

***Coccinella septempunctata*'s (Coleoptera: Coccinellidae) respons på
E-(β)-farnesen, 2-isopropyl-3-methoxypyrazin og *Sitobion avenae*
(Hemiptera: Aphididae) testet i 4-arm-olfaktometer**

**Speciale i miljøbiologi af
Kit Palmkvist Hansen og Christina Larsson**

Vejledere:
Søren Achim Nielsen (intern) og Hans Peter Ravn (ekstern)

Roskilde Universitetscenter 2006

Forord

En varm tak til vores interne vejleder Søren Achim Nielsen, Roskilde Universitetscenter og eksterne vejleder Hans Peter Ravn fra Center for Skov, Landskab og Planlægning, Den Kgl. Veterinær- og Landbohøjskole for utrættelig vejledning.

Her følger en tak til alle, der har svaret på vores spørgsmål og taget sig tid til at mødes med os for at diskutere vores forsøgsopstilling mv.

Ole Kilpinen, Plantebeskyttelse og Skadedyr, Forskningscenter Sorgenfri, Kgs. Lyngby takkes for erfaringsudveksling af olfaktometeropstilling, computer analyseprogram samt vejledning i brug heraf.

Tak til Jan Pettersson, Institutionen för entomologi, Sveriges Lantbruksuniversitet, Uppsala, for møde og e-mailkorrespondance med erfaringsudveksling af olfaktometeropstilling og gode diskussioner.

Michael Birkett, Rothamsted Research, England takkes for svar på vores spørgsmål ang. artikler og olfaktometeropstilling.

Jan-Ole Nielsen, Ingeniørassistent, Roskilde Universitetscenter takkes for teknisk assistance.

Kjeld Schaumburg og Henrik Jespersen ved Roskilde Universitetscenter skylder vi en tak for imprægnering af farnesen imprægneret i silikone.

Fritz Duus, Roskilde Universitetscenter takkes for konsultation af kemiske spørgsmål.

Karsten Dromph, Den Kgl. Veterinær- og Landbohøjskole takkes for besigtigelse af olfaktometeropstilling samt svar på spørgsmål herom.

Abstrakt

Mariehønen *Coccinella septempunctata*'s respons på E-(β)-farnesen (150 ng/ μ l), E-(β)-farnesen imprægneret i silikone (500 mg), 2-isopropyl-3-methoxy-pyrazin (0,00747 ng/ μ l) og kornbladlusen *Sitobion avenae* (45 stk.) blev undersøgt i 4-arm-olfaktometer.

Det var forventet, at *C. septempunctata* blev tiltrukket af teststofferne og duft fra *S. avenae* og opholdte sig i signifikant længere tid i testarmen end i kontrolarmene.

C. septempunctata's procentvise opholdstid i hver af de fire arme i olfaktometret blev udregnet på baggrund af videooptagelse med webkamera, der efterfølgende blev analyseret i et billedbehandlingsprogram.

Der kunne ikke påvises en tiltrækning af *C. septempunctata* til E-(β)-farnesen og 2-isopropyl-3-methoxy-pyrazin.

C. septempunctata's respons på E-(β)-farnesen og 2-isopropyl-3-methoxy-pyrazin afgøres sandsynligvis af en koncentrationsforskel mellem henholdsvis E-(β)-farnesen og 2-isopropyl-3-methoxy-pyrazin og andre duftstoffer.

C. septempunctata blev frastødt af E-(β)-farnesen imprægneret i silikone i intervallerne 0-2 minutter og 0-4 minutter, når opholdstiden i testarmen blev sammenlignet med opholdstiden i den overforliggende kontrolarm. En frastødning kan forklares ved en for høj koncentration af E-(β)-farnesen imprægneret i silikone.

Det kunne påvises, at *C. septempunctata* blev frastødt af duft fra *S. avenae* i intervallerne 0-4 minutter og 0-6 minutter. Det formodes, at ukendte duftstoffer hos *S. avenae* kan virke frastødende på *C. septempunctata* eller inhibere farnesens virkning.

Førend *C. septempunctata*'s respons på duft af E-(β)-farnesen, E-(β)-farnesen imprægneret i silikone, 2-isopropyl-3-methoxy-pyrazin og duft fra *S. avenae* endelig kan fastslås, bør der flere undersøgelser til.

Abstract

In this project the ladybird *Coccinella septempunctata*'s response to E-(β)-farnesene (150 ng/ μ l), E-(β)-farnesene in silicone (500 mg), 2-isopropyl-3-methoxy-pyrazine (0,00747 ng/ μ l) and odour from 45 *Sitobion avenae* was investigated. A 4-arm-olfactometer was used, and the movement of the ladybird was recorded with a web camera and thereafter analysed in a computer program, which calculated the time spend (%) in each of the four arms in the olfactometer.

C. septempunctata did not show an attraction to E-(β)-farnesene and 2-isopropyl-3-methoxy-pyrazine. The response to E-(β)-farnesene and 2-isopropyl-3-methoxy-pyrazine is probably dependent to the difference in concentrations between respectively E-(β)-farnesene and 2-isopropyl-3-methoxy-pyrazine and other odours.

C. septempunctata did show repellency to E-(β)-farnesene in silicone in the intervals 0-2 minutes and 0-4 minutes, when the time spend in the test arm was compared to the control arm in front of the test arm. This repellency can be explained by a too high concentration of E-(β)-farnesene in silicone.

C. septempunctata was repelled by odour from *S. avenae* in the intervals 0-4 minutes and 0-6 minutes. It is assumed that unknown odours from *S. avenae* act as repellent compounds to *C. septempunctata* or work as inhibitors to E-(β)-farnesene.

Further research about the respons of *C. septempunctata* to E-(β)-farnesene, E-(β)-farnesene in silicone, 2-isopropyl-3-methoxy-pyrazine and *S. avenae* is needed.

INDHOLDSFORTEGNELSE

1. INTRODUKTION	1
2. MATERIALER OG METODE	7
2.1. Indsamling, opbevaring og opdræt af <i>C. septempunctata</i>	7
2.2. Forsøgsopstilling	7
2.3. Forsøgsprocedure	8
2.4. Behandling af videooptagelser	9
2.5. Ændring af opstilling og forsøgsprocedure	10
2.6. Statistisk behandling af data	11
3. RESULTATER	13
3.1. Præferensforsøg	13
3.2. Forsøg med farnesen	14
3.3. Forsøg med farnesen imprægneret i silikone	14
3.4. Forsøg med <i>S. avenae</i>	15
3.5. Forsøg med pyrazin	16
4. DISKUSSION	17
4.1. Præferensforsøg	17
4.2. Respons på farnesen	17
4.3. Respons på <i>S. avenae</i>	18
4.4. Respons på pyrazin	20
4.5. Forsøgsopstilling og metode	22
5. KONKLUSION	26
6. REFERENCER	27

1. Introduktion

Bladlus er det dominerende skadedyr i landbruget i tempererede egne, idet de ødelægger planter direkte ved at æde heraf eller indirekte ved at overføre plantevira [Pickett *et al.*, 1992 og Pickett *et al.*, 1998]. Mariehøns, blandt andre den vidt udbredte *Coccinella septempunctata* L., er en nyttig prædator på bladlus [Al Abassi *et al.*, 2000 og Ninkovic *et al.*, 2001]. *C. septempunctata* er polyfag, hvor bladlus udgør den essentielle føde, og *C. septempunctata* kan konsumere ca. 100 til 200 bladlus per dag. Alternativ føde, såsom pollen og nektar fra blomster, kan tjene som energikilde og kan forlænge overlevelsen, men mariehønen kan ikke reproducere sig på alternative fødekilder. Kannibalisme på æg forekommer blandt *C. septempunctata*. [Hodek & Honěk, 1996] En bred vifte af bladlus er fundet at være essentiel føde for *C. septempunctata* [Hodek & Honěk, 1996], bl.a. kornbladlus *Sitobion avenae* (Fabricius) [Mills, 1981]. Nogle arter af bladlus er direkte giftige for *C. septempunctata*, i nogle tilfælde afhængig af hvilke planter bladlusene har ernæret sig på [Hodek & Honěk, 1996].

Eftersom *C. septempunctata* er generalist, hvor mange forskellige arter af bladlus kan udgøre den essentielle føde, findes både voksne og larver på et bredt udsnit af planter, og *C. septempunctata*'s habitat siges derfor at være diverst [Majerus & Kearns, 1989].

Fourageringsadfærd

Første trin i mariehønsens fourageringsadfærd er at finde frem til et habitat, der kan forventes at indeholde bladlus og herefter at søge over kortere afstand efter bladlus indenfor habitatet. *C. septempunctata* såvel som bladlus udviser positiv fototaksi og negativ geotaksi. Når mariehønen bevæger sig op ad en plantestængel, stopper den op ved gaffelforgreninger og bevæger sig ud af disse, og hvis der ikke er bladlus på forgreningen, vender mariehønen tilbage til stænglen og opad på ny. Strengene på blade er retningsgivende for mariehønsens færden, og ofte findes kolonier af bladlus nær strengene (afhænger af bladtypen). [Hodek & Honěk, 1996] Ved kontakten med eller konsumeringen af en bladlus intensiverer mariehønen sin fouragering ved at bevæge sig langsommere og dreje skiftevis til den ene og den anden side. Denne adfærd anses generelt for at øge effektiviteten af fourageringen, og adfærden betegnes som skiften fra ekstensiv til intensiv søgning. [Nakamuta, 1985] Denne ændring i adfærd fra ekstensiv til intensiv søgning lader til at være tillært, eftersom adfærden ikke observeres hos nyligt udklækkede mariehøns, men udvikles efter nogle forsøg med fangst af bladlus [Hodek & Honěk, 1996 – original kilde på fransk]. Bortset fra de tre ovenfor nævnte faktorer, der ligger til grund for mariehønsens fouragering (taksis, plantestruktur og kontakten med bladlus eller konsumeringen af bladlus), anses mariehønsens fouragering for at være tilfældig, eftersom mariehønen afsøger områder, den tidligere har afsøgt uden at finde føde og negligerer andre uudforskede områder. [Hodek & Honěk, 1996] Nakamuta (1984a) foreslår, at mariehønen under fouragering gør brug af synet på kort afstand (ca. 7 mm), og Stubbs (1980) foreslår på baggrund af adfærdsforsøg med *C. septempunctata*, at den gør brug af lugtesansen. Senere forskning peger på, at insekter har en høj udviklet lugtesans, idet der på

insekters antenner er fundet et stort antal olfaktoriske sanseneuroner [Pickett *et al.*, 1998]. Til biologisk bekæmpelse af bladlus kunne *C. septempunctata* udnyttes mere effektivt vha. semiokemiske¹ stoffer, herunder feromoner² [Al Abassi *et al.*, 1998], hvis disse blev isoleret, identificeret og syntiseret [Han & Chen, 2002]. *C. septempunctata* kunne således på forhånd tiltrækkes dyrkede områder, hvor der kunne forekomme bladlusangreb [Hodek & Honěk, 1996]. Forskning i insekters sansesystem har til formål at finde nye metoder til skadedyrsbekæmpelse og minimere eller helt eliminere brugen af toksiske pesticider [Pickett *et al.*, 1998]. Det vinder mere og mere indpas inden for biologisk bekæmpelse af skadedyr at bruge metoder, hvor nytterovdyr som *C. septempunctata* responderer på byttedyr eller habitater [Sengonca & Kranz, 2001]. Der er begrænset forskning indenfor kemisk kommunikation mellem skadedyr og deres naturlige fjender [Han & Chen, 2002] og til trods for, at *C. septempunctata* er velstuderet, vides der endnu ikke meget om den semiokemiske interaktion mellem *C. septempunctata* og bladlus [Al Abassi *et al.*, 2000].

Alarmferomon, E-(β)-farnesen

Bladlus (blandt andre kornbladlus *S. avenae* og havrebladlus *Rhopalosiphum padi* (L.)), der angribes af prædatorer, parasitter eller irriteres ved fysisk kontakt, kan udskille et klæbrigt sekret fra rygrørene [Nault *et al.*, 1973; Wientjens *et al.*, 1973; Mondor *et al.*, 2000 & Pickett *et al.*, 1992]. Tidligere troede man, at dette sekret kun tjente et formål som fysisk forsvar ved at klæbe ben og munddelene sammen på fjender, men senere er det fundet, at sekretet også indeholder et flygtigt stof, kaldet alarmferomon, der virker frastødende på andre bladlus [Nault *et al.*, 1973 & Mondor *et al.*, 2000].

De fleste arter i underfamilien Aphidinae producerer alarmferomon og responderer herpå med forskellig sensitivitet og respons [Montgomery & Nault, 1978 og Mondor *et al.*, 2000]. Bladlus kan respondere ved at vifte med antennerne, stoppe med at æde, begynde at gå væk, lade sig falde ned fra det blad, de sidder på og/eller udvise aggressiv adfærd [Nault *et al.*, 1973; Wientjens *et al.*, 1973 og Mondor *et al.*, 2000].

