

Het conditioneren van honingbijen (*Apis mellifera*) en sluipwespen (*Nasonia vitripennis*) om de geur van bedwantsen (*Cimex lectularius*) te detecteren



Door Jim Bakker, Miki de Brouwer, Elise Schuurman en Wout Vloedgraven

Het conditioneren van honingbijen (*Apis mellifera*) en sluipwespen (*Nasonia vitripennis*) om de geur van bedwantsen (*Cimex lectularius*) te detecteren

Een onderzoek naar de mogelijkheid om sluipwespen (*Nasonia vitripennis*) en honingbijen (*Apis mellifera carnica*) te trainen op detectie van de geur van bedwantsen (*Cimex lectularis*)

Auteurs:

Jim Bakker
Miki de Brouwer
Elise Schuurman
Wout Vloedgraven

Begeleidende docent:

Bruce Schoelitsz

Opdrachtgevers:

Mike Brooks en Vera de Visser KAD (Kennis- en Adviescentrum Dierplagen)

Locatie:

's Hertogenbosch

Datum:

07-02-2020

Voorwoord

Met voorliggend onderzoeksrapport wordt het onderzoek voor Kennis- en Adviescentrum Dierplagen tijdens de vierde jaar specialisatie ecologie van de bacheloropleiding Toegepaste Biologie afgesloten. Dit onderzoek is uitgevoerd op HAS Hogeschool, 's Hertogenbosch (Noord-Brabant) en vond plaats van september 2019 tot en met februari 2020. Het onderzoek werd begeleid door Bruce Schoelitsz van HAS Hogeschool, afdeling toegepaste biologie en Vera de Visser en Mike Brooks van het KAD.

Gezamenlijk hebben wij met veel plezier aan het project gewerkt en ondanks de ontsnapte sluipwespen en bijensteken, zijn wij erg tevreden over het eindresultaat. Graag willen wij de gelegenheid nemen om de opdrachtgevers, Vera de Visser en Mike Brooks, te bedanken voor het vrijgeven van het project en het vertrouwen hebben in onze kunde. De communicatie verliep erg soepel en daarbij werd er actief meegedacht over het vormgeven van het project dat wij erg op prijs stelden. Daarnaast willen wij Hans Smid en Eveline Verhulst bedanken voor het beschikbaar stellen van de materialen en Jaap Willems voor de begeleiding in het insectenlab. Als laatste willen we ons dankwoord richten tot onze begeleidend docent, Bruce Schoelitsz, voor de tijd en moeite die hij heeft gestoken in het onderzoek. Daarnaast voor zijn enthousiasme, betrokkenheid en inhoudelijke begeleiding.

Jim Bakker
Miki de Brouwer
Elise Schuurman
Wout Vloedgraven

Februari 2020

Samenvatting

De bedwants (*Cimex lectularius*) is een ectoparasiet die door verschillende factoren wereldwijd is toegenomen. Nederland behoort daarin niet tot de uitzonderingen. Het schadebeeld kenmerkt zich door zichtbare beten en infecties die het insect veroorzaakt met zijn steeksnuut op de menselijke huid maar ook psychische klachten behoren hiertoe. De verborgen levenswijze van bedwantsen bemoeilijkt echter de detectie op locatie. De aan- of afwezigheid van bedwantsen is daarom vaak lastig te bepalen en uit voorzorg worden er in veel gevallen onnodig dure bestrijdingen uitgevoerd. Een betrouwbare detectiemethode is daarom gewenst. Het bekende leervermogen van sluipwespen (*Nasonia vitripennis*) en honingbijen (*Apis mellifera*) behoort tot de potentiële mogelijkheden. Door gebruik te maken van de klassieke conditioneringsmethode, zijn zowel sluipwespen als honingbijen geconditioneerd op het aroma van dode bedwantsen. Ter controle zijn sluipwespen tevens geconditioneerd op vanille aroma en honingbijen op lavendel aroma. De conditionering van sluipwespen gebeurde middels een positieve stimulus in de vorm van een vleesvliegenpop waarbij de vrouwelijke sluipwespen tot ovipositie over konden gaan. Tegelijkertijd was de conditioneringsaroma aanwezig met als doel een associatie te vormen tussen positieve stimulus en aangeboden aroma. Na conditionering werden de sluipwespen in een high-throughput dual choice systeem getest. Met suikerwater als positieve stimulus werden honingbijen eveneens geconditioneerd en vervolgens getest. Naast deze onderzoeken is er een kleinschalig pilotonderzoek uitgevoerd met sluipwespen en levende bedwantsen en werd gebruik gemaakt van een T-buis. Uit beide onderzoeken is naar voren gekomen dat zowel sluipwespen als honingbijen te conditioneren zijn op aroma van dode bedwantsen. In totaal reageerde 64% van de sluipwespen en 37% van de bijen positief na de training. De toepasbaarheid van de insecten is een vraagstuk waar in het vervolg de nodige aandacht aan moet worden besteed. De afweging hierin moet worden gemaakt in het actief inzetten van de insecten op locatie of de insecten blootstellen aan luchtsamples. Om het onderzoek beter op de praktijk te laten aansluiten, is het aan te raden om in een vervolgonderzoek levende bedwantsen te gebruiken in plaats van dode.

Inhoudsopgave

1. Inleiding.....	6
2. Materiaal en methode	8
2.1 Onderzoeksdieren & verzorging.....	8
2.1.1 Sluipwespen	8
2.1.2 Honingbijen	8
2.1.3 Bedwantsen	8
2.2 Onderzoeksopzet.....	8
2.2.1 Conditionering sluipwespen.....	8
2.2.2 Experimentele opzet sluipwespen.....	9
2.2.3 Conditionering honingbijen.....	11
2.2.4 Testen PER honingbijen.....	12
2.3 Data-analyse	13
2.3.1 Data-analyse sluipwespen.....	13
2.3.2 Data-analyse honingbijen	13
3. Resultaten	14
3.1 Succes van de conditionering	14
3.2 Verschil tussen conditionering op bedwants en vanille.....	14
3.3 Succes conditionering per dag.....	15
3.3.1 Vanille geurbron	15
3.3.2 Bedwants geurbron.....	15
3.4 T-buis experiment	16
3.5 Honingbijen	16
4. Discussie.....	19
Referenties.....	22
Bijlagen	26
Bijlage I: Biologie van sluipwesp <i>Nasonia vitripennis</i>	26
Bijlage II – Materiaal en methode + resultaten training bijen	28

1. Inleiding

In de afgelopen jaren is de bedwants (*Cimex lectularius*) niet alleen in aantallen gestegen, ook de verspreiding wereldwijd is anno 2019 voor de mens in negatieve zin veranderd. De ectoparasiet beperkt zich namelijk niet tot enige landsgrenzen en is sinds de vorige eeuw aan een opmars begonnen in zowel Noord-Amerika als Europa (Anderson & Leffler, 2008). In 2015 moest in Amerika tenminste bij 80% van alle hotels bestrijdingen worden uitgevoerd in bedwants geïnfecteerde kamers (Scarpino & Althouse, 2019). Mede door de ontwikkelde resistentie voor insecticiden, toenemende immigratie en internationale reizen, vormt de bedwants ook in Nederland een groot probleem. De bedwants voedt zich met menselijk bloed (Rost- Roszkoskwa et al., 2016; Bai et al., 2011). Doormiddel van een steeksnuut prikt het insect de huid aan waardoor zichtbare beten en infecties kunnen ontstaan (Bernardeschi et al., 2013; Doggett, 2012; Reinhardt et al., 2009; Stucki & Ludwig, 2008). Naast de fysieke klachten kunnen er ook psychische klachten bij mensen veroorzaakt worden (Anderson & Leffler, 2008).

Alle redenen zijn aanwezig om de plaaginsecten te bestrijden. Echter bemoeilijkt de levenswijze van de bedwantsen de detectie op locaties. Ondanks dat de ectoparasieten volgens Goddard & deShazo (2009) in een straal van 1 á 2 meter van hun gastheer in rust verblijven, maakt de diversiteit van deze rustplaatsen het een moeilijke opgave om te achterhalen waar de bedwantsen verblijven. Bedwantsen zijn namelijk lichtschuw en bovendien capabel om zich tussen kieren van enkele millimeters te manoeuvreren (Hekker, 2013; Goddard & deShazo, 2009). Doordat het zo lastig is de parasiet te vinden en de huidige detectie methodiek berust op visuele waarnemingen (Cooper et al., 2014), kunnen veel waarnemingen tot een onterechte en dure bestrijding leiden. Visuele waarnemingen van beten zijn namelijk niet betrouwbaar, omdat insectbeten niet-specifiek zijn en er wordt vaak een verkeerde diagnose gesteld. Visuele waarnemingen van bedwantsen na een goede inspectie zijn heel betrouwbaar maar kost veel tijd wat de nodige kosten met zich mee brengt. Echter is de detectiekans klein omdat ze een verborgen levenswijze hebben (Doggett et al., 2004). Daarnaast worden ook honden gebruikt om bedwantsen te detecteren, wat ontzettend prijzig en geen waterdichte methode is (Vaidyanathan & Feldlaufer, 2013). Honden geven soms valse positieven of negatieven aan, afhankelijk van de expertise van de trainer en de training of het beloningsysteem dat wordt gebruikt voor de hond (Walker et al., 2006; Lit et al., 2011). Om te zorgen dat men geen onnodige kosten maakt om bedwantsen te bestrijden en de detectie betrouwbaar is, wordt de mogelijkheid onderzocht naar het gebruik van parasitoïde insecten of honingbijen bij het detecteren.

Parasitoïden hebben een aangeboren reactie op de geur van de gastheer (Vet en Groenewold, 1990), maar hebben ook het vermogen om te leren (Steidle & van Loon, 2003). Gedurende het proces waarin de parasitoïde zijn gastheer probeert te vinden, leert deze te reageren op chemische gastheer-geassocieerde signalen. Dit leerproces kan plaatsvinden tijdens de ontwikkeling (Gandolfi et al., 2003), tijdens het uitkomen van de parasitoïde uit de gastheer (van Emden et al., 1996), of tijdens de eerste ontmoeting met de gastheer (Steidle & van Loon, 2002). Tijdens ovipositie zijn parasitoïden in staat de signalen van de omgeving te associëren met de aanwezigheid van de gastheer. Deze ervaring kan hun aangeboren voorkeuren versterken of verzwakken (Vet et al., 1990; Giunti et al., 2015). De sterkte van de geconditioneerde respons kan nog verder worden versterkt door een beloning of geursignaal (Hoedjes et al., 2011). De grootste beloning is echter de ovipositie-ervaring in een gastheer (Lewis & Tumlinson, 1988; Turlings et al., 1989; Vet & Groenewold, 1990; Turlings et al., 1993). Door deze beloning te koppelen aan een geur, in dit geval de geur van bedwantsen, kunnen we sluipwespen trainen om bedwantsen te detecteren. De soort die hiervoor goed kan worden gebruikt en wordt gebruikt in dit onderzoek is *Nasonia vitripennis* (zie bijlage I voor informatie biologie *Nasonia vitripennis*). Van deze soort is bekend dat deze vliegpoppen parasiteert, gemakkelijk te kweken is en al uitgebreid bestudeerd is (Whithing, 1967; Steiner et al., 2006; Beukeboom et al. 2007; Ruther et al. 2007; Sykes et al. 2007).

