

MÓDSZEREK A KÉMIAI ÖKOLÓGIÁBAN

Vuts József¹, Koczor Sándor², Imrei Zoltán², Jósvai Júlia Katalin², Lohonyai Zsófia², Molnár Béla Péter², Kárpáti Zsolt², Szócs Gábor² és Tóth Miklós²

¹Rothamsted Research, Harpenden, Hertfordshire, AL5 2JQ Egyesült Királyság

E-mail: jozsef.vuts@rothamsted.ac.uk

²MTA Agrártudományi Kutatóközpont Növényvédelmi Intézet, 1525 Budapest, Pf. 102

Cikkünkkel áttekintjük a kártevő rovarok kémiai ökológiájának kutatásában leggyakrabban használt módszereket. A legfontosabbnak tartott, főleg angol nyelvű irodalomra hivatkozva reméljük, hogy kiindulópontul szolgál majd mindazoknak, akik tanulmányaik vagy munkájuk során kapcsolatba kerülnek ezzel a tudományterülettel, és a magyar nyelvű szakirodalom jelenti számukra az első lépést.

Kulcsszavak: szemiokemikália, allelokemikália, feromon, kémiai kommunikáció, illatanyagok, integrált növényvédelem

A kémiai ökológia több tudományágat átölelő kutatási terület, amely a különböző vegyületeknek az élőlények egymással való kölcsönhatásaiban betöltött szerepét vizsgálja. Foglalkozik a jelmolekulák bioszintézisével (Morgan 2010, Dudareva és mtsai 2013), szerkezetük felderítésével és mesterséges előállításukkal (szintézisével) (Francke 2010), a szaglási ingert felfogó, az ingerületet létrehozó, továbbító és feldolgozó környéki és központi idegrendszer élettani folyamataival (Hansson 1999), illetve az illatanyagoknak a viselkedésre és egyedfejlődésre kifejtett hatásaival, s mindezek ökológiai és evolúciós következményeivel (pl. Steiger és mtsai 2011). A kémiai jelek útján történő üzenetváltás az egyik legősibbnek tekintett kommunikációs forma. A kémiai jelek érzékelésének egyik módja a szaglás, amely során az illatmolekulák – összefoglaló néven szemiokemikáliák – jellemzően a levegő közegén keresztül jutnak el a kibocsátótól a felfogó szervezet receptoraihoz (pl. Mollo és mtsai 2014). A centiméteres vagy ennél nagyobb távolságokra terjedő illatmolekulák információs kódot jelenthetnek a táplálékkal, a fajtársakkal vagy éppen a szaporodóhellyel kapcsolatban. Az ízleléses kémiai érzékeléssel a jelen áttekintésben nem foglalkozunk, mivel ott a jelátvitel nem egy külső közegen át történik, a jel nem távhatású.

Feltehetőleg minden ma ismert élőlény képes valamilyen szintű szaglásra, mégis a leginkább kutatott, ezért legjobban ismert csoport – az emlősök mellett – a rovarok osztálya. Ennek az az oka, hogy a legtöbb gazdasági szempontból fontos kártevő a rovarok közül kerül ki, így elsősorban gyakorlati szempontok befolyásolták a kémiai ökológia irányvonalát (Jermy és mtsai 2006, Szócs és Tóth 2010). Az alapmegközelítés szerint szintetikus szemiokemikáliákkal igyekszünk úgy befolyásolni az egyes kártevő fajok viselkedését és/vagy egyedfejlődését, hogy mindez megnövekedett hatékonyságú, célzott és ezen keresztül környezetkímélő növényvédelmi lépésekhez vezessen. Működési elvük szerint fajspecifikus, szelektív feromonokat (pl. Wyatt 2014) vagy kisebb szelektivitással rendelkező allelokemikáliákat használhatunk, utóbbiak különböző fajok egyedei között közvetítik az információt (pl. Schoonhoven és mtsai 1998). Az allelokemikáliák esetében ugyanaz az illatanyag több fajra is hatással lehet, akár oly módon is, hogy egyes fajokat vonz, míg másokat taszít. Egy-egy kártevő rovarfaj kémiai kommunikációjának a feltárása többlépcsős, különböző kísérleti módszereket alkalmazó folyamat, amely sokszor kutatóintézetek közötti, jellemzően nemzetközi együttműködést igényel. A tudományra új eredmények felmutatása mellett

olyan új ismeretek megszerzéséhez vezet, amelyeket a növényvédelmi gyakorlatban alkalmazhatunk, és amelyeket a természetstechnológiába illesztve hatékonyabban és környezettudatosabban gazdálkodhatunk.

Jelen munkában vázlatos áttekintést adunk a rovarok kémiai ökológiájának kutatásában használt módszerekről. A tudományterületnek kiterjedt, jellemzően angol nyelvű szakirodalmából a számunkra kézenfekvő munkákra hivatkozunk, amelyek közül talán legátfogóbbak a Millar és Haynes (1998), valamint Haynes és Millar (1998) szerkesztésében megjelent módszertani tanulmányok, míg a magyar nyelvű szakirodalomból az elválasztástechnika vonatkozásában Kremmer és mtsai (2005) egyetemi jegyzetét vettük alapul egyes fejezeteknél. Jó áttekintést ad a viselkedésről általában Csányi (2002), a rovarökológiáról Szentesi és Török (1997), a rovarok testfelépítéséről Steinmann és Zombori (1981), a statisztikáról pedig Reiczigél és mtsai (2007).

Kémiai kommunikációra utaló viselkedési mintázatok

A felületes szemlélő számára a kémiai ökológiában az információt hordozó illatanyagok állnak a figyelem középpontjában, míg véleményünk szerint a rovarok viselkedésében bekövetkező változások a meghatározóak, amelyek kiváltásához szükségesek bizonyos illatanyagok.

A szárazföldi ökológiai rendszerekben az illatanyagok a levegőben és különféle víztestekben terjednek, melyek közül a légneműek jellemzően közép-, illetve hosszútávon fejtik ki hatásukat, azaz viselkedési választ a felfogó szervezetből a kibocsátó egyedtől legalább néhány centiméterre, de eddigi ismereteink szerint legfeljebb száz méterre (Wyatt 2014).

Egy adott kártevő rovar kémiai ökológiájának megismerése felé tett első lépés olyan viselkedési minta felismerése, amely arra utal, hogy a fajtársak az egymás közötti kommunikációban feromonokat használnak párkeresés vagy tömeges összegyülekezésük (aggregáció) során, illetve allelokemikáliákat a tápnövény felkutatásában és azonosításában. A kémiai kommu-

nikációra utaló viselkedési mintázatok kezdeti bizonyítékoknak (indikációknak) tekinthetők, amelyek felismerését különböző laboratóriumi és szabadföldi vizsgálatok segíthetik. Ezek szemléltetésére néhány példát mutatunk be.

1. A bundásbogár (*Epicometis hirta* Poda) (Coleoptera: Scarabaeidae) tavasszal a gyümölcsstermő növények virágainak szétválásával károsító cserebogárfaj. Tömeges fellépésekor komoly károkat okozhat, mivel a kémiai védekezés a virágzási időszakban aktív, beporzó méhfajok miatt korlátozottan, csak méhkímélő technológiával lehetséges. Emiatt más, költséghatékony módszer alkalmazása jelentősen növelheti a termesztés eredményességét. A cserebogarak csoportjában elterjedt a feromonok használata, melyek a növényi illatanyagoknál specifikusabbak és optimalizált esetekben jellemzően nagyobb hatásereőségűek. A bundásbogár fajon belüli, tehát feromonos kommunikációját sejtető viselkedési mintázatot fedezett fel Imrei és mtsai (2012) szabadföldi csapdázásos kísérletekben. A kutatók nagy fogókapacitású csapdák csalétke helyére kis ketrecben nőtény bogarakat tettek, melyek több hím egyedet csalogattak, mint a hímekkel csalétkezett, illetve csalétek nélküli ellenőrző (kontroll) csapdák (Imrei és mtsai 2012 – *Epicometis hirta* ISCE poszter alapján). Az ebből levont következtetés az volt, hogy a bundásbogárnak nőtények által termelt, hímeket csalogató szexferomona van.

2. Szentesi és mtsai (1975) laborban nevelt káposzta-bagolylepkéken (*Mamestra brassicae* L.) (Lepidoptera: Noctuidae) végeztek megfigyeléseket a faj feromon-összetételének azonosítása céljából, mely végül nagyban előmozdította a kártevő rajzáskövetésének (monitorozásának) a kidolgozását, így ezen keresztül a védekezőtechnológia fejlődését. A mesterséges táplálékon felnövő állatokat fordított napszakos körülmények között, pontosan szabályzott hőmérsékleten és magas páratartalommal tartották. Először a hímekből készített afrodiziákum-kivonatokat (az afrodiziákum a nőtények párzásra való hajlandóságát növelő illatanyag) nőtényekre kifejtett hatását vizsgálták légáramhoz kapcsolt üvegbúrában,

illetve álló légtérben. Hasonló körülmények között került sor nőstény potrohvég-kivonatok ivari aktivitásának vizsgálatára himenken, mely során bizonyítást nyert a nőstény szexferomon megléte a válaszoló példányok száma alapján. Az aktivitásért felelős feromonösszetevőket (feromonkomponenseket) azonosították (Novák és mtsai 1979, Jacquin és mtsai 1991), és később a szintetikus szexferomonnal működő, pl. CSALOMON® csapdák alkalmazása a termesztéstechnológiák részévé vált.

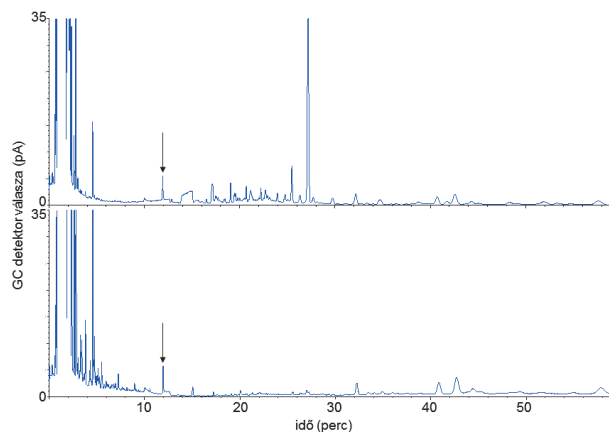
3. A kártevő német darázs (*Vespula germanica* Fabr.) és kecskedarázs (*Vespula vulgaris* L.) palearktikus elterjedésű társas redősszárnyú darászfajok (Hymenoptera: Vespidae), amelyeket a világ számos pontjára behurcoltak és ott jó alkalmazkodó-képességüknek köszönhetően elterjedtek. A darázsak ellen való védekezésben használt csalétek fejlesztésénél táplálékkeresési viselkedésüket vizsgálva azonosítottak olyan szintetikus vegyületeket, amelyek nagy számban csalogatták őket. Kedvelt zsákmányaik közé tartoznak például a különböző légyfajok, melyekkel a fészekben fejlődő lárváikat etetik. A házi légy (*Musca domestica* L.) (Diptera: Muscidae) feromonját, a (Z)-9-trikozént az egyik legismertebb szintetikus darázscsalétekhez adva jelentősen megnövelték annak csalogatóképességét (Jósvai és mtsai, 2012). Új-Zélandon – ahová szintén behurcolták ezeket a fajokat – figyelték meg, hogy a darázsak nagy számban jelennek meg partra vetődött zöld kagyló (*Perna canaliculus* Gmelin.) (Mollusca: Mytilidae), erjesztett barnacukor és az ott jellegzetes *Nothofagus*-bükkösök mézharmattal borított törzsei körül. Az ezekből a forrásokból származó illatanyagokat azonosítva és összevegyítve fejlesztettek ki egy nagy hatású csalétket (Unelius és mtsai 2016).

Az illatanyagok kivonása

Ha van szemiokemikáliák meglétére utaló viselkedési megfigyelés vagy valamilyen visel-

kedési mintázatot alátámasztó kísérleti adat, a soron következő lépés a viselkedési választ kiváltó illatanyagok kivonása az illatforrásból. Ez többféleképpen történhet, és maga az eljárás alapvetően meghatározza a szerkezetazonosítás irányába tehető további lépéseket.

Ellentétben a korábban használatos oldószeres mosással, manapság előnyben részesülnek a közvetlenül a vizsgálati alany légtéréből történő mintavételi eljárások. Ennek az egyik oka, hogy az oldószeres mosás az illékony vegyületek mellett általában sok más, kevésbé illékony összetevőt is kiold a szövetekből, melyektől meg kell tisztítani a kivonatot az elemzések előtt. E módszert használta Koczor és mtsai (2018) egy, a *Chrysopa formosa* Brauer (Neuroptera: Chrysopidae) fátyolkák által termelt riasztó illatanyag azonosítására. A vizsgálatokhoz 25 db kifejlett zöldfátyolka főbb testtájaiból (fej, tor, potroh) külön-külön készült kivonat hexán oldószerben való áztatással. A hexános torkivonatok tisztítása rövid szilikagél-állófázisú oszlopon történt, ahol az oszlopról hexánnal lemosott molekulák hányada (frakciója) már sokkal tisztább képet mutatott gázkromatográfiás (GC) elemzés során, mint a kiindulási kivonat (1. ábra). Az oldószersorban a polárosabbakkal való oszlopmosás polárosabb vegyületek leválasztását



1. ábra. *Chrysopa formosa* torkivonat tisztítása szilikagél-oszlopon. A felső gázkromatográfiás futás a nyers kivonatot mutatja, míg az alsó annak hexánnal kinyerhető hányadát. A nyíl az azonosítandó illatanyagot jelöli

(deszorpcióját) eredményezte volna az alapvetően poláros gélről.