Undersøgelser har vist, at alarmferomonet virker på bladlus 45-60 minutter efter udskillelse, og at det virker i et begrænset område på cirka samme størrelse som overfladearealet på mange blade [Nault *et al.*, 1973].

Selvom alarmferomonblandingen er forskellig fra art til art, er ét komponent; (*E*)-7,11-dimethyl-3-methylen-1,6,10-dodecatriene også kaldet E-(β)-farnesen (herefter benævnt farnesen), fælles for dem alle [Mondor *et al.*, 2000]. Udover at være et komponent i alarmferomonet hos bladlus, er farnesen et allestedsnærværende plantekomponent [Pickett *et al.*, 1992].

¹ Kemisk stof der overfører et signal fra en organisme til en anden [Pickett *et al.*, 1998].

² Ved feromon forstås et kemisk stof, der, når det frigives eller sekreses af en organisme, påvirker adfærden eller udviklingen hos andre individer af samme art [Majerus & Kearns, 1989].

***C. septempunctata*'s tiltrækning til planter, bladlus og farnesen**

Der er udført adfærdsforsøg med det formål at undersøge, om *C. septempunctata* bliver tiltrukket eller frastødt af planter, bladlus og farnesen. Han & Chen (2002) fandt, at *C. septempunctata* udviste intensiv søgeadfærd og tilbragte signifikant længere tid med at søge på filterpapir indeholdende honningdug fra tebladlusen *Toxoptera aurantii* (Boyer de Fonscolombe) end filterpapir uden honningdug [Han & Chen, 2002]. Nakamuta (1984b) har påvist et arrest respons¹ hos *C. septempunctata* stimuleret af kropsvæske fra ferskenbladlusen *Myzus persicae* Sulzer. Stubbs (1980) har foreslået, at *C. septempunctata*'s larver kan lugte farnesen fra ærtebladlusen *Acyrtosiphon pisum* (Harris), og Nakamuta (1991) har ligeledes foreslået, farnesen som et muligt kairomon².

Ved et angreb af bladlus ændres mønstret af flygtige stoffer, der afgives fra planter [Pettersson *et al.*, I tryk]. Olfaktomerforsøg har vist, at *C. septempunctata* foretrækker byg (*Hordeum vulgare* L.) beskadiget af havrebladlusen *R. padi* frem for byg, der ikke har været udsat for bladlusangreb [Ninkovic *et al.*, 2001]. Pettersson *et al.* (I tryk) har fremsat en hypotese om, at planter responderer på et herbivorangreb ved at tiltrække organismer på tredje trofiske niveau. Flere forsøg har vist, at *C. septempunctata* tiltrækkes af duft fra planter. Schaller & Nentwig (2000) fandt i y-rør-olfaktometerforsøg, at *C. septempunctata* blev tiltrukket af udtræk af planterne berberis (*Berberis vulgaris* L.) og kamille (*Tripleurospermum inodorum* (L.)). Ligeledes er det påvist, at *C. septempunctata* kan tiltrækkes af bladlus og udtræk heraf. Sengonca & Kranz (2001) fandt i olfaktometerforsøg, at *C. septempunctata* blev tiltrukket af duft fra hestebønneplanter (*Vicia faba* L.) og bladlusene *M. persicae*, *Aphis fabae* Scopoli og *A. pisum*. Sengonca & Liu (1994) fandt i 8-arm-olfaktometerforsøg, at *C. septempunctata* opdrættet på *A. fabae* og *M. persicae*, søgte mod disse to bladlusarter fem gange hurtigere end mod kontrolarmene. *C. septempunctata*'s larver var signifikant mere tiltrukket til fire forskellige bladlusarter (*A. fabae*, *M. persicae*, *A. pisum*, *Rhopalosiphum maidis* (Fitch)), som deres forældre var opdrættet på, end til kontrollerne [Sengonca & Liu, 1994]. En attract-arrest³ respons af *C. septempunctata* til et vandigt udtræk af *A. fabae* er påvist [Shonouda, 1999]. Ikke alle har kunnet påvise, at *C. septempunctata* tiltrækkes af bladlus, bl.a. fandt Triltsch *et al.* (2001) i olfaktometerforsøg, at *C. septempunctata* ikke blev tiltrukket af duft fra bladlus *A. fabae*. Hvorvidt mariehøns bliver tiltrukket eller ej, kan afhænge af mængden af bladlus eller kombinationen af bladlus og værtsplanter. Han og Chen (2002) fandt i y-rør-olfaktometer, at der skulle minimum 1200 *T. aurantii*, til i kombination med 30 tebladskud beskadiget af samme bladlus for at opnå en tiltrækning af *C. septempunctata* og minimum 2000 bladlus alene og minimum 40 tebladskud beskadiget af bladlus alene. En tiltrækning af *C. septempunctata* til bladlus opnås for visse arter kun, når bladlusene indeholder farnesen og er knuste. Den toplettede mariehøne *Adalia bipunctata* (L.) blev testet i olfaktometerforsøg, og blev tiltrukket af *A. pisum* og *M. persicae*, når disse var

¹ Ved et arrest respons forstås, at mariehønen bliver fastholdt inden for et givent område.

² Et kairomon er et feromon, der produceret af en art tiltrækker en anden art, men virker negativt på arten, der afgiver feromonet [Hale *et al.*, 1996].

³ Ved attract-arrest repons forstås, at en mariehøne bliver tiltrukket og fastholdt inden for et givent område.

knuste, men blev ikke tiltrukket af kålbladlusen *Brevicoryne brassicae* (L.). GC-MS-undersøgelsen viste, at *B. brassicae* ikke afgav farnesen til forskel fra *A. pisum* og *M. persicae*. [Francis *et al.*, 2004] Francis *et al.* (2004) konkluderede, at det var farnesen fra bladlusene, som *A. bipunctata* blev tiltrukket af. Al Abassi *et al.* (2000) undersøgte *C. septempunctata*'s tiltrækning af farnesen i 2-arm-olfaktometer og fandt, at *C. septempunctata* blev tiltrukket af farnesen.

Elektroantennogram og Single Cell Recording

Med elektroantennogram¹ (EAG) og Single Cell Recording² (SCR) kan det undersøges, hvorvidt mariehøns har olfaktoriske receptorer for forskellige duftstoffer på antennerne [Pickett *et al.*, 1998].

EAG-målinger foretaget på den 12-plettede mariehøne *Coleomegilla maculata* (De Geer) eksponeret for farnesen og refleksblødningsekstrakt, frembragte EAG-respons [Zhu *et al.*, 1999], og Han og Chen (2002) har målt EAG-respons på *C. septempunctata* eksponeret for honningdug fra *T. aurantii*. Ved hjælp af SCR er det bevist, at *C. septempunctata* har specifikke receptorer for farnesen på antennerne [Al Abassi *et al.*, 2000].

Pyraziner

C. septempunctata, der er et aposematisk³ insekt, kan refleksbløde som en forsvarsmekanisme mod prædatorer, når den angribes eller irriteres. Ved refleksblødning udskiller mariehønen (mellem benleddene ved tibia og femur på alle seks ben) et gullig klistret sekret indeholdende alkaloider bl.a. coccinellin, der smager bittert [Holloway *et al.*, 1991], og som har en toksisk funktion [Al Abassi, 1998].

C. septempunctata's æg indeholder også alkaloider, og larverne har aposematiske farvemønstre og er i stand til at refleksbløde [Holloway *et al.*, 1991].

For mariehøns potentielle prædatorer, der ikke har farvesyn eller bruger synssansen, spiller aposematiske farvemønstre ingen rolle, men aposematiske dyrs visuelle advarselssignaler kan være suppleret af duftstoffer [Moore *et al.*, 1990].

Af de forskellige typer alarmsignaler, der findes i naturen, er duftstoffer dem, der er mindst forstået [Woolfson & Rothschild, 1990]. Som den første foreslår og diskuterer Rothschild (1961), at et aspekt af Müllerian mimicry⁴ eksisterer som et vidt udbredt kompleks af tilnærmelsesvis ens duftmønstre, der fungerer som advarselssignaler på samme måde, som aposematiske farvemønstre fungerer som visuelle advarselssignaler for prædatorer.

¹ To elektroder sættes i forbindelse med antennen, hvorpå der kan måles et respons [Zhu *et al.*, 1999].

² En fin tilspidset tungsten elektrode stikkes ind i det olfaktoriske organ på antennerne indtil der, fra én formodet sanseneuron, kan måles en aktivitet. Man kan ved at eksponere et insekt for et duftstof dokumentere et eventuelt respons [Pickett *et al.*, 1998].

³ Aposematiske insekter er insekter, der advarer potentielle prædatorer med deres i øjenfaldende farvemønstre om deres kemiske forsvar [Campbell, 1996, s. 1124].

⁴ Ved Müllerian mimicry forstås at to eller flere ildesmagende aposematiske farvede arter efterligner hinanden og at hver art antageligt opnår en additiv fordel pga. at de udgør et samlet større antal og herved lærer prædatorer hurtigere at undgå ethvert bytte med et specielt udseende [Campbell, 1996, s. 1124].

Det bedste eksempel på advarselsduftstoffer er pyraziner, hvis kerner alle består af en sekskantet aromatisk ring med to nitrogenatomer placeret overfor hinanden. Pyrazinkernen kan let afledes biosyntetisk fra aminosyre og nedbrudte sukkerprodukter, hvorfor pyraziner er vidt udbredte i planter, insekter, terrestriske vertebrater, svampe, bakterier og marine organismer over hele verden. [Woolfson & Rothschild, 1990] Det er foreslået og antaget, at kendetegn ved aposematiske insekter er lugten af pyraziner associeret med en bitter smag [Rothschild, 1961]. Over tusinde pyrazinforbindelser er identificeret, men de, der fungerer mest konsekvent som en del af et advarselssystem, er 2,5-dimethyl-1,3-akyl- og 2-methoxy-, 3-alkylpyrazin, der afgiver nogle af de kraftigste dufte, mennesket kender til. Disse stoffer findes blandt andet i aposematiske insekter, heriblandt *C. septempunctata*. [Rothschild & Moore, 1987] Kemiske analyser af tilstedeværelsen af pyraziner er foretaget på en lang række dyr og insekter. Moore *et al.* (1990) fandt i GC-MS-undersøgelser, at *C. septempunctata* indeholdt 2-methoxy-3-alkylpyraziner for alle af de tre testede isomere; isopropyl, *sec*butyl og isobutyl.

Ifølge Rothschild & Moore (1987) udsender blomstrende nælder, især efter regn, en stærk duft af pyraziner, og mariehøns kan findes i et stort antal siddende på blomsterne, hvorved mariehønsens aposematiske beskyttelse øges mod prædatorer vha. pyrazinduftene fra de blomstrende nælder. Ved indsamlingen af *C. septempunctata* til nærværende projekt blev der observeret et stort antal mariehøns siddende på blomstrende nælder efter et regnsky. GC-MS-undersøgelser for pyraziner af stor nælde (*Urtica dioica* L.) er fundet negative for nælder, der ikke var i blomst og positive for nælder i blomst [Moore *et al.*, 1990], hvilket understøtter ovenstående observationer.

Al Abassi *et al.* (1998) har vha. GC-MS undersøgt og fundet, at 2-isopropyl-3-methoxypyrazin er kemisk identisk med duftstoffet, der af mennesker forbindes med og er karakteristisk for *C. septempunctata*. Dette blev bekræftet med kemisk fremstillet 2-isopropyl-3-methoxypyrazin. Al Abassi *et al.* (1998) konkluderer, at 2-isopropyl-3-methoxypyrazin (herefter benævnt pyrazin) er til stede i *C. septempunctata* og udgør den karakteristiske duft ved denne mariehøne.

Flere arter af mariehøns (blandt andet *C. septempunctata*) aggregerer i efteråret og overvintrer sammen i grupper af to og op til flere hundrede. Det er ikke klart, hvordan mariehønsene finder sammen i disse overvintringsaggregeringer, men det er foreslået, at et feromon spiller en rolle heri. Savoiskaya (1966) observerede, at den specifikke duft hos *A. bipunctata* var særlig stærk under migration til et overvintringssted og foreslår, at mariehøns, der aggregerer i forbindelse med overvintring, orienterer sig ved hjælp af lugtesansen. Al Abassi *et al.* (1998) har undersøgt pyrazins rolle i aggregering. I olfaktometerforsøg fandt de, at pyrazin udløst et attract-arrest respons hos *C. septempunctata*, og konkluderede, at det tyder på, at pyrazin, foruden at virke som et advarselssignal til potentielle prædatorer, også er et aggregeringsferomon. Aggregeringen blandt mariehøns finder sted over uger i efteråret, og et aggregeringsferomon må forventes at lugte intenst over længere tid og være kemisk stabilt for at kunne virke. Pyrazin er beskrevet som være egnet

som aggregeringsferomon, idet det ikke er et særlig flygtigt stof, men er kemisk stabilt. [Pettersson *et al.*, 2005] Det er ikke undersøgt, hvordan mariehøns frigiver pyrazin i forbindelse med aggregering i efteråret. Pyrazin er patenteret med henblik på udnyttelse i biologisk bekæmpelse af bladlus vha. mariehøns [Patent nr. WO9937152, 1999] men udnyttes, så vidt vi er bekendt med, endnu ikke kommercielt. Pyrazin og farnesen kunne fra dispensere langs marker eller plantager (f.eks. i juletræs- og pyntegranproduktion i Danmark) i efteråret tiltrække og fastholde mariehøns, og således manipulere dem til at overvintre i områder, hvor der potentielt set kunne forekomme bladlusangreb.

