

BRUK AV NYTTENEMATODER TIL BEKJEMPELSE AV GRANSNUTEBILLEN (*Hylobius abietis*)

Solveig Haukeland
Bioforsk Plantehelse, Ås

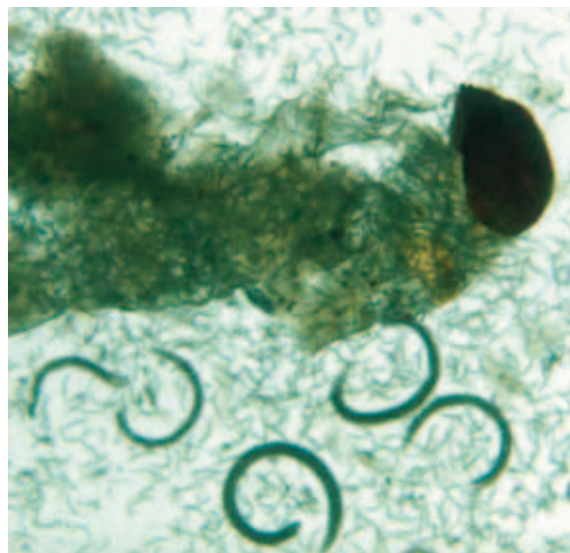
Innledning

Gransnutebilleren gjør stor skade i granplantninger over hele Europa og kan føre til stort økonomisk tap dersom det ikke settes inn tiltak (Langström & Day, 2004). De voksne billene blir lokket til nye hogstflater av duftene fra hogstavfall og stubber. Billene legger egg i røttene til de ferske stubbene, og larvene utvikler seg i innerbarken. De voksne billene lever lenge og eggleggingen kan skje i to sesonger. Når den nye billegenerasjonen klekker fra stubbene etter 1–2 år begynner de også å ete på de små bartreplantene. Billene kan «ringbarke» plantene og plantedødeligheten på en hogstflate kan bli nesten 100 %, (Christiansen 1971, Langström & Day 2004). Skadene kan strekke seg over fire år etter hogst. Den mest vanlige bekjempelsesmetoden er forebyggende påføring av et pesticid for å beskytte bartreplantene før utplanting. Fra 2006 er bruk av permentrin ikke lenger tillatt. I Norge er preparatene Merit Forest (Imidakloprid) og Karate Zeon godkjent til formålet (februar 2007) (<http://landbrukstilsynet.mattilsynet.no/plantevernmidler/godk.cfm>), men det er begrenset erfaring med disse preparatene til bruk mot snutebiller, i skog.

I prosjektet har vi studert nyttenematoder som et mulig alternativ eller supplement til bekjempelse av gransnutebilleren. Metoden går ut på å redusere antall nye generasjoner av gransnutebiller ved å drepe så mange larver som mulig i stubbene på hogstflater hvor de lever.

Nematoder (rundormer) er små, uleddete mark som vanligvis ikke kan sees med det blotte øye (Lee 2002). De finnes i nesten alle miljøer, inkludert ørkener, arktiske og antarktiske strøk, ferskvann og jord. Det er en svært artsrik gruppe og forekommer ofte i enorme individantall. Nematoder kan grovt deles inn i tre kategorier: Frittlevende arter, dyreparasitter og planteparasitter (Hågvær 1996, Lee 2002). Med nyttenematoder menes nematoder som kan brukes i biologisk bekjempelse av skadeinsekter (Gaugler 2002). Disse nematodene lever bare av insekter og tilhører kategorien dyreparasitter. De viktigste artsgruppene er *Steinernema* spp. og *Heterorhabditis* spp. Nytteneamatoder lever i

jorda der de oppsøker eller venter på muligheten til å smitte en insektlarve. Nematoden trenger seg inn i insektlarven og dreper den raskt ved hjelp av en medbrakt bakterie. Deretter skjer det en oppformering av nematodene inne i den døde larven, og etter en viss tid utvikles en ny generasjon nematoder som kan oppsøke nye insekter (figur 1). I naturen er det ikke vanskelig å finne disse nematodene ved å ta jordprøver som analyseres. I Norge har vi foreløpig påvist syv arter, og på verdensbasis er omlag 50 arter beskrevet så langt (Spiridonov et al. 2004). Flere arter av nyttenematoder masseproduseres i Europa (bl.a. England, Tyskland og Nederland) og kan kjøpes for bruk til biologisk bekjempelse av skadeinsekter i forskjellige plantekulturer (Grewal et al. 2005). I Norge er nyttenematoder hovedsakelig brukt mot hærmygg i veksthusproduksjon, mot rotsnutebiller i jordbær på friland og noe i produksjon av pryddplanter. Men det er muligheter for bruk på andre områder i fremtiden.