Bijen zijn eveneens in staat tot training met behulp van klassieke conditionering. In tegenstelling tot conditionering bij sluipwespen waar een zichtbare gedragsverandering waarneembaar is, berust deze conditionering op de 'proboscis extensie reflex' (PER) (Takeda, 1961; Giurfa & Sandoz, 2012). Dit mechanisme maakt deel uit van het voedselpatroon van bijen. In natuurlijke omstandigheden verlengt de proboscis (zuigorgaan) bij aanwezigheid van sucrose. Gebruikmakende van dit principe werd vervolgens in onderzoeken van Bittermann et al. (1983) en Matsumoto et al. (2012) een geurbron tegelijkertijd met sucrose toegediend aan bijen. Na de conditionering staken de bijen hun proboscis uit bij blootstelling aan diezelfde geurbron wat bevestigde dat de bijen getraind waren.

Het inpassen van sluipwespen of bijen in de huidige detectiemethode voor bedwantsen is een complex vraagstuk. In de basis is het belangrijk om een goede conditioneringsmethode te ontwikkelen voor sluipwespen (*Nasonia vitripennis*) en bijen (*Apis mellifera carnica*) en daarnaast moeten beide insectensoorten in staat zijn om de bedwantsgeur te herkennen en te onthouden. Hierbij werden de sluipwespen en de bijen getraind op de geur van dode bedwantsen in ether (behandeling) evenals op de geur van vanille en lavendel (controle). De sluipwespen zijn in een high-throughput systeem getest en de bijen met behulp van een zelf ontwikkelde constructie op de PER reactie.

2. Materiaal en methode

2.1 Onderzoeksdieren & verzorging

2.1.1 Sluipwespen

De kweek voor de *N. vitripennis* was opgezet in polystyrene kweekflesjes in een klimaatcel te HAS Hogeschool ('s Hertogenbosch). De batch met sluipwespen (larvaal) werden hiervoor geleverd door het Laboratorium voor de Entomologie van de Wageningen Universiteit. Met een gemiddelde temperatuur van 25°C en een luchtvochtigheid van 70% werd de kweek gedurende het onderzoek uitgevoerd. Voor een continue toevoer van sluipwespen, werden er vleesvliegpoppen bij de kweekflesjes toegevoegd zodat er ovipositie plaats kon vinden. Na de ovipositie kwamen de poppen van de sluipwespen na circa 14 dagen uit. Het deel van de ontsloten sluipwespen dat niet werd ingezet voor het experiment, werd gebruikt voor de verdere kweek. Iedere twee weken werden vleesvlieglarven extern gehaald van Dierenspeciaalzaak Ad van Nunen in Oirschot. Deze werden vervolgens drie dagen op kamertemperatuur gezet tot deze zich verpopten. Vanaf dit moment werden de poppen in de koelkast op 5 °C bewaard. Per week werden er ongeveer 100 poppen gebruikt tijdens het conditioneren en voor de kweek.

2.1.2 Honingbijen

Tijdens het onderzoek werd er gebruik gemaakt van een Europese honingbij kolonie (*Apis mellifera carnica*). De standplaats van de gebruikte kast bevond zich rondom de HAS Hogeschool ('s Hertogenbosch). Vanaf begin oktober tot halverwege december zijn de bijen uit deze kast gebruikt tijdens het onderzoek. Om de bijen uit de kast te verzamelen, werd de bijenkast aan de bovenkant opengemaakt en met rook werden de bijen gekalmeerd. Vervolgens werden de bijen individueel in buisjes gestopt met behulp van een Leonard pincet.

2.1.3 Bedwantsen

Voor het onderzoek werden de bedwantsen dood op etherbasis aangeleverd door het KAD en verkregen van cimexstore.co.uk. Daarnaast is ook voor een experiment gebruik gemaakt van levende bedwantsen, die werden aangeleverd door het KAD. Deze werden gehouden in een klein plastic buisje, met aan de onderkant een gaasje en in het buisje werd een klein papiertje gedaan waar de bedwantsen op konden zitten. Deze bedwantsen zijn op de dag van binnenkomst gevoed door het buisje met de kant van het gaas op de arm te plaatsen voor ongeveer tien minuten.

2.2 Onderzoeksopzet

2.2.1 Conditionering sluipwespen

Na het ontsluiten van de sluipwespen werd een deel van de vrouwelijke sluipwespen geconditioneerd om uiteindelijk de bedwantsgeur te herkennen. Dit werd getest door de sluipwespen te conditioneren met behulp van een vleesvliegpop en bedwantsaroma. Als controlegroep werd gebruik gemaakt van een even grote groep sluipwespen die geconditioneerd werden met een vleesvliegpop en vanillearoma. In een petrischaaltje (ø 8.8 cm, hoogte 1,5 cm) werd 1 µL bedwantsaroma of vanillearoma gepipetteerd op een stukje filterpapier van 1x1 cm. Het filterpapier werd in het midden van het petrischaaltje gelegd met 5 vleesvliegpoppen eromheen. Vervolgens werden er 5 vrouwelijke sluipwespen met een exhaustor in het petrischaaltje geplaatst. Iedere sluipwesp had een eigen pop ter beschikking voor ovipositionering. Op deze manier konden vijf sluipwespen tegelijkertijd geconditioneerd worden. De ovipositie kon gedurende 30 minuten plaatsvinden, de lengte van deze periode werd vastgesteld met een timer. De individuen die binnen deze 30 minuten de vleesvliegpop hadden geparasiteerd, werden verzameld met een exhaustor. De sluipwespen die niet aan ovipositie hadden gedaan, werden niet gebruikt voor het experiment. Na de conditionering werden deze sluipwespen terug in de klimaatcel geplaatst in een afgesloten ruimte voor 24 uur. Na deze periode

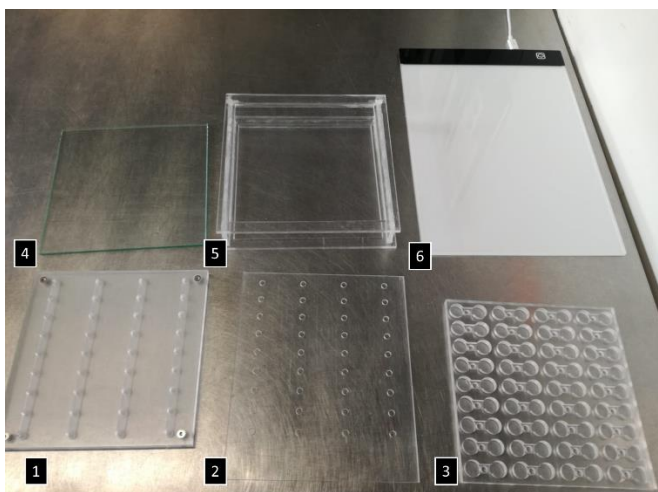
van 24 uur zijn de sluipwespen getest in het high throughput systeem. In totaal zijn er vijf conditioneringsrondes uitgevoerd, waarbij er voor iedere ronde 20 sluipwespen per aroma zijn geconditioneerd. In de periode tussen de conditionering en het testen is een deel van de geconditioneerde sluipwespen uitgevallen, het percentage hiervan lag tussen de 30 tot 40%.

2.2.2 Experimentele opzet sluipwespen

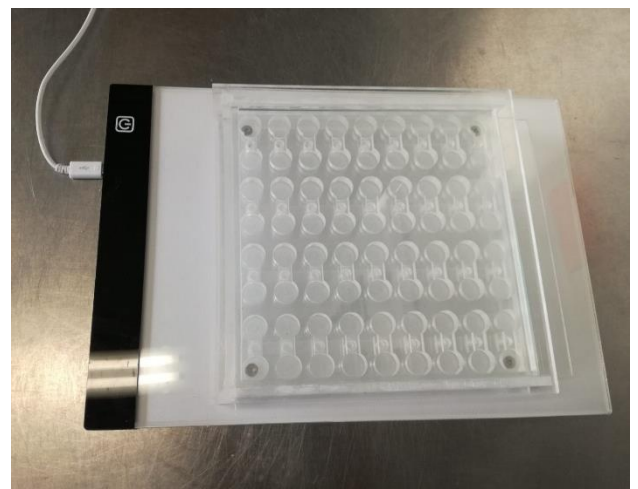
High-throughput experiment bedwants-aroma

Een groep geconditioneerde sluipwespen werd na 24 uur getest op herkenning van de geurbron. De experimenten werden uitgevoerd in (vergelijkbare omstandigheden als) de klimaatcel met een temperatuur van 25°C en een luchtvochtigheid van 70%.

De te testen sluipwespen werden geplaatst in een high-throughput olfactory met 36 ruimtes. Dit systeem maakt gebruik van vier verschillende platen. In de eerste plaat (cage plaat; 180x180x10mm) zijn de wespen geplaatst, deze waren aan de onderkant afgesloten met een gaasje. De tweede plaat (gate plaat; 195x180x2mm) dient als een tijdelijke barrière/ schuifplaat tussen de sluipwespen en de volgende plaat, tot de start van het experiment. In de derde plaat (arena plaat; 180x180x10mm) komt iedere gang uit op twee kamers. Hierin werd aan één van de twee kamers de geconditioneerde geurbronnen geplaatst. De vierde plaat (top plaat; 180x180x2mm) diende als afsluiting van de gehele opstelling (Bruijn et al., 2018). De platen werden ingeschoven in een frame om alles op zijn plek te houden. De opstelling is bij testen geplaatst op een lichtplaat (figuur 2.1 en 2.2).



Figuur 2.1 Opstelling high-throughput system. Deze bestaat uit: (1) Cage plaat waar de sluipwespen worden ingezet. (2) De gate plaat die dient als tijdelijke barrière tussen de ingezette sluipwespen en de rest van de opstelling. (3) De arena plaat waar de sluipwespen kiezen tussen het geconditioneerde aroma en een lege ruimte. (4) Top plaat als afsluiting van de opstelling. (5) Frame voor de opstelling. (6) Lichtplaat.



