

Herkenning van de soorten van het aardhommel-complex door middel van kleurpatronen (Hymenoptera: Apidae: *Bombus* s.s.)

Lucas Alferink
Leon Marshall
Roland De Jonghe
J.C. (Koo) Biesmeijer

TREFWOORDEN

COI, determinatie, soortencomplex

Entomologische Berichten 83 (6): 183-190

Het subgenus *Bombus* omvat in Nederland en België *Bombus cryptarum*, *B. lucorum*, *B. magnus* en *B. terrestris*. Deze hommels zijn zeer lastig uit elkaar te houden en daarom worden ze vaak bij elkaar genoemd als het aardhommel-complex. In deze studie proberen we met gemakkelijk herkenbare kenmerken te achterhalen of de hommels van het aardhommel-complex in het veld gedetermineerd kunnen worden. De individuen werden onderzocht op bepaalde kleurpatronen van de beharing en werden daarna geïdentificeerd op basis van het COI-gen. De mate waarin de hommels op basis van deze kleurpatronen gedetermineerd konden worden, was sterk afhankelijk van de soort en kaste. Koninginnen en mannetjes van *B. magnus* en mannetjes van *B. lucorum* werden het meest betrouwbaar onderscheiden. Werksters van de vier soorten konden echter niet onderscheiden worden op basis van kleurpatronen. Onze resultaten suggereren dat de status van deze vier hommelsoorten in Nederland en België onzeker is door foutieve determinaties in het verleden en heden. Als er aan deze soorten onderzoek wordt gedaan, bijvoorbeeld gedragsexperimenten, dan moet er voorzichtig worden omgegaan met het determineren op basis van kleurpatronen.

Inleiding

Hommels worden gezien als belangrijke bestuivers van zowel wilde planten als landbouwgewassen (Velthuis & Doorn 2006). Door verlies van habitat en afname van voedselplanten (Goulson *et al.* 2008) zijn de aantallen en soortenrijkdom van hommels de afgelopen eeuw achteruitgegaan in West-Europa (Biesmeijer *et al.* 2006, Carvalheiro *et al.* 2013) en Noord-Amerika (Cameron *et al.* 2011). De gevolgen van deze afname van voedsel en habitat kunnen versterkt worden door andere factoren zoals pathogenen, pesticiden en klimaatverandering (Williams & Osborne 2009). Om veranderingen in biodiversiteit goed te monitoren, is het belangrijk dat soorten correct worden gedetermineerd. Het probleem is echter dat hommels vaak lastig te determineren zijn op basis van veldkenmerken zoals kleurpatronen. In Nederland en België geldt dit vooral voor de hommels uit het aardhommel-complex, bestaande uit de wilgenhommel *Bombus cryptarum* (Fabricius, 1775), de veldhommel *B. lucorum* (Linnaeus, 1761), de grote veldhommel *B. magnus* Vogt, 1911 en de aardhommel *B. terrestris* (Linnaeus, 1758). Kruisingsexperimenten (De Jonghe & Rasmont 1983), onderzoek naar de mannelijke feromonen (Bertsch 1997, Bertsch *et al.* 2004, 2005) en DNA-analyse van het COI-gen (Bertsch *et al.* 2005, Murray *et al.* 2008, Williams *et al.* 2012b) laten zien dat deze hommels aparte soorten zijn.

In het verleden zijn veel verschillende kenmerken gebruikt

om de hommels uit het aardhommel-complex uit elkaar te houden. De belangrijkste hebben betrekking op de gele band op het borststuk (de kraag) bij koninginnen, zoals de aanwezigheid van een S-vorm van zwarte haren en hoe ver de gele band onder de vleugelaanhechting naar beneden reikt (Bertsch *et al.* 2004, Bertsch *et al.* 2005, Carolan *et al.* 2012, Rasmont 1984, Williams 2000) (figuur 1-2). Er is echter onduidelijkheid over de bruikbaarheid van deze kenmerken omdat er overlap is tussen soorten (Bertsch *et al.* 2004, 2005, Carolan *et al.* 2012). Andere kenmerken die gebruikt worden bij koninginnen zijn de puntering van het ocellaire veld, de puntering en microsculptuur op tergiet 2 en de vorm van structuren op het labrum (Amiet 1996, Kos 2020, Rasmont 1984). Volgens Murray *et al.* (2008) zijn werksters van het aardhommel-complex morfologisch niet te determineren in het veld. Sommige auteurs beweren dat dit ook voor mannetjes geldt (Murray *et al.* 2008, Waters *et al.* 2011) of dat determinaties op basis van morfologie niet betrouwbaar zijn (Bertsch 2009). Kenmerken om mannetjes te determineren hebben vooral betrekking op de kleur van de haren op het gezicht (Rasmont *et al.* 1986), maar de betrouwbaarheid van deze kenmerken is nog niet getest. Andere kenmerken hebben betrekking op de puntering en microsculptuur op tergiet 2 (Amiet 1996, Kos 2020, Rasmont *et al.* 1986) en de morfologie van het mannelijk genitaal (Alford 1975, Benton 2006, Kos 2020).

Door de problemen met morfologische determinatie zijn de conclusies over de verspreiding en ecologie van de soorten vooral gebaseerd op DNA-analyses en feromoononderzoek. Daaruit bleek dat *B. lucorum* wijd verspreid en algemeen is in grote delen van Europa (Bossert et al. 2016, Murray et al. 2008, Scriven et al. 2015, Urbanová et al. 2001, Williams et al. 2012b), net zoals *B. terrestris* (Bossert et al. 2016, Peeters et al. 2012, Williams et al. 2012b). Moleculaire methoden laten zien dat *B. lucorum*, *B. terrestris* en *B. cryptarum* polylectisch zijn op de Britse Eilanden (Scriven et al. 2015, Waters et al. 2011) en dat *B. magnus* daar een associatie lijkt te hebben met heide, vooral met gewone struikhei *Calluna vulgaris* (Scriven et al. 2015, 2016, Waters et al. 2011), rode dophei *Erica cinerea*, (Scriven et al. 2015, 2016) en gewone dophei *Erica tetralix* (Scriven et al. 2015, 2016).