Figur 1. Død gransnutebillelarve drept av nyttenematoden *Steinernema carpocapsae* (Foto S. Haukeland)

Materiale og metoder

Kartlegging

Jordprøver fra 1–3 år gamle hogstflater ble undersøkt for naturlig forekomst av nyttenematoder. På hver hogstflate som skulle undersøkes tok vi ut jordprøver med en jordbor (Ø 2,5 cm). En prøve inneholdt jord fra flere «stikk» tatt rundt stubben og langs røttene ut til 1 meter fra stubben, og ned til en dybde på mellom 15 og 30 cm. I noen tilfeller ble prøven delt inn i organisk/strø og mineraljord. Størrelsen på jordprøven var minst en liter. For å isolere nyttenematoder fra jordprøvene brukes voksmøllarver (*Galleria mellonella*) som åte. En halv liter av hver prøve ble lagt i en plastboks (med lokk) sammen med 3 friske voksmøllarver. Vi undersøkte larvene etter en og to uker. Døde larver ble tatt vare på og undersøkt for nyttenematoder. Funn av nyttenematoder i larvene ga muligheten for videre dyrking av nematoder på nye voksmøllarver. Identifikasjon av isolatene ble utført i mikroskop og til dels ved hjelp av molekylære metoder (RFLP) (Kaya & Stock 1997, Haukeland et al. 2006).

Forsøk i laboratoriet

Temperaturforsøk

Vi testet nyttenematodene isolert fra skogsjord på larver av rotsnutebillen (*Otiorhynchus sulcatus*). Formålet var å undersøke om de norskisolerte nematodene var mer tolerante for lav temperatur enn kommersielle nematodepreparater.

Rotsnutebillelarver ble lagt enkeltvis i 12 små brønner, hver brønn fylt med fuktet torv og tilsatt 200 nematoder i ca. 1 ml vann. Ubehandlet kontroll var tilsatt lik mengde vann. Temperaturene i forsøkene var 6, 12 og 18 °C. Omfanget var 8 forskjellige nyttenematoder, hvorav 5 norske og 3 kommersielle (norsk-isolerte *Steinernema* spp.: Nor 1- Nor 5. Kommersielle fra Becker Underwood: *S. feltiae*, *S. kraussei* og *Heterorhabditis megidis*).

Effektivitetsforsøk

Utvalgte nyttenematoder (tre norske nematodeisolater og et kommersielt preparat, *S. carpocapsae*) ble testet på larver, pupper og voksne gransnutebiller. Insektene var plukket fra røtter rundt stubber på et hogstfelt som beskrevet av Pezet (2005). En larve, puppe eller voksen var plassert enkeltvis i et 30 ml plastbeger uten føde, deretter fylt med 25 ml fuktet torv og tilsatt 200 nematoder eller vann (kontroll) i 1 ml løsning. I et annet forsøket med *S. car-*

pocapsae og gransnutebillelarver ble det brukt større beger (500 ml) og 1000 nematoder per beger for å undersøke om nematodene kunne forflytte seg 10 cm gjennom torven til larven. I dette forsøket fikk larvene bark som føde. Forsøkene var utført ved 17 °C og avsluttet etter to uker. Døde og levende insekter ble registrert og undersøkt for nematodeinfeksjon.

Forsøk på hogstflater

Forsøk med bruk av nyttenematoder var utført på to hogstflater, høsten 2004 og sommeren 2006. Flatene var felt (hogd) henholdsvis vinteren 2002/2003 og vinteren 2004/2005.