Figuur 2.2 Het opgebouwde high-throughput system

De sluipwespen zijn één voor één geplaatst in de cage plaat, waarna de ruimtes zijn afgesloten met dekglasjes. Vervolgens is de gate plaat eroverheen geschoven waarbij de dekglasjes van de eerste plaat werden weggeschoven. Tegelijkertijd zijn de geurbronnen in een van de twee kamers van de arena plaat willekeurig geplaatst, waarbij de ene helft van de plaat werd voorzien van vanille aroma en de andere helft van bedwants aroma. De aroma's zijn twee minuten voor inzet van het experiment gepipetteerd om de ether uit het bedwants aroma te laten verdampen. De arena en de top plaat zijn vervolgens tegelijkertijd over de andere platen heen geschoven. Hierna zijn de vier platen in het frame

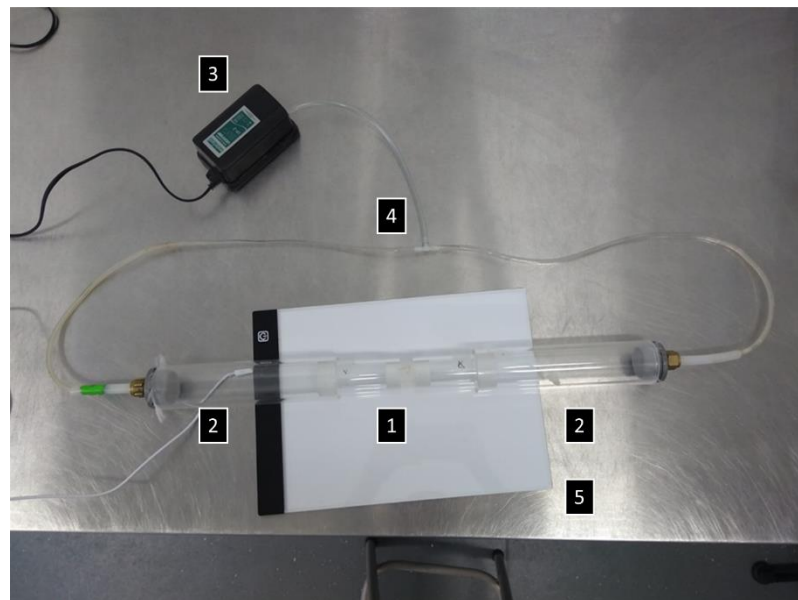
geplaatst en is de gate plaat ingeschoven. Bij inschuiven van de tweede plaat is begonnen met filmen voor een totaal van 15 minuten. Bij het bekijken van de films is de eerste keuze genoteerd. Nadat de tijd voorbij was zijn de sluipwespen van de opstelling verwijderd en zijn hierna gedood door deze in de vriezer te plaatsen. In totaal zijn er 142 sluipwespen getest waarvan er 74 geconditioneerd zijn op bedwants aroma en 68 op vanille aroma.

Pilot conditioneren op levende bedwantsen

Vervolgens is een pilot uitgevoerd voor het conditioneren van sluipwespen met levende bedwantsen. Het conditioneringsproces verliep hetzelfde als bij de bedwantsaroma, alleen werd er hier gebruik gemaakt van levende bedwantsen in een afgesloten buisje (Ø 1,1 cm, lengte 3,6 cm) met aan de onderkant gaas, waardoor de geur van de bedwantsen over de petrischaal werd verspreid.

Er werden 10 sluipwespen tegelijkertijd in een T-buis geplaatst. De T-buis is gemaakt van plexiglas en bestaat uit drie buizen. De middelste buis (Ø 3,5 cm, lengte 20 cm) heeft aan ieder uiteinde een van de twee zijdelingse buizen (Ø 4,0 cm, lengte 20 cm). De middelste buis zat aan de andere twee zijdelingse buizen vast door de twee grotere buizen 2 cm over de middelste buis te schuiven. Aan de uiteindes van de zijdelingse buizen zitten teflon buizen, waarin het mogelijk is om capillairtjes met aroma te plaatsen. Door middel van polyamide gaas te plaatsen voor de teflon buizen, konden de wespen niet de teflon buizen in lopen. Aan de teflon buizen werd de luchtpomp (Waterland model LP-3) vastgemaakt. Deze luchtpomp blies 2,5 L/uur aan lucht door de T-buis. Deze ingeblazen lucht kon de T-buis uit door middel van ventilatiegaten in de middelste buis. De opstelling werd bij het uitvoeren van het experiment geplaatst op een lichtplaat (figuur 2.3). Eén willekeurig gekozen kant werd voorzien het buisje met de levende bedwantsen. Er werd vijf minuten gewacht, zodat de geur kon verspreiden voordat de sluipwespen in de T-buis werden gezet.

De geconditioneerde sluipwespen werden vervolgens met een zuigexhauster in het midden van de olfactometer geplaatst. De sluipwespen kregen vervolgens 10 minuten de tijd om zich door de olfactometer te bewegen. Tijdens deze periode werden de sluipwespen geobserveerd en werd iedere 30 seconden de hoeveelheid wespen aan iedere kant genoteerd. Aan het einde van deze 10 minuten werden de aantallen sluipwespen per kant geteld. Een keuze was gemaakt als de sluipwesp voorbij een van de strepen 10 cm links of rechts vanuit het midden was gegaan. De geteste wespen werden gedood door deze in de vriezer te plaatsen. Deze test is één keer uitgevoerd.



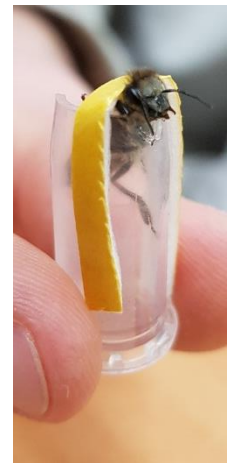
Figuur 2.3 De opgebouwde T-buis aangesloten met behulp van aquariumbuizen op de olfactometer. Deze bestaat uit: (1) de middelste buis met het gaatje waar de sluipwespen door zijn ingezet. (2) De buitenste buizen, waarin aan een willekeurige kant de geurbron was geplaatst. (3) De aquariumpomp. (4) De aquariumslang met T-stuk als verbinding tussen de pomp en de T-buis. (5) De lichtplaat.

2.2.3 Conditionering honingbijen

De conditionering van de honingbijen vond plaats in het insectenlab van de HAS Hogeschool, 's Hertogenbosch. Voordat de geoptimaliseerde conditionerings- en testwerkwijze tot stand kwam, zijn er pilots uitgevoerd. De materiaal en methode van deze pilots en de bijbehorende resultaten zijn te vinden in bijlage II.

In totaal werden 46 geconditioneerde bijen getest en 13 ongeconditioneerde bijen getest op de bedwants lucht. Vervolgens werden 30 geconditioneerde bijen en 17 ongeconditioneerde bijen getest op de lavendellucht.

De uit de kast verzamelde bijen werden voor 7 á 8 minuten verdoofd in de vriezer. Daarna werden zij stuk voor stuk vastgezet in een 2 ml Eppendorf buis waarvan de onderkant voor 0,5 cm was afgesneden. In dit buisje werd met een mes een inkeping van 1,5 cm diep en 0,3 cm breed gemaakt. Hierin werden de honingbijen vastgezet met tape, zodat ze enkel hun kop uit het buisje konden steken (figuur 2.4). Vervolgens werden de bijen voor 1 min gevoed met een suikerwateroplossing (50:50). Bijen die niet gevoed wilde worden, werden uit het experiment gehaald. Nadat alle bijen gevoed waren, werden de bijen voor 3 uur lang in een afgesloten bak gezet in wellsplaten met een constante temperatuur van circa 25 °C met een vochtige theedoek (figuur 2.5).



Figuur 2.4. Honingbij vastgezet in afgesneden Eppendorf. Foto: Miki de Brouwer (2019).



Figuur 2.5. Honingbijen in bak in een constante temperatuur van circa 25 °C met een vochtige theedoek. Foto: Miki de Brouwer (2019).

Na deze 3 uur werden de bijen geconditioneerd. Een deel van deze bijen werden niet geconditioneerd, maar meteen getest (hoofdstuk 2.2.4). Dode bijen werden uit het experiment gehaald. De betreffende aroma werd in een andere ruimte gepipetteerd op de filtreerpapierjes 30 min van tevoren. Hiervoor werd elke bij individueel in de experimentele opzet geplaatst (figuur 2.6). Deze opzet bevatte een manueel te hanteren afzuigstelsel met een roterende ventilator met een doorsnede van 10 cm. De bij werd met de kop vanaf dit afzuigstelsel op 10 cm geplaatst in een zo goed als afgesloten ruimte (conditionering box, 10x10x5). Hierbij werd getest met lavendel aroma (positieve controle) of bedwants aroma (negatieve controle). Deze filtreerpapierjes werden vervolgens in een afgesloten petrischaal verzameld. Voordat de bij in positie werd gebracht, werd de syringe gevuld met een filtreerpapierje van +/- 0,5 cm² met daarop 12 µl van de geteste aroma. Wanneer de bij in positie was gebracht, werd 5 cl met aroma vrijgelaten op 3 cm afstand vanaf de bij met een 60 cl injectiespuitsyringe. Elke bij kreeg in totaal een volume toegediend van 20 cl met 4 µl aroma met een interval van +/- 7 sec. Hierna werd 3 sec later met een satéprikker een druppel de suikerwateroplossing (50:50) gegeven aan de bij. Vanaf het moment dat de proboscis visueel zichtbaar was uitgestoken, werd de overige aroma (15 cl) uit dezelfde syringe vrijgelaten. Bijen die niet hun

proboscis uitstaken, werden uit het experiment gehaald. Na het conditioneren werden de bijen teruggeplaatst in dezelfde afgesloten bak na de eerste keer voeren.



