bestrijding van bladluizen door natuurlijke vijanden te stimuleren. Zo werden methoden onderzocht d.m.v. het aanbrengen van een kleverige barrière of werd nagegaan wat het effect zou zijn wanneer mieren een substituant voor honingdauw werden aangeboden.

#### 4.1. Kleverige barrière

In het verleden werd in verschillende onderzoeken een kleverige barrière toegepast rond de stam van de gastheerboom. Dit is een methode om mieren de toegang naar de boomkruin te ontzeggen. Zo bekwamen Nagy *et al.* (2013) dat de afwezigheid van *Lasius niger* bij *Dysaphis plantaginea* resulteerde in een verhoogde predatordruk door o.a. een verhoogde abundantie aan natuurlijke vijanden van de bladluis en/of een verhoogde predatorefficiëntie.

Verschillende onderzoekers hebben bedenkingen bij deze methode. Stewart-Jones *et al.* (2008) besloten dat deze methode slechts kostenefficiënt is als elke boom op een perceel er mee uitgerust werd. Zo'n hoge besmettingsgraad komt slechts zelden voor. Daarnaast stelden deze onderzoekers een biologisch nadeel vast. Lieveheersbeestjes (*Coccinellidae*) die net uit de hibernatie ontwaken zijn waarschijnlijk nog niet in staat om te vliegen. Velen kwamen vast te zitten op deze barrières op hun weg naar boven. Dit probleem kan veralgemeend worden naar andere kruipende natuurlijke vijanden wat het doel van de bestrijding opheft of zelfs tegenwerkt. Ook Pinol *et al.* (2009) stelden bij dezelfde methode vast dat er amper nog oorwormen (*Dermoptera*) aanwezig waren op de stam. Nagy *et al.* (2013) concluderen daarom dat deze methode ongeschikt is voor het weren van mieren op appelbomen om zo bladluizenpopulaties en schade van de vruchten te verminderen.

#### 4.2. Substituant voor honingdauw

Door mieren een alternatieve optie aan te bieden die nutritioneel interessanter is dan honingdauw, kan dit als een biologisch controlemiddel dienen om bladluizenpopulaties in de hand te werken (Madsen & Offenberg, 2020). Dankzij de competitie tussen de honingdauw en een alternatieve suikerbron wordt de interesse van de mieren in de honingdauw gereduceerd. Als gevolg hiervan verlaagt de snelheid waarmee de honingdauw door de bladluizenkolonie geproduceerd wordt. Daarnaast beïnvloedt de aanwezigheid van mieren de kwaliteit van de honingdauw. De productie van melezitose vergt namelijk een hoge metabolische kost van de bladluizen. Wanneer geen mieren aanwezig zijn, produceren bladluizen minder suikerrijke honingdauw om zo de kost te drukken (Fischer & Shingleton, 2001). Dit reduceert kleverige

oppervlakten en schimmelgroei waardoor de opbrengstderving en de cosmetische waarde minder (snel) afnemen.

#### 4.2.1. Veldproeven

Naast het uitsluiten van *L. niger* onderzochten Nagy *et al.* (2013) het effect van een honingoplossing als substituant voor honingdauw. De onderzoekers besluiten dat het voorzien van een alternatieve suikerbron voor mieren een succesvolle methode is om het mutualisme tussen mier en bladluis te verstoren. Het onderzoek biedt geen argumentatie dat mieren een verhoogde predatie van bladluizen vertonen in de aanwezigheid van een alternatieve suikerbron. Wel wijzen ze erop dat het gebruik van een honingoplossing minder effectief is dan het aanbrengen van een kleverige barrière. In een daaropvolgend onderzoek stellen Nagy *et al.* (2015) vast dat een sucrose-oplossing even effectief blijkt als het verhinderen van de mieren d.m.v een fysieke barrière. In diezelfde studie concluderen ze dat de aanwezigheid van natuurlijke vijanden een belangrijke rol speelt in het reduceren van de bladluizenpopulatie zodat deze niet boven de economische schadedrempel uitkomt. Deze methode kan volgens Nagy *et al.* (2013; 2015) ingezet worden als een indirect, biologisch controlemiddel om bladluizenpopulaties en de schade die ze aanbrengen in appelboomgaarden te reduceren. Ze veronderstellen dat dit het gebruik van insecticiden om bladluizen te bestrijden kan verminderen.

Wäckers *et al.* (2017) voerden een gelijkaardig onderzoek naar het effect van een externe suikerbron in de kruin en aan de stambasis van citrusbomen (*Citrus reticulata* Blanco) op het gedrag van *Lasius grandis* ten opzichte van *Aphis spiraecola*. Ze gingen na of het mogelijk is het evenwicht tussen mier en bladluis te verschuiven van mutualisme naar predatie. Wäckers *et al.* (2017) concluderen dat de verstoring van de verzorging van de bladluizen door *L. grandis* succesvol was. Het vertaalde zich in een snelle afname van de *A. spiraecola* kolonie. De behandeling waar de suikerbron in de kruin werd geplaatst resulteerde in een meer uitgesproken positief resultaat, waardoor deze behandeling naar de toekomst toe geprefereerd wordt. Net zoals Nagy *et al.* (2013; 2015) concluderen Wäckers *et al.* (2017) dat het gebruik van een alternatieve suikerbron veel potentieel heeft om mieren te beheren om zo Hemiptera op een biologische wijze te beheersen.

Niet alleen met bladluizen werden dit soort experimenten uitgevoerd, ook voor andere Hemiptera werd nagegaan of de biologische bestrijding met een alternatieve suikerbron mogelijk is. Zo zijn *Planococcus ficus* en *Pseudococcus comstocki* twee wolluissoorten die ernstige economische verliezen in wijngaarden veroorzaken. De wolluis *Planococcus citri* veroorzaakt dezelfde gevolgen op citrusbomen. Predatoren van deze wolluizen worden dikwijls aangevallen door mieren. Deze mieren zijn, net zoals in het geval van bladluizen, uit op de honingdauw van de Hemiptera. Pérez-Rodríguez *et al.* (2021) ondervonden dat het uitzetten van de alternatieve suikerbron Biogluc® een verminderde mieractiviteit boven de dispensers en een verminderd mierbezoek aan de wolluizen met zich mee bracht. Dit resulteerde in een toename van parasitisme bij de wolluizen. Parrilli *et al.* (2021) combineerden

het uithangen van suikerdispensers met het uitzetten van natuurlijke vijanden van de wolluizen. De resultaten wezen op een verminderde mieractiviteit rond de wolluizen en een verminderde aantasting van de druiventrossen. Pérez-Rodríguez *et al.* (2021) en Parrilli *et al.* (2021) spreken over het grote potentieel dat deze techniek heeft in het biologisch bestrijden van wolluizen. Nelson en Daane (2007) toonden aan dat er geen optimale dichtheid van alternatieve suikerbronnen is die de populatie mieren maximaal onder controle houdt. Wel suggereren ze dat het inzetten van meer suikerbronnen tot een hogere onderdrukking van wolluizen leidt. Daarnaast hangt de optimale aangeboden hoeveelheid hiervan af van de grootte van de mierenkolonies.

#### 4.2.2. Laboproeven

Offenberg (2001) demonstreerde aan de hand van laboratoriumexperimenten dat het gedrag van *L. niger* werksters ten opzichte van de symbiotische *Aphis fabae* van mutualisme naar predatie verschuift naargelang de beschikbare alternatieve voedselbronnen. Offenberg (2001) experimenteerde met een honingoplossing als alternatief voor honingdauw. Dit resulteerde in een significante afname van de populatie bladluizen. Een suikeraanbod zou tot een meer dan achtvoudige toename in predatie van bladluizen door mieren leiden. De behandeling met honingoplossing vertoonde een achtvoudige afname in het aantal verzorgende mieren.

Ook Schumacher en Platner (2009) voerden laboratoriumexperimenten uit met *L. niger*, *Aphis fabae* en een oplossing van rietsuiker als alternatieve suikerbron. Deze onderzoekers stelden vast dat mieren bladluizen verwaarlozen in de aanwezigheid van deze suikerbron. Er werd echter geen effect op de totale biomassa van de bladluizen vastgesteld. De oorzaak hiervan was de afwezigheid van natuurlijke vijanden tijdens het experiment waardoor de populatie bladluizen in omvang niet kon afnemen. Het voordeel voor de bladluizen bleef in het experiment beperkt tot de vermindering van schimmelaantasting door het verwijderen van de honingdauw door mieren. De biomassa van de mieren daarentegen nam wel significant toe dankzij de alternatieve suikerbron. Wellicht komt dit door de hogere suikerconcentratie en kost het minder tijd en energie voor de mieren om dit te verzamelen. Wel stelden Schumacher en Platner (2009) vast dat het verzamelen van honingdauw door mieren nooit volledig ophield.

De wolluis *Dysmicoccus brevipes* is een belangrijke plaag in verschillende landbouwgewassen in de (sub)tropen. Deze wolluis kan een mutualistische relatie aangaan met verschillende mierensoorten zoals de glimmende dikkop (*Pheidole megacephala*) en de vuurmier (*Solenopsis geminata*). Als gevolg van de aanwezigheid van een alternatieve suikerbron neemt het mierbezoek aan de wolluis af. Een verhoogde predatie of agressief gedrag wordt echter niet waargenomen (Carabalí-banguero *et al.*, 2013; Win *et al.*, 2018). Daarnaast blijven mieren steeds in bepaalde mate gebruik maken van de honingdauw van de wolluis (Carabalí-banguero *et al.*, 2013). Mogelijke verklaringen hiervoor zijn dat deze wolluis geen geschikte bron aan proteïnen is voor de betrokken mierensoorten of dat de honingdauw belangrijk blijft voor de groei en de overleving van de mierenkolonie (Win *et al.*, 2018). Het feit dat mieren trouw zijn aan hun route, met als gevolg dat het een bepaalde tijd duurt vooraleer een kolonie



volledig is overgeschakeld op de alternatieve suikerbron, kan een antwoord bieden op de laatste waarneming (Stockan & Robinson, 2016). Desondanks, omdat *D. brevipipes* minder gefrekwenteerd wordt door de mieren wanneer een alternatieve suikerbron aanwezig is, leidt dit tot een verminderde bescherming en een verhoogde blootstelling aan hun natuurlijke vijanden. Hierdoor kan predatie toenemen.

#### 4.2.3. Invloedfactoren

Win *et al.* (2018) voerden gelijkaardig onderzoek aan dat van Offenberg (2001). De verandering in het gedrag van de glimmende dikkop (*Pheidole megacephala*) ten opzichte van de mutualistische wolluis *D. brevipipes* werd geobserveerd wanneer een alternatieve suikerbron werd aangeboden. Win *et al.* (2018) stelden verschillen in resultaten tussen de twee onderzoeken vast. Deze verschillen zijn volgens hen te wijten aan soortspecifieke factoren en milieufactoren. Na onderzoek met *Formica rufa* suggereren Madsen en Offenberg (2020) dat de substituant voor honingdauw afgestemd moet zijn op de betrokken soorten en het seizoen. De voorkeur van mieren voor een bepaalde suikeroplossing lijkt immers soortspecifiek te zijn en vertoont een seizoensgebonden patroon. Het nuttigen van de alternatieve suikerbron was het hoogst tijdens de maand juli, wanneer de eisen van een kolonie mieren het hoogst was, en tijdens oktober, wanneer andere voedingsbronnen schaars werden. Wanneer *F. rufa* een ideale suikerbron vindt, duurt het even vooraleer ze volledig overschakelen van de honingdauw naar deze betere optie. De mieren zijn trouw aan hun route en dus sterk plaatsgebonden (Stockan & Robinson, 2016). Volgens Madsen en Offenberg (2020) is het daarom van belang om de alternatieve suikerbron vroeg op het seizoen ter beschikking te stellen aan de mieren. Op dat moment zijn de bladluizenpopulaties nog niet aanwezig of nog niet groot in aantal individuen.

Factoren die het foerageren door werksters van vele mierensoorten beïnvloeden, kunnen opgedeeld worden in intrinsieke en extrinsieke factoren. Enkele voorbeelden van intrinsieke factoren zijn de maturiteit van een kolonie, de leeftijd van de werksters en de genetische achtergrond van de mierensoort (Van Oudenhove *et al.*, 2011). De maturiteit van een kolonie slaat op de aanwezigheid van broed in het nest. Kolonies met broed verzamelen meer voedsel en doen grotere inspanningen om de inname van proteïnen van de kolonie op peil te houden dan kolonies zonder broed (Dussutour & Simpson, 2009). Van Oudenhove *et al.* (2011) vatten de extrinsieke factoren samen als biotische interacties zoals predatie, competitie en voedselbeschikbaarheid, en abiotische condities zoals het effect van een microklimaat (bodemtemperatuur, oppervlakte temperatuur en relatieve vochtigheidsgraad aan de oppervlakte) (Azcárate *et al.*, 2007).

Iedere mierensoort is actief binnen een bepaald temperatuur- en relatieve vochtigheidsbereik dat voorgesteld kan worden als een tweedimensionale ruimte. Over het algemeen geldt: hoe hoger de relatieve vochtigheid, hoe groter de temperatuurtolerantie. Woestijnmieren die overdag actief zijn, verlaten enkel 's morgens en in de late namiddag het nest wanneer de temperatuur gewenst is. In gematigde habitatten zoals noordelijke naaldbossen daarentegen

verlaten de mieren het nest volgens een tegenovergesteld patroon. Ze foerageren namelijk in het midden van de dag (Hölldobler & Wilson, 1990). Zo is het temperatuurbereik waarbinnen een *Crematogaster scutellaris* werkster foerageert 11 tot 40°C (Hölldobler & Wilson, 1990). *L. niger* wordt in laboratoria verzorgd bij een kamertemperatuur van 19 tot 25°C (Devigne & Detrain, 2002; Maillieux *et al.*, 2009). Maar de beste resultaten worden verkregen bij een temperatuur van 22°C en een relatieve vochtigheidsgraad van 60% (Parker & Parker, 2006). In een mediterrane ecosysteem blijkt temperatuur de belangrijkste klimaatvariabele die het foerageren van de werksters beïnvloedt te zijn (Azcárate *et al.*, 2007). Extreme temperaturen zouden namelijk een invloed hebben op de musculaire controle en de overleving van individuele mieren. Verder neemt de snelheid waarmee een feromonenspoor vervaagt af naarmate de temperatuur toeneemt (Van Oudenhove *et al.*, 2011).

Uit een onderzoek van Blanchard *et al.* (2021) blijkt dat de temperatuur de mutualistische relatie tussen mier en bladluis beïnvloedt. *Aphis fabae* is bij hogere temperaturen beweeglijker, maar de hoeveelheid honingdauw die zij uitscheidt is daarentegen niet afhankelijk van de temperatuur. Bij *L. niger* zorgt een temperatuurstijging van 3°C (van 20 naar 23°C) ervoor dat de loopsnelheid van de foeragerende werksters, het aantal gemobiliseerde mieren en de totale hoeveelheid honingdauw dat geoogst wordt toenemen. Binnen dit temperatuursbereik zorgt een stijging in temperatuur voor een positief effect in de mutualistische relatie tussen mier en bladluis. Wanneer de temperatuur echter 26°C bereikt, worden kleinere hoeveelheden honingdauw verzameld en zorgt een stijging van temperatuur nu voor een negatief effect.

Naast temperatuur zijn er fysische verstoringen zoals neerslag en wind die het mutualisme tussen mier en bladluis (tijdelijk) onderbreken. Door het inslaan van waterdruppels en het vormen van kleine plasjes en stroompjes worden de mieren tegengehouden het nest te verlaten om te foerageren (Hölldobler & Wilson, 1990; Rainer & Leal, 2001). Daarnaast wordt de lading dat een mier meedraagt richting het nest verzwaard, wat hen minder manoeuvreerbaar maakt (Farji-Brener *et al.*, 2018). Ook de mate, snelheid, intensiteit en timing waarmee bladluizen zich bewegen wordt beïnvloed door wind en regen (Finlay & Luck, 2011).

Verder kan onderlinge concurrentie tussen twee of meer mierensoorten een rol spelen bij het nuttigen van de alternatieve suikerbron door de mieren. Wanneer in het algemeen een sterkere concurrent opdaagt bij een voedselbron, trekt de andere mierensoort zich terug of wordt ze gedwongen de voedselbron te verlaten (Czechowski, 1985; Hölldobler & Wilson, 1990). *L. niger* die nochtans wordt omschreven als een territoriale mierensoort met een doeltreffend mechanisme om andere mierensoorten weg te concurreren, faalt hierin wanneer een suikerlokmiddel aangeboden wordt. De aantrekking van deze overvloedige, toegankelijke suikerbron is groot op andere mierensoort waardoor die in grote getallen aanwezig zijn rond de suikerbron. Het mechanisme van *L. niger* kan in zo'n omstandigheden de concurrentiedruk niet aan (Czechowski, 1985). Parrilli *et al.* (2021) stellen dat het uithangen van een alternatieve suikerbron doeltreffender is wanneer de betrokken mierensoorten relatief weinig agressief gedrag vertonen.

# Veldproef

## 1. Doelstelling

Deze veldproef had als doel het effect van een alternatieve suikerbron op het mutualisme tussen mieren en bladluizen te monitoren. Bovendien werd nagegaan of de suikertoevoeging een impact had op de biologische beheersing van bladluizen.

## 2. Materiaal en methoden

Om deze doelstelling te bereiken, werd de aanwezigheid van bladluizen, mieren (activiteit en bezoek) en natuurlijke vijanden gemonitord op drie verschillende soorten laanbomen (Tabel 1). Deze bomen bevonden zich op drie verschillende percelen van het bedrijf Greentraders bvba te Zele, België (Figuur 9).