Høsten 2004 spredde vi ut nematoder (*S. kraussei* Becker Underwood) i vannløsning rundt 10 stubber på hogstflaten (figur 2). Løsning med nyttenematoder som inneholdt 2,5 millioner nematoder per liter ble vannet ut rundt stubben i en avstand fra 0 til 50 cm fra stubben. Hver stubbe fikk en liter nematodeløsning. Våren 2005 tok vi ut jordprøver for å undersøke overlevelse av de utsatte nematodene. For å finne gransnutebillelarver eller -pupper pirket vi bort barken på stubbens røtter.

Sommeren 2006 vannet vi ut nematoden *Steinernema carpocapsae* (Becker Underwood) rundt stubber på samme måte som i 2004. Hogstflaten var delt i 4 gjentak. Hvert gjentak besto av fem stubber behandlet med 3 millioner nematoder og fem ubehandlede stubber. Røttene til halvparten av hver stubbe ble gravd frem og undersøkt for overlevende larver og pupper av gransnutebillen en måned etter behandlingen med nematodene.



Figur 2. Vanning av nyttenematoder rundt en stubbe.

Resultater

Kartlegging

Tabell 1 viser funn av nyttenematoder (*Steinernema* spp.) i jordprøver fra utvalgte hogstflater (2003–2005).

Tabell 1. Naturlig forekomst av *Steinernema*-arter (nytteneamatoder) fra flere hogstfelt og jordprøver tatt i 2003–2005.

Lokalitet og feltype	Antall prøver	Antall prøver med <i>Steinernema</i> spp.
AKERSHUS		
Kråkstad 1 år etter hogst	3x3 (9)	8
Kråkstad 3 år etter hogst	3x3 (9)	3
Kråkstad bestand	3x3 (9)	2
Kråkstad kantvegetasjon	3 (samleprøver)	2
Ski I	10	8
Ski II	10	5
Ski III	10	5
Vestby	19	16
TELEMARK		
Lidalen (Notodden) 2 år etter hogst	20 (øvre lag/organisk jord)	5
Lidalen (Notodden) 2 år etter hogst	20 (nedre lag/mineraljord)	5

Forsøk i laboratoriet

Resultater fra forsøkene ved ulike temperaturer er vist i tabell 2. Ved 18 °C var det over 80 % mortalitet for larvene og lite variasjon mellom nematode isolatene. Det var noe mer variasjon i forsøkene ved

12 °C hvor mortaliteten var noe lavere (mellom 40 og 60 %, men et isolat ga 79 % mortalitet). Det var en tendens til lavere mortalitet ved 6 °C spesielt for *S. carpocapsae* og ingen mortalitet av larvene for *H. megidis*.

Tabell 2. Mortalitet (%) av rotsnutebillelarver (*O. sulcatus*) etter 2 eller 3 ukers eksponering for forskjellige nyttenematoder ved ulike temperaturer.

Nyttenematode art eller isolat (eksponerings tid i uker)	Mortalitet (%)		
	18 °C	12 °C	6 °C
<i>Steinernema</i> sp. Nor 1 (2)	92	58	12
<i>Steinernema</i> sp. Nor 2 (2)	79	62	8
<i>Steinernema</i> sp. Nor 2 (3)	100	42	12
<i>Steinernema</i> sp. Nor 3 (3)	100	46	17
<i>Steinernema</i> sp. Nor 4 (3)	100	33	25
<i>Steinernema</i> sp. Nor 5 (3)	100	62	5
<i>S. carpocapsae</i> Nor (2)	92	33	8
<i>S. carpocapsae</i> Nor (3)	100	58	4
<i>S. carpocapsae</i> Nor (3)	100	42	4
<i>S. feltiae</i> (Becker Underwood) (2)	96	37	27
<i>S. feltiae</i> (Becker Underwood) (3)	87	37	25
<i>S. kraussei</i> (Becker Underwood) (3)	100	50	25
<i>Heterorhabditis megidis</i> (Becker Underwood) (3)	92	79	0

Tabell 3. Effekt av fire nytteneisoler mot larver og pupper av gransnutebiller.

Behandling	Mortalitet i % for larver	Mortalitet i % for pupper
Steinernema sp. Nor 1	80	80
Steinernema sp. Støk 1	70	40
S. kraussei (Becker Underwood)	57	70
Kontroll (vann)	63	50
S. carpocapsae Nor 2	40	-
Kontroll (vann)	30	-

Resultatene fra forsøkene med gransnutebillelarver og -pupper er summert i tabell 3. Forsøkene med voksne gransnutebiller er ikke tatt med, fordi mer enn halvparten av insektene rømte fra plastbegrene.