Omdat de vier hommelsorten uit het aardhommel-complex qua uiterlijke kenmerken zo op elkaar lijken, is de kans op foutieve determinaties groot, wat weer kan leiden tot onjuiste conclusies over ecologie en voorkomen (Bortolus 2008). In natuurhistorische collecties bevinden zich veel onjuist gedetermineerde exemplaren (Bertsch 2009), maar deze worden vaak gebruikt voor het bepalen van langetermijntrends van soorten. Veel soorten uit het aardhommel-complex worden ook geregeld gemeld op citizen science-websites en gebruikt bij ecologische studies en het is dan belangrijk om een goed onderscheid te maken tussen de soorten.

Het doel van deze studie was om te onderzoeken of de soorten van het aardhommel-complex met voor niet-entomologen bruikbare kleurkenmerken gedetermineerd kunnen worden.

Materiaal en methode

In totaal zijn 196 hommels verzameld op negen locaties in Nederland en één in België in de periode april-augustus 2017 (tabel 1). De tien verzamellocaties zijn geselecteerd op basis van de waarschijnlijkheid dat alle vier de soorten daar voorkomen gezien de historische collectiegegevens (die misschien berusten op foute determinaties, maar de gegevens werden gebruikt als een indicatie). De hommels werden willekeurig gevangen met een vlinder-net of verzamelbuis van 10:30 tot 16:00 op elke locatie. Verder zijn er 141 hommels uit dertien kolonies uit eigen kweek (bestaande uit *B. cryptarum*, *B. lucorum*, *B. terrestris* en *B. magnus*) toegevoegd aan de studie (tabel 1), omdat vooral meer individuen van *B. magnus* nodig waren. Dit resulteerde in een totaal van 337 hommels. Uit elke kolonie werd slechts één individu met DNA gedetermi-

neerd, omdat dit de hele kolonie op naam brengt zolang deze in een kweekkamer gekweekt is. Voor de meeste kolonies die in dit onderzoek zijn gebruikt, is dat het geval. Enkele kolonies hebben vrije vlucht in de natuur gehad en daar is menging met werksters van andere kolonies niet uit te sluiten.

Er is gekozen om te kijken naar kleurkenmerken die veel in de literatuur worden genoemd en relatief eenvoudig te zien zijn in het veld. We wilden namelijk testen in hoeverre voor niet-entomologen gemakkelijk te gebruiken kenmerken geschikt zijn als determinatiekenmerken. We hebben daarom niet gekeken naar kenmerken waarvoor een stereo-microscopie nodig is, zoals de puntering en microsculptuur op de achterrand van tergiet 2 of het mannelijk genitaal. Sommige van de onderzochte kenmerken zijn in het verleden gebruikt om koninginnen van de vier soorten te onderscheiden (Bertsch 2009, Bertsch et al. 2004, 2005, Carolan et al. 2012, Rasmont 1984). Bij de mannetjes is daarnaast ook nog naar andere kenmerken gekeken, zoals de kleur van de haren op het gezicht (Rasmont et al. 1986). Bij de koninginnen, werksters en mannetjes is naar de volgende kleurkenmerken gekeken: de zwarte S-vorm in de gele kraag (figuur 1), het tot ver onder de vleugelaanhechting reiken van de gele band op het borststuk (figuur 2), melanisatie van de gele band op het borststuk (figuur 3) en de bruingele banden op het borststuk en tergiet 2 (bgb, figuur 4). Bij mannetjes is ook nog gekeken naar de gele haren op het scutellum (ghsc, figuur 5), de gele haren op het hele gezicht (ghg, figuur 6) en de gele haren alleen aan de onderkant van het gezicht als een snor (gog, figuur 7). Het kenmerk bruingele banden is niet eerder onderzocht en is toegevoegd, omdat dit vaak wordt genoemd als kenmerkend voor *B. terrestris* tegenover heldergele banden voor *B. cryptarum*, *B. lucorum* en *B. magnus* (Falk 2017, Peeters et al. 2012).

In totaal zijn 337 (39 koninginnen, 201 werksters en 97 mannetjes) hommels gebruikt in deze analyse. De hommels werden gescheiden op kaste en sekse vanwege de verschillen in kleurpatroon tussen koninginnen, werksters en mannetjes. Allereerst werd de aan- of afwezigheid van de kleurkenmerken genoteerd. Daarna werd er een chi-kwadraattoets uitgevoerd om te zien welke kenmerken een positieve relatie hebben met een bepaalde soort en werden residual plots gemaakt om de relatie tussen de kenmerken en de soorten weer te geven. De residual plots laten zien welke soort het meest verschilt van de verwachte waarden voor een bepaald kenmerk van alle soorten bij elkaar. De analyses werden gedaan in R en RStudio (R version 3.4.2 en RStudio versie 1.1.383, R Core Team 2017).