Der er relativt få undersøgelser af pyrazin og farnesen som henholdsvis feromon og kairomon hos mariehøns. Yderligere undersøgelser kunne bibringe nyttefulde informationer i udnyttelse af disse stoffer inden for biologisk bekæmpelse.

På baggrund at dette undersøges det i 4-arm-olfaktometer, hvorvidt mariehønen *C. septempunctata* tiltrækkes af kemisk fremstillet E-(β)-farnesen, E-(β)-farnesen imprægneret i silikone, 2-isopropyl-3-methoxypyrazin og af duft indeholdende E-(β)-farnesen fra kornbladlusen *S. avenae*.

Det forventes, at farnesen, pyrazin og *S. avenae* stimulerer en tiltrækning af *C. septempunctata*. Et sådan respons vil ses ved, at *C. septempunctata* udviser aktiv søgeadfærd, hvor den går rundt i testarmen i olfaktometret (hvor duften må formodes at være) i signifikant længere tid end i kontrolarmene.

2. Materialer og metode

I dette kapitel beskrives indsamling, opbevaring og opdræt af *C. septempunctata*, forsøgsopstilling og – procedure og den statistiske behandling af data.

2.1. Indsamling, opbevaring og opdræt af *C. septempunctata*

I sommeren 2004 blev ca. 300 *C. septempunctata* indsamlet i området omkring Roskilde Universitetscenter, ved Syltemade ådal på Sydfyn og i Hillerød. Heraf blev ca. 250 opbevaret udendørs, i et 50x50x50 cm stort bur med moskitonet og fodret med *S. avenae* og *R. padi*. *C. septempunctata*, der ikke blev brugt til forsøg i oktober og november 2004, overvintrede ude og blev løbende vinteren i gennem taget ind og opbevaret i bure. Ca. 50 af de indsamlede *C. septempunctata* blev opbevaret og opdrættet i ventilerede glasbure i laboratoriet (senere i et kælderrum) med lys 16:8 L:D ved 20-24°C og ligeledes fodret med *S. avenae* og *R. padi*. *C. septempunctata* med snyltehvepse-puppe på undersiden af abdomen blev løbende fjernet, således at kulturen blev holdt fri for snyltehvepse.

R. padi og *S. avenae* blev opdrættet i kultur i hver deres klimarum ved 17 °C med 16:8 L:D og på hvede dyrket på vermikulit eller jord i foliebakker.

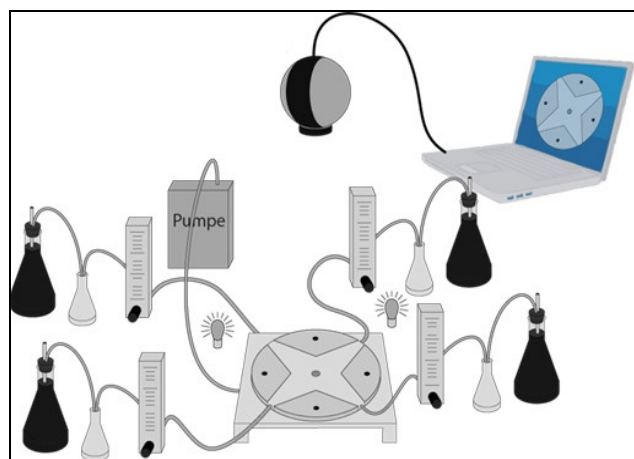
2.2. Forsøgsopstilling

Forsøgsopstillingen til dette projekt er en videreudvikling af 4-arm-olfaktometeropstillingen beskrevet af Vet *et al.*, (1983), Kilpinen, (pers. komm.) og Dromph (pers. komm.).

Olfaktometret, der blev specialfremstillet hos Brønnum Plast af hård plexiglas, målte 17 cm i diameter og bestod af tre dele, der blev holdt sammen vha. fire skruer, se figur 1.



Figur 1. På fotografiet ses et udsnit af olfaktometeropstillingen.



Figur 2. Figuren illustrerer olfaktometeropstillingen. For yderligere forklaring, se teksten.

Af de tre dele, udgjorde en del loftet af olfaktometret og en anden del bunden, hvori der var udskåret et hul i midten på 0,5 cm i diameter. Den tredje del, midterdelen, var skåret ud som en stjerneform med fire arme, hvor armene mundede ud i et hul med en diameter på 0,4 cm. Olfaktometret hvilede på kanterne af en plastkasse, hvori der var udskåret et hul i midten, og olfaktometret blev derved hævet ca. 10 cm over bordoverfladen. Med en vakuumpumpe (Heto SUE 300) blev luft suget igennem en 500 ml kolbe med aktivt kul forbundet med silikoneslanger til en 100 ml kolbe indeholdende filterpapir med teststof eller kontrolstof og videre gennem en silikoneslange igennem et flowmeter (Dwyer, 0-0,5 l/min). Se figur 2. Fra flowmetret blev luften suget videre gennem silikoneslanger til spidsen af en afklippet pipettespids (ca. 1 cm), der var sat ind i hullet i armen af olfaktometret. Luften blev suget ind i selve olfaktometret og ud gennem hullet i midten i olfaktometret. Silikoneslangerne var alle ca. 20 cm lange. Omkring opstillingen var opsat to lamper (25 W), der lyste opad omkring olfaktometret. For at undgå visuel påvirkning af mariehønen under forsøg, blev hele olfaktometeropstillingen dækket af et hvidt klædestof. [Kilpinen, pers. komm., Vet *et al.*, 1983 og Pettersson, pers. komm.]. Ovenover olfaktometret var monteret et web-kamera (Logitech® QuickCam® Pro 4000). Pipettespiden, der var placeret i midten af olfaktometrets bund, var slebet på indersiden med sandpapir for at opnå en ru overflade, så *C. septempunctata* bedre var i stand til at kravle opad denne.

2.3. Forsøgsprocedure

C. septempunctata's antenner, ben og gang blev vurderet før forsøg, og den blev kasseret, hvis den var skadet eller ikke gik ordentligt.

Teststof opløst i æter og kontrolstof (æter) blev overført til filterpapir, og efter ca. to minutter, hvor æteren kunne fordampe i stinkskab, blev filterpapiret placeret i kolberne. En *C. septempunctata* blev placeret i pipettespiden, som blev sat op i hullet i bunden af olfaktometret. Pumpe og lys blev tændt, og flowmetrene blev indstillet til ca. 200 ml/min¹ [Sengonca & Kranz, 2001 og Ninkovic & Pettersson, 2003]. Samtidig blev videooptagelse med web-kamera startet, og forsøget forløb i 30 til 60 minutter. Mellem hvert forsøg blev der lagt et nyt stykke hvidt papir (alm. kopipapir) i bunden af olfaktometret, så *C. septempunctata* bedre kunne gå rundt [Al Abassi *et al.*, 1998 og Birkett, pers. komm.].

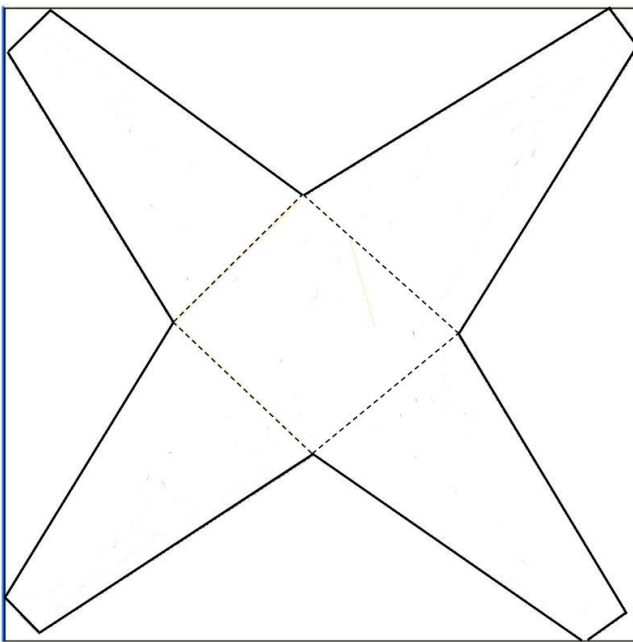
Olfaktometret blev roteret 90 grader mellem hvert forsøg for at undgå, at eventuel ydre stimuli ville påvirke *C. septempunctata*'s orientering. Efter fem forsøg blev olfaktometret samt pipettespiden fra midten af olfaktometret vasket i sæbevand, renses i ethanol og tørret af i papirservietter [Vet *et al.*, 1983].

¹ Det blev testet med rygende svovlsyre (H₂SO₄), hvorledes luftstrømmene i olfaktometret fordelte sig ved forskellige hastigheder, som beskrevet af Sengonca & Kranz (2001). Det blev fundet, at en hastighed på 180-220 ml/min gav de skarpeste grænser af luftstrømmene i centrum af olfaktometret, således at luftstrømmene blev opdelt i fire lige store områder. For at opretholde skarpt afgrænsede områder, var det vigtigere, at hastigheden var ens i alle arme, end at den var på f.eks. 180 eller 200 ml/min.

Forsøg blev gentaget 4-14 gange med en ny *C. septempunctata* hver gang, og forsøgene foregik i tidsrummet 10.00 til 17.00, hvor mariehøns udviser naturlig søgeadfærd [Nakamuta, 1984b]. Efter hvert forsøg blev *C. septempunctata* kønsbestemt for at sikre ligelig kønsfordeling.

2.4. Behandling af videooptagelser

Videooptagelserne blev redigeret i Microsoft® Windows® Movie Maker eller QuickTime Pro, således at kortere sekvenser (af ca. 15 sekunders varighed), hvor *C. septempunctata* ikke gik rundt, men f.eks. sad stille, pudsede sig eller var faldet om på ryggen og ikke kunne finde fodfæste, blev slettet. Den redigerede videooptagelse blev herefter eksporteret til billedsekvenser i programmet QuickTime Pro til ét billede per sekund, hvorved sekvenserne kunne analyseres i programmet "Billede analyse vers. 1.0" [Kilpinen, pers. komm.]. I billedanalyseprogrammet kunne *C. septempunctata*'s opholdstid i hver af de fire arme udtrykkes som sekundvis og procentvis fordeling, se figur 3.



Figur 3. Figuren viser de områder i olfaktometret, som billedanalyseprogrammet analyserer indenfor. Området i midten (med de stiplede linier omkring) blev ikke medregnet i analysen.

Billedsekvenserne blev analyseret for sekundvis og procentvis fordeling i de fire arme i 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 og 16 minutter.

Al Abassi *et al.* (1998) og Al Abassi *et al.* (2001) observerede *C. septempunctata* over 20 minutter, men Sengonca & Kranz (2001) fandt en optimal observationstid på 30 min. Grundet problemer i softwaren var det i nærværende forsøg ikke muligt at analysere billedsekvenserne i mere end 16 min.

Der blev udført præferensforsøg uden duftstoffer og to forsøg med teststoffer med den beskrevne opstilling, hvor *C. septempunctata* blev taget ind fra bur udendørs, akklimatiseret i 1-4 timer og tilbudt vand på et fugtet filterpapir.

I det første forsøg med teststoffer blev *C. septempunctata*'s respons på farnesen undersøgt. Den udtagede mængde E-(β)-farnesen (Sigma Aldrich, 85% renhed) var på 30 μ l og havde en koncentration på 150 ng/ μ l.

I det andet forsøg med teststoffer blev 2-isopropyl-3-methoxy-pyrazin (Sigma Aldrich, 97% renhed) testet, hvor den udtagede mængde var på 30 μ l med en koncentration på 0,00747 ng/ μ l.

Koncentrationerne af farnesen og pyrazin var tre gange større end de benyttede koncentrationer i henholdsvis Al Abassi *et al.* (2000) og Al Abassi *et al.* (1998). I pilotforsøg med lavere koncentrationer blev der ikke fundet et respons, hvorfor de højere koncentrationer blev valgt.

I begge forsøg var kontrolstoffet 10 μ l diethylæter (>99,5% renhed) [Al Abassi *et al.*, 1998 og Al Abassi *et al.*, 2000].

I forsøg på at stimulere *C. septempunctata* til at udvise intensiv søgeadfærd under forsøg, blev den sultede *C. septempunctata* tilbudt en *S. avenae* umiddelbart inden forsøg.

2.5. Ændring af opstilling og forsøgsprocedure

Forsøgsopstillingen blev ændret på baggrund af erfaringer fra de tidligere forsøg, pilotforsøg og efter konsultation af Jan Pettersson [Pettersson, pers. komm].

