



**Biologisk
bekæmpelse af alm.
Ædelgranlus (*Adelges
nordmanniana*)
En vurdering af
høstfluen *Leucopis
hennigrata***

Udgiver: Miljøstyrelsen

Redaktion:

Hans Peter Ravn

Mathias Just Justesen

Institut for Geovidenskab og Naturforvaltning,

Københavns Universitet

ISBN: 978-87-7038-418-6

Miljøstyrelsen offentliggør rapporter og indlæg vedrørende forsknings- og udviklingsprojekter inden for miljøsektoren, som er finansieret af Miljøstyrelsen. Det skal bemærkes, at en sådan offentliggørelse ikke nødvendigvis betyder, at det pågældende indlæg giver udtryk for Miljøstyrelsens synspunkter. Offentliggørelsen betyder imidlertid, at Miljøstyrelsen finder, at indholdet udgør et væsentligt indlæg i debatten omkring den danske miljøpolitik.

Må citeres med kildeangivelse

Miljøteknologisk Udviklings- og Demonstrationsprogram

Projektet, som er beskrevet i denne rapport, er støttet af Miljøteknologisk Udviklings- og Demonstrationsprogram, MUDP, som er et program under Miljøministeriet, der støtter udvikling, test og demonstration af miljøteknologi.

MUDP investerer i udvikling af fremtidens miljøteknologi til gavn for klima og miljø i Danmark og globalt, samtidig med at dansk vækst og beskæftigelse styrkes. Programmet understøtter dels den bredere miljødagsorden, herunder rent vand, ren luft og sikker kemi, men understøtter også regeringens målsætninger inden for klima, biodiversitet og cirkulær økonomi.

Det er MUDP's bestyrelse, som beslutter, hvilke projekter der skal modtage tilskud. Bestyrelsen betjenes af MUDP-sekretariatet i Miljøstyrelsen.

MUDP-sekretariatet i Miljøstyrelsen
Tolderlundsvej 5, 5000 Odense | Tlf. +45 72 54 40 00

Mail: ecoinnovation@mst.dk

Web: www.ecoinnovation.dk

Denne slutrapport er godkendt af MUDP, men det er alene rapportens forfatter/projektlederen, som er ansvarlige for indholdet. Rapporten må citeres med kildeangivelse.

Indhold

1.	Forord	5
2.	Sammenfatning og konklusion	5
3.	Summary and conclusion	7
4.	Baggrund og formål	9
4.1	Baggrund	9
4.1.1	Problemstilling	9
4.1.2	Almindelig ædelgranlus	9
4.1.3	Klassisk biologisk bekæmpelse som mulig løsning	12
4.1.4	<i>L. hennigrata</i> et naturligt rovdyr på alm. ædelgranlus	13
4.2	Formål	14
5.	Materiale og metoder	15
5.1	Indsamling	15
5.1.1	Georgien	15
5.1.2	Schweiz	16
5.2	DNA analysis	17
5.3	Test af høstfluen <i>L. hennigrata</i> med henblik på biologisk bekæmpelse	17
5.3.1	Livscyklus	17
5.3.2	Opdræt og overvintring	17
5.3.3	Effektivitet	20
5.3.4	Specificitet	21
6.	Resultater	24
6.1	Indsamling	24
6.1.1	Metoder til indsamling af <i>L. hennigrata</i>	24
6.2	<i>L. hennigrata</i> livscyklus og udbredelse	25
6.3	Opdræt og overvintring	27
6.3.1	Opdræt	27
6.4	Effektivitet	29
6.5	Specificitet	30
7.	Konklusioner og perspektiver	31
7.1	Konklusioner	31
7.2	Perspektiver	33
	Referencer	34

1. Forord

Denne rapport er udarbejdet som afslutningsrapport for projektet "Biologisk bekæmpelse af Almindelig ædelgranlus" støttet af Miljøteknologisk Udviklings- og Demonstrationprogram (MUDP) under Miljøstyrelsen. Projektet er gennemført i perioden 1. januar 2018 til 31. december 2020.

Projektet havde til formål at udnytte en af de naturlige fjender af almindelig ædelgranlus til at skaffe dansk og europæisk produktion af juletræer af med dét skadedyr, der er årsag til det største forbrug af insekticider. Dette blev specifikt gjort ved at teste specificitet og effektivitet af rovfluen *Leucopis hennigrata*, med henblik på at forberede det næste trin, der udgøres af udsætning under kontrollerede forhold.

Projektet er gennemført i et samarbejde mellem Institut for Geovidenskab og Naturforvaltning (IGN) som hovedansøger og Centre for Agriculture and Bioscience International (CABI) i Schweiz. Desuden har Dr. Izolda Matchutadze været en uundværlig samarbejdspartner i Georgien. Projektet og dets resultater indgår i PhD-afhandlingen "Forest Entomological challenges in Denmark, research and possible solutions" fra 15. marts 2021

2. Sammenfatning og konklusion

I Danmark produceres omkring 10 millioner ædelgran om året med en estimeret værdi på omkring 1 milliarder kroner. Størstedelen af den danske juletræsproduktion er udplantede nordmannsgran (*Abies nordmanniana*). I forbindelse med introduktionen af nordmannsgran til produktion af juletræer er den almindelige ædelgranlus blevet indslæbt til Central- og Nordeuropa, uden at de naturlige reguleringsorganismer er kommet med. Ædelgranlusen suger på skud og nåle, hvilket medfører nålekrølning, dannelse af sodskimmel, nåletab – i værste fald træets død og i mildere tilfælde nedklassificering og tab. Alm. ædelgranlus er den mest betydningsfulde skadevolder i juletræsproduktionen og er dér årsagen til langt de fleste pesticidbehandlinger.

Mange insekticider er ved at blive fjernet fra markedet, og der er påtrængende behov for alternative løsninger til at bekæmpe den alm. ædelgranlus i juletræsproduktionen. Klassisk biologisk bekæmpelse er en metode, der er ideel til bekæmpelse af 'ikke hjemmehørende' arter, da metoden forsøger at efterintroducere naturlige fjender fra den naturlige udbredelse af den 'ikke hjemmehørende' problematiske art.

Vi har i dette projekt undersøgt muligheden for at anvende *Leucopis hennigrata* (Diptera, Fam: Chamaemyiidae) til klassisk biologisk bekæmpelse af almindelig ædelgranlus i Nordeuropa.

KONKLUSION:

Vores undersøgelser af tætheden af rovdyr på almindelig ædelgranlus (den relative effektivitet) peger i Schweiz entydigt på *L. hennigrata* som det primære rovdyr, mens resultaterne fra Georgien viste en variation mellem lokaliteter, og dermed forskelle i hvorvidt *L. hennigrata* eller andre rovdyr havde den højeste tæthed. Undersøgelserne af *Leucopis*-larvers effektivitet til at fortære æg og voksne af alm. ædelgranlus under feltforhold i Georgien og Schweiz viste, at hver larve i sin levetid kan konsumere omkring 1.500 æg svarende til 15 æg-masser. Hvis

dette holdes op mod observerede tætheder af ædelgranlus og *L. hennigrata* vil denne predator alene kunne nedbringe ædelgranlus tætheden væsentligt og dermed have en betydende reducerende effekt på tætheden af ædelgranlus og således reducere skader og bekæmpelsesbehov på vore breddegrader.

Specificiteten af *L. hennigrata*-larvernes valg af byttedyr viste, at disse under laboratorieforhold kunne acceptere andre arter af byttedyr, når de ikke fik andet valg. Æglægningsforsøg med de voksne fluer viste på samme måde at fluerne, når de ikke fik andet valg, kunne presses til at lægge æg på utilsigtede bladlus arter. Dog var der kun ét tilfælde hvor fluerne lagde flere æg på en utilsigtet art (*Mindarus abietinus*) sammenlignet med vores kontrol (et bur uden fødekilde). Opfølgende undersøgelser af utilsigtede arter under feltforhold såvel i Georgien som i Schweiz viste, at dette sjældent eller aldrig sker uden for laboratoriet, hvilket desuden bakkes op af den eksisterende litteratur på arten (omend den er sparsom). De voksne fluers evne til at finde selv små forekomster af byttedyrene tyder desuden på meget høje grad af specificitet og tilpasning. I Kaukasus ses sjældent betydende forekomster af alm. ædelgranlus.

Ovenstående resultater giver - sammen med en række andre forhold (forekomst under sammenlignelige klimatiske forhold, at arten i Europa er identisk med arten i vestlige Asien, samt en effektiv fourageringsadfærds) - baggrund for at antage, at *L. hennigrata* også i Nordeuropa ville kunne være en effektiv predator, hvis blot den var nået hertil ved egen hjælp. Dette giver derfor anledning til at anbefale næste trin – en udsætning af *L. hennigrata* under kontrollerede forhold (i begrænset omfang og under overvågning – eventuelt burforsøg - på friland) i Danmark.

Opformering af *L. hennigrata* i stor skala under laboratorieforhold med henblik på udsætning har dog stadig nogle uløste udfordringer. Umiddelbart vil indsamling af pupper fra jordbunden under træer med høje tætheder af ædelgranlus i juli måned antagelig kunne skaffe den tilstrækkelige mængde individer til et udsætningsforsøg under kontrollerede forhold.

3. Summary and conclusion

The yearly Danish production of Christmas trees is about 10 million *Abies nordmanniana*, with an estimated value of about 1 billion DKK. When this crop was introduced from Caucasus to Central Europe, the Silver Fir Wolly Adelgid – *Adelges nordmanniana* – was introduced together with it, but without the natural enemies of the adelgid. The adelgids feeding on the needles in the spring causes characteristic bottle-brush shoots. In addition, the adelgid produce honey dew creating sod mould and it can cause stunting of the terminal buds, which in worst case can result in the death of the tree. Milder attacks may cause disqualification and economic loss. This adelgid is responsible for most of the insecticide applications in Christmas tree production in Denmark.

Most insecticides effective against *A. nordmanniana* are gradually being banned, and as a result, there is an urgent need for alternative solutions, that can reduce the pest populations in the Christmas tree production. Classical biological control is an ideal method for management of non-native pest species, because this method introduces natural enemies of the pest, from within the natural distribution of the non-native species.

In this project, we investigated the predatory fly *Leucopis hennigrata* (Diptera, Fam: Chamaemyiidae) as a possible biological control agent against the Silver Fir Wolly Adelgid in Northern Europe.

Investigations of the density of predators in Georgia and Switzerland on *A. nordmanniana* showed varying results. In Switzerland, *L. hennigrata* was clearly the main predator of *A. nordmanniana*, whereas results from Georgia were ambiguous, because of a large variation between localities, and thereby differences in whether or not *L. hennigrata* or other predators, were the most abundant.

Investigations of efficacy of the predatory larvae of *Leucopis hennigrata* were carried out both in Georgia and in Switzerland. It is shown that a single larva can consume about 1.500 eggs or 15 egg masses. When compared to the observed densities of adelgids and the fly larvae, this predator could be expected to have a significant impact on the density of the adelgid - and as a consequence – on the damage and need for treatment in our country.

Specificity in choice of prey was not proven to be absolute in laboratory experiments. The larvae of *L. hennigrata* in no-choice tests consumed both eggs and adults of non-target aphids and adelgids. No choice tests on the adult *Leucopis* flies showed they accepted to oviposit in colonies of several other aphid and adelgid species. However, the number of oviposited eggs was generally low and not significantly different from our control (a cage with no alternative host). Only on one species – *Mindarus abietinus* (which is also a pest in *Abies* production in Denmark), did we see a significant difference from the control. Thorough field investigations of *M. abietinus* and other non-target adelgids, showed that this never (or at least very rarely) happened under natural conditions. Another observation that supports high specificity is the ability for adult *L. hennigrata* flies to detect even quite small and isolated colonies of *A. nordmanniana*.

The above results - together with other considerations (comparable climates between Northern Europe and the natural distribution at altitudes, presence in neighboring countries, wasteful feeding increasing efficacy) - suggests *L. hennigrata* to be a good candidate for biological control. Ready to release under surveyed conditions (cage experiments) in Denmark.

Challenges still remain regarding mass rearing under laboratory conditions before release. Extraction of pupae from the soil under trees with high attack densities of *Ad. nordmanniana* seems the most straightforward method to achieve the predators in numbers sufficient for trial release experiments under surveyed conditions.

