

Slutrapport till SLU EkoForsk, juni 2014

## **Användning av artspecifika doftsubstanser för ekologisk kontroll av klöverspetsviveln – en fröskadegörare i klöverfröodlingar**

*Projektansvarig:* Åsa Lankinen, Institutionen för växtskyddsbiologi, SLU Alnarp

*Projektgrupp:* Olle Anderbrandt, Maj Rundlöf och Glenn Svensson (Biologiska institutionen, Lund Universitet), Mattias Larsson och Göran Birgersson (Institutionen för växtskyddsbiologi, SLU Alnarp), Ola Lundin (Institutionen för ekologi, SLU Ultuna).

Projektet har drivits i samordning med ett SLF-projekt (projektnr.: H1033099).



Foto: Maj Rundlöf

## Sammanfattning

Klöverfrö är grundläggande inom jordbruket för att producera djurfoder och som grüngödsling. Det senare är speciellt viktigt på ekologiskt brukade gårdar där konstgödsel inte används. Frätande skadeinsekter, främst klöverspetsvivlar, kan orsaka skördeförluster på över 50%. Inom den ekologiska sektorn saknas etablerade bekämpningsmetoder. Kontroll genom manipulation av skadeinsekternas doftstyrda beteenden är en möjlighet. I detta projekt var målet att kartlägga vilka dofter (feromoner och växtdofter) som påverkar klöverspetsvivlar, med slutmålet att använda dessa dofter för prognos och kontrollverksamhet. Arbetet har koncentrerats kring 1) doftuppsamling och kemisk identifiering av doftämnen, 2) elektrofysiologi främst hos den gulbenta viveln (*Apion fulvipes*) och 3) beteendestudier i lab, 4) insamling av vivlar i röd- och vitklöverodlingar för att undersöka samband mellan vivelförekomst och klövers fenologi and 5) övervintring av vivlar. Vi fann ett stort antal doftämnen hos klöver, bla monoterpenener, C<sub>11</sub>-terpenkolväten och sesquiterpenener.  $\beta$ -ocimene (E och Z) ökade över säsongen. Elektrofysiologimätningar visade att den gulbenta viveln, som är specialiserad på vitklöver, har 18 klasser av luktneuron som uppfattade många klöverdofter. Beteendestudier i lab konfirmerade att doften är viktig för värdväxtval hos både den gulbenta och den rödbenta viveln (*A. trifolii*), som är specialiserad på rödklöver. Ett annat intressant resultat var att honvivlar har starkare preferens för klöver med knoppar och blommor jämfört med hannar. Detta mönster kunde vi även se i det fältinsamlade materialet, där förekomst av honvivlar var starkt positivt sammankopplad med förekomst av knoppar. Undersökningar av vivlarnas förekomst i och utanför åkrar tidigt på våren visade att vivlar övervintrar nära tidigare års klöverfält. Våra slutsatser är att dessa studier har bidragit med viktig grundläggande kunskap om klöverspetsvivlars kemiska kommunikation och ekologi, vilken kan ligga till grund för framtida utveckling av prognosverksamhet och kontroll av klöverspetsvivlar.

## Summary

Clover seed is fundamental within the agricultural sector, as clover is used in leys to produce animal fodder and as green manure. The latter is particularly important on organically managed farms where the use of inorganic fertilizers is prohibited. Seed-eating pest insects, predominantly *Apion* weevils, can cause yield losses of over 50 %. No established control measure exists within the organic sector. Pest management in clover seed production would be particularly well favored by developing odor-based control strategies. In this project our aim was to identify semiochemicals (pheromones and attractive floral volatiles) for different species of seed-eating weevils, with the end goal to develop efficient methods for monitoring and control. Our work focused on 1) scent collection and chemical identification of clover volatiles, 2) electrophysiology in *Apion fulvipes*, 3) behavioral lab studies, 4) field-collection of weevils and comparison to crop phenology, and 5) overwintering of weevils. Common compounds in clover included monoterpenes, C<sub>11</sub>-terpene hydrocarbones and sesquiterpenes. Moreover,  $\beta$ -ocimene (E and Z) increased over the season. Our electrophysiological screening of potential weevil attractants in *A. fulvipes*, specialized in white clover, found 18 classes of olfactory sensory neurons detecting several clover compounds. Our lab bioassays confirmed

that odors are important for host plant choice in *A. fulvipes* and in *A. trifolii*, specialized in red clover. We also showed that females, but not males, prefer clover with buds and flowers. This result was consistent with our field collections of weevils, where number of females was positively correlated with number of buds. Presence of weevils in fields and field margins early in spring indicated weevil overwintering close to previous clover fields. In conclusion, our studies provided important basic knowledge on chemical communication and ecology in seed-eating weevils forming the foundation for future studies aiming to develop odor-based strategies for monitoring and control.