Da *C. septempunctata* udviser positiv fototaksi, kan en lyskilde, der afgiver et uensartet lys omkring olfaktometret, påvirke dens orientering. De to lamper blev skiftet ud med et lysbord (25x25 cm) med mætteret glasplade, der afgav et ensartet lys (på 25 watt). Olfaktometret blev placeret oven på lysbordet. Derudover blev der placeret en ca. 10 cm høj skærm af pap rundt om olfaktometret for at forøge afskærmningen mod eventuel visuel stimuli fra omgivelserne. Kolber med aktivt kul blev fjernet for at minimere antal led i opstillingen, hvilket gjorde det lettere at indstille flowmetrerne. Flowmetre og testkolber blev byttet rundt, således at testkolber udgjorde første led fra olfaktometret og flowmetrerne andet led. Der blev udført præferensforsøg uden duftstoffer og to forsøg med teststoffer med *C. septempunctata* fra kultur med ovenstående ændringer.

I det ene forsøg med teststoffer blev mariehøns respons på duft fra *S. avenae* undersøgt. *S. avenae* blev valgt frem for *R. padi*, eftersom *S. avenae* betegnes som værende af høj fødekvalitet for *C. septempunctata* og *R. padi* som lav, idet det er fundet, at *C. septempunctata* fodret med *S. avenae* lægger mere end dobbelt så mange æg per hun, sammenlignet med *C. septempunctata* fodret med *R. padi* [Hodek & Honěk, 1996 - originalkilde på russisk].

En testkolbe indeholdende ca. 45 *S. avenae* blev inden forsøgets start og med jævne mellemrum (ca. hvert 10. minut) rystet for at stimulere bladlusene til at frigive alarmferomon. *C. septempunctata* var inden forsøg sultet i ca. 20 timer.

I det andet forsøg med teststoffer blev *C. septempunctata*'s respons på farnesen imprægneret i silikone undersøgt.

Farnesen blev imprægneret i silikonen vha. CO₂ ved et givent tryk og en given temperatur. Imprægneringen blev foretaget af Kjeld Schaumburg og Henrik Jespersen, Roskilde Universitetscenter.

Farnesen imprægneret i silikone diffunderer igennem silikonen med en antaget ensartet koncentration til forskel fra det andet forsøg med farnesen, hvor farnesen fordampes fra filterpapir, hvor afgivelsen antageligt falder over tid.

Et stykke silikone med 3,2 µg farnesen/mg silikone blev udklippet (156,13 mg), således at mængden af farnesen var på ca. 500 mg farnesen. Samme stykke silikone imprægneret med farnesen blev brugt i alle forsøg.

C. septempunctata var inden forsøg sultet i 2 til 72 timer, og i begge forsøg med teststoffer var kontrolkolberne tomme.

I tabel 1 ses en oversigt over, i hvilke forsøg *C. septempunctata* var fra kultur indendørs eller bur udendørs, samt hvilken opstilling, sultperioder, og hvornår på året forsøg er udført.

Tabel 1. Oversigt over forsøg.

Forsøg	Kultur indendørs/bur udendørs	Opstilling	Tid på året	Sultperiode
Præferens (uden duftstoffer)	Mariehøns fra kultur indendørs	Ændret opstilling	Januar 2005	Sultet i 0-4 timer
	Mariehøns fra bur udendørs (Resultater ikke vist)	Oprindelig opstilling	Oktober-november 2004	Sultet i 1-4 timer
Farnesen	Mariehøns fra bur udendørs	Oprindelig opstilling	Oktober-november 2004	Akklimatiseret i 1-4 timer
Pyrazin	Mariehøns fra bur udendørs	Oprindelig opstilling	Oktober-november 2004	Akklimatiseret i 1-4 timer
<i>S. avenae</i>	Mariehøns fra kultur indendørs	Ændret opstilling	Januar-februar 2005	Sultet i ca. 20 timer
Farnesen imprægneret i silikone	Mariehøns fra kultur indendørs	Ændret opstilling	Januar-februar 2005	Sultet i 2- 72 timer

2.6. Statistisk behandling af data

Data blev først testet for varianshomogenitet (Bartlett Chi square [StatSoft, Inc., 1995]), hvorefter data blev arcsin-transformeret. Derefter blev disse data testet for normalfordeling (Kolmogorov-Smirnov [StatSoft, Inc., 1995]). Data, hvor betingelser med varianshomogenitet og normalfordeling var opfyldt, blev analyseret med One-Way ANOVA Planned Comparison [StatSoft, Inc., 1995], hvor testarmen blev vægtet med værdien +3 og kontrolarmene blev vægtet med værdien -1.

I forsøg med farnesen imprægneret i silikone i testarm, hvor der kun blev set på testarm og den overliggende kontrolarm, blev data analyseret med One-Way ANOVA [StatSoft, Inc., 1995].

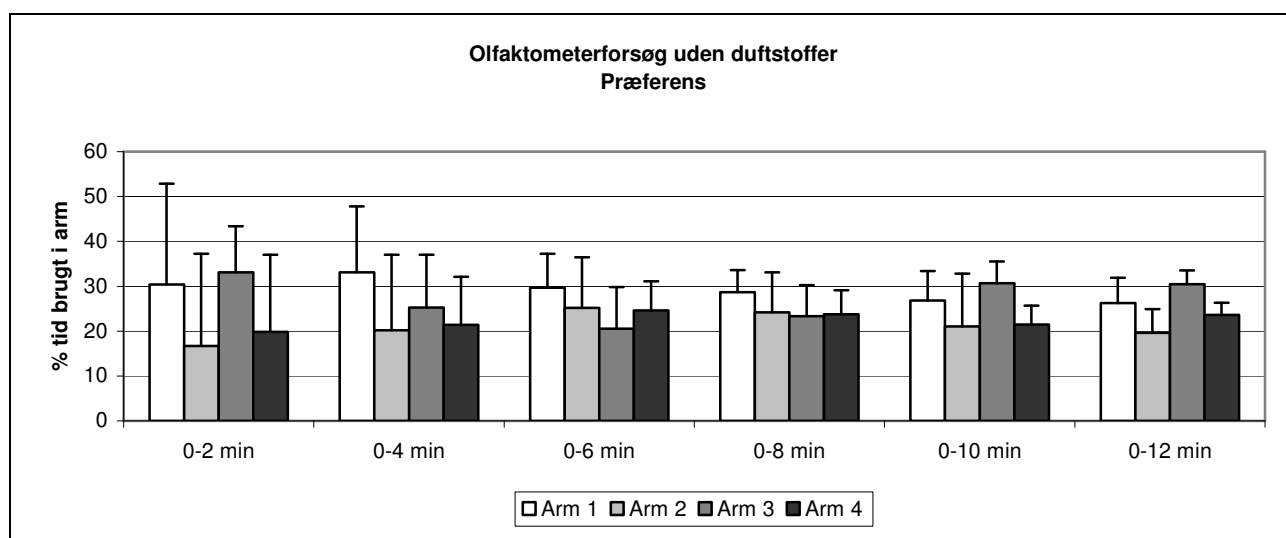
Data, hvor der ikke var varianshomogenitet og/eller normalfordeling, blev testet med Kruskal Wallis [StatSoft, Inc., 1995].

3. Resultater

I dette kapitel præsenteres resultater fra olfaktometerforsøg, hvor præferensforsøg (forsøg uden duftstoffer), forsøg med farnesen, farnesen imprægneret i silikone, duft fra *S. avenae* og med pyrazin er vist på grafer.

3.1. Præferensforsøg

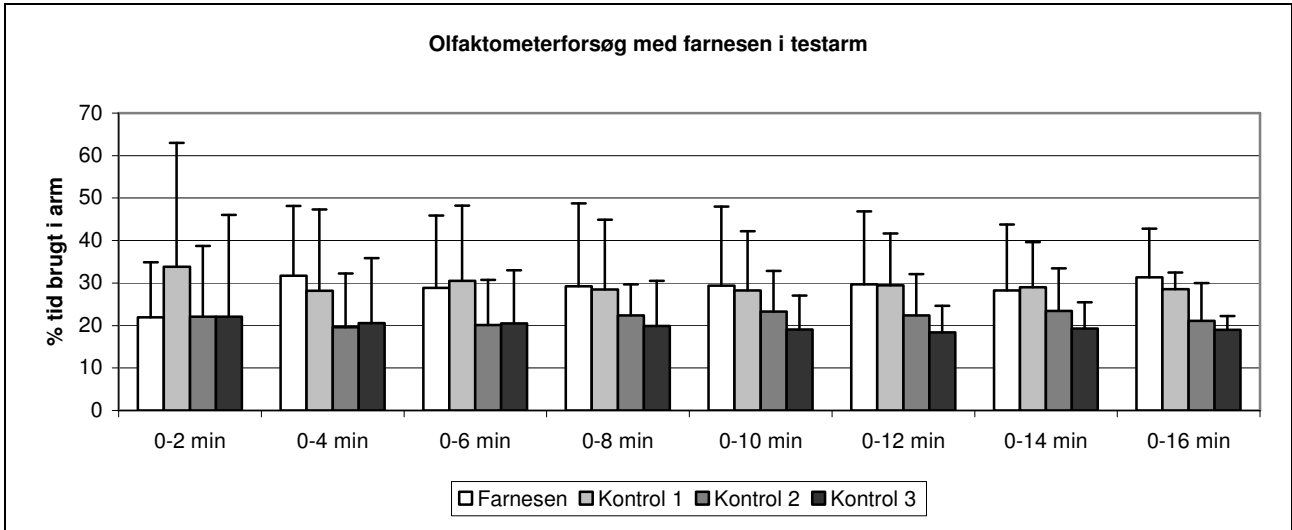
I figur 4, der viser præferensforsøg i olfaktometer, ses det, at *C. septempunctata* opholder sig cirka lige lang tid i alle arme, og at der ikke er signifikant forskel på opholdstiden i armene.



Figur 4. Gennemsnitlig procentvis opholdstid for *C. septempunctata* i hver arm i olfaktometer uden duftstoffer. Barrerne indikerer standardafvigelsen på gennemsnittet. $P > 0,05$ for alle intervaller (One-Way ANOVA) $N=2-6$ (se tabel 2)

3.2. Forsøg med farnesen

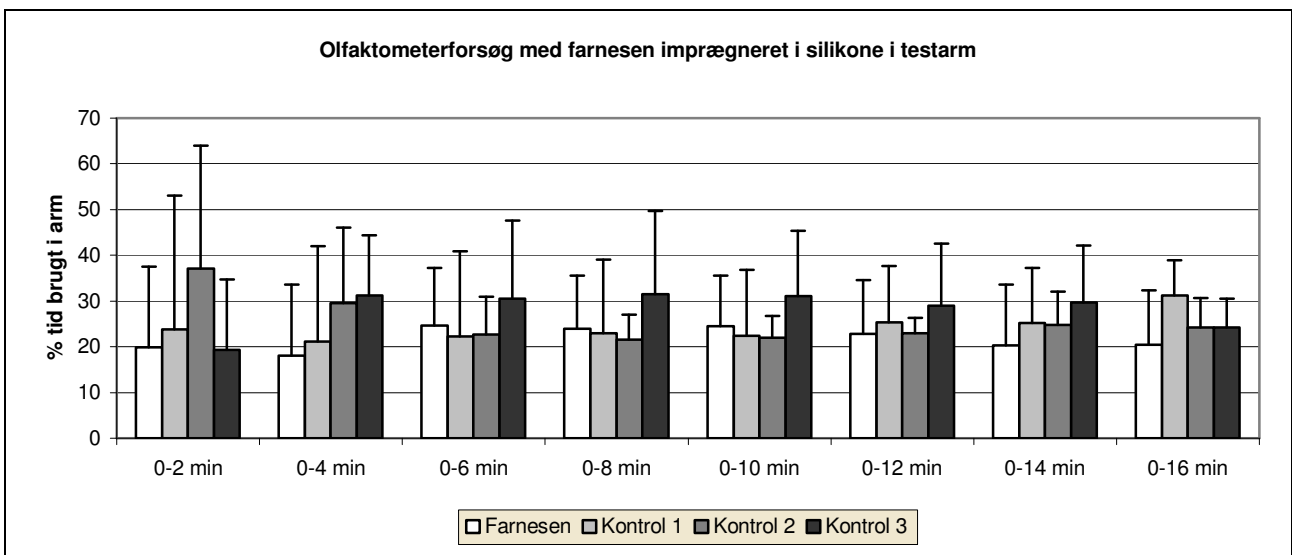
I figur 5, der viser olfaktometerforsøg med farnesen i testarmen, ses, at *C. septempunctata*'s gennemsnitlige opholdstid i testarmen ikke er signifikant forskellig fra kontrolarmene.