4. Baggrund og formål

4.1 Baggrund

4.1.1 Problemstilling

I Danmark produceres omkring 10 millioner ædelgran om året med en estimeret værdi på omkring 1 milliard kr. (Danske Juletræer, 2021). Størstedelen af den danske juletræsproduktion er udplantede nordmannsgran (*Abies nordmanniana*). Nordmannsgran stammer oprindeligt fra Kaukasus, hvor den almindelige ædelgranlus (*Adelges (Dreyfusia) nordmannianae* (Eckstein, 1890)) er naturligt hjemmehørende (Eichhorn, 1967). I forbindelse med introduktionen af nordmannsgran til produktion af juletræer er almindelig ædelgranlus blevet indslæbt til Central- og Nordeuropa uden, at de naturlige reguleringsorganismer er kommet med (Ravn et al. 2012; Havill et al., 2020). Ædelgranlusen suger på skud og nåle, hvilket medfører nålekrølning, dannelse af sodskimmel, nåletab – i værste fald træets død og i mildere tilfælde nedklassificering og tab. Alm. ædelgranlus er den mest betydningsfulde skadevolder i juletræsproduktionen og er årsagen til langt de fleste pesticidbehandlinger (Danske Juletræer, 2021). Siden brugen af pesticider blev udfaset på offentlige arealer eksisterer der ikke længere (Christensen, 1995) en særskilt opgørelse af bekæmpelsesmiddelforbruget i juletræsproduktionen. Men det vurderes, at det stadig drejer sig om cirka to-tredjedele af alle juletræer, der sprøjtes mod alm. ædelgranlus hvert år. Udbudet af insekticider, der står til rådighed i produktionen ændres konstant. Mange midler er fjernet fra markedet, nyere alternativer er kommet til, men der er stadig et øget behov for alternative løsninger.

4.1.2 Almindelig ædelgranlus

Livscyklus

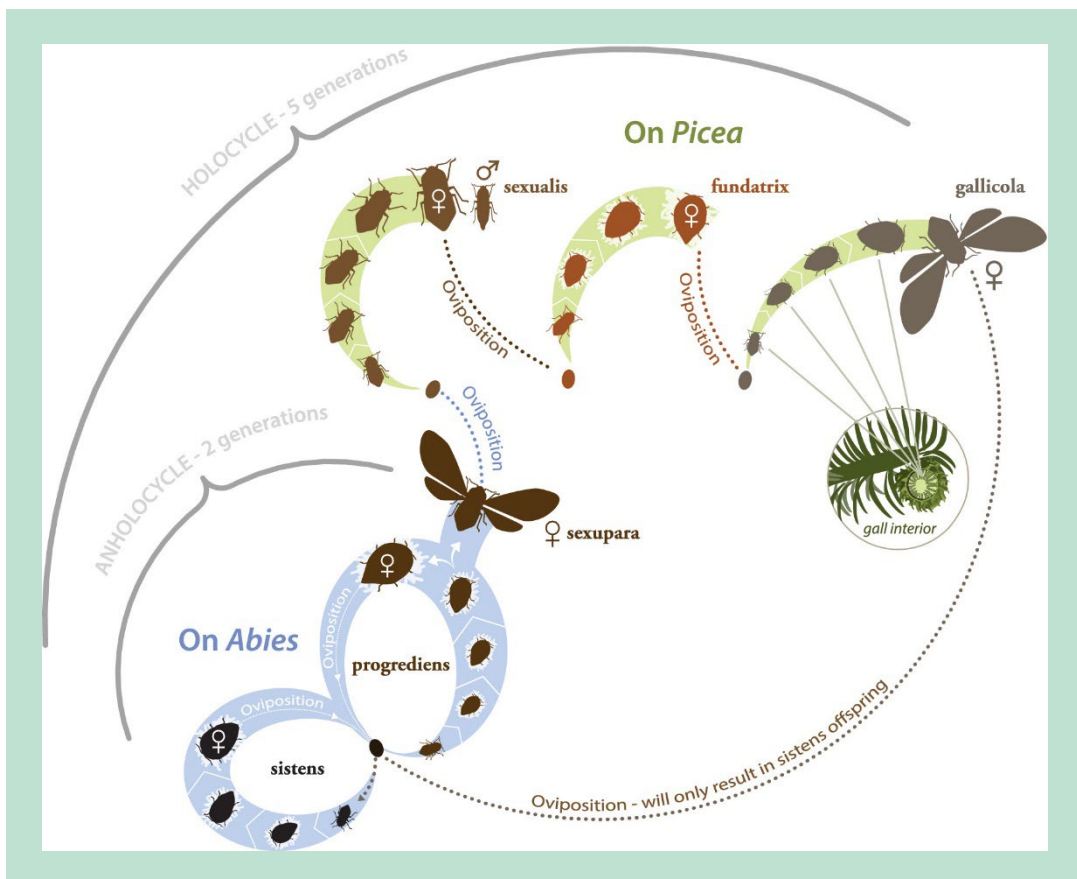
Den almindelige ædelgranlus er naturligt hjemmehørende i Kaukasus og de Pontiske alper (Eichhorn, 1967). Ædelgranlusene (Adelgidae) er som gruppe kendt for at have en meget udviklet livscyklus (For mere information om livscyklus se Varty, 1956; Eichhorn, 1967a; Havill & Footitt, 2007; Havill et al., 2020) og det samme er tilfældet for den alm. ædelgranlus. Den alm. ædelgranlus værtsskifter mellem den primære vært orientalsk gran (Varty, 1956; Eichhorn 1967a), hvor kønnet formering foregår, og den sekundære *Abies* vært, hvor masseopformering foregår (Havill et al., 2020). Er orientalsk gran (eller omorika gran) ikke tilstede, vil den alm. ædelgranlus ikke være i stand til at reproducere sig kønnet (Havill and Footitt, 2007; Havill et al., 2020). Da de primære værtstræer kun er tilstede som prydræer i Europa, antages det at den alm. ædelgranlus primært reproducere sig ukønnet i juletræsproduktionen i Europa. Selve livscyklussen, både den ukønnede del i juletræerne og den kønnede del med træwærtsskifte gennemføres via forskellige morfologiske livsstadier forklaret under.



FIGUR 1. Æglæggende hunner af alm ædelgranlus på skudaksen af en *Abies-nordmannina* kvist. Hele livscyklus ses på fig. 2. Billede taget af Mathias Just Justesen.

Kønnet livscyklus:

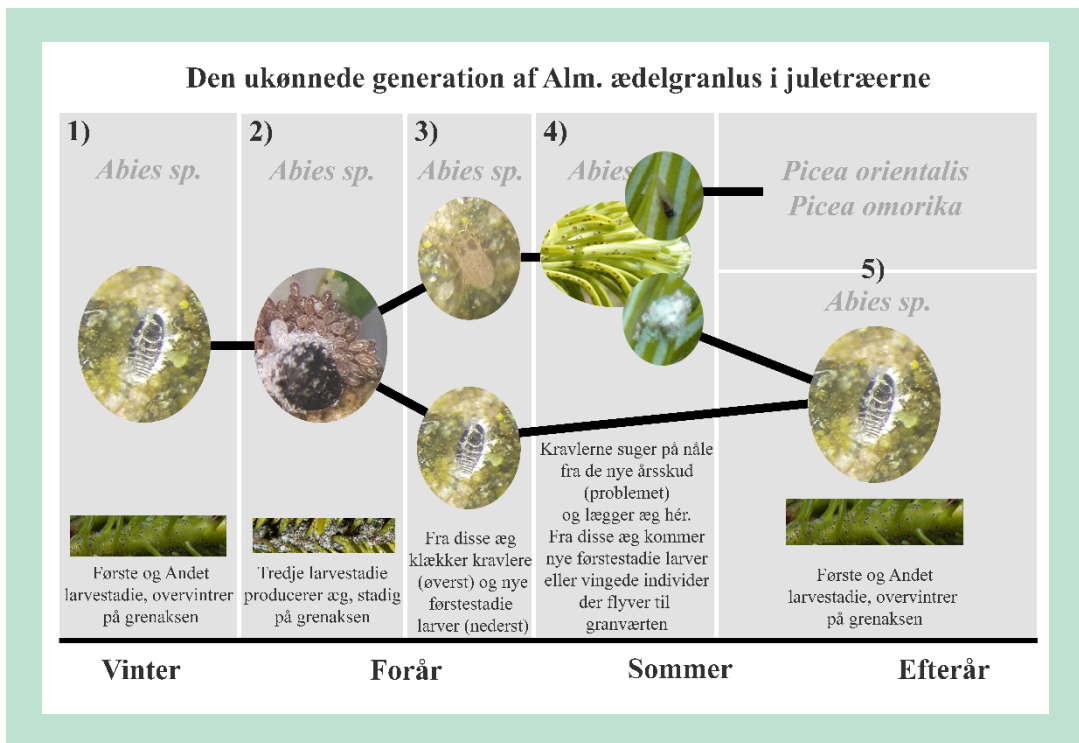
Den kønnede livscyklus er illustreret i fem skridt i figur 2 og forklaret herefter (Information er taget fra Varty, 1956; Eichhorn 1967a, Havill et al., 2020); 1) Sexupara generationen klækker fra æg lagt på *A. nordmanniana* og flyver herefter til et *P. orientalis* og lægger æg, hvorfra både hunner og hanner klækker. 2) Sexualis generationen parrer sig på orientalsk gran og lægger ét æg. 3) Fundatrix generationen kommer ud af det ene æg (stadig på orientalsk gran) og provokerer træet til at danne en galle hvori de lægger æg. 4) Gallicola generationen lever inde i gallen på orientalsk gran og når gallen tørrer ud, flyver denne generation ud og finder et *Abies* træ hvor de lægger æg. 5) fra disse æg klækker første stadie larver (se skridt 1 i figur 2) kaldet sistentes og den ukønnede formering på *Abies* (i juletræerne) starter.



FIGUR 2. Illustration af de 5 generationer involveret i den komplette livscyklus af *A. nordmannianae*. Figuren er taget fra Havill et. Al. 2020.

Ukønnet livscyklus:

Den ukønnede livscyklus i juletræerne er illustreret i fem skridt i figur 3 og forklaret herefter; 1) Den alm. ædelgranlus overvintrer i første og andet larvestadie (Eichhorn, 1967a). Dette stadie ses som små sorte 'skildpaddeagtige' larver med sølvskinnende voksstriber. Disse sidder alle på skudaksen af sidste års skud, og om vinteren er der altså ikke nogen ædelgranlus ude på nålene. 2) Midt i foråret videreudvikles larverne til æglæggende hunner. Æggene er 'timet' til at klække lige før træernes nye skud springer ud. Fra disse æg udvikles to former. 3) Den første form er de samme 'skildpaddeagtige' larver allerede beskrevet, der med det samme sætter sig på grenaksen og overvintrer til næste forår. Den anden form er det, man kalder 'kravlere'. 4) Disse sætter sig på nålene af de nybrudte skud og suger, hvori problemet med krøllede nåle opstår. Hér udvikles de videre til æglæggende, voksklædte hunner. Fra disse æg lagt på nålene klækker igen to livsformer. 5) Den ene er en vinget livsform (omtalt som sexupara generation), der vil forsøge at finde orientalsk gran eller omorikagran. Den anden form er flere af samme 'skildpaddeagtige' larver allerede beskrevet. Kun æggene og førstestadie-larver er frie og kan spredes. Alle andre stadier sidder fast med sugesnabelen langt inde i sivævet på værststræet.



FIGUR 3. Ukønnet formering af alm. Ædelgranlus i Europa. 1) 'Skildpaddeagtige' larver overvintrer på grenaksen i første eller andet larvestadie. 2) I løbet af foråret udvikler larverne sig til æglæggende hunner (tredje larvestadie). 3) To former kan klække fra disse æg. Den ene form er identisk med den overvintrende larve i skridt 1. Den anden er en kravler som sætter sig på de nyudsprungne nåle. 4) Denne kravler suger på nålene. Hér udvikles kravlerne videre til æglæggende, voksklædte hunner. Fra disse æg lagt på nålene klækker igen to livsformer. 5) Den ene er en vinget livsform (omtalt som sexupara generation i faktaboks), der vil forsøge at finde orientalsk eller omorika gran. Den anden form er flere af samme 'skildpaddeagtige' larve beskrevet i skridt 1. Billeder er taget af Mathias Justesen, Hans Peter Rav og Lukas Seehausen.

Taksonomi:

Ved begyndelsen af dette projekt blev det antaget at der fandtes 6 meget tætbeslægtede arter i slægten *Adelges*, i Europa. Disse arter blev ofte refereret til som *Adelges piceae*-komplekset og inkluderede også den alm. ædelgranlus. Der var adskillige overlap mellem de morfologiske nøglekarakterer arterne imellem og primært var det arternes fænologi, der blev brugt til at adskille dem (Havill et al., 2020). Under forløbet har ny forskning (Havill et al., 2020) dog peget på at der faktisk kun er tale om 2 arter, men at disse er i stand til at hybridisere. Som følge af dette studie må det nu antages, at vi i Danmark har arterne ædelgranstammelussen (*Adelges piceae*) og den alm. ædelgranlus, mens arten tidligere kendt som *Adelges merkeri* sandsynligvis er en hybrid mellem ædelgranstammelussen og den alm. ædelgranlus. Antallet af porer på rygpladerne af meso og meta-thorax, samt de tre abdominale led er den morfologiske karakter, der skal bruges til at artsbestemme den alm. ædelgranlus fra ædelgranstammelussen. Dette er dog en tidskrævende proces, da det både kræver kemisk forberedelse af individerne, tilstedeværelsen af første larvestadie og et mikroskop med høj forstørrelse.

4.1.3 Klassisk biologisk bekæmpelse som mulig løsning

Som nævnt er mange insekticider ved at blive fjernet fra markedet, og der er påtrængende behov for alternative løsninger til at bekæmpe alm. ædelgranlus i juletræsproduktionen. Klassisk biologisk bekæmpelse er en metode, der er ideel til bekæmpelse af 'ikke hjemmehørende' arter, da metoden forsøger at efterintroducere naturlige fjender fra den naturlige udbredelse af den 'ikke hjemmehørende' problematiske art.