## **Bakgrund**

### Övergripande målsättning

Tillgången på klöverfrö är grundläggande inom jordbruket, då klöver används för att producera djurfoder och som grüngödsling (Thorup-Kristensen m. fl. 2003). Det senare är speciellt viktigt på ekologiskt brukade gårdar där konstgödsel inte används. Skörden av klöverfrö i Sverige varierar stort mellan gårdar och mellan år, vilket ger negativa ekonomiska konsekvenser för fröproducenter och konsumenter genom bl. a. osäkerhet i produktionen, lagerkostnader och brist på utsäde. I dagsläget vet man inte med säkerhet vad den ojämna frösättningen beror på, men säkerställt är att fröätande skadeinsekter, främst klöverspetsvivlar, kan orsaka skördeförluster på över 50% (Hansen & Boelt 2008). Vivlarna kan konventionellt bekämpas med pyretroider men med tveksam bekämpningseffekt, eller med neonicotinoiden tiakloprid som har hög bekämpningseffekt men där sidoeffekter på nyttoinsekter inte går att utesluta (Folkesson 2009, Lundin m. fl. 2012). Inom den ekologiska sektorn finns inte någon etablerad bekämpningsmetod. Kontroll genom manipulation av skadeinsekternas doftstyrda beteenden skulle kunna vara en alternativ metod. Feromoner (se nedan) är doftsignaler som många insekter använder för kommunikation särskilt i samband med parningen, vilket kan utnyttjas för att locka till sig eller förvirra skadeinsekter. Skadedjurskontroll med feromoner har gradvis ökat inom många områden (Witzgall m. fl. 2010). Massfångst med feromoner och värdväxtdofter (se kairomoner, nedan) har ofta varit särskilt framgångsrik med olika vivlar, vilka använder aggregationsferomoner för att attrahera honor (Cross m. fl. 2006; Rhino m. fl. 2010). Utveckling av en sådan bekämpningsmetod, som är ett möjligt slutmål för detta projekt, har även fördelen att nyttoinsekterna i klöverfröodlingen inte påverkas negativt, vilket torde bidra till en högre och stabilare fröskörd då man kan utnyttja den fulla potentialen hos pollinatörerna och skadeinsekternas naturliga fiender. I korthet vill vi besvara följande frågor:

- Vilka feromoner och växtdofter påverkar klöverspetsvivlar?
- Kan feromoner och/eller växtdofter användas för prognosverksamhet och kontroll av klöverspetsviveln inom klöverfröproduktionen?

### Klöverspetsvivlar

Fröätande vivlar av släktet *Apion* är viktiga skadegörare i klöverfröproduktionen (Markkula m. fl. 1964; Folkesson 2009). De vuxna insekterna sprider sig in i klöverfröodlingen under försommaren och livnär sig där på klöverblad, men mest skada på klövern gör de fröätande larverna. Klöverspetsviveln lägger ägg i klöverns blomknoppar, och

under larvens utveckling äter den uppskattningsvis 6-10 fröämnen och frön. På sensommaren kläcks den nya generationen klöverspetsvivlar, som övervintrar i närheten av fältet (Jones 1950).

Olika arter av vivlar är kopplade till röd- respektive vitklöver. I svenska rödklöverfröodlingar dominerar den rödbenta (*Apion trifolii*) och den allmänna klöverspetsviveln (*A. apricans*), medan den gulbenta klöverspetsviveln (*A. flavipes*) dominerar helt i vitklöverfröodlingar. Undersökningar från röd- och vitklöverfröodlingar i södra Sverige visar på omfattande angrepp av vivlar (Folkesson 2009; Lundin 2009). I skånska undersökningar från 2008 hittades i genomsnitt 3,3 vivlar per rödklöverblomhuvud, och med en uppskattad skördeförlost på 48 kg/ha vid förekomsten av en vivel per blomhuvud (Lundin 2008) blir det tydligt att vivelangreppsgraden är en viktig faktor för fröskördens storlek.

### Feromoner och kairomoner

Insekter använder vanligen kemiska signaler för att kommunicera mellan individer och för att inhämta information om miljön de lever i. Doftsignaler som används för kommunikation inom en art kallas feromoner, medan de signaler som utnyttjas av andra arter än de som sänder ut dem kallas kairomoner, t.ex. de dofter som insekter använder för att lokalisera lämpliga värdväxter. Under de senaste decennierna har mycket forskning bedrivits kring feromoner och växtgifter och möjligheten att utnyttja dessa för miljövänlig kontroll av skadegörande insekter i jord- och skogsbruket. Doftbaserade kontrollmetoder har många fördelar jämfört med traditionell pesticidanvändning, eftersom dessa ”infokemikalier” är ogiftiga och dessutom extremt selektiva och sällan påverkar andra arter i ekosystemet på ett negativt sätt.

Feromonbaserad bekämpning av vivlar har använts med varierande framgång för arter som använder aggregationsferomon där båda könen attraheras till doften (Cross m. fl. 2006; Rhino m. fl. 2010). Inga feromoner har emellertid identifierats för klöverspetsvivlar. Mer information finns tillgänglig om klöverdofter. Tidiga studier på *Trifolium* (Honkanen m. fl. 1969; Buttery m. fl. 1984) identifierade 40 ämnen hos röd- och vitklöver, och visade att blad, blommor och frökapslar av rödklöver har olika doftprofil. Metoderna för att detektera och analysera flyktiga substanser har dock förfinats med åren och senare publikationer (Figueiredo m. fl. 2007; Kigathi m. fl. 2009) har identifierat ytterligare substanser från rödklöver. Dessutom har doftanalyser utförts på rödklöver med olika grad av angrepp från skadeinsekter (Kigathi m. fl. 2009). Dessvärre finns inga publicerade data kring klöverspetsvivlars elektrofysiologiska eller beteendemässiga respons till klöverdofter. Beteendestudier har dock utförts på vivlar av släktet *Hypera* (Smith m. fl. 1976) som visade att honor attraheras i högre grad än hanar till doftämnen från blomknoppar av vitklöver. I dessa studier testades insekternas doftpreferens i en fyrvägs-olfaktometer. Inga data finns på vivlars attraktion till dofter från deras värdväxter i fält.