Tabel 1. Verzamellocaties en aantal individuen per locatie.
Table 1. Sample sites and number of specimens per site.

| Locatie / location | Aantal verzameldagen / number of sampling days | Data (2017) / dates (2017) | Aantal individuen / number of individuals |
|---------------------------------|--|----------------------------|---|
| Dwingelderveld (DR) | 1 | 26 juli | 20 |
| Kalmthoutse Heide (België, ANT) | 1 | 24 augustus | 25 |
| Lunterse bos (GE) | 2 | 24 mei, 14 juni | 6 |
| Meijendel (ZH) | 2 | 04 april, 31 mei | 12 |
| Slikken van de Heen (ZE) | 1 | 24 augustus | 20 |
| Terschelling (FR) | 6 | 09/11 mei, 02/04 augustus | 15 |
| Tiengemetten (ZH) | 1 | 26 mei | 25 |
| Vliegbasis Soesterberg (UT) | 2 | 16 mei, 26 juni | 33 |
| Wijlre, Zuid-Limburg (LI) | 1 | 13 juli | 20 |
| Zuid-Kennemerland (NH) | 2 | 08 mei, 18 juli | 20 |
| Hommels uit eigen kweek | - | - | 141 |



1. De S-vormige lijn van zwarte haren in de gele kraag bij een *Bombus cryptarum*-koningin. Foto: Lucas Alferink

1. The S-shaped line of black hairs in the yellow collar of a *Bombus cryptarum* queen.



2. Het tot ver onder de vleugelaanhechting reiken van de gele kraag bij een *Bombus magnus*-koningin. Foto: Lucas Alferink

2. The extension of the yellow collar to far below the tegula of a *Bombus magnus* queen.



3. Melanisatie van de gele kraag bij een *Bombus cryptarum*-koningin. Foto: Lucas Alferink

3. Melanisation of the yellow collar of a *Bombus cryptarum* queen.



4. Bruingele kleur van de banden op het borststuk en tergiet 2 bij een *Bombus terrestris*-koningin. Foto: Lucas Alferink

4. Brown-yellow colour of the bands on the thorax and tergite 2 of a *Bombus terrestris* queen.

De hommels zijn gedetermineerd op basis van DNA-analyse. Dit werd gedaan nadat de kleurpatronen waren bekeken zodat we niet werden beïnvloed door de uitkomst van de DNA-analyse. Het gen dat werd geanalyseerd is het cytochroom c oxidase subunit 1 (COI), dat voor hommels geschikt is gebleken om cryptische soorten uit elkaar te halen (Williams *et al.* 2012a) en in veel studies over het aardhommel-complex is gebruikt (Bertsch *et al.* 2005, Bossert *et al.* 2016, Carolan *et al.* 2012, Murray *et al.* 2008, Scriven *et al.* 2015, Waters *et al.* 2011).

Van elke hommel werd een poot gebruikt voor DNA-extractie. De poot werd in 200 µl T1-Lysis-buffer gestopt en een scalpel werd gebruikt om de poot te vermalen zodat het DNA toegankelijk werd. Aan elk monster werd 25 µl Proteinase K toegevoegd en de extractie werd uitgevoerd met een standaard protocol met behulp van een KingFisher DNA-extractierobot (programma: Machery_Nagel_Tissue_96 KingFisher Flex). Polymerase chain reactions (PCRs) werden uitgevoerd met de universele primers LCO1490 en HC02198 (Folmer *et al.* 1994) met elk een pipetvolume van 1,00 µl (10pMol/µl) per monster. De PCR mix bevatte verder per monster 18,8 µl mQ (Ultrapure), 2,50 µl buffer CL

(10x) (Qiagen), 0,50 µl dNTP (2,50 mM), 0,25 µl Taq polymerase (5,00 U/µl) (Qiagen) and 1,00 µl template DNA, resulterend in een totaal volume van 25,0 µl. Het PCR-programma werd uitgevoerd met een Bio-Rad C1000 Touch™ Thermal Cycler en bestond uit initiële denaturatie op 94 °C voor 3 minuten, gevolgd door 40 cycli van denaturatie op 94 °C voor 15 seconden, hybridisatie op 50 °C voor 30 seconden en extensie op 72 °C voor 40 seconden. De laatste extensie werd uitgevoerd op 72 °C voor 5 minuten gevolgd door een oneindige pauze op 12 °C. Om het succes van de PCRs te bepalen werd 3 µl van elk PCR-product op een 96 Agarose gel, 2% (E-Gel®) gezet. Succesvolle PCR-producten werden opgestuurd naar BaseClear (BaseClear B.V. Leiden) voor Sanger sequencing. Ruwe sequentiedata werd aangepast en opgeslagen in Geneious® (versie 8.1.8; 2005-2015 Biomatters Ltd). Alignment van de data werd gedaan met de plugin MAFFT Multiple Alignment version 1.3.3. Deze aangepaste sequenties werden geëxporteerd als FASTA-bestanden en vergeleken met de NCBI GenBank BLAST-pagina (Altschul *et al.* 1990) en de Barcoding of Life Database (BOLD, www.boldsystems.org) om de individuele sequenties aan een soort toe te wijzen.



5. Gele haren op het scutellum bij een *Bombus magnus*-manneling.
Foto: Lucas Alferink
5. Yellow hairs on the scutellum of a *Bombus magnus* male.



6. Gele haren op het hele gezicht bij een *Bombus lucorum*-manneling.
Foto: Lucas Alferink
6. Yellow hairs on the whole face of a *Bombus lucorum* male.



7. Gele gezichtsbehaaring als een snor bij een *Bombus magnus*-manneling. Foto: Lucas Alferink
7. Yellow facial hairs like a moustache of a *Bombus magnus* male.