For forsøket med puppene, var det statistisk sikker forskjell mellom kontroll og nytteneisolatebehandlingen (student t-test $\alpha = 5\%$, $p = 0,015$), men ikke mellom nematodeisolatene. For forsøket med larvene var det ikke signifikante forskjeller mellom behandlingene. Kontrollmortaliteten var noe høy (63%). For forsøket med *S. carpocapsae* var det ikke signifikant (t-test) forskjell i mortalitet mellom behandlede og ubehandlede larver.

Feltforsøk

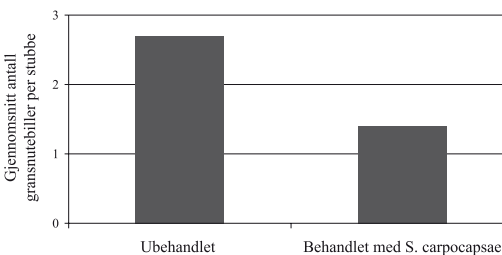
Det ble funnet svært få gransnutebillelarver i stubbene fra forsøket høsten 2004. Effekten av nematode-utslippet kunne derfor ikke påvises. Det ble imidlertid vist at de utslupne nematodene overvintret i jorda rundt stubbene.

I feltforsøket sommeren 2006 ble larver, pupper og voksne gransnutebiller registrert i stubbene (figur 3). Som i 2005 var det varierende antall larver og pupper i stubbene (fra 0 til 8 per stubbe). Gjennomsnitt antall levende gransnutebillelarver og -pupper per stubbe var 2,7 (standardavvik 2,1) for ubehandlet, og 1,4 (standardavvik 1,9) for behandlet med *S. carpocapsae* (figur 4). Det var ikke statistisk forskjell mellom behandlingene ($p = 0,055$, enveis varians analyse).



Figur 3. Registrering av overlevende insekter i feltforsøk, fire uker etter utslipp av nytteneisolatet *S. carpocapsae*.

Effekt av nytteneisolatet *Steinernema carpocapsae* på gransnutebiller i stubber på en hogstflate (n=38)



Figur 4. Resultater fra en behandling med *S. carpocapsae* mot gransnutebiller i stubber på et hogstfelt.

Diskusjon

Resultater fra kartleggingsstudiene viste at arter av nytteneisolatet *Steinernema* er ganske vanlig forekommende på hogstflater, dette er også påvist i tidligere kartlegging i andre områder i Norge (Salinas 2002). Arten *S. kraussei* var mest vanlig. Studier i andre land tyder på at denne arten er mest vanlig i skogsjord (Spiridonov et al. 2004). Kartlegging for nytteneisolater i Norge er gjort tidligere, hovedsakelig på dyrket mark, og viser at de forekommer i hele landet fra sør, langs kysten, til nord (Svanvik i Sør-Varanger) (Haukeland 1993, Salinas 1996). Kartlegging for nytteneisolater er viktig for å øke kunnskapen om forekomst av nye arter i landet som kan studeres videre til bruk i biologisk bekjempelse eller andre studier.

I forsøkene ved ulike temperaturer med rotsnutebillelarver fant vi at noen av de norskeisolerte artene er aktive (dvs. kan infisere og drepe larven) ved lav temperatur (6 °C), men to kommersielle preparater var også virksomme ved samme temperatur. Flere forsøk mot gransnutebillelarver, også med flere nytteneisolater, er nødvendig før noen endelig konklusjon kan trekkes om at en norskeisolert nematode er mer aktiv ved lav temperatur enn de tilgjengelige kommersielle preparatene. En nytteneisolate som er aktiv ved lave temperaturer (under 12 °C) vil være effektiv mot gransnutebillelarver eller -pupper i en lengre periode av vekstsesongen.

I forsøkene med gransnutebille (larver og pupper) var det en forholdsvis høy mortalitet i kontrollen, sannsynligvis fordi insektene ikke fikk mat. Men det var aldri påvist nematodeinfeksjon i kontrollarvene. I det andre forsøket med *S. carpocapsae*, der larvene fikk bark å spise på, var mortaliteten i kontrollen lavere. Men her var det lav mortalitet av larvene behandlet med *S. carpocapsae*. Dette kunne skyldes at larvene åt seg inn i barken for å unngå å bli infisert med nematodene. En lengre eksponering, for eksempel en uke til, hadde kanskje gitt en høyere mortalitet. Likevel viste forsøket at nematodene kunne forflytte seg gjennom torv og infisere larven 10 cm unna.