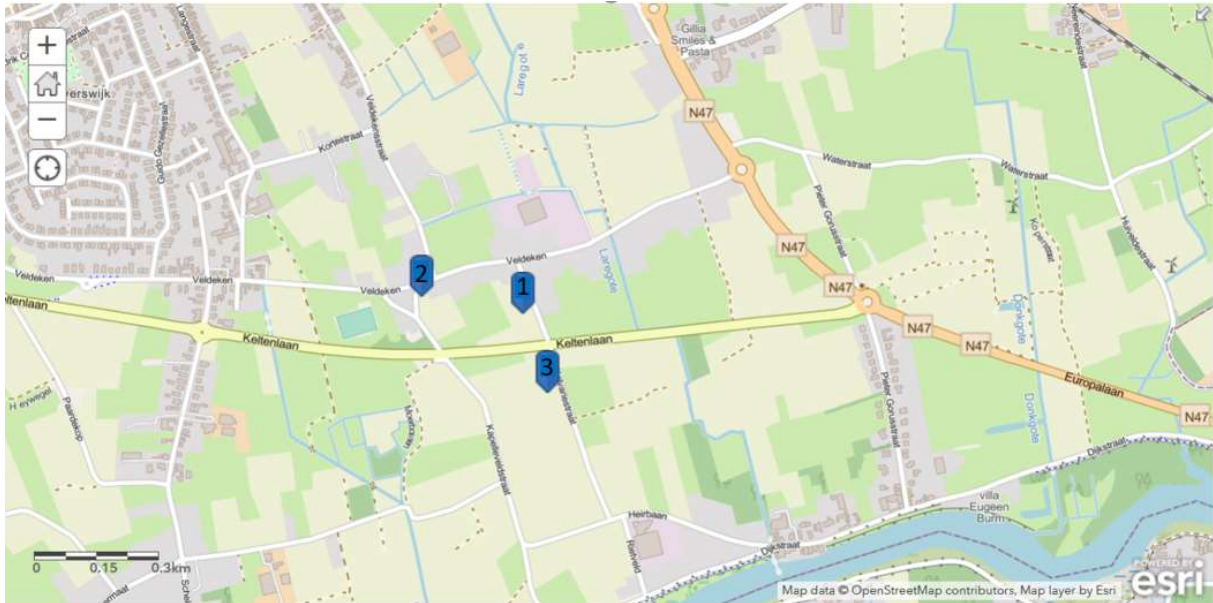
Op vooraf vastgelegde tijdstippen gedurende de maand augustus (2020) werden telkens minstens 28 bomen per soort gemonitord. Bomen werden geselecteerd op basis van de aanwezigheid van mieren en bladluizenkolonies. Dit geldt niet voor de eiken wegens een beperkt aantal bomen ter beschikking. De volgende monitoringstijdstippen werden vastgelegd:

- net voor het toepassen van de alternatieve suikerbron.
- twee, vier en acht dagen na het uithangen van de alternatieve suikerbron.

De observaties vonden telkens plaats tussen 9 uur en 17 uur.

Tabel 1. Informatie over de bomen waarop gemonitord werd.

	<b>Lindes</b>	<b>Eiken</b>	<b>Esdoorns</b>
<b>Cultivar</b>	<i>Tilia cordata</i> 'Greenspire'	<i>Quercus palustris</i> 'Green Dwarf'	<i>Acer pseudoplatanus</i> 'Bruchem'
<b>Leeftijd</b>	5 jaar	9 à 10 jaar	5 jaar
<b>Monitoring</b>	4, 6, 8 en 12 augustus	11, 13, 15 en 19 augustus	16, 18, 20 en 24 augustus
<b>Coördinaten</b>	51.054592, 4.050027	51.054968, 4.046513	51.052851, 4.050891



Figuur 9. Kaart met verschillende locaties van de boomsoorten te Zele (1: *Tilia cordata*, 2: *Quercus palustris* en 3: *Acer pseudoplatanus*) (ArcGIS Online, z.j.).

Per boomsoort werden twee behandelingen toegepast van telkens minimum 14 bomen. Een controlebehandeling zonder suikertoevoeging en een behandeling met suikertoevoeging. De suikertoevoeging bestaat uit een dispenser met daarin Biogluc®, een suikeroplossing 1:1 verdund met water klaar voor gebruik (35,7% (m/m) suikeroplossing: 37,5% fructose, 34,5% glucose, 25% sucrose, 2% maltose en 1% oligosachariden) beschikbaar gesteld door Biobest bvba te Westerlo, België. De suikertoevoeging werd steeds aan de laagste vertakking van de boom aangebracht. Voor *T. cordata* was dit op een gemiddelde hoogte van  $77,6 \pm 19,2$  (gemiddelde  $\pm$  standaardfout) cm. Voor *Q. palustris* en *A. pseudoplatanus* was dit gemiddeld resp.  $192,4 \pm 52,9$  cm en  $99,8 \pm 38,0$  cm.

Om het effect op de bladluisaanwezigheid na te gaan, werden per boom vier bladluizenkolonies gemarkeerd en geobserveerd. Indien voldoende bladluizen aanwezig waren, werden aanvullend op deze vier gemarkeerde kolonies zes tot tien overige kolonies ad random gekozen. Zo werd per observatiemoment per boom op minstens tien kolonies gemonitord. Een kolonie bladluizen wordt gedefinieerd als de aanwezige bladluizen op of langs de onderkant van een blad.

Om de mieractiviteit op een boom te monitoren werd gedurende één minuut het aantal mieren geteld dat een denkbeeldige horizontale lijn op de stam ( $\pm 50$  cm van de bodem) kruist bij het naar boven of beneden lopen van de stam. Het mierbezoek is het percentage bladluizenkolonies waar minstens één mier in aanwezig was gedurende 30 seconden. Om de aanwezigheid van natuurlijke vijanden te onderzoeken werd gedurende 30 seconden geteld hoeveel natuurlijke vijanden, op en rond het blad waar een bladluizenkolonie zich bevond, voorkwamen. Gemonitorde eitjes van natuurlijke vijanden en geparasiteerde bladluizen vallen ook onder de parameter aanwezigheid van natuurlijke vijanden. Figuur 10 geeft de suikertoevoeging per boomsoort weer.

Tenslotte werden op het einde van elke veldproef 30 mieren en bladluizen per behandeling verzameld in ethanol 70%. Deze werden later gedetermineerd in het labo. Voor de

determinatie van de bladluizen werd beroep gedaan op *Aphids on the World's Trees: An Identification and Information Guide* van R.L. Blackman en V.F. Eastop (1994). De mieren werden gedetermineerd aan de hand de determinatiesleutel *Mieren van de Benelux* van P. Boer (2015).



*Figuur 10. De behandeling met een alternatieve suikerbron voor Tilia cordata (links boven), Acer pseudoplatanus (links onder) en Quercus palustris (rechts) op een gemiddelde hoogte van resp.  $77,6 \pm 19,2$  cm,  $99,8 \pm 38,0$  cm en  $192,4 \pm 52,9$  cm. De proef op Acer pseudoplatanus vond als laatste plaats, waardoor niet genoeg Biogluc® beschikbaar was om de zak volledig te vullen.*

### 3. Dataverwerking

Alle statistische analyses werden in SAS (Statistical Analysis System) versie 9.4 uitgevoerd. Om het effect van behandeling op mieractiviteit, mierbezoek, grootte van de bladluizenkolonie en aanwezigheid van natuurlijke vijanden te bepalen, werden veralgemeende lineaire gemengde modellen getest met de GLIMMIX-procedure. De analyses werden uitgevoerd per boomsoort. Telkens werd gekeken naar de verschillen tussen de behandelingen voor de suikertoevoeging en naar de verschillen tussen de behandelingen na de suikertoevoeging.

De GLIMMIX-procedure in SAS past statistische modellen toe op gegevens met correlaties of niet-constante variabiliteit waarbij de respons niet noodzakelijk normaal verdeeld is. De tabel *type III tests of fixed effects* geeft de resultaten weer van de hypothese-testen voor de significantie van elk van de vaste effecten die in het model gespecificeerd zijn (SAS Institute Inc, 2013).

Om het effect van suikertoevoeging op de mieractiviteit te achterhalen werd een model getest waarbij het aantal mieren dat een horizontale lijn op de stam kruist gedurende één minuut als respons variabele en behandeling als onafhankelijke variabele of vast effect werden vastgelegd. Tijd en herhaling werden als afhankelijke variabelen of random effecten aan het model toegevoegd.

De mieractiviteit volgt de poissonverdeling. Deze verdeling is een discrete kansverdeling die het voorkomen van een bepaald voorval telt gedurende een gegeven oppervlakte, afstand, tijdsinterval enzovoort.

Indien de data door een te hoog aantal 0-waarden niet getest kon worden met veralgemeende lineaire gemengde modellen werd een  $\log(N+1)$ -transformatie op de data uitgevoerd en met een algemeen lineair model getest (GLIMMIX-procedure, SAS).

De impact van suikertoevoeging op mierbezoek werd getest met een veralgemeend lineair gemengd model met de aanwezigheid van één of meerdere mieren in de bladluizenkolonie als respons variabele, behandeling als onafhankelijke variabele en tijd en herhaling als afhankelijke variabelen.

Het mierbezoek wordt uitgedrukt in het percentage bladluizenkolonies met mieren per boom. Als gevolg is de data binomiaal verdeeld. De som van  $k$  onafhankelijke en identieke verdeelde  $(0, 1)$  variabelen heeft een binominale verdeling (Altham, 1978). Indien één of meerdere mieren aanwezig zijn in de kolonie wordt het cijfer één weerhouden als resultaat. Indien dit niet het geval is, is het resultaat een nul.

Om de impact van suikertoevoeging op de grootte van de bladluizenkolonie te achterhalen werd een model getest waarbij het aantal bladluizen per kolonie als responsvariabele, behandeling als onafhankelijke variabele en tijd en kolonie genest binnen de herhaling als afhankelijke variabelen aan het model werden toegevoegd. Deze data volgen de poissonverdeling.

Het effect van suikertoevoeging op de aanwezigheid van natuurlijke vijanden werd getest met een veralgemeend lineair gemengd model waarbij het totaal aantal natuurlijke vijanden per kolonie per boom als respons variabele en behandeling als onafhankelijke variabele aan het model werden toegevoegd. Daarnaast werden tijd en kolonie genest binnen de herhaling als afhankelijke variabelen eraan toegevoegd. Ook deze data volgen een poissonverdeling.

De trend van het aantal natuurlijke vijanden per boom is identiek aan de trend van het aantal natuurlijke vijanden per kolonie per boom. Echter liggen de gemiddelden hoger, wat in deze context tastbaarder is. Daarom worden deze grafieken uitgedrukt in het aantal natuurlijke vijanden per boom in plaats van per kolonie, wat oorspronkelijk gemonitord werd.

Indien er reeds voor het toepassen van de alternatieve suikerbron (dus op dag 0) significante verschillen optraden, werd dit beginaantal of -waarde als onafhankelijke variabele opgenomen in het model.

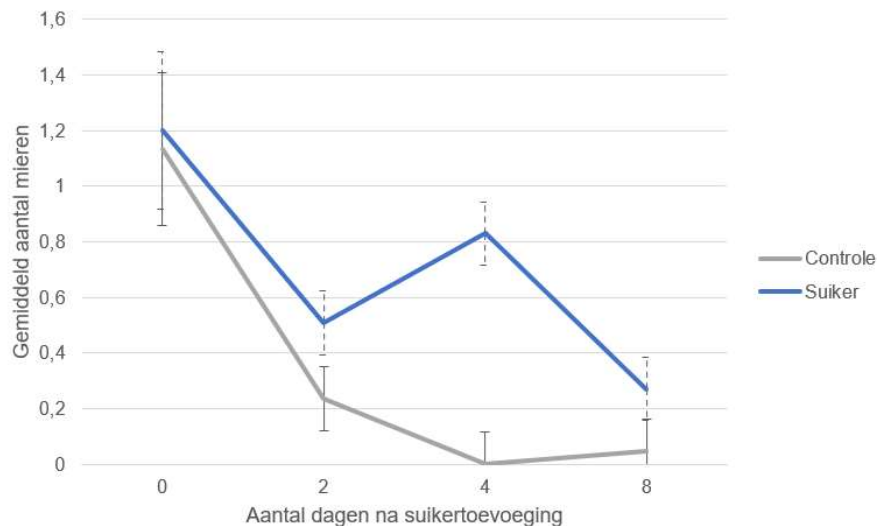
Indien een significant effect ( $p < 0,05$ ) van behandeling werd gevonden, werden post-hoc Tukey testen uitgevoerd om onderlinge verschillen tussen behandeling en controle in kaart te brengen.

Alle grafieken werden gegenereerd met Microsoft Excel versie 2104.

## 4. Resultaten

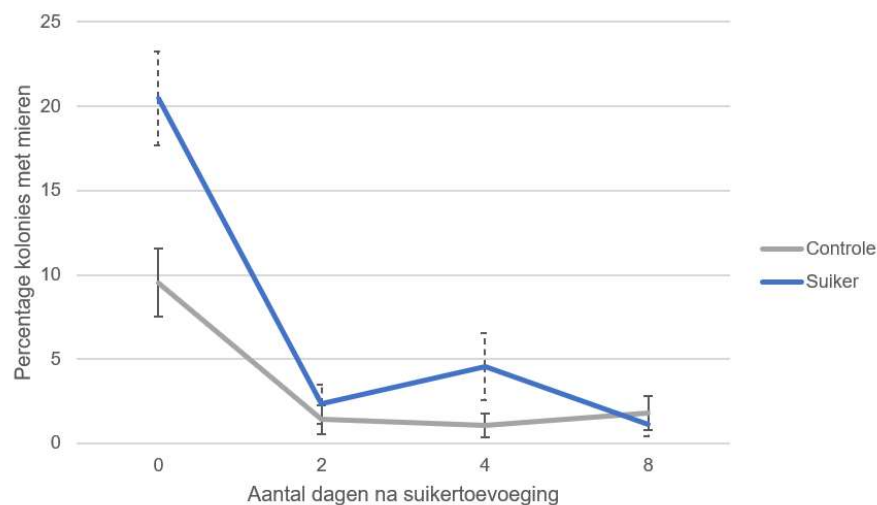
### 4.1. *Tilia cordata*

Voordat de alternatieve suikerbron werd opgehangen, werd geen verschil in mieractiviteit vastgesteld tussen de 30 te monitoren lindebomen ( $p = 0,8670$ ). Het toepassen van de suikerbron had een significant effect op de mieractiviteit ( $p < 0,0004$ ) (Figuur 11). De mieractiviteit op bomen met suikerbron was hoger ( $0,52$  mieren  $\pm 0,08$ ) dan op bomen zonder suikertoevoeging ( $0,09$  mieren  $\pm 0,08$ ).



Figuur 11. Invloed van de suikertoevoeging op de mieractiviteit ( $0,52$  mieren  $\pm 0,08$ ) op *Tilia cordata*.

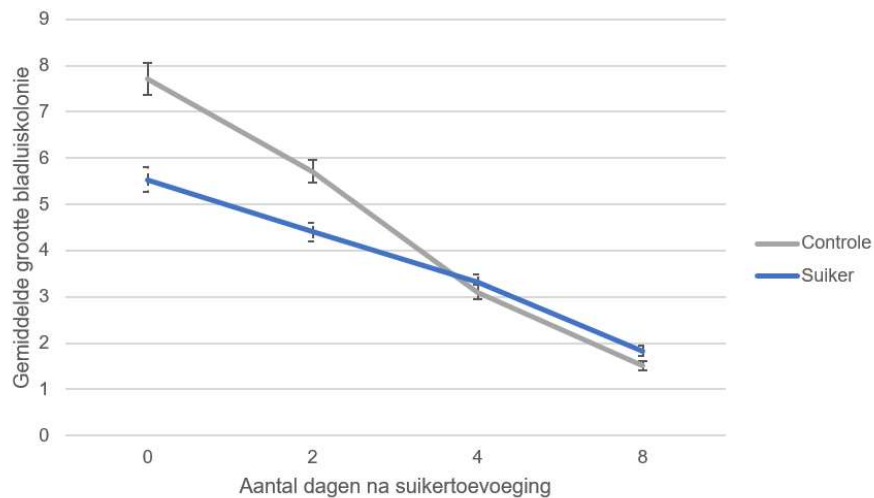
Voor het uithangen van de suikerbron werden significante verschillen in mierbezoek en het aantal bladluizen per kolonie vastgesteld tussen de bomen van de controlegroep en deze waar de suikerbron komt ( $p$  is resp.  $0,0046$  en  $< 0,0001$ ). Toevoegen van suiker had geen significant effect op het mierbezoek ( $p = 0,1564$ ) (Figuur 12).



Figuur 12. Geen invloed van de suikertoevoeging op het percentage kolonies met mieren in aanwezig per boom ( $p = 0,1564$ ) op *Tilia cordata*.

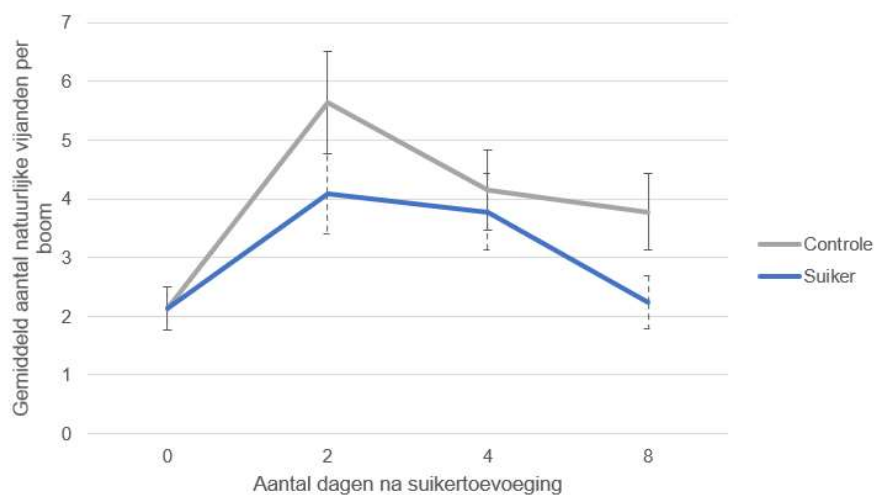


De suikertoevoeging heeft een significant effect op de grootte van de bladluizenkolonies ( $p < 0,0001$ ) (Figuur 13). De gemiddelde bladluizenkolonie was bij bomen met suiker (2,89 bladluizen  $\pm 0,94$ ) kleiner dan bij controlebomen (3,12 bladluizen  $\pm 1,01$ ).