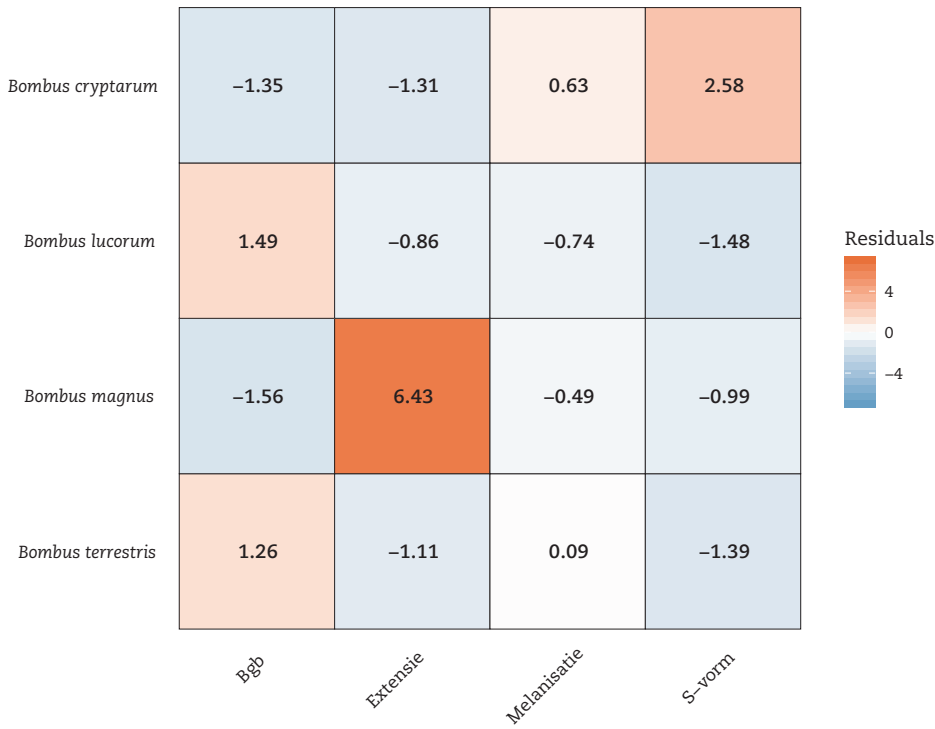
Resultaten

De residual plot voor koninginnen laat een sterke positieve relatie zien tussen *B. magnus* en het ver naar beneden reiken van de gele kraag op het borststuk en in mindere mate een positieve relatie tussen *B. cryptarum* en de zwarte S-vorm in de gele kraag (figuur 8). Dit komt overeen met de aan- of afwezigheid scores van de kleurkenmerken (tabel 2). Bijna alle koninginnen van *B. cryptarum* hebben een zwarte S-vorm in de kraag (11/12) en bij alle koninginnen van *B. magnus* reikt de kraag tot ver beneden de vleugelaanhechting (4/4).

Bij werksters is er eveneens een positieve relatie tussen *B. magnus* en het ver naar beneden reiken van de gele kraag maar ook een negatieve relatie met bruingele banden (figuur 9). *Bombus cryptarum* laat een positieve relatie zien met de zwarte S-vorm en de melanisatie van de gele kraag (figuur 9). *Bombus terrestris* heeft een positieve relatie met bruingele banden en een negatieve relatie met het ver naar beneden reiken van de kraag (figuur 9). In tegenstelling tot de koninginnen laten de aan- of afwezigheid scores zien dat bij maar 25/41 van de *B. magnus*-werksters de gele kraag ver naar beneden reikt (tabel 2).

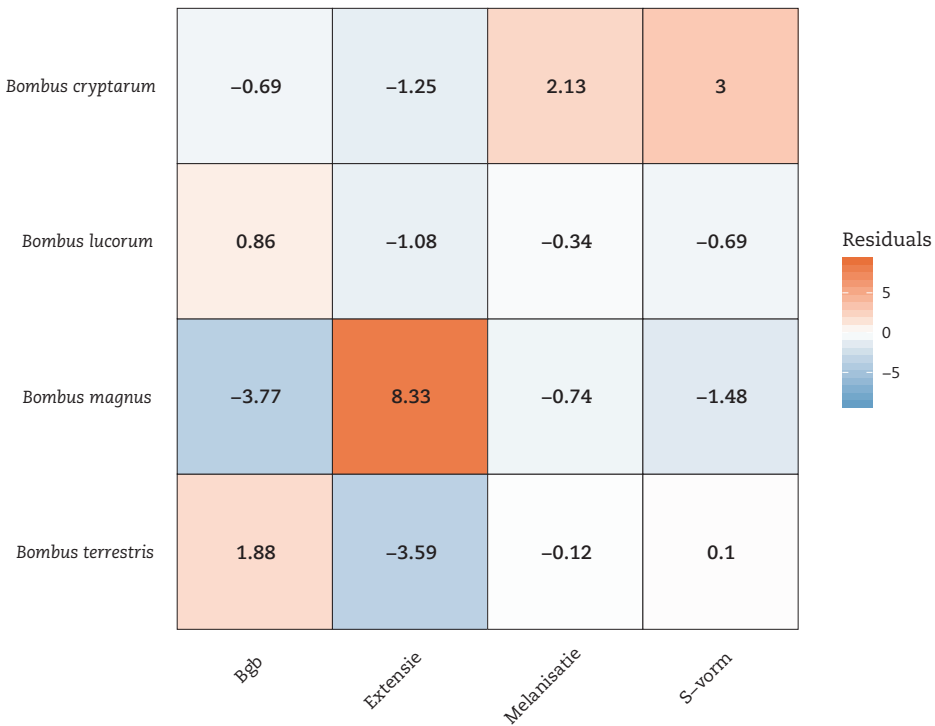
Tabel 2. Aan- of afwezigheidsscores van de kenmerken bij koninginnen, werksters en mannetjes.
Table 2. Presence/absence of qualitative characteristics in queens, workers and males.

