NEV-Dissertatieprijs 2013

Waarom bestaan er tweestippelige lieveheersbeestjes die niet kunnen vliegen en zijn ze betere bladluizenbestrijders?

Suzanne T.E. Lommen

TREFWOORDEN
***Adalia bipunctata*, Aphidae, biologische bestrijding, kunstmatige selectie, vleugellengte**

Entomologische Berichten 77 (3): 81-86

In mijn proefschrift onderzoek ik intraspecifieke variatie in vleugellengte in het tweestippelig lieveheersbeestje, *Adalia bipunctata*. In de natuur komen 'ongevleugelde' mutanten voor met afgeknotte vleugels (zowel de echte vliegvleugels als de dekschilden). Ze kunnen niet vliegen, leven korter en produceren minder nakomelingen. Hoe korter de vleugels, hoe slechter de prestatie. Ten eerste wilde ik als evolutiebioloog begrijpen waarom ongevleugelde *A. bipunctata* dan toch bestaan. De afknotting blijkt het gevolg van een vertraagde ontwikkeling van het vleugelweefsel in de larven. De mate van afknotting wordt beïnvloed door een combinatie van de genen en de omgeving waarin de larven opgroeien. We hebben geen enkel evolutionair voordeel van deze afwijking kunnen vinden. Het is waarschijnlijker dat toeval of een mutatie-selectie-balans het fenomeen in stand houdt. Vervolgens onderzocht ik of deze natuurlijke variatie benut zou kunnen worden om de commerciële biologische bladluisbestrijding met *A. bipunctata* te verbeteren, omdat de gewone vormen die nu worden gebruikt vaak wegvliegen van de planten waarop ze worden uitgezet. Ongevleugelden bieden inderdaad perspectief voor effectievere bestrijding door een langer verblijf op de planten. Vanwege hun lagere 'fitness' werd echter getwijfeld of een rendabele commerciële massakweek mogelijk zou zijn. Wij laten zien dat de kweek van ongevleugelde *A. bipunctata* te optimaliseren is. Door kunstmatige selectie konden we binnen vijf generaties kweeklijnen van de meest 'fitte' ongevleugelde vormen produceren. Ze missen nauwelijks vleugelweefsel maar kunnen toch niet vliegen. Ze reproduceren beter dan de tegengestelde selectielijnen die geen vleugelweefsel meer hadden. Zouden deze lijnen in de praktijk worden gebruikt, dan is het risico op verzwakking van natuurlijke populaties door inmenging minimaal door hun fitness-nadeel ten opzichte van de gewone vormen. Bij elkaar laat dit werk zien hoe de kennis van de onderliggende mechanismen van natuurlijke variatie binnen soorten gebruikt kan worden ter verbetering van biologische plaagbestrijders.

Natuurlijke variatie en plaagbestrijding

De natuur is enorm divers. Nemen we twee willekeurige insectensoorten, dan variëren ze hoogstwaarschijnlijk in uiterlijk, levenswijze en gedrag. Evolutionair biologen onderzoeken waarom zulke variatie bestaat. Daarnaast heeft de mens altijd geprobeerd om zulke variatie te benutten, bijvoorbeeld in de plaagbestrijding. Insecten die als predator of parasitoïde leven, worden ingezet voor de biologische bestrijding van herbivoren die een plaag vormen in de landbouw, tuinbouw en in het openbaar groen. Bij commerciële of 'augmentatieve' bestrijding worden deze natuurlijke vijanden massaal gekweekt door commerciële bedrijven, waarna de gebruiker ze in grote aantallen loslaat bij de planten die door de plaagsoort worden belaagd (Eilenberg 2001).

Bij de ontwikkeling van zo'n commercieel verkrijgbare biologische bestrijder wordt een zorgvuldige selectie uitgevoerd om de meest geschikte soort te bepalen. De potentiële bestrijder moet kosteneffectief zijn: hij moet de plaag effectief uitschakelen onder de omstandigheden die bij de klant heersen en de winst die hieruit wordt gehaald moet opwegen tegen de productiekosten van de bestrijder. De massakweek is niet altijd eenvoudig, bijvoorbeeld wanneer soorten een heel specifieke voedselvoorkeur hebben of kannibalistisch zijn (zoals lieveheersbeestjes). Omdat veel plaagsoorten een exotische herkomst hebben, worden hun natuurlijke vijanden vaak in hetzelfde oorspronkelijke gebied gezocht en vervolgens geïmporteerd. De mogelijkheden tot import worden echter