„Koszos” kivonatok tisztítása folyékony nitrogénnel hűtött vákuum-desztillációval is lehetséges, melynél az illékony molekulák $-195\text{ }^{\circ}\text{C}$ alatt csapódnak le, így választhatók el (Al Abassi és mtsai 1998). A másik ok, amiért a légtérből való illatanyaggyűjtés előnyösebb lehet az, hogy jobban tükrözi az élőlény által ténylegesen kibocsátott elegy minőségi és mennyiségi összetételét. Példaként szolgál erre az *Agriotes proximus* Schwarz és *A. lineatus* L. pattanóbogarak esete (Coleoptera: Elateridae), melyeknél az egyik feromonvegyület, a geranilbutanoát csak nyomokban volt kimutatható mirigykivonatokban, míg légtérkivonatokban a mennyisége sokkal nagyobb volt (Tóth és mtsai 2003, Vuts és mtsai 2012).

Egy adott élőlény légtéréből többféleképpen lehet kivonatot készíteni. Először is léteznek ún. statikus eljárások, ahol nyugalomban lévő gőztérből veszünk mintát, ezzel szemben a dinamikus módszereknél a gőztér állandó áramlásban van. Az álló gőztérből történő mintavétel egyik sokat használt módszere a szilárdfázisú mikroextrakció (angol nevének kezdőbetűi után SPME), melynek fontos eleme egy olvasztott kvarcszál, melynek felületére kémiai kötással különböző polimer folyadékfilmeket rögzítenek. A kifűtéses tisztítás után gőztérbe merített mintavető felületén az illékony vegyületek az adott gőztérre jellemző megoszlási hányadosuk értékének megfelelően diffúzió útján megkötődnek (adszorbeálódnak), ahonnan pl. a GC erre a célra kialakított, $250\text{ }^{\circ}\text{C}$ körüli hőmérsékletre felfűtött mintaadagolójában (injektor) a molekulák leoldhatók (deszorpció) és kromatográfiás jellemzőik tanulmányozhatók. Az SPME módszer gyors és hatékony mintavételt tesz lehetővé, érzékenysége a többi eljáráshoz viszonyítva nagy, hátránya viszont, hogy csupán egyetlen elemzésre nyílik lehetőség, hiszen a minta deszorbeálódva a polimer rétegről nem nyerhető vissza, mert a készülék érzékelőjének (lángionizációs detektorának) elérésekor elég. Egy másik, a közelmúltban kifejlesztett statikus mintavételezési módszer poli-dimetilsziloxán (PDMS) darabkák elhelyezése a minta

légtérében, ami mind működési, mind elemzési elvét tekintve hasonló az SPME-hez, de jóval olcsóbb. A polimer oldószeres mosással és kifűtéssel tisztítható, így újra felhasználható (Kallenbach és mtsai 2015).

Dinamikus mintavételezés során pumpák keltette légáram sodorja a kibocsátó ivar által a légtérbe juttatott molekulákat, melyek egy része az illatcsapdaként alkalmazott anyag felületén adszorbcióval megkötődik az adszorbens telítődéséig, illetve a vegyületre jellemző egyensúlyi állapot (equilibrium) eléréséig. A zárt rendszerű illatanyaggyűjtés (CLSA) (Boland és mtsai 1983) lényege, hogy az egységek (mintatároló lombik, keringető pumpa, áramlásmérő, adszorbens filter, csővezetékek) összeszerelése után egy légmentesen zárt, önmagába visszatérő rendszer keletkezik, amelyben a bezárt levegő a továbbiakban nem hígul a környezetből beszívott tiszta, de mintát nem tartalmazó levegővel. Az ilyen rendszer kémiaiilag mindenképpen közömbös (inert), nem kötő felületű, leggyakrabban teflon bevonatú pumpát és áramlásmérőket, illetve tefloncsöveket igényel, hiszen a folyamatosan körbeáramló levegő szennyezéseket vihet magával ezek felületéről, illetve maga a minta is megkötődhet ezek felületén. Ellentétben a nyílt rendszerű illatanyag-gyűjtéssel (lásd alább), a minta nem szárad ki, és a viszonylag zavartalan, zárt körülmények között hosszan tartó, akár 24 órás mintavétel is lehetséges. Schulz és munkatársai (2004) például sikeresen használták a CLSA technikát készletatka-telepek által kibocsájtott aggregációs feromon meghatározásához. Hasonlóképpen eredményes szexferomon gyűjtésről számolt be Molnár és mtsai (2009) CLSA használatával, ahol több mint 2000 darab nőstény gubacsszúnyog által a zárt légtérbe kibocsájtott vegyületeket sikerült az adszorbensen (orvosi szén) összegyűjteni a szerkezet-meghatározáshoz. A módszer további előnyeként említik a célvegyületek feldúsulásának lehetőségét az adszorbens felületén, köszönhetően a folyamatos, zárt körbeáramlásnak.

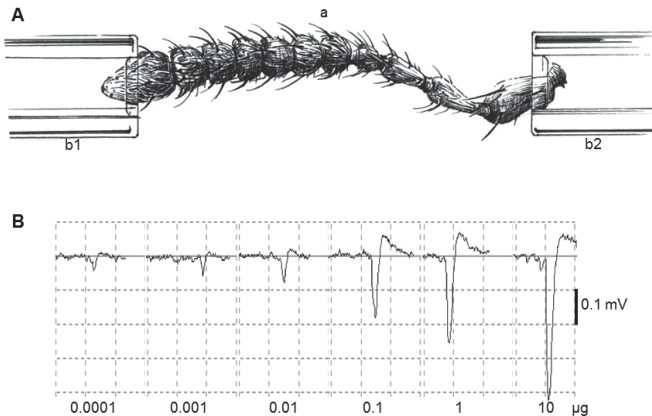
Nyílt rendszerű illatanyaggyűjtés (Agelopoulos és Pickett 1998) során az egyik pumpa a környezetből szívja be a levegőt, ami orvosi

szélen áthaladva megtisztul a szennyeződések-től, így érve el a minta légtérét. Innen szűkített kimeneten keresztül egy másik pumpa szívja ki a levegőt, ebben a kimenetben helyezkedik el a megkötő polimert tartalmazó üvegcső. Fontos, hogy a minta gőzterét a pumpák erősségének szabályzásával állandó, a légnyomásnál kissé nagyobb nyomás alatt tartsuk, így nem szükséges teljesen légmentes szigetelésről gondoskodni, mivel a környezetből nem kerülhet a rendszerbe szennyezett levegő. Szintén fontos figyelembe venni, hogy az eljárás egyes minták (élő növény vagy rovar) kiszáradását okozhatja az állandó légkeringetés miatt. Maga a polimer többféle lehet, és az elemzés célja határozza meg, hogy melyiket használjuk. A Sigma-Aldrich cég által forgalmazott Porapak Q polidivinilbenzén-egységekből felépített ún. kopolimer, mely egyforma méretű, porozítású és felületű gyöngyökből áll. Az egységes felépítés a nagy analitikai pontosságot, a nagyfokú porózusság ($150 \text{ m}^2/\text{g}$) a célvegyületekre való kimagasló érzékenységet biztosítja, növényekből, ill. rovarokból származó illatmolekulák széles tartományának gyűjtésére alkalmas (csökkenő polaritási sorban: szerves sav > alkohol > keton ~ aldehid > észter > éter > alkán). A mintavételezés végeztével a csövecskét szerves oldószerrel (általában tisztított dietil-éterrel vagy hexánnal) átmossuk, ezáltal eltávolítva a Porapak Q polimeren megkötődött vegyületeket. A kapott folyadékminta mélyhűtőben tárolható, és többszöri elemzésre is felhasználható. A Tenax márkanévű polimer jó választás akkor, ha szintén széles vegyülettartományban szeretnénk mintázni, viszont lényeges szempont kis tömegű molekulák érzékelése is. A 2,6-difenil-*p*-fenilénoxid egységekből felépülő polimer ugyan kisebb felületű, mint a Porapak Q ($\sim 35 \text{ m}^2/\text{g}$), a magas hőmérsékleten (350°C) is fennmaradó stabilitása és kimagasló adszorpciós/deszorpciós képessége alkalmassá teszi nagy illékonyságú vegyületek kivonására és kimutatására. Az SPME-módszerhez hasonlóan a Tenax-polimert tartalmazó üvegcsövet a GC felfűtött mintaadagolójába illesztve a megkötődött molekulák deszorbeálódnak. Oldószer használata híján a GC-futás első néhány percé-

ben megjelenő vegyületek is megfigyelhetők, mivel az oldószer kromatográfiás csúcsa nem fedi el ezeket, viszont – az SPME-hez hasonlóan – csupán egyetlen elemzésre van lehetőségünk. A polimerek tisztításánál (ún. kondicionálás) azokat először dietil-éterrel átmossuk, majd a Porapak Q-t 132°C -on, míg a Tenax-ot 220°C -on nitrogénáramban kifűtjük. Azonban deszorpció során nemcsak a megkötött illatanyagok válhatnak le, hanem olykor – nemkívánatos módon – magáról az adszorbensről is távoznak bizonyos összetevők. Ezt a jelenséget is érdemes figyelembe venni a megfelelő adszorbens kiválasztásánál. Manapság elterjedt az ún. Super Q polimer használata is.

Elektroantennográfia (EAG)

Azt, hogy az eddig említett módszerek valamelyikével sikeresen kivontuk-e a megfigyelt viselkedést kiváltó vegyülete(ke)t, becsülni tudjuk egy kifinomult műszer segítségével. Ugyan az elektroantennográfia (EAG) használatának elsajátítása némi gyakorlatot igényel, hosszabb távon értékes időt és erőforrásokat takaríthatunk meg vele. Mivel több áttekintő cikk is megjelent már ezzel kapcsolatban (pl. Schneider 1957, Roelofs 1977, Vuts és Tóth 2008, Szöcs és Tóth 2010), ezért itt csak vázlatosan ismertetjük. Az eljárás a rovar környéki idegrendszere szagérzékeléséért felelős alegységeinek, a főként a csápokon elhelyezkedő szaglászőri érzékszetteknek az illatingerekre adott válaszait méri (2A. ábra). Mivel ezek az ingerek is elektromos jelekké alakulnak az érzékelő sejt dendritjének sejthártyáján, amelyeket a sejt axonja továbbít a központi idegrendszer feldolgozó egységeibe, a sejthártyák által határolt terek közötti töltéseloszlások feszültség formájában mérhetők, erősítők segítségével érzékelhetővé tehetők. A levegőből az illatmolekulák a csápon lévő érzékszőrök (szenzillumok) pórusain jutnak be valószínű diffúzió útján a szőr belsejébe, melyet vizes oldat tölt ki, körbevéve a szőr alapján ülő érző idegsejtek ide benyúló dendritágait. A sejthártyába ágyazott receptorfehérjékhez az oldatban úszó illatanyagköötő fehérjék (OBP)/ (PBP) szállítják a bejutott, javarészt hidrofób



2. ábra. Elektroantennográfia (EAG). A: Elektrodok közé illesztett, szaglószőrökkel borított élő csáp (a). A csáp csúcsi része az érzékelő elektródra húzott, méretre szabott üvegkapillárisban lévő elektromosan vezető folyadékba merül (b1), míg az alapi rész a vonatkoztatási elektróddal lép kapcsolatba hasonló módon (b2). A folyadék ionokat tartalmazó Ringer- vagy más oldat (pl. KCl) (Emma Joanne Thacker-Vuts alkotása). B: Ugyanazon szintetikus vegyület növekvő anyagmennyiségeire a csápon sok esetben növekvő amplitúdójú válasz gerjed egy bizonyos határértékig, melyet millivoltban (mV) mérünk

molekulákat. Az idegsejtek a megfelelő ingerre anyagcseréjük megváltoztatásával válaszolnak, bonyolult jelátviteli folyamatok révén ingerületi állapotba kerülnek. Ez a folyamat egy bioelektromos jelenség, amely a sejthártya két oldala közti ionok eltérő eloszlásából adódó potenciálkülönbség (nyugalmi potenciál) inger hatására történő megváltozásán alapul: a sejten kívüli tér egy pillanatig negatív töltésű lesz a sejt belsejéhez képest. Ha az inger kellő erősségű (energiájú), a kezdeti receptor-potenciálból egy küszöböt átlépve akciós potenciál ébred, mely ingerületként szétterjed az idegszövet rostjain. Ezt a pillanatnyi, a sejteken kívüli térben bekövetkező elektromos potenciál-csökkenést (depolarizációt) megfelelően elhelyezett elektródokkal mérni lehet az egész csáp mentén. Ha az érzékelő elektródot a csáp csúcsi, a vonatkoztatási (referencia) elektródot pedig az alapi részéhez csatlakoztatjuk, az EAG készülék áramköre a testfolyadékon keresztül zárul, és a megfelelő szaginger csápra juttatásakor összesített feszültségváltozást mérünk, mely valamilyen, az adott ingerre érzékeny idegsejt egyesített válasza (2B. ábra). Ez a válasz a feszültség

időbeni változását kifejező oszcillogrammal ábrázolható, melyet ma már számítógépes program segítségével mérünk, és a feszültség-idő függvény mérési pontjait digitálisan tároljuk. Fontos megjegyezni, hogy az EAG-válaszból nem következtethetünk az adott vegyület által kiváltott viselkedési válasz minőségére (pl. vonzás/taszítás), mégis, fontos információ, hogy az adott illatanyagot a szóbanforgó rovar érzékeli. Az Ockenfels Syntech GmbH cég (Kirchzarten, Németország) az egyik legismertebb gyártó, amely mind az EAG berendezést, mind a hozzá tartozó programokat forgalmazza.