Figur 5. Gennemsnitlig procentvis opholdstid for *C. septempunctata* i hver arm i olfaktometer med farnesen i testarm. Barrerne indikerer standardafvigelsen af gennemsnittet. $p > 0,05$ for alle intervaller (One-Way ANOVA Planned Comparison). $N = 5$ (i intervallet 0-16 minutter $N=3$)

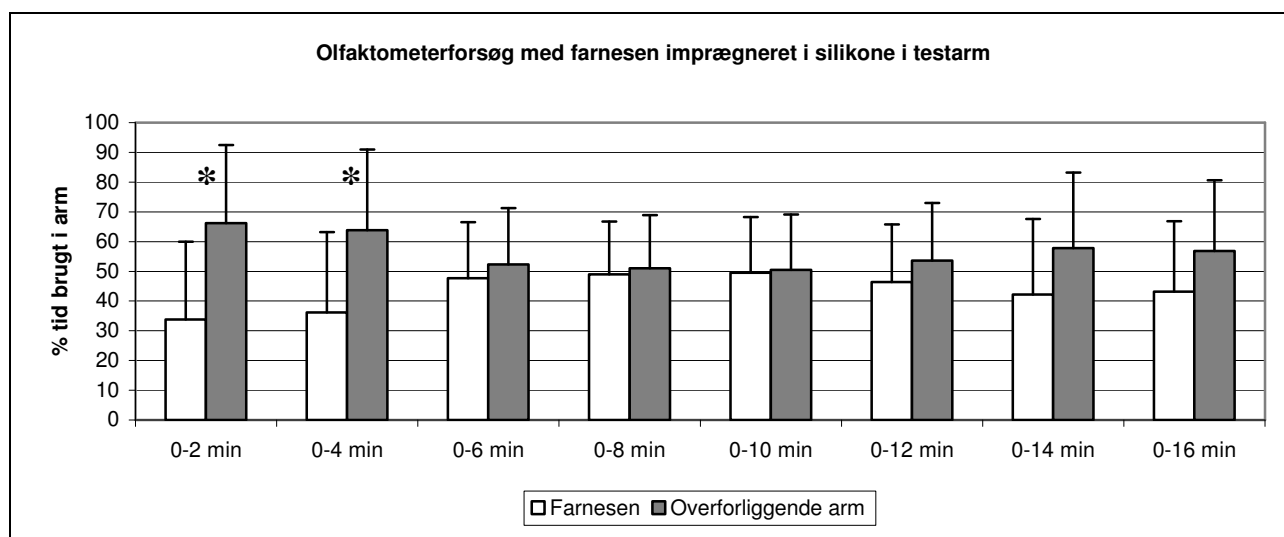
3.3. Forsøg med farnesen imprægneret i silikone

I Figur 6, der viser olfaktometerforsøg med farnesen imprægneret i silikone i testarm, ses, at *C. septempunctata*'s gennemsnitlige opholdstid i testarmen ikke er signifikant forskellig fra kontrolarmene.



Figur 6. Gennemsnitlig procentvis opholdstid for *C. septempunctata* i hver arm i olfaktometer med farnesen imprægneret i silikone i testarm. Barrerne indikerer standardafvigelsen på gennemsnittet. $p > 0,05$ for alle intervaller (One-Way ANOVA Planned Comparison). $N = 8$ (I intervallet 0-12 minutter $N = 7$, i intervallet 0-14 minutter $N=5$ og i intervallet 0-16 minutter $N=4$)

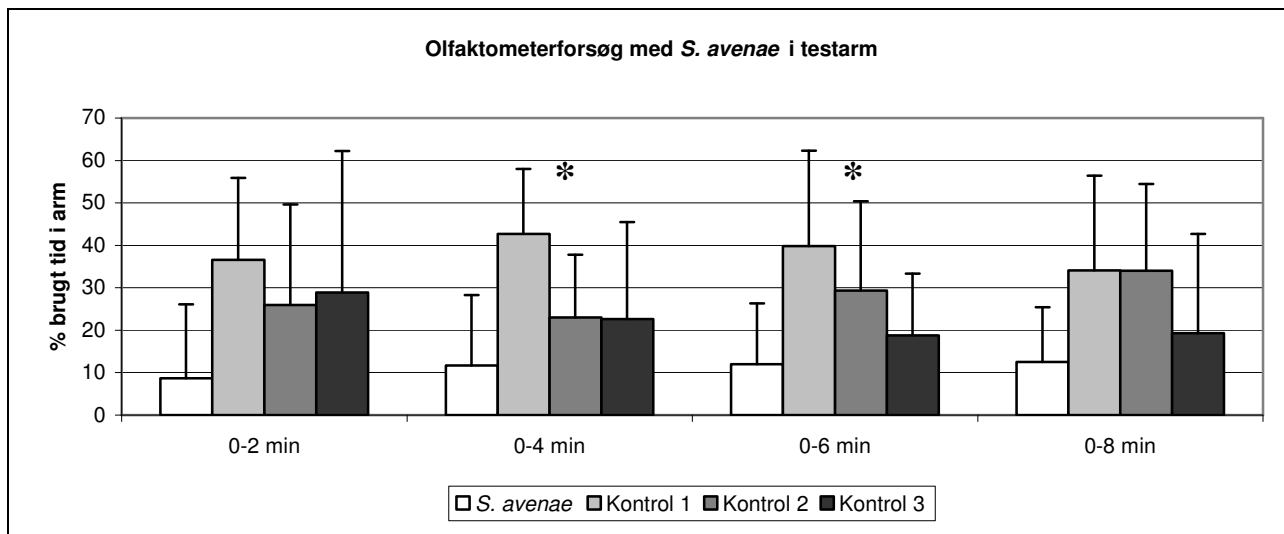
Af figur 7 ses, at *C. septempunctata* opholdstid i testarmen (med farnesen imprægneret i silikone) er signifikant forskellig fra opholdstiden i den overforliggende kontrolarm, i intervallerne 0-2 minutter og 0-4 minutter. I de resterende intervaller er der ikke signifikant forskel på opholdstiden i de to arme.



Figur 7. Kumulerede data for den gennemsnitlige procentvise opholdstid for *C. septempunctata* i hver arm i olfaktometer med farnesen imprægneret i silikone i testarm. Barrerne indikerer standardafvigelsen på gennemsnittet. * indikerer $p < 0,05$ for 0-2 minutter og 0-4 minutter. $p > 0,05$ for de resterende intervaller (Kruskal Wallis). $N = 8$ (I intervallet 0-12 minutter $N = 7$, i intervallet 0-14 minutter $N = 5$ og i intervallet 0-16 minutter $N = 4$)

3.4. Forsøg med *S. avenae*

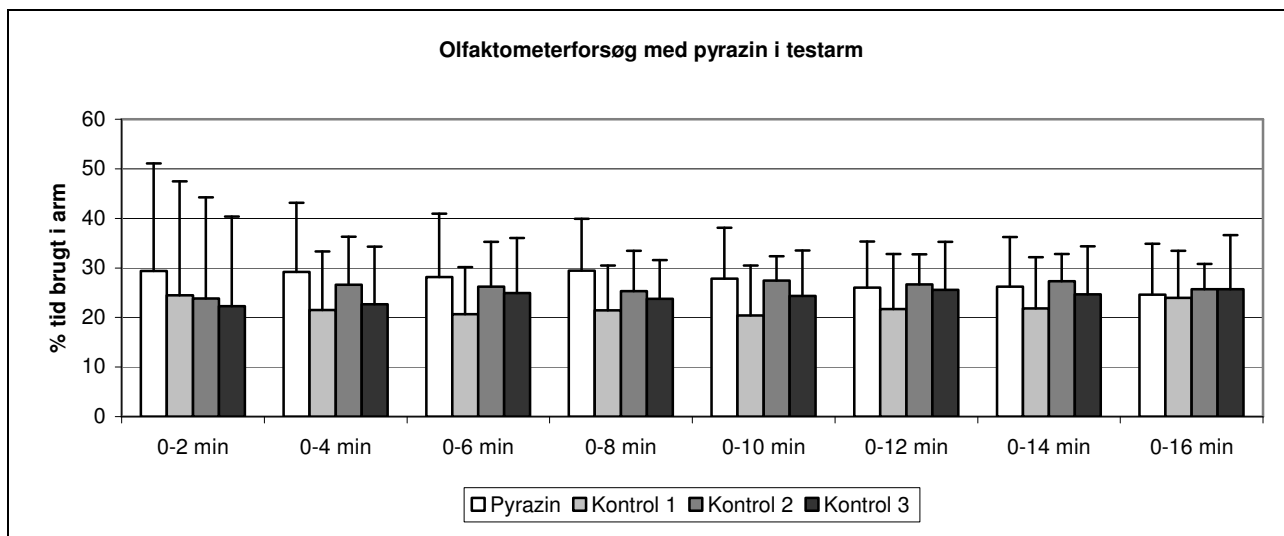
I figur 8, der viser olfaktometerforsøg med duft fra *S. avenae* i testarm, ses det, at *C. septempunctata*'s gennemsnitlige opholdstid i arm med duft fra *S. avenae* er lavere end i kontrolarmene i alle intervaller. Derudover ses, at der signifikant forskel på testarmen og kontrolarmene i intervallerne 0-4 minutter og 0-6 minutter.



Figur 8. Gennemsnitlig procentvis opholdstid for *C. septempunctata* i hver arm i olfaktometer med duft fra *S. avenae* i testarm. Barrerne indikerer standardafvigelsen af gennemsnittet. * indikerer $p < 0,05$ for 0-4 minutter og 0-6 minutter. $p > 0,05$ for de resterende intervaller (One-Way ANOVA Planned Comparison). N=7 i intervallet 0-2 minutter, N=6 i intervallet 0-4 minutter, N=5 i intervallet 0-6 minutter og N=3 i intervallet 0-8 minutter.

3.5. Forsøg med pyrazin

I figur 9, der viser olfaktometerforsøg med pyrazin, ses, at *C. septempunctata*'s gennemsnitlige opholdstid i testarmen ikke er signifikant forskellig fra kontrolarmene.



Figur 9. Gennemsnitlig procentvis opholdstid for *C. septempunctata* i hver arm i olfaktometer med pyrazin i testarm. Barrerne indikerer standardafvigelsen på gennemsnittet. $p > 0,05$ for alle intervaller (One-Way ANOVA Planned Comparison, 0-10 minutter er testet med Kruskal Wallis). N=11 (1 intervallerne 0-10 minutter, 0-12 minutter og 0-14 minutter N=10, i intervallet 0-16 minutter N=8)

4. Diskussion

I det følgende diskuteres resultaterne fra olfaktometerforsøgene. Først diskuteres præferensforsøgene, *C. septempunctata*'s respons på farnesen, *S. avenae* og pyrazin og endelig følger en diskussion af metode og olfaktometeropstilling.

4.1. Præferensforsøg

Præferensforsøg viste, at *C. septempunctata* ikke brugte mere tid i en arm frem for en anden, hvorfor det kan antages, at der ikke er nogle metodemæssige faktorer, der spiller ind på, hvordan *C. septempunctata* bevæger sig rundt i olfaktometret.

4.2. Respons på farnesen

C. septempunctata blev ikke som forventet tiltrukket af farnesen (se figur 5), de blev heller ikke frastødt heraf. Af resultaterne for farnesen imprægneret i silikone (figur 6), ses ligeledes hverken tiltrækning eller frastødning.

C. septempunctata blev frastødt af farnesen imprægneret i silikone i intervallerne 0-2 minutter og 0-4 minutter, når opholdstiden i testarmen sammenlignes med opholdstiden i den overforliggende kontrolarm (se figur 7).

Det vides ikke, med hvilken afgivelsesrate farnesen diffunderede igennem silikonen. Da *C. septempunctata* blev frastødt i intervallerne 0-4 minutter og 0-6 minutter foreligger muligheden, at 500 mg var en for høj koncentration *C. septempunctata* blev eksponeret for, eftersom et ellers tiltrækkende stof kan virke frastødende i for høje koncentrationer [Ravn *et al.*, 2004].

Vi er ikke bekendt med, at andre har benyttet samme metode med farnesen imprægneret i silikone i olfaktometerforsøg, og kan derfor ikke drage sammenligninger til andre forsøg.

Ved SCR er det bevist, at *C. septempunctata* har olfaktoriske receptorer for farnesen på deres antenner, hvilket indikerer, at de kan lugte farnesen, og at det har betydning i deres fouragering. Det er desuden påvist, at *C. septempunctata*'s respons på farnesen afhænger af koncentrationen af (-)- β -caryophyllen (et allestedsnærværende plantestof). Ud af 36 celler, der responderede på plante - eller bladlusstoffer, var 21 af dem specifikke for farnesen eller (-)- β -caryophyllen. [Al Abassi *et al.*, 2000] Disse receptorer blev fundet i nærheden af hinanden, hvilket ifølge Al Abassi *et al.* (2000) gør *C. septempunctata* i stand til at opfange en koncentrationsforskel, når der sker en hurtig stigning af farnesen fra bladlus i forhold til en konstant baggrundkoncentration af farnesen i forhold til (-)- β -caryophyllen. I 2-arm-olfaktometer fandt Al Abassi *et al.* (2000), at *C. septempunctata* blev tiltrukket af farnesen, men at tiltrækningen faldt, ved stigende

koncentrationer af (-)- β -caryophyllen. Al Abassi *et al.* (2000) konkluderede, at disse resultater kraftigt peger på, at gående voksne *C. septumpunctata* gør brug af farnesen i deres fouragering.