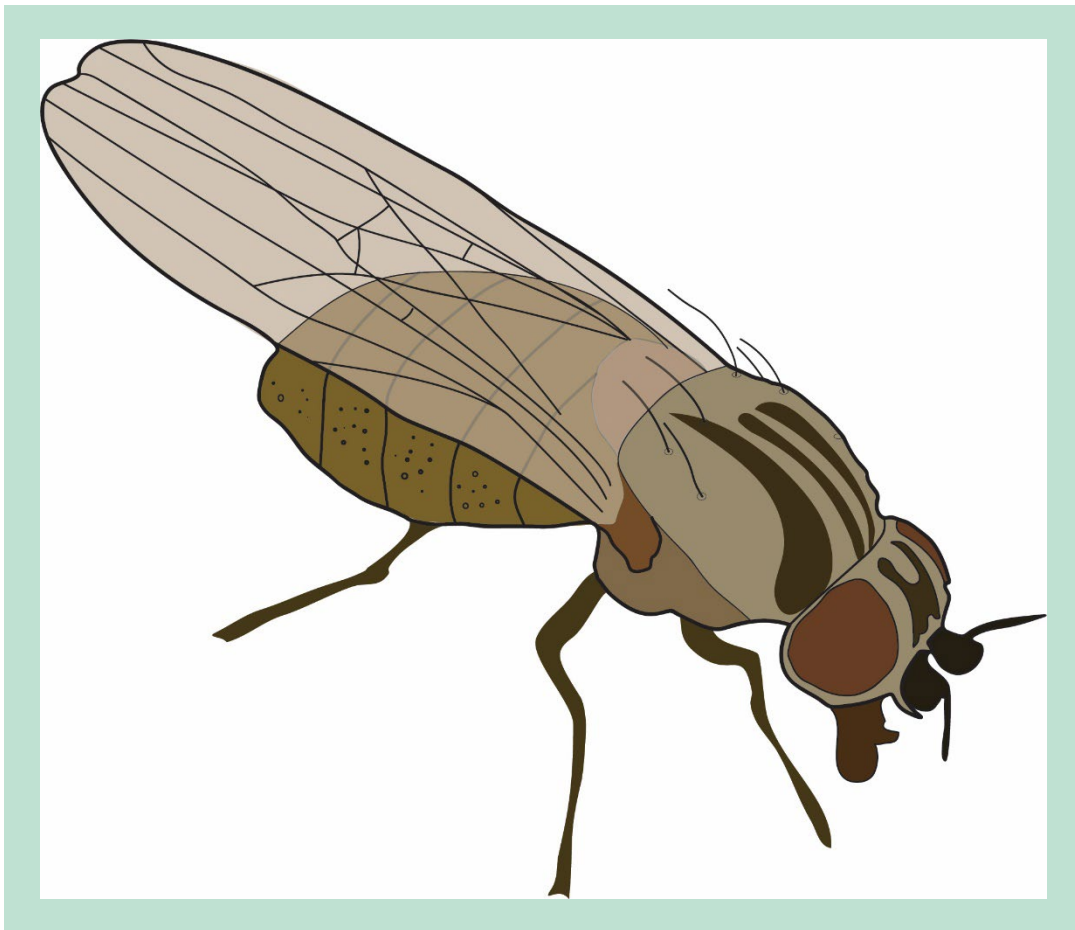
Der har tidligere været enkelte uheldige eksempler hvor de efterintroducere naturlige fjender har angrebet utilsigtede arter, og samtidig utallige eksempler på ineffektive introduktioner af naturlige fjender. For at minimere risikoen for overstående er der gennem tiden udarbejdet vejledninger. Kenis et al. (2017) opsummerer gennem 15 skridt, hvad der skal til, for at sikre så succesfuld en introduktion som muligt. Groft sagt handler de første skridt (1 – 4) om at indsamle alt tilgængelig information om det problematiske dyr (udbredelse, naturlige fjender, livscyklus, tidligere forsøg, etc.), både fra dets naturlige udbredelse og hvor dyret er blevet introduceret til. Desuden er det selvfølgelig vigtigt at der foreligger forskning der gør det muligt at identificere den problematiske art. Skridt 5 handler om, på baggrund af viden indsamlet i de første skridt, at udvælge hvilket land (lokalitet) man vil forsøge at introducere naturlige fjender fra.

Ved starten af dette projekt fandtes der allerede indledende undersøgelser fra 2006/2007 (Ravn et al. 2012), der havde forsøgt at identificere den mest lovende kandidat til biologisk bekæmpelse af alm. ædelgranlus (skridt 1 – 5). Resultaterne af dette studie pegede på en rovlevende flue af familien Chamaemyiidae (høstfluer), *L. hennigrata* McAlpine, 1978. Arten var tilsyneladende den mest betydende naturligt regulerende faktor for almindelig ædelgranlus i Kaukasus og de Pontiske alper, hvor ædelgranlusen ikke optræder i større tætheder. Denne rovlevende flue findes ikke i Danmark (Thomas Pape, pers. medd., www.allearter-databasen.dk). Før man kan få Miljøstyrelsens tilladelse til at efterintroducere arten kræver det imidlertid, at arten testes for sin specificitet – at den alene angriber ædelgranlusene – og sin effektivitet – at den er effektiv til at reducere ædelgranlusenes tæthed. Dette er groft sagt også, hvad de næste skridt (6 – 11) i vejledningen omhandler. Især fremhæves vigtigheden af at teste specificiteten på hjemmehørende ikke tilsigtede arter under karantæneforhold. Udover at teste specificitet og effektivitet af det udvalgte rovdyr, er det ekstremt vigtigt at sikre sig at taksonomien (hvordan man kan genkende den naturlige fjende) og biologien af det rovdyr, man har i sinde at introducere, er ordentligt undersøgt. Dette projekt – og resten af rapporten - har undersøgt netop dette, for den rovlevende flue *L. hennigrata*.

Skridt 12 – 15 handler om at optimere selve introduktionen af rovdyret, i tilfælde af undersøgelserne i tidligere skridt anbefaler dette.

4.1.4 *L. hennigrata* et naturligt rovdyr på alm. ædelgranlus

L. hennigrata er et naturligt rovdyr på alm. ædelgranlus, men er også kendt som rovdyr på den tætbeslægtede ædelgranstammelus (*A. piceae* (Ratzeburg, 1843))(McAlpine, 1978). Enkelte steder i litteraturen er fluen også nævnt som predator på grøn ananasgallelus (*Adelges viridis* (Ratzeburg, 1843)) (McAlpine, 1978). Arten er kendt fra Grækenland, Tyrkiet, Georgien, den russiske del af Kaukasus, og nævnes flere steder i øst og central Europa. Før dette projekt eksisterede der meget lidt information om *L. hennigrata* i litteraturen, og det meste fandtes i nationale rapporter og andet svært tilgængeligt litteratur (især rapporter af Eichhorn, e.g. Eichhorn, 1967; Eichhorn, 1967a, + mange flere). Herfra kunne man læse, at arten er univoltin (en generation om året) og at æggene lægges i april - maj. Larverne lever af både æg og voksne hunner af alm. ædelgranlus og findes fra april - juni. Larverne forpupper sig i jorden i maj - juni. De voksne fluer (illustreret i figur 4 og vist på figur 11) klækker i august til september.



FIGUR 4. Illustration af den voksne *L. hennigrata* høstflue. Lavet af Mathias Just Justesen.

4.2 Formål

Projektet havde til formål at fremme udviklingen af pesticidfri juletræsproduktion vha. biologisk bekæmpelse. Ædelgranlusen er den væsentligste årsag til pesticidanvendelse i produktion af juletræer. Alm. ædelgranlus blev utilsigtet indslæbt fra Kaukasus (Havill et al., 2020) antagelig uden den mest betydende naturlige regulering – en rovflue-art. Dette projekt vil – efter internationale retningslinjer - afprøve specificitet og effektivitet af denne rovflue-art. Dette er et nødvendigt skridt på vejen mod biologisk bekæmpelse af alm. ædelgranlus og dermed pesticidfri og miljøvenlig produktion af juletræer.

5. Materiale og metoder

5.1 Indsamling

Grundet den naturlige udbredelse af alm. ædelgranlus og *L. hennigrata*, har vi udført alt feltarbejdet i Georgien og Schweiz. Dog har COVID-19 situationen umuliggjort vores feltarbejde i Georgien i 2020.

5.1.1 Georgien

Der blev gennemført to feltture til Georgien. Den første tur var i 2018 i perioden 24/5 – 09/06 og den anden tur var i 2019 fra 05/05 - 08/06.

Det første arbejde i Georgien drejede sig om at indsamle så mange individer som muligt af *L. hennigrata*, da disse individer skulle forsøges overvintret og bruges i specificitetsforsøg det efterfølgende år. Primært blev individer indsamlet, ved at besøge fem lokaliteter (se tabel 1) med nordmannsgran (*A. nordmanniana*). Ved hver lokalitet blev mange 1000 træer visuelt inspiceret for tilstedeværelsen af alm. ædelgranlus. Ved højere tætheder af ædelgranlusen, blev grene indsamlet til videre inspektion under stereolup. Alle rovdyr fundet på grenene blev optalt, og alle indsamlede *L. hennigrata* individer blev enten overført til beholdere (se figur 5) med føde til fluerne (grene inficeret med alm. ædelgranlus) eller brugt i effektivitetstest. Senere blev fluerne transporteret i forseglede beholdere til et karantænelaboratorie i Schweiz. Der blev udført indledende effektivitets- og specificitetsforsøg i Georgien i 2019 (beskrevet i afsnit 2.3.3 og 2.3.4).



FIGUR 5. Eksempel på bokse medbragt fra Georgien til karantænelaboratoriet i Schweiz. Foto taget af Mathias Just Justesen.

5.1.2 Schweiz

Der blev løbende fra marts – september udført feltarbejde omkring Delémont i Schweiz (se tabel 1) i 2018, 2019, 2020. På samme måde som i Georgien blev adskillige træer visuelt inspiceret for tilstedeværelsen af ædelgranlus og inficerede grene blev inspiceret under stereolup. Alle rovdyr fundet på grenene blev optalt og alle indsamlede *L. hennigrata* individer blev overført til petriskåle med føde, eller brugt i effektivitetsforsøg.

Vi testede to andre indsamlingsmetoder anbefalet i litteraturen, der potentielt kunne bruges til masseindsamling af *L. hennigrata*. I den første metode, tapede vi 30 cm brede papstrimler rundt om ædelgranlus-angrebne træer. Dette skulle øge tætheden af *L. hennigrata* larver under og imellem pappet og dermed effektivisere indsamlingen. Den anden testede metode udnytter at fluelarverne forpupper sig i jorden lige under angrebne træer. Her indsamlede vi de øverste 5 cm jord samt mos og førne, lige under angrebne træer (se figur 6). Dette materiale blev placeret i udklækningsbure og overvåget. I Schweiz blev der desuden udført indledende effektivitetstest i 2019, samt effektivitets og specificitetsforsøg i 2020 (beskrevet i afsnit 2.3.3 og 2.3.4).



FIGUR 6. Eksempel på angrebet træ nær Delémont i Schweiz, hvor jord, førne og mos blev indsamlet, da denne indeholder mange pupper fra *L. hennigrata*. Foto taget af Mathias Just Justesen.

Country	Localities	Coordinate	Altitude
Georgia	Imereti, Tlugh	42.434477, 43.145071	1200 - 1300
Georgia	Imereti, Tskhrajvari	42.386499, 42.979124	1500 - 1600
Georgia	Guria, Bakhmaro	41.849420, 42.318047	1800 - 2000
Georgia	Adjara, Beshumi	41.627655, 42.540207	1800 - 1900
Georgia	Adjara, Chirukhi	41.4812253, 42.4363557	1600 - 1800
Switzerland	Jura, Delémont	47.372919, 7.327894	550 - 700
Switzerland	Jura, Rangiers	47.382139, 7.238167	800 - 900
Switzerland	Jura, Saint Brais	47.313361, 7.127639	900 - 1000
Switzerland	Jura, Develier	47.360333, 7.262250	500 - 600
Switzerland	Jura, Seehof	47.302528, 7.497611	600 - 700

FIGUR 7. De bedst undersøgte lokaliteter i Georgien og Schweiz

5.2 DNA analysis

Vi har ekstraheret og gennem PCR multipliceret DNA-sekvenser af genet Cytochrome c oxidase subunit I (COI) fra forskellige organismer, der var relevante for projektet.

En del af projektet skulle sikre den samme art af *L. hennigrata* var tilstede i både Schweiz og Georgien. Dette blev bl.a. gjort ved at sammenligne DNA-sekvenser af COI genet. I alt blev 80 individer fra Schweiz, 28 individer fra Georgien, 7 individer fra Tyrkiet og 1 fra England sammenlignet. Desuden blev samme gensekvens fra rovdyr indsamlet i Schweiz, Danmark og Georgien sekventeret. Arter af næbmunde brugt i vores specificitetstests blev også identificeret på baggrund af deres gensekvenser for at sikre vores egne identifikationer var korrekte.