## **Material och metoder**

### Insamling av klöverspestvivlar

Vivlar som skulle användas för elektrofysiologiska studier, extraktion av möjliga

feromoner eller för beteendestudier samlades i första hand in genom slaghävning i fält med stora populationer. Även blomhuvuden plockades in för att kläcka fram den nya generationen. På laboratoriet förvarades djuren i burar med tillgång till klöverplantor.

### Uppsamling och analys av klöverdofter

Växtmaterialet placerades i en glaskyvet (i laboratorium) eller stekpåse (doftfri polyacetat – i fält) och med hjälp av en pump fördes doftämnen från växten till en kolonn fylld med en syntetisk adsorbent. Efter avslutad doftsamling sköljdes de uppsamlade doftmolekylerna ur adsorbentkolonnen med ett organiskt lösningsmedel. Uppsamling gjordes under hela säsongen från både vit- och rödklöver i fält 2011 och dessutom från olika växtdelar i växthus. Doftkoncentraterna användes för beteendestudier såväl som för kemiska analyser med gaskromatografi-masspektroskopi.

### Elektrofysiologi

För att bestämma vilka flyktiga substanser, från ffa klöver, som klöverspetvivelarna kan uppfatta med sina doftorgan, sensiller, på antennerna användes s.k. single-sensillum recording (SRR). Här etablerar man kontakt med neuronerna (vanligen 2-3) i en sensillum och stimulerar med de olika ämnena. Om något neuron har receptorer för ämnet genereras en potentialändring som kan registreras och kvantifieras. SRR mätningar genomfördes på antenner från båda könen av såväl *A. fulvipes* som *A. trifolii*.

### Labstudier av vivelars beteende

Beteendestudier i lab har omfattat födovalsexperiment och test av attraktion till doftämnen från klöver, med hjälp av olfaktometrar där vivelarnas preferenser för olika dofter kan studeras (Smith m. fl. 1976; Wee m. fl. 2008). I födovalsexperimenten testade vi preferens för respektive klöverart hos de två dominerande vivelarterna. Vi avlägsnade även vivelarnas doftorgan (antenner) för att undersöka hur starkt kopplad deras födoval är till dofter som avges från klöver.

För att undersöka hannars respektive honors attraktion till klöverdoft använde vi tvåvalsexperiment där vi kombinerade de båda klöverarterna och en luftkontroll på olika sätt. Som ett mått på vivelarnas attraktion till de olika dofterna använde vi tiden som vivelarna upphöll sig i zonen närmast respektive doftkälla.

### Fångst av vivelar och fenologi hos klöver

Passiva fallfällor sattes ut i tre vit- och tre rödklöverfält innan vivelarnas flygperiod 2011 och 2012 och vittjades en gång per vecka under hela tillväxtperioden. För att kunna jämföra vivel förekomst med klöverns tillväxt och blomning, noterade vi klöverns utveckling varje vecka.

I några fält sattes fällor med doftbeten ut. Doftsammansättningen baserades dels på den uppmätta avgivningen från klöver och dels på vivelarnas förmåga att lukta ämnena – baserat på de elektrofysiologiska mätningarna.

## Övervintringsplatser

För att få en uppfattning om var vivlarna övervintrar och om hur stora de lokala variationerna är sattes ett antal kläckningstält ut innan flygperioden 2013 (Fig. 1). Tälten är täta runt om och endast individer som övervintrat inom den ca halva m<sup>2</sup> som tältet täcker fångas.



**Fig. 1.** Kläckningstält i och strax intill ett rödklöverfält i södra Skåne. Klöverspetsvivelarna fångas då de vaknar efter vintervilan dels i burken högst upp och dels i en skålfälla inne i tältet.

## Studier av sexualferomoner hos vivlarna

Hanar och honor av *A. trifolii* extraherades i hexan för att identifiera möjliga feromonkomponenter. Extrakten analyserades med gaskromatografi-masspektroskopi.

## Fångst av fjällsprötad grönglanssäckmal, *Coleophora deauratella*

Vi deltog i ett samarbetsprojekt som syftar till att bestämma det geografiska ursprunget till den introducerade populationen i Nordamerika som orsakar stora skador i klöverfröodlingar där, se t.ex. Evenden m. fl. (2010). En feromonfälla sattes upp i ett rödklöverfält norr om Sjöbo och vittjades en gång per vecka.

