

VILNIUS UNIVERSITY
STATE SCIENTIFIC RESEARCH INSTITUTE
NATURE RESEARCH CENTRE

Irena Nedveckytė

**HERBIVOROUS INSECTS INTERACTION WITH ENTOMOPATHOGENIC FUNGI
(BASED ON SPECIES OF HYMENOPTERA AND LEPIDOPTERA ORDERS)**

Summary of Doctoral Dissertation

Biomedical sciences, Ecology and Environmental science (03 B)

Vilnius, 2015

The dissertation was prepared during the years 2008-2014 at the Nature Research Centre.

Scientific Supervisor – Prof. Dr Habil. Vincas Būda (Nature Research Centre, Biomedical Sciences, Ecology and Environmental Sciences–03B)

Scientific Adviser – Dr Dalė Pečiulytė (Nature Research Centre, Biomedical Sciences, Ecology and Environmental Sciences – 03 B)

The defence of the dissertation is held at the Vilnius University Ecology and Environmental Research Council:

Chairman – Prof. Dr Sigitas Podėnas (Vilnius University, Biomedical Sciences, Zoology – 05 B)

Members: Dr Rasa Bernotienė (Nature Research Centre, Biomedical Sciences, Ecology and Environmental Sciences – 03 B)

Dr Vaidotas Lygis (Nature Research Centre, Biomedical Sciences, Ecology and Environmental Sciences – 03 B)

Prof. Dr Algimantas Paulauskas (Vytautas Magnus University, Biomedical Sciences, Ecology and Environmental Sciences – 03 B)

Dr Alma Valiuškaitė (Lithuanian Research Centre for Agriculture and Forestry, Biomedical Sciences, Ecology and Environmental Sciences – 03 B)

Opponents: Dr Jurga Motiejūnaitė (Nature Research Centre, Biomedical Sciences, Ecology and Environmental Sciences – 03 B)

Prof. Dr Habil. Jonas Rimantas Stonis (Lithuanian University of Educational Sciences, Biomedical Sciences, Zoology – 05 B)

Defence of the dissertation will be held at the public meeting of the Ecology and Environmental Research Centre Council on 9 October 2015 at 1 p. m. at the Nature Research Centre.

Address: Akademijos 2, LT-08412, Vilnius, Lithuania.

Phone +370 5 2729257, fax +370 5 2729352

The dissertation is available at the libraries of Vilnius University and Nature Research Centre.

VILNIAUS UNIVERSITETAS
VALSTYBINIS MOKSLINIŲ TYRIMŲ INSTITUTAS
GAMTOS TYRIMŲ CENTRAS

Irena Nedveckytė

VABZDŽIŲ FITOFAGŲ IR ENTOMOPATOGENINIŲ GRYBŲ SAŪVEIKA
(REMIANTIS PLĖVIASPARNIŲ IR DRUGIŲ RŪŠIŲ TYRIMAIS)

Daktaro disertacijos santrauka

Biomedicinos mokslai, ekologija ir aplinkotyra (03 B)

Vilnius, 2015

Disertacija rengta 2008–2014 metais Gamtos tyrimų centre

Mokslinis vadovas – Prof. habil. dr. Vincas Būda (Gamtos tyrimų centras, biomedicinos mokslai, ekologija ir aplinkotyra – 03 B)

Mokslinė konsultantė – Dr. Dalė Pečiulytė (Gamtos tyrimų centras, biomedicinos mokslai, ekologija ir aplinkotyra – 03 B)

Disertacija ginama Vilniaus universiteto Ekologijos ir aplinkotyros mokslo krypties taryboje:

Pirmininkas – Prof. dr. Sigitas Podėnas (Vilniaus universitetas, biomedicinos mokslai, zoologija – 05 B)

Nariai: Dr. Rasa Bernotienė (Gamtos tyrimų centras, biomedicinos mokslai, ekologija ir aplinkotyra – 03 B)

Dr. Vaidotas Lygis (Gamtos tyrimų centras, biomedicinos mokslai, ekologija ir aplinkotyra – 03 B)

Prof. dr. Algimantas Paulauskas (Vytauto Didžiojo universitetas, biomedicinos mokslai, ekologija ir aplinkotyra – 03 B)