5.3 Test af høstfluen *L. hennigrata* med henblik på biologisk bekæmpelse

5.3.1 Livscyklus

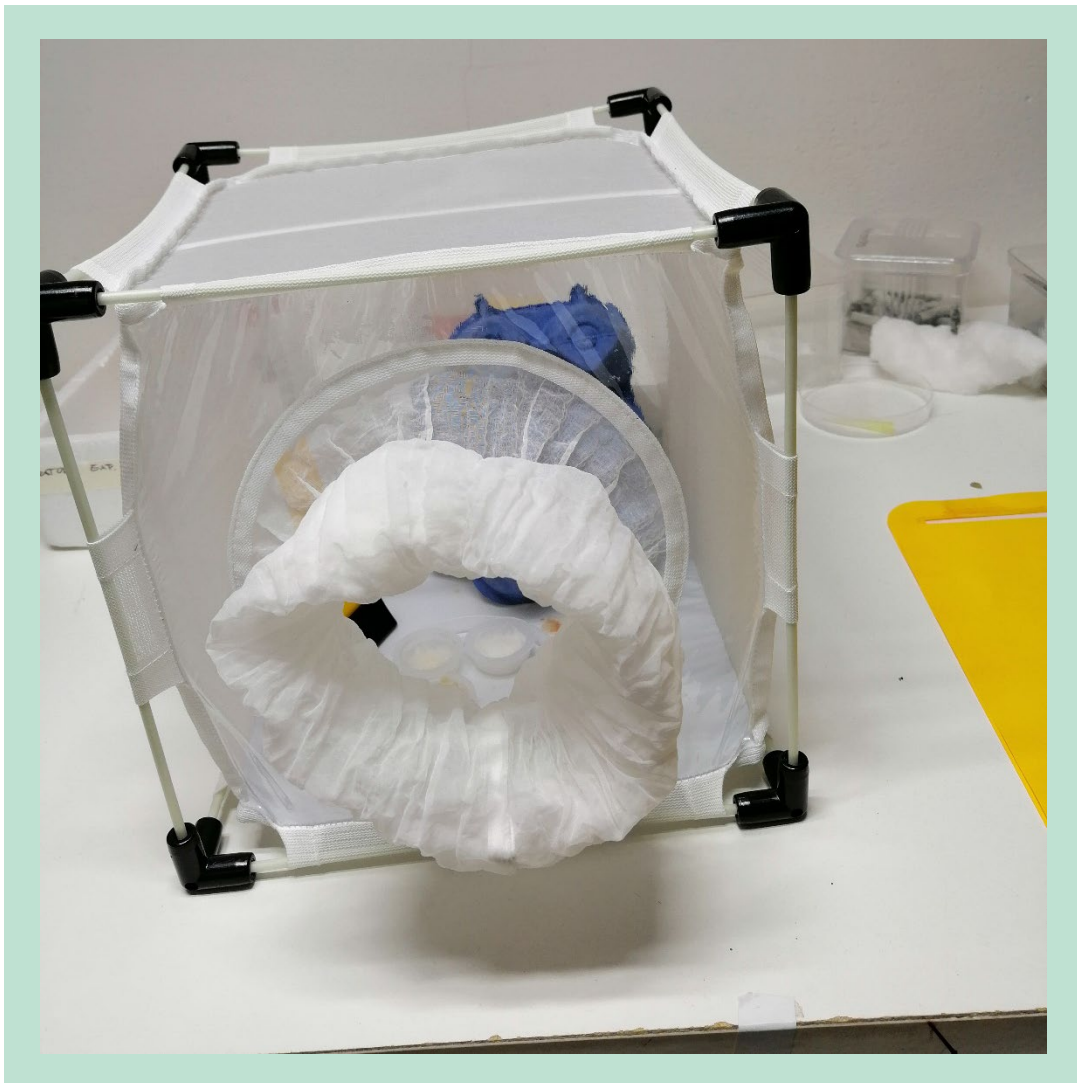
Udarbejdelsen af *L. hennigrata*'s livscyklus er baseret på alle vores observationer gennem projektet, kombineret med den information vi har fået via de forskellige metoder der er blevet brugt i vores arbejde med at indsamle, opdrætte, overvintre og teste (specificitet og effektivitet) *L. hennigrata* til biologisk bekæmpelse af alm. ædelgranlus. Desuden har Dr. Stephen Gaimari, førende høstflueekspert fra Plant Pest Diagnostics Centre California Department of Food and Agriculture, hjulpet med sin erfaring og viden om høstfluer.

5.3.2 Opdræt og overvintring

Igennem projektet har vi forsøgt at opdrætte forskellige livsstadier af fluen (larver, pupper, voksne), samt forsøgt at overvintre de voksne fluer.

Voksne i foråret:

Voksne individer indsamlet i foråret blev opbevaret i 24×24×24 cm klækkébure (figur 7), hvor vand, honningvand og honning/gær ekstrakt blev tilbudt som fødekilde i små plasticbeholdere med vat. Honning/gær ekstrakt blev også tilbudt på gult papir, hvor massen blev smurt i et tyndt lag (ca. 1mm) langs papiret, der blev hængt fra loftet. En æggebakke blev placeret for at tilbyde skjul til fluerne. Klækkéburene blev opbevaret udendørs, så de fulgte det omgivende naturlige klima.



FIGUR 8. Bur til opbevaring af voksne *Leuconis* fluer.

Æg:

Æg blev lagt af voksne individer indsamlet i foråret, på forskellige arter af lus. Grene med de forskellige lusearter blev opbevaret i de samme klækkebure, der også blev opbevaret uden-dørs så de fulgte det omgivende klima. Desuden blev adskillige æg indsamlet i Georgien og opbevaret i klækkekasserne (se figur 8) sammen med indsamlede *L. hennigrata* larver.

Larver:

Adskillige larver af forskellig størrelse, er gennem projektet indsamlet og forsøgt udviklet til puppestadiet. Dette blev typisk gjort ved at opbevare larver i plastikbeholdere sammen med grene, hvor der var høj tæthed af ædelgranlus. I forbindelse med specificitetsforsøg blev ny-klækkede larver også udviklet til pupper på andre lus.

Pupper:

De larver, der blev indsamlet i Georgien, blev opbevaret i førnævnte plasticbeholdere, hvori de forpuppede sig. I starten af juli blev plasticbeholderne åbnet og pupper blev overført til tomme plasticcylinderrør, med skum i toppen. Her blev de opbevaret i et karantæne laboratorie ved 23°C og en lys / mørke periode på henholdsvis 16 / 8 timer. Vi opbevarede også enkelte pupper fra effektivitetsforsøg i Georgien, i petriskåle fra midt maj til deres klækning i august/sep-tember under samme forhold.

I Schweiz forsøgte vi også at opbevare pupper i petriskåle med kraftigt væddet filterpapir, for at holde en høj luftfugtighed.

Voksne i efteråret:

Alle voksne fluer klækket fra pupper i løbet af august/september blev placeret i klækkebure (figur 7) hvor vand, honningvand og honning/gær ekstrakt blev tilbudt som fødekilde i små plastikbeholdere med vat. Honning/gær ekstrakt blev også tilbudt på gult papir, hvor massen blev smurt i et tyndt lag (ca. 1mm) langs papiret, der blev hængt fra loftet. En æggebakke blev placeret for at tilbyde skjul til fluerne. Klækkeburene blev opbevaret under tre forskellige forhold. Et blev placeret udendørs i et skur, så de fulgte det omgivende naturlige klima, et blev placeret i et laboratorie ved stuetemperatur med naturligt sollys, og et var placeret i et karantæne laboratorie ved 23°C og en lys / mørke periode på henholdsvis 16 / 8 time

Overvintring:

Fluerne der klækkede i efteråret 2019 blev indtil oktober opbevaret i de ovenfor beskrevne klækkebure, under de førnævnte tre forskellige forhold. Herefter forsøgte vi at overvintré 269 individer til næste forår, så de voksne fluer kunne bruges i specificitetsforsøg. Fluer fra alle tre typer forhold blev opdelt i 2 typer beholdere på 1.3L med udluftning i toppen (figur 8). I begge typer beholdere blev der installeret små plastikskåle med vat hvor honningvand blev tilbudt. Den ene beholderstype havde forskellige naturlige materialer som mos, lav og grene, mens den anden var sammensat af forskellige kunstige materialer som pap og vat. Fluerne opbevaret indendørs med naturligt sollys og de fluer opbevaret i karantænelaboratoriet blev forsøgt overvintret i et insektskab (figur 8). Fra 9 oktober og frem begyndte vi gradvist at nedkøle fluerne. Første uge blev de nedkøbet til 15°C, den følgende uge til 10°C og herefter blev de opbevaret ved 3-5°C med en mørke/lys periode på 12 / 12 timer, indtil midten af marts. Fluerne opbevaret udendørs, fulgte det omgivende naturlige klima over hele vinteren. Beholderne blev tjekket ugentligt for aktivitet over hele vinteren.



FIGUR 9. Foto af de to typer (gange to) materialer brugt til overvintring. Her ses beholderne placeret i insektskabet, med individer fra karantænelaboratoriet (de to beholdere til højre) og fra laboratoriet med stuetemperatur og naturligt sollys (de to beholdere til venstre). Taget af Lukas Seehausen.

5.3.3 Effektivitet

To aspekter er vigtige for at vurdere hvor effektivt et rovdyr *L. hennigrata* er på den alm. ædelgranlus i naturen.

Abundans i naturen

Det første aspekt drejer sig om at belyse tætheden af *L. hennigrata*, sammenlignet med andre naturlige rovdyr på ædelgranlusen. Dette blev konkret undersøgt gennem en standardiseret indsamling af rovdyr fra alm. ædelgranlus.

I Schweiz nær Delémont i 2020 indsamlede vi 180 kviste (forrige års, årsskud) fra *Abies alba*. Dette blev gjort på 3 lokaliteter 4 gange med ca. to ugers mellemrum. Ved hver lokalitet indsamlede vi 3 kviste fra fem træer, hvor der blev observeret en høj tæthed af ædelgranlus. Alle rovdyr indsamlet på kvistene blev forsøgt identificeret til art ved brug af tilgængelig litteratur. Enkelte arter blev dog kun identificeret på baggrund af deres udseende (morphospecies). Naturligvis blev *L. hennigrata* identificeret ved hjælp af en nøgle og enkelte individer blev sendt til Stephen Gaimari (den førende høstflue ekspert), samt DNA sekventeret, for at sikre korrekt identifikation. Ud over optælling af rovdyrene på kvistene, blev alle ægmasser af ædelgranlus optalt og længden af kvisten (inklusive sidegrene) blev målt. Vi sammenlignede også den absolute abundans mellem *L. hennigrata* og ædelgranlus, altså antallet af *L. hennigrata* sammenlignet med antallet af ædelgranlus.

I Racha regionen i Georgien mellem 9-14 Maj 2019, blev 72 kviste på samme måde undersøgt og analyseret for den relative og den absolute abundans. Derudover blev adskillige kviste undersøgt i Georgien i løbet af 2019, uden at måle længden på kvisten eller optælle antallet af ægmasser. Dette muliggjorde at flere prøver kunne gennemgås, da hovedformålet i Georgien i 2019 var at indsamle så mange individer som muligt. Alle kviste med den højeste tæthed af alm. ædelgranlus blev gennemgået og antallet af rovdyr blev noteret. Denne protokol blev gennemført på 11 lokaliteter fordelt mellem Bakhmaro, Beshumi og Tlughu.

Effektivitet af den enkelte larve

Det andet undersøgte aspekt, handler om at vurdere hvor stor en effekt den enkelte larve har, altså hvor mange æg spiser *L. hennigrata* larverne. Dette blev testet ved at isolere *L. hennigrata* larver i arenaer med et kendt antal æg fra ædelgranlussen. Efter 24 timer blev det opgjort hvor mange æg hver enkelt larve havde spist. På grund af forskelle i tilgængeligt udstyr, blev dette gjort med mindre forskelle mellem Georgien og Schweiz.

I Schweiz i 2019 blev 20 *L. hennigrata* larver indsamlet omkring midt-maj nær Delémont. Disse larver blev målt til nærmeste 0.5mm under et sterolup og herefter placeret enkeltvis i petriskåle med 5cm i diameter og lidt fugtigt filterpapir i bunden. I hver petriskål blev larven placeret ved siden af en ægmasse med gennemsnitligt 200 æg fra ædelgranlussen, indsamlet fra *Abies alba*. Efter 24 timer blev indholdet af petriskålen grundigt gennemgået for antallet af intakte æg, skadede æg, og antallet af kravlere. Derved kunne antallet af præderede æg udregnes ved at trække antallet af kravlere fra antallet af skadede og tomme æg. Præcis det samme eksperiment blev gentaget i Schweiz året efter (2020), men denne gang tilførte vi flere æg til arenaen (gennemsnitligt 300 per petriskål).



FIGUR 10. Eksempel på arenaer fra Georgien, hvor én *L. hennigrata* fluelarve er blevet isoleret med ægmasser fra den alm. ædelgranlus. Taget af Mathias Just Justesen.