Figuur 2.6. Opstelling conditionering bijen. Linksboven: Opstelling met bij van voorkant, zonder conditioneringsbox. Duidelijk zichtbaar de afzuiging. Rechtsboven: Opstelling met bij van voorkant, met conditioneringsbox en syringe. Linksonder: Opstelling van zijkant, met conditionering box en spuit. Rechtsonder: Opstelling met bij van zijkant, zonder

2.2.4 Testen PER honingbijen

Na 30 min werden de geconditioneerde en ongeconditioneerde bijen uit de afgesloten bak gehaald en opnieuw in de conditioneringspositie gezet. Om vast te stellen of de bijen geconditioneerd waren, werd opnieuw dezelfde aroma op dezelfde manier toegediend. Dit keer werden de bijen niet meer gevoed met suikerwater maar werden zij enkel blootgesteld aan het aroma. Om vast te stellen dat ongeconditioneerde bijen niet op de geur reageerde werden zij ook blootgesteld aan een aroma (lavendel of bedwants). Op het moment dat de bij de proboscis in deze tijd uitstak werd dit genoteerd met PER (+). Wanneer deze reactie uitbleef, werd dit genoteerd als PER (-). Na het testen van de bijen werden zij geëuthanaseerd door ze voor een 15 minuten te plaatsen in de vriezer en vervolgens te onthoofden, om zeker te weten dat ze dood waren

2.3 Data-analyse

2.3.1 Data-analyse sluipwespen

Tijdens de 15 minuten tijd in het high-throughput system, werden de eerste keuzes die de sluipwespen maakten genoteerd. Om te bepalen of de sluipwespen vaker dan 50% kozen voor de kamer met het aroma waarop ze geconditioneerd zijn, is de binomiale toets uitgevoerd in IBM SPSS 24 statistics. Hiermee is getoetst of de sluipwespen met het bedwantsaroma geconditioneerd kunnen worden. Om te testen of er een significant verschil zat tussen de sluipwespen die geconditioneerd waren op vanille en de sluipwespen die geconditioneerd waren op bedwants aroma, is de onafhankelijke t-toets uitgevoerd in IBM SPSS 24 statistics.

2.3.2 Data-analyse honingbijen

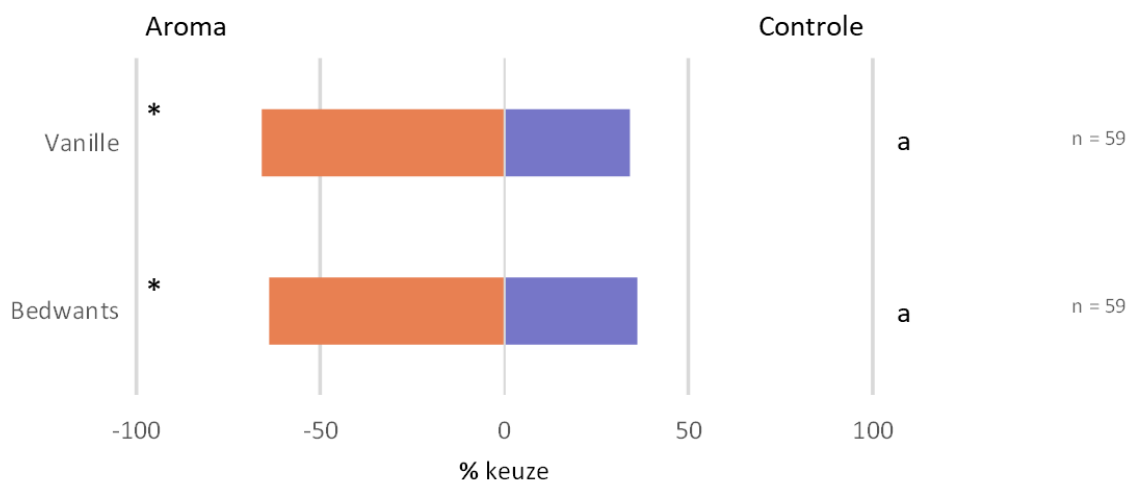
Tijdens het onderzoek werd de respons genoteerd per bij (PER + of PER -). Om te zien of hierin significante verschillen waar te nemen is er tussen de respons op de twee verschillende aroma's een onafhankelijke t-toets uitgevoerd in IBM SPSS 24 statistics. Ook zullen geconditioneerde en ongeconditioneerde bijen met elkaar vergeleken worden, om te bepalen of conditionering daadwerkelijk een significant effect geeft. Dit werd alleen voor de lavendel aroma getest. Hierbij werd nogmaals de onafhankelijke T-toets uitgevoerd in IBM SPSS 24 statistics. Om te bepalen of de bijen daadwerkelijk geconditioneerd konden worden op de geteste geur werd er voor beide aroma's een binominale toets uitgevoerd in IBM SPSS 24 statistics.

3. Resultaten

3.1 Succes van de conditionering

De wespen die zijn geconditioneerd op vanille hebben 41 keer gekozen voor de vanille geurbron en 27 keer gekozen voor de ruimte zonder geurbron. Er is niet significant aangetoond ($p = 0,057$; binomiale toets) dat de geconditioneerde wespen vaker voor vanille hebben gekozen. De wespen die zijn geconditioneerd op bedwantsaroma hebben 42 keer gekozen voor de bedwants geurbron en 32 keer gekozen voor de ruimte zonder geurbron en hier is ook geen significante voorkeur aangetoond ($p = 0,148$).

Als echter de eerste testronde wordt weggelaten voor zowel de wespen die zijn geconditioneerd op vanille en op bedwantsaroma, worden er wel significante verschillen aangetoond. In het geval van de op vanille geconditioneerde wespen hebben 39 wespen voor de vanille geurbron gekozen wat significant hoger is ($p = 0,009$) dan de 20 wespen die voor de ruimte zonder geurbron hebben gekozen. De op bedwants geconditioneerde wespen hebben ook significant meer ($p = 0,018$) gekozen voor de bedwants geurbron in verhouding tot de ruimte zonder geurbron. Hier hebben 38 wespen gekozen voor de geurbron en 21 voor de ruimte zonder geurbron (figuur 3.1).



Figuur 3.1. Percentage van vrouwelijke *N. vitripennis* dat gekozen heeft voor het aroma (oranje) of controle (blauw) in de T-maze. De asterisk geeft een significante voorkeur aan voor een van de twee zijden, gebaseerd op een binomiale test. De letters geven de significante verschillen aan in voorkeur tussen vanillearoma en bedwantsaroma gebaseerd op een onafhankelijke T-toets.

3.2 Verschil tussen conditionering op bedwants en vanille

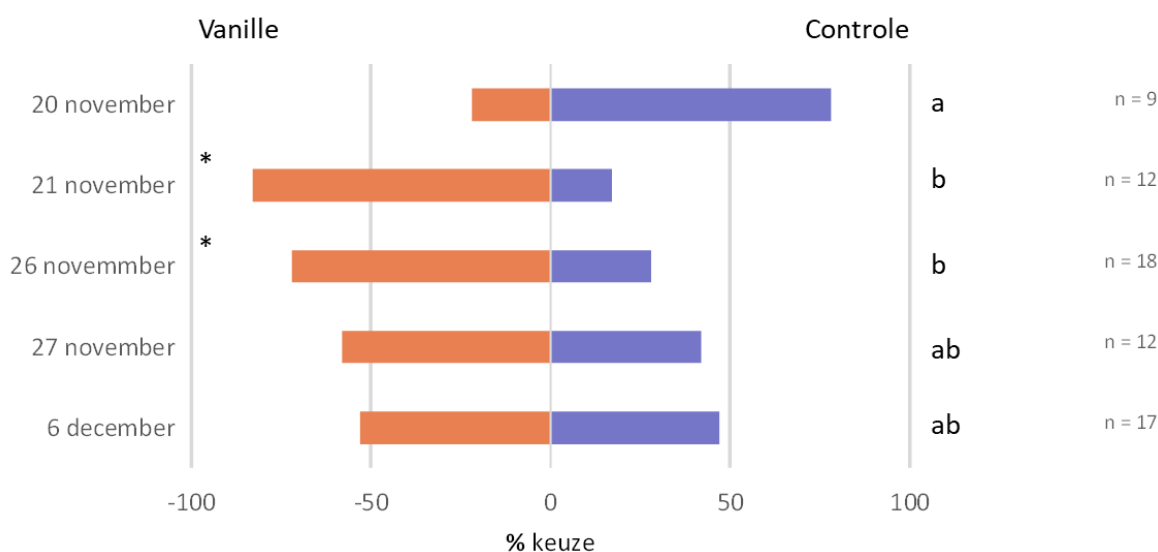
Wanneer de eerste testronde wordt meegeteld wordt er geen significant verschil ($p = 0,672$; onafhankelijke T-toets) gevonden tussen de op vanille getrainde wespen en de op bedwants getrainde wespen. Zowel met ($p = 0,672$) als zonder ($p = 0,427$) de eerste ronde zijn er geen significante verschillen gevonden tussen de op vanille getrainde sluipwespen en de op bedwants getrainde sluipwespen.

3.3 Succes conditionering per dag

3.3.1 Vanille geurbron

Op 21 november 2019 hebben de op vanille geconditioneerde wespen significant vaker ($p = 0,019$; binomiale toets) gekozen voor de vanille geurbron dan voor de ruimte zonder de geurbron. Hierbij hebben 10 wespen voor de geurbron gekozen en 2 voor de lege ruimte. Op 26 november 2019 hebben de op vanille geconditioneerde wespen significant meer ($p = 0,048$) gekozen voor de vanille geurbron dan voor de lege ruimte. Hier hebben 13 wespen voor de geurbron gekozen en 5 voor de lege ruimte (figuur 3.2).

Tussen de verschillende rondes is ook verschil aangetoond. Op 20 november is er significant minder vaak voor de vanille geurbron gekozen dan op 21 (61,1%; $p = 0,005$; OneWay ANOVA) en 26 november (50,0%; $p = 0,012$). Tussen de rest van de dagen zijn verder geen verschillen aangetoond.

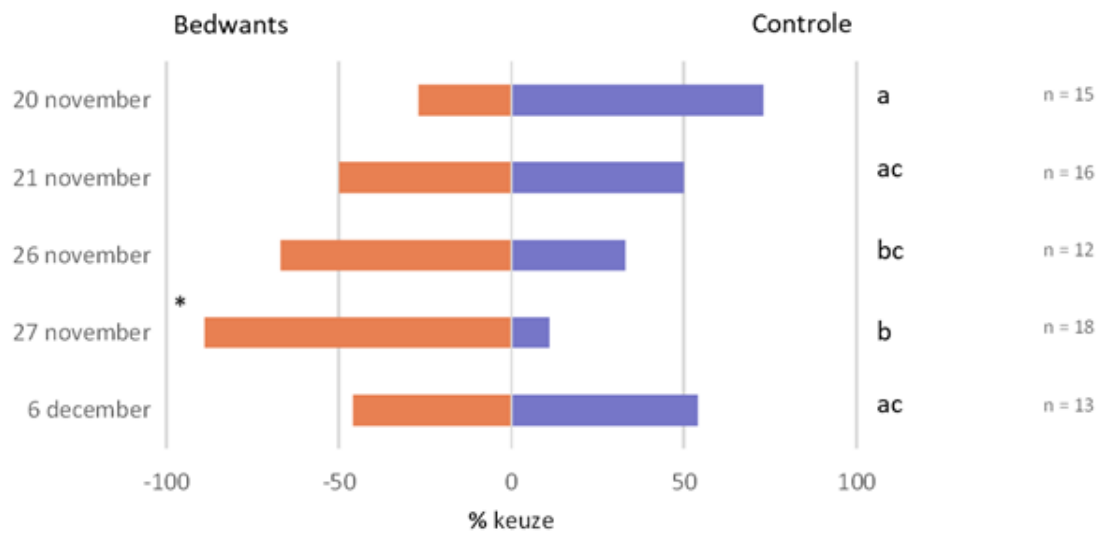


Figuur 3.2. Percentage van vrouwelijke *N. vitripennis* dat gekozen heeft voor het vanille geurbron (oranje) of controle (blauw) in de T-maze. De asterisk geeft een significante voorkeur aan voor een van de twee zijden, gebaseerd op een binomiale test. De verschillende letters geven de significante verschillen aan in voorkeur tussen de vijf testdagen gebaseerd op een OneWay ANOVA test

3.3.2 Bedwants geurbron

Op 27 november hebben de op bedwants geconditioneerde wespen significant meer ($p = 0,001$; onafhankelijke T-toets) gekozen voor de geurbron, 16 keer, in verhouding tot de 2 wespen die voor de ruimte hebben gekozen zonder de geurbron. De overige momenten waarop de experimenten zijn uitgevoerd zijn geen significante verschillen gevonden ($p > 0,05$).