NEV-Dissertatieprijs 2013

Tijdens de 25e Nederlandse Entomologendag (Ede, 13 december 2013) is de zesde NEV-Dissertatieprijs uitgereikt aan Dr. Suzanne Lommen, voor haar proefschrift 'Exploring and exploiting natural variation in the wings of a predatory ladybird beetle for biological control', op 16 mei 2013 verdedigd aan de Universiteit Leiden. De prijs bestaat uit een geldbedrag plus een oorkonde en wordt jaarlijks toegekend voor het beste proefschrift op het gebied van de entomologie, verdedigd aan een Nederlandse universiteit in het voorgaande academische jaar (1 september – 31 augustus). Het juryrapport roemt met name de mooie combinatie van gebruikte technieken: genetisch werk, kruisingsexperimenten en veldwerk. De multidisciplinarie aanpak resulteert in een goede en geïntegreerde dissertatie, waarin zowel fundamentele als toegepaste elementen aan bod komen.

During the 25th Annual Dutch Entomologists Meeting (Ede, 13 December 2013), the sixth Netherlands Entomological Society (NEV) Dissertation Award was presented to Dr. Suzanne Lommen, for her thesis 'Exploring and exploiting natural variation in the wings of a predatory ladybird beetle for biological control', defended on 16 May 2013 at Leiden University. This prize comprises a sum of money and a certificate of appreciation, and is awarded for the best doctoral thesis in the field of entomology, defended at a Dutch university in the preceding academic year (1 September – 31 August). The committee especially praises the combination of the techniques that were used: genetics, crossing experiments and field work. The multidisciplinary approach results in a good and integrated thesis, in which both fundamental and applied elements are presented.

steeds verder beperkt (Cock *et al.* 2010, Van Lenteren *et al.* 2011): de recente Convention on Biological Diversity (zie www.cbd.int) geeft landen het recht om marketing van soorten uit het eigen land elders te verhinderen of beperken en de richtlijnen van de Voedsel- en Landbouworganisatie van de Verenigde Naties vereisen een strikte evaluatie van het gevaar van de geïmporteerde soorten voor de lokale biodiversiteit (IPPC 2005). Sommige zeer effectieve exotische kandidaten moeten daarom worden uitgesloten.

De keuze in soorten natuurlijke bestrijders is dus beperkt. In dat geval kan een ander niveau van natuurlijke variatie soms uitkomst bieden: variatie die binnen een soort voorkomt, ofwel intraspecifieke variatie. Binnen een soort kunnen populaties van verschillende locaties bijvoorbeeld van elkaar verschillen, maar ook binnen die populaties kunnen individuen veel variëren in kenmerken die van belang zijn in de biologische bestrijding (Hopper *et al.* 1993, Lozier *et al.* 2008, Nachappa *et al.* 2010, Wajnberg 2010, Tabone *et al.* 2010, Wajnberg *et al.* 2012). Daardoor zijn bepaalde populaties, of bepaalde individuen binnen populaties, geschikter als biologische bestrijder dan andere. Om deze variatie te kunnen benutten, moet ze in kaart worden gebracht. Opgehelderd moet worden in hoeverre de variatie erfelijk en daarmee mogelijk kweekbaar is en of deze daadwerkelijk leidt tot verschillen in prestatie in de biologische bestrijdingspraktijk.

Wegvliegende lieveheersbeestjes

In mijn proefschrift staat intraspecifieke variatie in vleugels van het tweestippelig lieveheersbeesje, *Adalia bipunctata* (Linnaeus) (figuur 1), centraal. Deze soort is inheems in een groot deel van de westerse wereld, inclusief Europa. Omdat zowel de larven als volwassenen voornamelijk van bladluizen leven en veel verschillende bladluissoorten tot hun prooi behoren, wordt deze soort als predator ingezet voor de biologische bestrijding van bladluizen in de tuinbouw, in boomgaarden en het openbaar groen. Europa vormt de grootste afzetmarkt en *A. bipunctata* is hier sinds de jaren '80 commercieel verkrijgbaar (Van Lenteren 2012). Wetenschappelijk onderzoek bewijst dat uitzetten van de soort de plaagdruk van diverse bladluissoorten succesvol kan verminderen (Hämäläinen 1977, 1980, Wyss *et al.* 1999a, 1999b), maar in de praktijk hebben de lieveheersbeestjes toch niet altijd het gewenste effect.