## **Resultat**

### Klöverdofternas sammansättning

Vi fann stora variationer mellan doftinsamlingarna. Resultaten från rödklöver var mera enhetliga och de ämnen som förekom i störst koncentration var monoterpener ( $\alpha$ -pinen, myrcen, limonen, *E*- $\beta$ -ocimen, *Z*- $\beta$ -ocimen, och *E,E*-allo-ocimen), C11-terpenkolväten (*E*- och *Z*-4,8-dimethyl-1,3,7-nonatrien) samt sesquiterpener (*E*- $\beta$ -caryophyllen, *E*- $\beta$ -farnesen,  $\alpha$ -humulen). De vanligaste icke-cykliska föreningarna var *Z*-3-hexenol and *Z*-3-hexenylacetat. Samma ämnen hittades över hela säsongen men doftprofilen ändrades, t.ex. ökade andelen  $\beta$ -ocimen (*E* och *Z*) över säsongen.

### Elektrofysiologi

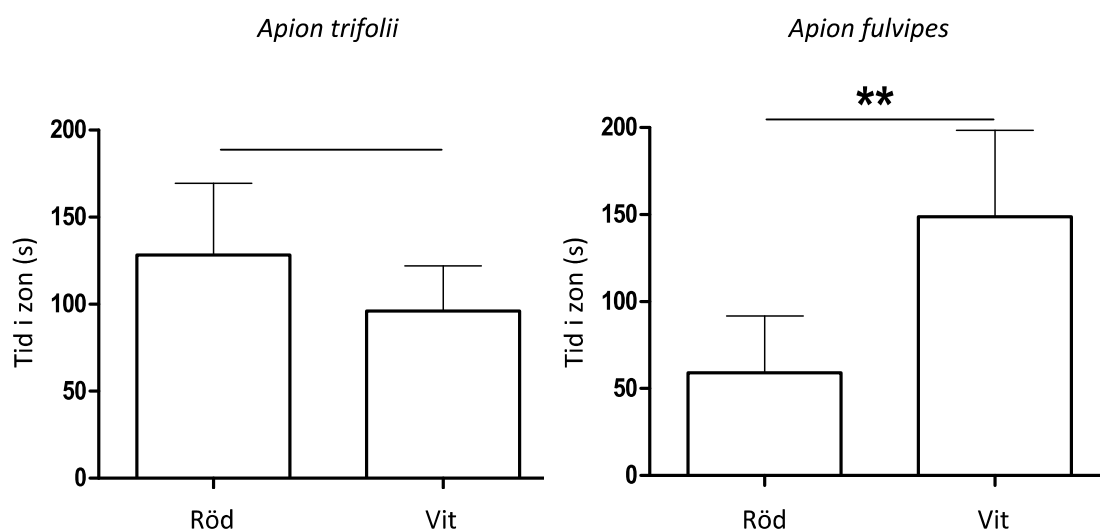
Single-sensillummätningarna på båda könen av *A. fulvipes* visade att de kan uppfatta flera av de 28 testade ämnena och sammanlagt karakteriserades 18 klasser av luktneuron, flera av dem mycket specialiserade (Andersson m. fl. 2012). Inga tydliga skillnader mellan könen kunde upptäckas. Motsvarande studie av *A. trifolii* är inte helt slutförd, men omfattar

ytterligare substanser som bl. a. identifierats i doftuppsamlingarna (Carrasco m. fl. opublicerat).

### Labstudier av vivlars beteende

Födovalsexperiment visade att honor, men inte hanar, av de båda dominerande vivelarterna föredrar den klöverart de är specialiserade på. När vi avlägsnade vivlarnas antenner, som används för att uppfatta dofter, slutade honorna att välja mellan klöverarter vilket betyder att deras preferens är doftstyrd (Nyabuga m. fl. manuscript).