Tussen de verschillende rondes is ook verschil aangetoond. Op 26 en 27 november is er significant vaker door de geconditioneerde sluipwespen gekozen voor het bedwantsaroma dan op 20 november (40,0%, $p = 0,028$; 62,2%, $p = 0,000$; OneWay ANOVA). Daarbij is op 27 november significant vaker gekozen voor het bedwantsaroma dan op 21 november en op 6 december (38,9%, $p = 0,016$; 42,7%, $p = 0,013$). Tussen de overige dagen zijn geen significante verschillen aangetoond (figuur 3.3).



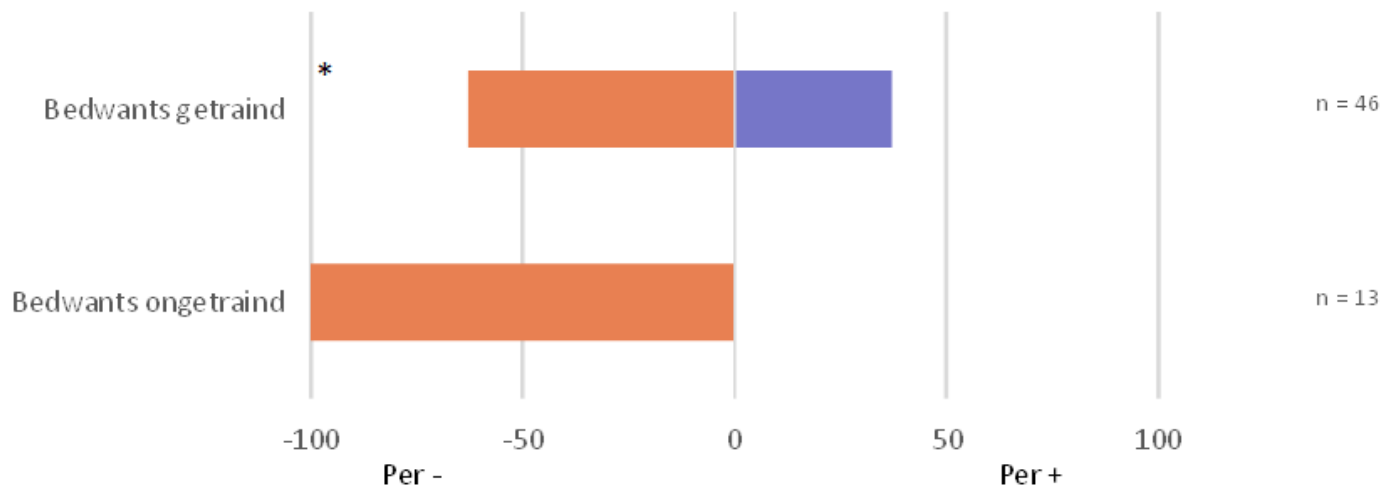
Figuur 3.3. Percentage van vrouwelijke *N. vitripennis* dat gekozen heeft voor het bedwantsaroma (oranje) of controle (blauw) in de T-maze. De asterisk geeft een significante voorkeur aan voor een van de twee zijden, gebaseerd op een eenzijdige test. De verschillende letters geven de significante verschillen aan in voorkeur tussen de vijf testdagen gebaseerd op een OneWay ANOVA test.

3.4 T-buis experiment

In het experiment met de T-buis zijn 10 wespen gebruikt, deze wespen waren geconditioneerd op levende bedwantsen. Van deze wespen hebben er 7 gekozen voor de kant met de levende bedwantsen en de overige 3 wespen voor de kant zonder deze geurbron (controle).

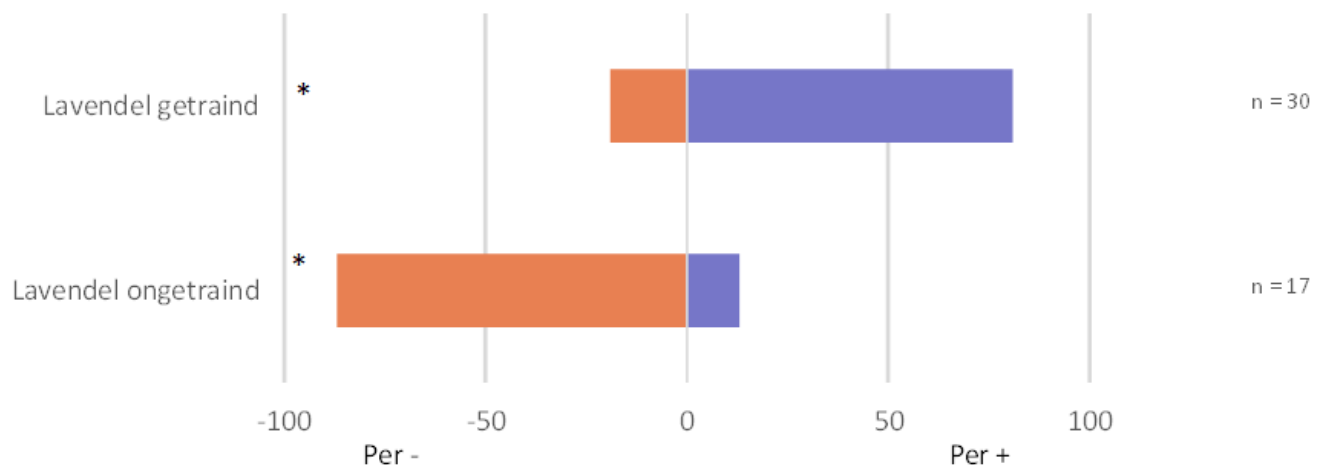
3.5 Honingbijen

Van de 46 op bedwants getrainde bijen vertoonde na het testen 37% (17 bijen) een positieve PER en 63% (29 bijen) van deze bijen een negatieve PER (figuur 3.4). Hieruit is significant gebleken dat bijen daadwerkelijk wel getraind kunnen worden op de bedwants lucht ($p < 0,000$). Ongetrainde bijen herkennen de bedwantsen lucht niet (0%).



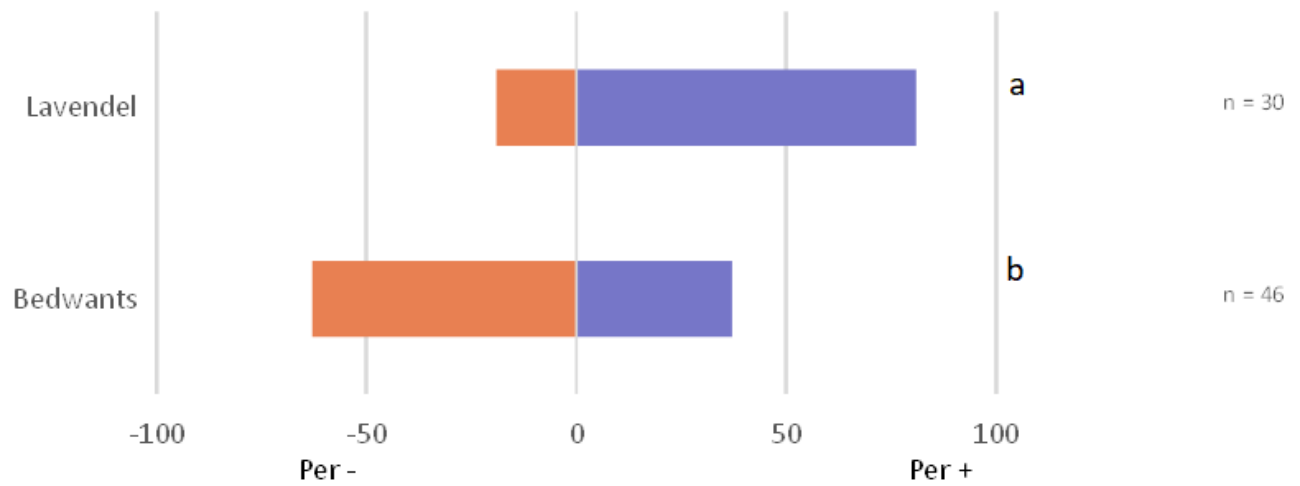
Figuur 3.4. PER respons van zowel getrainde (n=46) als ongetrainde (n=13) bijen op bedwantslucht. De asterisk geeft aan dat bijen getraind kunnen worden op de bedwants lucht. Ongetrainde bijen herkennen de bedwants lucht niet.

Van de 30 op lavendel getrainde bijen vertoonde na het testen 81% (24 bijen) een positieve PER en 19% (6 bijen) van deze bijen een negatieve PER (figuur 3.5). Ongetrainde bijen herkennen de lavendel lucht met 13% wel (2 bijen) en 87% niet (15 bijen). Om uit te sluiten of de bijen reageren op de lavendellucht is een binominale toets uitgevoerd. Hieruit blijkt dat de bijen zonder training niet reageren op de lavendellucht ($p < 0,000$). Ook is significant bewezen dat de bijen getest kunnen worden op de lavendellucht ($p < 0,000$).



Figuur 3.5. PER respons van zowel getrainde (n=30) als ongetrainde (n=17) bijen op lavendellucht in %. De asterisk geeft aan dat bijen zonder training reageren niet op de lavendellucht en dat bijen getest kunnen worden op de lavendellucht. .