| | Koninginnen / queens | | | | Werksters / workers | | | | Mannelingen / males | | | |
|------------------------------------|----------------------|------|------|-------|---------------------|------|-------|--------|---------------------|------|-------|-------|
| | cry. | luc. | mag. | ter. | cry. | luc. | mag. | ter. | cry. | luc. | mag. | ter. |
| S-vorm in kraag | 11/12 | 0/10 | 0/4 | 1/13 | 3/10 | 0/11 | 0/41 | 9/139 | 0/11 | 0/8 | 0/19 | 4/59 |
| Extensie van kraag | 0/12 | 0/10 | 4/4 | 0/13 | 0/10 | 0/11 | 25/41 | 5/139 | 6/11 | 8/8 | 19/19 | 30/59 |
| Melanisatie van kraag | 2/12 | 0/10 | 0/4 | 1/13 | 1/10 | 0/11 | 0/41 | 2/139 | 5/11 | 0/8 | 0/19 | 1/59 |
| Bgb (Bruingele banden) | 8/12 | 9/10 | 0/4 | 13/13 | 4/10 | 6/11 | 3/41 | 95/139 | 2/11 | 0/8 | 0/19 | 42/59 |
| Ghsc (Gele haren scutellum) | - | - | - | - | - | - | - | - | 0/11 | 1/8 | 17/19 | 0/59 |
| Ghg (Gele haren hele gezicht) | - | - | - | - | - | - | - | - | 0/11 | 7/8 | 1/19 | 0/59 |
| Gog (Gele haren onderkant gezicht) | - | - | - | - | - | - | - | - | 1/11 | 1/8 | 18/19 | 0/59 |



8. Residual plot die de relatie laat zien tussen de kenmerken voor de koninginnen van het aardhommel-complex. Hoe hoger het getal, des te meer wijkt de relatie af van het gemiddelde. Bgb = bruingele banden op borststuk en tergiet 2, Extensie = extensie van de gele kraag tot ver onder de vleugel-aanhechting, Melanisatie = melanisatie van de gele kraag en S-vorm = S-vorm van zwarte haren in de gele kraag.

8. Residual plot showing the relationship of the traits for queens of the *terrestris*-complex. The higher the number, the more the relationship deviates from the mean. Bgb = brown-yellow bands on thorax and tergite 2, Extensie = extension of the collar to far below the tegula, Melanisatie = melanisation of the collar and S-vorm = S-shaped line of black hairs in the collar.



9. Residual plot die de relatie laat zien tussen de kenmerken voor de werkers van het aardhommel-complex. Hoe hoger het getal, des te meer wijkt de relatie af van het gemiddelde. Bgb = bruingele banden op borststuk en tergiet 2, Extensie = extensie van de gele kraag tot ver onder de vleugel-aanhechting, Melanisatie = melanisatie van de gele kraag en S-vorm = S-vorm van zwarte haren in de gele kraag.

9. Residual plot showing the relationship of the traits for workers of the *terrestris*-complex. The higher the number, the more the relationship deviates from the mean. Bgb = brown-yellow bands on thorax and tergite 2, Extensie = extension of the collar to far below the tegula, Melanisatie = melanisation of the collar and S-vorm = S-shaped line of black hairs in the collar.



10. Residual plot die de relatie laat zien tussen de kenmerken voor de mannetjes van het aardhommel-complex. Hoe hoger het getal, des te meer wijkt de relatie af van het gemiddelde. Bgb = bruingele banden op borststuk en tergiet 2, Extensie = extensie van de gele kraag tot ver onder de vleugel-aanhechting, Melanisatie = melanisatie van de gele kraag, S-vorm = S-vorm van zwarte haren in de gele kraag, Ghg = gele haren op het hele gezicht, Ghsc = gele haren op het scutellum en Gog = gele haren aan de onderkant van het gezicht als een snor.

10. Residual plot showing the relationship of the traits for males of the *terrestris*-complex. The higher the number, the more the relationship deviates from the mean. Bgb = brown-yellow bands on thorax and tergite 2, Extensie = extension of the collar to far below the tegula, Melanisatie = melanisation of the collar, S-vorm = S-shaped line of black hairs in the collar, Ghg = yellow hairs on the whole face, Ghsc = yellow hairs on the scutellum and Gog = yellow hairs on the underside of the face like a moustache.

Bij *B. cryptarum* hebben maar 3/10 van de werksters een S-vorm en 1/10 melanisatie van de kraag (tabel 2).

De residual plot voor mannetjes laat een sterke positieve relatie zien tussen *B. cryptarum* en melanisatie van de kraag en tussen *B. lucorum* en gele haren op het hele gezicht (figuur 10). *Bombus magnus* heeft een positieve relatie met zowel gele haren op het scutellum als gele haren aan de onderkant van het gezicht en een negatieve relatie met bruingele banden (figuur 10). *Bombus terrestris* mannetjes laten een positieve relatie zien met bruingele banden (figuur 10). De aan- of afwezigheid scores vertonen ongeveer hetzelfde beeld als de residual plot. Bijna alle mannetjes van *B. lucorum* hebben gele haren op het hele gezicht (7/8) en bijna alle mannetjes van *B. magnus* hebben alleen gele haren aan de onderkant van het gezicht (18/19) en gele haren op het scutellum (17/19, tabel 2). Het hoge aantal mannetjes *B. terrestris* met bruingele banden is ook het vermelden waard (42/59, tabel 2).