I Georgien i 2019, udførte vi samme type eksperiment på 20 *L. hennigrata* larver indsamlet fra *Abies nordmanniana* nær Tlugh, mellem 15 – 17 maj. Larverne blev her placeret i 2.5cm papir arenaer (figur 9) inde i petriskåle med en diameter på 10 cm. På samme måde blev larven placeret ved siden af en ægmasse, dog kun med et gennemsnit på omkring 125 æg. Efter 24 timer blev larven fjernet. Optællingen af præderede æg var lidt anderledes, da vi her vurderede dette ved at tælle æg formet som en skål (udsuget) som præderede, mens æg med længdegående folder som naturligt klækkede æg.

5.3.4 Specificitet

Ligesom vores test af *L. hennigrata*'s effektivitet, er to aspekter vigtige for at vurdere hvor specifikt et rovdyr *L. hennigrata* er på alm. ædelgranlus. Altså om *L. hennigrata* udelukkende spiser alm. ædelgranlus eller om andre slags bladlus også præderes. Dette blev vurderet både på individer i fangeskab og gennem opgørelser fra felten.

Specificitet i laboratoriet

Kun udført på Schweiziske individer. Voksne fluer blev i 2020 indsamlet ved at scanne træer inficeret med ædelgranlus i løbet af April/Maj i Delémont, Schweiz. Når en flue blev observeret, blev den indsamlet i en plasticbeholder og et lige antal fluer blev overført til tre forskellige klækkebure. Formålet med disse voksne flue individer, var at teste deres specificitet, gennem en række "no-choice" tests.

Inden vi påbegyndte "no-choice" tests på andre utilsigtede arter, ville vi sikre os det var muligt at få *L. hennigrata* til at lægge æg i fangeskab. Dette blev gjort ved at indsætte to *Abies alba* grene med mere end 100 ægmasser fra ædelgranlussen, ind i de tre klækkebure med 15 – 30 individer af de indsamlede *L. hennigrata*. Inden grenene blev placeret i klækkeburene blev de inspiceret under et stereolup og alle æg og rovdyr blev fjernet. Efter tre dage blev grenene geninspiceret. Her fandt vi at de 15 – 30 individer i hver af de 3 bure, havde lagt mere end 20 æg per gren, og vi fortsatte herefter med "no-choice" test på andre utilsigtede arter.

De utilsigtede arter blev indsamlet fra lokaliteter rundt omkring Delémont, Schweiz. De utilsigtede arter vi testede, blev indsamlet fra *Pinus sylvestris*, *Larix decidua*, *Picea abies* og *Abies alba*. Disse arter blev udvalgt fordi deres kolonier og ægmasser var almindeligt forekomne i

større tætheder, tæt på ædelgranlus ægmasser hvor *L. hennigrata* samme år, også var blevet observeret. Vi indsamlede 4 utilsigtede næbmunde på denne måde: *Adelges viridis* (Ratzeburg), *Adelges laricis* Vallot, *Pineus pini* (Macquart) og *Mindarus abietinus* Koch. Desuden testede vi under karantæneforhold de voksne fluers villighed til at lægge æg på *Pseudococcus comstocki* (Kuwana), da disse allerede blev opdrættet i CABI's laboratorier.

Helt specifikt indsamlede vi angrebne grene med de utilsigtede arter og inspicerede dem under et stereolup, for at fjerne alle æg og rovdyr der potentielt var tilstede. Her tog vi også en lille prøve til DNA-analyser (se afsnit 5.2). De angrebne grene blev opdelt i 3 lige store bundter i en beholder med vand, så de kunne holde sig friske. Herefter blev de indsat i de tre klækkebure med voksne *L. hennigrata* i tre dage og antallet af lagte æg blev opgjort. Denne proces blev gentaget for alle 5 utilsigtede arter. I alle tilfælde på nær ét, blev dette gjort i et udendørs træskur, der fulgte de omgivende temperaturer og med et vindue til naturligt sollys. Samme procedure blev gennemført da fluerne blev udsat for ægmasser af *Pseudococcus comstocki*, men dette forgik i CABI's karantænelaboratorie, da dette er en invasiv art i Schweiz. Til sidst testede vi også om fluerne ville lægge æg, i tilfælde af der ikke var nogen fødekilder tilstede i klækkeburet. Disse forsøg blev udført mellem 17 april og 7 maj.

- *Adelges viridis* blev indsamlet fra *Larix decidua*, hvor to grene per bur med omkring 14 angrebne nåle blev testet mellem 17-20 april.
- *Adelges laricis* blev indsamlet fra *Picea abies*, hvor omkring galler per bur med larver og ægmasser blev testet mellem 20-23 april.
- To *Pseudococcus comstocki* ægmasser placeret på et stykke *Malus domestica* bark per bur, blev testet mellem 23-26 april.
- *Pineus pini* blev indsamlet fra *Pinus sylvestris*, hvor 7 grene per bur med mellem 1 og 7 ægmasser blev testet mellem 27-30 april.
- *Mindarus abietinus* blev indsamlet fra *Abies alba*, hvor 4-5 slemt angrebne grene per bur blev testet mellem 1-4 maj.
- Ingen utilsigtede arter, to tomme *Abies alba* grene uden nogen fødekilde blev testet mellem 4-7 maj.

Alle grene i forsøget blev efter 3 dage geninspiceret og antallet af *L. hennigrata* æg blev opgjort. Disse grene med utilsigtede arter hvor fluerne havde lagt æg, blev herefter placeret i beholdere med vand og forseglet med parafin. Disse blev opbevaret i større plastikbeholdere for at se hvordan larverne der klækkede fra æggene, ville klare sig på de utilsigtede arter.

Specificitet i naturen

For at undersøge tilstedeværelsen af *L. hennigrata* på andre arter end alm. ædelgranlus, gennemførte vi indsamlinger af potentielle alternative værter i både Schweiz og Georgien. I Schweiz blev dette gjort i større omfang, mens det i Georgien blev gjort mere sporadisk.

I Schweiz omkring Delémont, undersøgte vi 10 lokaliteter med *Larix decidua*, én lokalitet med *Abies alba*, og 27 lokaliteter med *Picea abies*. Alle lokaliteter lå placeret indenfor 6km af tidligere undersøgte lokaliteter hvor *L. hennigrata* med sikkerhed var tilstede, tidligere det samme år. Indsamling fandt sted i tidsrummet 24. april til 12. maj 2020.

- 36 grene blev indsamlet fra *L. decidua* angrebet af *A. viridis*.
- 99 grene blev indsamlet fra *A. alba* angrebet af *M. abietinus*.

- 291 grene blev indsamlet fra *P. abies* angrebet af *A. laricis*. (DNA analyser på enkelte individer fra nogle af disse grene, fandt at det var en blanding af *A. viridis* og *A. laricis*).

Grenene blev anbragt i plastikposer og medbragt til laboratoriet hvor de blev minutløst gennemgået for æg og larver af *L. hennigrata*.

Lignende indsamling og gennemgang af utilsigtede arter blev gennemført i Georgien mellem maj og juni i 2019. Igen blev alle undersøgte arter indsamlet tæt på lokaliteter hvor *L. hennigrata* med sikkerhed fandtes.

Baseret på vores DNA-analyser blev de følgende arter undersøgt.

- *Pineus orientalis* (Dreyfus) (Hemiptera: Adelgidae) blev indsamlet fra fire barkstykker på omkring 5x5cm fra to *Picea orientalis* træer i Bakhmaro, hvoraf begge havde en lav tæthed.
- Ti planter med en ukendt bladlus med høj tæthed fra *Rumex* sp. blev indsamlet i Bakhmaro og inspiceret.
- Fem grene med *Mindarus* sp. blev indsamlet fra hver af to store *Abies nordmanniana* træer i henholdsvis Bakhmaro og Beshumi.
- Tre grene med en middel tæthed af *Pineus* sp. (*pini* or *orientalis*) blev indsamlet fra hvert af to unge *Pinus sylvestris* i Tlugh. Derudover blev omkring 15 minutter brugt ved begge træer, hvor alle angrebne grene blev gennemgået med en lup med 10x forstørrelse for tilstedeværelsen af *L. hennigrata*.
- To grene angrebet af en ukendt Diaspididae (muligvis en ny art for videnskaben), blev indsamlet fra to *Abies nordmanniana* træer i Tlugh. Fordi denne hårde skjoldlus var meget talrig, blev der brugt 30 minutter på lokaliteten, hvor adskillige træer blev gennemgået for *L. hennigrata* med en lup med 10x forstørrelse.

6. Resultater

6.1 Indsamling

I 2018 besøgte vi Georgien mellem d. 24/5 – 09/06. På trods af intensivt feltarbejde lykkedes det kun at indsamle 23 individer af *L. hennigrata*, der blev medbragt til Schweiz og forsøgt videreudviklet og overvintret (se afsnit 6.3.2). Grunden til dette var formentlig et ekseptionelt tidligt forår i Georgien. Dette blev også bekræftet af vores observationer. I Tlugh (1200 – 1400m) fandt vi ingen larver, men over 70 gamle ægkapsler af *L. hennigrata*. Derudover blev der kun sjældent observeret æg af den alm. ædelgranlus, da disse allerede var klækket. I Chirukhi, Georgia (1750 m, 41.4812253, 42.4363557) (1650 – 1800m) indsamlede vi én enkelt larve og observerede igen adskillige tomme ægkapsler fra *L. hennigrata*. På samme måde var de fleste ægmasser af ædelgranlusen allerede klækket.

I Bakhmaro (1800 – 2000m) lykkedes det at indsamle alle 23 individer medbragt fra Georgien i 2018. I Bakhmaro fik vi ikke indtrykket af at være for sent, da mange af ædelgranlusene stadig havde ægmasser. I 2019 blev der heller ikke fundet høje tætheder på denne lokalitet, på trods af andre lokaliteter havde høje tætheder. Derfor må det antages at denne lokalitet generelt ikke var god for *L. hennigrata*, muligvis på grund af de meget kolde vintre og den korte sommersæson (grundet højden over havet).

Den anden tur til Georgien i 2019 blev grundet det tidlige forår i 2018 planlagt med tidligere afgang. Vi tog af sted mellem 05/05 - 08/06 for at sikre der stadig var aktivitet af *L. hennigrata* larver. Foråret var dog "normalt" dette år, og det var derfor kun muligt at finde larver på lokaliteterne med lavere højde (1200 – 1400 m) indtil senere. Desuden genbesøgte vi nogle af de samme lokaliteter i 2019 og sammenligninger fra de samme datoer, bekræftede minimum to ugers forskel i hvilke udviklingsstadier af ædelgranlus og *L. hennigrata* der blev indsamlet. Denne felttur resulterede i indsamling af 391 pupper af *L. hennigrata*, sammenlignet med 20 pupper i 2018.

Vi havde håbet på endnu et besøg til Georgien i 2020, hvor opfølgende specificitet- og flere effektivitetstests ville være ideelt. Desværre umuliggjorde COVID-19 situationen dette feltarbejde.

Observationer fra samme lokaliteter (og træer) i 2018 og 2019 nær Delémont i Schweiz, afslørede, at der var markant flere ædelgranlus og *L. hennigrata* i 2019, sammenlignet med 2018. Dette blev dog desværre ikke indsamlet på en standardiseret og sammenlignelig måde.

6.1.1 Metoder til indsamling af *L. hennigrata*

Vi har i løbet af dette projekt forsøgt at indsamle forskellige livsstadier af *L. hennigrata* med flere metoder. Vores erfaringer kan bruges til at give visse anbefalinger til eventuelt fremtidig udsætning af *L. hennigrata*, hvor succesen kan afhænge af at kunne udsætte mange individer. Ideelt set vil man i laboratoriet masseopformere rovdyret af interesse (*L. hennigrata*) men som beskrevet i afsnit 6.3, er dette endnu ikke en forhåndenværende metode for *L. hennigrata* på trods af en ihærdig indsats.

Vi har indsamlet voksne fluer fra stammer inficeret med ædelgranlus. Denne teknik er effektiv til at indsamle æglæggende hunner hvilket kan være fordelagtigt til tests af deres æglægningsadfærd eller i tilfælde af, at man skal bruge ikke-parasiterede stadier af fluen. Vi indsamlede flest individer om eftermiddagen, på dage med meget sol og lidt vind. Denne metode er dog per individ tidskrævende, og vil ikke være tilstrækkelig til masseudsætning.

Vi har indsamlet larver fra stammer og grene med ædelgranlus. Dette var effektivt både på stammer og grene med høje tætheder af ædelgranlusen - især på stammeangreb. Dog er denne metode meget tidskrævende per individ, da nyklækkede larver kan være svære at se med lav forstørrelse, idet de gemmer sig under og imellem æg-masserne af ædelgranlusene. Derfor er det nødvendigt at medtage materialet og inspicere det under stereolup. Som alternativ blev det forsøgt at opsætte papstrimler omkring angrebne træer. I Schweiz lykkedes det at fange 24 *L. hennigrata* larver, to svirrefluelarver og én *Scymnus* billelarve ved at efterlade en papstrimmel (30 cm i bredden) rundt om et angrebet træ i 2 regnfulde dage. Baseret på dette (og tidligere undersøgelser af Otto Eichhorn) kunne det tyde på at denne teknik kunne være effektiv til masseindsamling af *L. hennigrata* larver. Specifikt kunne dette gøres ved at efterlade papstrimler ved basis af stammer på angrebne træer i løbet af maj og juni, hvor *L. hennigrata* forpupper sig i jorden og i sprækker og mos lige over jorden. Denne teknik virker dog kun på stammeangreb, da vores forsøg på at øge tætheden på angrebne kviste med pap ikke havde nogen effekt.

