

Wij willen eten!

-Statistische analyse van de voedselselectie door rupsen-

Inleiding

Meer dan 60% van alle soorten op aarde behoren tot de insecten. Ze komen in bijna alle habitats voor en zijn essentieel voor het leven op aarde. Soms vormen insecten plagen die hele oogsten kunnen vernietigen, maar van het merendeel van de insectensoorten hebben we helemaal geen last. We hebben er zelfs voordeel van. Hierbij kan je denken aan insecten die andere schadelijke insecten eten en daarom bij biologische bestrijding ingezet worden. Een bekend voorbeeld hiervan is het uitzetten van lieveheersbeestjes om bladluizen te bestrijden. Daarnaast zijn insecten ook nodig om planten te bestuiven en om organische afvalstoffen van mens en dieren af te breken. Een kleine groep plantenetende insecten echter, zorgen vaak voor schade aan allerlei voedingsgewassen in de landbouwplantenteelt. Bij de leerstoelgroep Entomologie van Wageningen University wordt onderzoek gedaan naar deze insecten. Met behulp van de resultaten van dit onderzoek worden o.a. biologische methoden ontwikkeld waarmee deze schadelijke insecten bestreden kunnen worden.

Plantenetende insecten komen over de hele wereld voor. Ze kunnen onderscheid maken tussen voor hen 'nuttige' planten waarmee ze zich voeden en andere planten in de omgeving. Hoe doen ze dat? Tijdens het foerageren (voedselzoek- en eetgedrag) nemen insecten een aantal beslissingen, zoals:

1. in welke richting ga je zoeken naar voedsel?
2. hoelang blijf je in een bepaalde omgeving?
3. accepteer je een bepaalde voedselbron of niet?

Voor het nemen van deze beslissingen is informatie uit de omgeving, zoals de vorm en kleur van planten, van groot belang. Daarnaast verspreiden planten chemische stoffen (geur- en smaakstoffen) die tevens belangrijke informatie verschaffen aan de plantenetende insecten.

Doel

In deze proef bekijk je het foerageergedrag van rupsen van de kooluil en van rupsen van het koolwitje. Door te kijken naar het gedrag van de rupsen kun je informatie krijgen over de manier waarop ze voedsel selecteren. Maken de rupsen onderscheid tussen verschillende plantensoorten? Welke prikkels gebruiken ze daarbij? Aan het einde van het experiment kan iets over het verschil tussen de soorten gezegd worden. Conclusies over de verkregen resultaten kunnen bij de voorgestelde proefopzet worden getrokken met behulp van de tekentoets.



Wij willen eten!

-Statistische analyse van de voedselselectie door rupsen-

Theorie

Kieskeurig?

De meeste insecten zijn behoorlijk kieskeurig in hun keuze voor planten om zich te voeden en op voort te planten. Insecten die zich met één plantensoort of een paar nauw gerelateerde plantensoorten voeden, worden monofagen genoemd. Oligofagen zijn insecten die zich met een aantal plantensoorten voeden, maar de plantensoorten behoren allemaal tot dezelfde plantenfamilie. Het koolwitje (*Pieris brassicae*) is een voorbeeld van een oligofaag insect, omdat deze zich alleen voedt met verschillende koolsoorten. Polyfagen zijn insecten die niet kieskeurig zijn en voeden zich met planten uit verschillende families. Een voorbeeld hiervan zijn rupsen van de kooluil (*Mamestra brassicae*): ze zijn generalistische herbivoren. De meeste plantenetende insecten zijn oligofagen.

Insect-plant interacties

Plantenetende insecten en planten zijn verenigd in complexe relaties.

De interactie vindt plaats door middel van chemische signalen van zowel insecten als planten. De keuze van een insect voor een bepaalde plant hangt af van de vele chemische eigenschappen van de plant. De bekendste stoffen hierbij zijn koolhydraten, aminozuren en mineralen, maar daarnaast bevat iedere plant honderdduizenden soortspecifieke plantenstoffen. Elke plantensoort heeft een specifieke chemische 'vingerafdruk' die herkend kan worden door de verschillende insecten.