Discussie

Deze studie laat zien dat determinatie van hommels uit het aardhommel-complex in Nederland en België op basis van duidelijk zichtbare kleurkenmerken lastig is. De kleurpatronen overlappen, vooral bij werksters en mannetjes, en dit bevestigt de resultaten uit andere gebieden waar deze hommels samen voorkomen (Bertsch 2009, Murray et al. 2008, Rasmont 1984, Rasmont et al. 1986, Waters et al. 2011). Voor elke soort was er per kaste minimaal één individu dat kenmerken deelde met andere soorten, behalve voor *B. magnus*-koninginnen, maar dit betrof slechts vier exemplaren. DNA-analyse was de enige methode die de vier soorten met zekerheid uit elkaar hield, iets wat andere studies ook laten zien (Carolan et al. 2012, Murray et al. 2008).

Koninginnen

De zwarte S-vorm in de gele kraag bij *B. cryptarum*-koninginnen en het ver naar beneden reiken van de gele kraag bij *B. magnus*-koninginnen worden vaak genoemd als redelijk bruikbare kenmerken, omdat ze aanwezig zijn in de meeste gevallen (Bertsch et al. 2004, 2005, Carolan et al. 2012). Carolan et al. (2012) vonden echter veel overlap tussen de soorten bij deze twee kenmerken. Dit staat in tegenstelling tot onze resultaten dat de S-vorm op één *B. terrestris*-koningin na alleen is waargenomen bij *B. cryptarum*-koninginnen en de extensie van de kraag alleen bij *B. magnus*-koninginnen. Deze kenmerken zouden in het veld als sterke indicatie kunnen dienen, maar het aantal onderzochte exemplaren is laag, dus de bruikbaarheid is nog moeilijk in te schatten.

Werksters

Het ver naar beneden reiken van de gele kraag onderscheidt een deel van de *B. magnus*-werksters van de andere soorten, iets wat Waters et al. (2011) ook hebben laten zien door *B. magnus* en *B. lucorum* grofweg van elkaar te scheiden door middel van dit kenmerk. Het feit dat in de studie van Waters et al. (2011) niet alle hommels correct werden gedetermineerd en dat *B. cryptarum*-werksters niet onderscheiden konden worden, laat echter zien dat werksters van het aardhommel-complex moeilijk te determineren zijn. Ook de huidige studie laat zien dat er veel intraspecifieke variatie is binnen de werksters, wat de determinatie op basis van kleurpatronen lastig maakt.

Mannetjes

Uit deze studie blijkt dat kenmerken die betrekking hebben op de kleur van de gezichtsbehaarung belangrijk zijn om de mannetjes van het aardhommel-complex te onderscheiden. Vooral

het geheel geel behaarde gezicht bij *B. lucorum* en de beperking van de gele beharing tot de onderkant van het gezicht bij *B. magnus* zijn belangrijke kenmerken. Dit komt deels overeen met de studie van Rasmont et al. (1986), die vaststelden dat in België *B. lucorum* gemiddeld meer gele haren op het gezicht heeft dan *B. magnus*. Andere belangrijke kenmerken die een rol spelen bij de determinatie van *B. magnus* zijn de gele haren op het scutellum en het ver naar beneden reiken van de gele kraag. Wederom komt dit deels overeen met Rasmont et al. (1986). Zij beschrijven dat zowel *B. lucorum* als *B. magnus* gele haren hebben op het scutellum, maar ze zijn wel meer aanwezig bij *B. magnus*. Aan de andere kant vermelden ook zij dat *B. magnus* een ver naar beneden reikende gele kraag heeft. Hier moet wel bij gezegd worden dat er extreem lichte mannetjes van *B. lucorum* bestaan met gele of witte haren op zowel de hele thorax als het hele abdomen (Falk 2017). Deze mannetjes zijn daardoor duidelijk als *B. lucorum* herkenbaar. Daar komt nog bij dat vrijwel alle *B. lucorum*-mannetjes zwarte haren met lichte toppen hebben op thorax en abdomen, wat ze een min of meer grijzig uiterlijk geeft (Amiet 1996, Rasmont et al. 1986).

Omdat de soorten in het aardhommel-complex qua uiterlijk zo sterk op elkaar lijken, gebeurt het vaak dat deze hommels worden aangezien voor *B. terrestris*, de meest algemene soort uit het complex. Hierdoor worden de andere soorten over het hoofd gezien en is de verspreiding in ruimte en tijd van deze soorten in Nederland en België niet geheel duidelijk.

Het correct determineren van soorten is belangrijk voor onze kennis over biodiversiteit en ecologie. Het probleem is dat we van veel soorten niet weten of ze voorkomen in een bepaald gebied door de aanwezigheid van morfologisch gelijkende soorten. Zelfs voor een goed onderzocht gebied zoals West-Europa is dit het geval voor de hommelsorten *B. cryptarum*, *B. lucorum*, *B. magnus* en *B. terrestris*. Er zijn waarschijnlijk veel foutieve determinaties in natuurhistorische collecties, wat Bertsch (2009) heeft aangetoond, en vaak worden deze soorten samengevoegd onder de naam aardhommel-complex. Het niet of foutief determineren kan leiden tot het trekken van onjuiste conclusies over de verspreiding en langetermijntrends van deze soorten (Bortolus 2008). Dit kan weer leiden tot bijvoorbeeld het onopgemerkt verdwijnen van een soort uit Nederland en België (Bortolus 2008). Het feit dat hommels zeer gevoelig zijn voor klimaatopwarming (Marshall et al. 2018) in combinatie met een stijgende gemiddelde temperatuur in Nederland en België maakt dat dit scenario zomaar realiteit zou kunnen worden. Dit laat het belang zien van het correct determineren van soorten. De hommels uit het aardhommel-complex worden ook vaak gebruikt in ecologische experimenten en citizen science-projecten. Foutieve determinaties tot op soortniveau kunnen dan leiden tot verkeerde conclusies, omdat we weten dat de hommels uit het aardhommel-complex een verschillende ecologie en biologie hebben.