Az elektródok közé helyezett élő rovarcsáp rendkívül érzékeny, a vizsgálati alany (pl. tápnövény vagy rovar) légtér-

ből készített kivonat igen kis mennyiségével, általában már néhány mikroliterjével (µL) ingerelhető. A mintát kis darab szűrőpapírra csempentjük, majd ezt Pasteur-pipettába helyezzük, és vagy kézi fecskendő, vagy szabályozható légáramot biztosító pedálos légfúvó (stimulus kontroller) által a pipettán levegőt fújunk át, egyenesen a csáppreparátum felé tartó párasított légáramba. A csáp egy idő után elveszti érzékenységét, ami az ugyanarra az ingerre (stimulusra) a kísérlet elején és végén adott válasz nagyságának csökkenéséből jól látható. Ennek valószínűleg a preparátum kiszáradása az oka, de egyes feltételezések szerint az időközben az érzékszőrök felszínén felhalmozódó, és ezáltal az illatmolekulák szűrőbe való bejutását akadályozó szénhidrogén-vegyületek felhalmozódása a felelős (Böröczky és mtsai 2013). Bárhogy is van, érdemes egy, a csápból ismert EAG-választ kiváltó szintetikus vegyülettel (standard) a kísérlet elején és végén is ingerelni, majd a többi választ a program segítségével a standard átlagára „szabványosítani” (normalizálni). Mivel némely esetben nem zárható ki, hogy maga az oldószer is EAG-

aktív, ellenőrzésképpen érdemes azt bevonni a vizsgálatokba (negatív kontroll). Általában öt-tíz független ismételtesben – azaz öt-tíz olyan csápon, amelyek más-más egyedről származnak – lefuttatott ingsorozatot már megadja, mely kivonatokat a legaktívabbak, melyekre érdemes a további azonosítási erőfeszítéseket összpontosítani. Növelheti az EAG-görbék nagyságának (amplitúdójának) összehasonlítására alkalmazható statisztikai próba erősségét, ha az illatanyagokat véletlenszerű sorrendben alkalmazzuk az ismételtesek között. Szintén növeli mérésünk megbízhatóságát, ha a vizsgálandó vegyületek által kiváltott EAG választ több dózisban is mérjük (dózis-hatás görbék), és egy sorozatban mindig az azonos dózisban alkalmazott vegyületek hatását hasonlítjuk össze.

Gázkromatográfhoz kapcsolt elektroantennográfiás detektor (GC-EAD)¹

A kártevő rovarfajból vagy annak tápnövényéből készített illatminták általában több tucat összetevőből állnak. Azt, hogy ezek közül melyek váltanak ki bioelektromos csáp választ, segít megválaszolni, ha az EAG-készüléket GC-vel kapcsoljuk össze (GC-EAD). A GC működési elvéről több kiváló munka készült (pl. Millar és Haynes 1998, Kremmer és mtsai 2005), itt most csak a gyakorlati alkalmazás szempontjából legfontosabb ismeretekre térünk ki röviden. A gázkromatográfia – mint a többi kromatográfia eljárás – összetett elegyek szétválasztására alkalmas, mely az összetevők két fázis közötti ismételt megoszlásán (adszorpció-deszorpció) alapul. A GC mozgófázisa egy megfelelően kiválasztott nagy tisztaságú vivőgáz (leggyakrabban hidrogén vagy hélium), mely nem lép kölcsönhatásba az állófázissal (vagyis kémiai szempontból nem aktív). Az állófázisok különböző folyadék fázisú szerves polimerek, melyek kapilláris üvegoszlop belső falához vannak rögzítve. A korábban már említett PDMS állófázisként való alkalmazásakor (pl. a HP-1

márkajelzésű oszlopoknál) az összetevők közül először a legkisebb molekulatömegűek jutnak végig a oszlopon, tehát elválásuk (eluálódásuk) sorrendjét elsősorban forráspontjuk sorrendje határozza meg. Az ilyen, ún. apoláros oszlopokkal szemben a polárosabbak (pl. DB-WAX) poli-etilénlikolt tartalmaznak állófázisként, melyek a molekulák áthaladási sebességét a funkciós csoportok között létrejövő másodlagos (nem-kovalens) kölcsönhatások útján is befolyásolják.

Ha oldószeres (folyadék-) kivonatot elemzünk, 10 µL ürtartalmú ún. mikrofecskendővel pillanatszerűen juttatjuk be annak 1–2 µL-jét a GC mintaadagolójába, mely 350 °C-ig fűthető. Ha közvetlen oldószeres kivonatok elemzése a feladat, érdemes ún. split/splitless mintaadagolót használni „split” üzemmódban, amely a beállított magas hőmérséklet (250 °C) miatt a mintát rögtön gőzállapotba juttatja, majd az érkező vivőgáz a minta egy előre meghatározott arányú töredékét a kapillárisoszlopra sodorja. A megfelelő hőmérséklet megválasztásakor gondoljuk arra is, hogy egyes biológiailag aktív összetevők magas hőmérsékleten elbomolhatnak. A mintaadagolóba benyúló oszlopvég jóval alacsonyabb hőmérsékletű, ezáltal az odasodort minta lecsapódik, majd onnan az összetevők forráspontjának függvényében újra gőzfázisba kerül, s az oszlopba jut. Mivel a minta nagyobbik része szelepeken át eltávozik, ez a beállítás nyomelemzésre nem alkalmas, de például egy 10 m-es oszlophoz csatlakoztatva „koszos” mintákról előzetes képet kaphatunk. „Splitless” üzemmódban már nagyon kis mennyiségek elemzése is lehetséges, mivel itt az összes befecskendezett minta az oszlopra kerül. Hőérzékeny vagy nagy moláris tömegű vegyületek esetén a „cool on-column” mintaadagoló használata javasolt, amely kialakítása által lehetővé teszi, hogy a különleges kiképzésű fecskendővel a minta legfeljebb 4 µL-ét közvetlenül az alacsony hőmérsékletű (30–40 °C) oszlopra juttassuk.

¹A műszer-együttes magyar nevéként a „bioszenzoros gázkromatográf” megjelöléssel már találkozhattunk a hazai szakirodalomban (Szöcs és Tóth 2010).

A GC hőszabályzó kályhájában (termosztát/oven) helyezkedik el maga a föltekert kapillárisoszlop, melyben a kromatográfias elválasztás folyamata végbemegy. A kályhában légkeringetés biztosítja az egyenletes hőeloszlást, így az eredmények precíz ismételhetőségét. A kályha hőmérséklete programozással szabályozható, egy elemzés tulajdonképpen egy hőmérsékletprogram alatt játszódik le. A leggyakrabban 0,25 és 0,32 mm belső átmérőjű kromatográfias oszlopban a vivőgáz 0,3–15 cm³/perc térfogati sebességgel áramlik, és az állófázissal különböző kölcsönhatásokat létesítő vegyületeket végigsodorja az oszlop teljes hosszán. Azt az időtartamot, ami egy adott vegyület oszlopon történő áthaladásához szükséges, visszatartási (retenció) időnek (RT) nevezzük, melyet a rá jellemző megoszlási hányados határoz meg. Az oszlop összetevőkre nézett felbontásának ideális értékét az oszlophossz, a hőmérséklet és a vivőgáz nyomásának összehangolásával érhetjük el. A hőmérsékletprogram beállításánál fontos, hogy a mintában lévő összetevők hőstabilitásán túlmenően azt is figyelembe vegyük, hogy a kályhában lévő oszlop (vagy oszlopok) maximálisan hány fokot bír(nak) ki, ugyanis fennáll a veszélye annak, hogy olyan magas maximális hőmérsékleti értéket programozunk be, amely a hőérzékenyebb oszlopot „megsüti”, azaz tönkretesz. Hasonlóképpen figyelni kell arra, hogy a vivőgáz a vizsgálat (futás) közben ki ne fogyjon, mert ha enélkül fűtjük fel az oszlopot, akkor az állófázis károsodhat, az oszlop tönkremeget.

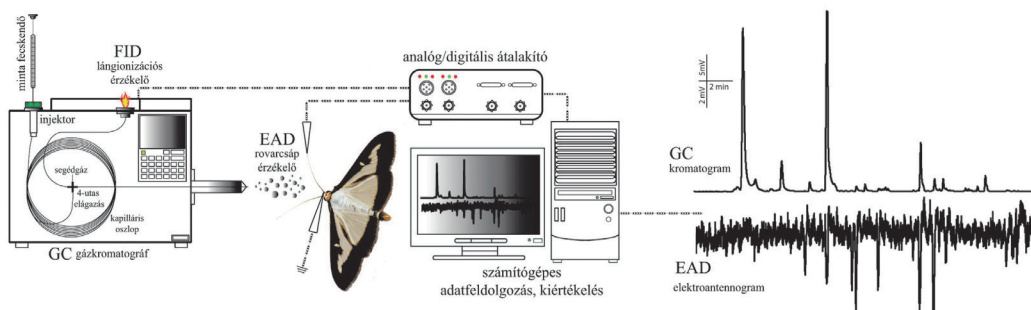
Az oszlopról elválasztódó összetevők a GC érzékelőjében (detektorában) a mennyiségükkel arányos elektromos jelet váltanak ki, melyet a csatlakoztatott adatfeldolgozó rendszer alakít át hasznos információvá, többek között a jelintenzitás idő függvényében való ábrázolásával kapott kromatogrammá. A fűthető detektor hőmérséklete általában 20–30°C-kal magasabb, mint az oszlop végső hőmérséklete a kedvezőtlen lerakódások megelőzése végett. A kémiai ökológiában az egyik leggyakrabban alkalmazott kémiai detektor a lángionizációs detektor (flame ionisation detector (FID)), ahol az oszlopon áthaladó vegyületek molekulái

egy kb. 2000–2500K hőmérsékletű hidrogén-levegő lángba jutnak [sokszor segédgázként nitrogént, vagy magából a vivőgázból egy löketet (make-up) használnak]. Itt a szerves vegyületek felbomlanak kisebb egységekre (fragmentálódnak) és egy részük ionizálódik, majd anyagmennyiségükkel arányos áramot, végül elektromos jelet eredményeznek.

A ChemStation programcsomag (Agilent Inc.) alkalmas a GC detektorából származó elektromos jelek feldolgozására. Kivonatunk összetevői ideális esetben Gauss-görbével leírható csúcsokként jelennek meg, melyek például retenció idejükkel, magasságukkal, szélességükkel vagy a szomszédos csúcsoktól való elválasztódásuk mértékével (szelektivitási tényező, α) jellemezhetők.

A GC-EAD (Arn és mtsai 1975, Szöcs és Tóth 2010) egy mára már szinte nélkülözhetlenné vált módszer a kémiai ökológus számára. Mint láttuk, kivonataink általában bonyolult összetételűek, ami megnehezíti annak eldöntését, hogy mely összetevők lehetnek felelősek a megfigyelt viselkedésért, melyekre majd a soron következő szerkezetazonosítási lépéseket kell összpontosítanunk. Viszont ha a GC-t az EAG-műszerrel egy különleges fűthető csatoló elemen (transfer line) keresztül összekapcsoljuk, a csáp válaszait mérhetjük a kivonat csúcsokként megjelenő egyes összetevőire, mivel a két futás időben megfeleltethető, szinkronizált (3. ábra). Az EAG-válaszok megmutatják, mely csúcsok hordoznak élettani aktivitást, melyek aztán esetleg viselkedési választ is kiváltanak. A GC-EAD lényege, hogy a GC-oszlop végén egy elágazás a kivonat egyik felét a GC érzékelőjére, a másik felét pedig a fűtött csatoló elemen keresztül a csápérzékelő felé áramló párasított légáramba irányítja. Három-négy futás után már kijelölhetők azok a csúcsok, melyek ismételt csápválaszt váltottak ki, s így további figyelmet érdemelnek.