Vi har klækket pupper indsamlet fra jord under angrebne træer. Dette var en meget effektiv måde at indsamle og klække mange voksne *L. hennigrata* flueindivider på i efteråret. Vi klækkede 273 voksne individer i 2019, fra jord indsamlet på et par timer. Det optimale tidspunkt at indsamle jord er i løbet af juli. Her vil alle fluer have forpuppet sig, men ingen vil endnu have klækket. Desuden tillader denne metode at klække voksne fluer i klækkedure, hvilket betyder de voksne *L. hennigrata* individer kan udtages enkeltvis til masseudsætning og derved kan man undgå at udsætte eventuelle parasitoider.

Grundet det høje antal fanget på kort tid og muligheden for at undgå udsætning af parastitoider, anbefaler vi i første omgang denne metode til udsætningsforsøg af *L. hennigrata* i efteråret, på udvalgte lokaliteter.

En anden metode beskrevet af Otto Eichhorn blev ikke testet, men den kunne have perspektiver. Ved at efterlade tragtfælder i løbet af april, maj og juni på 200 stammeangrebne træer, lykkedes det Eichhorn at indsamle 5600 *L. hennigrata* individer. I tilfælde af vores anbefalede metoder ikke findes tilfredsstillende kunne denne metode testes.

6.2 *L. hennigrata* livscyklus og udbredelse

Vores DNA-analyser bekræftede tilstedeværelsen af *L. hennigrata* i Tyrkiet, Georgien, England og Schweiz, hvorfor udbredelsen, der kan antages ud fra litteraturen i afsnit 4.1.4, virker sandsynlig. Sammenligning af DNA-sekvenserne fra Georgien/Tyrkiet og Schweiz/England viste dog en klar opdeling af disse to populationer. Forskellen mellem de to populationer (1.57%) vil ikke normalt tolkes som forskellige arter (3%), men resultaterne indikerer dog en form for isolation og en interspecifik divergens mellem populationerne.

Stephen Gaimari's undersøgelser af individer fra begge populationer fandt ingen morfologiske forskelle mellem den nordlige og sydlige population.

Generelt er *L. hennigrata* et univoltint rovdyr, der er godt synkroniseret med alm. ædelgranlus. Vores studier (afsnit 6.4) og egne observationer viser at *L. hennigrata* primært angriber alm. ædelgranlus, når de har en relativt høj tæthed, eller omvendt ikke findes i meget lave tætheder af alm. ædelgranlus.

Hvert livsstadie af *L. hennigrata* er beskrevet mere detaljeret herunder:

Parring

Det har længe været et mysterie om *L. hennigrata* parrer sig i efteråret eller foråret. Men vores resultater har vist at dette med alt sandsynlighed foregår i foråret. Dette er dels på grund af det ikke lykkedes for os (og tidligere forskere) at observere parring i løbet af efteråret, men også fordi parring blev observeret d. 20 marts 2020 kl 17:00, mellem to af de fire individer det lykkedes os at overvintre. Dette passer også med vi i de efterfølgende uger kunne indsamle æglæggende hunner i felten.

Æglægning

De voksne fluer lægger æg ved ædelgranlusene i det tidlige forår, som regel omkring begyndelsen af april. Præcist hvor langt tid efter parring hunnerne vil begynde at lægge æg, hvor mange æg de lægger, og hvor langt tid de vil fortsætte med at lægge æg, er endnu uvist. Hunnerne foretrækker at lægge æggene, så vidt muligt skjult under ægmasserne af ædelgranlusene, men æg, som ligger helt frit for enden af kviste med høje tætheder, er også observeret. Ægget er mælkehvidt med længdegående riller. Vi estimerede udviklingen fra æg til larve, til at vare omkring en uge.

Larvens udvikling

Ligesom andre høstfluer har *L. hennigrata* tre larvestadier. De første larver ses som regel fra midten af april til midten af maj, men afhængig af klimaet kan der ses larver helt fra start april til start juni. Første larvestadie, der klækker fra æggene er mindre end 1mm store. De er hvidgrå med en synlig sort plet dorsalt. De små larver (og efterfølgende larvestadier) er blinde og de bruger derfor deres hoved som et føle-organ. Når de har fundet en ægmasse gemmer de sig imellem æggene og især nyklækkede små larver kan være meget svære at opdage, uden at flytte på æggene. Det første larvestadie mangler de karakteristiske spirakler, der ses i de senere larvestadier (figur 10). Larverne forpupper sig når de har en størrelse på omkring 3.5mm. Dette sker som regel 20 – 25 dage efter de er klækket.



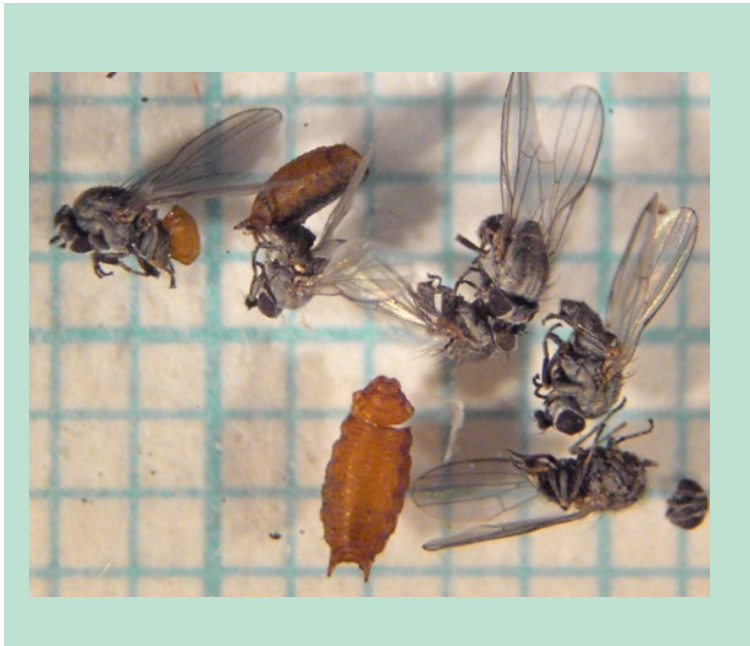
FIGUR 11. *L. hennigrata* larve, med de tydelige spirakler på bagkroppen. Taget af Hans Peter Ravn

Pupperne

De fleste larver begynder at forpuppe sig omkring midten til slutningen af maj indtil senest slut juli. Afhængig af temperaturen kan forpupning dog finde sted allerede i starten af maj. Larverne forpupper sig i de øverste jordlag under angrebne træer. De blev dog også observeret i sprækker og under mos, ved foden af angrebne træer. Pupperne er kobberrøde og har to karakteristiske forlængede spirakler på bagkroppen (figur 11). Puppen er omkring 2.5mm lang.

Voksne fluer i efteråret

Afhængig af temperaturen klækker de voksne fluer i løbet af august, september eller oktober. Tidligere undersøgelser peger på lysmængde betyder mere for klækketidspunktet sammenlignet med temperaturen. Fluerne kan kendes fra andre lignende fluer, på de har et brunstribet mesoscutum, et helt brunt scutellum, og at den tredje abdominal tergite er sort (figur 11). Hvad fluerne foretager sig i løbet af eftersommeren er uvist. Vi observerede, at vores fluer i fangeskab indtog føde i denne periode. Det har tidligere været foreslået, at ikke alle voksne forlader pupperne, og dermed at dele af populationen overvintrer som puppe. Vores resultater fandt ingen indikationer på at arten overvintrer som puppe.



FIGUR 12. *L. hennigrata* pupper og voksne. Fluerne på billedet er blevet indsamlet som store larver i juni i Kaukasus og er klækket af pupperne i efteråret efter de blev taget indendørs. Taget af Hans Peter Ravn.

Overvintring

Det vides stadig ikke hvor *L. hennigrata* overvintrer, men kun at i hvert fald størstedelen (hvis ikke alle) overvintrer som voksne fuldtudviklede fluer. Observationer over vinteren afslørede at de voksne fluer var aktive og indtog føde på meget "varme" solskinsdage. Fordi parringen med alt sandsynlighed foregår i foråret, kan vi også konkludere at både hanner og hunner overvintrer.

6.3 Opdræt og overvintring

Ser man på de enkelte udviklingsstadier (æg, larve, puppe, voksen flue) hver for sig er det lykkedes at opdrætte alle livsstadier af fluen. På individniveau er dette dog langt fra tilfældet. Dette eneste livsstadie der relativt simpelt kunne videreudvikles til næste stadie uden høj dødelighed, var puppestadiet og til dels store voksne fluelarver. Udvikling af de andre stadier involverede en relativt høj dødelighed, hvilket især gjaldt overvintringen af voksne fluer.

6.3.1 Opdræt

Vi har i dette projekt forsøgt at opdrætte forskellige livsstadier af *L. hennigrata* i laboratoriet. Disse erfaringer kan i fremtiden være brugbare for videre arbejde med fluen. Desuden har de givet meget ny viden til opdræt af høstfluer generelt, da der ind til nu kun findes et studie i opdræt af høstfluer (en anden art end *L. hennigrata*).

Voksne i foråret:

Vi observerede at disse fluer spiste af de tilbudte fødekilder. Størstedelen af de indsamlede hunner lagde villigt æg. De fleste fluer indsamlet og opbevaret på denne måde døde efter nogle uger. Dette virker som en naturlig udvikling i deres livscyklus, da ingen voksne fluer blev observeret i juni/juli, og det derfor antages at fluerne også dør under naturlige forhold i løbet af sommeren.

Æg:

Det var ikke svært at få æglæggende hunfluer, til at lægge æg i fangeskab. Disse æg blev opbevaret i klækkebure opbevaret udendørs med det naturlige klima og langt de fleste klækkede

efter en lille uges tid. Dog lykkedes det ikke at klække størstedelen af de indsamlede æg i Georgien. Disse æg blev opbevaret i plastikbokse med en ret høj luftfugtighed, og blev transporteret rundt i biler. Det kunne altså tyde på at opbevaringsforholdene for æggene er kritisk for deres udvikling.

Larver:

Opdræt af larver til pupper kræver en konstant tilstedeværelse af en levende fødekilde. Dette kan vise sig at være besværligt, hvis man ikke har nem adgang til sådanne fødekilder. Vi har selv haft succes med at opdrætte larver på ædelgranlus, men også andre lus kan potentielt bruges som alternativ. Vores observationer af de indsamlede larver i forskellig størrelse, peger på at større larver har en meget højere overlevelseseffekt end de små.

Pupper:

65 % af de pupper der blev hjembragt fra Georgien klækkede succesfuldt. Mange af dem der ikke klækkede skyldtes angreb af parasitoider, hvoraf nogen kom ud i løbet af efteråret, mens andre først kom ud det efterfølgende forår. Når man tager de meget simple forhold som pupperne blev opbevaret under i betragtning, skal der altså ikke meget til at klække dem. Pupper opbevaret ved høj fugtighed udviklede svampe, der dræbte pupperne.

Voksne i efteråret:

De voksne fluer klækket i Schweiz blev opbevaret tre forskellige steder. Fluerne indsamlet i Georgien blev opbevaret i karantænelaboratoriet mens voksne fluer indsamlet i Schweiz blev opbevaret indendørs i et laboratorium og udendørs i et skur. Fluerne klækkede i løbet af august og september. 120 af de 257 klækkede fluer (46%) opbevaret i karantænelaboratoriet overlevede til 9 oktober. 46 af de 261 klækkede fluer (18%) opbevaret indendørs i et laboratorium overlevede til 9 oktober. 100 af de 138 klækkede fluer (72%) opbevaret udendørs overlevede til 9 oktober. Forhold der imiterer det naturlige klima, vil altså øge overlevelseseffekten.