Zue *et al.* (1999) fandt, at hos *C. maculata* steg EAG-responset ved stigende koncentration af farnesen, og at en dosis-responskurve viste en mætning for farnesen på 100 μg for hanner¹. I nærværende forsøg benytttes en mængde på 4,5 μg farnesen (150 $\text{ng}/\mu\text{l}$ i 30 μl), der ligger under den mængde, som Zue *et al.* (1999) fandt som mætning hos *C. maculata*. *C. maculata* er mindre end *C. septumpunctata*, hvorfor en mætning hos *C. septumpunctata* kan forventes at ligge på samme niveau eller over den for *C. maculata*. Al Abassi *et al.* (2000) benyttede en mængde farnesen på 0,5-1,5 μg . Francis *et al.*, (2004) fandt, at *A. dipunctata* tiltrækkes af farnesen, når opløsningen indeholder mere end 2 μg farnesen. Mængden på 4,5 μg (benyttet i nærværende forsøg) burde ligge på det rigtige niveau, og at det derfor ikke er mængden af farnesen, der er afgørende for, at der ikke ses en tiltrækning.

4.3. Respons på *S. avenae*

Det var forventet, at *C. septumpunctata* blev tiltrukket af duft fra *S. avenae*, og at den derfor tilbragte signifikant længere tid med at søge i armen med duft fra *S. avenae* end i kontrolarmene. Dette var ikke tilfældet. Af figur 8 fremgår det, at *C. septumpunctata* blev signifikant frastødt af *S. avenae* i intervallerne 0-4 minutter og 0-6 minutter i tiden brugt i testarmen overfor alle tre kontrolarme. Resultaterne giver en god indikation på, at *C. septumpunctata* ikke blev tiltrukket af duft fra *S. avenae*. Der er ikke målinger efter 8 minutter, hvilket kunne give en bedre indikation på, om *C. septumpunctata* fortsat blev frastødt eller om den ved længere tids eksponering ville blive tiltrukket eller slet ikke ville reagere på *S. avenae*.

Eftersom det viste sig, at *C. septumpunctata* blev frastødt af farnesen imprægneret i silikone, når der sammenlignes med den overforliggende arm, indikerer dette, at det er farnesen, kemisk fremstillet såvel som fra *S. avenae*, der virker frastødende på *C. septumpunctata*.

Triltsch *et al.*, (2001) fandt, at mariehønen *Propylea quattuordecimpunctata* (L.) hverken blev tiltrukket eller frastødt af duft fra *S. avenae* i 4-arm-olfaktometer.

Muligvis har *S. avenae* i dette forsøg ikke været irriteret tilstrækkeligt til, at de afgav alarmferomon eller tilstrækkeligt med alarmferomon til at tiltrække *C. septumpunctata*, da de blev placeret i testkolben.

Ninkovic *et al.* (2001) fandt i olfaktometerforsøg, at *C. septumpunctata* ikke blev tiltrukket af duft fra uforstyrrede *R. padi*. Francis *et al.* (2004) kunne vha. GC-MS ikke detektere flygtige stoffer fra 250 mg hele uforstyrrede bladlus (*M. persicae*, *A. pisum* og *B. brassicae*), kun knuste *M. persicae* og *A. pisum* afgav

¹ Forfatterne skriver, at der er en mætning ved 100 μg , men dette fremgår ikke på den tilhørende graf i artiklen.

farnesen. Ligeledes fandt Francis *et al.* (2004) en tiltrækning hos *A. bipunctata* i olfaktometer til *M. persicae* og *A. pisum*, når disse var knuste.

I nærværende forsøg blev brugt ca. 45 *S. avenae*, hvilket svarer til ca. 6,6 mg (Achim Nielsen, pers. komm.). Han & Chen (2000) fandt i y-rørsforsøg, at der skulle mindst 2000 knuste *T. aurantii* til at tiltrække *C. septempunctata*. Triltsch *et al.*, (2001) testede med 5 *S. avenae* i olfaktometerforsøg, men finder ingen tiltrækning. Der kan derfor have været brugt for få *S. avenae* til at se en tiltrækning i nærværende forsøg, men tilsyneladende nok til at se en frastødning i nogle af tidsintervallerne.

I *S. avenae* kan der være et eller flere stoffer, som inhiberer i forhold til mængden af farnesen eller andre stoffer, der ellers virker tiltrækkende eller frastødende på *C. septempunctata*. Jan Pettersson (pers. komm.) har erfaret, at *C. septempunctata* ikke tiltrækkes af duft fra *S. avenae*. Francis *et al.* (2004) fandt, at *A. bipunctata* ikke blev tiltrukket af *B. brassicae*, uforstyrrede såvel som knuste. De foreslår, at *B. brassicae* ikke frigiver kairomoner, der tiltrækker *A. bipunctata*, eller at disse kairomoner bliver inhiberet af andre stoffer. De kunne ikke detektere farnesen fra *B. brassicae* vha. GC-MS, men derimod benzyl-isothiocyanat og benzylnitril, når bladlusene var knuste. Francis *et al.*, 2004 foreslår, at benzyl-isothiocyanat kan virke som kairomoninhibitor ligesom (-)- β -caryophyllen.

Alarmferomonet hos *S. avenae* indeholder farnesen, og farnesen er også biologisk aktivt hos *S. avenae* [Wientjens *et al.*, 1973]. Senere forskning har vist, at *S. avenae* ikke reagerer på farnesen [DEFRA PI0339], og man kan derfor forestille sig, at denne bladlus ikke bruger farnesen som alarmferomon, men kan udskille det. Eftersom nyere forskning viser, at *S. avenae* ikke reagerer på farnesen, kunne det tyde på, at mængden af farnesen, der frigives, er meget lav, eftersom det ikke kan betale sig for *S. avenae* at frigive det, hvis artsfæller ikke reagerer herpå. Hvis *S. avenae* frigiver en relativ lav mængde farnesen, når den irriteres eller angribes af prædatorer, er mængden muligvis ikke tilstrækkelig til at tiltrække *C. septempunctata*. Man kan også forestille sig, at *S. avenae* indeholder et eller flere stoffer, der virker frastødende, og at disse eller andre stoffer inhiberer virkningen af farnesen hos *C. septempunctata*, hvilket kan tilskrives den frastødende effekt.

En anden mulighed er, at farnesen er ophørt med at virke aktivt, dvs. er nedbrudt i den tid, der går fra, at *S. avenae* bliver placeret i testkolben, til at *C. septempunctata* bliver eksponeret herfor, hvilket var en halv time op til tre timer. Nault *et al.* (1973) finder, at bladlus (*A. pisum*, *Acyrtosiphon solani* Kalténbach og *M. persicae*) ophører med at reagere på farnesen ca. 45 til 60 minutter efter, at det er blevet frigivet (og at *C. septempunctata* ligeledes ophører med at reagere på farnesen).

Kolben med *S. avenae* blev rystet ca. hvert 10. minut og umiddelbart inden forsøg, men ikke under forsøget. Rystelser af kolben blev vurderet at afstedkomme frigivelse af alarmferomon hos *S. avenae*. Det kunne tænkes, at farnesen i nærværende forsøg var nedbrudt efter en vis tid, hvorfor der ikke blev observeret en

tiltrækning til testarmen med duft fra *S. avenae*. Dette kan måske forklare, hvorfor der ses en frastødning de første minutter og ikke på sigt.

4.4. Respons på pyrazin

Udfra figur 9 fremgår det, at *C. septempunctata* hverken tiltrækkes eller frastødes af testarmen med duft af pyrazin, i forhold til de tre kontrolarme. Det var forventet, at *C. septempunctata* blev tiltrukket af pyrazin og dermed, at de tilbragte signifikant længere tid i testarmen med duft af pyrazin end i de tre kontrolarme. Vi er kun bekendt med, at der i litteraturen er beskrevet to forsøg med mariehøns' respons på pyrazin (Al Abassi *et al.*, 1998 og Ravn *et al.*, 2004), og sammenligningsgrundlaget er derfor lille.

Al Abassi *et al.* (1998) fandt i et 2-arm-olfaktometer, at *C. septempunctata* tiltrækkes af pyrazin, kemisk fremstillet samt oprenset vakuumdestillat fra artsfæller. Forskellen fra nærværende forsøg med 4-arm-olfaktometer (med én testarm og tre kontrolarme) og det, beskrevet af Al Abassi *et al.* (1998), er bl.a., at de brugte et 2-arm-olfaktometer, og derved opnår de dobbelt så stor chance, hvis det er tilfældigt, at *C. septempunctata* vælger testarmen med pyrazin end kontrolarmen. Derudover er der også forskel på dataindsamlingen, hvor Al Abassi *et al.* (1998) noterede *C. septempunctata*'s position hvert 2. minut over 20 minutter, mens der i nærværende forsøg blev analyseret på *C. septempunctata*'s opholdstid i de fire arme. Metoden, hvor *C. septempunctata*'s position hvert 2. minut over 20 minutter registreres, blev afprøvet, men blev ikke fundet repræsentativ for deres position mellem observationerne og metoden blev forkastet. Sekvenser, hvor mariehønen sad stille i mere end ca. 15 sekunder, blev bortredigeret, hvor Al Abassi *et al.* (1998) afbrød forsøg, hvis *C. septempunctata* sad stille mellem to observationer. Det var sjældent, at det i nærværende forsøg blev observeret, at *C. septempunctata* gik rundt i mere end 2 til 5 minutter ad gangen. *C. septempunctata* kunne sidde stille i lang tid, og i nogle tilfælde blev videosekvenser, der oprindeligt var på 30 minutter, redigeret ned til 4 minutter. *C. septempunctata* benyttet af Al Abassi *et al.* (1998), var muligvis mere aktive og i en fase af deres cyklus, hvor de var modtagelige for stimuli af pyrazin til forskel fra dem benyttet i nærværende forsøg. Der blev benyttet en koncentration af pyrazin på 0,00747 ng/μl, der var tre gange højere end den Al Abassi *et al.* (1998) benyttede (0,0025 ng/μl). Pilotforsøg med en koncentration på 0,0025 ng/μl viste ingen tiltrækning, men der blev heller ikke observeret en frastødning, hvilket kunne have indikeret, at der blev benyttet en for høj koncentration af pyrazin, eftersom det ofte forholder det sig således, at en for høj koncentration af et ellers tiltrækkende stof kan virke frastødende [Ravn *et al.*, 2004]. Francis *et al.* (2004) fandt, at *A. bipunctata* når en mætningsgrad af farnesen, hvor der ved stigende koncentration ses et fald i EAG-responset. Man kunne forestille sig, at det samme gjorde sig gældende for *C. septempunctata* i forhold til pyrazin, men eftersom der ikke kunne påvises nogen frastødning, skyldes den manglende tiltrækning eller frastødning sandsynligvis ikke koncentrationen. Forsøg med pyrazin blev udført i oktober og november, hvilket muligvis er for sent på året til at opnå et respons hos *C. septempunctata*, eftersom aggregeringen må formodes at have fundet sted.

Forskellene i metoderne benyttet i nærværende forsøg og dem af Al Abassi *et al.* (1998) kan have betydning for, at der i nærværende forsøg ikke kunne påvises en tiltrækning af *C. septempunctata* til pyrazin.

I feltforsøg i Danmark er mariehøns' tiltrækning til pyrazin undersøgt. To koncentrationer blev testet, og der blev fundet en tiltrækning, hvor antallet af mariehøns var fordoblet på træer med dispensere med en frigivelsesrate på 0,6 mg/dag i forhold til træer uden dispensere og i forhold til træer med dispensere med en frigivelsesrate på 7 mg/dag. [Ravn *et al.*, 2004] Ravn *et al.* (2004) fandt desuden, at mariehøns blev tiltrukket til træer op til 10 meter væk fra træer med dispensere med frigivelsesraten på 0,6 mg/dag.

At der i nærværende forsøg ikke ses en tiltrækning kan også skyldes, at pyrazin i sig selv ikke spiller nogen økologisk rolle hos *C. septempunctata*. Rothschild *et al.* (1984) diskuterer, hvorvidt pyraziner fungerer ved at forstærke andre signalstoffer, mens de i sig selv ikke har nogen effekt. Woolfson & Rothschild (1990) foreslår, at pyraziner virker alt efter konteksten, hvor de kan forstærke andre signaler og herved indirekte virke tiltrækkende eller frastødende på insekter, men at pyraziner i sig selv ikke nødvendigvis er hverken nyttefulde eller skadelige. Ifølge Guilford *et al.* (1987) danner *C. septempunctata* sandsynligvis selv pyraziner, og Moore *et al.* (1990) mener, at når insekter selv danner pyrazinerne, er disse som regel i samspil med et stort antal kemikalier fra f.eks. hæmolymfen, hvorfor pyraziner dannet af *C. septempunctata* ikke nødvendigvis kan sammenlignes med kemisk fremstillet pyrazin. Dette kunne være en forklaring på, hvorfor vi ikke ser en tiltrækning eller en frastødning af *C. septempunctata* men forklarer ikke, at Abassi *et al.* (1998) og Ravn *et al.* (2003) finder, at *C. septempunctata* tiltrækkes af kemisk fremstillet pyrazin. Andre, måske endnu ukendte, semiokemiske stoffer kan spille en vigtig rolle i tiltrækning af *C. septempunctata*, hvilket Al Abassi *et al.* (1998) heller ikke afviser.