We hebben laten zien dat van de in deze studie onderzochte determinatiemethoden DNA-analyse de enige is die de vier soorten hommels met zekerheid van elkaar onderscheidt, en we weten dat die methode werkt bij alle drie de kasten. Wat kleurkenmerken betreft zijn voor koninginnen de zwarte S-vorm in de gele kraag bij *B. cryptarum* en het tot ver onder de vleugelbasis naar beneden reiken van de gele kraag bij *B. magnus* veelbelovend, net zoals voor mannetjes de gele gezichtsbehaarung bij *B. lucorum* en de gele snor bij *B. magnus*. De lage aantallen hommels die in deze studie zijn gebruikt zorgen er echter voor dat wij hierover geen goede conclusies kunnen trekken. Een suggestie voor verder onderzoek is om deze vier kenmerken te testen met grotere aantallen hommels.

Dankwoord

Met dank aan Roland Butôt en Frank Stokvis van het Naturalis DNA-laboratorium voor het helpen met de DNA-analyse. John Smit wordt bedankt voor het verzamelen van hommels en Lisette van Kolfschoten wordt bedankt voor haar hulp met het veldwerk. We willen graag ook Werner de Gier bedanken voor zijn hulp bij de visualisatie.

Literatuur

- Alford DV 1975. Bumblebees. Davis-Poynter.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW & Lipman DJ 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215: 403-10.
- Amiet F 1996. Hymenoptera, Apidae. I. Allgemeiner Teil, Gattungsschlüssel, die Gattungen *Apis*, *Bombus* und *Psithyrus*. *Fauna Helvetica* 12: 1-98.
- Benton T 2006. Bumblebees: the natural history & identification of the species found in Britain. Collins.
- Bertsch A 1997. Discrimination of the bumblebee species *Bombus cryptarum* and *B. lucorum* by means of male labial gland secretions and morphological characters (Hymenoptera: Apidae). *Entomologia Generalis* 22: 129-145.
- Bertsch A, Schweer H & Titze A 2004. Discrimination of the bumblebee species *Bombus lucorum*, *B. cryptarum* and *B. magnus* by morphological characters and male labial gland secretions (Hymenoptera: Apidae). *Beiträge zur Entomologie* 54: 365-386.
- Bertsch A, Schweer H, Titze A & Tanaka H 2005. Male labial gland secretions and mitochondrial DNA markers support species status of *Bombus cryptarum* and *B. magnus* (Hymenoptera, Apidae). *Insectes Sociaux* 52: 45-54.
- Bertsch A 2009. Barcoding cryptic bumblebee taxa: *B. lucorum*, *B. cryptarum* and *B. magnus*, a case study (Hymenoptera: Apidae: *Bombus*). *Beiträge zur Entomologie* 59: 287-310.
- Biesmeijer JC, Roberts SPM, Reemer M, Ohlemüller R, Edwards M, Peeters T, Schaffers AP, Potts SG, Kleukers R, Thomas CD, Settele J & Kunin WE 2006. Parallel declines in pollinators and insect-pollinated plants in Britain and the Netherlands. *Science* 313: 351-54.
- Bortolus A 2008. Error cascades in the biological sciences: the unwanted consequences of using bad taxonomy in ecology. *AMBIO* 37: 114-118.
- Bossert S, Gereben-Krenn B-A, Neumayer J, Schneller B & Krenn HW 2016. The cryptic *Bombus lucorum* Complex (Hymenoptera: Apidae) in Austria: phylogeny, distribution, habitat usage and a climatic characterization based on COI sequence data. *Zoological Studies* 55: 1-15.
- Cameron SA, Lozier JD, Strange JP, Koch JB, Cordes N, Solter LF & Griswold TL 2011. Patterns of widespread decline in North American bumble bees. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108: 662-667.
- Carolan JC, Murray TE, Fitzpatrick U, Crossley J, Schmidt H, Cederberg B, McNally L, Paxton RJ, Williams PH & Brown MJF 2012. Colour patterns do not diagnose species: quantitative evaluation of a DNA barcoded cryptic bumblebee complex. *PLoS ONE* 7(1): e29251.
- Carvalho LG, Kunin WE, Keil P, Aguirre-Gutiérrez J, Ellis WN, Fox R, Groom Q, Hennekens S, Van Landuyt W, Maes D, Van de Meutter F, Míchez D, Rasmont P, Ode B, Potts SG, Reemer M, Roberts SPM, Schaminée J, WallisDeVries MF & Biesmeijer JC 2013. Species richness declines and biotic homogenisation have slowed down for NW-European pollinators and plants. *Ecology Letters* 16: 870-78.
- De Jonghe R & Rasmont P 1983. Kreuzungsexperiment mit Hummeln des Genus *Bombus* Latreille sensu stricto (Hymenoptera, Apidae). *Phegea* 11: 7-10.
- Falk SF 2017. Veldgids bijen voor Nederland en Vlaanderen. Kosmos uitgevers.
- Folmer O, Black M, Hoeh W, Lutz R & Vrijenhoek R 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 3: 294-99.
- Goulson D, Lye GC & Darvill B 2008. Decline and conservation of bumble bees. *Annual Review of Entomology* 53: 191-208.
- Kos M 2020. *Bombus* - hommels en koekoekshommels. In: *Nederlandse bijen op naam brengen - deel 2* (Nieuwenhuijsen H, Peeters TMJ & Dijkshoorn D eds): 111-141. Stichting Jeugdbondsuitgeverij.
- Marshall L, Biesmeijer JC, Rasmont P, Verweijen NJ, Dvorak L, Fitzpatrick U, Francis F, Neumayer J, Ødegaard F, Paukkunen JPT, Pawlikowski T, Reemer M, Roberts SPM, Straka J, Vray S & Dendoncker N 2018. The interplay of climate and land use change affects the distribution of EU bumblebees. *Global Change Biology* 24: 101-116.
- Murray TE, Fitzpatrick U, Brown MJF & Paxton RJ. 2008. Cryptic species diversity in a widespread bumble bee complex revealed using mitochondrial DNA RFLPs. *Conservation Genetics* 9: 653-566.
- Peeters TMJ, Nieuwenhuijsen H, Smit J, Van der Meer F, Raemakers IP, Heitmans WRB, Van Achterberg C, Kwak M, Loonstra AJ, De Rond J, Roos B & Reemer M 2012. *De Nederlandse bijen* (Hymenoptera: Apidae s.l.). *Natuur van Nederland* 11. Naturalis Biodiversity Center & European Invertebrate Survey - Nederland.
- R Core Team 2017. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing.
- Rasmont P 1984. Les bourdons du genre *Bombus* Latreille sensu stricto en Europe Occidentale et Centrale (Hymenoptera, Apidae). *Spixiana* 7:135-160.
- Rasmont P, Scholl A, De Jonghe R, Obrecht E & Adamski A. 1986. Identité et variabilité des mâles de bourdons du genre *Bombus* Latreille sensu stricto en Europe occidentale et centrale (Hymenoptera, Apidae, Bombinae). *Revue Suisse de Zoologie* 93:661-682.
- Scriven JJ, Woodall LC, Tinsley MC, Knight ME, Williams PH, Carolan JC, Brown MJF & Goulson D 2015. Revealing the hidden niches of cryptic bumblebees in Great Britain: Implications for conservation. *Biological Conservation* 182: 126-133.
- Scriven JJ, Whitehorn PR, Goulson D & Tinsley MC 2016. Niche partitioning in a sympatric cryptic species complex. *Ecology and Evolution* 6: 1328-1339.
- Urbanová K, Valterová I, Hovorka O & Kindl J 2001. Chemotaxonomical characterisation of males of *Bombus lucorum* (Hymenoptera: Apidae) collected in the Czech Republic. *European Journal of Entomology* 98:111-115.
- Velthuis HHW & Van Doorn A 2006. A Century of Advances in Bumblebee Domestication and the Economic and Environmental Aspects of Its Commercialization for Pollination. *Apidologie* 37: 421-451.
- Waters J, Darvill B, Lye GC & Goulson D 2011. Niche differentiation of a cryptic bumblebee complex in the western isles of Scotland. *Insect Conservation and Diversity* 4: 46-52.
- Williams PH 2000. Are *Bombus lucorum* and *magnus* separate species? *BWARS Newsletter* 2000: 15-17.
- Williams PH & Osborne JL 2009. Bumblebee vulnerability and conservation worldwide. *Apidologie* 40: 367-387.
- Williams PH, An J-D, Brown MJF, Carolan JC, Goulson D, Huang J-X & Ito M 2012a. Cryptic bumblebee species: consequences for conservation and the trade in greenhouse pollinators. *PLoS ONE* 7(3): 1-8.
- Williams PH, Brown MJF, Carolan JC, An J-D, Goulson D, Aytakin AM, Best LR, Byvaltsev AM, Cederberg B, Dawson R, Huang J-X, Ito M, Monfared A, Raina RH, Schmid-Hempel P, Sheffield S, Sima P & Xie Z-H 2012b. Unveiling cryptic species of the bumblebee subgenus *Bombus* s. str. world-wide with COI barcodes (Hymenoptera: Apidae). *Systematics and Biodiversity* 10: 21-56.