De neiging van volwassen lieveheersbeestjes om weg te vliegen (Hämäläinen 1977, Brakefield 1984) wordt hiervan als één van de oorzaken gezien. Zodoende hebben onderzoekers in het verleden al met verschillende soorten lieveheersbeestjes geëxperimenteerd om individuen te creëren die niet konden vliegen. Eerst werden vleugels handmatig verwijderd (Ignoffo *et al.* 1977, Olszak 1986) en later werden niet-vliegende genetische varianten geselecteerd uit een kweek waarin genetische mutaties waren opgewekt (Ferran *et al.* 1998, Tourniaire *et al.* 1999). Vanuit praktische, wetmatige en ethische overwegingen kan het echter voordelig zijn om gebruik te maken van soorten die van nature in hun vliegkunsten verschillen. Zo zijn Franse en Japanse onderzoekers er in geslaagd om in het Aziatisch lieveheersbeestje, *Harmonia axyridis* Pallas, met behulp van een vliegmolentje genotypes te selecteren met minder ontwikkelde vliegspieren (Tourniaire *et al.* 2000, Tomokazu Seko persoonlijke communicatie). Later zijn deze genotypes ook op de markt gebracht. In diverse soorten is inderdaad aangetoond dat een beperking van het vliegvermogen leidt tot een langer verblijf op de planten waarop lieveheersbeestjes zijn losgelaten (zowel in de kas als in de buitenlucht) en in enkele gevallen is bewezen dat de bladluisbestrijding werd verbeterd (Ignoffo *et al.* 1977, Ferran *et al.* 1998, Tourniaire *et al.* 1999, Weissenberger *et al.* 1999, Seko *et al.* 2008, 2014).

De exotische *Harmonia axyridis* heeft zich in Europa echter ontpopt tot een invasieve soort die schadelijk is voor de lokale biodiversiteit (Roy & Wajnberg 2008) en daarom is zijn gebruik in biologische bestrijding tegenwoordig verboden in Europa. Daarmee is de inheemse *A. bipunctata* weer interessanter geworden.

1. Tweestippelig lieveheersbeestje, *Adalia bipunctata*. Foto: Tim Faasen
1. Two-spot ladybird, *Adalia bipunctata*.

Variatie in vleugellengte

In natuurlijke populaties van *A. bipunctata* in Groot-Brittannië en Nederland zijn diverse malen 'ongevleugelde' varianten gevonden (Majerus and Kearns 1989, Marples *et al.* 1993). Dit is zeer ongebruikelijk binnen de lieveheersbeetjesfamilie. Zulke zeldzame varianten hebben afgeknotte vliegvleugels én dekschilden die oorspronkelijk ook vliegvleugels waren, maar in de evolutie van kevers zijn veranderd in beschermende schilden. Deze misvorming blijkt erfelijk bepaald en wordt gereguleerd door een ondergeschikte (recessieve) variant van het corresponderende gen (Marples *et al.* 1993), waardoor alleen individuen met twee kopieën van deze variant (op beide sets chromosomen) daadwerkelijk ongevleugeld zijn. Doordat alle nakomelingen van twee ongevleugelde ouders ook ongevleugeld zijn, is het eenvoudig een kweek van uitsluitend ongevleugelde *A. bipunctata* op te zetten. Hierbij bleek dat er grote variatie is in de mate van vleugelreductie: hoewel ze allemaal genetisch gezien ongevleugeld zijn, varieert het uiterlijk via een continue reeks van kevers die helemaal geen vleugelweefsel meer hebben tot kevers die alleen het laatste stukje van hun vleugels missen (figuur 2).

Het wordt interessant om ongevleugelde individuen van *A. bipunctata* als biologische bestrijders op de markt te brengen wanneer ze aan twee voorwaarden voldoen: ze moeten effectiever zijn in de bladluisbestrijding dan de huidige normale gevleugelde varianten én ze moeten kosteneffectief te produceren zijn. Dat heb ik in mijn proefschrift onderzocht. We hebben daarvoor ook de onderliggende mechanismen van ongevleugeldheid onderzocht. Hiervoor hebben we lieveheersbeestjes in Utrecht, waar het kenmerk ongevleugeld in de populatie voorkomt, verzameld en in het laboratorium van Leiden Universiteit verder gekweekt tot een pure ongevleugelde en een pure gevleugelde lijn, die we gebruikten voor al onze experimenten.

Waarom bestaan ongevleugelde lieveheersbeestjes?