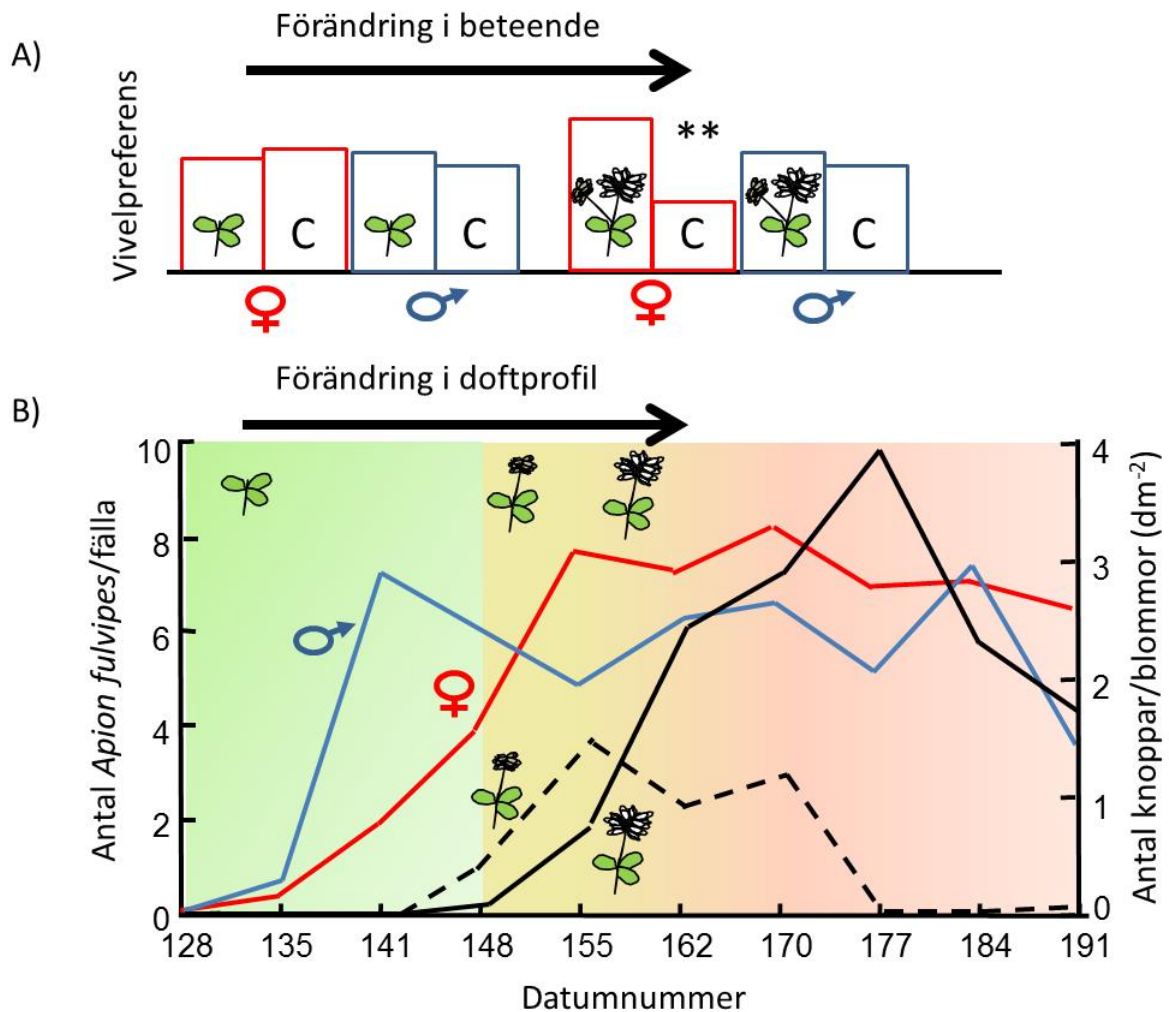
I tvåvals försök där vi studerade vivlarnas beteenderespons med hjälp av doftstimuli från växter med och utan knoppar och blommor kunde vi se att doften från klöverblad inte var attraktiv för vivlarna. När blommande växter användes föredrog honor av *A. fulvipes* doften av vitklöver över doften av rödklöver medan honor av *A. trifolii* inte visade någon tydlig



**Fig. 2.** Respons hos honor av rödbent klöverspetsvivel, *Apion trifolii*, som är specialiserad på rödklöver, och gulbent klöverspetsvivel, *A. fulvipes*, som är specialiserad på vitklöver, i tvåvals försök där doft från båda klöverarterna i blom- och knoppstadiet har används som stimuli. Medan *A. trifolii* inte diskriminerar mellan doftstimuli, uppehåller sig *A. fulvipes* hellre i zonen som innehåller doft av den egna värdväxten. \*\* indikerar signifikant skillnad ( $P < 0,01$ ).

preferens för någon klöverart (Fig. 2). Ett annat resultat som påvisade artskillnader var att hanar av *A. trifolii* attraherades till doften av blommande? rödklöver jämfört med kontroll medan hanar av *A. fulvipes* inte attraherades till varken vit- eller rödklöverdoft.

Förutom att peka på artskillnader visade våra försök med både hannar och honor att det är tydliga skillnader mellan könen, där honor generellt har starkare preferens för blommande klöver jämfört med kontroll (Fig 3A). Vi drar därmed slutsatsen att honor, men inte hannar ändrar sin preferens under värdväxtens utveckling (Nyabuga m. fl. manuscript).



**Fig. 3.** A) Tvåvelsexperiment i lab mellan doft från en värdväxt och kontrollbehandling (= C) visade att honvivelns preferens för sin värdväxt förändras under värdväxtens olika utvecklingsstadier (fenologi), vilket exemplifieras här med data från den gulbenta viveln (*A. fulvipes*). Det fanns en tydlig benägenhet att honorna föredrog klöverplantor med knoppar och blommor jämfört med plantor utan knoppar och blommor. Hanvivel uppvisade inga eller mindre skillnader i val mellan värdväxt och kontroll. \*\* indikerar en statistiskt signifikant skillnad ( $P < 0,01$ ). B) Veckovis insamling av vivel från klöverfält från slutet på maj fram till skörd jämfördes med klöverns fenologi och doftprofil. Här visas ett exempel från ett vitklöverfält där den gulbenta viveln (*A. fulvipes*) är dominerande. Både honor (röd linje) och hanar (blå linje) fanns i fältet redan innan knoppar (streckad linje) och blommor (svart linje) utvecklas. En analys av flera undersökta fält visade att antal honor, men inte antal hanar ökar när antalet knoppar blir fler. Våra kemiska analyser av klöverdofter visade en markant skillnad i vissa ämnen som samvarierade med klöverns fenologi.