De planten, op hun beurt, blijven niet wachten tot ze worden opgevreten door hordes insecten. Alhoewel ze niet kunnen ontkomen aan insecten heeft iedere plant een heel arsenaal van verdedigingsmethoden, zowel direct als indirect. Als een insect van een plant eet, dan wordt dat gesignaleerd door de plant via een stof in het speeksel van het insect. Deze stof veroorzaakt een reactie van de plant. Als er sprake is van directe verdediging, gaat de plant stoffen aanmaken die giftig zijn voor het insect. Het kan zijn dat de plant deze giftige stof altijd al produceerde, maar na de aanval van het insect de productie ervan verhoogt of dat de plant een nieuwe giftige stof aanmaakt. De plant kan zich ook indirect verdedigen door de natuurlijke vijand van het plantenetende insect te lokken. Dit kan onder andere door deze insectenetende insecten te lokken met voedsel, zoals stuifmeel of suikerverbindingen die worden uitgescheiden. Een andere manier is om geursignalen af te geven aan de omgeving die kunnen worden opgepikt door deze insecten.

Ondanks de verdedigingsmechanismen van de plant, blijven er voldoende mogelijkheden voor de plantenetende insecten, om de plant te eten en om er haar eieren op te leggen. De plant wordt op zijn beurt niet volledig weggevreten en ziet ook kans zich voort te planten en te verspreiden. Er is sprake van een evenwichtssituatie.

Variatie en diversiteit van planten en insecten

Insecten kiezen vaak zeer nauwkeurig de planten waarvan ze eten en waarop ze eieren leggen. Insecten selecteren niet alleen bepaalde plantensoorten, maar ook bepaalde



Wij willen eten!

-Statistische analyse van de voedselselectie door rupsen-

delen van een plant. Het selecteren van voedsel kan bovendien veranderen tijdens de verschillende ontwikkelingsfasen van het insect. Voedselselectie vereist dus een aanpassing van insecten waarbij zij planten die van waarde zijn, kunnen herkennen en vinden. Aan de andere kant heeft blootstelling aan dieren waarschijnlijk in belangrijke mate bijgedragen aan de ontwikkeling van diversiteit in de plantenwereld. Zoals al eerder vermeld is, heeft elke plantensoort zijn eigen chemische vingerafdruk bestaande uit allerlei verschillende plantstoffen die in een bepaalde concentratie worden uitgescheiden. Maar er bestaan ook kleine variaties in de chemische vingerafdruk tussen planten van dezelfde soort. De verdedigingsreactie van een plant is afhankelijk van haar genotype en de insectensoort waardoor zij wordt aangevallen.

Wanneer een groep planten van een bepaalde soort steeds door dezelfde insectensoort wordt aangevallen zullen deze planten langzaam maar zeker hun chemische signalen aanpassen en een iets andere chemische vingerafdruk vertonen dan andere planten van dezelfde soort die door andere soorten insecten wordt aangevallen. Na verloop van tijd ontstaat er dus binnen een plantensoort individuele variatie afhankelijk van de aanwezige insecten. De plant die zich het beste aanpast aan de veranderingen van de omgeving zal overleven en zich voortplanten. Dit proces wordt natuurlijke selectie genoemd. Dit proces is waarschijnlijk al vele eeuwen aan de gang en zorgt, volgens de evolutietheorie, voor het ontstaan van verschillende soorten planten. Met andere woorden, het insect is waarschijnlijk één van de drijvende krachten achter de vorming en de diversiteit van de plantenwereld.

Om onderbouwde conclusies te kunnen trekken op grond van de resultaten van een experiment is het gebruik van een statistische toets noodzakelijk. Pas na zo'n toets kan je verschillen of verbanden aantonen of zeggen dat er op basis van de resultaten geen verschil of verband is gevonden. Er zijn veel verschillende toetsen. Elke toets werkt op een andere manier, waarbij het aantal kenmerken, het aantal steekproeven en de steekproefomvang belangrijk zijn. Doordat een toets specifieke eisen stelt aan de gegevens is het belangrijk hier bij het opzetten van de proef al rekening mee te houden. Wanneer er van tevoren niet over nagedacht is, kan het zijn dat er uiteindelijk niet getoetst kan worden of het verschil of verband significant is, terwijl dit bijvoorbeeld bij een grotere steekproef wel het geval had kunnen zijn. Voor het verwerken van de resultaten van deze proef maken we gebruik van de tekentoets. Dat wil overigens niet zeggen dat deze voor dit experiment de best denkbare toets is. We beperken ons hier namelijk tot eenvoudig uit te voeren toetsen die nauw aansluiten bij het vwo pakket en die een aardig beeld geven van het gebruik van toetsen bij een praktische vraagstelling.