Uit de resultaten blijkt dat 81% (figuur 3.4 en figuur 3.5) van de getrainde bijen op lavendellucht een positieve respons (PER+) vertoonden, waarbij 37% van de getrainde bijen op bedwantslucht een PER+ vertoonden (figuur 3.6). Uit de onafhankelijke t-toets blijkt dat na training de bijen de lavendellucht significant meer kunnen herkennen (PER+) dan de bedwantslucht ($p < 0,000$).



Figuur 3.6. PER respons van op bedwantslucht getrainde bijen (n=46) en op lavendellucht getrainde bijen (n=30). De letters geven aan dat er significant is gebleken dat bijen de lavendellucht meer kunnen herkennen dan de bedwantslucht.

4. Discussie

Dit onderzoek toont aan dat het voor zowel de sluipwesp *Nasonia vitripennis* als de honingbij *Apis mellifera* mogelijk is om deze soorten te conditioneren op aroma van dode bedwantsen opgelost in ether. Het testen van bijen op de aroma van dode bedwantsen opgelost in ether is een vernieuwend onderzoek, waar geen informatie over bekend is. Sluipwespen daarentegen zijn al eens eerder geconditioneerd op dode bedwantsaroma maar zonder succes (Ariës et al., 2019). Echter zijn soortgelijke parasitoïde sluipwespen zoals *Anagyrus pseudococchi* en *Leptomastix dactylopii* succesvol getraind op wol- en schildluisgeur (Kruidhof et al., 2018). De sluipwespen die geconditioneerd zijn in dit onderzoek op bedwantsaroma zouden hierom naar verwachting met de juiste methodiek wel te trainen zijn op dode bedwantsaroma. In dit onderzoek is aangetoond dat sluipwespen inderdaad te conditioneren zijn op dode bedwantsaroma. De resultaten uit dit onderzoek komen overeen met het onderzoek uitgevoerd door Hoedjes et al. (2012) waar *N. vitripennis* na 24 uur de conditioneringsaroma (vanille- en chocolade) gemiddeld met 67,5 % herkende.

De nodige aandacht vraagt het pilotonderzoek met levende bedwantsen op sluipwespen. Alhoewel hier geen significant verschil werd aangetoond op de kleine onderzoeksgroep, leek toch het overgrote deel in de T-buis voor de bedwantsaroma na conditionering te kiezen. Het vergroten van het aantal herhalingen en vanille als controlegroep gebruiken is van toegevoegde waarde. Door gebruik te maken van levende bedwantsaroma zal het onderzoek meer de praktijk na bootsen waardoor bij het behalen van goede resultaten in een vervolgonderzoek het inpassen vermoedelijk beter zal verlopen. Door dit uit te voeren in de T-buis, moeten de sluipwespen een grotere afstand (30 cm) afleggen voordat de geurbron is bereikt ten opzichte van het high-throughput systeem.

De proef kan verder worden verbeterd door de sluipwespen te voeden in de periode tussen het ontpoppen en het testen. Tijdens dit experiment zijn de sluipwespen in de kweekbuis gebleven tot deze zijn geconditioneerd en erna weer in een kweekbuis geplaatst tot moment van testen. In deze periode hebben zij geen bron van voedsel gehad. Deze afwezigheid van voedsel kan hebben gezorgd dat sommige wespen geen positieve respons vertoonden (ovipositiegedrag tijdens conditioneren en het bijpassende foeragegedrag tijdens het testen), omdat zij meer bezig waren met het foerageren naar voedsel dan naar de mogelijkheid tot ovipositie. Zo bleek uit een onderzoek van Wäckers (1994) dat de parasitoïde *Cotesia rubecula*, wanneer deze niet gevoed was met suiker, in de Y-buis eerder kiest voor de bloemgeuren dan de planten die geïnfesteerd waren met mogelijke gastheren. Wanneer *C. rubecula* niet verzadigd is met voedsel, prioriteert hij foerageren boven ovipositie. Om dit gedrag tijdens een vervolgonderzoek bij *N. vitripennis* zoveel mogelijk te minimaliseren is het voeden met suikerwater een goede optie.

Een afwijkend resultaat op 20 november heeft het percentage succesvol gekozen sluipwespen omlaaggehaald. Een mogelijke verklaring voor de sterke afwijkende responsen tijdens deze eerste testronde, is een afwijking op de later gebruikte methode. Tijdens de conditionering voor de eerste testronde zijn de sluipwespen uit de opstelling geselecteerd zodra deze met de vliegenpop in contact zijn gekomen, onafhankelijk van het soort contact. Er zijn waarschijnlijk sluipwespen in de testronde gebruikt die per toeval op de pop zaten, maar geen ovipositiegedrag vertoonden. Bij latere testrondes zijn de sluipwespen pas verwijderd wanneer duidelijk ovipositiegedrag werd vertoond. Ovipositiegedrag werd toegekend wanneer de sluipwesp rechtstreeks richting de pop loopt, erop klimt en met de antennen op de pop drumt (Jacobi, 1939). Dit wordt gevolgd door plotseling stoppen met het drummen, het krommen van het lichaam en aantikken van de pop met de punt van het abdomen om de ovipositor in positie te brengen. Hierna vindt ovipositie plaats (Edwards, 1954).

Een andere mogelijke verklaring kan worden gevonden in de geschiktheid van de vleesvliegpoppen die de sluipwespen met behulp van hun antennes waarnemen door kairomoonafscheiding van de gastheer (Vet & Wackers, 2006; Vet et al., 1995; Turlings et al., 1993). Met chemo, mechano- en

thermoreceptoren op deze antennes bepalen de sluipwespen de kwaliteit van de gastheer die samenhangt met het stadium waarin de pop zich bevindt en of de pop al geparasiteerd is (Baaren et al., 2007). Als de pop zich in een gunstig stadium voor de ovipositie bevindt, zal de sluipwesp tijdens de ovipositie de conditioneringsgeur aan een hoge kwaliteitsbeloning koppelen dan wanneer de kwaliteit van de pop minder is. Een hoge kwaliteitsbeloning resulteert weer in het langer onthouden van de conditioneringsgeur in het geheugen (Rescorla, 1988). In het begin van het onderzoek werden er externe vleesvliegpoppen gebruikt waarvan het verpoppingsstadia niet goed te achterhalen was. Na 20 november werd er ook extern materiaal gebruikt maar in de vorm van vleesvliegmaden in plaats van poppen. Het verpoppen gebeurde intern waardoor poppen in een vroeg stadium al werden geselecteerd en inactief werden in de koeling. Het vroege verpoppingsstadium waarin de vleesvliegpop zich bevindt heeft de voorkeur bij sluipwespen volgens Klomp & Wiebes (1979) waardoor dit wellicht een verklaring geeft waarom er in de opvolgende dagen een beter resultaat is behaald. Aan te raden is om een eigen kweek van vleesvliegpoppen op te zetten. Hiermee kan makkelijk in de gaten worden gehouden hoe lang een vleesvlieglarve is verpopt en kan er worden gezorgd voor hogere kwaliteit beloningen om de sluipwespen mee te conditioneren.

De sluipwespen in dit onderzoek werden 30 minuten in contact gebracht met een koude inactieve vleesvliegpop waardoor de gastheerdetectie enkel werd uitgevoerd met behulp van de chemoreceptoren. Door de vleesvliegpop gedurende een aantal uur op kamertemperatuur te laten komen zal de sluipwesp naast de chemoreceptoren ook de mechano- en thermoreceptoren efficiënt kunnen benutten doordat de pop actief wordt. Hierdoor zal het sluipwesp vrouwtje een gastheer eerder kunnen detecteren inclusief ovipositioneren en vindt er een sterkere koppeling plaats tussen stimulus en beloning (Hoedjes et al., 2011). Het aanbieden van een grotere beloning wordt in een onderzoek van Brodeur, Geervliet & Vet (1998) als positieve factor benoemd om stimuli langer in het geheugen op te slaan. Het aanbieden van meerdere poppen tijdens het conditioneren zal tot een grotere beloning leiden voor het sluipwespvrouwtje waardoor mogelijk de conditioneringsgeur beter en langer in het geheugen blijft. Naar verwachting zullen deze twee aanpassingen leiden tot een vergroot succes bij conditionering van de sluipwespen en zal het slagingspercentage wellicht richting 75% gaan.

Bij het bijenonderzoek had ruim een derde van de op dode bedwants getrainde bijen na conditionering hun proboscis verlengt na vrijlaten van de stimulus zonder beloning. Ongetrainde bijen staken na het toedienen van dode bedwantsgeur geen van allen hun proboscis uit. Dit resultaat wordt versterkt door een onderzoek van Matsumoto et al. (2012) waarin is aangetoond dat aroma's zonder beloning over het algemeen geen PER veroorzaken. Middels de vergelijking in het aantal positieve PER responsen op lavendelaroma tussen de op lavendelaroma geconditioneerde honingbijen en ongetrainde honingbijen, is uitgesloten dat de lavendelgeur mogelijk al bekend was bij de kolonie door eerder contact. Hierdoor kan worden geconcludeerd dat conditionering wel degelijk een positief effect heeft op het herkennen van de bedwantsgeur en idem voor de lavendelgeur. Het versterken van de geurbron kan ervoor zorgen dat de conditionering en de herkenning van de bedwantsgeur wordt versterkt (Nest, 2018). In een vervolgonderzoek is het de moeite waard om de dosis van de bedwantsgeur te verhogen zodat de geurbron beter kan worden waargenomen door de antennen van de bijen. Aansluitend op het praktiseren van het onderzoek, is het conditioneren van de honingbijen op levende bedwantsen raadzaam om in een vervolgonderzoek op te pakken.

Tijdens het onderzoek werden er circa 40 bijen geconditioneerd en getraind in een tijdsbestek van 7 uur. Gedurende het proces vielen er circa 10 bijen af waardoor na het testen er 30 bijen overbleven die veelal te verzwakt waren om nog langere tijd buiten de bijenkast te verblijven. Met oog op het meenemen van bijen op locatie om bedwantsen op te sporen, kan het conditioneren van de gehele kolonie in de bijenkast perspectief bieden (Cabe & Farina, 2008). Op deze manier heb je genoeg geconditioneerde bijen en kunnen deze in de kolonie verblijven tot het moment van testen, waardoor uitval geminimaliseerd wordt en er na langere tijd kan worden getest. Vergelijkbare methoden zijn

toegepast door Cabe en Farina (2008); Verboom (2019), die gebruik maakten van suikeroplossingen waarin de gewenste aroma's zijn verwerkt. Door deze in de korf te plaatsen werd de gehele kolonie geconditioneerd. Hierna konden de bijen meteen getest worden op de aroma selectie uit de korf.