Dr. Alma Valiuškaitė (Lietuvos agrarinių ir miškų mokslų centras, biomedicinos mokslai, ekologija ir aplinkotyra – 03 B)

Oponentai: Dr. Jurga Motiejūnaitė (Gamtos tyrimų centras, biomedicinos mokslai, ekologija ir aplinkotyra – 03 B)

Prof. habil. dr. Jonas Rimantas Stonis (Lietuvos edukologijos universitetas, biomedicinos mokslai, zoologija – 05 B)

Disertacija bus ginama viešame Ekologijos ir aplinkotyros mokslo krypties tarybos posėdyje 2015 m. spalio 9 d. 13 val. Gamtos tyrimų centre.

Adresas: Akademijos 2, LT-08412, Vilnius, Lietuva

Tel. +370 5 2729257, fax +370 5 2729352

Disertacijos santrauka išplatinta 2015 m. rugsėjo 9 d.

Disertaciją galima peržiūrėti Vilniaus universiteto ir Gamtos tyrimų centro bibliotekose.

INTRODUCTION

Relevance of the research

Lepidoptera and Hymenoptera are the major orders of pests of coniferous trees that can cause massive reproduction outbreaks and in such way defoliate trees (Žiogas, 1997; Dahlsten, Mills, 1999; Belova *et al.*, 2000). Under natural conditions, abundance of the pests is controlled by a specific complex of their parasitoids and animals feeding on insects. However, upon occurrence of environmental conditions favourable for pest development and/or if parasitoid hatching synchronicity is disturbed, the outbreaks of massive reproduction and spread of conifer defoliators can occur. They can persist for 4–7 years in some stands (Žiogas, 1997; Ciesla, 2004; Haynes *et al.*, 2014), and thus trees lose increment (Straw, 1996; Straw *et al.*, 2002; Gedminas *et al.*, 2004), get weaker and are more often attacked by trunk pests and diseases (Cedervind *et al.*, 2003; Lynikienė *et al.*, 2004a).

Such outbreaks are most often neutralised applying chemical insecticides, e.g. synthetic pyrethroids: etofenprox, diflubenzuron, teflubenzuron, z-cypermethrin, ect. (Sierpinska, 1998; Woreta, Malinowski, 1998). In recent years, their use has been limited because of their adverse effect on environment and living organisms, e.g. the widely used cypermethrins are very toxic to water insects, bees, fish and human health (Cox, 1996). One of alternatives to chemical pesticides is the use of biological preparations. They are produced on the basis of protozoa, baculoviruses, bacteria, nematodes and entomopathogenic fungi. To date, biological insecticides created on the basis of bacteria *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) are popular all over the world. They are certified and used in the EU. These preparations are used to fight with conifer defoliators in Poland (Glowacka, 1996; Sierpinska, 1998, Augustyniuk-Kram, 2011), Sweden (Lindelow, 1997), France (Augustyniuk-Kram, Kram, 2012), Lithuania (Lynikienė *et al.*, 2004b; Alenikovas, Gedminas, 2010). These preparations can be used only under favourable environmental conditions: sprayed only in the daytime, no rain at least 1–2 days after application to avoid wash down, etc. Besides, *Bt* preparations are effective only if used through the intestine of insects wherefore only actively feeding pests die.

One of alternatives to be used for protection against pine defoliators is preparations produced on the basis of entomopathogenic fungi. Currently, their production and use are in great request (Sihag, 2011) because of low price, higher resistance to unfavourable environmental factors (rain, UV radiation, temperature) and ability to kill insects in every stage of development (even in non-feeding stages). Unfortunately, no biological preparation to control Lepidoptera and Hymenoptera populations feeding on conifer needles has been registered as yet.

One of the reasons is that so far no comprehensive investigation on interaction of entomopathogenic fungi with the bordered white *Bupalus piniaria*, pine-tree lappet *Dendrolimus pini*, and common pine sawfly *Diprion pini* has been done, nor has sensitivity of these insects to pathogenic fungi been studied.

The results of this research are important not only for fundamental knowledge, but also for practical application, i.e. in creating and using the means to control abundance and spread of these pests and to mitigate damage to forest ecosystems.