Geaccepteerd: 3 februari 2023

Summary

Recognizing *Bombus* s.s. bumblebees based on colour patterns (Hymenoptera: Apidae)

The bumblebee species *Bombus cryptarum*, *B. lucorum*, *B. magnus* and *B. terrestris* are known to be very similar in their colour patterns across the majority of their ranges. Unreliable identifications make it difficult to determine the conservation status of these species. In this study, we assess if ecologists and citizen scientists can reliably and quickly separate these four species in the Netherlands and Belgium using colour pattern traits. Queens, workers and males were sampled at nine locations across the Netherlands and one in Belgium. The specimens were scored for certain colour pattern traits and were afterwards identified based on COI sequence data. For queens, workers and males we looked at the following traits: the black S-shape line in the yellow collar, the melanisation of the yellow collar, the extension of the yellow collar below the tegula and the brown-yellow colour of the bands on the thorax and tergite 2. For males we also looked at the yellow hairs on the scutellum, the yellow hairs on the whole face and the yellow hairs only on the underside of the face like a moustache. We show that easy to recognize characteristics can separate some specimens of the species depending on caste and sex. *Bombus magnus* males and queens and *B. lucorum* males were most reliably separated from the other species using colour patterns. Workers of all four species cannot be separated completely using colour patterns alone. Based on our findings we need to conclude that the status of these bumblebee species in the Netherlands and Belgium is uncertain due to possible misidentifications in the past and present. People who wish to work with these species should be careful in species identification based on colour patterns.



Lucas Alferink
Bennekom
alferink.lucas@gmail.com

Leon Marshall
Leiden

Roland de Jonghe
Westerlo (België)

J.C. (Koo) Biesmeijer
Zoeterwoude-Rijndijk