#### Fångst av vivel och fenologi hos klöver

Genom att använda passiva skålfällor för att fånga vivelarna över hela säsongen i flera skånska fröodlingar och samtidigt studera blommingsfenologin hos både röd- och vitklöver kunde vi studera hur väl vivelns fenologi relaterar till värdväxtens. Vi fann stora skillnader i fångst av vivel mellan olika odlingar, men det var tydligt att vivelarna finns i låga antal i fälten redan innan klöver får knoppar och blommor (Fig. 3B, Nyabuga m. fl. manuscript).



Hos båda vivelarterna kunde vi också se att fångsten av honor, men inte hannar, var positivt korrelerad med blomningsfenologin, främst antalet knoppar hos klöver.

Fällorna som avgav olika blandningar av ämnen som ingår i klöverdoft fångade genomgående få vivlar trots att ett antal olika fälltyper användes, både för att fånga gående och flygande vivlar. Inga tydliga indikationer på att doftbetena påverkade vivlarna erhöles.

### Övervintringsplatser

Stor variation i vivelförekomst fanns både mellan olika fält och mellan olika kläckningstält inom samma fält eller fältkant. Kläckningstälten visade att vivlarna övervintrar både i och utanför tidigare klöverfält och att områdets historik av klöverfröodling spelar stor roll när det gäller förekomst av vivlarna.

### Studier av sexualferomoner hos vivlarna

Genom kemiska analyser av vivelextrakt har vi visat att hannar, men inte honor, producerar substansen geranylaceton. Detta skulle kunna vara ett möjligt sexualferomon, d.v.s. en substans som används för kommunikation inom arten, t.ex. attraktion av honor.

### Fångst av fjällsprötad grönglanssäckmal, *Coleophora deauratella*

Den utplacerade fällan fångade några tiotal hannar som skickades för molekylärgenetiska undersökningar till Schweiz. Arten kan således fångas med det kommersiella feromonet även här i Sverige.

## **Diskussion**

I detta projekt var ett mål att förstå vilka doftämnen och eventuella feromoner som påverkar klöverspetsvivlar. I linje med tidigare studier (Lundin m. fl. 2012, 2013) visade våra fältstudier att två arter av klöverspetsvivlar är de vanligaste i klöverfröodlingar. Den gulbenta klöverspetsviveln, *A. fulvipes*, är dominerande i vitklöver medan den rödbenta viveln, *A. trifolii* är den förhärskande i rödklöver i södra Sverige. Eftersom de olika vivelarterna uppvisar denna starka artpreferens var vi intresserade av att kartlägga de båda klöverarternas olika dofter och försöka koppla dessa till vivlarnas doftsinne. De resultat från elektrofysiologimätningar som idag är färdiganalyserade ger tydligt stöd för att *A. fulvipes* kan uppfatta klöverdofter. Beteendestudierna i lab visar dessutom att vivlar attraheras av vissa dofter mer än andra. Som väntat är ett generellt mönster att de föredrar doften från den klöverart de är specialiserade på, men det finns både art- och könsskillnader. I båda klöverarterna drogs honorna mer till klöver med knoppar och blommor. Ett intressant resultat från våra fältstudier, som tycks bekräfta att honor och hannar skiljer sig i doftpreferens även under mer naturliga förhållanden, är att antalet honor i klöverfälten är kopplat till antalet knoppar, medans hannar inte uppvisar ett sådant mönster. Även om vi ännu inte har kunnat klargöra vilka ämnen hos klöverknoppar som honorna attraheras till, så kan vi se en tydlig skillnad i doftprofil hos klöver över säsongen. Framtida studier har stor potential att identifiera dessa värdväxtdofter.

Förutom att använda sig av värdväxtdofter är det troligt att feromoner är viktiga för vivlarna i samband med parningen. Våra analyser av vivelextrakt av hannar och honor

identifierade ett ämne som skiljer sig mellan könen. I fortsatta beteende- och elektrofysiologistudier skulle man kunna testa om detta ämne är ett feromon och naturligtvis också leta efter andra feromonkandidater.

Ett möjligt slutmål med vårt projekt var att utveckla fällor för massfångst eller prognos av klöverspetsvivlar genom att använda antingen feromoner eller värdväxtdoftor. Sådan skadedjurskontroll ökar stadigt inom det svenska jordbruket (Witzgall m. fl. 2010) och har visat sig framgångsrik för andra vivelarter, bl. a. aggregationsferomoner för att attrahera honor (Cross m. fl. 2006; Rhino m. fl. 2010). Även om vi idag inte har fullständig kunskap om feromoner och värdväxtdoftor hos klöverspetsvivlar, så är den ökade förståelsen om vivlarnas doftkommunikation, som detta projekt har genererat, en grundbult för framtida studier av doftämnen och deras praktiska användning för skadedjurskontroll. Genom våra lyckade försök att fånga fjällsprötad grönglanssäckmal med tillgängliga feromonfällor, finns hopp om att liknande fällor skulle kunna vara användbara för klöverspetsvivlar. För ekologiska klöverfröodlingar finns idag mycket få kontrollmetoder av klöverspetsvivlar. En möjlig, men lågeffektiv metod är att lägga klöverfält en bit ifrån föregående års odlingar (Langer & Rohde 2005). Våra studier av vivlarnas övervintringsplatser visade att vivlarna ofta övervintrar nära klöverfält, vilket i kombination med låg spridningsförmåga kan vara förklaringen till att det kan fungera som växtskyddsmetod att flytta fält. I framtida studier skulle man kunna undersöka mer i detalj hur vivlarnas övervintring och spridning ser ut, t.ex. i ett landskapsperspektiv med kunskap om tidigare klöverfält. Sådana ökade insikter skulle kunna vara möjliga att använda som prognosverktyg för varje enskilt fält, men kräver mer detaljerade kunskaper om vivlarnas ekologi.