Uitvoering

In dit experiment laat je een rups van een kooluil, en een rups van een koolwitje kiezen tussen bladponsjes (klein stukje blad) van een bonenplant en van een koolplant. De rupsen zijn voor de start van het experiment drie uur gehongerd.



Wij willen eten!

-Statistische analyse van de voedselselectie door rupsen-

Materialen

- 30 Ponsjes van bonenblad, diameter 2 cm
- 30 Ponsjes van koolblad, diameter 2 cm
- Kooluil rupsen (ongeveer 3 uur gehongerd)
- Koolwitjesrupsen (ongeveer 3 uur gehongerd)
- 2 petrischalen (doorsnede 9 cm)
- Verenstaalpincet (deze gebruiken we omdat de kans dan klein is dat een rups wordt geplet tussen de grijpers van de pincet)
- Stopwatch

Veiligheid

Er zitten geen handelingen of stoffen verwerkt in dit practicum die gevaar voor de veiligheid opleveren.

Dit experiment dient altijd uitgevoerd te worden onder begeleiding van een docent of toa. Wageningen University aanvaardt geen enkele aansprakelijkheid voor schade die voortvloeit uit het verrichten van dit experiment buiten de campus van Wageningen University.

Beschrijving

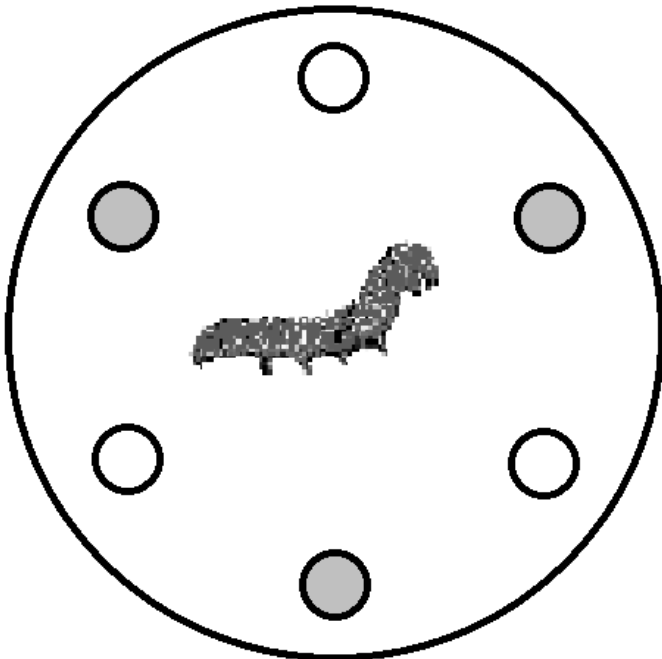
1. Tweekeuzeproef

Verdeel drie ponsjes van het bonenblad op gelijke afstand van elkaar in de twee petrischaaltjes op 0,5 cm afstand van de rand. Verdeel de drie ponsjes van het koolblad op dezelfde manier, waarbij de koolblad ponsjes en de bonenblad ponsjes elkaar afwisselen (zie figuur 3).



Wij willen eten!

-Statistische analyse van de voedselselectie door rupsen-



Figuur 3. De verdeling van de twee bladsoorten over het petrischaaltje.

Zet nu voorzichtig (niet te hard knippen!) met een verenstaalpincet een rups precies in het midden van een schaal. Elk klein groepje (2 á 3 personen) kiest dus voor één van de twee soorten rupsen om de proef uit te voeren. Houd nu bij hoe lang de rups op welk soort voedselbron verblijft. Doe dit gedurende tien minuten. Er zijn dus twee categorieën:

1. De rups heeft contact met en/of eet van het bladponsje van het bonenblad.
2. De rups heeft contact met en/of eet van het bladponsje van het koolblad.

Vul in tabel 1 de totaal doorgebrachte tijd per categorie in. Doe dit met tien *verschillende rupsen van dezelfde soort* en telkens met nieuwe ponsjes. Vul bij totale tijd de tijd in seconden in.

Maak aan het eind van de proef een schatting van de hoeveelheid opgegeten oppervlak van beide soorten bladponsen. Dit doe je nadat de rups 10 minuten in het petrischaaltje heeft gezeten zodat alle blaadjes even lang aan de rups zijn blootgesteld.