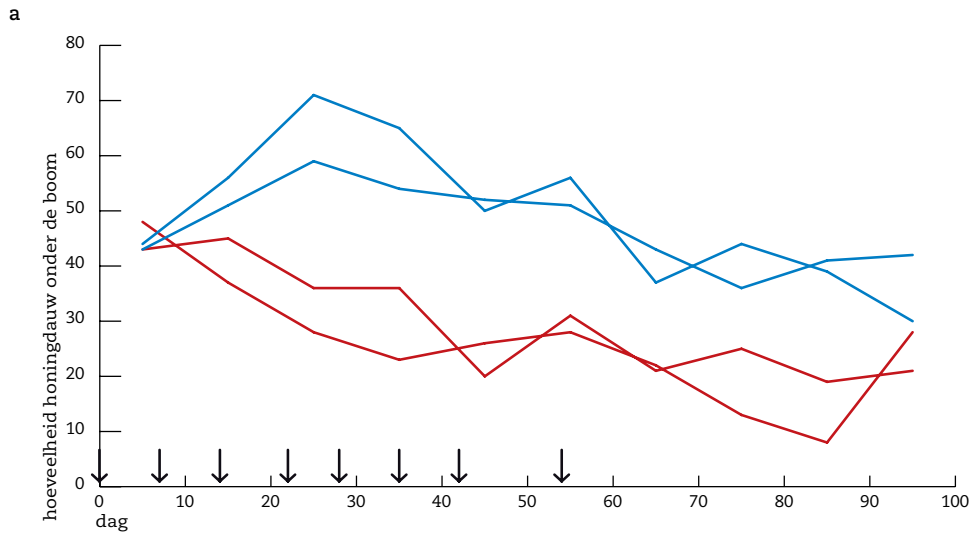
Door dissectie van larven laten we zien dat de vleugelreductie het resultaat is van een vertraagde ontwikkeling van het vleugelweefsel in het larvale stadium: hoe later of trager de ontwikkeling, hoe korter de vleugels (Lommen *et al.* 2009). In een kruisingsexperiment tonen we aan dat de mate van de verkorting voor een groot gedeelte genetisch wordt bepaald: hoe korter de vleugels van de ouders, hoe korter die van de nakomelingen. Maar ook de omgeving beïnvloedt deze ontwikkeling: als de larven opgroeien bij een extreem hoge temperatuur blijft hun vleugellengte achter bij die van hun broertjes of zusjes die bij een normale temperatuur opgroeien (Lommen 2013). Deze kennis kunnen we gebruiken om de vleugellengte van een ongevleugelde kweek te manipuleren.

We hebben geen evolutionair voordeel van de ongevleugelde afwijking kunnen ontdekken. Ueno *et al.* (2004) toonden al aan dat de ongevleugelde vormen gemiddeld minder 'fit' waren dan gevleugelde: de larven ontwikkelden zich langzamer, de volwassen lieveheersbeestjes leefden korter en de vrouwtjes produceerden daardoor ook minder nakomelingen. Hoe korter de vleugels, hoe slechter ze presteerden (Ueno *et al.* 2004). In een serie paringsexperimenten met allerlei combinaties van gevleugelde en ongevleugelde mannetjes en vrouwtjes met en zonder keus uit partners, bewijzen wij ook nog dat ongevleugelde vrouwtjes minder vaak paren en dat de kans erop afneemt naarmate ze kortere vleugels hebben (Lommen 2013). Het blijft daarom onduidelijk waarom het ongevleugelde genotype in de natuur voorkomt. Het kan een toevalligheid zijn (genetische drift), of een mutatie-selectie-balans die het fenomeen in stand houdt. Dit neemt niet weg dat ongevleugelde varianten in plaagbestrijding een voordeel zouden kunnen zijn.

Ongevleugelde lieveheersbeestjes bestrijden langer

Uit verschillende experimenten concludeer ik dat het gebruik van ongevleugelde lieveheersbeestjes de bestrijding van blad-

2. Ongevleugelde tweestippelige lieveheersbeestjes, *Adalia bipunctata*, variëren in de mate van vleugelreductie. Onderstaande foto's zijn voorbeelden uit een continue reeks van variatie. Uiterst rechts een normaal gevleugelde kever (wildtype) ter vergelijking. Foto's: Suzanne Lommen
2. Wingless two-spot ladybird beetles, *Adalia bipunctata*, vary in the degree to which wings are truncated. The pictures below are examples of the full range of continuous variation. At the far right a normal winged morph (wildtype) is depicted for comparison.