Overvintring:

Vi forsøgte som sagt at overvintrere 266 voksne *L. hennigrata* i 2019 i to forskellige typer beholdere ved 2 forskellige typer af opbevaring (naturligt klima vs. klækkeskab). I 2018 blev 12 individer også forsøgt overvintret i et klækkekammer med samme nedkøling som i 2019 og opbevaret med kunstige materialer, ingen overlevede. I 2019 blev 166 individer (120 karantæne + 46 laboratorie) forsøgt overvintret i et klækkekammer. Ingen overlevede vinteren. I 2019 blev 100 individer forsøgt overvintret i et skur, der fulgte det omgivende klima. Fire individer overlevede i beholderen med kunstige materialer. Generelt observerede vi i denne beholder også aktivitet på varme dage. Den 20 marts var fire individer stadig i live og vi observerede parring mellem to af individerne. Individerne døde kort herefter. Det sidste individ døde i begyndelsen af maj. Vi observerede i alle tilfælde at de naturlige materialer udviklede svampe og alle fluer døde relativt hurtigt i disse beholdere. I alt overlevede fire individer (1.4%) af de 266, der blev forsøgt overvintret i 2019. Det var som sagt dem, der blev opbevaret udendørs, og det må altså konkluderes at en imitation så tæt på naturlige klimatiske forhold vil øge overlevelseseffekten. Dog ikke til en tilfredsstillende grad. Det vil være nødvendigt at få en højere overlevelseseffekt på overvintrende individer før *L. hennigrata* kan opdrættes i fangeskab. Den meget lave overlevelseseffekt kunne muligvis skyldes at forholdene med de kunstige materialer var alt for tørre. Vi håbede at de naturlige materialer kunne opveje dette, men de udviklede som sagt skadelige svampe. Desuden, observerede vi aktivitet og fødeindtag hos fluerne i løbet af vinteren hvilket var uventet og derfor er det vigtigt der hele tiden er vand og føde tilgængeligt. Da det endnu ikke vides hvor *L. hennigrata* overvintrer, kunne indsamling af arten om vinteren muligvis afsløre et unikt habitat, med bestemte krav, hvilket kunne hjælpe med at øge overlevelseseffekten.

6.4 Effektivitet

Abundans i naturen

Indsamlingen af de 180 kviste fra Schweiz resulterede i 265 individer af naturlige fjender, fordelt over 18 arter (hvoraf nogle blev vurderet kun på deres udseende). Fra disse blev 157 individer identificeret som *L. hennigrata*. At disse individer tilhørte arten *L. hennigrata*, blev også bekræftet af vores DNA-analyser. Det betyder altså at 59% af alle indsamlede rovdyr på ædelgranlus i Schweiz tilhørte arten *L. hennigrata*. Som nævnt indsamlede vi vores data over 4 datoer, hvorfor vi også har en idé om udviklingen over tid. I midt april var 40% af de indsamlede rovdyr *L. hennigrata*. I slutningen af april var dette 66% og i midt maj 34%. I slutningen af maj var det kun 17.5% af rovdyrene der var *L. hennigrata*. Denne udvikling, hvor den relative abundans af *L. hennigrata* er højest omkring slutningen af april er forventelig, da dette passer perfekt med, hvornår vi observerede de højeste tætheder af ædelgranlus. Den lave tæthed af *L. hennigrata* hen mod slutningen af maj forklares også af fluens livscyklus, da vores resultater peger på langt størstedelen af bestanden på dette tidspunkt allerede vil have forpuppet sig i jorden.

Det kan kort nævnes at de andre rovdyr med nævneværdig abundans primært bestod af forskellige arter af svirrefluer, samt nogle arter af mariehøns. Vores meget indledende arbejde med disse dyr peger på at der i Schweiz (og Georgien) er flere arter af svirrefluer, der er specifikt specialiseret til at angribe ædelgranlus. I Danmark er næsten alle rovdyr på ædelgranlusen generalister, der også findes på andre bladlus.

Som nævnt var den relative abundans af *L. hennigrata* helt oppe på 66% i slutningen af april (uge 18, 2020). Vi testede hér forholdet mellem antallet af larver fundet per cm kvist i forhold til antallet af ædelgranlus per cm kvist. Vores analyser viste, hvordan *L. hennigrata* ikke blev fundet hvis tætheden af ædelgranlus var under 7 ægmasser per cm kvist. Egne erfaringer fra feltarbejdet i både Schweiz og Georgien, gav hurtigt samme indtryk, at fluen ikke blev fundet hvis tætheden af alm. ædelgranlus var for lav, og omvendt at ved høje tætheder blev der ofte indsamlet flere individer. Vi fandt altså på kviste med høj tæthed (10 ægmasser per cm) flest antal *L. hennigrata* (0.1 per cm).

I Georgien indsamlede vi i samme type forsøg 169 rovdyr i æggestadiet og 181 rovdyr i larvestadiet. Af disse blev 42 æg (25%) og 20 larver (11%) identificeret som *L. hennigrata*. I gennemsnit var 14% af alle rovdyr indsamlet i Georgien med denne protokol *L. hennigrata*. Desuden lavede vi et forsøg, hvor æg og længde på kviste ikke blev opgjort. Her indsamlede vi 1.182 rovdyr. Af disse blev 16% identificeret som *L. hennigrata*. Der var dog meget stor variabilitet mellem de 3 undersøgte lokaliteter. I Beshumi var 51% (162 individer) af de indsamlede rovdyr *L. hennigrata*, mens det i kun var 4 og 0.5% i henholdsvis Bakhmaro og Tlughu.

I Georgien blev der også indsamlet forskellige arter af svirrefluer og mariehøns i ægmasserne, men især larver af en galmyg i slægten *Aphidoletes* (muligvis *Aphidoletes thomsonii* Mohn) og larver af billen *Laricobius caucasicus* Rost, blev fundet i store mængder, især i Bakhmaro og Tlughu, men også i Beshumi.

Effektivitet af den enkelte larve

I det eksperiment, der blev gennemført i Schweiz i 2019 blev 4 af de 20 larver ekskluderet fordi for mange af æggene fra ædelgranlusen var klækket inden larverne kom til. De 16 tilbageværende larver havde en gennemsnitlig længde på omkring 2.3 mm og de spiste i gennemsnit 57 æg, hvilket svarer til ca. 25% af de æg de blev tilbudt. De 10 larver i det lignende eksperiment udført i Schweiz i 2020, var i gennemsnit større (3.1 mm) og de fortærede i gennemsnit 96 æg, hvilket svarer til ca. 30% af de tilbudte æg. Ud over dette observerede vi, at mange æg fra 2020 eksperimentet kun var blevet gennemboret af larverne og delvist spist, hvorefter æggene tørrede ud. Denne tendens, hvor larverne kun delvist spiste æggene, gjorde tallet markant højere, end hvis man kun inkluderede de æg, der var helt spist.

Seks af de tyve larver i det lignede eksperiment gennemført i Georgien blev ekskluderet fordi de forpuppede sig (2 individer) eller at de undslap papirarenaen (4 individer). De resterende 14 individer spiste i gennemsnit 117 æg, hvilket svarer til et gennemsnit på 93% af de tilbudte æg.

6.5 Specificitet

Specificitet i laboratoriet

I gennemsnit lagde de voksne fluer 6 æg per bur da de blev udsat for grene med *Pineus pini*. I gennemsnit lagde de 15 æg per bur, da de blev udsat for *Adelges laricis*. På samme måde lagde de i gennemsnit 20 æg på grene med *Adelges viridis* og 58 æg på grene med *Mindarus abietinus*. Vi fandt ikke nogen æg på *Pseudococcus comstocki*. Der blev i gennemsnit lagt ét æg per bur med grene uden nogen fødekilde. Vi testede disse forskelle (Poisson regression med *glm* funktionen, R Core Team 2021) og kun antallet af æg lagt på *Mindarus abietinus* var signifikant forskelligt fra kontrolburet uden nogen fødekilde.

Vi fulgte som sagt udviklingen af de klækkede larver på de enkelte utilsigtede arter.

Vi observerede at *L. hennigrata* kunne spise *Adelges viridis* larver. Udviklingen af ægmasser fra *Adelges viridis* larverne på disse grene skete dog først nogle uger senere, hvorfor det ikke var overraskende, at alle larver af *L. hennigrata* døde, før de kunne forpuppe sig (for lidt mad). Alle æg lagt ved gallerne af *Adelges laricis* var indtørrede, og vi observerede overraskende nok, at nogle af *Adelges laricis* larverne angreb *L. hennigrata* æggene. For at se hvorvidt denne art kunne fungere som fødekilde, indsamlede vi senere *Adelges laricis* ægmasser og udsatte dem for *L. hennigrata* larver. Dette afslørede at *L. hennigrata* larverne gerne spiste *Adelges laricis* ægmasser.

Vi observerede at *L. hennigrata* gerne spiste æg af *Pineus pini* og vi havde en enkelt observation, hvor en larve også angreb en æglæggende hun. En enkelt *L. hennigrata* larve (3mm) druknede i vandet til grenene. Denne art kan altså i fangeskab understøtte udvikling af *L. hennigrata* til senere larvestadier.

Det blev observeret at adskillige af *L. hennigrata* larverne, der blev tilbudt *M. abietinus* spiste af "larverne" fra denne alternative art. Ved slutningen af eksperimentet fandt vi tre puparier i bunden af plastikbeholderen. En af disse klækkede til voksenstadiet af *L. hennigrata*.

Specificitet i naturen

- På ingen af de 36 *Larix decidua* grene angrebet af *Adelges viridis* blev der fundet æg eller larver af *L. hennigrata*.
- På ingen af de 99 *Abies alba* grene angrebet af *Mindarus abietinus* blev der fundet æg eller larver af *L. hennigrata*.
- På ingen af de 291 *Picea abies* grene med *Adelges laricis* (+ *A. viridis*) blev der fundet æg eller larver af *L. hennigrata*.

Vi indsamlede og adskillige svirrefluer og guldvinger på grene fra alle tre arter. Ingen af vores undersøgelser i Georgien fandt *L. hennigrata* på utilsigtede/alternative føde-arter.

7. Konklusioner og perspektiver

7.1 Konklusioner

Før man kan få Miljøstyrelsens tilladelse til at efterintroducere en naturlig fjende kræver det, at arten af interesse er ordentligt undersøgt og dermed, at der ikke er usikkerhed om taksonomien og biologien af det rovdyr, man har i sinde at introducere. Dette projekt har gennem DNA-analyser, samarbejde med den førende høstflueekspert og vores mange observationer og tests af arten, tilvejebragt vigtig viden. Vi har nu har et godt kendskab til artens livscyklus og udbredelse. Især vores observation af parrende individer om foråret, har givet vigtig viden til forståelsen af artens livscyklus. Endnu er dele af artens overvintringsbiologi ukendt.

Med henblik på at opnå tilstrækkelig viden til at opnå tilladelse til at efterintroducere en naturlig fjende skal artens specificitet og effektivitet være testet i laboratoriet og i felten. Dette har været det primære mål i dette projekt.

Effektiviteten af *L. hennigrata* på den alm. ædelgranlus er i meget lille omfang nævnt i Eichhorns rapporter fra 1960'erne. Her bliver *L. hennigrata* nævnt som et vigtigt rovdyr på grene og kviste angrebet af alm. ædelgranlus. Dette er er ideelt for juletræsindustrien, da problemet opstår ved angreb på kvistene, hvilket krøller nålene, og gør træerne usalgbare. Et senere studie (Ravn et al., 2012) med fokus på at finde den mest idéelle naturlige fjende af alm. ædelgranlus, konkluderede også, at *L. hennigrata* havde stort potentiale. Vores egne resultater fra Schweiz af den relative abundans af *L. hennigrata* bekræftede potentialet ved at indføre *L. hennigrata* som et naturligt rovdyr mod den alm. ædelgranlus. Langt størstedelen (59%) af de rovdyr, der blev indsamlet i Schweiz, tilhørte *L. hennigrata*. Dette tal var markant lavere i Georgien (14%), men én af de tre lokaliteter i Georgien, havde på samme måde som i Schweiz, en høj (51%) relativ tæthed af *L. hennigrata*. Den lave tæthed af *L. hennigrata* på de to resterende lokaliteter i Georgien, kan på den ene lokalitet (Tlugh) skyldes en forholdsvis lav tæthed af alm. ædelgranlus, mens det på den anden lokalitet kan skyldes beliggenheden og de tilknyttede klimatiske forhold (2000m over havets overflade).

Vi fandt, at *L. hennigrata* ikke fandtes i angreb af alm. ædelgranlus med en lav tæthed (under 7 ægmasser per cm) hvilket muligvis er forklaret af den mængde ægmasser, der skal til, for at larverne kan udvikle sig til puppestadiet. I forhold til biologisk bekæmpelse betyder det, at det ikke forventes at *L. hennigrata* alene kan udrydde den alm. ædelgranlus fra Danmark, men dens høje tæthed tyder på den vil kunne nedbringe populationerne af alm. ædelgranlus til acceptable tætheder.

Vores undersøgelser af larvernes effektivitet i Georgien og Schweiz varierede meget, men i både Schweiz og Georgien observerede vi adskillige større larver der fortærede over 100 æg om dagen. Kombineres dette resultat med larvens levetid (omkring 20 - 25 dage) kan en larve nemt nå at indtage omkring 1.500 æg, hvilket svarer til omkring 15 ægmasser. Med denne meget konservative estimering kombineret med antallet af ædelgranlus og *L. hennigrata* per cm kvist, vil *L. hennigrata* alene kunne nedbringe ædelgranlus populationen med 15 - 20%. Da populationen kun skal nedbringes til at acceptabelt niveau kunne dette betyde store gevinster for juletræsproducenterne. Desuden observerede vi, at larverne i flere tilfælde kun gennemhullede æggene uden at spise dem (eller kun meget lidt). Denne type "spild" forårsaget af larverne er ikke opgjort, men kunne øge antallet af dræbte ædelgranlus markant. Disse studier peger altså på at en introduktion af *L. hennigrata* vil have en tydeligt reducerende effekt på tætheden af ædelgranlus.