2. Geenkeuzeproef

Maak ook twee petrischalen klaar waarin je alleen drie ponsjes bonenblad legt op gelijke afstanden van elkaar. Doe in de ene schaal een rups van een koolwitje, in de andere een rups van een kooluil. Scoor na een uur of er van het blad gevreten is of niet. Herhaal dit nog eens aan het eind van de middag.

Wij willen eten!

-Statistische analyse van de voedselselectie door rupsen-

Resultaten

1. Gebruik tabel 1 om de handelingen die de rupsen uitvoeren te noteren. In de laatste kolom kunnen de resultaten opgeteld en verwerkt worden.

Tabel 1. Tijd doorgebracht op de verschillende bladen voor 10 rupsen van één van de twee soorten.

Rups nummer	Schrijfruimte voor tijd doorgebracht op blad		Verschil in seconden
	Categorie 1 (bonenblad) (in seconden)	Categorie2 (koolblad) (in seconden)	
1			
2			
3			
4			
5			
6			
7			
8			
9			
10			
Totaal			

Voor het uitvoeren van de tekentoets ga je kijken naar het verschil in tijd doorgebracht op de verschillende bladeren. Na het uitvoeren van de toets kun je dan iets zeggen over de voorkeur van de soort voor één van de bladsoorten. Voer nu de tekentoets uit volgens het stappenplan (zie de lesbrief) met behulp van tabel 1.



Wij willen eten!

-Statistische analyse van de voedselselectie door rupsen-

Vragen

1. Wat is je conclusie van de tekentoets (de keuze voor de eenzijdige onbetrouwbaarheidsdrempel α is 0,10)? Is er een voorkeur voor een blad?
2. Als je de uitkomst van de toets vergelijkt met de totale doorgebrachte tijd op beide soorten bladen, komt dit dan overeen volgens jou? Waarom kan dit verschillen?
3. Waarom kun je uit het observeren van alle gedragshandelingen, in tegenstelling tot het meten van de verblijftijden op verschillende bladeren alleen, meer concluderen over de reden van de keuze van de rupsen wat betreft voedsel?
4. Beschrijf het loop- en eetgedrag van elke rups. Wat is je het meest opgevallen?
5. Welke oorzaak kun je bedenken voor de specialisatie van het koolwitje, *Pieris brassicae*, op één van de twee plantensoorten? (Als jij deze soort niet hebt bekeken vraag dan de resultaten aan een ander groepje in de klas).
6. Vergelijk de uitkomsten met die van de andere groepjes in de klas. Valt er iets op?



Wij willen eten!

-Statistische analyse van de voedselselectie door rupsen-

Suggesties voor verder onderzoek

In de gegeven beschrijving gaan we ervan uit dat je beide rupsen gebruikt. De proef is echt ook goed uit te voeren met één van de rupsen of de rupsen te verdelen over verschillende groepjes. Ook kun je andere rupsen gebruiken (die bijvoorbeeld leerlingen zelf gevangen hebben) om leerlingen een uitspraak te laten doen over die rupsen.

Voor de verandering kun je ook de bladeren van andere planten gebruiken. Daarnaast is het ook leuk om te zien wat er gebeurt als je de bonenbladeren eerst besmeerd met het sap van de koolplant of andersom.

Deze proef kan gekoppeld worden aan de habitat van vlinders. Waarom kiezen vlinders bepaalde planten voor voedsel en voortplanting? Vanuit deze invalshoek kan de methode in de proef ook gebruikt worden als basis voor een experiment in een profielwerkstuk.

Documentatie

- Dicke, M. 1998. SOS-signalen van planten. Natuur en techniek. 9:58-67
- Bakker, K. et al. 1991. Insekten. Cahiers Bio-Wetenschappen en Maatschappij Vol. 15 nr. 2.

Oriëntatie op vervolgonderwijs

Het onderwerp van dit experiment kom je ook tegen in de volgende opleidingen van Wageningen University:

- Biologie
- Plantenwetenschappen
- Bos- en Natuurbeheer

Kijk voor meer informatie op www.wageningenuniversity.nl/bsc.