3. (a) De grafiek geeft de hoeveelheid honingdauw weer, gemeten onder twee soorten met bladluis besmette lindebomen, die wel (rood) of niet (blauw) waren behandeld met ongevleugelde lieveheersbeestjes op de dagen met de pijlen. (b) Twee van de gebruikte lindebomen in Amsterdam Slotervaart. Foto: Thomas Hollness

3. (a) The diagram depicts the amount of honeydew, measured beneath two species of aphid-infested lime trees, treated (red) or not (blue) with wingless ladybird beetles, in the city of Amsterdam, on the days indicated by the arrows. (b) Two of the lime trees in Amsterdam Slotervaart that were part of the experiment.

luizen *in principe* kan verbeteren. Met lieveheersbeestjes en diverse bladluissoorten in petrischalen toonden we eerst aan dat het vraatgedrag van ongevleugelde lieveheersbeestjes hetzelfde is als dat van gevleugelde (Lommen *et al.* 2008). Vervolgens testten we hun capaciteit tot plaagbestrijding op planten die met bladluizen zijn besmet. In een kas introduceerden we een gevleugeld lieveheersbeestje, een ongevleugeld, of helemaal geen op individuele paprikaplanten (Lommen *et al.* 2008). Na twee dagen vonden we meer ongevleugelde dan gevleugelde lieveheersbeestjes terug op de planten. De planten met ongevleugelde lieveheersbeestjes hadden kleinere bladluispopulaties dan de onbehandelde controles. De meerwaarde van de ongevleugelde ten opzichte van de gevleugelde lieveheersbeestjes hing echter af van de soort bladluis. Bij de groene perzikluis, *Myzus persicae* (Sulzer), waren ongevleugelde lieveheersbeestjes effectiever in de bestrijding, maar bij de boterbloemluis, *Aulacorthum solani* Kaltenbach, hadden de gevleugelde lieveheersbeestjes ondanks de kortere verblijfstijd net zoveel effect. We denken dat dit aan het verdedigingsgedrag van de boterbloemluis ligt, die zich bij verstoring, zoals aanwezigheid van lieveheersbeestjes, van de plant laat vallen. We verwachten dat dit een kortetermijneffect is en dat ongevleugelde lieveheersbeestjes op langere termijn in het algemeen effectiever zijn in bladluisbestrijding in kassen dan gevleugelde lieveheersbeestjes door hun langere verblijfsduur op de planten.

We laten ook voor het eerst zien dat het uitzetten van lieveheersbeestjes in de stad het bladluisprobleem kan verminderen (Lommen *et al.* 2013). Lindes komen veel voor in steden en worden jaarlijks gekoloniseerd door de bonte lindebladluis, *Eucallipterus tiliae* (Linnaeus), die grote hoeveelheden overlastgevende honingdauw kunnen produceren. Door wekelijks larven of volwassen exemplaren van de ongevleugelde kweeklijn uit te zetten op de stam van de bomen, verminderde de honingdauw onder de Hollandse linde (*Tilia x vulgaris*) en de winterlinde (*Tilia cordata*) in het Amsterdamse stadsdeel Slotervaart aanzienlijk gedurende twee maanden (figuur 3). Hiermee laten we zien dat het buiten uitzetten van ongevleugelde tweestippelige lieveheersbeestjes ook potentie heeft. Vervolgonderzoek moet aantonen of ze ook effectiever zijn dan gevleugelde varianten en of de frequentie van uitzetten kan worden teruggebracht om de maatregel kosteneffectief te maken.

Verbeterde kweek

Het wordt pas interessant om ongevleugelde varianten van het tweestippelig lieveheersbeestje als biologische bestrijders op de markt te brengen wanneer ze ook kosteneffectief te kweken zijn. Hun lagere 'fitness' baarde zorgen voor een rendabele commerciële massakweek. Gebruikmakend van de opgedane kennis over de regulatie van vleugellengte, laten we echter zien hoe de kweek van ongevleugelde lieveheersbeestjes geoptimaliseerd kan worden.