Figuur 13. Invloed van de suikertoevoeging op de gemiddelde bladluizenkoloniegrootte van (2,89 bladluizen  $\pm 0,94$ ) op *Tilia cordata*.

Het aantal natuurlijke vijanden per boom voor de suikertoevoeging was identiek tussen de behandelingen ( $p = 1,0000$ ). Toevoegen van suiker had een significant effect op dit aantal ( $p = 0,0044$ ) (Figuur 14). Het aantal natuurlijke vijanden per boom met suikerbron was lager (3,32 natuurlijke vijanden  $\pm 0,63$ ) dan bij controle bomen (4,46 natuurlijke vijanden  $\pm 0,82$ ).

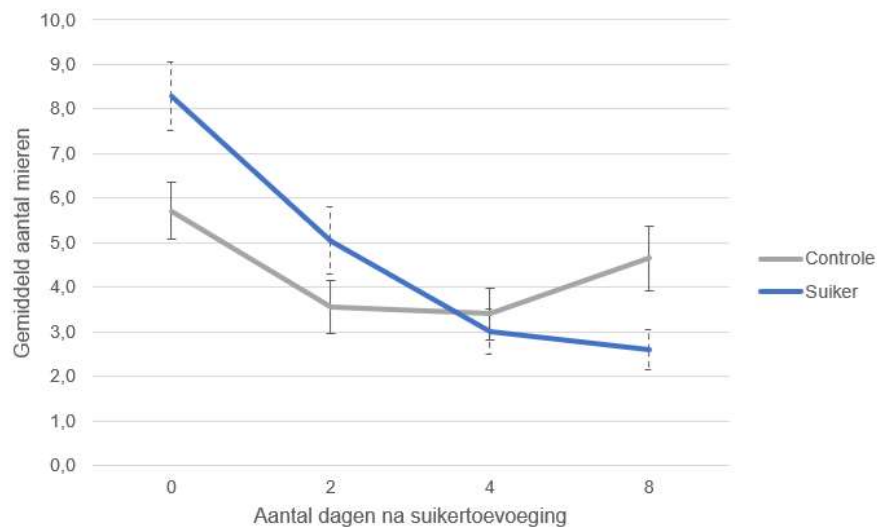


Figuur 14. Invloed van de suikertoevoeging op het gemiddelde aantal natuurlijke vijanden per boom (3,32 natuurlijke vijanden  $\pm 0,63$ ) op *Tilia cordata*.

## 4.2. *Quercus palustris*

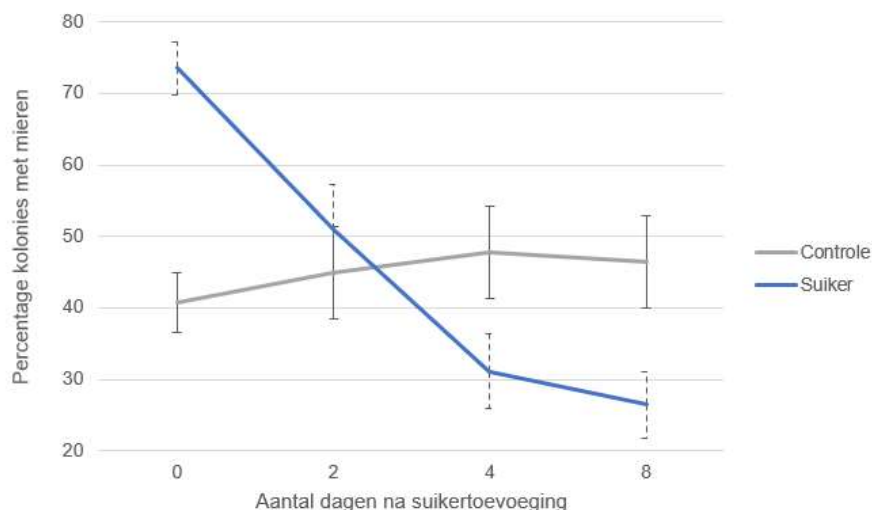
Voordat de alternatieve suikerbron werd aangebracht, werden significante verschillen in mieractiviteit vastgesteld tussen de 28 te monitoren eikenbomen ( $p = 0,0168$ ). Zowel de beginactiviteit en het toevoegen van suiker als de interactie tussen deze twee factoren hebben een significant effect op de mieractiviteit ( $p < 0.0001$ ) (Figuur 15). De mieractiviteit op bomen

met suikertoevoeging was gemiddeld  $4,22$  mieren  $\pm 0,69$ . Op bomen zonder suikertoevoeging werden gemiddeld  $3,23$  mieren  $\pm 0,57$  geteld.



Figuur 15. Invloed van de suikertoevoeging op de mieractiviteit ( $4,22$  mieren  $\pm 0,69$ ) op *Quercus palustris*.

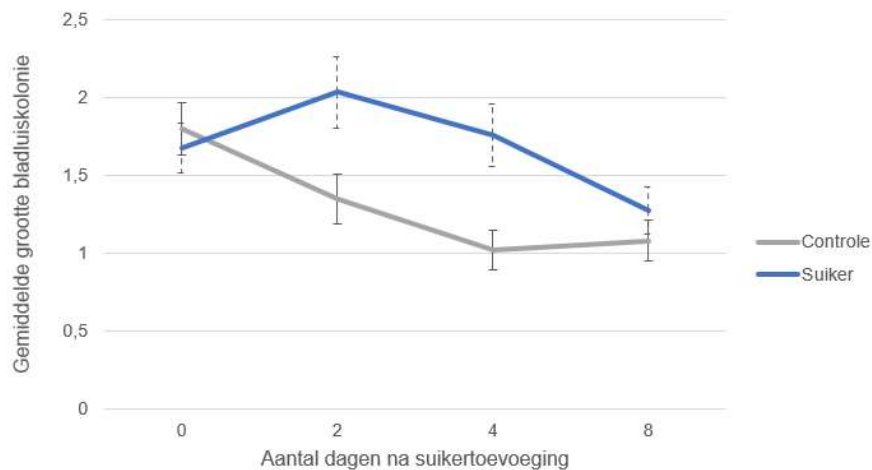
Voor het ophangen van de suikertoevoeging werden significante verschillen in mierbezoek vastgesteld tussen de bomen van de controlegroep en deze waar de suikerbron in komt ( $p < 0,0001$ ). De behandeling met suiker bracht een significant effect op het mierbezoek teweeg ( $p < 0,0001$ ) (Figuur 16). Het mierbezoek op bomen met suikertoevoeging was lager ( $35,4\% \pm 5,21$ ) dan op bomen zonder suikertoevoeging ( $46,3\% \pm 5,57$ ).



Figuur 16. Invloed van de suikertoevoeging op het percentage kolonies met mieren in aanwezig per boom ( $35,4\% \pm 5,21$ ) op *Quercus palustris*.

Er werden geen significante verschillen in de grootte van de bladluizenkolonies vastgesteld tussen behandelingen voor het uithangen van de suikerbron ( $p = 0,3675$ ). De behandeling met suiker had effect op het aantal bladluizen ( $p < 0,0001$ ) (Figuur 17). De grootte van een bladluizenkolonie op bomen met suikerbron was gemiddeld  $1,67$  bladluizen  $\pm 0,21$ . Op bomen

zonder suikertoevoeging werden gemiddeld 1,14 bladluizen  $\pm$  0,15 bladluizen per kolonie geteld.

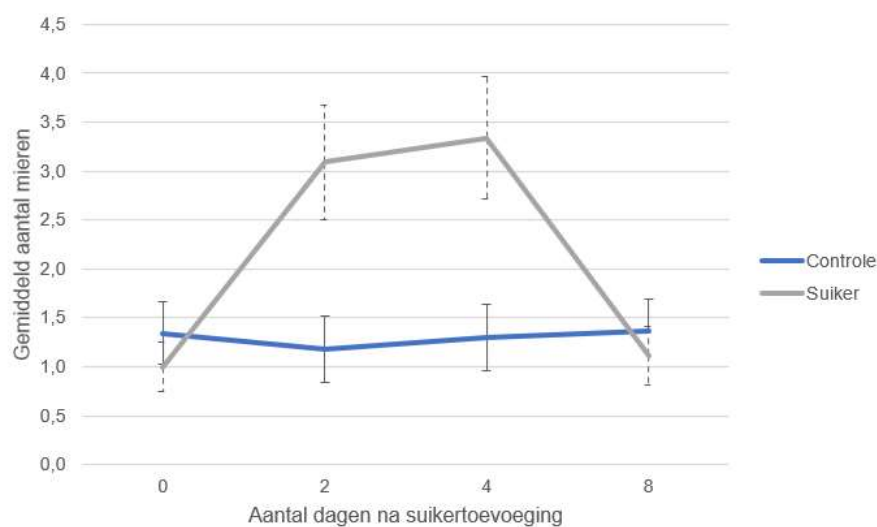


Figuur 17. Invloed van de suikertoevoeging op de gemiddelde bladluizenkoloniegrootte van (1,67 bladluizen  $\pm$  0,21) op *Quercus palustris*.

Er werden te weinig natuurlijke vijanden waargenomen om statistische analyses op uit te voeren. Ook wanneer de data getransformeerd werd naar aantal natuurlijke vijanden per boom konden de analyses niet uitgevoerd worden.

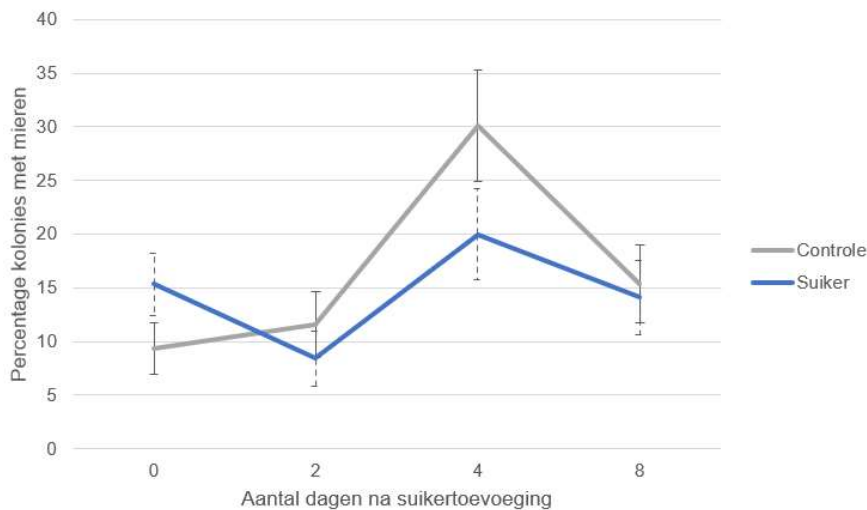
### 4.3. *Acer pseudoplatanus*

Voor het uithangen van de suikertoevoeging werden bij *A. pseudoplatanus* geen verschillen in mieractiviteit waargenomen tussen de 30 te monitoren esdoorns ( $p = 0,4068$ ). Het toevoegen van een alternatieve suikerbron veroorzaakte een significante verhoging van de mieractiviteit ( $p < 0,0001$ ; 2,45 mieren  $\pm$  0,58 t.o.v. 1,25 mieren  $\pm$  0,31) (Figuur 18).



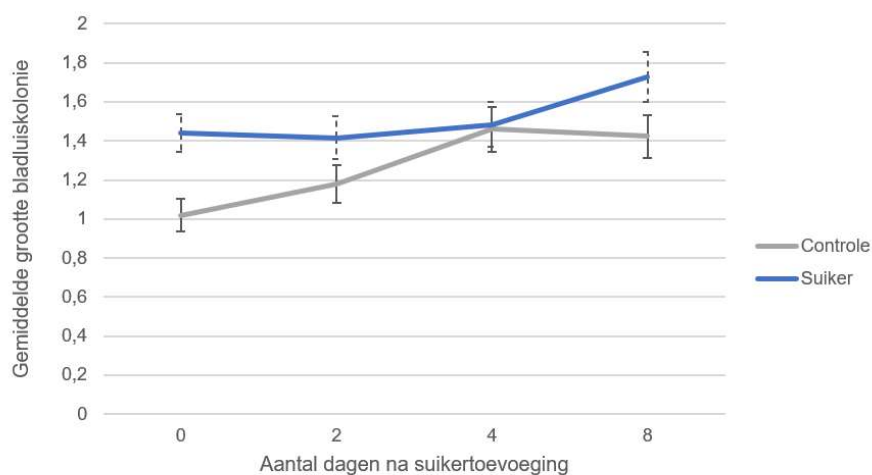
Figuur 18. Invloed van de suikertoevoeging op de mieractiviteit (2,45 mieren  $\pm$  0,58) op *Acer pseudoplatanus*.

Voor het uithangen van de suikerbron werden geen significante verschillen in mierbezoek en het aantal bladluizen per kolonie vastgesteld tussen de bomen van de controlegroep en deze waar de suikertoevoeging in komt ( $p$  is resp. 0,1286 en 0,1893). Het toepassen van suiker had een marginaal significant effect op het mierbezoek ( $p = 0,0517$ ) (Figuur 19). Het mierbezoek was lager bij bomen met suikerbron ( $13,5\% \pm 4,39$ ) dan bij controle bomen ( $18,2\% \pm 5,53$ ).



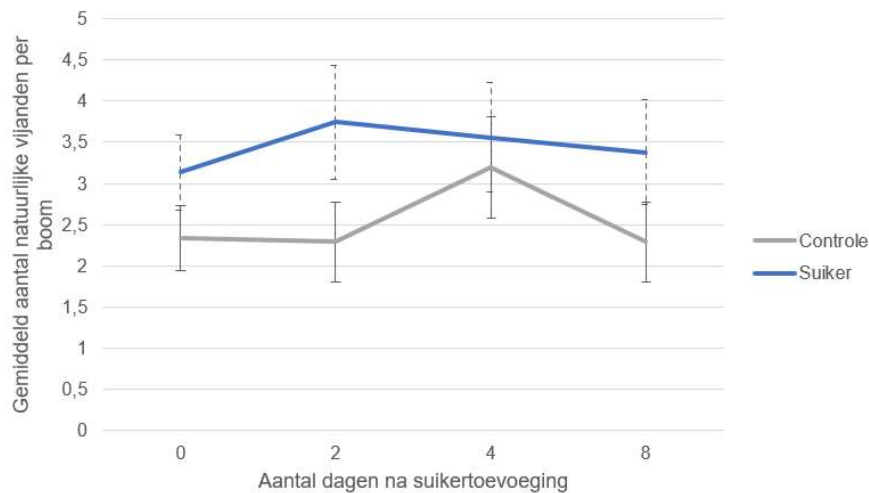
Figuur 19. Invloed van de suikertoevoeging op het percentage kolonies met mieren in aanwezig per boom ( $13,5\% \pm 4,39$ ) op *Acer pseudoplatanus*.

De behandeling met suiker had effect op het aantal bladluizen ( $p = 0,0141$ ) (Figuur 20). Op bomen met de alternatieve suikerbron werden gemiddeld 1,54 bladluizen  $\pm 0,12$  per kolonie geteld. Op bomen zonder suikertoevoeging was dat gemiddeld 1,35 bladluizen  $\pm 0,10$  per kolonie.



Figuur 20. Invloed van de suikertoevoeging op de gemiddelde bladluizenkoloniegrootte van ( $1,54$  bladluizen  $\pm 0,12$ ) op *Acer pseudoplatanus*.

Voordat de alternatieve suikerbron werd aangebracht, werden geen significante verschillen in het aantal natuurlijke vijanden waargenomen tussen de bomen van de controlegroep en deze waar de suikertoevoeging in wordt uitgehangen ( $p = 0,1877$ ). Het toepassen van suiker had een significant effect op het aantal natuurlijke vijanden ( $p = 0,0064$ ) (Figuur 21). Het aantal natuurlijke vijanden per boom met suikerbron was hoger (3,56 natuurlijke vijanden  $\pm 0,55$ ) dan bij controle bomen (2,60 natuurlijke vijanden  $\pm 0,42$ ).



Figuur 21. Invloed van de suikertoevoeging op het gemiddelde aantal natuurlijke vijanden per boom (3,56 natuurlijke vijanden  $\pm 0,55$ ) op *Acer pseudoplatanus*.

#### 4.4. Samenvatting

Tabel 2 geeft een overzicht van de resultaten van de veldproef per boomsoort.

Tabel 2. Overzicht van het effect van een alternatieve suikerbron op de mieractiviteit, het mierbezoek, de grootte van de bladluizenkolonies en het aantal natuurlijke vijanden tijdens de veldproef (+: positieve invloed, -: negatieve invloed, 0: neutrale invloed).

	<i>T. cordata</i>	<i>Q. palustris</i>	<i>A. pseudoplatanus</i>	Verwachting
<b>Mieractiviteit</b>	+	-	+	+
<b>Mierbezoek</b>	0	-	-	-
<b>Bladluizenkolonie</b>	-	+	+	-
<b>Natuurlijke vijanden</b>	-	/	+	+

## 4.5. Determinatie

Uit de determinatie van de mieren volgt dat *Lasius niger* zowel bij de behandeling als bij de controlegroep over de drie boomsoorten heen voorkwam. Op een tweetal *Q. palustris* bomen met suikerbron was naast *L. niger* ook de mierensoort *Myrmica rubra* aanwezig.

Per boomsoort werd een andere bladluisoort gedetermineerd. Bij *T. cordata* werd uitsluitend de lindenbladluis (*Eucallipterus tiliae*) waargenomen. Bij *A. pseudoplatanus* was dat uitsluitend de grote esdoornluis (*Drepanosiphum platanoidis*). Bij beide boomsoorten waren de bladluizen zowel gevleugeld als ongevleugeld. In het geval van *Q. palustris* ging het niet om bladluizen, maar wel om takluizen van het genus *Lachnus*. Deze laatste tot op soort determineren is delicaat. De taxonomie van bepaalde soorten is namelijk onzeker (Blackman & Eastop, 1994). Er werden enkel ongevleugelde takluizen gemonitord.

Opmerkelijk is dat op één van de vijftien met suiker behandelde *A. pseudoplatanus* op de dagen waar de mieractiviteit het hoogst was (dag 2 en 4) naast *L. niger* ook een andere mierensoort waargenomen werd. Deze mier was roodkleurig en slank. Op de laatste dag (dag 8) wanneer de mieren in ethanol verzameld werden, was deze mierensoort niet aanwezig waardoor deze ook niet gedetermineerd werd.