Det kan tænkes, at et andet stof skal være tilstede i en koncentrationsforskel overfor pyrazin, for at se en tiltrækning eller frastødning af *C. septempunctata* til pyrazin, ligesom Al Abassi *et al.* (2000) finder, at (-)- β -caryophyllen inhiberer farnesens virkning.

Det er endnu ikke undersøgt, hvorvidt *C. septempunctata* har receptorer for pyrazin på dens antenner. Der findes mange forskellige stoffer i blodvæsken fra refleksblødning, heriblandt pyrazin [Moore *et al.*, 1990], og Zhu *et al.* (1999) fandt ved EAG-målinger et repons, når *C. maculata* blev eksponeret for blodvæske fra artsfæller. At blodvæske udløste et EAG-respons beviser ikke, at mariehøns har receptorer for pyrazin som rent stof, men det kan tænkes. Det vides ikke, om mariehøns kan afgive pyrazin andet end ved refleksblødning.

Da der kun er lavet to undersøgelser om *C. septempunctata*'s respons på pyrazin, bør der flere undersøgelser til, før *C. septempunctata*'s respons på pyrazin og funktionen af pyrazin endelig kan fastslås.

4.5. Forsøgsopstilling og metode

I det følgende afsnit diskuteres problemstillinger omkring opstilling og metode.

Valg af olfaktometer

I nærværende forsøg stod valget mellem to typer af olfaktometre. Y-rørsolfaktometret og 2, 4 eller fler-arm-olfaktometret. Ved forsøg med én duftkilde i 4-arm-olfaktometer, vil 25% af ikke responderende *C. septempunctata* ende tilfældigt i armen med duftkilde. For y-rør- eller 2-arm-olfaktometer vil 50% af de ikke responderende *C. septempunctata* ende tilfældigt i armen med duftkilde. I y-rør-olfaktometre kan der opstå turbulens i forgreningen mellem de to rør, hvorved duftkilderne blandes. [Vet *et al.*, 1983] For at opnå stærkest statistiske validitet og undgå turbulens i olfaktometrets forgreninger blev 4-arm-olfaktometer valgt. Denne type olfaktometer er ikke udviklet til flyvende insekter, hvorfor *C. septempunctata*'s langdistancesøgning ikke blev udtrykt. Med dette olfaktometer blev det valgt kun at undersøge gående *C. septempunctata*'s kortdistancesøgning.

Lyskilde

I forsøg med farnesen og pyrazin, sendte lyskilden lys op omkring olfaktometret, hvilket gav en uensartet spredning af lyset, hvilket kunne influere på *C. septempunctata*'s orientering og dermed valg af arme (dette blev ikke observeret i præferensforsøg). Desuden blev lyset reflekteret i olfaktometret, hvilket vanskeliggjorde optagelse med web-kameraet. Lyskilden blev udskiftet med en lyskasse med matteret glasplade og en ensartet spredning af lyset. Til trods for at lyset kom nedefra, og *C. septempunctata* naturligt søger opad mod solen (positiv fototaksis), blev naturlig adfærd i olfaktometret observeret. Der blev observeret ekstensiv søgning, hvor *C. septempunctata* gik hurtigt og tilsyneladende tilfældigt rundt, og intensiv søgning, hvor den søgte op ad og langs kanter, langsommere, drejende sig fra skiftevis den ene til den anden side.

Luftstrømhastighed

Luftstrømhastigheden i olfaktometret blev indstillet til ca. 200 ml/min. Som beskrevet i metoden, blev det fundet optimalt ved røgforsøg med H₂SO₄ med ens luftstrømhastigheder i alle fire arme for at undgå turbulens ved forgreningerne til hver arm. Ofte ændrede luftstrømhastigheden sig i de enkelte arme i løbet af forsøget, hvilket kan have betydning for resultaterne. Luftstrømhastigheden på 200 ml/min lod ikke til at påvirke *C. septempunctata*'s naturlige adfærd, da den frit gik omkring i olfaktometret og var i stand til at rejse sig op på bagbenene. Hvis luftstrømhastigheden havde været for høj, kunne dette være kommet til udtryk ved, at *C. septempunctata* ikke ville gå rundt men klynge sig fast til underlaget for ikke at blive blæst omkuld.

***C. septempunctata*'s aktivitet i forhold til fødetilgængelighed**

I forsøgene blev der benyttet *C. septempunctata*, der var indsamlet og derefter opbevaret eller opdrættet indendørs eller opbevaret i et bur udendørs. I oktober og november blev der udført forsøg med *C. septempunctata*, der var opbevaret i bur udendørs, hvor de er ved at overvintre. Det blev vurderet, at *C. septempunctata* ikke længere var aktive, heller ikke efter flere timers akklimatisering ved stuetemperatur i laboratoriet.

C. septempunctata opbevaret og opdrættet indendørs udviste heller ikke stor aktivitet. Lugtesansen kan være svækket hos mariehøns der har været holdt i kultur i laboratoriet i flere generationer, eftersom lugtesansen ikke er strengt påkrævet for at finde føde, da der er føde i overflod. Sengonca & Kranz (2001) fandt, at indsamlede *C. septempunctata* var mere aktive og reagerede hurtigere på duftkilder end *C. septempunctata* fra opdræt. Sengonca & Kranz (2001) tilskriver dette, at *C. septempunctata* fra opdræt har vænnet sig til konstant fødetilgængelighed, hvilket stemmer overens med, at insekters sensitivitet overfor føde kan påvirke og/eller mindske søgeeffektiviteten [Reed *et al.*, 1995].

Sultperiode

I forsøgene til dette projekt var *C. septempunctata* fra bur udendørs akklimatiseret i op til 4 timer uden føde i laboratoriet før forsøg, og *C. septempunctata*, der var opbevaret eller opdrættet indendørs, var sultet i op til 72 timer. Sengonca & Kranz (2001) fandt, at en sultperiode forud forsøg på 6 timer var optimal, idet *C. septempunctata*'s reaktion i olfaktometret blev reduceret ved over eller under 6 timers sult. Nakamuta (1987) observerede øget søgeaktivitet hos sultet *C. septempunctata bruckii*, og at søgeaktiviteten var faldende ved fortsat sult. Ikke alle har sultet mariehøns før forsøg og har alligevel fundet et respons [Al Abassi *et al.*, 1998, Al Abassi *et al.*, 2000, Ninkovic *et al.*, 2001 og Ninkovic & Pettersson, 2003]. I dette projekt har det ikke været muligt at sulte *C. septempunctata* i 6 timer, og det kan tænkes, at de har haft forskellig søge- og reaktionseffektivitet alt efter sultperiode. Eftersom der ikke blev iagttaget ændringer i søgeaktiviteten ved de forskellige sultperioder, anses sultperioderne ikke for afgørende for resultaterne.

Køn

Kønsfordelingen i forsøgene var ligelig. Sengonca & Kranz (2001) har undersøgt, men kunne ikke påvise en forskel på reaktionen hos hanner og hunner af *C. septempunctata* i olfaktometerforsøg.

For parasitoider på bladlus kan det have betydning for deres respons på duftstoffer, om parasitoiden har lagt æg eller ej. Du *et al.* (1998) fandt, at snyltehvepsen *Aphidius ervi* Haliday, der havde lagt æg, udviste orienteret flyvning mod visse duftstoffer, men ikke mod andre. Reed *et al.* (1995) fandt, at *Diaeretiella rapae* (M'Intosh) med ovipositionserfaring reagerede positivt på duftstoffer fra et hvede-bladluskompleks, til forskel fra individer uden ovipositionserfaring. Man kan derfor foranlediges til at tro, at det samme kunne gøre sig gældende for mariehøns. Der blev i nærværende forsøg ikke skelnet mellem *C. septempunctata*'s

alder og køn, og hvorvidt de var i deres æglægningscyklus vides derfor ikke. Det blev flere gange observeret, at de lagde æg i olfaktometret under forsøg, hvilket kunne indikere, at de reagerede på duftstoffer af farnesen eller bladlus, idet det er vist, at *C. septempunctata* ikke udsætte æglægning, selvom der ikke er føde tilgængeligt, hvis de eksponeres for duftstoffer fra bladlus og deres honningdug [Evans & Dixon, 1986].

***C. septempunctata*'s tilstand**

Det er observeret både i laboratorium og felten, at mariehøns kan gå hen over bladlus uden at æde dem [McAllister & Roitberg, 1987]. I nærværende forsøg blev det observeret i laboratoriet, at *C. septempunctata* sultet i op til 72 timer ikke åd en tilbudt bladlus, selvom den havde været kontakt med den. Det kan skyldes den tilstand, *C. septempunctata* var i (f.eks. være mæt, en han der søgte en mage, eller en hun, der ledte efter et egnet sted at lægge æg) [Hodek, 1993]. Om *C. septempunctata*'s tilstand har påvirket resultaterne i nærværende forsøg, kan ikke vides, men deres tilstand kan være en afgørende faktor. Ved at udføre adfærdsforsøg med *C. septempunctata* på præcis samme alder kan risikoen minimeres for, at de ikke var interesseret i at søge efter bladlus (og dermed tiltrækkes af farnesen), mage eller ved at aggregere i efteråret (og dermed tiltrækkes af pyrazin). Dette har været for omstændeligt i nærværende projekt.

Analyse af data

I analyseprogrammet ("Billede analyse vers. 1.0" [Kilpinen, pers. komm.]), skulle det område, hvor indenfor *C. septempunctata*'s gang blev analyseret, defineres manuelt ved at markere området med musen. Dette område blev aldrig helt lige og ens for hver analyse, se eksempel herpå på figur 3. Om *C. septempunctata* har været udenfor eller inden for det område, der blev analyseret, har betydning for antal sekunder, den registreres som værende i en testarm, kontrolarm eller ikke registreret, hvis den opholdt sig i midten af olfaktometret (angivet med stiplede linier). Usikkerheden herved har mindre betydning i de tilfælde, hvor der er resultater for 16 minutter, men kan have betydning for resultater, hvor der kun er data fra f.eks. 2, 4 eller 6 minutter. Det blev vurderet, at usikkerheden ved analyseprogrammet ikke har betydning for resultaterne.

Kontaminering

Forsøgene fandt sted i samme laboratorium, som kemikalierne blev opbevaret og håndteret i, hvilket kan have afstedkommet en kontaminering af laboratorium og forsøgsoptilling. Der kan være grund til at tro, at duft fra teststoffer i laboratoriet har blandet sig med duft fra teststoffer i olfaktometret, og at mariehønsene derfor ikke responderede med en klar tiltrækning eller frastødning på pyrazin og farnesen i olfaktometret.

Teststoffer

En forklaring på, hvorfor der ikke kunne påvises en tiltrækning af *C. septempunctata* til farnesen kunne være, at farnesen, der er et flygtigt stof, kan være fordampet fra filterpapiret i testkolben før

C. septempunctata blev eksponeret herfor eller efter kort tids eksponering før forsøget blev afsluttet. Som tidligere nævnt er frigivelsen af farnesen fra silikone antagelig konstant og ensartet, hvilket kan forklare, at der ses et respons med farnesen imprægneret i silikone.

Francis *et al.* (2004) analyserede luften fra kolber med teststoffer vha. GC-MS. Det var uden for rækkevidde at udføre sådanne undersøgelser i nærværende forsøg, hvilket ellers kunne have vidnet om, hvorvidt der var teststoffer tilstede i luften i kolberne og hvor lang tid, teststofferne var om at fordampe.

Da der ikke blev fundet en tiltrækning eller frastødning i forsøg med farnesen, men en frastødning til *S. avenae* i intervallerne 0-4 og 0-6 minutter og farnesen imprægneret i silikone, når man ser på testarm og den overforliggende kontrolarm i intervallerne 0-2 og 0-4 minutter, peger dette på, at det højest sandsynligt skyldes for hurtig fordampning af farnesen fra filterpapir.

Eftersom pyrazin er kemisk stabilt og ikke særlig flygtigt kan for hurtigt fordampning ikke tilskrives, at der ikke blev observeret en tiltrækning af *C. septempunctata* hertil [Pettersson *et al.*, 2005].

5. Konklusion

Det kunne ikke påvises, at *C. septempunctata* tiltrækkes af farnesen og pyrazin.

Det konkluderes, at *C. septempunctata*'s respons på farnesen og pyrazin sandsynligvis afgøres af en koncentrationsforskel mellem andre duftstoffer og et samspil hermed. Desuden formodes det at have betydning, at de anvendte duftstoffer er kemisk fremstillede og ikke destillater fra mariehøns og bladlus. Håndteringen af teststoffer i laboratoriet kan ligeledes have haft indflydelse på resultaterne, hvilket de enkelte individers formodentlige forskellige tilstand også kan have.

Farnesen imprægneret i silikone tiltrak ikke som forventet *C. septempunctata*, men virkede frastødende i intervallerne 0-2 minutter og 0-4 minutter (testarm sammenlignet med overforliggende kontrolarm). En frastødning kan forklares ved en for høj koncentration af farnesen imprægneret i silikone.