In een experiment pasten we kunstmatige selectie toe bij de kweektemperatuur waarbij de erfelijke component het grootste was. We creëerden vier kweeklijnen van ongevleugelde lieveheersbeestjes, waarbij we elke generatie een deel van de kevers selecteerden als ouders van de volgende generatie. In twee lijnen selecteerden we de individuen met de kortste vleugels, in de twee andere juist de individuen met de langste vleugels. Al na vier generaties hebben de meeste kevers in de twee 'korte' lijnen geen vleugelweefsel meer over (bijv. figuur 2, meest links), terwijl de meeste van de twee 'lange' lijnen slechts het achterste stukje van hun vleugels missen (bijv. figuur 2, meest rechts) en enkele individuen nauwelijks te onderscheiden zijn van normale lieveheersbeestjes. Deze 'lange lijnen' planten zich beter voort, terwijl ze nog steeds niet of nauwelijks kunnen vliegen (Lommen 2013). Zulke lijnen lijken daarom het meest kansrijk voor een rendabele massakweek en wellicht presteren ze ook nog beter in de bestrijding dan varianten met kortere vleugels.

Perspectief

Op basis van deze eerste onderzoeken biedt de ongevleugelde variant van het tweestippelig lieveheersbeestje goed perspectief voor verbetering van de huidige bestrijding met normaal gevleugelde varianten van het tweestippelig lieveheersbeestje, doordat hun vraatgedrag onveranderd is maar hun verblijfsduur op besmette planten langer is. Ik heb laten zien dat kennis van de mechanismen die vleugelvariatie reguleren, gebruikt kan worden om gewenste vormen van het ongevleugelde fenotype te kweken. Ik adviseer om via kunstmatige selectie lijnen te creëren van ongevleugelde lieveheersbeestjes met minimale vleugelreductie, omdat die een hogere fitness hebben en daarom naar verwachting rendabeler te kweken zijn. Verder onderzoek zal moeten uitwijzen of dit in de praktijk haalbaar en kosteneffectief is en bij toepassing op grote schaal inderdaad effectievere bestrijding oplevert. De gevonden fitness-nadelen ten opzichte van gevleugelde lieveheersbeestjes maken het zeer onwaarschijnlijk dat het gebruik van zulke lijnen in de praktijk natuurlijke populaties van *A. bipunctata* na inmenging zou verzwakken.

Ik hoop dat dit werk wetenschappers en de praktijk kan inspireren om genetische natuurlijke variatie vaker te benutten om biologische bestrijders te verbeteren (Lommen *et al.* 2016). Deze strategie kan het gebruik van risicovolle alternatieven met exotische organismen, zoals het invasieve lieveheersbeestje *H. axyridis*, en genetische manipulatie overbodig maken.

Dankwoord

Ik dank de NEV voor de dissertatieprijs en de mogelijkheid een overzicht van mijn proefschrift in Entomologische Berichten te publiceren. Speciale dank aan mijn promotoren Paul Brakefield en Peter de Jong voor de begeleiding, en aan Kees Koops voor de mede-uitvoering van het beschreven werk. Voor een uitgebreid dankwoord verwijs ik naar mijn proefschrift. Het onderzoek werd financieel gesteund door Technologiestichting STW (#6094), Koppert B.V., Wageningen UR, Leiden Universiteits Fonds en het Museum of Natural History of Cambridge.

Literatuur

Brakefield PM 1984. Ecological studies on the polymorphic ladybird *Adalia bipunctata* in the Netherlands. 2. Population dynamics, differential timing of reproduction and thermal melanism. Journal of Animal Ecology 53: 775-790.

Cock MJW, van Lenteren JC, Brodeur J, Barratt BIP, Bigler F, Bolckmans K, Consoli FL, Haas F, Mason PG & Parra JRP 2010. Do new access and benefit sharing procedures under the Convention on Biological Diversity threaten the future of biological control? BioControl 55: 199-218.

Eilenberg J, Hajek AE & Lomer C 2001. Suggestions for unifying the terminology for biological control. Biocontrol: 387-400.

Ferran A, Giuge L, Tourniaire R, Gambier J & Fournier D 1998. An artificial non-flying mutation to improve the efficiency of the ladybird *Harmonia axyridis* in biological control of aphids. Biocontrol 43: 53-64.

Hämäläinen M 1977. Control of aphids on sweet peppers, chrysantemums and roses in small greenhouses using ladybeetles *Coccinella septempunctata* and *Adalia bipunctata* (Col, Coccinellidae). Annales Agriculturae Fenniae 16: 117-131.

Hämäläinen M 1980. Evaluation of two native coccinellids for aphid control in glasshouses. IOBC/WPRS Bulletin 59-63.