Tabel 3 geeft een overzicht van de verschillende mier- en bladluisoorten per boomsoort.

Tabel 3. Overzicht mier- en bladluisoorten per boomsoort.

	Mierensoort(en)	Bladluizensoort
<b><i>T. cordata</i></b>	<i>L. niger</i>	<i>E. tiliae</i>
<b><i>Q. palustris</i></b>	<i>L. niger</i> , <i>M. rubra</i>	<i>Lachnus</i> sp.
<b><i>A. pseudoplatanus</i></b>	<i>L. niger</i>	<i>D. platanoidis</i>

Op en rond *T. cordata* werden zowel voor de controlegroep als voor de behandeling met de alternatieve suikerbron voornamelijk eitjes van gaasvliegen, geparasiteerde bladluizen en lieveheersbeestjes gemonitord. Er werden zowel eitjes, als larven en adulten van het lieveheersbeestje waargenomen.

Bij *Q. palustris* werden op enkele uitzonderingen na geen natuurlijke vijanden gemonitord. In het geval van *A. pseudoplatanus* werden zowel voor de controlegroep als voor de behandeling voornamelijk eitjes van de gaasvliegen en geparasiteerde bladluizen gemonitord.

## 5. Discussie

Het toepassen van een suikervoorzienig bij *Tilia cordata* leidde tot een significant effect op de mieractiviteit. De mieractiviteit op bomen met een alternatieve suikerbron lag hoger dan bij controle bomen. Dit strookt zowel volgens de verwachting dat mieren actiever gebruik maken van de stam om de suikertoevoeging te bereiken, als volgens de bevindingen van Wäckers *et al.* (2017) waar de mieractiviteit op bomen met de alternatieve suikerbron in de kruin toenam. In het geval van *T. cordata* had de alternatieve suikerbron geen significant effect op het mierbezoek. Dit is te verwachten aangezien mieren geen mutualistische relatie aangaan met *E. tiliae*. Volgens Völkl *et al.* (1999) zijn de oorzaken voor het uitblijven van deze relatie de lage honingdauwproductie en het feit dat deze bladluisoort zich voedt in relatief kleine, afzonderlijke kolonies met als gevolg dat een werkstermier een relatief lage kwantitatieve opbrengst ontvangt.

Over het algemeen heeft de suikertoevoeging aan de lindebomen een significant effect op de grootte van de bladluizenkolonies. De gemiddelde bladluizenkolonie was bij bomen met suiker kleiner dan bij controlebomen, al liggen de waarden zeer dicht bij elkaar. Wanneer de grafiek (Figuur 13) geanalyseerd wordt, geldt deze uitspraak uitsluitend voor dag 0 en dag 2. Na dag 2 werden grotere bladluizenkolonies gemonitord op bomen met suiker, wat niet strookt met de resultaten van Wäckers *et al.* (2017). Alhoewel ook hier de waarden zeer dicht bijeen liggen. Voor het uithangen van de alternatieve suikerbronnen (op dag 0) werden significante verschillen in mierbezoek en aantal bladluizen per kolonie tussen de controlegroep en de groep waar de suikertoevoeging in wordt uitgehangen vastgesteld. Het mierbezoek lag hoger bij de groep waar de suikertoevoeging in wordt uitgehangen, terwijl het aantal bladluizen er lager lag. Dit strookt niet met de verwachting dat meer mierbezoek leidt tot meer bladluizen. Wellicht valt deze bevinding te wijten aan het uitblijven van een mutualisme tussen mier en *E. tiliae*. Het verschil in mierbezoek kan niet te wijten zijn aan een verschil in mieractiviteit aangezien voor deze laatste parameter geen significant verschil tussen de twee groep werd vastgesteld. Het is niet eenvoudig hier een verklaring voor te geven. Mogelijks passeerden de mieren op deze bomen vaker toevallig op de bladeren waar bladluizenkolonies op aanwezig waren. Het verschil in aantal bladluizen per kolonie valt wellicht te wijten aan de standplaats van de bomen. De bomen uit de controlegroep die significant meer bladluizen hadden, stonden beschut tussen twee andere rijen bomen, waardoor de invloed van wind en regen op de beweging van de bladluizen mogelijk werd verzwakt (Finlay & Luck, 2011). In tegenstelling tot de groep waar de suikertoevoeging in wordt uitgehangen die zich aan de rand van het perceel bevond.

Het toevoegen van suiker had een negatief significant effect op het aantal natuurlijke vijanden. Iets wat tegen de verwachtingen in is. Aangezien er geen mutualistische relatie tussen *E. tiliae* en mieren is, wordt geen verandering in het aantal natuurlijke vijanden verwacht. Dit effect zou te wijten zijn aan andere toevallige factoren. Het feit dat er meer natuurlijke vijanden aanwezig zijn in de controlegroep kan gelinkt worden aan de grotere bladluizenkolonies op deze bomen in vergelijking met de bomen waar suiker in opgehangen is. Er is namelijk een goede synchronisatie tussen predatoren en plaagkolonies (Firepong & Kumar, 1975).

In het geval van *Quercus palustris* ging het niet om bladluizen, maar wel om takluizen. Deze werden gedetermineerd tot op genusniveau *Lachnus*. Tot op soort determineren is moeilijk aangezien de taxonomie van bepaalde soorten onzeker is. Blackman en Eastop (1994) suggereren dat het een complex geheel van soorten met verschillende karyotypen en waardplanten is. Een karyotype is de verzameling chromosomen van een individu. Tijdens het monitoren was duidelijk dat deze soort frequent door mieren werd bezocht, wat ook bevestigd wordt in de literatuur (Paris & Espadaler, 2009; Skinner & Whittaker, 1981). Bovendien zal bij hoge takluispopulatie-densiteiten *L. niger*, naast het oogsten van honingdauw, de takluizen ook prederen (Sakata, 1995).

Er werden significante verschillen vastgesteld voor zowel de mieractiviteit als voor het mierbezoek. Na dag 2 liggen beide parameters bij de bomen met suikertoevoeging lager dan bij de bomen van de controlegroep. In het geval van de mieractiviteit is dit niet volgens de verwachtingen. Een factor die mogelijk een rol gespeeld kan hebben, is de onderlinge concurrentie tussen *M. rubra* en *L. niger* op twee van veertien bomen waar suiker op werd toegepast (Czechowski, 1985). De daling in mierbezoek komt overeen met de resultaten van Wäckers *et al.* (2017).

Voor het uithangen van de alternatieve suikerbronnen (op dag 0) werden significante verschillen in mieractiviteit en mierbezoek tussen de controlegroep en de groep waar de suikertoevoeging in wordt uitgehangen vastgesteld. Zowel de mieractiviteit als het mierbezoek lag bij deze tweede groep significant hoger. Een mogelijke verklaring voor het significant verschil in mieractiviteit is de verspreiding van die mierenkolonies tussen de bomen (Rico-Gray & Oliveira, 2007). Het is logisch dat in het geval van *Q. palustris* een hogere mieractiviteit leidt tot meer mierbezoek wegens het mutualisme tussen mier en takluis van het genus *Lachnus*.

De grootte van een takluiskolonie op bomen met een alternatieve suikerbron was groter dan een takluiskolonie op bomen zonder suikertoevoeging. Dit strookt niet met de resultaten van Wäckers *et al.* (2017) waar na dag 2 juist een omgekeerd verschil gemonitord werd. De verklaring hiervoor kan mogelijks te vinden zijn in de lage bladluis aantallen. Voor de bomen waar een suikertoevoeging in ophing was de gemiddelde grootte van een kolonie 1,67 bladluizen  $\pm$  0,21. Deze waarde ligt 0,53 bladluizen hoger dan het gemiddelde van de controlegroep. Wanneer één à twee bladluizen samen voorkomen, wordt in de praktijk niet over een kolonie gesproken.

Als conclusie volgt dat het gebruik van een suikertoevoeging het gedrag van mieren niet alleen ten opzichte van bladluizen, maar ook ten opzichte van takluizen kan wijzigen. Op basis van de resultaten van deze veldproef kan niet geconcludeerd worden dat een alternatieve suikerbron een optie is in de biologische bestrijding van takluizen als gevolg van de lage aantallen. Door dit onderzoek te herhalen op het moment dat de takluizendensiteit maximaal is, kan duidelijkheid geschept worden over de inzetbaarheid van een alternatieve suikerbron als biologische bestrijdingsmethode van *Lachnus* sp. op *Q. palustris*.

Het feit dat er bijna geen natuurlijke vijanden op en rond deze boomsoort waargenomen werden, is mogelijks te wijten aan het mutualisme tussen mier en takluis. De mieren beschermen takluizen van het genus *Lachnus* actief, maar natuurlijke vijanden zullen plaatsen



waar deze mieren aanwezig zijn vermijden (Oliver *et al.*, 2008). Daarnaast kan *Lachnus* sp. zichzelf verdedigen tegen predatoren door te trappen met de achterpoten (InfluentialPoints, z.j.).

De mieractiviteit op *Acer pseudoplatanus* waar suikertoevoeging in ophangt, neemt zoals in het geval van *T. cordata* toe, terwijl dit op de controlebomen zo goed als constant blijft. Op dag 8 valt de mieractiviteit van de behandeling sterk terug zodat dit op hetzelfde niveau als de mieractiviteit van de controle komt. Die dag waren de weersomstandigheden niet verschillend ten opzichte van de andere dagen (Bijlage 1; Bijlage 2). Hitte, neerslag of wind zijn dus geen verklaring voor deze terugval in activiteit. Een mogelijke verklaring is de hoge abundantie aan wespen (*Vespula*). Wespen kwamen bij iedere boomsoort voor, maar bij *A. pseudoplatanus* werden er opmerkelijk meer waargenomen met een absolute piek in densiteit op dag 8 (Figuur 22, links). De proef op deze boomsoort vond eind augustus plaats. In de gematigde streken van Europa leeft een kolonie wespen vijf maanden, van half mei tot half oktober. Naar het eind van het wespenseizoen toe is er een verschuiving in hun voedsel van proteïnen naar koolhydraten. Vanaf dat moment zijn er minder larven aanwezig in het nest. Het zijn uitsluitend deze larven die net zoals bij mieren nood hebben aan proteïnen. Bovendien neemt de behoefte aan koolhydraten van zowel de vrouwelijke als de mannelijke wespen toe. Voor vrouwelijke wespen is deze verhoogde behoefte een voorbereiding op de hibernatie. Voor mannelijke wespen dient het ter voorbereiding om te paren (Edwards, 1980).

In een studie van Grangier en Lester (2011) in Nieuw-Zeeland werd vastgesteld dat wespen werksters van de inheemse mierensoort *Prolasius advenus* bij een voedselbron kunnen verwijderen. De wesp pakt de werksters met haar mandibels, vliegt naar achter en laat ze ongedeerd op enige afstand van het voedsel weer vallen. Zowel de frequentie als de efficiëntie van dit gedrag nam significant toe met de densiteit van de mieren bij de voedselbron. Aangezien wespen zonminnende insecten zijn en dus uitsluitend overdag bij warm weer actief zijn (Peeters *et al.*, 2004), hebben de mieren vanaf valavond de kans om zich te voeden aan de alternatieve suikerbron en dus niet op het moment van monitoren. Dit werd vastgesteld tijdens de eigen waarnemingen (Figuur 22, rechts). Een tweede mogelijke verklaring voor de terugval in mieractiviteit is ook een gevolg van de enorme abundantie aan wespen. De wieken van de dispensers werden aangevreten door de wespen (Figuur 22, links). Door deze aantasting droogde de buitenkant van de wieken uit, met als gevolg dat de mieren ook na valavond geen toegang hadden tot de Biogluc®.



Figuur 22. Aanwezigheid van wespen op de alternatieve suikerbron bij *Acer pseudoplatanus* op dag 8 (**links**). Vanaf valavond krijgen mieren de kans om zich ongestoord te voeden met de alternatieve suikerbron op *Acer pseudoplatanus*. Vanaf dit moment zijn er namelijk geen wespen meer aanwezig (**rechts**).

Tijdens de veldproef waren een tiental beschermhoezen ter beschikking om de wick af te schermen voor wespen (Figuur 23). Op deze manier werd de concurrentie van wespen eenvoudig uitgeschakeld. Om alternatieve suikerbronnen toe te passen in het openbaar groen zijn deze hoezen een voorwaarde naar veiligheid van buurtbewoner en passanten toe.



Figuur 23. Dispensers met daarin Biogluc® met (**rechts**) en zonder (**links**) beschermhoes die de wick afschermt voor wespen.

Het toepassen van suiker had een marginaal significant effect op het mierbezoek bij *A. pseudoplatanus*. Het feit dat het hier slechts over een marginaal significant effect gaat kan te wijten zijn aan het uitblijven van een mutualistische relatie tussen bladluizen van het genus *Drepanosiphum* en mieren (Skinner & Whittaker, 1981; Stukalyuk *et al.*, 2020). Verder spelen een te laag bladluisaantal en toevallige factoren mogelijk een rol hierin. De reden dat mieren niet in mutualisme treden met deze bladluissoort zou juist hun gering aantal zijn (Stukalyuk *et al.*, 2020).

Het toepassen van suiker had, net zoals bij *Q. palustris*, een positief significant effect op de bladluizenkoloniegrootte op *A. pseudoplatanus*. Er werden grotere kolonies vastgesteld op bomen met suikerbron dan op controlebomen, wat niet strookt met de resultaten van Wäckers *et al.* (2017). In principe wordt er geen significant effect verwacht, aangezien er net zoals bij *T. cordata*, geen mutualisme plaats vindt tussen mieren en bladluizen op deze boom. Mogelijks is ook hier het lage bladluis aantal een verklaring voor dit onverwacht positief effect.

In tegenstelling tot *T. cordata* had het toevoegen van suiker een positief significant effect op het aantal natuurlijke vijanden. Ook hier werd geen verandering verwacht door het uitblijven van een mutualistische relatie tussen mier en *D. platanoidis*. De toename in natuurlijke vijanden op en rondom bomen met een alternatieve suikerbron kan gelinkt worden aan de grotere bladluizenkolonies op deze bomen dankzij de synchronisatie tussen predatoren en plaagkolonies (Firempong & Kumar, 1975).

Voor de parameters koloniegrootte en aantal natuurlijke vijanden werden voor zowel de bomen van de controlegroep als voor deze waar de suikertoevoeging in hing en over de drie boomsoorten heen te lage aantallen verzameld. Met als gevolg dat de resultaten en uitspraken weinig representatief zijn.

Een reden voor de lage bladluisaantallen is het moment van de veldproef ten opzichte van de populatiedensiteit van deze insecten. In een gematigd klimaat bereikt deze densiteit halfweg de zomer een piek (midden juli in het Verenigd Koninkrijk) waarna het aantal bladluizen sterk vermindert. Dit wordt de 'mid-season crash' genoemd (Karley *et al.*, 2004). Tijdens de zomermaanden is het floëem van bomen over het algemeen van lage kwaliteit (Douglas, 1993). Vermoedelijk vertonen bladluizen die leven op bomen een periode van geprogrammeerde stopzetting van ontwikkeling en voortplanting zodat populaties gedurende enkele weken in slechts één ontwikkelingsstadium verkeren (als volwassen insect of als nimfe, afhankelijk van soort tot soort) als evolutionair antwoord op deze voorspelbare seizoensgebonden verschuiving van voedingsstoffen in floëem (Dixon, 1975). Zes tot acht weken later herstelt de bladluizenpopulatie zich opnieuw (Karley *et al.*, 2004). De term die hiervoor van toepassing is, is estivatie (Dixon, 1998). Aangezien de veldproef plaats vond gedurende de maand augustus, kan aangenomen worden dat de bladluizenpopulatie zich enkele weken na de piek bevond.

Het feit dat er weinig adulte natuurlijke vijanden gemonitord werden, zou te wijten kunnen zijn aan de gehanteerde methode. Door tijdens het monitoren continu tussen de bomen te staan en hierbij bladeren en takken te bewegen, kunnen de adulten opgeschrikt en gevluht zijn. Gezien natuurlijke vijanden laat in het seizoen waarschijnlijk geen invloed hebben op de populatiedynamiek van bladluizen is mogelijks een verklaring voor zowel de weinige adulten als de lage aantallen nimfen en eitjes. Natuurlijke vijanden zouden slechts vroeg in het seizoen invloed hebben wanneer bladluizenkolonies nog klein zijn. Empirische bevestiging hiervan is weliswaar nog zwak (Kindlmann & Dixon, 2010). Hierdoor bestaat het gemonitord aantal natuurlijke vijanden voornamelijk uit geparasiteerde bladluizen.

Het is niet vanzelfsprekend om bekomen resultaten af te toetsen aan waarnemingen en conclusies uit de literatuur. De interactie tussen mier, bladluis en plant hangt van veel

verscheidene factoren af, wat een geïntegreerde plaagbeheersing complex maakt (Delabie, 2001). Vaak worden proeven uitgevoerd met andere mier- en bladluisoorten en onder verschillende omstandigheden. Dit kan leiden tot verschillende of meer uitgesproken effecten.

Ondanks de lage bladluisaantallen werden effecten van de suikerbron op de mieractiviteit en mierbezoek vastgesteld. De overige resultaten moeten met enige voorzorg geïnterpreteerd worden, wegens het beperkt aantal herhalingen. Door de proef te hernemen met meer herhalingen en op een vroeger tijdstip zodat de bladluisdensiteit maximaal is, zullen de resultaten mogelijk duidelijker zijn.

Indien deze proef in de toekomst herhaald wordt op andere laanbomen, dient de determinatie van de bladluizen op voorhand te gebeuren. Zo kan nagegaan worden of ze een mutualistische relatie met mieren kennen. Anders zal een behandeling van de geïnfecteerde bomen met een alternatieve suikerbron weinig significante gevolgen vertonen die zullen bijdragen aan de biologische plaagbeheersing van bladluizen. Daarnaast dient de proef over een langere periode opgezet te worden om het doeltreffendheid van deze geïntegreerde plaagbestrijding in kaart te brengen. Aangezien mieren trouw zijn aan hun route en dus sterk plaatsgebonden zijn (Stockan & Robinson, 2016), is het interessant om de alternatieve suikerbronnen vanaf het voorjaar (Madsen & Offenberg, 2020) en gedurende enkele jaren uit te hangen. Dit zou het effect ervan op de mieren maximaliseren (Nelson & Daane, 2007).