## Publikationer

- Andersson, M.N., Larsson, M.C., Svensson, G.P., Birgersson, G., Rundlöf, M., Lundin, O., Lankinen, Å. and Anderbrant, O. 2012. Characterization of olfactory sensory neurons in the white clover seed weevil, *Apion fulvipes* (Coleoptera: Apionidae). *Journal of Insect Physiology* 1325-1333. DOI: 10.1016/j.jinsphys.2012.07.006
- Svensson, G. 2011. Till klöverfröets räddning: Forskare letar efter dofter som ska lura klöverspetsvivlarna. *Ekologiskt lantbruk* 7/2011:19-20. (Övriga författare bortrensade av redaktören utan vår vetskap) <http://ekolantbruk.se/pdf/55588.pdf>
- Lankinen, Å., Anderbrant, O., Andersson, M.N., Birgersson, G., Larsson, M.C., Lundin, O., Rundlöf, M. och Svensson, G. 2012. Bekämpning av klöverspetsvivlar i klöverfröodling: Ny forskning tar hjälp av insekternas kemiska doftspråk. *Svensk Frötidning* 2/12:32-34. <http://www.svenskraps.se/kunskap/pdf/01489.pdf>

## Slutsatser

Projektet har framför allt lagt grunden för de fortsatta undersökningarna av klöverspetsvivlarnas ekologi och kemiska kommunikation. Vi har funnit att vivlarna övervintrar i och i närheten av tidigare klöverfält och att tätheten kan variera mycket även över korta avstånd. *Apion trifolii* och *A. fulvipes* är specialiserade på sina respektive klöverarter, bl. a. på grund av doftpreferenser. Detta visar att man bör undvika att kontinuerligt odla samma klöverart inom samma område. Antalet klöverspetsvivlar som fångas

i passiva fällor (utan doftbete) ökar i takt med klöverns tillväxt, knoppsättning och blomning, i synnerhet gäller detta för honorna. Mönstret är ungefär detsamma för båda arterna och utgör en viktig grund för att kunna använda fällfångst som indikation för kommande skador. Klöverspetsvivlarnas förmåga att uppfatta en lång rad flyktiga ämnen gör att förutsättningarna finns att hitta någon form av doftbaserad metod som t. ex. effektiviserar övervakningen.

### **Resultatförmedling till näringen**

- 2012-01-30: Workshop för SW Seeds enheter för vallfrö, förädling, utveckling och försäljning, Svalöv, (Maj Rundlöf).
- 2012-05-25: Fältvandring ekologisk klöverproduktion, Kvidinge, arrangerad av Hushållningssällskapet (Olle Anderbrant).
- 2012-05-29: Fältvandring i Fellingsbro och Kungsör för röd- och vitklöverfröodlare arrangerad av Hushållningssällskapet (Ola Lundin).
- 2012-08-16: Referensgruppsmöte för annat SLF projekt om rödklöver, tillsammans med Svalöf-Weibull växtförädlare (Åsa Lankinen).
- 2012-11-01 Presentation på temadag i Alnarp om biologisk bekämpning och dess roll i integrerat växtskydd. Arrangerat av Kompetenscentrum för biologisk bekämpning (CBC) vid SLU tillsammans med Jordbrukverket och Partnerskap Alnarp (Ola Lundin).
- 2013-02-20: Möte med projektets referensgrupp, Lund (hela projektgruppen).
- 2013-02-26: Presentation om bekämpningströsklar och feromonfällor för klöverspetsvivlar på Södra Sveriges Frö- och Oljeväxtodlares fröodlardag på Bjärsjölagård (Maj Rundlöf).
- 2013-02-27: Presentation om klöverspetsvivlarnas kemiska ekologi på Jordbruksverkets FoU dag i Linköping (Glenn Svensson).
- 2013-07-22: ERFA-gruppmöte om rödklöverfröodling på Rosersbergs gård i nordvästra Skåne (Maj Rundlöf).
- 2014-01-20: Lägesrapport från projektet på klöverfrödag i Alnarp arrangerad av Sveriges Frö- och Oljeväxtodlare i samarbete med fröföretagen. För odlare i södra Sverige (Olle Anderbrant, Ola Lundin, Maj Rundlöf).
- 2014-01-20: Möte med projektets referensgrupp, Alnarp (projektgruppen).
- 2014-03-25: Lägesrapport från projektet på klöverfrödag i Vänersborg arrangerad av Sveriges Frö- och Oljeväxtodlare i samarbete med fröföretagen. För odlare i västra Mellansverige (Ola Lundin).
- 2014-03-26: Lägesrapport från projektet på klöverfrödag i Norrköping arrangerad av Sveriges Frö- och Oljeväxtodlare i samarbete med fröföretagen. För odlare i östra Mellansverige (Ola Lundin).
- 2014-06-24: Fältvandring i Norregårdens klöverfröodling, sydvästra Skåne, organiserad av Odling i balans (Maj Rundlöf).