Hopper KR, Roush RT & Powell W 1993. Management of genetics of biological-control introductions. Annual Review of Entomology 38: 27-51.

Ignoffo CM, Garcia C, Dickerson WA, Schmidt GT & Biever KD 1977. Imprisonment of entomophages to increase effectiveness - evaluation of a concept. Journal of Economic Entomology 70: 292-294.

IPPC 2005. International Standards for Phytosanitary Measures 03: Guidelines for the export, shipment, import and release of biological control agents and other beneficial organisms. FAO, United Nations.

Lommen STE, Middendorp CW, Luijten CA, Van Schelt J, Brakefield PM & De Jong PW 2008. Natural flightless morphs of the ladybird beetle *Adalia bipunctata* improve biological control of aphids on single plants. Biological Control 47: 340-346.

Lommen STE, Saenko SV, Tomoyasu Y & Brakefield PM 2009. Development of a wingless morph in the ladybird beetle, *Adalia bipunctata*. Evolution & Development 11: 278-289.

Lommen STE 2013. Exploring and exploiting natural variation in the wings of a predatory ladybird beetle for biological control. PhD thesis, Leiden University. https://openaccess.leidenuniv.nl/handle/1887/20872

Lommen STE, Holness TC, De Jong PW, Van Kuik AJ & Brakefield PM 2013. Releases of a natural flightless strain of the ladybird beetle *Adalia bipunctata* reduce aphid-born honeydew beneath urban lime trees. BioControl 58: 195-204.

Lommen STE, De Jong PW & Pannebakker BA 2016. It is time to bridge the gap between exploring and exploiting: prospects for utilizing intraspecific genetic variation to optimise arthropods for augmentative pest control. Entomologia Experimentalis et Applicata 162: 108-123.

Lozier JD, Roderick GK & Mills NJ 2008. Evolutionarily significant units in natural enemies: Identifying regional populations of *Aphidius transcaspicus* (Hymenoptera : Braconidae) for use in biological control of mealy plum aphid. Biological Control 46: 532-541.

Majerus MEN & Kearns PWE 1989. Ladybirds. Richmond Publishing Company.

Marples NM, De Jong PW, Ottenheim MM, Verhoog MD & Brakefield PM 1993. The inheritance of a wingless character in the 2-spot ladybird (*Adalia bipunctata*). Entomologia Experimentalis et Applicata 69: 69-73.

Nachappa P, Margolies DC, Nechols JR & Morgan TJ 2010. Response of a complex foraging phenotype to artificial selection on its component traits. Evolutionary Ecology 24: 631-655.

Olszak RW 1986. The effectiveness of three species of coccinellid adults in controlling small colonies of the green apple aphid (*Aphis pomi*). In: Ecology of Aphidophaga (Hodek I. ed): 381-384. Academia, Junk.

Roy HE & Wajnberg E 2008. From biological control to invasion: the ladybird *Harmonia axyridis* as a model species. BioControl 53: 1-4.

Seko T, Yamashita K & Miura K 2008. Residence period of a flightless strain of the ladybird beetle *Harmonia axyridis* Pallas (Coleoptera: Coccinellidae) in open fields. Biological Control 47: 194-198

Seko T, Sumi A, Nakano A, Kameshiro M, Kaneda T & Miura K 2014. Suppression of aphids by augmentative release of larvae of flightless *Harmonia axyridis*. Journal of Applied Entomology 138: 326–337.

Tabone E, Bardon C, Desneux N & Wajnberg E 2010. Parasitism of different *Trichogramma* species and strains on *Plutella xylostella* L. on greenhouse cauliflower. Journal of Pest Science 83: 251-256.

Tourniaire R, Ferran A, Gambier J, Giuge L & Bouffault F 1999. Locomotor behavior of flightless *Harmonia axyridis* Pallas (Col., Coccinellidae). Journal of Insect Behaviour 12: 545-558.