# Laboproef

## 1. Doelstelling

De vragen waarop we aan de hand van deze laboproeven een antwoord trachten te vinden, luiden: 'Is *Crematogaster scutellaris* in staat om de bladluizenpopulatie onder controle te houden?' En verder, 'welke invloed heeft het aanbieden van de alternatieve suikerbron Biogluc® hier op?'.

## 2. Materiaal en methoden

### 2.1. Proefopzet

Vijf vleugelloze adulten van de bladluissoort *Acyrtosiphon pisum* werden in een microkosmos (met afmetingen 9 x 8 x 21,5 cm en met gaas langs één kant) op de waardplant *Vicia faba* geplaatst. Het zaad van deze *V. faba*-plant werd minstens negen dagen op voorhand geplant in een *Drosophila*-kweekfles van 170 ml met daarin een substraat van bevochtigde potgrond. De potgrond werd voor het introduceren van de mieren afgeschermd aan het hand van een mousse. Wanneer de parthenogenetische reproductie van de vijf adulte bladluizen leidde tot een kolonie van minstens 20 bladluizen, werd het aantal herleid naar 20 individuen door telkens de kleinste bladluizen te verwijderen. Op planten waar dit aantal nog niet bereikt was, werden bladluizen van hetzelfde stadium bijgezet. Op het moment dat de bladluizen herleid werden naar 20 individuen, werden de steunblaadjes die zich ondertussen ontwikkeld hadden bij *V. faba* verwijderd met behulp van een scalpel. Deze steunblaadjes worden bezet door grote, donker paarse extraflorale nectarklieren (EFN) (Mondor & Addicott, 2003), wat ongewenst was tijdens deze proef. 24 uur voor de aanvang van de proef werden gestandaardiseerde kolonies van 50 *Crematogaster scutellaris*-werksters en 20 larven afgezonderd van de volledige kolonie in afzonderlijke PET-containers (10 x 8 x 9 cm) om hen te laten wennen aan deze nieuwe omgeving. Deze PET-containers bevatten een nestcompartiment in gips, afgedekt met twee draagglasjes van 7,5 x 2,5 cm. Tijdens de 24 uur afzondering werden de kolonies enkel voorzien van water om ze uit te hongeren. Vervolgens werd de PET-container verbonden met de microkosmos (Figuur 24, links). De opstelling werd bewaard in een klimaatskast bij een temperatuur van 25°C, een relatieve vochtigheid van 60% en een lichtregime van 16 u licht en 8 u duisternis.

Er werden twee behandelingen en één controle uitgevoerd met telkens dertien herhalingen (Tabel 4). Aan één van de behandelingen werd Biogluc® als alternatieve suikerbron toegevoegd. Deze suikeroplossing bevond zich in een glazen buisje afgesloten met een wiek en werd in de microkosmos van de bladluizen geplaatst (Figuur 24, rechts). Bij de andere behandeling kregen de mieren geen Biogluc® aangeboden. De controle bevatte geen mieren en geen Biogluc®.



Figuur 24. Het artificieel nest met *Crematogaster scutellaris* werd verbonden aan de microkosmos van *Acyrthosiphon pisum* op zijn waardplant *Vicia faba* (links). Een close-up van de suikeroplossing Biogluc® in de microkosmos van *Acyrthosiphon pisum* (rechts).

De aanwezigheid van mieren in de bladluizenkolonie, oftewel het mierbezoek van *C. scutellaris* aan *A. pisum*, werd gedurende 30 seconden geteld. Daarnaast werd het aantal bladluizen aanwezig in de microkosmos geteld. De volgende monitoringstijdstippen voor deze parameters werden net zoals bij de veldproef vastgelegd:

- net voor het toepassen van de alternatieve suikerbron.
- twee, vier en acht dagen na het inbrengen van de alternatieve suikerbron.

Op de laatste dag (dag 8) werd het aantal dode mieren bij de behandeling en controle met de mieren geteld.

Tabel 4. Overzicht van de behandelingen en de controle waar de laboproef uit opgebouwd is.

	Overzicht
<b>Behandeling met Biogluc®</b>	<i>V. faba</i> + <i>A. pisum</i> + <i>C. scutellaris</i> + Biogluc®
<b>Behandeling zonder Biogluc®</b>	<i>V. faba</i> + <i>A. pisum</i> + <i>C. scutellaris</i>
<b>Controle</b>	<i>V. faba</i> + <i>A. pisum</i>

Voor de hierboven beschreven finale proef werden verschillende combinaties tussen plant en bladluiz onderzocht in preliminaire proeven. Iedere microkosmos tijdens deze voorstudies werd geplaatst in een klimaatskast bij een temperatuur van 25°C, een relatieve vochtigheid van 60% en een lichtregime van 16 u licht en 8 u duisternis.

Als eerste werd de combinatie van *Phaseolus vulgaris* met *Aphis fabae* geselecteerd. De bladeren en de stengel van *P. vulgaris* krullen niet. Dit vergemakkelijkt het niet-destructief

tellen van de bladluizen. Daarenboven treden mieren vaak in mutualisme met *A. fabae* (Engel *et al.*, 2001; Offenberg, 2001; Vantaux *et al.*, 2012; Woodring *et al.*, 2004). *A. fabae* is wellicht de meest bestudeerde bladluis in Europa door zijn voorkeur voor de geslachten *Phaseolus* en *Vicia* (Blackman & Eastop, 2007). Het overbrengen van twee verschillende veldkolonies van *A. fabae* met als waardplanten *Euonymus fortunei* en *Viburnum opulus* naar *P. vulgaris* bleek niet succesvol.

Hoewel *V. faba* een waardplant is van *A. fabae*, werd geen proef uitgevoerd met deze combinatie. Deze bladluissoort is relatief klein en zou moeilijk zichtbaar zijn tussen de gekrulde bladeren.

Ook de combinatie van *A. pisum* op *P. vulgaris* werd onderzocht en was niet succesvol. De overgebrachte *A. pisum* overleefden niet op deze waardplant. Wellicht zijn allelochemicaliën uitgescheiden door de plant hier de oorzaak van (Goławska, 2010).

Tot slot werd overgegaan tot het gebruik van een kolonie *A. pisum* die in labo-omstandigheden werd gekweekt op *V. faba*. Zowel deze plaagsoort als deze waardplant beschikken over karakteristieken die ze minder gunstig maken voor gebruik in de beoogde proefopzet. *A. pisum* gaat immers geen mutualisme aan met mieren (Tokunaga & Suzuki, 2008; Völkl *et al.*, 1999). Daarenboven beschikt *V. faba* over EFN op de stipulen en bemoeilijkt het krullen van de bladeren het niet-destructief tellen van de aanwezige bladluizen.

Om enerzijds de ontwikkelingssnelheid van de bladluizenkolonie en anderzijds de draagkracht van de plant na te gaan, werden tien jonge *V. faba*-planten afgesneden en in water geplaatst. Op deze planten werden telkens vijf vleugelloze adulten overgeplaatst. Na drie en zes dagen in de klimaatskast leidde de reproductie van de bladluizen tot resp.  $21,6 \pm 12,1$  (gemiddelde  $\pm$  standaardfout) en  $37,1 \pm 20,2$  individuen. *A. pisum* op *V. faba* vertoont bij 25°C de hoogste intrinsieke groeisnelheid ( $0,30 \text{ d}^{-1}$ ) (Ahn *et al.*, 2020). Over het algemeen produceert een vleugelloze *A. pisum* 8,5 nakomelingen per dag. De productie van nakomelingen start op een leeftijd van 10 à 12 dagen (Capinera, 2008). Dit komt niet overeen met het aantal bladluizen na drie en zes dagen in de klimaatskast. Wellicht waren de vijf overgeplaatste adulten te jong. Vanaf dag zeven bleek de helft van de afgesneden planten niet over voldoende draagkracht te beschikken om zich te herstellen van de aangebrachte stressfactoren. Hieruit werd besloten dat de bladluis kolonies gestandaardiseerd zouden worden op 20 individuen.

Ook uit een herhaling met 15 oudere planten, bleek op dag 9 dat 50% van de planten het had begeven door de stress waaraan de planten werden blootgesteld. Daarom werd gekozen om verder te gaan met volwaardige *V. faba*-planten.

## 2.2. Kweek van de studie-organismen

### 2.2.1. *Lasius niger*

Oorspronkelijk was het de bedoeling de proeven uit te voeren met *L. niger*. In juli 2019 werden tijdens de bruidsvlucht van *L. niger* jonge koninginnen verzameld op Campus Coupure van de Universiteit Gent. Elk jonge koningin werd afzonderlijk in een glazen proefbuis geplaatst die

voor de helft met water gevuld werd. Het watercompartiment werd afgesloten met watten. Na het inbrengen van de koningin werd de proefbuis gedicht met een volgende prop watten. De koninginnen werden onmiddellijk in de koelkast geplaatst en bewaard gedurende 12 maanden. Tijdens deze periode werden de koninginnen niet gevoed.

In juli 2020 werden 16 koninginnen uit de koelkast gehaald en op kamertemperatuur gehouden om de koloniestichting te initiëren. De koloniestichting faalde bij vijf van de zestien koninginnen. Tweeënhalf maanden later werd iedere koningin met de nanitici naar een artificieel nest overgebracht. De nestjes zijn opgebouwd uit een PET-container (met afmetingen 10 x 8 x 9 cm). De PET-container bevat een nestcompartiment in gips, afgedekt met twee draagglasjes van 7,5 x 2,5 cm. Aan de bovenrand werd langs de binnenkant een laagje Fluon aangebracht om uitbraak te bemoeilijken. Water en een suikeroplossing met aminozuren (48% vol. water, 40% vol. suiker, 8% vol. esdoornsiroop en 4% vol. Aminobolan Mega Forte) waren ad libitum beschikbaar. De aminozuren worden voorzien door Aminobolan Mega Forte, een hoog gedoseerde vloeibare aminozuurformule. Twee keer per week werd iedere kolonie voorzien van een dode larve van de grote wasmot (*Galleria mellonella*) en enkele fruitvliegjes (*Drosophila hydei*) als bron aan proteïnen. De kolonies werden in het labo in omgevingstemperatuur gehouden. Een warmtemat werd op de artificiële nesten geplaatst als warmtebron.

Na acht maanden vertoonden elf kolonies verdere groei van het aantal werksters. Ondanks de groei werd het aantal werksters in de jonge kolonies ontoereikend geacht op het moment dat de laboproef werd opgestart. Door het uitzonderlijk koude voorjaar waren in de natuur bovendien nog geen *L. niger*-kolonies te vinden met broed in het popstadium waarmee de labokolonies zouden kunnen worden aangevuld.

### 2.2.2. *Crematogaster scutellaris*

Jonge koninginnen van *C. scutellaris* werden in oktober 2018 na de bruidsvlucht verzameld in Sauvebonne, Frankrijk. Na de koloniestichting in een proefbuis, werd de jonge kolonie overgeplaatst in een artificieel nest bestaande uit cellenbeton (YTONG). De kolonie werd sindsdien verzorgd in het labo bij omgevingstemperatuur. Onder een deel van het artificieel nest werd een warmtemat geplaatst als warmtebron. Het dieet van de kolonie bestond uit water en een suikeroplossing met aminozuren (48% vol. water, 40% vol. suiker, 8% vol. esdoornsiroop en 4% vol. Aminobolan Mega Forte) die ad libitum aangeboden werden. Het artificieel dieet werd regelmatig aangevuld met larven van de grote wasmot (*Galleria mellonella*). Op het moment van de proef was broed in alle stadia in de kolonie aanwezig.

### 2.2.3. *Acyrtosiphon pisum*

*A. pisum* gaat geen mutualisme aan met mieren (Tokunaga & Suzuki, 2008; Völkl *et al.*, 1999). Zij heeft een lage honingdauwproductie en voedt zich in relatief kleine, afzonderlijke kolonies. Dit maakt dat een werkstermier een relatief lage kwantitatieve opbrengst ontvangt (Völkl *et al.*, 1999) wanneer zij *A. pisum* zou bezoeken. Als gevolg van het uitblijven van een mutualisme zou *A. pisum* enkele eigenschappen ontwikkeld hebben om beter te lopen, wat tot een



verhoogd vermogen tot verspreiding leidt. Deze eigenschappen zijn langere poten, een relatief grote wandelsnelheid en een verhoogde tolerantie tegen verhongering. Deze eigenschappen zijn tot stand gekomen omdat *A. pisum* ontsnapt aan zijn natuurlijke vijanden door zich te laten vallen waarna de bladluis opnieuw een waardplant moet bereiken (Tokunaga & Suzuki, 2008). Mogelijks spelen de lange sifonen van *A. pisum* ook een rol in het uitblijven van de associatie met mieren. Over het algemeen worden bladluizen met langgerekte sifonen namelijk minder vaak verzorgd door mieren (Sorensen, 2009).

De kolonie *A. pisum* wordt gekweekt in laboratoriumomstandigheden in een klimaatskast bij een temperatuur van 23°C, een relatieve vochtigheid van 60% en een lichtregime van 16 u licht en 8 u duisternis. Tuinboon (*Vicia faba*) wordt hierbij aangeboden als waardplant.

### 3. Dataverwerking

Voor de laboproef werden alle statistische analyses uitgevoerd in SPSS Statistics 27. Om te testen of er significante verschillen in de populatie bladluizen zijn tussen de behandeling zonder Biogluc®, de behandeling met Biogluc® en de controle zonder mieren werd de Mood's median test gebruikt. De One-way ANOVA werd toegepast om te testen of er een significant verschil was in het aantal dode mieren op dag 8 tussen de behandeling zonder Biogluc® en de behandeling met Biogluc®.

In eerste instantie werd de Kruskal-Wallis test als niet-parametrische test gekozen om te controleren of er significante verschillen in het aantal bladluizen waren tussen de behandeling zonder Biogluc®, de behandeling met Biogluc® en de controle. Hierbij worden populaties getest op de afkomst uit dezelfde distributies (Kruskal & Wallis, 1952). Deze test is een alternatief voor de One-way ANOVA omdat enkel de controle zonder mieren een normale verdeling volgt. Dit werd vooraf gecontroleerd aan de hand van de Shapiro-Wilk test. De Kruskal-Wallis test is gebaseerd op veronderstellingen waaraan voldaan moet zijn. In de eerste plaats moeten de steekproeven onafhankelijk zijn van elkaar. Vervolgens moeten de verdelingen van de populaties dezelfde vorm hebben. Uit de histogrammen bleek dat deze laatste veronderstelling in dit geval niet voldaan werd. De populaties zijn niet afkomstig uit dezelfde distributie. Daarom werd geopteerd voor de Mood's median test. Deze alternatieve test is minder krachtig dan de Kruskal-Wallis test. Wanneer uit de Mood's median test bleek dat er significante verschillen optreden ( $p < 0,05$ ), werd een post-hoc analyse in de vorm van de paarsgewijze Dunn test uitgevoerd (Verwaeren *et al.*, 2018). Dit werd voor dag 2, 4 en 8 na het toepassen van de alternatieve suikerbron uitgevoerd om per observatiedag na te gaan of er significante verschillen optreden tussen de drie groepen.

Om na te gaan of er een significant verschil was tussen het aantal dode mieren op dag 8 tussen de behandeling met Biogluc® en de behandeling zonder Biogluc® werd een One-way ANOVA (variantieanalyse) uitgevoerd. Deze test heeft als doel de gemiddelden van twee of meer groepen te vergelijken voor één afhankelijke variabele, in dit geval het aantal dode mieren op dag 8. One-way ANOVA is gebaseerd op veronderstellingen waaraan voldaan moet worden. Ten eerste dienen de steekproeven onafhankelijk en van een continue variabele te zijn. Ten tweede moet de data binnen elke groep afzonderlijk afkomstig zijn uit een normaal verdeelde populatie. Dit werd nagegaan met de Shapiro-Wilk test. Ten derde dienen de varianties van de populaties gelijk te zijn (homoscedasticiteitsvoorwaarde), wat gecontroleerd werd met de Levene test (Verwaeren *et al.*, 2018).

De grafieken met de mediaan van het aantal bladluizen per dag voor iedere behandeling en controle werden gegenereerd met Microsoft Excel versie 2104.

## 4. Resultaten

Zowel op dag 2 en 4 als op dag 8 werden significante verschillen in bladluisaantal tussen de behandeling met Biogluc®, de behandeling zonder Biogluc® en de controle vastgesteld. De p-waarde was voor de drie monitoringsdagen telkens kleiner dan 0,001. Uit de bijhorende paarsgewijze post-hoc analyses in de vorm van de Dunn test bleek dat de drie groepen onderling steeds significant verschilden ( $p < 0,05$ ) voor deze parameter (Tabel 5).

Tabel 5. Significantie (p-waarden) tussen de twee behandelingen en de controle per monitoringsdag volgens de Dunn test.