Projektet har en enkel hemsida med länkar till bidragsgivarna SLF och SLU EkoForsk <http://www.lu.se/pheromonegroup/research/control-of-pest-insects-in-clover-seed-production>. Texten finns även på svenska: [http://www.lu.se/upload/biologi/pheromone/cloverproject\\_sw.pdf](http://www.lu.se/upload/biologi/pheromone/cloverproject_sw.pdf)

### **Citerad litteratur**

Buttery R.G., Kamm J.A., Ling L.C. 1984. Volatile components of red clover leaves, flowers, and seed pods: possible insect attractants. J. Agric. Food Chem. 32:254-256.

- Cross J.V., Hall D.R., Innocenzi P.J., Hesketh H., Jay C.N., Burgess C.M. 2006. Exploiting the aggregation pheromone of strawberry blossom weevil *Anthonomus rubi* (Coleoptera: Curculionidae): part 2. Pest monitoring and control. *Crop Prot.* 25:155-166.
- Evenden M.L., Mori B.A., Gries R., Otani J. 2010. Sex pheromone of the red clover casebearer moth, *Coleophora deauratella*, an invasive pest on clover in Canada. *Entomol. Exp. Appl.* 137:255-261.
- Figueiredo R., Rodrigues A.I., Costa M.D. 2007. Volatile composition of red clover (*Trifolium pratense* L.) forages in Portugal: The influence of ripening stage and ensilage. *Food Chem.* 104:1445-1453.
- Folkesson Ö. 2009. Vivelvarning i klöverfrö. *Svensk frötidning* 3:12-15.
- Hansen L.M., Boelt B. 2008. Thresholds of economic damage by clover seed weevil (*Apion fulvipes* Geoff.) and lesser clover leaf weevil (*Hypera nigrirostris* Fab.) on white clover (*Trifolium repens* L.) seed crops. *Grass Forage Sci.* 63:433-437.
- Honkanen, E., Moisio, T., Karvonen, P. 1969 Studies on the volatile flavour substances in some clover species. *Suomen Kem.* 42:448-&
- Jones M.J. 1950. Clover seed weevils. *Proceedings of the Association of Applied Biologists* 37:313-320.
- Kigathi R.N., Unsicker S.B., Reichelt M., Kesselmeier J., Gershenzon J., Weisser W.W. 2009. Emission of volatile organic compounds after herbivory from *Trifolium pratense* (L.) under laboratory and field conditions. *J. Chem. Ecol.* 35:1335-1348.
- Langer, V., Rohde, B. 2005. Factors reducing yield of organic white clover seed production in Denmark. *Grass and Forage Science* 60: 168-174
- Lundin O. 2008. Seed eating weevils and their natural enemies in Swedish red clover seed production – effects of landscape type and insecticide use on biological control. Examensarbete i Miljövetenskap, Lunds universitet.
- Lundin O. 2009. Klöverspetsvivar i rödklöverfröodling – naturliga fiender hjälper till. *Svensk Frötidning* 3:16-17.
- Lundin O. 2013. Ecology and management of crop pollination and pest control, insights from red clover seed production. PhD thesis. Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala
- Lundin O., Rundlöf M., Smith H.G., Bommarco R. 2012. Towards integrated pest management in red clover seed production. *J. Econ. Entomol.* 105:1620-1628.
- Markkula, M., Myllymaki, S. & Kanervo, V.(1964). The abundance of seed pests of red clover in Finland and the effect of certain factors on their abundance. *Annales Agriculturae Fenniae*, 3:95-132.
- Rhino B., Dorel M., Tixier P., Risede J.M. 2010. Effect of fallows on population dynamics of *Cosmopolites sordidus*: toward integrated management of banana fields with pheromone mass trapping. *Agric. For. Entomol.* 12:195-202.
- Smith C.M., Frazier J.L., Knight W.E. 1976. Attraction of clover head weevil, *Hypera meles*, to flower bud volatiles of several species of *Trifolium*. *J. Insect Physiol.* 22:1517-1521.
- Thorup-Kristensen K., Magid J., Jensen L. S. 2003. Catch crops and green manures as biological tools in nitrogen management in temperate zones. *Adv. Agron.* 79:227-302.
- Wee S.L., El-Sayed A.M., Gibb A.R., Mitchell V., Suckling, D.M. 2008. Behavioural and electrophysiological responses of *Pantomorus cervinus* (Boheman) (Coleoptera: Curculionidae) to host plant volatiles. *Australian J. Entomol.* 47:24-31.
- Witzgall P., Kirsch P., Cork A., 2010. Sex pheromones and their impact on pest management. *J. Chem. Ecol.* 36:80-100.