Tourniaire R, Ferran A, Giuge L, Piotte C & Gambier J 2000. A natural flightless

mutation in the ladybird, *Harmonia axyridis*. Entomologia Experimentalis et Applicata 96: 33-38.
Ueno H, De Jong PW & Brakefield PM 2004. Genetic basis and fitness consequences of winglessness in the two-spot ladybird beetle, *Adalia bipunctata*. Heredity 93: 283-289.
Van Lenteren JC, Cock MJW, Brodeur J, Barratt BIP, Bigler F, Bolckmans K, Haas F, Mason PG & Parra JRP 2011. Will the Convention on Biological Diversity put an end to biological control? Revista Brasileira De Entomologia 55: 1-5.
Van Lenteren JC 2012. The state of commercial augmentative biological control: plenty of natural enemies, but a frustrating lack of uptake. Biocontrol 57: 1-20.
Wajnberg E 2010. Genetics of the behavioral ecology of egg parasitoids. In: Egg parasitoids in agroecosystems with emphasis on *Trichogramma* (Consoli FL, Parra JRP and Zucchi RA eds): 149-156. Springer.
Wajnberg E, Curty C & Jervis M 2012. Intra-population genetic variation in the temporal pattern of egg maturation in a parasitoid wasp. Plos One 7. DOI: 10.1371/journal.pone.0045915.
Weissenberger A, Brun J, Piotte C & Ferran A 1999. Comparison between the wild type and flightless type of the coccinellid *Harmonia axyridis* (Pallas) in the control of the damson hop aphid *Phorodon humuli* (Schrank). Fifth International Conference on Pests in Agriculture: 727-734.
Wyss E, Villiger M, Hemptinne JL & Müller-Schärer H 1999a. Effects of augmentative releases of eggs and larvae of the ladybird beetle, *Adalia bipunctata*, on the abundance of the rosy apple aphid, *Dysaphis plantaginea*, in organic apple orchards. Entomologia Experimentalis Et Applicata 90: 167-173.
Wyss E, Villiger M & Müller-Schärer H 1999b. The potential of three native insect predators to control the rosy apple aphid, *Dysaphis plantaginea*. Biocontrol 44: 171-182.

Geaccepteerd: 28 oktober 2016

Summary

Why do flightless ladybird beetles exist, and are they better in biological control of aphids?
I investigated a remarkable phenomenon: 'wingless' morphs of the two-spot ladybird beetle, *Adalia bipunctata*. Such mutants occur occasionally in nature, including in a Dutch population in Utrecht. The wingless beetles have truncated wings, including their flight wings as well as their wing covers. The extent of the truncation varies from individuals missing only the tips, to those missing all wing tissue. None of them can fly, they live shorter, and they produce fewer offspring. The more truncated the wings are, the lower their fitness. We conducted experimental research, using wingless and wildtype strains from this population reared in the laboratory. On the one hand, as an evolutionary biologist, I wanted to understand why such wingless morphs of *A. bipunctata* exist. We show that the truncated wings are resulting from a retarded development of the wing tissue in the larval stages. The later and slower the development, the more truncated the wings of the adults are. We prove that the extent of the truncation is partially genetically controlled: parents with stronger wing truncations produce offspring with shorter wings than parents with slight truncations. But we also show that the rearing environment affects the extent of wing truncation: at extreme high temperatures the wings are more truncated. Despite understanding how this deviating wing morph arises, we did not find an evolutionary benefit from this deviating development: in mating experiments wingless females are mated less frequently, and it is known that mated wingless morphs produce less offspring than wildtypes. Therefore, the wingless morph is unlikely to be an evolutionary adaptation, but is rather the result of chance, or reflecting a mutation-selection balance. On the other hand, I investigated if wingless *A. bipunctata* could improve the commercial biological control of aphid pests, since the currently used regular morphs tend to fly away from the plants on which they have been released. Our research shows perspective for control by the wingless morphs. Due to a prolonged residence time, and a similar voracity, they were better in controlling the aphid *Myzus persicae* when released on single pepper plants in the greenhouse. In addition, releasing them on aphid-infested lime trees in the city of Amsterdam resulted for the first time in a measurable reduction in the sticky and annoying honeydew, secreted by aphids, beneath these trees. Their lower fitness, however, might not render their commercial mass-rearing affordable. Using our findings about the regulation of their wing development, we demonstrate that the rearing can be optimized. By artificial selection of particular phenotypes under benign conditions, we managed to produce rearing lines of the most 'fit' wingless phenotypes: those lacking only the small end of their wings, but still unable to fly. They reproduce better than lines of wingless beetles that lost all their wing tissue, but their fitness is still lower than that of normal morphs. Therefore, we expect that using these lines for commercial releases would not risk weakening wild populations upon interference. Taken together, this work shows how understanding the underlying mechanisms of phenotypic intraspecific variation can be useful to contribute to improving biological control agents by artificial selection.

Suzanne Lommen
Department of Biology
University of Fribourg
Chemin du Musée 10
1700 Fribourg, Zwitserland
suzannelommen@hotmail.com