De resultaten uit de onderzoeken van sluipwespen en honingbijen zijn een goede basis voor het verder uitbouwen naar gebruik van insecten voor het opsporen van bedwantsen. Op beide insecten heeft conditionering een positief effect op de herkenning van dode bedwantsgeur. Door de huidige conditioneringsmethode te optimaliseren door de beloning te vergroten tijdens het aanbieden van de conditioneringsgeur, zal het waarschijnlijk langer in het geheugen opgeslagen blijven. Door de vleesvliegpoppen te laten acclimatiseren op kamertemperatuur voorafgaand aan de conditionering zal de kwaliteit van de pop voor de sluipwesp verhoogd worden. Als aanvulling kunnen er meerdere poppen aangeboden worden waardoor in combinatie met de kwaliteit van de poppen, de sluipwesp dit als een grotere beloning associeert. Om een vertaalslag naar de praktijk te maken, is het aan te raden om het inzetten van levende bedwantsen door te zetten in een vervolgonderzoek. Daarnaast is het vergroten van de afstand van de geurbron tot de sluipwespen en honingbijen goed om te onderzoeken aangezien op locatie de bedwantsen in een grotere straal aanwezig kunnen zijn dan in de onderzoek omgeving. Het onderzoeken of de gehele kolonie honingbijen te conditioneren is in de bijenkast behoort tot de laatste aanbevelingen aangezien dit veel voordelen heeft voor het gebruik van de honingbijen op verschillende locaties.

Referenties

- Anderson, A. L., Leffler, K. (2008). Bedbug infestations in the news: a picture of an emerging public health problem in the United States. *Environmental health* 70: 24- 27.
- Ariës, L., Cornelissen, B., Kamer, S., van Eek, X. (2019). Bedwantsen (*Cimex lectularius*) opsporen doormiddel van sluipwespen (*Nasonia vitripennis*). *Dierplagen informatie* 2: 26-27.
- Baaren, J., Boivin, G., Bourdais, D., Roux, O. (2007). Antennal sensilla of hymenopteran parasitic wasps: variations linked to host exploitation behavior. *Formatex*: 345- 352.
- Bai, X., Mamidala, P., Rajarapu, S. P., Jones, S. C., Mittapalli, O. (2011). Transcriptomics of the Bed Bug (*Cimex lectularius*). *PloS ONE* 6: 1- 10.
- Bernardeschi, C., Le Cleach, L., Delaunay, P., Chosidow, O. (2013). Bed bug infestation. *Britisch Medical Journal* 138: 346.
- Beukeboom, L. W., Kamping, A., Louter, M., Pijnacker, L. P., Katju, V., Ferree, P. M., Werren, J. H. (2007). Haploid females in the parasitic wasp *Nasonia vitripennis*. *Science* 315: 206.
- Bitterman, M. E., Menzel, R., Fietz, A., Schäfer, S. (1983). Classical conditioning of proboscis extension in honeybees (*Apis mellifera*). *Journal Company Psychology* 97: 107- 119.
- Brodeur, J., Geervliet, J. B. F., Vet, L. E. M. (1998). Effects of pieris host species on life history parameters in a solitary speciliast and gregarious generalist parsitoid (*Cotesia* species). *Entomolia Experimentalis et Applicata* 86: 145- 152.
- Burton-Chellew, M. N., Koevoets, T., Grillenberger, B. K., Sykes, E. M., Underwood, S. L., Bijlsma, K., Gadau, J., van de Zande, L., Beukeboom, L. W., West, S. A., Shuker, D. M. (2008). Facultative sex ratio adjustment in natural populations of wasps: cues of local mate competition and the precision of adaptation. *The American naturalist* 172: 393- 404.
- Cooper, R., Wang, C., Singh, N. (2014). Accuracy of Trained Canines for Detecting Bed Bugs (Hemiptera: *Cimicidae*). *Journal of economic entomology* 107: 2171- 2181.
- De Bruijn, J. A. C., Vet, L. E. M., Jongsma, M. A., Smid, H. M. (2018). Automated high-throughput individual tracking system for insect behavior: Applications on memory retention in parasitic wasps. *Journal of Neuroscience Methods* 309: 208-217.
- Dicke, M., I.T. Baldwin. 2010. The evolutionary context for herbivore-induced plant volatiles: beyond the 'cry for help'. *Trends in Plant Science* 15: 167- 175.
- Doggett, S. L. (2012). *Cimex lectularius* and *Cimex hemipterus*. *Professional pest manager*: 28- 29.
- Doggett, S. L., Geary, M. J., Russell, R. C. (2004). The Resurgence of Bed Bugs in Australia: With Notes on Their Ecology and Control. *Environmental Health* 4: 30-38.
- Edwards, R. L. (1954). The Host-Finding and Oviposition Behaviour of *Mormoniella vitripennis* (Walker) (Hym., Pteromalidae), a Parasite of Muscoid Flies. *Behaviour* 7: 88-112.

- Fatouros, N.E., Lucas-Barbosa, D., Weldegergis, B. T., Pashalidou, F. G., van Loon, J. J. A., Dicke, M., Harvey, J. A., Gols R., Huigens, M. E. (2012). Plant Volatiles Induced by Herbivore Egg Deposition Affect Insects of Different Trophic Levels. *PLoS ONE* 7, e43607.
- Gandolfi, M., Mattiacci, L., Dorn, S. (2003). Preimaginal learning determines adult response to chemical stimuli in a parasitic wasp. *Proceedings of the Royal Society B, Biological Sciences* 270: 2623- 2629.
- Girault, A. A., Sanders, G. E. (1909). The chalcidoid parasites of the common house or typhoid fly (*Musca domestica* L.) and its allies. *Psyche: A Journal of Entomology* 16: 119- 132.
- Giunti, G., Canale, A., Messing, R. H., Donati, E., Stefanini, C., Michaud, J. P., Benelli, G. (2015). Parasitoid learning: Current knowledge and implications for biological control. *Biological Control* 90: 201- 215.
- Giurfa, M., Sandoz, J. C. (2012). Invertebrate learning and memory: Fifty years of olfactory conditioning of the proboscis extension response in honeybee. *Learning and Memory* 19: 54- 66.
- Goddard, J., deShazo, R. (2009). Bed bugs and chemical consequences of their bites. *JAMA* 302: 1358- 1366.
- Hekker, T. A. M. (2013). Bedwantsen, terug van weggeweest. *Infectieziekten bulletin* 4: 103- 106.
- Hoedjes, K. M., Kruidhof, H. M., Huigens, M. E., Dicke, M., Vet, L. E. M., Smid, H. M. (2011). Natural variation in learning rate and memory dynamics in parasitoid wasps: opportunities for converging ecology and neuroscience. *Proceedings of the Royal Society B, Biological Sciences* 278: 889- 897.
- Hoedjes, K. M., Steidle, J. L. M., Werren, J. H., Vet, L. E. M., Smid, H. M. (2012). High- throughput olfactory conditioning and memory retention test show variation in *Nasonia* parasitic wasps. *Genes brain behavior* 11: 879- 887.
- Jacobi, E.F. (1939). Über Lebensweise, Auffinden des Wirtes und Regulierung der Individuenzahl von *Mormoniella vitripennis* (Walker). *Archives Néerlandaises de Zoologie* 3: 197- 282.
- Klomp, H., Wiebes, J. T. (1979). Sluipwespen in reactie tot hun gastheren. Centrum voor landbouwpublicaties en landbouwdocumentaties: 9- 196.
- Kruidhof, M., Leman, A., Catala- Senent, L., Vijverberg, R., Messelink, G. (2018). Biologische bestrijding van wol- en schildluis onder glas. Wageningen Research, glastuinbouw: 5- 55.
- Lafferty, K. D., Kuris, A. M. (2002). Trophic strategies, animal diversity and body size. *Trends in Ecology and Evolution* 17: 507- 513.
- Lewis, W. J., Tumlinson, J. H. (1988). Host detection by chemically mediated associative learning in a parasitic wasp. *Nature* 331: 257- 259.
- Lit, L., Schweitzer, J.B., Oberbauer, A.M. (2011). Handler beliefs affect scent detection dog outcomes. *Animal Cognition* 14: 387–394.

Matsumoto, Y., Menzel, R., Sandoz, J. C., Giurfa, M. (2012). Revisiting olfactory classical conditioning of the proboscis extension response in honeybees: A step toward standardized procedures. *Journal of Neuroscience Methods* 211: 159- 167.

McCabe, S. I., Farina, W. M. (2008). Olfactory information transfer in the stingless bee *Melipona quadrifasciata*: effect of in-hive experiences on classical conditioning of proboscis extension. *Journal of Comparative Physiology* 195: 113- 122.

Nest, B. N. (2018). The Olfactory Proboscis Extension Response in the Honey Bee: A Laboratory Exercise in Classical Conditioning. *Journal of Undergraduate Neuroscience Education* 16: 168- 176.

Reinhardt, K., Kempke, D., Naylor, R. A., Siva-Jothy, M. T. (2009). Sensitivity to bites by the bedbug, *Cimex lectularius*. *Medical and Veterinary Entomology* 23: 163- 166.

Rescorla, R. A. (1988) Behavioral studies of pavlovian conditioning. *Annual Review of Neuroscience* 11: 329- 352.

Rost-Roszkowska, M. M., Vilimova, J., Włodarczyk, A., Sonakowska, L., Kaminska, K., Kaszuba, F., Marchewka, A., Sadilek, D. (2016). Investigation of the midgut structure and ultrastructure in *Cimex lectularius* and *Cimex pipistrelli* (Hemiptera: Cimicidae). *Neotropical Entomology* 46: 1- 13.

Ruther, J., Meiners, T., Steidle, J. L. (2002). Rich in phenomena-lacking in terms. A classification of kairomones. *Chemoecology* 12: 161- 167.

Ruther, J., Stahl, L. M., Steiner, S., Garbe, L. A., Tolasch, T. (2007). A male sex pheromone in a parasitic wasp and control of the behavioral response by the female's mating status. *Journal of Experimental Biology* 210: 2163- 2169.

Scarpino, S. V., Althouse, B. M. (2019). Uncovering the hidden cost of bed bugs. *PNAS* 116: 7160- 7162.

Schneiderman, H. A., Horwitz, J. (1958). The induction and termination of facultative diapause in the chalcid wasps *Mormoniella vitripennis* (Walker) and *Tritoneptis klugii* (Ratzeburg). *Journal of Experimental Biology* 35: 520- 551.

Steidle, J. L. M., van Loon, J. J. A. (2002). Chemoecology of parasitoid and predator oviposition behavior. In: Hilker M, Meiners T (eds) *Chemoecology of insect eggs and egg deposition*. *Entomologia Experimentalis* 107: 291- 317.

Steidle, J. L. M., van Loon, J. J. A. (2003). Dietary specialization and infochemical use in carnivorous arthropods: testing a concept. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 108: 133–148.