Elektromos válaszokat nemcsak egész csápból, hanem annak egyetlen érzékszőréből is felvételezhetünk az ún. egyedi érzékszőrből való mérés módszerével [single sensillum recording (SSR)]. Erről egy önálló cikk keretében lesz szó.



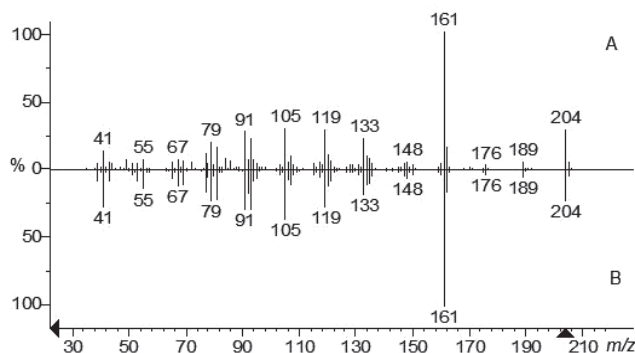
3. ábra. A GC-EAD vázlatos felépítése (Molnár B.P. nyomán)

Szerkezetazonosítás

Tömegspektrometria, gázkromatográfhoz kapcsolt tömegspektrométer

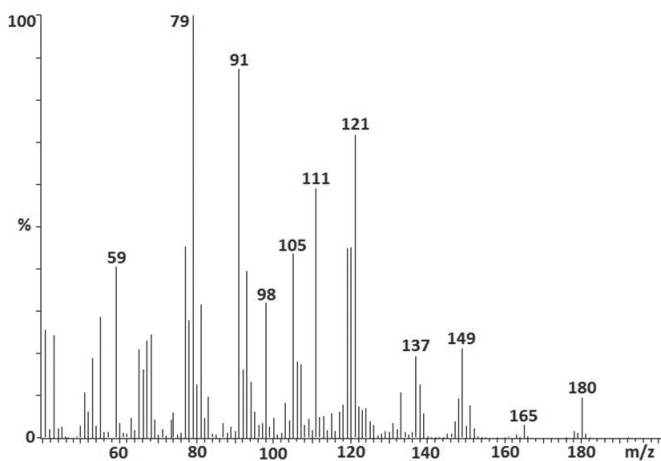
A gázkromatográfiában használt érzékelési módok között a tömegspektrométer (MS) a leghatékonyabb, mert minden olyan összetevőt érzékel, mely a GC oszlopán elválasztható, illetve mert az MS-ben a mérés során a vegyület széthasításakor képződő anyagi részecskék tömege, töltése és eloszlásuk (tömegspektrumuk) alapján az eredeti vegyület szerkezetének előzetes meghatározása lehetővé válik. A GC-MS nagy érzékenysége miatt a kezdeti szerkezetazonosítás leginkább használt módszere, már pikogrammmnyi mennyiségekről is hasznos ismeretekhez juttat. A mozgófázisként héliumot használó GC oszlopáról elválasztódó anyagok az MS ionforrásában molekulászerkezeti sajátágaiknak megfelelően fragmentálódnak és részben ionizálódnak. A tömegspektrométerek belsejében a vizsgálandó vegyület széthasítása elektronnyaláb segítségével, vákumban (légüres térben) történik. Az ionok keltésére leginkább elterjedt módszer az ún. elektronütközési ionizáció (EI), melynél az izzó katódból kilépő, standard üzemmódban 70 elektronvolt (eV) energiájú (1.6×10^{-19} J) elektronokkal való ütközés következtében a molekulák darabolódnak és ionizálódnak. Ezeket ionoptikai lencsék

gyorsítják, fókuszálják és juttatják az analizátorba, melynek a legelterjedtebb fajtája az ún. kvadrupol tömegszűrő. Itt az ionok a gerjesztett elektromágneses térrel való kölcsönhatásuk következtében tömeg/töltés (m/z) hányadosuk alapján szétválnak, s minden időpillanatban csak adott m/z értékű ionok jutnak át a szűrőn. Az analizátort elhagyó ionok intenzitását ion-elektron átalakítók mérik, ahol a becsapódó ionok másodlagos elektronokat keltenek, melyek nagyfeszültség hatására sokszorozódnak, ezáltal igen kis ionintenzitások is mérhetők (lásd nagy érzékenység). Az egyes csúcsokhoz tartozó tömegspektrumok – melyek adott vegyület ionizálódott fragmentjeinek relatív intenzitását ábrázolják az m/z hányados függvényében – összehasonlíthatók MS-könyvtárakban [pl. National Institute of Standards and Technology (NIST)] lévő spektrumokkal (4. ábra). Amennyiben azonban



4. ábra. γ -Kadinén csúcs meghatározása növényi olaj hexános frakciójában. Az m/z 161 és m/z 204 (M^+) értékű ionokra való célzott keresés az Agilent cég ChemStation programja által működtetett felületen megadta azt a csúcsot, melynek a tömegspektruma (A) jó egyezést mutatott a NIST-könyvtárban lévő γ -kadinén standardéval (B)

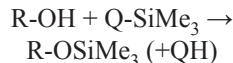
olyan vegyülettel állunk szemben, amely nem szerepel a könyvtárban, annak szerkezetét természetesen ily módon nem tudjuk meghatározni. Ilyenkor a szakterületen jártas kémikus nyújthat segítséget. A tölgyaknázó sörtésmoly (*Tischeria ekebladella* Bjerk.) (Lepidoptera: Tischeriidae) szexferomonja például új, eddig még sohasem azonosított vegyületnek („new natural product”) bizonyult, amelynek meghatározását prof. Wittko Francke (Hamburgi Egyetem) bravúros szerkezet-rekonstrukciója tette lehetővé (Molnár és mtsai 2012). Ráadásul sok esetben maga a molekula-ion (M^+) is érzékelhető, amely viszont az adott csúcs által képviselt ismeretlen vegyület tömegét adja meg (5. ábra).



5. ábra. A metil-(2E,4Z,7Z)-2,4,7-dekatrienoát tömegspektrumra. Y-tengely: relatív ionintenzitás, x-tengely: ionfragmentek tömege (mivel a z töltésük általában 1), melyet az egyes csúcsok fölötti számok külön ki is emelnek. m/z 180: molekula-ion (M^+), vagyis egy 180 g moláris tömegű vegyületről van szó. A szerkezet-azonosításban további segítséget jelentett az m/z 59 (metoxikarbonil-csoport), m/z 121 (M^+ -ból metoxikarbonil-csoport leválása) és m/z 149 ion (M^+ -ból metoxi-csoport [m/z 31] leválása), melyből arra következtettünk, hogy az ismeretlen vegyület egy tíz szénatomszámú, három kettős kötést tartalmazó karbonsav metil-észtere (Vuts és mtsai 2015)

Ugyan a GC-MS nagy pontossággal tájékoztat egy ismeretlen – esetünkben EAG-csápválaszt kiváltó – kivonat-összetevő szerkezeti sajátosságairól, sok esetben nem elégséges a vegyület végleges meghatározásához. Előfordul, hogy ún. származékképzési eljárásokkal kell tovább boncolnunk az ismeretlen szerkezet sajátosságait.

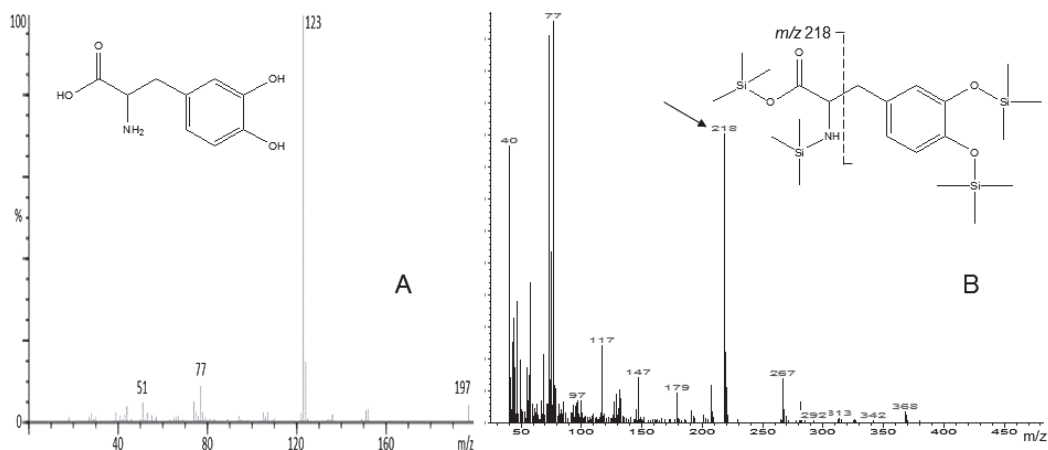
Származékképzésre a mérendő anyag illékonyságának vagy hőmérsékleti stabilitásának növelése, a GC csúcsok átfedésének megszüntetése, a FID vagy MS detektor alsó érzékelési határának csökkentése vagy a kettős kötések számának és helyzetének megállapítása (pl. Molnár és mtsai 2009) miatt lehet szükség. Bő áttekintést ad a témáról Millar és Haynes (1998). A lényeg, hogy a különböző eljárások (pl. szililezés, alkilezés, oximálás) reakció-egyenleteinek ismeretében megjósolhatunk egyes várt kromatográfiai (pl. GC retenciós idő) vagy tömegspektrometriai (jellegzetes ionok feltűnése) jellemzőket. Példának álljon itt az L-3,4-dihidroxi-fenilalanin (L-DOPA) nevű aminosav szililezhetőségét vizsgáló kísérletünk, melytől az anyag jobb megfigyelhetőségét vártuk GC-MS-ben. Az L-DOPA az alábbi egyenlet szerint reagál a szililező reagenssel, ami N-metil-N-trimetilszilil-trifluoracetamid (MSTFA):



A számunkra érdekes termék az egyenlet jobb oldalának első vegyülete, ami azt mutatja, hogy a kiindulási anyag összes hidroxilcsoportja szilileződik, így GC-MS-ben jellegzetes jelet ad (6. ábra).

Mágneses magrezonancia spektroszkópia

Az ismeretlen molekula szerkezetéről további ismeretekhez juthatunk spektroszkópai (infravörös-, ultraibolya-, mágneses magrezonancia-) módszerekkel. A mágneses magrezonancia spektroszkópia (NMR) hatalmasat lendített a kémiai szerkezet-azonosítás területén, nagyban felgyorsítva az ismeretlen, biológiai aktivitással bíró vegyületek meghatározását. Az NMR-spektrum felvételéhez magára a tiszta vegyületre van szükség, amit emiatt el kell



6. ábra. L-DOPA szililezés előtt (A) és után (B). Az ábra B részén látható származék jól megfigyelhető GC-MS ionfragmentje a nyíllal jelölt m/z 218. A termék illékonyabb, mint a kiindulási anyag, így GC-MS-ben könnyebben elemezhető

különíteni a kivonatból. Ez leggyakrabban elválasztó (preparatív) kromatográfiás eljárásokkal [GC, ill. nagynyomású folyadékkromatográfia (HPLC)] történhet (Zuo és mtsai 2013, Keeling és mtsai 2001, Sperling és mtsai 2015). Az NMR előnye, hogy mintánk az elemzés után nemvész el – ellentétben a GC-vel vagy a GC-MS-sel –, viszont viszonylag nagy mennyiségek (néhány tíz μg fölött) szükségesek ahhoz, hogy elegendő adathoz jussunk.

A szerkezet-meghatározás helyességének ellenőrzése gázkromatográfiával

Ha sikerült a lehető legnagyobb biztonsággal azonosítanunk az ismeretlen csúcsot, hátra van még az ún. teljeskörű (abszolút) meghatározás, ami abból áll, hogy beszerezzük a legbiztosabbnak vélt szerkezet tiszta, szintetikus változatát (standardját). Jó esetben ez kereskedelmi forgalomban elérhető (pl. Sigma-Aldrich, Bedoukian, TCI), előfordul viszont, hogy kémikusok együttműködésére van szükség annak szintézisére. A bevett módszer (Pickett 1990) az, hogy először az ismeretlen csúccsal megegyező mennyiségű standardot fecskendezünk a GC-be két különböző polaritású oszlopon (pl. HP-1 és DB-WAX), és a retenciós mutatókat [pl. Kováts-index (KI), Kováts 1958]

összevetjük. Ha ezek egyeznek, a kivonatot és a standardot együtt juttatjuk a GC-be (ún. standard addíciós módszer), s ha a meghatározandó csúcs magassága megkétszereződik mindkét oszlopon, viszont a szélessége nem változik, a szerkezet-azonosítás minden bizonnyal sikerült. Az „i”-re a pontot azonban a viselkedési vizsgálat teszi fel (lásd a következő fejezetet).