Voor de docent of toa

Uitvoering

Materialen

De kooluil- en koolwitjesrupsen zijn verkrijgbaar bij de leerstoelgroep Entomologie aan Wageningen University. Neem hiervoor contact op met vraagbaak@wur.nl. Er bestaat ook een mogelijkheid om eitjes toegestuurd te krijgen en deze zelf op te kweken tot 3^e stadium rups. De eitjes worden in 4 weken opgekweekt en moeten dus nog eerder worden aangevraagd.

Het duurt 4 dagen voordat de eieren uitkomen. En daarna moeten ze flink gevoerd worden met biologische kool bij een temperatuur van (22°C). Dan duurt het nog 3 weken voordat de rupsen in het juiste stadium gekomen zijn om de proef ermee uit te voeren. Bonen- en koolplantjes zijn eenvoudig te kweken in de vensterbank. Koolbladeren (van diverse koolsoorten) zijn ook eventueel verkrijgbaar bij de biologische winkel.

Vaardigheden

Het is aan te raden dat de leerlingen van tevoren al een keer de lesbrief hebben bestudeerd. Verder is enige kennis van toetsen handig. Met behulp van de lesbrief over de tekentoets moeten alle leerlingen dit practicum kunnen uitvoeren.

Veiligheid

Er zitten geen handelingen of stoffen verwerkt in dit practicum die gevaar voor de veiligheid opleveren.

Dit experiment dient altijd uitgevoerd te worden onder begeleiding van een docent of toa. Wageningen University aanvaardt geen enkele aansprakelijkheid voor schade die voortvloeit uit het verrichten van dit experiment buiten de campus van Wageningen University.

Resultaten

De resultaten kunnen erg verschillen. Hieronder volgt de toets uitgevoerd voor één set waarnemingen. De theorie en achtergrondvragen zullen voor verschillende scenario's behandeld worden. De waarnemingen die gebruikt worden voor de uitwerking zijn als volgt (voor bijvoorbeeld het koolwitje):



Wij willen eten!

-Statistische analyse van de voedselselectie door rupsen-

Rups nummer	Schrijfruimte voor tijd doorgebracht op blad		Verschil in seconde
	Categorie 1 (bonenblad)	Categorie2 (koolblad)	
1	187	345	
2	34	456	
3	134	125	
4	34	234	
5	102	134	
6	120	145	
7	134	265	
8	78	309	
9	98	198	
10	23	490	
Totaal			

Uitwerking van de vragen

1. Wat is je conclusie van de tekentoets (de keuze voor de eenzijdige onbetrouwbaarheidsdrempel α is 0,10)? Is er een voorkeur voor een blad?

Eerst het uitvoeren van de toets volgens het stappenplan:

1. Is er een systematisch verschil tussen de tijd die de rups doorbrengt op het bonenblad en op het koolblad? Meet daartoe de tijd x in seconde doorgebracht op het bonenblad en de tijd y in seconden doorgebracht op het koolblad.
2. Als nulhypothese nemen we aan dat er geen systematisch verschil is in tijd doorgebracht op één van beide bladsoorten. Als alternatieve hypothese verwachten we dat rupsen van het koolwitje systematisch meer tijd doorbrengen op één van de twee bladeren. In formulevorm is de nulhypothese $H_0: P(y-x > 0) = 0,5$ ("de tijd die rupsen op het bonenblad doorbrengen verschilt niet van de tijd die ze op het koolblad doorbrengen") en een alternatieve hypothese $H_1: P(y-x > 0) \neq 0,5$ ("de tijd die rupsen op het bonenblad doorbrengen verschilt van de tijd die ze op het koolblad doorbrengen"). Met deze hypothesen is de uit te voeren toets tweezijdig.
3. De toetsingsgrootte T is het aantal positieve verschillen $y-x$. De mogelijke waarden voor deze toetsingsgrootte zijn de gehele getallen vanaf 0 tot en met 10. Onder de alternatieve hypothese heeft T de neiging om kleinere of grotere waarden aan te nemen. In de tabel hieronder is de uitwerking gegeven van een mogelijk resultaat.



Wij willen eten!