Tests af specificiteten af *L. hennigrata* larver blev undersøgt under laboratorieforhold i Schweiz og vores tests viste at larverne ikke er specifikke. De spiste stort set alt, hvad de blev tilbudt. Ikke kun æg men også voksne bladlus. Dette er dog som udgangspunkt ikke så kritisk, da larverne igennem deres levetid ikke bevæger sig længere end et par centimeter, hvorfor sandsynligheden for at de spiser andre bladlus er meget lille. Dette gælder selvfølgelig kun under antagelsen, at de voksne *L. hennigrata* fluer er kræsnede med, hvor de vil lægge æg. Da ingen af de overvintrede individer fra Georgien overlevede, har vi ingen test på de voksne Georgiske fluers specificitet. Det lykkedes dog at gennemføre forsøg på voksne individer indsamlet i Schweiz i foråret 2020. Disse fluer blev placeret i klækkekammer med andre bladlusarter. Vores resultater viste, at de voksne fluer lagde æg på alle slags bladlus, men også på bladlusfri substrater i kontrolkammeret. På baggrund af disse observationer alene, er det altså ikke muligt og udelukke at, *L. hennigrata* kan finde på at lægge æg på andre insekterarter.

I Georgien, i 2019, testede vi specificiteten af *L. hennigrata* i naturen, ved at gennemgå ægmasser fra andre bladlus og ædelgranlus på forskellige træer og planter, tæt ved steder hvor *Leucopis* larver blev observeret. Vi observerede hverken æg, larver eller voksne i disse ægmasser. Et lignende studie blev gennemført i Schweiz i 2020. Her indsamlede vi på samme måde store mængder ægmasser fra andre bladlus, indsamlet tæt ved træer, hvor *L. hennigrata* tidligere var indsamlet. Alle ægmasser på disse grene blev grundigt gennemgået for æg, larver og voksne *L. hennigrata*, men ingen blev fundet. På baggrund af vores specificitetstests kan det altså konkluderes at *L. hennigrata* voksne og larver under kunstige forhold kan presses til at lægge æg på andre arter, men at de meget sjældent eller aldrig vil gøre dette under naturlige forhold.

På trods af *L. hennigrata* larvernes uspecifikke adfærd og at de voksne fluer kunne presses til at lægge æg på andre bladlusarter, vil vi anbefale udsætning af *L. hennigrata* til biologisk bekæmpelse af alm. Ædelgranlus. Dette gøres på baggrund af følgende pointer: 1) *L. hennigrata* er et rovdyr specifikt tilpasset ædelgranlusse angreb på kviste, hvilket er ideelt i forhold til problemet i juletræsproduktionen. 2) *L. hennigrata* er univoltin hvilket betyder, at arten vil have lettere ved at synkronisere sig med byttedyrsituationen ved eventuelt udsættelse i Danmark. 3) Andre arter i slægten *Leucopis* har tidligere været brugt til biologisk bekæmpelse af andre ædelgranlus arter. 4) Vores morfologiske og genetiske undersøgelser viser, at *L. hennigrata* findes i både Vestasien og Europa, hvilket betyder at rovdyret allerede findes i vores nabolande (Tyskland og England), hvorfor risikoen for en mislykkedes introduktion er mindre. 5) Vores undersøgelser af den relative abundans i Schweiz (og delvist i Georgien) finder *L. hennigrata* som det primære rovdyr og det forventes derfor at have en signifikant effekt på populationen af alm. ædelgranlus hvis *L. hennigrata* succesfuldt introduceres. 6) Antallet af æg spist af *L. hennigrata* larverne i forhold til antallet af ædelgranlus, samt deres tendens til at gennemhulle æg uden at udsuge disse, giver anledning til at forvente en målbar effekt, i tilfælde af en succesfuld introduktion. 7) Selvom vores specificitetstest af voksne og larver i laboratoriet viste meget lidt specificitet, anbefaler vi stadig en udsætning af *L. hennigrata* i Danmark. Dette skyldes at vi, trods vores grundige undersøgelser af "ikke-tilsigtede" arter (alternative byttedyr) i Schweiz og vores indledende undersøgelser i Georgien, ikke fandt nogen *L. hennigrata*. Det vil altså være ekstremt sjældent at *L. hennigrata* i naturen vil vælge at lægge æg på andre arter. Derfor finder vi det meget usandsynligt at *L. hennigrata* i Danmark vil kunne true bestanden af nogen utilsigtede arter. Adskillige af de svirrefluer vi fandt som rovdyr på vores utilsigtede arter, fandtes rent faktisk også på alm. ædelgranlus. Sådanne generalister blandt rovdyr ville ikke anbefales til udsætning. Derudover kan det nævnes at *M. abietinus* (den eneste utilsigtede art hvor de voksne *L. hennigrata* fluer lagde signifikant flere æg, sammenlignet med et tomt bur) i øvrigt også anses som et problem i juletræsproduktionen.

Hvordan skal udsættelsen foregå? Det mest normale i forbindelse med masseudsætning er at opformere det tilsigtede rovdyr i fangeskab og dernæst udsætte det på friland. På baggrund af

vores forsøg på at opdrætte forskellige livsstadier af *L. hennigrata* i fangeskab, er dette på nuværende tidspunkt ikke en holdbar løsning. Især en bedre overlevelsesrate på de overvintrede individer er nødvendig, før mere arbejde med denne teknik fortsættes.

Derimod vil vi foreslå at det gøres ved at indsamle jord og førne under træer med høje tætheder af ædelgranlus. Dette kan passende gøres i Schweiz, i samarbejde med CABI der allerede har den fornødne viden til at gennemføre disse indsamlinger. Jorden kan lægges direkte i klækkebure og transporteres til et karantænelaboratorie. Jorden bør indsamles i juli da alle individer på dette tidspunkt vil have forpuppet sig, men ingen individer vil være klækket. Indsamling af jord i klækkebure tillader desuden at de voksne *L. hennigrata* individer kan udtages enkeltvis fra buret og derved kan man undgå at udsætte eventuelle parasitoider.

Da der allerede findes eksempler på at forskellige underarter (meget forskellige populationer) har haft markante forskelle i deres egnethed som naturlige fjender, vil det også give mening at udsætte individer fra Georgien. Dette skyldes at vi fandt en genetisk forskellighed mellem populationen i Schweiz og Georgien, denne var bare ikke stor nok til, at man vil antage, der er tale om to forskellige arter. I tilfælde af udsætning fra Georgien vil vi anbefale, at der bliver fulgt op på specificitetstestene. Dette kan nemt gøres ved at følge en lignende protokol til den vi brugte i Schweiz. Dette vil sikre, at der ikke er markante forskelle i de to populationers specificitet, hvilket er vigtigt at have styr på inden individerne udsættes. Da de angrebne træer i Georgien typisk er noget mindre og med væsentligt lavere tæthed, vil indsamling af individer fra Georgien nemmest gøres ved at klippe grene af træer med høje tætheder i løbet af Maj/Juni. Disse grene kan derefter overføre til plastikboks og hvorefter de skal transporteres til et karantænelaboratorium i Danmark. Igen er det vigtigt ikke at få eventuelle parasitoider på fluerne med.

7.2 Perspektiver

Det helt naturlige perspektiv på baggrund af dette projekt, vil være og gennemføre kontrolrede udsætninger af *L. hennigrata* i Danmark (forklaret overfor). I en nærmere fremtid vil studiet udarbejde tre internationale artikler. En der specifikt handler om hvor egnet *Leucopis hennigrata* er som organisme i biologisk bekæmpelse af alm. ædelgranlus. En artikel med vores forsøg på opdræt og overvintring og artens livscyklus og fænologi, samt en artikel om rovdyrskomplekset i Schweiz, Georgien og Danmark. Disse resultater skal præsenteres på næste års pyntegrønt temadage. Vi har desuden forsøgt at overvintrere fluer igen i år (2021) under fugtigere forhold og med mere mad, da en succesfuld overvintring vil kunne lette processen med indledende udsætning i Danmark. Skulle disse resultater være positive vil de kunne findes i den internationale publikation.

Desuden håber vi på at kunne genbesøge Georgien engang i fremtiden. Dels fordi specificitets- og effektivitetstesten udført i naturen var meget indledende og dels fordi der stadig mangler en specificitetstest på voksne fluer fra Georgien. Dette data vil give en mere sikker vurdering af den sydlige population og dennes egnethed.

Indledende studier på rovdyrskomplekset i Georgien, viste andre mulige kandidater til biologisk bekæmpelse. Især billen *Laricobius caucasicus* blev fundet i meget stort antal på to lokaliteter. Da denne art er meget forskellig (DNA-analyse) fra den lignende *Laricobius erichsonii*, fundet i Danmark, kunne denne være et bud på en egnet organisme. Lignende undersøgelser som dem, vi har gennemført på *L. hennigrata*, er dog nødvendige, før introduktion af denne art kan komme på tale. Denne bille kunne også have potentiale mod ædelgranstammelusen i USA, da den fandtes på lokaliteter med et meget koldt klima og i højt antal på stammeangrebne træer.

Alle tidligere undersøgelser peger på, at det primært er den almindelige ædelgranlus, der er et problem i juletræsproduktionen, men grundet ny viden (se afsnit 4.1.2) vil en bekræftelse af dette give mening i et eventuelt fremtidigt projekt.

Referencer

Christensen P (1995) Skøn over skovbrugets samlede forbrug af bekæmpelsesmidler og kunstgødning.

Danske Juletræer (2021). Personlig kommunikation med Claus Jerram Christensen, direktør i brancheorganisationen "Danske Juletræer". De fleste refererede informationer kan desuden findes på deres hjemmeside; <https://www.christmastree.dk>

Eichhorn, O. (1967). Balsam Woolly Aphids (*Adelges* spp.): Work in Europe and Turkey in 1967. Commonwealth Institute of Biological Control, European Station, Delémont, Switzerland. Unpublished report.

Eichhorn, O. (1967a). On methods of differentiating the species of the harmful white woolly aphids (genus *Dreyfusia* CB = *Adelges* An.) on Fir, and the consequences for forest protection. Tech. Bull. CIBC 8, 53–82.

Havill, N.P. & Footitt, R.G. (2007). Biology and evolution of Adelgidae. Annual Review of Entomology, 52, 325–349.

Havill, N. P., Griffin, B. P., Andersen, J. C., Footitt, R. G., Justesen, M. J., Caccone, A., D'Amico, V., & Elkinton, J. S. (2020). Species delimitation and invasion history of the balsam woolly adelgid, *Adelges (Dreyfusia) piceae* (Hemiptera: Aphidoidea: Adelgidae), species complex. Systematic Entomology. McAlpine, J. F. (1978). A new dipterous predator of balsam woolly aphid from Europe and Canada (Diptera: Chamaemyiidae). Entomologica Germanica, 4(3/4), 349-355.

Kenis, M., Hurley, B. P., Hajek, A. E., & Cock, M. J. (2017). Classical biological control of insect pests of trees: facts and figures. Biological Invasions, 19(11), 3401-3417.

McAlpine, J. F. (1978). A new dipterous predator of balsam woolly aphid from Europe and Canada (Diptera: Chamaemyiidae). Entomologica Germanica, 4(3/4), 349-355.

Ravn, H. P., Havill, N. P., Akbulut, S., Footitt, R. G., Serin, M., Erdem, M., Mutum, S., & Kenis, M. (2012). *Dreyfusia nordmannianae* in Northern and Central Europe: potential for biological control and comments on its taxonomy. Journal of Applied Entomology, 137(6), 401-417.

Varty, I.W. (1956). *Adelges* insects of silver firs. Bulletin of the Forestry Commission, London, 26, 1–75.

Biologisk bekæmpelse af alm. ædelgranlus (*Adelges nordmanniana*)

Projektet havde til formål at udnytte en af de naturlige fjender af almindelig ædelgranlus til at skaffe dansk og europæisk produktion af juletræer af med dét skade-dyr, der er årsag til det største forbrug af insekticider. Dette blev specifikt gjort ved at teste specificitet og effektivitet af rovfluen *Leucopis hennigrata*, der er naturligt udbredt i bl.a. Schweiz, med henblik på at forbedre det næste trin, der udgøres af udsætning under kontrollerede forhold.

Undersøgelsens resultater tyder på, at *L. hennigrata* vil kunne nedbringe tætheden af ædelgranlus væsentligt og dermed have en betydende reducerende effekt på tætheden af ædelgranlus og derigennem reducere skader og bekæmpelsesbehov i Danmark.

Dette giver anledning til at anbefale næste trin – en udsætning af *L. hennigrata* under kontrollerede forhold (i begrænset omfang og under overvågning – eventuelt burforsøg - på friland) i Danmark. Opformering af *L. hennigrata* i stor skala under laboratorieforhold med henblik på udsætning har dog stadig nogle uløste udfordringer. Umiddelbart vil indsamling af pupper fra jordbunden under træer med høje tætheder af ædelgranlus i juli måned i rovfluens naturlige udbredelses-område antagelig kunne skaffe den tilstrækkelige mængde individer til et udsætningsforsøg under kontrollerede forhold i Danmark.



Miljøstyrelsen
Tolderlundsvej 5
5000 Odense C

www.mst.dk