Erfaringene fra feltforsøkene viste at det var vanskelig å bedømme om et felt var godt egnet for forsøk med nematoder med hensyn til antall larver i stubbene. Det var stor variasjon i mengden gransnutebiller i stubbene noe som gjorde det vanskelig å få tilstrekkelige data for statistisk analyse. Det var også svært tidkrevende å finne larver i røttene på stubber. I videre arbeid kan det tenkes at en laboratorieoppformering av larver, ved å samle inn biller som legger egg, kunne være nyttig. Men også med denne metoden er det ikke alltid lett å få nok materiale. I et laboratorieforsøk der 20 furukubber ble smittet naturlig med eggleggende gransnutebiller var 5 kubber helt uten larver. For de resterende kubbene var gjennomsnittet 3,9 larver/pupper per kubbe, med funn fra en til ti larver/pupper per kubbe (Eidet 1999).

En viktig del av arbeidet var praktisk utprøving av nyttenematoder i felt for å få erfaring med metoden. Resultatene fra feltforsøket i 2006 viste at det var en tendens til færre insekter i stubbene behandlet med nyttenematoder sammenlignet med ubehandlede stubber. Det var en reduksjon i antall gransnutebiller på litt over 50 %. Arbeider fra lignende forsøk i Irland har gitt tilsvarende resultater (Dillon et al. 2006) med *S. carpocapsae*. En annen nematodeart (*Heterorhabditis downesi*) fra Irland viste seg å være mer effektiv og ga en reduksjon i antall insekter per stubbe på 87 %. I Storbritannia, spesielt i Skottland, har nyttenematoder blitt tatt i praktisk bruk i bekjempelse av gransnutebiller, og i 2003 ble over 200 ha hogstflater behandlet. Resultatene fra Irland og Skottland tyder på at bruken av nyttenematoder kan være en bekjempelsesmetode mot gransnutebiller, men den må brukes sammen med andre kulturtiltak (Dillon et al. 2006).

Konklusjon

Forsøkene viste at nyttenematoder kan drepe både larver og pupper av gransnutebiller og at norskisolerte nyttenematoder kan være effektive. Det ble oppnådd nyttig erfaring både med gransnutebiller og i bruk av nyttenematoder i felt på hogstflater. Videre arbeid med nyttenematoder og gransnutebiller bør fokusere på testing av norskisolerte nyttenematoder og praktisk bruk av nyttenematoder i felt.

Abstract

The large pine weevil, *Hylobius abietis* L. (Coleoptera: Curculionidae), is a major economical pest of young conifers throughout Europe and Asia. This pest causes severe damage and mortality to conifer seedlings that have not been protected. In consequence it is the only forest pest for which prophylactic chemical treatment is routine in many countries, including Norway. In this study we investigated the use of entomopathogenic nematodes against the immature stages of *H. abietis*. Entomopathogenic nematodes in the genera *Steinernema* and *Heterorhabditis* are used for biological control of certain pest insects. *H. abietis* weevils are attracted to clear cut areas and lay their eggs around stumps of pine or spruce. The immature stages (larvae/pupae) are found in the roots of the stumps. For control of this pest the aim is to reduce numbers of emerging weevils from stumps by killing the larvae and pupae with entomopathogenic nematodes by applying them around stumps.

To investigate the natural occurrence of entomopathogenic nematodes in forest soils we conducted several surveys in clear cut areas. *S. kraussei* was found to be most common. Some of the isolated nematodes from forest soil were tested for activity at low temperature. A few of the Norwegian isolates were active at low temperature (6 °C) but not more than commercial *S. feltiae* and *S. kraussei*.

In laboratory studies against *H. abietis* larvae and pupae, 80 % mortality was achieved against pupae and larvae for one of the Norwegian isolates.