Viselkedési vizsgálatok

Mivel EAG-válaszok alapján nem lehet eldönteni egy adott vegyületről, hogy milyen viselkedési mintázatot fog kiváltani, a meghatározott összetevők standardjait viselkedési vizsgálatoknak kell alávetni. Ugyan a szabadföldi csapdázás adja meg a végső választ a kérdéses vegyületek gyakorlati használhatóságáról, hasznos lehet laboratóriumi körülmények között előzetes kísérleteket végezni, ha sok a kipróbálandó anyag, mert ezáltal fogalmat alkothatunk az egyes vegyületektől várható hatásokról.

A kémiai ökológiai vizsgálatokban különösen fontos, hogy megfelelő tisztaságú vegyületekkel dolgozzunk, ugyanis – főleg szexferomos kísérletek esetében – a szennyeződések jelentős mértékben gátolhatják a csalogató hatást. Szintén alapvető fontosságú a megfelelő kísérleti előírások betartása, hogy elkerüljük a külön-

bőző kezelések közötti beszennyeződéseket, mert ezek is jelentősen befolyásolhatják a kísérlet kimenetelét. Sok példa bizonyítja, hogy az egyik rovarfaj feromonja jelentős mértékben gátolhatja egy másik, azonos időben, ugyanazon az élőhelyen rajzó faj feromonjának aktivitását, még ha csak nyomokban van is jelen (pl. Szöcs és mtsai 2002, 2004).

Olfaktométerek

A szaglási ingerek által kiváltott viselkedési válaszok mérésére alkalmas ún. olfaktométerek („szaglási válasz-mérők”) több változata ismert, de a leggyakrabban használt a kétutas (ipszilon, Y-tube) és négyutas (négykarú/4-arm) olfaktométer. Mindkétben folyamatos légáram sodorja az illatmolekulákat a forrástól a kísérleti állat(ok) által bejárható térrészbe, melyek mozgását a kísérlet időtartama alatt folyamatosan figyelemmel kísérjük és felvételezzük. Haynes és Millar (1998) kimerítően tárgyalja a különböző módszereket. A kísérleteket elsötétített, szellőztető berendezéssel ellátott szobában, egy belülről fekete falú dobozban végezzük, ahol az egyetlen fényforrás a berendezés fölé elhelyezett neoncső. Ennek vibrálási frekvenciája a rovar által érzékelhető érték fölött van (Shields 1989), s amely alá áttetsző papírlapot helyezünk, ami a fényt szétszórja, egyenletes megvilágítást biztosítva ezáltal. Végül hogy a sztatikus elektromosság hatását csökkentjük, földelt gumilap kerül az olfaktométer alá. A kétutas olfaktométer (McIndoo 1926, Skelton és mtsai 2009, Molnár és mtsai 2010) légáramlását többféleképpen meg lehet oldani.

1. Egy pumpa kemencében előzőleg kifűtött (aktivált) orvosi szén-szűrőn, majd desztillált vízen átnyomja a levegőt. A tisztított és párasított légáram kettéosztva jut áramlásmérőbe, ahol a sebességet lehet szabályozni. Innen tefloncsöveken az ipszilon két karjába ömlik, melyek bevezető szakaszában vannak elhelyezve a kipróbálandó illatanyagok, többnyire egy darab szűrőpapírra mérve. A levegő végig-sodorja az olfaktométer karjaiban az illatmolekulákat, melyek azok tövénél összekeverednek

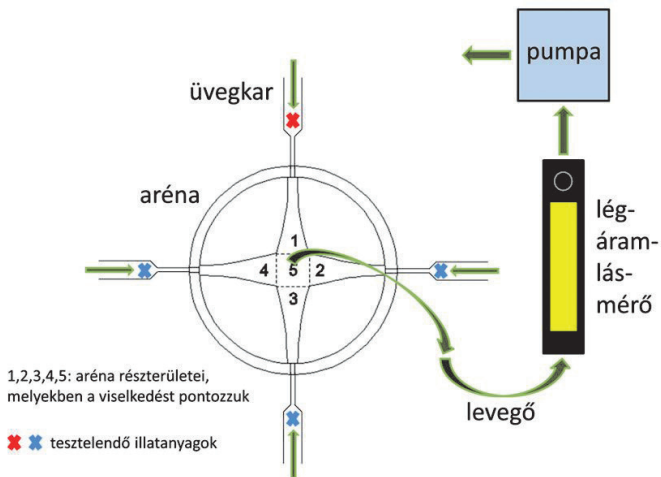
és az alsó szárban tovább utaznak, ez utóbbi a végén nyitott, hogy a levegő eltávozhasson.

2. A levegőt szívópumpa segítségével át is „húzzhatjuk” a rendszeren, amely ebben az esetben a szár után van csatolva, a többi alkatrész ugyanolyan elrendezései, mint az előzőnél.

3. Ha nem csak szűrőpapírra kimért szintetikus vegyületekkel kísérletezünk, hanem például élő növényekkel, érdemes pozitív nyomású rendszert beállítani, ahol a párasító és az áramlásmérők közé lezárt búraba tesszük a kísérleti növényeket. A búrából a levegőt a szívópumpa távolítja el.

A kísérleti állatokat a szár alján eresztjük el, melyek jó esetben légáram ellenében fognak elindulni, s a karok találkozásánál választanak, hogy melyik stimulus felé fordulnak. Ha szintetikus vegyületekkel dolgozunk, kontrollként a hígításhoz használt oldószert használjuk, ugyanolyan térfogatban. A kísérlet hossza fajtól függ, némelyiknek szükséges valamennyi idő, hogy megszokja az új környezetet (akklimatizálódjon), s csak ezután mutat kereső viselkedést. Egyesével vagy csoportosan is vizsgálhatjuk a rovarokat, melyek válasza magányos állatok esetében lehet az elsőként választott kar (pl. az utolsó kétharmadnyi szakaszt elérte-e), vagy a kar, melyben a kísérlet végén a rovar található. Csoportosan tesztelt fajoknál az egyedek megoszlása a karok között lehet a mérendő változó. Minden egyes ismételteshez tiszta olfaktométert használunk, és az ismétlések között váltogatjuk a karok helyzetét, hogy kizárjuk az esetleg befolyásoló látási (vizuális) vagy más nem ellenőrzött (kontrollált) ingereket. Általában khi-négyzet-próbát használunk az eredmények kiértékelésére. Az üvegalkatrészek tisztítása meleg mosogatószeres vízzel, acetonos öblítéssel, majd kemencében való kifűtéssel történik.

A négyutas olfaktométer (Pettersson 1970, Vet és mtsai 1983, Vuts és mtsai 2015) (7. ábra) esetében általában egy kísérleti állatot vizsgálunk egyszerre, melynek négy választási lehetősége van. Működési elve hasonló az előző típushoz, a különbségek az alábbiakban foglalhatók össze: a térrészt, amiben az állat mozog, három plexikorong fogja közre, melyeket műanyag csavarok préselnek össze, hogy a



7. ábra. Négyutas olfaktométer vázlatos felépítése. Csalogató hatású illatanyagok esetében csak az egyik karba helyezünk illatanyagot, míg a másik három karba oldószerrel kezelt kontrollt. Taszító (repellens) hatású illatanyagok esetén csak egy kontroll van

minél jobb légmentességet biztosítsák. A kipróbálható vegyületeket hordozó szűrőpapírdarabokat az üvegkarokba tesszük, melyeken egy pumpa szívja át a levegőt, egyenesen a belső térrészbe – ebben az esetben nincs légtisztítás. (Amennyiben egész növényt tesztelünk, a felépítés hasonló a kétutas olfaktométeréhez.) Az olfaktométert szabályos időközönként (pl. 16 perces kísérlet esetén 4 percenként) 90°-kal elforgatjuk, hogy bármilyen fényforrás vagy egyéb látási inger okozta hatást csökkentsünk. Mérendő változó lehet az egyes karokban eltöl-

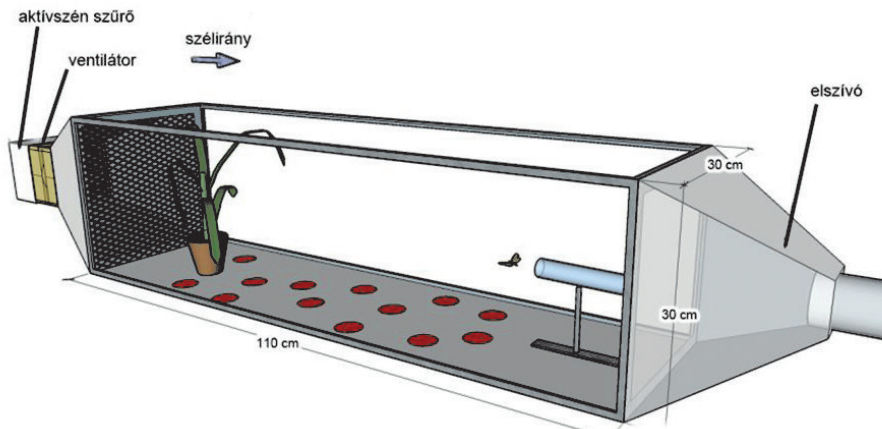
tott idő hossza, a karokba való belépések száma vagy az első választott kar. Az adatok statisztikai kiértékelése nem egyértelmű (lásd: Szentesi és Jermy 1999), általánosított vagy kevert lineáris modellekkel az idő változó hatása becsülhető. A plexialkatrészeket etanollal öblítjük, s levegőn szárítjuk.

Rovar-szélcsatorna

A szélcsatornás viselkedési vizsgálatokat repülő rovarok esetében lehet alkalmazni. A mérések során nagyon közel kerülhetünk az illatanyagok szabadföldi hatásvizsgálatához, mivel ilyen körülmények között

a rovarok anemotaxisát, az illatanyagok felé való repülését tanulmányozhatjuk laboratóriumi körülmények között. A vizsgálat segítségével megtudhatjuk, hogy a kérdéses vegyületek vagy azok keverékei csalogató vagy taszító hatással bírnak-e.

A rovar-szélcsatornáknak több típusa létezik, melyek között méret- és alakbeli különbségek lehetnek, illetve szívó, vagy fújó elven működő légáramlással üzemelhetnek (8. ábra). A szélcsatornát szellőztető rendszerrel ellátott helyiségben üzemeltetjük, hogy a szobában



8. ábra. Rovar-szélcsatorna vázlatos felépítése

esetlegesen felgyülemelő illatszennyezéseket eltávolítsuk. Ezenkívül az éjszaka aktív rovarok tanulmányozása esetében teljes sötétséget, vagy holdfénnel egyenértékű fényerősséget és megfelelő páratartalmat kell biztosítani. Egy szabályozható ventilátor, amely változtatható áramlási sebességet biztosít nagyon nagy pontossággal, áramoltatja a levegőt a berendezés egyik végéből a másik felé. A bemeneti nyílásnál egy aktív szén-szűrő helyezkedik el annak érdekében, hogy a szélcsatornába csak tiszta, illatanyagmentes levegő érkezzon. Általában lamináris légáramlással dolgozunk (10–100 cm/s), ezért a beáramló levegőt egy sűrű szövésű fémhálón vezetjük át. A légáramlás sebességét és az örvénylés (turbulencia) mértékét titán-tetraklorid (TiCl_4), vagy egyéb (kevésbé mérgező) füstképző anyaggal mérhetjük. Fontos, hogy a szélcsatorna kivezető végéhez elszívó-berendezést kössünk, hogy az illatokkal szennyezett, eltávozó levegő ne a laboratórium légterében keringjen. A rovarokat legalább 1 órával a kísérlet megkezdése előtt be kell helyezni abba a helyiségbe, ahol a szélcsatorna van, hogy akklimatizálódjanak a szoba hőmérsékletéhez, páratartalmához és fényerősségéhez. Különösen ügyelnünk kell arra, hogy a fotoperiódus megegyezzen azzal a fotoperiódussal, amelyen a rovarokat előzőleg tartottuk, ugyanis ellenkező esetben azok biológiai órája miatt elmaradhat a stimulusra várt viselkedési válasz. Hogy közvetlenül a mérés előtt ne zavarjuk meg a rovarokat, már ekkor érdemes a vizsgálatra szánt példányokat egyesével két végén fémhálós lezárt indítóketrecbe (10–15 cm hosszú üveghenger, az átmérő a rovar méretétől függ) tenni. A szélcsatornának a tesztelendő illatforrással ellentétes végében, légárammal szemben helyezük el az indítóállványt, amelyre a rovar vagy az indítóketrecet tesszük. A szélcsatorna másik végében az illatforrást helyezük el, ami felé – ha rovarok számára vonzó az illat – azok légárammal szemben repülnek. Az illatforrás lehet élő rovar ketrecben, tápnövény, tápnövényből származó illatok közvetlen szélcsatornába való bevezetése (Kárpáti és mtsai 2013a) vagy szintetikus illat (feromon, kairomon) és keverékük, melyeket különböző

kibocsátókra (gumigyűrű, szűrőpapír, kanócos kibocsátó stb.) mérhetünk. A vizsgálat során a rovarok különböző viselkedésformáit tanulmányozhatjuk, mint például: csápok mozgása, indítóketrecben történő mozgás, aktivitás, indítóketrecből történő kirepülés, az illatforrás felé való irányba állás, forrás irányába mutató repülés (pozitív anemotaxis), illatforrás megközelítése, illatforrás megérintése, illatforrásra való leszállás. Ezen viselkedési lépések idejét is mérhetjük (Kárpáti és mtsai 2013b, Molnár és mtsai 2015). A szélcsatorna köré kamerákat szerelhetünk, melyek rögzítik a rovarok két- vagy háromdimenziós mozgását, ebből kiszámíthatjuk az egyes lépések közötti vagy az átlagsebességet, illetve a rovarok elfordulási szögét az illatforráshoz képest (Witzgall és Arn 1990, Kárpáti és mtsai 2013b). A mérések során ügyelni kell a tisztaságra, mivel bármilyen kis szennyeződés, mely a szélcsatorna falán marad, eredménytelen méréshez vezethet, ezért mérés után erős légárammal esetenként 97%-os alkohollal kell tisztítani a berendezést és a hozzá tartozó kiegészítőket.