Steiner, S., Hermann, N., Ruther, J. (2006). Characterization of a female-produced courtship pheromone in the parasitoid *Nasonia vitripennis*. *Journal of Chemical Ecology* 32: 1687–1702.

Stucki, A., Ludwig, R. (2008). Images in clinical medicine: bed bug bites. *England Journal of Medical* 359: 1047.

Sykes, E. M., Innocent, T. M., Pen, I., Shuker, D. M., West, S. A. (2007). Asymmetric larval competition in the parasitoid wasp *Nasonia vitripennis*: a role in sex allocation? *Behavioral Ecology and Sociobiology* 61: 1751- 1758.

- Takeda, K. (1961). Classical conditioned response in the honeybee. *Journal of Insect Physiology* 6: 168- 179.
- Tumlinson, J. H., Lewis, W. J., Vet, L. E. M. (1993). How parasitic wasps find their hosts. *Scientific American* 268: 100- 106.
- Turlings, T. C., Tumlinson, J. H., Lewis, W. J., Vet, L. E. M. (1989). Beneficial arthropod behavior mediated by airborne semiochemicals. VIII. Learning of host-related odors induced by a brief contact experience with host by-products in *Cotesia marginiventris* (Cresson), a generalist larval parasitoid. *Journal of Insect Behavior* 2: 217- 225.
- Turlings, T. C., Wäckers, F. L., Vet, L. E. M., Lewis, W. J., Tumlinson, J. H. (1993). *Insect Learning, Ecology and Evolutionary Perspectives*. Springer US, Boston, 398 p.
- Vaidyanathan, R. and Feldlaufer, M.F. (2013). Review article: Bed Bug Detection: Current Technologies and Future Directions. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 88: 619- 625.
- Van Emden, H. F., Sponagel, B., Wagner, E., Baker, T., Ganguly, S., Douloumpaka, S. (1996). Hopkins' 'host selection principle', another nail in its coffin. *Physiological Entomology* 21: 325- 328.
- Verboom, H. (2019). Exploring the possibilities of using *Apis mellifera* (honey bee) as a biosensor to detect *Anoplolepis gracilipes* (A. gracilipes) scent. Stageverslag. Geraadpleegd op 31-01-2020.
- Vet, L. E. M., Groenewold, A. W. (1990). Semiochemicals and learning in parasitoids. *Journal of Chemical Ecology* 16: 3119- 3135.
- Vet, L. E. M., Lewis, W. J., Cardé, R. T. (1995). Parasitoid foraging and learning. *Chemical ecology of insects* 2. Springer US, Boston: 433.
- Vet, L. E. M., Lewis, W. J., Papaj, D. R., van Lenteren, J. C. (1990). A variable-response model for parasitoid foraging behavior. *Journal of Insect Behavior* 3: 471- 490.
- Vet, L., Wackers, F. I. (2006). Sluipwespen: macabere meesterspeurders. *Onderzoek aan insecten* 12: 125- 133.
- Wäckers, F. L. (1994). The effect of food deprivation on the innate visual and olfactory preferences in the parasitoid *Cotesia rubecula*. *Journal of Insect Physiology* 40: 641-649.
- Walker, D. B., Walker, J. C., Cavnar, P. J., Taylor, J. L., Pickel, D. H., Hall, S. B., Suarez, J. C. (2006). Naturalistic quantification of canine olfactory sensitivity. *Applied Animal Behaviour Science* 97: 241– 254.
- Whiting, A. R. (1967). The biology of the parasitic wasp *Mormoniella vitripennis* [*Nasonia brevicornis*] (Walker). *The Quarterly Review of Biology* 42: 333- 406.
- Wray, M. K., Mattila, H. R., Seeley, T. D. (2011). Collective personalities in honeybee colonies are linked to colony fitness. *Animal Behaviour* 81: 559-568.

Bijlagen

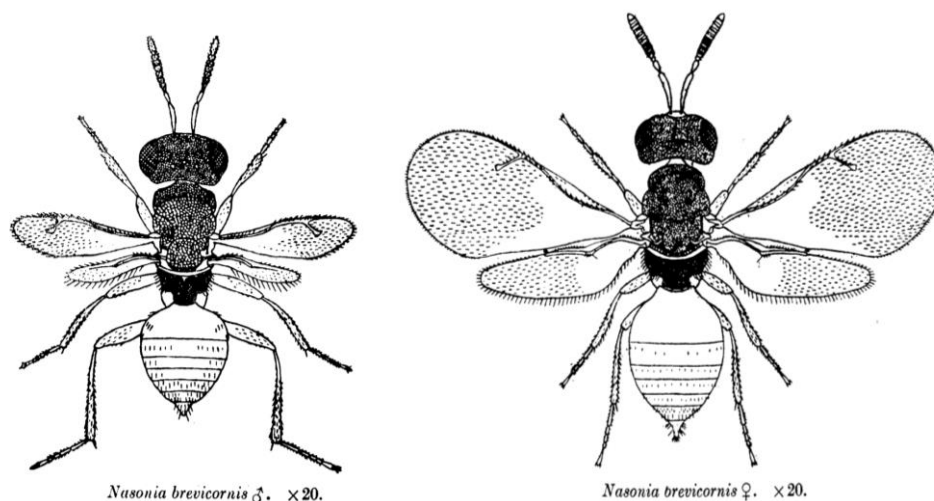
Bijlage I: Biologie van sluipwesp *Nasonia vitripennis*

De sluipwespen (*Nasonia vitripennis*) behoren tot de orde Hymenoptera en kenmerken zich door de parasitaire levenswijze tijdens het larvale stadium (Wäckers, 2007). Volwassen *N. vitripennis* zijn te herkennen door hun zwarte exoskelet met een opvallende glans. Daarnaast is in tegenstelling tot andere sluipwespen, het achterlichaam relatief rondvormig (figuur 1).



Figuur 1: Volwassen *Nasonia vitripennis* op vliegenpop (Alchetron, 2018)

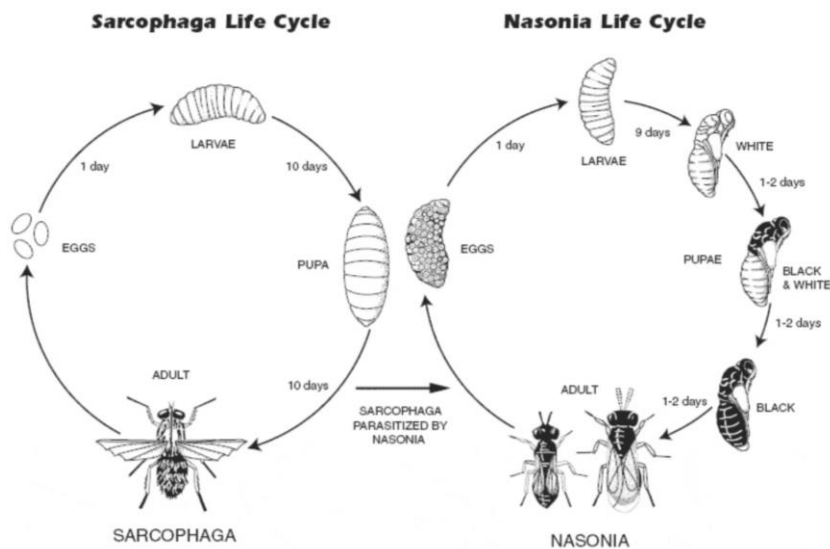
De gemiddelde grootte van vrouwelijke *N. vitripennis* is 2,4 tot 2,6 mm, waar bij mannelijke het gemiddelde rond de 2 mm ligt volgens Jacobi (1939). Volgens Girault en Sanders (1909) liggen deze gemiddelden respectievelijk op 1,75 mm voor de vrouwen en 1,32 millimeter voor de mannen. Ook in andere uiterlijke eigenschappen zijn verschillen aanwezig. Vrouwelijke *N. vitripennis* zijn een diep donkergroen, met een bijna zwart abdomen, de kop en thorax geven een bronskleurige schittering in het licht, en de thorax ziet er vanuit sommige aanzichten blauwig uit. De antennen zijn donker, de basisgeleding (scapus en pedicel) diepbruin, de poten donkerbruin tot bruin. Mannelijke *N. vitripennis* daarentegen zijn helder metaalachtig groen, met bronskleurige reflectie. De antennen en poten zijn licht geelbruinig. De vleugels van de vrouwtjes zijn groot en functioneel, terwijl de vleugels bij de mannetjes rudimentair zijn en een bevuilde indruk geven (Girault en Sanders, 1909; figuur 2).



Figuur 2 Dorsale weergave van mannelijke en vrouwelijke *Mormoniella vitripennis* (= *Nasonia vitripennis*) (Graham-Smith, 1919)

Voor de mannetjes duurt het minder lang om zich volledig te ontwikkelen en te ontsnappen uit de pop. Omdat de mannelijke *N. vitripennis* niet het vermogen hebben om te vliegen, blijven deze wachten bij de opening van de poppen tot de vrouwtjes ontsnappen en paren dan onmiddellijk (Burton-Chellew, Koevoets et al., 2008). De vrouwtjes kunnen wel vliegen en gaan na het paren op

zoek naar een geschikte gastheer. Daar bepalen de vrouwtjes de geslachtsratio, doordat ze het zaad kunnen opslaan en de eitjes selectief kunnen bevruchten (Whiting, 1967). Deze geslachtsratio varieert tussen 1 op 3 en 1 op 7 mannetjes voor mannetjes ten opzichte van vrouwtjes (Whiting, 1967). De levenscyclus van de *N. vitripennis* voltrekt zich in ongeveer 14 dagen bij een temperatuur van 25°C (Schneiderman en Horwitz, 1958; figuur 3).



Figuur 3 Levenscyclus van *Sarcophaga crassipalpis* (vleesvlieg; links) en *Nasonia vitripennis* (rechts) bij een temperatuur van 25°C.

Bijlage II – Materiaal en methode + resultaten training bijen

Datum	Aantal bijen + aroma	Materiaal en methode
19-11-19	21 (bedwants)	- Eerste keer trainen en testen - Hoeveelheid aroma: 4 µl - Luchtstroom met aroma: 20 ml - Verdamp tijd ethanol: géén - Afzuiging aroma: direct na toediening - Tijd van toediening: 5 sec. - Afstand spuit tot bij: +/- 5 cm
26-11-19	38 (bedwants)	- Tweede keer trainen en testen - Hoeveelheid aroma: 4 µl - Luchtstroom met aroma: 20 ml - Verdamp tijd ethanol: géén - Afzuiging aroma: 5 seconden na volledige toediening luchtstroom + aroma - Tijd van toediening: 5 sec. - Afstand spuit tot bij: 3 cm