-Statistische analyse van de voedselselectie door rupsen-

Rups nummer	Schrijfruimte voor tijd doorgebracht op blad		Verskil in seconde
	Categorie 1 (bonenblad)	Categorie2 (koolblad)	
1	187	345	-158
2	34	456	-422
3	134	125	9
4	34	234	-200
5	102	134	-32
6	120	145	-25
7	134	265	-131
8	78	309	-241
9	98	198	-100
10	23	490	-477
Totaal	944	2701	-1757

- De keuze voor de eenzijdige onbetrouwbaarheidsdrempel α is 0,10.
- De kritieke waarde bij een tweezijdige toets met 10 ($=n$) gepaarde waarnemingen en $\alpha = 0,10$ is 1 (zie tabel in de lesbrief). Het kritieke gebied is dan $\{0,1\} \{9,10\}$.
- De waarde van de toetsingsgrootheid T is in dit voorbeeld 1, want één positief verschil (zie bovenstaande tabel).
- De waarde van T ligt in het kritieke gebied en dan wordt de nulhypothese verworpen. De conclusie luidt: er is een systematisch verschil aangetoond in doorgebrachte tijd bij deze waarnemingen, waarbij duidelijk meer tijd is doorgebracht op het bonenblad.

Er is ook te zien dat de rups in dit geval een voorkeur heeft voor het bonenblad (bij een éézijdige toets zou het kritieke gebied namelijk $\{0,1\}$ zijn met als toetsingsgrootheid één negatieve waarde en dus zou de nulhypothese (geen verschil in doorgebrachte tijd) worden verworpen en is er overtuigend aangetoond dat er meer tijd op het koolblad wordt doorgebracht).

Dit is een realistische conclusie voor koolwitjes. Koolwitjes zijn namelijk oligofaag. Voor de kooluilrups is de verwachting dat er geen significant verschil zal zijn tussen de doorgebrachte tijd op één van de soorten. De kooluilrups is immers polyfaag.

- Als je de uitkomst van de toets vergelijkt met de totale doorgebrachte tijd op beide soorten bladen komt dit dan overeen volgens jou? Waarom kan dit verschillen?

Dit komt overeen in dit geval. Als er in de resultaten wel verschil is doordat de conclusie is dat er geen verschil is en de doorgebrachte tijd is wel verschillend, kan dat komen doordat het verschil ook door toeval verklaard kan worden.

- Waarom kun je uit het observeren van alle gedragshandelingen, in tegenstelling tot het meten van de verblijftijden op verschillende bladeren alleen, meer concluderen over de reden van de keuze van de rupsen wat betreft voedsel?



Wij willen eten!

-Statistische analyse van de voedselselectie door rupsen-

Je ziet dan de manier van bewegen naar een stukje blad. Daaraan kan je wellicht meer afleiden wat betreft keuze op basis van geur of beeld. Dit is dan echter wel speculatief en moet op een veel ingewikkeldere manier getoetst worden.

10. Beschrijf het loop- en eetgedrag van elke rups. Wat is je het meest opgevallen?

Elk antwoord is goed. Het gaat erom dat de leerling het gedrag van de rupsen nauwlettend observeert.

11. Welke oorzaak kun je bedenken voor de specialisatie van het koolwitje, *Pieris brassicae*, op één van de twee plantensoorten? (Als jij deze soort niet hebt bekeken vraag dan de resultaten aan een ander groepje in de klas).

Door te specialiseren op één (of enkele) soorten kan de rups zich aanpassen aan de soort. Zo kan een soort de afweer van de plant ontwijken of chemische stoffen van de plant waarnemen om zo de plant eenvoudig te kunnen vinden.

12. Vergelijk de uitkomsten met die van de andere groepjes in de klas. Valt er iets op?

Er kunnen verschillen zijn in uitkomsten. Zo kan er in het ene groepje een significant verschil uitkomen terwijl dit bij andere groepjes niet het geval hoeft te zijn. Dat kan verschillende oorzaken hebben. Zo kunnen er meetfouten in zitten waardoor verschillen onjuist negatief worden of juist positief. Om te kijken of het een fout is als deze, kan je de toets een keer uitvoeren met alle gegevens van alle groepjes. Door zo een grotere steekproef te creëren worden de uitkomsten steeds betrouwbaarder.

Opmerkingen

Er moet in kleine groepjes gewerkt worden van twee (maximaal drie) leerlingen. Belangrijk hierbij is dat de verdeling van beide rupsensoorten evenredig is over de klas. Dit is noodzakelijk om iets te kunnen zeggen over de verschillen tussen de beide rupsensoorten.

Er is ook een korter en eenvoudiger uitgave van het experiment beschikbaar. Daarin wordt geen gebruik gemaakt van een toets.