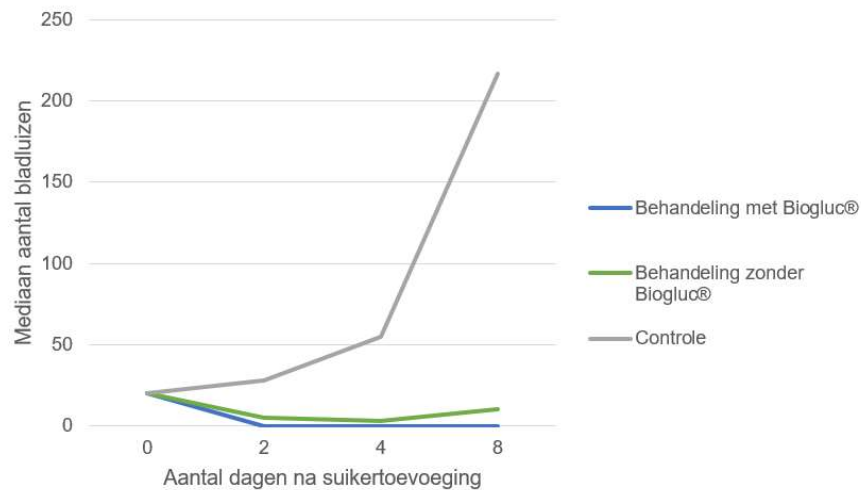
		Significantie
<b>Dag 2</b>	Behandeling met Biogluc® - Behandeling zonder Biogluc®	0,018
	Behandeling met Biogluc® - Controle	0,000
	Behandeling zonder Biogluc® - Controle	0,000
<b>Dag 4</b>	Behandeling met Biogluc® - Behandeling zonder Biogluc®	0,005
	Behandeling met Biogluc® - Controle	0,000
	Behandeling zonder Biogluc® - Controle	0,001
<b>Dag 8</b>	Behandeling met Biogluc® - Behandeling zonder Biogluc®	0,001
	Behandeling met Biogluc® - Controle	0,000
	Behandeling zonder Biogluc® - Controle	0,000

maar zoomt in op de behandeling met Biogluc® en behandeling zonder Biogluc® om het significante verschil tussen deze twee aan te duiden.

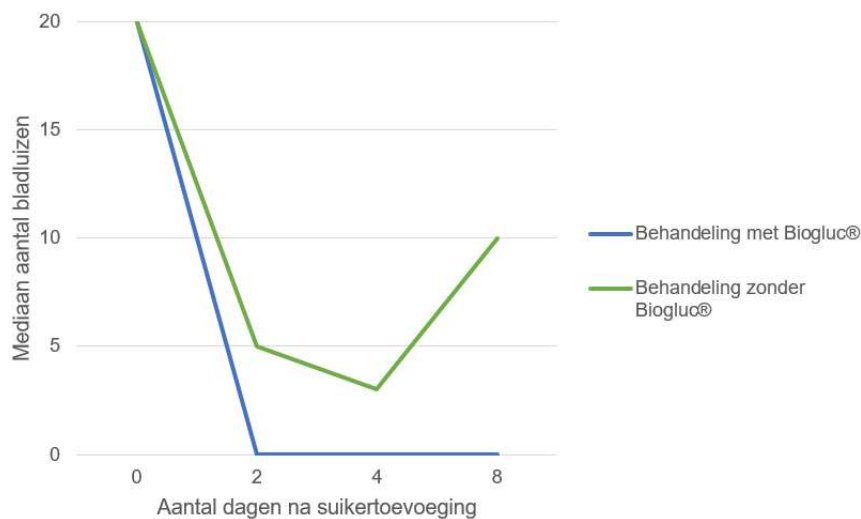
Tabel 6 en Figuur 25 geven de mediaan van het aantal bladluizen per dag voor de behandeling met Biogluc®, de behandeling zonder Biogluc® en de controle. Figuur 26 is een onderdeel van Figuur 25, maar zoomt in op de behandeling met Biogluc® en behandeling zonder Biogluc® om het significante verschil tussen deze twee aan te duiden.

Tabel 6. De mediaan van het aantal *Acyrtosiphon pisum* per dag voor de behandeling met Biogluc®, de behandeling zonder Biogluc® en de controle.

Dag	Behandeling met Biogluc®	Behandeling zonder Biogluc®	Controle
<b>0</b>	20	20	20
<b>2</b>	0	5	28
<b>4</b>	0	3	55
<b>8</b>	0	10	217



Figuur 25. Invloed van suikertoevoeging op de mediaan van het aantal *Acyrtosiphon pisum* per dag voor de behandeling met *Biogluc*®, de behandeling zonder *Biogluc*® en de controle.



Figuur 26. Invloed van suikertoevoeging op de mediaan van het aantal *Acyrtosiphon pisum* per dag voor de behandeling met *Biogluc*® en de behandeling zonder *Biogluc*®.

Naast het aantal bladluizen per microkosmos werd in het geval van de behandeling met *Biogluc*® en de behandeling zonder *Biogluc*® de aanwezigheid van mieren in de bladluizenkolonie, oftewel het mierbezoek van *C. scutellaris* aan *A. pisum*, gemonitord. In geen geval werd er mierbezoek vastgesteld.

Het aantal dode mieren was zowel voor de behandeling met *Biogluc*® als voor de behandeling zonder *Biogluc*® normaal verdeeld ( $p$  is resp. 0,407 en 0,310). Aan de homoscedasticiteitsvoorwaarde werd voldaan ( $p = 0,479$ ). Het aantal dode mieren op dag 8 verschilde significant tussen de behandeling met *Biogluc*® en de behandeling zonder *Biogluc*® ( $p < 0,001$ ). Dit aantal bedroeg resp.  $7,77 \pm 1,11$  en  $31,69 \pm 1,63$ .

## 5. Discussie

De verschillen in de parameter bladluisaantal tussen de behandeling met Biogluc®, de behandeling zonder Biogluc® en de controle waren significant op dag 8 (maar zoomt in op de behandeling met Biogluc® en behandeling zonder Biogluc® om het significante verschil tussen deze twee aan te duiden.

Tabel 6). De mediaan van de controle lag 22 keer hoger dan die van de behandeling zonder Biogluc®. Hieruit werd duidelijk dat *C. scutellaris* succesvol was in het controleren van de bladluispopulatie in beide behandelingen.

Het onder controle houden van de bladluispopulatie resulteerde verder in een merkbaar visueel verschil in de gezondheidstoestand van *V. faba* na het aflopen van de proef (Figuur 27). De planten in de controle werden het zwaarste aangetast. Over het algemeen waren de visuele verschillen tussen de behandeling met Biogluc® en die zonder Biogluc® minder uitgesproken, hoewel de planten behorende tot de behandeling met Biogluc® gezonder oogden dan de planten waarbij *C. scutellaris* geen Biogluc® aangeboden kreeg. Een kwantitatieve of kwalitatieve benadering van de gezondheidstoestand van de planten maakte geen deel uit van de proefopzet.



Figuur 27. *Vicia faba* planten na het aflopen van de proef in de behandeling met Biogluc® en *Crematogaster scutellaris* (**links**), in de behandeling met *Crematogaster scutellaris* zonder Biogluc® (**midden**) en in de controle zonder *Crematogaster scutellaris* (**rechts**).

Op de wanden van de microkosmosen in de controle waren bovendien meer druppels honingdauw te zien dan op die van de twee behandelingen, hoewel dit niet werd gekwantificeerd. Op dag 8 werd verkleuring van de honingdauw vastgesteld, hetgeen wees op de aanwezigheid van schimmels (Sorensen, 2009) of andere micro-organismen. In enkele gevallen ging het om rooskleurige vlekken. Mogelijks is de roze gist *Sporobolomyces roseus* hiervan de oorzaak (Fokkema *et al.*, 1983). De aanwezigheid van *C. scutellaris* zorgde

eveneens dat indirecte schade als gevolg van de bladluizen die zich voedden met het plantenfloëem werd voorkomen.

De significante verschillen in bladluisaantal tussen de behandeling met Biogluc® en de behandeling zonder Biogluc® tonen aan dat de aanwezigheid van de alternatieve suikerbron een positieve invloed had op de predatie van *A. pisum* door *C. scutellaris*. De bladluispopulatie werd beter onder controle gehouden wanneer Biogluc® werd aangeboden. Dit is in lijn met de bevindingen door Offenberg (2001). In het labo-onderzoek van Offenberg (2001) werd een afname in bladluispopulatie vastgesteld wanneer mieren een alternatieve suikerbron aangeboden kregen. Offenberg (2001) verklaarde dat de afname het gevolg is van predatie door mieren. Net als tijdens het onderzoek van Offenberg (2001) leek tijdens dit onderzoek *C. scutellaris* geen verdere baat te hebben bij de aanwezigheid van de *A. pisum* kolonie wanneer de alternatieve suikerbron ter beschikking werd gesteld. In slechts drie van de dertien gevallen werd er op dag 2 nog minstens één bladluis waargenomen. Ook in het geval van de behandeling zonder Biogluc® werd predatie op *A. pisum* vastgesteld, maar hier bevatten slechts drie van de dertien herhalingen op dag 2 geen bladluizen meer. Predatie werd in beide behandelingen reeds enkele uren na introductie van *C. scutellaris* bij *A. pisum* waargenomen (Figuur 28). De verhoogde predatie komt ook overeen met de resultaten van het veldonderzoek van Pérez-Rodríguez *et al.* (2021). Hieruit blijkt dat mieren meer neigen naar predatie in bomen voorzien van dispensers met Biogluc®. Pérez-Rodríguez *et al.* (2021) stellen dat verder onderzoek noodzakelijk is om de verhoogde predatie op honingdauwproducerende insecten door mieren wanneer een alternatieve suikerbron aangeboden wordt, te ondersteunen. De resultaten van de laboproef in het kader van deze masterproef kunnen bijdragen aan deze ondersteuning.



Figuur 28. *Crematogaster scutellaris* predateert op *Acyrthosiphon pisum*. Deze predatie is minder uitgesproken bij wanneer de suikeroplossing Biogluc® niet wordt aangeboden.

Offenberg (2001) heeft het over een afname in bladluispopulatie, terwijl de behandeling met Biogluc® leidde tot het bijna volledig verdwijnen van *A. pisum* op de plant. In de onderzoeken van Schumacher en Platner (2009), Carabalí-banguero *et al.* (2013) en Win *et al.* (2018) werd echter geen predatie vastgesteld. Mogelijks werden de bestudeerde bladluizen niet aanzien als een geschikte of toegankelijke bron van proteïnen, of bleef de productie van honingdauw

belangrijk voor de groei en de overleving van de mierenkolonie (Win *et al.*, 2018). Hieruit zou het tegenovergestelde geconcludeerd kunnen worden in het geval van *A. pisum*. Deze soort is mogelijk wel een goede bron van proteïnen, maar niet van kwalitatieve suikers. De relatief lage kwantitatieve honingdauwopbrengst die de mieren ontvangen van *A. pisum* (Völkl *et al.*, 1999) was wellicht te verwaarlozen ten opzichte van de kwalitatieve sachariden in het Biogluc®-preparaat die makkelijk toegankelijk en in overvloed aanwezig was.

In de behandeling zonder Biogluc® verliep de intensiteit van de predatie niet in die mate dat de volledige populatie bladluizen verdween. Integendeel, na dag 4 werd opnieuw een toename van het aantal bladluizen opgemeten (Figuur 26). In dit geval bleek de kwalitatief lage honingdauw toch belangrijk voor de overleving van de werksters en larven en bleven sommige bladluizen gespaard van predatie. In geen van de herhalingen werd mierbezoek vastgesteld tijdens de observatiemomenten. Mogelijks nuttigden de *C. scutellaris*-werksters louter de afgescheiden druppels honingdauw die in de microkosmos terecht kwamen. Dit gedrag werd tweemaal waargenomen. Bovendien bestaat de mogelijkheid dat de werksters zich voedden met honingdauw buiten de observatiemomenten. Hoewel het voor *C. scutellaris* wellicht niet evident was om de honingdauw rechtstreeks van de *A. pisum* te oogsten wegens de langgerekte sifonen van deze bladluis (Sorensen, 2009). Predatie werd uitsluitend waargenomen wanneer een mier reeds een bladluis vast had. Het bezoeken van bladluizenkolonies door mieren om ze te prederen, werd niet waargenomen.

Het aantal dode mieren in de behandeling zonder Biogluc® en in de behandeling met Biogluc® was significant verschillend. Het aantal dode mieren was vier maal groter in de behandeling zonder Biogluc® dan in die met. De hogere sterfte is wellicht te wijten aan een gebrek aan koolhydraten in de behandeling zonder Biogluc®. In deze behandeling werden suikers enkel aangeleverd door de niet-gepredeerde bladluizen. Bovendien werd op dag 4 een stijging van het aantal bladluizen opgemeten in de behandeling zonder Biogluc®. Deze stijging zou in verband kunnen gebracht worden met het verzwakken of het sterven van de werksters ten gevolge van dit suikertekort.

Tot slot werd er schade aan de planten waargenomen die rechtstreeks werd aangebracht door *C. scutellaris*. De bladeren en in mindere mate de stengel werden aangevreten (Figuur 29). Dit gedrag deed zich voor in beide behandelingen. Novgorodova (2019) stelde vast dat *Myrmica scabrinodis* bij een tekort aan koolhydraten, jonge kiemplanten van tarwe doorbeet waarna ze het vrijgekomen plantensap verzamelden. Novgorodova (2019) verklaarde dit gedrag als een overlevingsstrategie bij acuut tekort aan koolhydraten. Hoewel *C. scutellaris* deze strategie zou kunnen hebben toegepast in de behandeling zonder Biogluc®, vormt dit geen verklaring voor de schade die werd aangebracht in de behandeling met Biogluc®. Het plantenweefsel van *V. faba* is week. De aanleiding van het graaf- en bijtgedrag in dit zachte materiaal zou kunnen liggen bij het zoeken naar een uitweg uit de microkosmos of bij het zoeken naar andere voedselbronnen. De werksters vertoonden bovendien hetzelfde gedrag naar de mousse toe.



Figuur 29. Plantendelen van *Vicia faba* werden aangevreten door *Crematogaster scutellaris*.

Mechanische beschadiging (door herbivoren) van *V. faba* bladeren leidt ertoe dat de plant meer en opvallendere EFN produceert. Mondor en Addicott (2003) suggereren dat dit een adaptieve en induceerbare respons is om predatoren aan te trekken wanneer het risico op herbivoren toeneemt. Deze onderzoekers namen dit effect reeds na één week waar. Daarnaast verschenen er, ondanks het wegsnijden van de EFN van *V. faba* op dag 0, vanaf dag 4 nieuwe schutblaadjes met EFN die op het moment van verwijderen (nog) niet zichtbaar waren. Naast de aanwezigheid van deze nectariën werd nog een factor waarom *V. faba* een minder geschikte plant is voor het uitvoeren van deze proef bevestigd: de bladeren krulden om of krulden zich rond de stengel. Dit bemoeilijkte het tellen van de bladluizen.

Ondanks het uitblijven van een mutualisme tussen *C. scutellaris* en *A. pisum* en de nadelen van het gebruik van *V. faba* werden significante resultaten bekomen bij de proef rond het aanbieden van een suikerbron. De resultaten toonden aan dat het aanbieden van Biogluc® de mate waarin *C. scutellaris* de *A. pisum*-populatie onder controle hield deed toenemen. Er werden niet alleen meer en sneller bladluizen gepredeerd, de beschikbaarheid van Biogluc® zorgde er ook voor dat de mortaliteit van de werksters afnam. Het gebruik van Biogluc® kan dus een praktische toepassing kennen in de biologische bestrijding van bladluizen en dient verder onderzocht te worden.



## Algemeen besluit

De complexiteit waaruit het mutualisme tussen mier en bladluis is opgebouwd, mag niet onderschat worden. Het is een samenspel tussen mier, Homoptera, plant en andere insecten (zoals natuurlijke vijanden van de bladluis) dat doorheen de tijd tot stand is gekomen en afhangt van verschillende invloedfactoren (Delabie, 2001). Dit mutualisme wordt omgeschreven als fragiel en onstabiel (Yao, 2014) en is één van de meest facultatieve, opportunistische en variabele associaties met een grote onzekerheid over het effect van de aanwezigheid van mieren op de plant (Rico-Gray & Oliveira, 2007).

Bij de veldproef werden significante invloeden waargenomen op de vier gemonitorde parameters. Er werd verwacht dat de mieractiviteit positief, het mierbezoek negatief, het aantal bladluizen negatief en het aantal natuurlijke vijanden positief beïnvloed zouden worden. Deze combinatie werd echter op geen van de drie boomsoorten verwezenlijkt. De proef liep over een beperkt aantal herhalingen op een moment waarop de bladluisaantallen over het algemeen laag zijn met als gevolg dat er slechts lage aantallen gemonitord werden. Daarnaast werden weinig natuurlijke vijanden waargenomen. Tenslotte werd op twee van de drie boomsoorten een bladluissoort gedetermineerd waar mieren geen mutualistische relatie mee aangaan. Deze factoren leiden ertoe dat effecten te wijten aan het toeval niet helemaal uitgesloten kunnen worden. De resultaten van de veldproef dienen met enige voorzorg geïnterpreteerd te worden. Toch levert dit onderzoek het bewijs dat de gehanteerde methode significante effecten veroorzaakt en potentieel heeft om effectief ingezet te worden in de geïntegreerde plaagbeheersing van bladluizen. Door langer, uitgebreider en vanaf het voorjaar onderzoek te verrichten kan het effect van een alternatieve suikerbron op het mutualisme tussen mier en bladluis per boomsoort in kaart gebracht worden (Madsen & Offenberg, 2020; Nelson & Daane, 2007). Het juiste moment om de proef te herhalen bevindt zich ten opzichte van de populatiedensiteit van bladluizen voor de 'mid-season crash' midden juli (Karley *et al.*, 2004). Uit de veldproef op *Q. palustris* die geïnfecteerd was met de *Lachnus* sp. takluis komt naar voren dat deze methode mogelijk ook bruikbaar is op andere honingdauwproducerende plaagsoorten binnen de Hemiptera. Gelijkaardige proeven op de wolluis bevestigen dit (Carabalí-banguero *et al.*, 2013; Nelson & Daane, 2007; Parrilli *et al.*, 2021; Pérez-Rodríguez *et al.*, 2021; Win *et al.*, 2018).