Szabadföldi viselkedés-vizsgálatok

Egy vegyület vagy vegyületkeverék (kombináció) csalogató, vagy épp riasztó hatásáról a leghitelesebb eredményt a szabadföldi vizsgálatok adják, amelyekben az adott stimulust olyan nem szabályozott környezetben vizsgáljuk, ahol a rovar természetes körülmények között előfordul, szemben a laboratóriumi vizsgálatokkal, ahol ellenőrzött, a vizsgálni kívánt tényezőkre lehetőség szerint leszűkített környezetben zajlanak a kísérletek. A kísérlet szempontjából „mélyvíznek” számít a szabadföldi viselkedés-vizsgálat, hiszen jóval összetettebb környezettel szembesülnek az egyedek, amelyben számos egyéb szaglással (olfaktórikus), látással (vizuális) és hallással (akusztikus) kapcsolatos inger éri őket. Tapasztalatok szerint nem biztos, hogy a laboratóriumban kimutatott hatás a szabadföldön is igazolható. A szabadföldi kísérletek eredményességében több olyan tényező is szerepet játszik, amelyeket a leg gondosabb előkészületek esetén sem lehet befolyásolni, mint például a

célfaj népségének (populációjának) tényleges nagysága a kísérleti területen, vagy az időjárás. Egy-egy kísérlet eredményeinek megbízhatósága növelhető, ha a kísérletet több helyszínen, esetleg több rajzási időszakon keresztül is elvégezzük, igaz, ez többletmunkával és -idővel jár.

A szabadföldi kémiai ökológiai kísérletek jellemző kérdése, hogy mely illatanyagra vagy illatanyag-kombinációra, illetve milyen mennyiségekre (kibocsátási sebességre), esetleg arányokra van szükség a viselkedési válasz kiváltásához. A megfelelő kibocsátó (diszpenzer) alkalmazása, azaz a formuláció befolyásolja az adott illatanyag vagy illanyag-kombináció mennyiségi viszonyait, így a kibocsátott illatanyagok arányát, kibocsátási sebességét (időegység alatt kibocsátott mennyiség) vagy éppen a kibocsátás teljes időtartamát. Mind a túl alacsony, mind pedig a túl magas kibocsátott mennyiség csökkentheti a csalogatás hatékonyságát. Csapdázásos kísérletek esetén alapvető fontosságú olyan csapdaforma választása, amely a célfaj viselkedési mintázatát kihasználva minél nagyobb arányban fogja meg a csalétket megközelítő egyedeket. Így pl. mászó rovaroknál talajcsapda, repülő rovaroknál ragacsos vagy varsás csapdatípus lehet megfelelő (Knodel and Agnello, 1990, Lewis and Macaulay 1976, Muirhead-Thomson 1991, www.csalomoncsapdak.hu). A szemiokemikáliák mellett a vizuális vagy más, pl. vibrációs ingerek is fontos szerepet játszhatnak a táplálékkeresésben, ez utóbbiak vizsgálata is szükséges lehet, ugyanis megfelelő színnel vagy más ingerrel vegyítve a csalogató hatás gyakran fokozható. Mindezekén túl, ha a megfelelő csalétek és csapdatípus adott, további vizsgálatok segítségével javíthatjuk a csapdák fogóhatását (pl. csapdamagasság, csapdasűrűség, lombkoronában való elhelyezkedés stb.) (Jutsum és Gordon, 1989). Almamoly esetében például általános következtetés, hogy a feromoncsapdák a lombkorona magasabb részeiben elhelyezve fogják a legtöbb egyedet (Ahmad és Al-Gharbawi 1986, McNally és Barnes 1981, Riedl és mtsai 1979).

Szabadföldi kísérletekben mindenképp célzerű a kezeléseket több ismétlésben kihelyezni,

általában véletlen réteges (blokkos) elrendezésben (randomised blocks design), a csapdák között legalább 5–10 méteres távolságot tartva. A következtetéseket a különböző kezelések által fogott egyedek számának egymáshoz és illatanyag-kezelést nem tartalmazó kontroll csapdákéhoz való viszonyításával vonhatjuk le. A kezeletlen kontroll csapda szerepe különösen fontos azokban a kezdeti kísérletekben, ahol semmilyen, szabadföldi csalogató hatást kiváltó illatanyag-keverék nem ismert, de általában is szükségesek, hiszen fontos vonatkoztatási pontként szolgálnak. Akkor mondhatjuk, hogy egy kezelés csalogatja az adott rovarfajt, ha jelentősen (szignifikánsan) több egyedet csalogat, mint a kontroll csapdák. A későbbi vizsgálatokban a csalogató hatású illatanyagok szintén referenciaként szolgálhatnak (pozitív kontroll), ezekhez mérhetjük például újabb (szinergista) vegyületek hozzáadásának hatását. A csapdák fogásait célszerű rendszeresen (pl. hetente kétszer, de egyes, kis testméretű és tömegesen rajzó faj esetében ennél gyakrabban, akár naponta), hasonló idő elteltével ellenőrizni, de megjegyezzük, hogy az ellenőrzések között nem szükséges pontos időközöket hagyni, mivel számos tényező, úgymint a hőmérséklet vagy a légnyomás változása jóval nagyobb hatással bír a csapdázás eredményére, mint 10–30%-os eltérés az ellenőrzések között eltelt időben. Egyes fajok esetében a faji szintű azonosítás és az ivar megállapítása a helyszínen megtörténhet, de gyakran mikroszkópos vizsgálatra is szükség van. A statisztikai kiértékelés során a különböző kezelések által fogott egyedek számát hasonlítjuk össze általában többmintás statisztikai próbákkal, például varianciaanalízissel és a megfelelő post hoc-tesztel (Day és Quinn 1989), de egyesek nem-paraméteres próbákat javasolnak.

A feromonokat és más szemiokemikáliákat a gyakorlati növényvédelem számos területen felhasználhatja (Jutsum és Gordon 1989), melyekkel kapcsolatosan célirányos kísérletekben határozzák meg az illatanyag felhasználásához szükséges pontos feltételeket. Nem mindegy például, hogy egy faj szintetikus szexferomon-összetevőit előrejelzésre vagy légtértelítésre

szeretnék felhasználni. Légtértelítési eljárásnál a jóval kisebb tisztaságú szintetikus feromonkomponenseket olyan kibocsátóba adagolják, amely nagy mennyiségben hosszú időn (akár egész évadon) keresztül képes egyenletesen kibocsátani a hatóanyag(ka)t (Heuskin és mtsai 2011, Knight és mtsai 2008), míg ha a csalétket csapdában tervezik használni, akkor jóval nagyobb tisztaságú és nagyságrendekkel kisebb anyagmennyiséget kibocsátó diszpenzerekre van szükség. Természetesen a csapdákhoz alkalmazott diszpenzerek esetében is követelmény, hogy vonzóképességüket huzamosabb ideig (legalább egy rajzás teljes időtartamára) megtartsák, az ne csökkenjen számottevő mértékben. A kibocsátó minőségén túl légtértelítés esetében még számos befolyásoló tényező vizsgálata szükséges, azonban jelen cikk ezeket nem veszi sorra.

A csapdák általában a tömeges rajzáskezdet, azaz a néhány egyednél nagyobb fogások megállapítására használhatóak (Tóth és mtsai 2000, 2005a). Noha ragacsos és nem ragacsos csapdaformák esetén egyaránt összehasonlítjuk a fogott mennyiségeket, lényeges megjegyezni, hogy a ragacsos, illetve más telítődő csapdatípusok kevéssé vagy nem alkalmasak mennyiségi viszonyok mérésére, mert fogási teljesítményük (fogókapacitásuk) időben nem állandó. Rajzaskövetésre alkalmas, nagy fogókapacitású csapdatípusokban (általában varsás, folyadékot használó, illetve talajcsapdák) a fogott egyedek számát rendszeresen feljegyezve lehet a célkártató adott területen lévő populáció-nagyságának változását nyomonkövetni.

A csapdák fogásait kártevőcsoportonként, illetve fajonként más módon használhatjuk a növényvédelmi döntéshozatalban. Így jellemzően a sodrómolyok esetén a tömeges rajzáskezdettől (Tóth és mtsai 2005a) számított biológiai null pont felett hőösszeget használhatunk a kártevő egyes alakjai elleni védekezés időzítéséhez, míg a pattanóbogaraknál a teljes éves fogás csapdánkénti átlagából vonhatunk le következtetést (Imrei és Tóth 2012). A mindenkorai növényvédelemmel kapcsolatos döntéshozatal nemcsak biológiai, hanem gazdasági természetű összefüggéseket is magában foglal,

így standardizálása túlmutat a kémiai ökológia, illetve növényvédelem szűkebben vett tudományterületén.

Látás és szaglás kölcsönhatása

Noha a rovarok látása optikailag rendkívül fejlett, számos tekintetben nagyságrendekkel fejletlenebb a gerincesek vagy az ember látásánál. Amit mi körvonalazott mintázatként látunk, azt például a méhek vagy a nappali lepkék a jóval kifinomultabb színárnyalat-érzékelésük segítségével ismerik fel. Különböző fénytani tulajdonságaik révén a rovarporozta virágok a rovarok számára sokkal inkább elütnek a környezetüktől, így „leszállópályaként” irányítják a rovar a táplálékforráshoz (Kevan és Baker 1983). A következő példák a táplálékhoz köthető viselkedési válaszokon keresztül mutatják be a vizuális és illatanyagok tájékozódás egyes eseteit.

Az érzékelés során jelentőséggel bír a vizuális, kémiai és más ingereket a rovar párhuzamosan fogja fel és dolgozza fel, melyek együttesen váltanak ki viselkedési választ, akár egymást erősítve. Az aranyos rózsabogár (*Cetonia aurata aurata* L.) és a rezes virágbogár (*Potosia cuprea* Fabr.) (Coleoptera: Scarabaeidae) esetében a háromféle szintetikus virágillatanyagot tartalmazó csalétek csalogató hatása kék színű csapdákban alkalmazva jelentősen megnövekszik, megjegyezve, hogy e két fajnál csak a kémiai inger jelenlétében lehet kimutatni színpreferenciát (valamely szín előnyben részesítését) (Tóth és mtsai 2005b). Ezzel szemben a rokon bundásbogár (*Epicometis hirta* Poda) esetében a megfelelő két összetevőjű szintetikus virágillat-keverék a megfelelő árnyalatú kék színnel együtt vonzó hatású, de a kék és más élénk színek akár kémiai inger nélkül is nagy számban csalogatják a bogarakat (Schmera és mtsai 2004). A hasonló sokpettyes virágbogár (*Oxythyrea funesta* Poda) csalétek nélkül leginkább a zöldessárga színre érzékeny, amelyhez adva az illatanyag-keverék fogásemelkedést eredményez (Tóth és mtsai 2005b). Ezeket a szín- és virágillatanyag-társításokat egyre szélesebb

termesztői körben használják a cserebogarak Cetoniinae alcsaládjába tartozó fajainak rajzáskövetésére vagy akár az egyedszámok csökkentésére (Voigt és mtsai 2005, Tóth és mtsai 2006).

Vannak olyan fajok, melyeknél a vizuális inger hatása önmagában is elegendő a gyakorlati felhasználásra. Így a lucernacincért (*Plagionotus floralis* Pallas) (Coleoptera: Cerambycidae) a zöldessárga szín önmagában erőteljesen csalogatja (Imrei és mtsai 2014), míg ugyanez a legközelebbi rokon fajok, a bársonyos (*P. arcuatus* L.) és a sárga-farú darázscincér (*P. detritus* L.) esetén nem kimutatható (Imrei Z. nem közölt). Joggal feltételezhetjük, hogy nem az érzékelés képességében van különbség a közeli rokonságban álló cincérfajok között, hanem az adott ingerre adott magasabb szintű, központi idegrendszeri működésben, amely a viselkedési válaszokban mutatkozik meg.