Der blev ikke fundet, at *C. septempunctata* tiltrækkes af duft fra *S. avenae* men derimod, at den blev frastødt i intervallerne 0-4 minutter og 0-6 minutter. Det formodes, at ukendte duftstoffer hos *S. avenae* kan virke frastødende på *C. septempunctata* eller inhibere farnesens virkning.

Yderligere undersøgelser af *C. septempunctata*'s respons på farnesen, pyrazin og *S. avenae* er påkrævet, førend det endeligt kan fastslås, hvordan disse stoffer eventuelt i samspil med andre duftstoffer påvirker *C. septempunctata*.

6. Referencer

- Al Abassi S., Birket M. A., Pettersson J., Pickett J. A. & Woodcock C. M. 1998.** "Ladybird beetle odour identified and found to be responsible for attraction between adults". CMLS Cellular and Molecular Life Sciences vol. 54. 876-879
- Al Abassi S., Birket M. A., Pettersson J., Pickett J. A., Wadhams L. J. & Woodcock C. M. 2000.** "Response of the seven-spot ladybird to an aphid alarm pheromone and an alarm pheromone inhibitor is mediated by paired olfactory cells". Journal of Chemical Ecology vol. 26, no. 7. 1765-1771
- Achim Nielsen, Søren, pers. komm.** Roskilde Universitetscenter
- Birkett Mike, pers. komm.** Rothamsted Research. E-mail, 2004
- Campbell, N.A. 1996.** "Biology". Fourth edition. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc. California. s.1124.
- DEFRA PI0339.** "Identification of semiochemicals of insect pests with potential for minimising use of pesticides in UK crops". Department for Environment, Food and Rural Affairs. Research development, Final project report. Fundet på følgende hjemmeside d. 19.03.2006: http://www.defra.gov.uk/science/project_data/DocumentLibrary/PI0339/PI0339_1319_FRP.doc
- Dromph, Karsten, pers. komm.** Den Kgl. Veterinær- og Landbohøjskole. Personligt møde, 2004
- Du, Y., Poppy, G. M., Powell, W., Pickett, J. A., Wadhams, L. J. & Woodcock, C. M. 1998.** "Identification of semiochemicals released during aphid feeding that attract parasitoid *Aphidius ervi*". Journal of Chemical Ecology vol. 24, no. 8. 1355-1367
- Evans, E. W. & Dixon, A. F. G. 1986.** "Cues for oviposition by ladybird beetles (Coccinellidae): responses to aphids". Journal of Animal Ecology vol 55. 1027-1034.
- Francis, F., Lognay, G. & Haubruge E. 2004.** "Olfactory responses to aphid and host plant volatile releases: E-(β)-farnesene an effective kairomone for the predator *Adalia bipunctata*". Journal of Chemical Ecology vol. 30, no. 4. 741-755
- Guilford, T., Nicole, C., Rothschild, M. & Moore, B.P. 1987.** "The biological role of pyrazines: evidence for a warning odour function". Biological Journal of the Linnean Society vol 31. 113-128.
- Hale, W. G., Margham, J. P. & Saunders, V. A. 1995.** "Collins dictionary of biology". Second edition, HarperCollins Publishers, Great Britain. ISBN 0 00 470805 9
- Han, B. & Chen, Z. 2002.** "Behavioral and electrophysiological responses of natural enemies to synomones from tea shoot and kairomones from tea aphids, *Toxoptera aurantii*". Journal of Chemical Ecology vol. 28, no. 11. 2203-2219
- Hodek, I. & A. Honěk. 1996.** "Ecology of Coccinellidae". Series Entomologica vol 54. Kluwer Academic Publishers. ISBN 0-7923-4177-5
- Hodek, I., 1993.** "Prey and habitat specificity in aphidophagous predators (a review)". Biocontrol Science and Technology. vol. 3. 91-100.
- Holloway, G. J., de Jong, P. W., Brakefield, P. M. & de Vos, H. 1991.** "Chemical defence in ladybird beetles (Coccinellidae). I. Distribution of coccinelline and individual variation in defence in 7-spot ladybirds (*Coccinella septempunctata*)". Chemoecology vol. 2. 7-14.
- Kilpinen Ole, pers. komm.** Plantebeskyttelse og Skadedyr. E-mail og telefon, 2004
- Majerus, M. & Kearns, P. 1989.** "Ladybirds". Naturalists' Handbooks 10. The Richmond Publishing Co. Ltd. The Company of Biologists Ltd. Great Britain.
- McAllister, M. K. & Roitberg, B. D. 1987.** "Adaptive suicidal behaviour in pea aphids". Nature vol. 328. 797-799.
- Mills, N. J. 1981.** "Essential and alternative foods for some British Coccinellidae (Coleoptera)". Entomologist's Gazette vol. 32. 197-202
- Mondor, E. B., Scott Baird, D., Slessor, K. N. & Roitberg, B. D. 2000.** "Ontogeny of alarm pheromone secretion in pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*". Journal of Chemical Ecology vol. 26, No. 12.
- Moore, B. P., Brown, W. V. & Rothschild, M. 1990.** "Methylalkylpyrazines in aposematic insects, their hostplants and mimics". Chemoecology vol. 1. 43-51.

- Montgomery, M. E. & Nault, L. R. 1978.** "Effects of age and wing polymorphism on the sensitivity of *Myzus persicae* to alarm pheromone". *Annals of the Entomological Society of America* vol. 71 no. 5.
- Nakamuta K. 1984a.** "Visual orientation of a ladybeetle, *Coccinella septempunctata* L., (Coleoptera: Coccinellidae), towards its prey". *Applied Entomology & Zoology* vol. 19, no. 1. 82-86
- Nakamuta, K. 1984b.** "Aphid body fluid stimulates feeding of a predatory ladybeetle, *Coccinella septempunctata* L. (Coleoptera: Coccinellidae)". *Applied Entomology & Zoology* vol. 19, no. 1. 123-125
- Nakamuta, K. 1985.** "Mechanism of the switchover from extensive to area-concentrated search behaviour of the ladybird beetle, *Coccinella septempunctata bruckii*". *Journal of Insect Physiology* vol. 31 849-856.
- Nakamuta. K. 1987.** "Diel rhythmicity og prey search activity and its predominance over starvation in the ladybeetle, *Coccinella septempunctata bruckii*". *Physiological Entomology* vol. 12. 91-98
- Nakamuta K. 1991.** "Aphid alarm pheromone component, E-(β)-farnesene, and local search by a predatory lady beetle, *Cocinella septempuntata bruckii* Mulsant, (Coleoptera: Coccinellidae)". *Applied Entomology & Zoology* vol. 26, no. 1. 1-7
- Nault, L. R., Edwards, L. J. & Styer, W. E. 1973 .** "Aphid alarm pheromones: secretion and reception". *Environmental Entomology* vol. 2. 101-105.
- Ninkovic, V., Al Abassi, S. & Pettersson, J. 2001.** "The influence of aphid-induced plant volatiles on ladybird beetle searching behavior". *Biological Control* vol. 21. 191-195
- Ninkovic, V. & Pettersson, J. 2003.** "Searching behaviour of the seven-spotted ladybird, *Coccinella septempunctata* – effects of plant-plant odour interaction". *OIKOS* vol. 100. 65-70
- Patent nr. WO9937152. 1999.** "Pyrazines as attractants for insects of order Coleoptera". International application published under the Patent Cooperation Treaty (PCT). Fundet på følgende hjemmeside d. 26.05.04: <http://v3.espacenet.com/textdoc?DB=EPODOC&IDX=WO9937152&F=0>
- Pettersson Jan, pers komm.** Sveriges Lantbruksuniversitet. E-mail og personligt møde, 2004 og 2005
- Pettersson, J., Ninkovic, V., Glinwood, R., Birkett, M. & Pickett, J. A. 2005.** "Foraging in a complex environment – semiochemicals support searching behaviour of the seven spot ladybird". *European Journal of Entomology* vol. 102. 365-370
- Pettersson, J., Ninkovic, V., Glinwood, R., Al Abassi, S., Birkett, M., Pickett, J. & Wadhams, L. I tryk.** "Foraging behaviour of *Coccinella septempunctata* (L.): volatiles and allelobiosis". Fundet på følgende hjemmeside d. 11.03.06: <http://www.net.sfsi.co.jp/shoko-travel/symposium/symPDF/S6/Pettersson.pdf>
- Pickett, J. A., Wadhams, L. J. & Woodcock, C. M. 1992.** "The chemical ecology of aphids". *Annual Review of Entomology* vol. 37. 67-90
- Pickett, J. A., Wadhams, L. J., Woodcock, C. M. & Hardie, J. 1998.** "Insect supersense. Mate and host location by insects as model systems for expoliting olfactory interactions". *The Biochemist*. August. 8-13.
- Ravn, H. P., Riis-Nielsen, T. & Enkegaard, A. 2004.** "Mariehøns til bekæmpelse af ædelgranlus". Produktionsafgiftsfonden for Juletræer og Pyntegrønt. Rapport vedrørende (1997-0027). Fundet på følgende hjemmeside d. 22.03.06: http://www.sns.dk/erhvogadm/tilskud/produktionsafgiftsfonden/afslut/1999_0027.pdf
- Reed, H. C., Tan, S. H., Haapanen, M., Killmon, M., Reed, D. K. & Elliott, N C. 1995.** "Olfactory responses of the parasitoid *Diaeretiella rapae* (Hymenoptera: Aphidiidae) to odor of plants, aphids and plant-aphid complexes". *Journal of Chemical Ecology*, vol. 21, no. 4. 407-417
- Rothschild, M. 1961.** "Defensive odours and mullerian mimicry among insects". *Transactions of the Royal Entomological Society of London* 113.
- Rothschild, M., Moore, B. P. & Brown, W. V. 1984.** "Pyrazines as warning odour components in the Monarch butterfly, *Danaus Plexippus*, and in moths of the genera *zygaena* and *Amata* (Lepidoptera)". *Biological Journal of the Linnean Society* vol. 23. 375-380.
- Rothschild, M. & Moore, B. 1987.** "Pyrazines as alerting signals in toxic plants and insects". Labeyrie, V. *Insects-plants: Proceedings of the 6. international symposium on Insect-plant* (Series entomological vol. 41. 97-101).

- Savoiskaya, 1966.** "Ecology of aphidophagous insects": Proceedings of a symposium held in Liblice september 27-october 1, 1965/ ed. by Ivo Hodek. 139-142.
- Schaller M. & Nentwig, W. 2000.** "Olfactory orientation of the seven-spot ladybird beetle, *Coccinella septempunctata* (Coleoptera: Coccinellidae): attraction of adults to plants and conspecific females". European Journal of Entomology vol. 97. 155-159.
- Senconga, C. & Kranz, J. 2001.** "A modified, four-armed olfactometer for determining olfactory reactions of beneficial arthropods". Journal of Pesticide Science vol. 74. 127-132
- Sengonca, C. & Liu, B. 1994.** "Responses of the different instar predator, *Coccinella septempunctata* L. (Coleoptera: Coccinellidae), to the kairomones produced by the prey and non-prey insects as well as the predator itself". Journal of Plant Diseases and Protection vol. 101, no. 2. 173-177.
- Shonouda, M. 1999.** "Aphid aqueous-extract as a source of host searching kairomones for the aphidophagous predator *Coccinella septempunctata* L. (Col., Coccinellidae)". Journal of Pesticide Science vol.72. 126-128.
- StatSoft, Inc. 1995.** "STATISTICA for Windows" [Computer program manual]. Tulsa, OK: StatSoft, Inc., 2325 East 13th Street, Tulsa, OK 74104, (918) 583-4149, fax: (918) 583-4376.
- Stubbs, M. 1980.** "Another look at prey detection by coccinellids. Ecological Entomology vol. 5. 179-182.
- Triltsch, H., Hechenthaler, G., Gosselke, U., Freier, B., 2001.** "How does a ladybird respond to aphids?" IOBC/WPRS Bulletin vol. 24, no. 6. 49-58
- Vet, L. E. M., van Lenteren, J. C., Heymans, M. & Meelis, E. 1983.** "An airflow olfactometer for measuring olfactory responses of hymenopterous parasitoids and other small insects". Physiological Entomology vol. 9. 97-106.
- Wientjens W. H. J. H. , Lakwijk, A. C. & Van Der Marel, T. 1973.** "Alarm pheromone of grain aphids". Experientia vol. 29 no. 6. 658-660.
- Woolfson, A. & Rothschild, M. 1990.** "Speculating about pyrazines". Proc. R. Soc. Lond. B. vol. 242. 113-119.
- Zhu, J., Cossé, A. A., Obrycki, J., Boo, K. S. & Baker, T. C. 1999.** "Olfactory reactions of the twelve spotted lady beetle, *Coleomegilla maculata* and the green lacewing, *Chrysoperla carnea* to semiochemicals released from their prey and host plant: Electroantennogram and behavioral responses". Journal of Chemical Ecology vol. 25 no. 5. 1163-1177