Two field trials were conducted. Treatments were 2,5 million *S. kraussei* or 3 million *S. carpocapsae* applied to stumps. The number of larvae and pupae per stump was low and variable for the first trial (*S. kraussei*) so that no conclusions of the treatment could be made. In the second trial the num-

bers of insects (larvae, pupa and adult *H. abietis*) were reduced by just over 50 % in the stumps treated *S. carpocapsae*, compared to untreated stumps, but not significantly so.

These studies showed that larvae and pupae are susceptible to infections by entomopathogenic nematodes. Studies in Ireland and Scotland in the UK indicate that use of entomopathogenic nematodes as an alternative control method against *H. abietis* could be considered, but should be used together with silvicultural methods to minimize damage caused by this pest.

In Norway further field trials are necessary as well as studies on the efficacy of the different local nematode isolates.

Litteratur

- Christiansen, E. 1971. Time of attack in young reforestation areas by the Pine weevil (*Hylobius abietis* L.) (Coleoptera, Curculionidae) during feeding and oviposition. Meddelser fra Det norske Skogforsøksvesen 28: 421–427.
- Dillon, A.B., Ward, D., Downes, M.J. & Griffin, C.T. 2006. Suppression of the large pine weevil *Hylobius abietis* (L.) (Coleoptera: Curculionidae) in pine stumps by entomopathogenic nematodes with different foraging strategies. Biological Control 38, 217–226.
- Eidet, R.E. 1999. Bruk av den insektpatogene nematoden *Steinernema feltiae* mot gransnutebillen, *Hylobius abietis* L.: Spredning og infeksjon av *S. feltiae* i felt- og laboratorieforsøk. Hovedfagsoppgave i økologisk entomologi. Universitetet for miljø- og biovitenskap, Ås 85 s.
- Gaugler, R. (Ed). 2002. Entomopathogenic nematology. CABI publishing UK. 388 Pp.
- Grewal, P.S., Ehlers, R-U. & Shapiro-Ilan, D.I. (Eds.) 2005. Nematodes as biological pest control agents. Cabi publishing, UK. 505 pages.
- Haukeland, S. 1993. Entomopathogenic nematodes found in Norway. Norwegian Journal of Agricultural Sciences 7: 17–27.
- Haukeland, S. Klingen, I. & Brurberg, M.B. 2006. An overview of entomopathogenic nematodes in the Nordic countries including a first report of *Steinernema carpocapsae* (Steinerneatidae: Rhabditida). Russian Journal of Nematology 14, 139–146.
- Håggvar, E. 1996. Det zoologiske mangfoldet – Dyregruppenes systematikk, bygning og biologi. Universitetsforlaget, Oslo. 383 s.
- Kaya H.K. & Stock, S.P. 1997. Techniques in insect nematology. I: Lacey, L (Ed) Manual of techniques in insect pathology. Academic Press USA. 281–324 pp.
- Langström, F. & Day, K.R. 2004. Damage, control and management of weevil pests, especially *Hylobius abietis*. I: Lieutier, F., Day, K.R., Battisti, A. Grégoire, J.-C. & Evans, H.F. (Eds.), Bark and wood boring insects in living trees in Europe, a synthesis. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, pp. 415–444.
- Lee, D.L. 2002 (Ed). The biology of nematodes. Taylor & Francis, London New York. 635 pp.
- Pezet, J. 2005. Entomopathogenic nematodes against the large pine weevil *Hylobius abietis* (L.). Internship report, Ecole National Supérieure Agronomique de Toulouse. (Tilgjengelig ved Bioforsk Plantehelse.).
- Salinas, H. S. 1996. Nematoder som nyttedyr – naturlig forekomst i Norge. Gartneryrket nr. 7: 13–17.
- Salinas, H. S. 2002. Entomopathogenic nematodes in Norwegian forest soils. Nematology 4: 197
- Spiridonov, S.E., Reid, A.P., Podrucka, K., Subbotin, S.A. & Moens, M. 2004. Phylogenetic relationships within the genus *Steinernema* (Nematoda: Rhabditida) as inferred from analyses of sequences of the ITS1–5.8S-ITS2 region of rDNA and morphological features. *Nematology* 6: 547–566.

Websider

<http://www.cost850.ch/>: COST 850 sine websider om nytteneematoder

www.entom.slu.se/snytbagge/index.htm: Sveriges Landbruksuniversitet sine websider om gransnutebillen