A díszbogarak (Coleoptera: Buprestidae) esetében nem a táplálkozással kapcsolatos tájékozódás, hanem a fajtársak felismerése irányította a figyelmet a vizuális kulcsingerek vizsgálatára. Az ameríkába behurcolt *Agrilus planipennis* Fairmaire (Lelito és mtsai 2007), de számos hazai faj, így az *A. biguttatus* Fabr., *A. sulcicollis* Lacordaire és *A. angustulus* Illiger esetében is a levegőben lebegő hímek egy méter körüli távolságból jellegzetes puskagolyószerű alakjuk és szárnyfedőjük fénytani tulajdonságai alapján ismerik fel a fajtársaknak vélt egyedeket (Domingue és mtsai 2011). A bogarak színét és a fény jellegzetes „színváltó” szórását a szárnyfedő nanométer nagyságrendű rétegezethez adódó fénytörés hozza létre (Domingue és mtsai 2014). A levegőben kereső egyedek lecsapnak a lombzaton üldögélő fajtársakra emlékeztető testekre, amelyek lehetnek más fajhoz tartozó egyedek, de a kísérletek tanúsága szerint akár műbogarak is. A kémiai kommunikáció minden valószínűség szerint már a lehetséges társ testén vagy annak közelében történt leszállás után kap csak szerepet. Néhány másodperc elegendő annak eldöntésére, hogy valóban

fajtársat talált-e a kereső – többnyire hím – egyed, illetve hogy megállapítsa a megtalált egyed ivarát, amelyben a közelre ható vagy csak tapintással érzékelhető (kontakt) illatananyagok adhatnak támaszt.

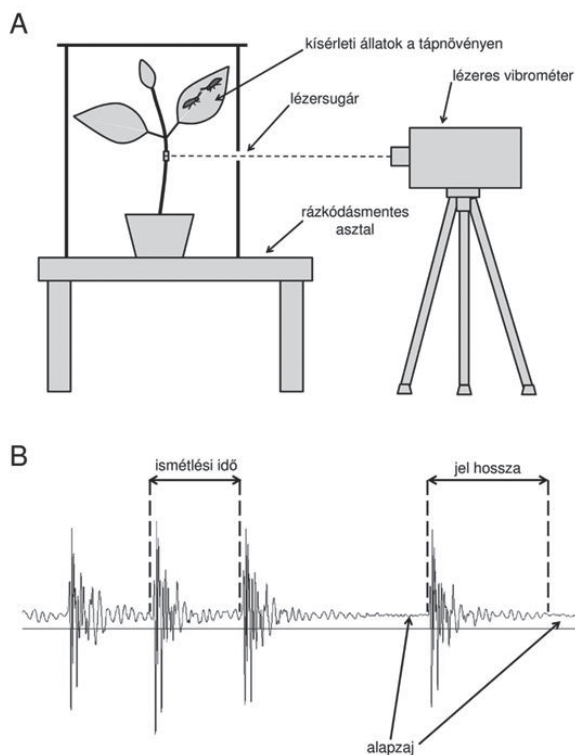
Hallás (vibráció) és szaglás kölcsönhatása

Számos rovarfaj kommunikációjában játszanak szerepet a különböző közegek rezgésével létrehozott jelzések. Nagyobb testű rovaroknál találkozhatunk az emberi fül számára is hallható hanggal, ezekben az esetekben a jelzéseket közvetítő közeg a levegő. Elég például a nagytestű énekeskabócákra gondolnunk, amelyek hangját akár 100 méter távolságból is meghallhatjuk. A hangképzésre számos különböző módszer ismert a rovarvilágban (Claridge 2006).

Számos, főleg kisebb testű rovar azonban nem képes ilyen hangadásra, esetükben a közvetítő közeg valamilyen szilárd aljzat (leggyakrabban növény), amin a rovarok tartózkodnak. A jelzéseket ilyenkor az aljzat (szubsztrát) közvetíti, mely hangok az emberi fül számára általában nem hallhatók. A növényen tartózkodó faj másik egyede viszont érzékeli a rezgést és válaszol rá, a jelzések alapján pedig megtalálják egymást.

Vannak olyan rovarcsoportok, ahol a hangokkal vagy rezgéssel végzett kommunikáció a jellemző, ezeknél olykor nem is ismert olyan feromon, ami a pártalálásban szerepet kapna. Más esetekben azonban mind a feromonok, mind a vibrációs jelzések szerepet játszanak a párkeresésben. Erre példa a zöld vándorpoloska (*Nezara viridula* L.) (Hemiptera: Pentatomidae), amely fajnál a hím szexferomon segítségével csalogatja a nőtényt a növényre, ahol aztán vibrációs jelzésekkel találják meg egymást (Gogala 2006).

A szubsztráton keresztül terjedő vibrációs jelzések vizsgálatára az egyik legkiválóbb módszer a lézeres vibrométer, amely a felület elmozdulásait rögzíti és azokat mérhetővé, ábrázolhatóvá teszi. A berendezés használatát a 9. ábra szemlélteti.



9. ábra A: lézeres vibrométer működési elve. B: a lézeres vibrométerrel mért jelek néhány, a mérések során fontos változóval

Rövidítések jegyzéke

CLSA: zárt rendszerű illatanyaggyűjtés
(closed-loop stripping apparatus)
EAG: elektroantennográfia
EI: elektronütközési ionizáció
FID: lángionizációs érzékelő (flame ionisation detector)
GC: gázkromatográfia
GC-EAD: bioszenzoros gázkromatográf (coupled GC-electroantennographic detector)
HPLC: nagynyomású folyadékkromatográfia (high-pressure liquid chromatography)
KI: Kováts-index
MS: tömegspektrométer (mass spectrometer)
NMR: mágneses magrezonancia spektroszkópia (nucleic magnetic resonance spectroscopy)
OBP/PBP: illatanyag-/feromonkötő fehérje (odour/pheromone-binding protein)

PDMS: poli-dimetil-sziloxán
RT: visszatartási (retenciós) idő (retention time)
SPME: szilárdfázisú mikroextrakció (solid-phase microextraction)
SSR: egyedi érzékszőrből való mérés (single sensillum recording)

Köszönetnyilvánítás

A munka részben a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal (NKFIH) K 124680, NN 123892 és PD 115938 nyilvántartási számú pályázatainak, valamint a Bolyai János Kutatási Ösztöndíj támogatásával valósult meg.

IRODALOM

- Agelopoulos N.G. and Pickett J.A. (1998): Headspace analysis in chemical ecology: effects of different sampling methods on ratios of volatile compounds present in headspace samples. *Journal of Chemical Ecology*, 24: 1161–1172.
- Ahmad T. and Al-Gharbawi Z. (1986): Effects of pheromone trap design and placement on catches of codling moth males. *Journal of Applied Entomology*, 102: 52–57.
- Al Abassi S., Birkett M.A., Pettersson J., Pickett J.A. and Woodcock C.M. (1998): Ladybird beetle odour identified and found to be responsible for attraction between adults. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 54: 876–879.
- Arn H., Städler E. and Rauscher S. (1975): The electroantennographic detector - a selective and sensitive tool in the gas chromatographic analysis of insect pheromones. *Zeitschrift für Naturforschung*, 30: 722–725.
- Boland W., Ney P., Jaenicke L. and Gassmann G. (1983): A "closed-loop-stripping" technique as a versatile tool for metabolic studies of volatiles. In: *Analysis of Volatiles: Methods. Applications. Proceedings, International Workshop Würzburg, Federal Republic of Germany, September 28–30., 1983.*
- Böröczky K., Wada-Katsumata A., Batchelor D., Zhukovskaya M. and Schal C. (2013): Insects groom their antennae to enhance olfactory acuity. *Proceeding of the National Academy of Sciences USA*, 110: 3615–3620.

- Claridge M.** (2006): Insect sounds and communication – an introduction. In: Insect sounds and communication: physiology, behaviour, ecology, and evolution. Eds.: Drosopoulos S, Claridge MF. CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, London, New York, pp. 3–10.
- Csányi V.** (2002): Etológia. Nemzedékek Tudása Tankönyvkiadó, Budapest.
- Day R.W. and Quinn G.P.** (1989): Comparisons of treatments after an analysis of variance in ecology. *Ecological Monographs*, 59: 433–463.
- Domingue M.J., Csóka Gy., Tóth M., Véték G., Péntes B., Mastro V. and Baker T.C.** (2011): Field observations of visual attraction of three European oak buprestid beetles toward conspecific and heterospecific models. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 140: 112–121.
- Domingue M.J., Lakhtakia A., Pulsifer D.P., Hall L.P., Badding J.V., Bischof J.L., Martín-Palma R.J., Imrei Z., Janik G., Mastro V.C., Hazen M. and Baker T.C.** (2014): Bioreplicated visual features of nanofabricated buprestid beetle decoys evoke stereotypical male mating flights. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 111: 14106–14111.
- Dudareva N., Klempien A., Muhlemann J.K. and Kaplan I.** (2013): Biosynthesis, function and metabolic engineering of plant volatile organic compounds. *New Phytologist*, 198: 16–32.
- Francke W.** (2010): Structure elucidation of some naturally occurring carbonyl compounds upon coupled gas chromatography/mass spectrometry and microreactions. *Chemoecology*, 20: 163–169.
- Gogala M.** (2006): Vibratory signals produced by Heteroptera — Pentatomorpha and Cimicomorpha. In: Insect sounds and communication: physiology, behaviour, ecology, and evolution. Eds.: Drosopoulos S, Claridge MF. CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, London, New York, pp. 275–295.
- Hansson B.S.** (1999): Insect olfaction. Springer, Berlin–Heidelberg.
- Haynes K.F. and Millar J.G.** (1998): Methods in chemical ecology II. Bioassay methods. Kluwer, Boston/Dordrecht/London.
- Heuskin S., Verheggen F.J., Haubruge E., Wathélet J.-P. and Lognay G.** (2011): The use of semiochemical slow-release devices in integrated pest management strategies. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, 15: 459.
- Imrei Z. és Tóth M.** (2012): A kártevőszelzés és a védekezéssel kapcsolatos döntéshozatal illatanyagok csapdákra alapozott legújabb lehetőségei szántóföldön. *Kleffmann Group. Gazdanapló* 2012–2013. Budapest: Kleffmann és Partner Kft., 2012: 6–9.
- Imrei Z., Vuts J., Woodcock C.M., Birkett M.A., Pickett J.A. and Tóth M.** (2012): Evidence of a female produced pheromone in a cetonii chafér, *Epicometis hirta* (Coleoptera, Scarabaeidae). 28th Annual Meeting, International Society of Chemical Ecology (Vilnius, Litvánia, 2012. július 22–26.), 229.
- Imrei Z., Kovács Zs., Toshova T.B., Subchev M., Harmincz K., Szarukán I., Domingue M.J. and Tóth M.** (2014): Development of a trap combining visual and chemical cues for the alfalfa longhorn beetle, *Plagionotus floralis*. *Bulletin of Insectology*, 67: 161–166.
- Jacquin E., Nagnan P. and Frérot B.** (1991): Identification of hairpencil secretion from male *Mamestra brassicae* (L.) (Lepidoptera: Noctuidae) and electroantennogram studies. *Journal of Chemical Ecology*, 17: 239–246.
- Jermy T., Szentesi Á., Tóth M. and Szőcs G.** (2006): Pest control: from chemical ecology to evolution. A Hungarian perspective. *Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica*, 41: 121–135.
- Jósvai J.K., Szarukán I. and Tóth M.** (2012): Chemical communication of predator-prey interactions: an example for practical application in improving attractants for yellowjackets (Hymenoptera: Vespidae). *Semiochemicals: the essence of green pest control IOBC/WPRS Working Group „Pheromones and other semiochemicals in integrated production”* (Bursa, Törökország, 2012. október 1–5.), 91–92.
- Jutsum A.R. and Gordon R.F.S.** (1989): Insect pheromones in plant protection. Wiley, New York.
- Kallenbach M., Veit D., Eilers E.J. and Schuman M.C.** (2015): Application of silicone tubing for robust, simple, high-throughput, and time-resolved analysis of plant volatiles in field experiments. *Bio-protocol*, 5: e1391.
- Kárpáti Z., Knaden M., Reinecke A. and Hansson B.S.** (2013a): Intraspecific combinations of flower and leaf volatiles act together in attracting hawkmoth pollinators. *PLoS ONE*, 8(9): e72805.
- Kárpáti Z., Tasin M., Cardé R.T. and Dekker T.** (2013b): Early quality assessment lessens pheromone specificity in a moth. *Proceeding of the National Academy of Sciences USA*, 110: 7377–7382.
- Keeling C.I., Ngo H.T., Benusic K.D. and Slessor K.N.** (2001): Preparative chiral liquid chromatography for enantiomeric separation of pheromones. *Journal of Chemical Ecology*, 27: 487–497.
- Kevan P.G. and Baker H.G.** (1983): Insects, as flower visitors and pollinators. *Annual Review of Entomology*, 28: 407–453.
- Knight A.L., Larson T.L., Ketner K., Hilton R. and Hawkins L.** (2008): Field evaluations of concentrated spray applications of microencapsulated sex pheromone for codling moth (Lepidoptera: Tortricidae). *Environmental Entomology*, 37: 980–989.
- Knodel J.J. and Agnello A.M.** (1990): Field comparison of nonsticky and sticky pheromone traps for monitoring fruit pests in western New York. *Journal of Economic Entomology*, 83: 197–204.
- Koczor S., Szentkirályi F., Vuts J., Caulfield J.C., Withall D.M., Pickett J.A., Birkett M.A. and Tóth M.** (2018): Conspecific and heterogeneric lacewings respond to (Z)-4-tridecene identified from *Chrysopa formosa* (Neuroptera: Chrysopidae). *Journal of Chemical Ecology*, doi:10.1007/s10886-017-0920-2
- Kovács E.** (1958): Characterization of organic compounds by gas chromatography. Part 1. Retention indices of aliphatic halides, alcohols, aldehydes and ketones. *Helvetica Chimica Acta*, 41: 1915–1932.