In de laboratoriumproef rond de invloed van het toevoegen van een suikerbron (Biogluc®) op de interactie tussen *Crematogaster scutellaris* en *Acyrtosiphon pisum* bleken de verschillen in het aantal bladluizen in de behandeling met Biogluc®, de behandeling zonder Biogluc® en de controle significant. Ondanks dat dit niet kwantitatief of kwalitatief werd opgemeten, was de gezondheidstoestand van *Vicia faba* bij het aflopen van de proef zichtbaar verschillend wanneer een suikerbron aanwezig was. De daling in bladluisaantal in de behandeling met Biogluc® toont aan dat de aanwezigheid van *C. scutellaris* die de alternatieve suikerbron Biogluc® aangeboden krijgt een directe negatieve invloed uitoefent op de populatiegroei van *A. pisum* in de microkosmos. De daling in het aantal bladluizen is te wijten aan de predatie van de bladluizen door *C. scutellaris*. In de behandeling zonder Biogluc® bewijst de daling in

bladluisaantal dat *C. scutellaris* ook in dit geval in staat is om de bladluizenpopulatie in de microkosmos onder controle te houden. *C. scutellaris* lijkt *A. pisum* niet te verzorgen, maar heeft wel baat bij de aanwezigheid ervan. Er bleven in bijna alle herhalingen van de behandeling zonder Biogluc® bladluizen aanwezig op de planten terwijl dit niet het geval was bij de behandeling met Biogluc®. De honingdauw blijkt belangrijk te zijn voor de overleving van de werksters en de larven (Win *et al.*, 2018). Ondanks het uitblijven van een mutualisme tussen mier en *A. pisum* werden in dit onderzoek significante resultaten bekomen die aantonen dat een alternatieve suikerbron als Biogluc® een mogelijkheid biedt binnen de geïntegreerde beheersing van bladluizen.

Zowel bij de veldproef als bij de laboproef werd nagegaan in welke mate het mutualisme tussen mier en bladluis verstoord kan worden door mieren de alternatieve suikerbron Biogluc® aan te bieden. In beide gevallen werden significante resultaten bekomen. De methode is veelbelovend en kan naar de toekomst toe een rol spelen in de biologische beheersing van bladluizen.

## Toekomstperspectieven

De resultaten van deze masterproef wijzen in de richting dat het aanbieden van een alternatieve suikerbron zoals Biogluc® aan mieren een mogelijke methode kan zijn in de geïntegreerde bestrijding van bladluizen. De uitkomsten zijn slechts een aanzet naar verder en uitgebreider onderzoek. Door de veldproef uit te voeren op belangrijke boomsoorten aanwezig in de sierteelt, de fruitteelt en het openbaar groen kan een overzicht gemaakt worden om de toepasser te informeren op welke bomen en op welk tijdstip een alternatieve suikerbron effectief is om het aantal bladluizen te verminderen. Dit kan leiden tot een eenvoudige en relatief goedkope aanpak die, eens de suikerdispensers zijn uitgehangen, geen verdere aandacht nodig heeft.

Door alternatieve suikerbronnen op percelen met sierbomen of fruitgaarden te combineren met het uitzetten van natuurlijke vijanden zou een synergetisch effect bekomen kunnen worden. Parrilli *et al.* (2021) concluderen dat dit in het geval van de wolluis tot aanzienlijke verbeteringen van de ecosysteemdiensten, zoals predatie en parasitisme, leidt. De onderzoekers zetten naast 120 dispensers per ha ook de sluipwesp *Anagyrus vladimiri* en het lieveheersbeestje *Cryptolaemus montrouzieri*, dat natuurlijke vijanden zijn van de wolluis, uit. Deze laatste predator werd alleen op planten waar wolluiskolonies op voorkwamen uitgezet. Dit leverde een precieze en effectieve, maar arbeidsintensieve bestrijding op. Er dient onderzocht te worden of dit synergetisch effect in stand blijft wanneer alle natuurlijke vijanden ad random verspreid over het perceel uitgezet worden. Het toepassen wordt op die manier minder arbeidsintensief.

Verschillende onderzoekers bestudeerden reeds de invloed van de voorspelde klimaatsopwarming op het mutualisme tussen mier en bladluis in verschillende regio's aan de hand van proeven (Barton & Ives, 2014; Blanchard *et al.*, 2021). Op basis hiervan wordt voorspeld dat een klimaatsopwarming van 3°C in gematigde streken tot een versterkt mutualisme tussen mieren en bladluizen zal leiden (Blanchard *et al.*, 2021). Het verder onderzoeken en uitwerken van het aanbieden van een alternatieve suikerbron om het mutualisme tussen mier en bladluis te verbreken kan ook naar aanleiding hiervan een interessante aanpak zijn in de geïntegreerde beheersing van bladluizen in gematigde streken.

## Literatuurlijst

- Ahn, J. J., Cho, J. R., Kim, J.H., & Seo, B. Y. (2020). Thermal Effects on the Population Parameters and Growth of *Acyrtosiphon pisum* (Harris) (Hemiptera: Aphididae). *Insects*, 11(8), 481.
- Alfaress, S., Brodersen, C., Ammar, E., Rogers, M., & Killiny, N. (2018). Laser surgery reveals the biomechanical and chemical signaling functions of aphid siphunculi (cornicles). *PLOS ONE*, 13(10).
- Alhadidi, S. N., Griffin, J. N., & Fowler, M. S. (2018). Natural enemy composition rather than richness determines pest suppression. *BioControl*, 63(4), 575–584.
- Altham, P. M. E. (1978). Two Generalizations of the Binomial Distribution. *Journal of the Royal Statistical Society: Series C (Applied Statistics)*, 27(2), 162–167.
- ArcGIS Online. (z.j.). Geraadpleegd op november 18, 2020, via <https://www.arcgis.com/index.html>
- Arganda, S., Nicolis, S. C., Perochain, A., Pechabadens, C., Latil, G., & Dussutour, A. (2014). Collective choice in ants: The role of protein and carbohydrates ratios. *Journal of Insect Physiology*, 69(C), 19–26.
- Azcárate, F. M., Kovacs, E., & Peco, B. (2007). Microclimatic conditions regulate surface activity in harvester ants *Messor barbarus*. *Journal of Insect Behavior*, 20(3), 315–329.
- Bale, J. S., Van Lenteren, J. C., & Bigler, F. (2008). Biological control and sustainable food production. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 363(1492), 761–776.
- Barton, B. T., & Ives, A. R. (2014). Direct and indirect effects of warming on aphids, their predators, and ant mutualists. *The Ecological Society of America*, 95(6), 1479–1484.
- Beattie, A. J. (1985). *The evolutionary ecology of ant-plant mutualisms*. Cambridge University Press.
- Beattie, A. J. (1989). Myrmecotrophy: Plants fed by ants. *Trends in Ecology & Evolution*, 4(6), 172–176.
- Billen, J. (2006). Signal variety and communication in social insects. *Proceedings of the Netherlands Entomological Society Meetings*, 17, 9–25.
- Billen, J., & Morgan, E. D. (1998). Pheromone Communication in Social Insects: Sources and Secretions. In R. K Vander Meer, M. D Breed, M. Winston, & K. E Espelie (Eds.), *Pheromone Communication in Social Insects* (1st ed.). Westview Press, Inc.
- Biobest. (z.j.). Geraadpleegd op februari 9, 2021 via: <https://www.biobestgroup.com>
- Biogroei. (z.j.). Natuurlijke vijanden van bladluizen. Geraadpleegd op maart 26, 2021 via: <https://www.biogroei.be>
- Blackman, R. L. (1987). Reproduction, cytogenetics and development. In K. A. Minks & P. Harrewijn (Eds.), *Aphids: Their biology, natural enemies & control* (pp. 163–195). Elsevier.
- Blackman, R. L., & Eastop, V. F. (1994). *Aphids on the World's Trees: An Identification and Information Guide*. CAB International.
- Blackman, R. L., & Eastop, V. F. (2007). Taxonomic Issues. In H. F. van Emden & R. Harrington (Eds.), *Aphids as Crop Pests* (pp. 1–22). CAB International.
- Blanchard, S., Lognay, G., Verheggen, F., & Detrain, C. (2019). Today and tomorrow: impact of climate

- change on aphid biology and potential consequences on their mutualism with ants. *Physiological Entomology*, 44(2), 77–86.
- Blanchard, S., Van Offelen, J., Verheggen, F., & Detrain, C. (2021). Towards more intimacy: moderate elevation of temperature drives increases in foraging and mutualistic interactions between *Lasius niger* and *Aphis fabae*. *Ecological Entomology*, 46(2), 406–418.
- Boer, P. (2015). *Mieren van de Benelux* (Tweede). Jeugdbondsuitgeverij, 's Graveland.
- Boulanger, F. X., Jandricic, S., Bolckmans, K., Wäckers, F. L., & Pekas, A. (2019). Optimizing aphid biocontrol with the predator *Aphidoletes aphidimyza*, based on biology and ecology. *Pest Management Science*, 75(6), 1479–1493.
- Brisson, J. A., & Stern, D. L. (2006). The pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*: An emerging genomic model system for ecological, developmental and evolutionary studies. *BioEssays*, 28(7), 747–755.
- Bristow, C. M. (1991). Ant-plant interactions. In C. R. Huxley & D. F. Cutler (Eds.), *Ant-plant interactions* (pp. 104–119). Oxford University Press.
- Bronstein, J. L. (1994). Conditional outcomes in mutualistic interactions. *Trends in Ecology & Evolution*, 9(6), 214–217.
- Buckley, R. C. (1983). Interaction between ants and membracid bugs decreases growth and seed set of host plant bearing extrafloral nectaries. *Oecologia*, 58, 132–136.
- Buckley, R. C. (1987). Interactions involving plants, Homoptera and ants. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 18, 111–135.
- Capinera, J. L. (2008). Pea Aphid, *Acyrtosiphon pisum* (Harris) (Hemiptera: Aphididae). In *Encyclopedia of Entomology* (pp. 2766–2770).
- Carabalí-banguero, D. J., Wyckhuys, K. A. G., Montoya-Ierma, J., Kondo, T., & Lundgren, J. G. (2013). Do additional sugar sources affect the degree of attendance of *Dysmicoccus brevipes* by the fire ant *Solenopsis geminata*? 65–73.
- Cerda, X., & Dejean, A. (2011). Predation by ants on arthropods and other animals. In *Predation in the Hymenoptera: An Evolutionary Perspective*, 39–78.
- Cock, M. J. W., van Lenteren, J. C., Brodeur, J., Barratt, B. I. P., Bigler, F., Bolckmans, K., Cònsoli, F. L., Haas, F., Mason, P. G., & Parra, J. R. P. (2010). Do new Access and Benefit Sharing procedures under the Convention on Biological Diversity threaten the future of biological control? *BioControl*, 55(2), 199–218.
- Czechowski, W. (1985). Competition between *Myrmica laevinodis* Nyl. and *Lasius niger* (L.) (Hymenoptera, Formicoidea). *Annales Zoologici*, 39, 153–173.
- De Clercq, P. (1999). Brave beestjes in de aanval. *Het Ingenieursblad*, 10-11/1999, 50-57.
- Dekoninck, W., Vankerkhoven, F., & Maelfait, J.-P. (2003). *Verspreidingsatlas en voorlopige Rode Lijst van de mieren van Vlaanderen. Rapport van het Instituut voor Natuurbehoud*.
- Delabie, J. H. C. (2001). Trophobiosis between formicidae and hemiptera (sternorrhyncha and auchenorrhyncha): An overview. *Neotropical Entomology*, 30(4), 501–516.
- Depa, Ł., Kaszyca-taszakowska, N., & Taszakowski, A. (2020). *Ant-induced evolutionary patterns in aphids*. 95, 1574–1589.
- Detrain, C., & Prieur, J. (2014). Sensitivity and feeding efficiency of the black garden ant *Lasius niger* to

- sugar resources. *Journal of Insect Physiology*, 64(1), 74–80.
- Devigne, C., & Detrain, C. (2002). Collective exploration and area marking in the ant *Lasius niger*. *Insectes Sociaux*, 49(4), 357–362.
- De Witt, S. (2014). De een zijn dood is de ander zijn brood. Beheer van bladluis met natuurlijke vijand. Geraadpleegd via: [www.boomzorg.nl](http://www.boomzorg.nl)
- Dixon, A. F. G. (1975). Seasonal changes in fat content, form, state of gonads, and length of adult life in the sycamore aphid, *Drepanosiphum platandoides* (Schr.). *Transactions of the Royal Entomological Society of London*, 12, 87–99.
- Dixon, A. F. G. (1998). *Aphid ecology*. Chapman & Hall, London.
- Douglas, A. E. (1993). The nutritional quality of phloem sap utilized by natural aphid populations. *Ecological Entomology*, 18, 31–38.
- Douglas, A. E. (2006). Phloem-sap feeding by animals: Problems and solutions. *Journal of Experimental Botany*, 57(4), 747–754.
- Dussutour, A., & Simpson, S. J. (2009). Report Communal Nutrition in Ants. *Current Biology*, 19(9), 740–744.
- Edwards, R. (1980). *Social Wasps: Their Biology and Control*. Rentokil Limited.
- Engel, V., Fischer, M. K., Wäckers, F. L., & Völkl, W. (2001). Interactions between extrafloral nectaries, aphids and ants: Are there competition effects between plant and homopteran sugar sources? *Oecologia*, 129(4), 577–584.
- Farji-Brener, A. G., Dalton, M. C., Balza, U., Courtis, A., Lemus-Domínguez, I., Fernández-Hilario, R., & Cáceres-Levi, D. (2018). Working in the rain? Why leaf-cutting ants stop foraging when it's raining. *Insectes Sociaux*, 65(2), 233–239.
- Finlay, K. J., & Luck, J. E. (2011). Response of the bird cherry-oat aphid (*Rhopalosiphum padi*) to climate change in relation to its pest status, vectoring potential and function in a crop-vector-virus pathosystem. In *Agriculture, Ecosystems and Environment*.
- Firempong, S., & Kumar, R. (1975). Natural enemies of *Toxoptera aurantii* (Boy.) (Homoptera:Aphididae) on cacao in Ghana. *Biological Journal of the Linnean Society*, 7(4), 261–292.
- Fischer, M. K., & Shingleton, A. W. (2001). Host plant and ants influence the honeydew sugar composition of aphids. *Functional Ecology*, 15(4), 544–550.
- Fisher, D. B., Wright, J. P., & Mittler, T. E. (1984). Osmoregulation by the aphid *Myzus persicae*: A physiological role for honeydew oligosaccharides. *Journal of Insect Physiology*, 30(5).
- Fokkema, N. J., Riphagen, I., Poot, R. J., & de Jong, C. (1983). Aphid honeydew, a potential stimulant of *Cochliobolus sativus* and *Septoria nodorum* and the competitive role of saprophytic mycoflora. *Transactions of the British Mycological Society*, 81(2), 355–363.
- Folgarait, P. J. (1998). Ant biodiversity and its relationship to ecosystem functioning: A review. *Biodiversity and Conservation*, 7(9), 1221–1244.
- Francis, F., Guillonneau, F., Leprince, P., De Pauw, E., Haubruge, E., Jia, L., & Goggin, F. L. (2010). Tritrophic interactions among *Macrosiphum euphorbiae* aphids, their host plants and endosymbionts: Investigation by a proteomic approach. *Journal of Insect Physiology*, 56(6), 575–585.

- Giron, D., Huguet, E., Stone, G. N., & Body, M. (2016). Insect-induced effects on plants and possible effectors used by galling and leaf-mining insects to manipulate their host-plant. *Journal of Insect Physiology*, *84*, 70–89.
- Goławska, S. (2010). Effect of various host-plants on the population growth and development of the pea aphid. *Journal of Plant Protection Research*, *50*(2), 224–228.
- Gómez, J. M., & Zamora, R. (1992). Pollination by ants: consequences of the quantitative effects on a mutualistic system. *Oecologia*, *91*, 410–418.
- Grangier, J., & Lester, P. J. (2011). A novel interference behaviour: invasive wasps remove ants from resources and drop them from a height. *Biology Letters*, *7*(5), 664–667.
- Haesaert, G. (2020). Beheersing van gewasvijanden. Gent: Universiteit Gent - cursus
- Hamilton, C., Lejeune, B. T., & Rosengaus, R. B. (2011). Trophallaxis and prophylaxis: Social immunity in the carpenter ant *Camponotus pennsylvanicus*. *Biology Letters*, *7*(1), 89–92.
- Handel, S. N., & Beattie, A. J. (1990). Seed Dispersal by Ants the insects to carry away its seeds without harming them. *Scientific American*, *263*, 76–83.
- Hogenhout, S. A., & Bos, J. I. B. (2011). Effector proteins that modulate plant-insect interactions. *Current Opinion in Plant Biology*, *14*(4), 422–428.
- Holland, J. N., & Bronstein, J. L. (2008). Mutualism. *Encyclopedia of Ecology*, 2485–2491.
- Hölldobler, B., & Wilson, E. O. (1990). *The Ants*. Belknap Press of Harvard University Press.
- Huang, H. T., & Yang, P. (1987). The Ancient Cultured Citrus Ant. *BioScience*, *37*(9), 665–671.
- Huang, J.-H., Jing, X., & Douglas, A. E. (2015). The Multi-Tasking Gut Epithelium of Insects. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, *67*, 15–20.
- Integrated Taxonomic Information System. Formicidae. Geraadpleegd op oktober 12, 2020 via ITIS Report:  
[https://www.its.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search\\_topic=TSN&search\\_value=154193&print\\_version=PRT&source=to\\_print](https://www.its.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=154193&print_version=PRT&source=to_print)
- Jolivet, P. (1986). *Ants and Plants: An Example of Coevolution*. Backhuys.
- Joosten, N., & Lansink, M. (2010). Bladluis in aantocht. Geraadpleegd via: [www.boomzorg.nl](http://www.boomzorg.nl)
- Kanost, M. R. (2009). Hemolymph. In V. H. Resh & R. T. Cardé (Eds.), *Encyclopedia of Insects* (pp. 446–449). Academic Press.
- Karley, A. J., Parker, W. E., Pitchford, J. W., & Douglas, A. E. (2004). The mid-season crash in aphid populations: Why and how does it occur? *Ecological Entomology*, *29*(4), 383–388.
- Keeton, W. T., & Gould, J. L. (1986). *Biological Science* (4th ed.). W.W. Norton & Co.
- Kindlmann, P., & Dixon, A. F. (2010). Modelling Population Dynamics of Aphids and Their Natural Enemies. In *Aphid Biodiversity under Environmental Change* (pp. 1–20). Springer, Dordrecht.
- Kitching, R. L., & Harmsen, R. (2008). Amensalism. *Encyclopedia of Ecology*, 160–162.
- Koninklijk Meteorologisch Instituut (KMI). (2020). Klimatologisch maandoverzicht augustus. 2020. Geraadpleegd van <https://www.meteo.be>