- Kremmer T., Torkos K. és Szókán Gy.** (2005): Elválasztástechnikai módszerek elmélete és gyakorlata. Kromatográfia, elektroforézis, centrifugálás-ultracentrifugálás. Eötvös Kiadó, Budapest.
- Lelito J.P., Fraser I., Mastro V.C., Tumlinson J.H., Böröczky K. and Baker T.C.** (2007): Visually mediated 'paratrooper copulations' in the mating behavior of *Agrilus planipennis* (Coleoptera: Buprestidae), a highly destructive invasive pest of North American ash trees. *Journal of Insect Behavior*, 20: 537–552.
- Lewis T. and Macaulay E.** (1976): Design and elevation of sex-attractant traps for pea moth, *Cydia nigricana* (Steph.) and the effect of plume shape on catches. *Ecological Entomology*, 1: 175–187.
- McIndoo N.E.** (1926): An insect olfactometer. *Journal of Economic Entomology*, 19: 545–571.
- McNally P.S. and Barnes M.M.** (1981): Effects of codling moth pheromone trap placement, orientation and density on trap catches. *Environmental Entomology*, 10: 22–26.
- Millar J.G. and Haynes K.F.** (1998): Methods in chemical ecology I. Chemical methods. Kluwer, Boston/Dordrecht/London.
- Mollo E., Fontana A., Roussis V., Polese G., Amodeo P. and Ghiselin M.T.** (2014): Sensing marine biomolecules: smell, taste, and the evolutionary transition from aquatic to terrestrial life. *Frontiers in Chemistry*, 2: 92.
- Molnár B., Kárpáti Zs., Szöcs G. and Hall D.R.** (2009): Identification of female-produced sex pheromone of the honey locust gall midge, *Dasineura gleditchiae*. *Journal of Chemical Ecology*, 35: 706–714.
- Molnár B.P., Szöcs G., Hillbur Y. and Hall D.R.** (2010): Megfelelő-e a racém elegy a lepényfa-gubacs-szűnyög (*Dasineura gleditchiae*) szexcsapdázásához? *Növényvédelem*, 46: 101–108.
- Molnár B.P., Tröger A., Toshova Th.B., Subchev M., van Nieukerken E. J., Sjaak-Koster J. C., Szöcs G., Tóth M. and Francke W.** (2012): Identification of the females-produced sex pheromone of *Tischeria ekebladella*, an oak leafmining moth. *Journal of chemical Ecology*, 38: 1298–1305.
- Molnár B.P., Tóth A., Fejes-Tóth A., Dekker T. and Kárpáti Z.** (2015): Electrophysiologically-active maize volatiles attract gravid female European corn borer, *Ostrinia nubilalis*. *Journal of Chemical Ecology*, 41: 997–1005.
- Morgan E.D.** (2010): Biosynthesis in insects. Advanced edition. RSC Publishing, Cambridge.
- Muirhead-Thomson R.** (1991): Trap responses of flying insects. The influence of trap design on capture efficiency. Academic Press, Suffolk.
- Novák L., Tóth M., Balla J. and Szántay Cs.** (1979): Sex pheromone of the cabbage armyworm, *Mamestra brassicae* – isolation, identification and stereocontrolled synthesis. *Acta Chimica Academiae Scientiarum Hungaricae*, 102: 135–140.
- Pettersson J.** (1970): An aphid sex attractant I. Biological studies. *Entomologia Scandinavica* 1: 63–73.
- Pickett J.A.** (1990): GC-MS in insect pheromone identification: three extreme case histories, in *Chromatography and Isolation of Insect Hormones and Pheromones*, ed. by McCaffery AR and Wilson ID. Plenum Press, New York/London, pp. 299–309.
- Reiczig J., Harnos A. és Solymosi N.** (2007): Biostatistika nem statisztikusoknak. Pars Kft., Nagykovácsi
- Riedl H., Hoying S.A., Barnett W.W. and Detar J.E.** (1979): Relationship of within-tree placement of the pheromone trap to codling moth catches. *Environmental Entomology*, 8: 765–769.
- Roelofs W.L.** (1977): The scope and limitations of the electroantennogram technique in identifying pheromone components. In: Crop protection agents – their biological evaluation. Ed.: McFarlane NR. Academic Press, New York, pp. 147–165.
- Schmura D., Tóth M., Subchev M., Sredkov I., Szarukán I., Jermy T. and Szentesi Á.** (2004): Importance of visual and chemical cues in the development of an attractant trap for *Epicometis (Tropinota) hirta* Poda (Coleoptera: Scarabaeidae). *Crop Protection*, 23: 939–944.
- Schneider D.** (1957): Elektrophysiologische Untersuchungen von Chemo- und Mechanorezeptoren der Antenne des Seidenspinners *Bombyx mori* L. *Zeitschrift für vergleichende Physiologie*, 40: 8–41.
- Schoonhoven L.M., Jermy T. and van Loon J.J.A.** (1998): Insect-plant biology. Garland Science, New York.
- Schulz S., Fuhlendorff J., Steidle J.L.M., Collatz J. and Franz J.-T.** (2004): Identification and biosynthesis of an aggregation pheromone of the storage mite *Chortoglyphus arcuatus*. *ChemBioChem*, 5: 1500–1507.
- Shields E.J.** (1989): Artificial light: experimental problems with insects. *Bulletin of the Entomological Society of America* 35: 40–44.
- Skelton A.C., Birkett M.A., Pickett J.A. and Cameron M.M.** (2007): Olfactory responses of medically and economically important mites (Acari: Epidermoptidae and Acaridae) to volatile chemicals. *Journal of Medical Entomology*, 44: 367–371.
- Sperling S., Kühbandner S., Engel K.C., Steiger S., Stökl J. and Ruther J.** (2015): Size exclusion high performance liquid chromatography: re-discovery of a rapid and versatile method for clean-up and fractionation in chemical ecology. *Journal of Chemical Ecology*, 41: 574–583.
- Steiger S., Schmitt T. and Schaefer H.M.** (2011): The origin and dynamic evolution of chemical information transfer. *Proceedings of the Royal Society B*, 278: 970–979.
- Steinmann H. és Zombori L.** (1981): Rovaralaktani kifejezések. Magyarországi állatvilága XVII/D. Akadémiai Kiadó, Budapest.
- Szentesi Á., Tóth M. and Dobrovolszky A.** (1975): Evidence and preliminary investigations on a male aphrodisiac and a female sex pheromone in *Mamestra brassicae* (L.). *Acta Phytopathologica Academiae Scientiarum Hungaricae*, 10: 425–429.
- Szentesi Á. és Török J.** (1997): Állatökológia. Egyetemi jegyzet. Kovasznai Kiadó, Budapest.
- Szentesi Á. és Jermy T.** (1999): A preferencia értékelésének problémái. *Állattani Közlemények*, 84: 3–19.

- Szöcs G. és Tóth M.** (2010): A nagyítólencsétől a bioszenzoros gázkromatográfiáig: a magyar feromonkutatás három évtizede. *Növényvédelem*, 46: 645–653.
- Szöcs G., Kárpáti Zs., Imrei Z. és Tóth M.** (2002): Néhány százalék „szennyezés”: siker vagy kudarc a feromoncsapdázásnál. *Növényvédelmi Tudományos Napok*, 48: 56.
- Szöcs G., Tóth M., Kárpáti Zs., Zhu J., Löfstedt C., Plass E. and Francke W.** (2004): Identification of polienic hydrocarbons from the northern winter moth, *Operophtera fagata*, and development of a species specific lure for pheromone traps. *Chemoecology*, 14: 53–85.
- Tóth M., Imrei Z. és Szöcs G.** (2000): Ragacsmentes, nem telítődő, nagy fogókapacitású új feromonos csapdák kukoricabogárra (*Diabrotica virgifera virgifera*, Coleoptera: Chrysomelidae) és gyapottokbagolylepkére [*Helicoverpa (Heliothis) armigera*, Lepidoptera: Noctuidae]. Integrált termesztés a kertészeti és szántóföldi kultúrákban, 21: 45–49.
- Tóth M., Furlan L., Yatsynin V.G., Ujváry L., Szarukán I., Imrei Z., Tolasch T., Francke W. and Jossi W.** (2003): Identification of pheromones and optimization of bait composition for click beetle pests (Coleoptera : Elateridae) in Central and Western Europe. *Pest Management Science*, 59: 417–425.
- Tóth M., Kádár F. és Imrei Z.** (2005a): Ragacsos és varrás feromoncsapda-típusok hatékonyságának összehasonlítása a gyapjaslepké (*Lymantria dispar* L.) fogására. *Növényvédelem*, 41: 267–271.
- Tóth M., Imrei Z., Szarukán I., Voigt E., Schmera D., Vuts J., Harmincz K. és Subchev M.** (2005b): Gyümölcs- ill. virágkárokat okozó cserebogárfélék kémiai kommunikációja: egy évtized kutatási eredményei., *Növényvédelem* 41: 581–588.
- Tóth M., Voigt E., Imrei Z., Szarukán I., Schmera D., Vuts J., Harmincz K., Subchev M. and Sivcev I.** (2006): Semiochemical- baited traps for scarab pests damaging fruits and blossoms. Abstracts of the 58th Int. Symp. Crop. Prot., Gent, Belgium, 23 May, 2006.
- Unelius C.R., Suckling D.M., Brown R.L., Jósai J.K. and El-Sayed A.M.** (2016): Combining odours isolated from phylogenetically diverse sources yields a better lure for yellow jackets. *Pest Management Science*, 72: 760–769.
- Vet L.E.M., van Lenteren J.C., Heymans M. and Meelis E.** (1983): An air-flow olfactometer for measuring olfactory responses of hymenopterous parasitoids and other small insects. *Physiological Entomology*, 8: 97–106.
- Voigt E., Tóth M., Imrei Z., Vuts J., Szöllös L. és Szarukán I.** (2005): A zöld cserebogár és az aranyos rózsabogár növekvő kártétele és a környezetkímélő védekezés lehetőségei. *Agrofórum*, 16: 63–65.
- Vuts J. és Tóth M.** (2008): Elektroantennográfiás választépek: mire jök és mire nem? *Növényvédelem*, 44: 377–384.
- Vuts J., Tolasch T., Furlan L., Bálintné Csonka É., Felföldi T., Márialigeti K., Toshova T., Subchev M., Xavier A. and Tóth M.** (2012): *Agriotes proximus* and *A. lineatus* (Coleoptera: Elateridae): a comparative study on the pheromone composition and cytochrome c oxidase subunit I gene sequence. *Chemoecology*, 22: 23–28.
- Vuts J., Francke W., Mori K., Zarbin P.H.G., Hooper A.M., Millar J.G., Pickett J.A., Tóth M., Chamberlain K., Caulfield J.C., Woodcock C.M., Tröger A.G., Bálintné Csonka É. and Birkett M.A.** (2015): Pheromone bouquet of the dried bean beetle, *Acanthoscelides obtectus* (Col.: Chrysomelidae), now complete. *European Journal of Organic Chemistry*, 2015: 4843–4846.
- Witzgall P. and Arn H.** (1990): Direct measurement of the flight behavior of male moths to calling females and synthetic sex pheromones. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 45: 1067–1069.
- Wyatt T.D.** (2014): Pheromones and animal behavior: chemical signals and signatures. Cambridge University Press, New York.
- Zuo H-L., Yang F-Q., Huang W-H. and Xia, Z-N.** (2013): Preparative gas chromatography and its applications. *Journal of Chromatographic Science*, 51: 704–715.

METHODS IN CHEMICAL ECOLOGY

J. Vuts¹, S. Koczor², Z. Imrei², J. K. Jósai², Zs. Lohonyai², B. P. Molnár², Zs. Kárpáti², G. Szöcs² and M. Tóth²

¹ Rothamsted Research, Harpenden, Hertfordshire, AL5 2JQ United Kingdom
e-mail: jozsef.vuts@rothamsted.ac.uk

² Plant Protection Institute CAR HAS, Pf. 102, Budapest, H-1525 Hungary

This article reviews some of the commonly used methods in insect chemical ecology, aiming to be a starting point for those who encounter this interdisciplinary research area.

Keywords: semiochemical, allelochemical, pheromone, chemical communication, volatiles, Integrated Pest Management

Érkezett: 2018. január 5.