- Kruskal, W. H., & Wallis, W. A. (1952). Use of Ranks in One-Criterion Variance Analysis. *Journal of the American Statistical Association*, 47(260), 583–621.
- Leroy, P. D., Wathelet, B., Sabri, A., Francis, F., Verheggen, F. J., Capella, Q., Thonart, P., & Haubruge, E. (2011). Aphid-host plant interactions: Does aphid honeydew exactly reflect the host plant amino acid composition? *Arthropod-Plant Interactions*, 5(3), 193–199.
- Marcipont, Y., Braekman, P., Verschoren, L., Moens, J., Casteels, H., & Audenaert, J. (2016). Praktijkgids landbouw en natuur. Module sierteelt. Vlaamse Overheid: Departement Landbouw & Visserij.
- Madsen, N. E. L., & Offenberg, J. (2020). Seasonal Changes in Sugar and Amino Acid Preference in Red Wood Ants of The *Formica rufa* Group. *Sociobiology*, 67(2), 144–152.
- Mailleux, A. C., Deneubourg, J. L., & Detrain, C. (2009). Food transport in ants: Do *Lasius niger* foragers maximize their individual load? *Comptes Rendus - Biologies*, 332(5), 500–506.
- Mittler, T. E. (1958). Studies on the Feeding and Nutrition of *Tuberolachnus Salignus* (Gmelin) (Homoptera, Aphididae). *Journal of Experimental Biology*, 35, 74–84.
- Moir, M. L., Renton, M., Hoffmann, B. D., Leng, M. C., & Lach, L. (2018). Development and testing of a standardized method to estimate honeydew production. *PLOS ONE*, 13(8), 1–16.
- Mondor, E. B., & Addicott, J. F. (2003). Conspicuous extra-floral nectaries are inducible in *Vicia faba*. *Ecology Letters*, 6(6), 495–497.
- Morgan, E. D. (2009). Trail pheromones of ants. *Physiological Entomology*, 34, 1–17.
- Nagy, C., Cross, J. V., & Markó, V. (2015). Can artificial nectaries outcompete aphids in ant-aphid mutualism? Applying artificial sugar sources for ants to support better biological control of rosy apple aphid, *Dysaphis plantaginea* Passerini in apple orchards. *Crop Protection*, 77, 127–138.
- Nagy, C., Cross, J. V., & Markó, V. (2013). Sugar feeding of the common black ant, *Lasius niger* (L.), as a possible indirect method for reducing aphid populations on apple by disturbing ant-aphid mutualism. *Biological Control*, 65(1), 24–36.
- Nalam, V., Isaacs, T., Moh, S., Kansman, J., Finke, D., Albrecht, T., & Nachappa, P. (2020). Diurnal feeding as a potential mechanism of osmoregulation in aphids. *Insect Science*, 521–532.
- Nelson, E. H., & Daane, K. M. (2007). Improving liquid bait programs for Argentine ant control: Bait station density. *Environmental Entomology*, 36(6), 1475–1484.
- Nelson, S. (2006). Sooty Mold. *Encyclopedia of Entomology*, 2055–2055.
- Noppe, C., Michaud, J. P., & De Clercq, P. (2012). Intraguild predation between lady beetles and lacewings: Outcomes and consequences vary with focal prey and arena of interaction. *Annals of the Entomological Society of America*, 105(4), 562–571.
- Novgorodova, T. A. (2019). Getting carbohydrates in ants: damage of the young cereal sprouts by ants of the genus *Myrmica* Latreille, 1804 (Hymenoptera: Formicidae), to obtain plant sap. *Annales de La Société Entomologique de France (N.S.)*, 55(6), 459–464.
- Novgorodova, T. A., & Gavriyuk, A. V. (2012). The degree of protection different ants (Hymenoptera: Formicidae) provide aphids (Hemiptera: Aphididae) against aphidophages. *European Journal of Entomology*, 109(2), 187–196.
- Offenberg, J. (2001). Balancing between mutualism and exploitation: The symbiotic interaction between *Lasius* ants and aphids. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 49(4), 304–310.



- Offenberg, Joachim. (2015). Ants as tools in sustainable agriculture. *Journal of Applied Ecology*, 52(5), 1197–1205.
- Oliver, T. H., Jones, I., Cook, J. M., & Leather, S. R. (2008). Avoidance responses of an aphidophagous ladybird, *Adalia bipunctata*, to aphid-tending ants. *Ecological Entomology*, 33(4), 523–528.
- Oliver, T. H., Mashanova, A., Leather, S. R., Cook, J. M., & Jansen, V. A. A. (2007). Ant semiochemicals limit apterous aphid dispersal. *Proc Biol Sci.*, 274(1629), 3127–3131.
- Paris, C. I., & Espadaler, X. (2009). Honeydew collection by the invasive garden ant *Lasius neglectus* versus the native ant *L. grandis*. *Arthropod-Plant Interactions*, 3(2), 75–85.
- Parker, J. D., & Parker, K. M. (2006). Ants as Naturally Long-lived Insect Models for Aging. In M. P. Conn (Ed.), *Handbook of Models for Human Aging* (pp. 277–282). Academic Press.
- Parr, C. L., Eggleton, P., Davies, A. B., Evans, T. A., & Holdsworth, S. (2016). Suppression of savanna ants alters invertebrate composition and influences key ecosystem processes. *Ecology*, 97(6), 1611–1617.
- Parrilli, M., Profeta, M., Casoli, L., Gambirasio, F., & Masetti, A. (2021). *Use of Sugar Dispensers to Disrupt Ant Attendance and Improve Biological Control of Mealybugs in Vineyard*. 1–16.
- Peeters, C., & Molet, M. (2010). Colonial Reproduction and Life Histories. In L. Lach, C. Parr, & K. Abbott (Eds.), *Ant Ecology* (pp. 159–176). Oxford University Press.
- Peeters, T. M. J., van Achterberg, C., Heitmans, W. R. B., Klein, W. F., Lefeber, V., van Loon, A. J., Mabelis, A. A., Nieuwenhuijsen, H., Reemer, M., de Rond, J., Smit, J., & Velthuis, H. H. W. (2004). *De wespen en mieren van Nederland (Hymenoptera: Aculeata)*. Nederlandse Fauna 6. Nationaal Natuurhistorisch Museum Naturalis, Leiden, knnv Uitgeverij, Utrecht & European Invertebrate Survey – Nederland, Leiden.
- Pérez-Rodríguez, J., Pekas, A., Tena, A., & Wäckers, F. L. (2021). Sugar provisioning for ants enhances biological control of mealybugs in citrus. *Biological Control*, 157(November 2020). <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2021.104573>
- Pinol, J., Espadaler, X., & Canellas, N. (2009). *Effects of the concurrent exclusion of ants and earwigs on aphid abundance in an organic citrus grove*. 515–527.
- Podsiadlowski, L. (2016). Phylogeny of the Aphids. In A. Vilcinskis (Ed.), *Biology and Ecology of Aphids* (1st ed., p. 282). CRC Press.
- Porter, S. D. (1989). Effects of Diet on the Growth of Laboratory Fire Ant Colonies (Hymenoptera: Formicidae). *Journal of the Kansas Entomological Society*, 62(2), 288–291.
- Portha, S., Deneubourg, J.-L., & Detrain, C. (2002). Self-organized asymmetries in ant foraging: a functional response to food type and colony needs. *Behavioral Ecology*, 13(6), 776–781.
- Quque, M., Benhaim-Delarbre, M., Deneubourg, J. L., Sueur, C., Criscuolo, F., & Bertile, F. (2019). Division of labour in the black garden ant (*Lasius niger*) leads to three distinct proteomes. *Journal of Insect Physiology*, 117(May), 103907.
- Rabbinge, R. (1980). *Biologie van graanluizen*. 1–9.
- Rainer, W. W., & Leal, I. R. (2001). Does rainfall affect temporal variability of ant protection in *Passiflora coccinea*? *Écoscience*, 8(4), 450–453.
- Rehr, S. S., Feeny, P., & Janzen, D. (1973). Chemical defence in Central American non-ant-Acacias. *Journal of Animal Ecology*, 42, 405–416.

- Rico-Gray, V., & Oliveira, P. S. (2007). *The Ecology and Evolution of Ant-Plant Interactions*. The University Of Chicago Press.
- Rios, R. S., Marquis, R. J., & Flunker, J. C. (2008). Population variation in plant traits associated with ant attraction and herbivory in *Chamaecrista fasciculata* (Fabaceae). *Oecologia*, *156*, 577–588.
- Rosumek, F. B., Silveira, F. A. O., De S. Neves, F., Newton, N. P., Diniz, L., Oki, Y., Pezzini, F., Fernandes, G. W., & Cornelissen, T. (2009). Ants on plants: a meta-analysis of the role of ants as plant biotic defenses. *Oecologia*, *160*(3), 537–549.
- Sadek, R. Z., Elbanna, S. M., & Semida, F. M. (2013). Aphid-host plant interaction. *Open Journal of Animal Sciences*, *3*(2), 16–27.
- Sakata, H. (1994). How an ant decides to prey on or to attend aphids. *Researches on Population Ecology*, *36*, 45–51.
- Sakata, H. (1995). Density-dependent predation of the ant *Lasius niger* (Hymenoptera: Formicidae) on two attended aphids *Lachnus tropicalis* and *Myzocallis kuricola* (Homoptera: Aphididae). *Researches on Population Ecology*, *37*, 159–164.
- Sanders, D., & van Veen, F. J. F. (2011). Ecosystem engineering and predation: The multi-trophic impact of two ant species. *Journal of Animal Ecology*, *80*(3), 569–576.
- SAS Institute Inc. (2013). SAS/STAT® 13.1 User's Guide. Cary, NC: SAS Institute Inc.
- Schoeters, E., & Vankerhoven, F. (2001). *Onze Mieren* (Deel 1). Educatie Limburgs Landschap vzw.
- Schumacher, E., & Platner, C. (2009). Nutrient dynamics in a tritrophic system of ants, aphids and beans. *Journal of Applied Entomology*, 33–46.
- Skinner, G. J., & Whittaker, J. B. (1981). An Experimental Investigation of Inter-Relationships Between the Wood-Ant (*Formica rufa*) and Some Tree-Canopy Herbivores Author (s): G. J. Skinner and J. B. Whittaker Published by: British Ecological Society Stable URL: <https://www.jstor.org/stable> *Journal of Animal Ecology*, *50*(1), 313–326.
- Sorensen, J. T. (2009). Aphids. *Encyclopedia of Insects*, 27–31.
- Stadler, B., & Dixon, A. F. G. (2005). Ecology and evolution of aphid- ant interactions. *Annual Review of Ecology and Systematics*, *36*, 345 – 372.
- Stewart-Jones, A., Pope, T. W., Fitzgerald, J. D., & Poppy, G. M. (2008). *The effect of ant attendance on the success of rosy apple aphid populations, natural enemy abundance and apple damage in orchards*. 37–43.
- Stockan, J. A., & Robinson, E. J. H. (2016). *Wood ant ecology and conservation*. Cambridge University Press Styrsky.
- Stukalyuk, S. V., Kozyr, M. S., Netsvetov, M. V., & Zhuravlev, V. V. (2020). Effect of the invasive phanerophytes and associated aphids on the ant (Hymenoptera, formicidae) assemblages. *Halteres*, *11*, 56–89.
- Syngenta. (z.j.). Pediment: voor een acute knock-down van luizen. Geraadpleegd op maart 28, 2021 via: <https://www.syngenta.nl>
- Tiede, Y., Schlautmann, J., Donoso, D. A., Wallis, C. I. B., Bendix, J., Brandl, R., & Farwig, N. (2017). Ants as indicators of environmental change and ecosystem processes. *Ecological Indicators*, *83*, 527–537.

- Tokunaga, E., & Suzuki, N. (2008). Colony growth and dispersal in the ant-tended aphid, *Aphis craccivora* Koch, and the non-ant-tended aphid, *Acyrtosiphon pisum* Harris, under the absence of predators and ants. *Population Ecology*, 50(1), 45–52.
- Tooker, J. F., & Helms, A. M. (2014). Phytohormone Dynamics Associated with Gall Insects, and their Potential Role in the Evolution of the Gall-Inducing Habit. *Journal of Chemical Ecology*, 40(7), 742–753.
- Trager, M. D., Bhotika, S., Hostetler, J. A., Andrade, G. V. Rodriguez-Cabal, M. A., McKeon, C. S., Osenberg, C. W., & Bolker, B. M. (2010). Benefits for Plants in Ant-Plant Protective Mutualisms: A Meta-Analysis. *PLOS ONE*, 5.
- Van der Horst, M. (1998). Plagen in de boomkwekerij. Verantwoord bestrijden en beheersen. Boskoop, boomteeltpraktijkonderzoek.
- Vander Meer, R. K., & Alonso, L. E. (1998). Pheromone Directed Behavior in Ants. In R. K. Vander Meer, M. Breed, M. Winston, & E. K.E (Eds.), *Pheromone Communication in Social Insects* (pp. 159–192). Westview Press, Inc.
- Van Oudenhove, L., Billoir, E., Boulay, R., Bernstein, C., & Cerdá, X. (2011). Temperature limits trail following behaviour through pheromone decay in ants. *Naturwissenschaften*, 98(12), 1009–1017.
- Vantaux, A., Parmentier, T., Billen, J., Van Liefferinge, J. (2016). Praktijkgids gewasbescherming. Module IPM sierteelt. Vlaamse Overheid: Departement Landbouw & Visserij.
- Vantaux, A., Parmentier, T., Billen, J., Wenseleers, T. (2012). Do *Lasius niger* ants punish low-quality black bean aphid mutualists? *Animal Behaviour*, 83(1), 257–262.
- Verwaeren, J., Audenaert, K., & Miclotte, J. (2018). *Oefeningencursus Proefopzet en Dataverwerking: statistisch verwerken van data met SPSS*. Gent: Universiteit Gent - cursus
- Viridaxis. (z.j.). OrnaProtect. Geraadpleegd op maart 28, 2021 via: <https://www.viridaxis.com>
- VMM. (2013). Nieuwe wetgeving pesticidengebruik vanaf 1 januari 2015. Geraadpleegd op april 9, 2021 via: [www.vmm.be](http://www.vmm.be)
- Völkl, W., Woodring, J., Fischer, M., Lorenz, M. W., & Hoffmann, K. H. (1999). Ant-aphid mutualisms: the impact of honeydew production and honeydew sugar composition on ant preferences. *Oecologia*, 118, 483–391.
- Wäckers, F. L., Alberola, J. S., Garcia-Marí, F., & Pekas, A. (2017). Attract and distract: Manipulation of a food-mediated protective mutualism enhances natural pest control. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 246(May), 168–174.
- Way, M. (1963). Mutualism between ants and honeydew-producing Homoptera. *Annu Rev Entomol*, 8, 307–344.
- Williams, I. S., & Dixon, A. F. (2007). Life cycles and polymorphism. In *Aphids as crop pests* (pp. 69–85).
- Wilson, E. O., & Hölldobler, B. (2005). Eusociality: Origin and consequences. *PNAS*, 102, 13367–13371.
- Win, A. T., Kinoshita, T., & Tsuji, K. (2018). The presence of an alternative food source changes the tending behavior of the big-headed ant, *Pheidole megacephala* (Hymenoptera: Formicidae) on *Dysmicoccus brevipes* (Homoptera: Pseudococcidae). *Applied Entomology and Zoology*, 53(2), 253–258.

- Woodring, J., Wiedemann, R., Fischer, M. K., Hoffmann, K. H., & Völkl, W. (2004). Honeydew amino acids in relation to sugars and their role in the establishment of ant-attendance hierarchy in eight species of aphids feeding on tansy (*Tanacetum vulgare*). *Physiological Entomology*, *29*(4), 311–319.
- Yao, I. (2014). Costs and constraints in aphid-ant mutualism. *Ecological Research*, *29*, 383–391.
- Zhang, S., Zhang, Y., & Ma, K. (2012). The ecological effects of the ant-hemipteran mutualism: A meta-analysis. *Basic and Applied Ecology*, *13*(2), 116–124.

## Bijlagen

### BIJLAGE 1. Cumulaties en gemiddelden voor de maand augustus 2020, Ukkel (KMI, 2020).

Datum	Temp_max °C	Temp_min °C	Temp_gem °C	Neerslag mm	Wind m/s	Zonneschijn hh:mm
01-08-2020	27.1	17.6	22.5	0	2.6	4:46
02-08-2020	24.9	15.5	20.3	0	2.6	9:09
03-08-2020	24.1	14.2	19	0	2.6	12:51
04-08-2020	23.8	13.4	18.6	0	2.4	25:00
05-08-2020	24.8	13.2	19.2	0	2.5	38:29
06-08-2020	26	13.6	20.1	0	2.4	51:57
07-08-2020	27.1	14.4	21.1	0	2.4	65:32
08-08-2020	28.2	15	22	0	2.3	76:24
09-08-2020	28.7	15.7	22.5	11.8	2.4	84:10
10-08-2020	29.2	16.2	23	11.8	2.3	92:13
11-08-2020	29.6	16.7	23.3	12.1	2.3	98:31
12-08-2020	29.9	17	23.6	12.1	2.3	109:52
13-08-2020	29.9	17.2	23.7	16.2	2.2	116:49
14-08-2020	29.6	17.2	23.5	26.7	2.3	121:12
15-08-2020	29.4	17.3	23.3	26.7	2.2	127:03
16-08-2020	29.4	17.3	23.2	28.8	2.2	134:14
17-08-2020	29.1	17.2	23	28.8	2.2	142:16
18-08-2020	28.9	17.1	22.8	30.1	2.2	151:06
19-08-2020	28.8	17	22.7	32.9	2.3	155:42
20-08-2020	28.9	17.1	22.8	33	2.4	158:35
21-08-2020	28.8	17.1	22.9	35.4	2.5	167:06
22-08-2020	28.6	17.1	22.7	35.8	2.5	171:40
23-08-2020	28.2	17	22.4	39.6	2.6	173:17
24-08-2020	27.9	16.9	22.2	39.6	2.6	177:36

**BIJLAGE 2. Grafieken dagelijkse neerslaghoeveelheid en maximumtemperatuur voor maand augustus 2020, Ukkel (KMI, 2020).**