The aim of the research

The aim of the research was to determine the diversity of entomopathogenic fungi in the natural population of conifer defoliators, to establish sensitivity of these insects to entomopathogenic fungi and to test insect ability to recognise fungus-infected substrates (based on the model species from Hymenoptera and Lepidoptera orders).

Tasks of the present research

For fungus–insect interaction:

1. To isolate and identify entomopathogenic fungi in the natural population of the bordered white moth *Bupalus piniaria* (Lepidoptera) and estimate their diversity.
2. To establish sensitivity of conifer defoliators: bordered white moth *Bupalus piniaria* (Lepidoptera), pine-tree lappet moth *Dendrolimus pini* (Lepidoptera) and common pine sawfly *Diprion pini* (Hymenoptera), to entomopathogenic fungi.

For insect–fungus interaction:

3. To test insect ability to recognise fungus-infected substrate:
 - evaluate behavioural and olfactory receptor responses to substrate infestation;
 - isolate and identify volatile compounds according to which an insect can recognise substrates with and without fungi;
 - estimate biological activity of synthetic analogues of isolated and identified compounds based on the investigation of the Indian meal moth *Plodia interpunctella* (Lepidoptera).

Defended statements:

1. A complex of at least 15 cultivated micromycete species can be isolated from dead *Bupalus piniaria* larvae collected under field conditions.
2. Sensitivity of conifer defoliators to entomopathogenic fungi depends both on insect species and stage of its development as well as on entomopathogenic fungus species.
3. *Plodia interpunctella* females chose for egg-laying the substrate uninfected by fungi.

4. Substrates infected and uninfected with fungi can be distinguished according to volatile organic compounds of the substrate.

Scientific novelty of the study

1. Entomopathogenic fungi were isolated from the bordered white moth *Bupalus piniaria* larvae and identified, their diversity was evaluated for the first time;
2. The effect of entomopathogenic fungi on larval stages of conifer defoliators *Bupalus piniaria*, *Dendrolimus pini* and *Diprion pini* was investigated for the first time;
3. The sensitivity of *Dendrolimus pini* to entomopathogenic fungi during pre-imaginal development was investigated for the first time;
4. *Plodia interpunctella* chemoreceptors were found to react to 4-oxoisophorone and 3-methyl-1-butanol for the first time;
5. It was found for the first time that 4-oxoisophorone can affect mated *Plodia interpunctella* females as a repellent and 3-methyl-1-butanol acts both as a repellent (in high doses) and as an attractant (in lower doses);
6. It was proved for the first time that 3-methyl-1-butanol can be a marker to recognise fungus-infected substrates.

Scientific and practical significance

The results of the research provide new data on interactions between insects and fungi.

The results obtained can be applied:

- ✓ in creating biological protection means against conifer defoliators;
- ✓ in choosing the most suitable time for application of biological preparations;
- ✓ in creating biomarkers;
- ✓ in electrophysiological investigation of olfactory receptors of insects.

Approbation of the results

Dissertation results were presented at: XXVIII Nordic – Baltic Congress of Entomology (Birštonas, Lithuania 2010), 2nd conference of „Young scientists - for agricultural progress“ (Vilnius, Lithuania, 2013), the 30th ISCE Annual Meeting. Meeting Overview, 8–12 July, (Urbana-Champaign, Illinois, USA, 2014), the 31st ISCE Annual Meeting. (Stockholm, Sweden, 2015). Results of the research were published in seven publications: three scientific articles and four conference abstracts.

Structure of the dissertation.

The dissertation contains the following chapters: Introduction, Literature Review, Material and Methods, Results, Discussion, Conclusions, References (280 sources), List of Publications where the dissertation material was published and Appendices. The dissertation covers 109 pages; it contains 11 tables and 31 figures. The text of dissertation is written in Lithuanian with the abstract in English.

Acknowledgements.

I am sincerely grateful to my scientific supervisor Prof. habil. dr. Vincas Būda for his guidance and help in the preparation of the dissertation manuscript. I wish to express my sincere thanks to dr. Dalė Pečiulytė for assistance in planning and carrying out the research, for her patience and unfading energy. I thank my colleagues from the Laboratory of Chemical and Behavioural Ecology for assistance with methodology, for the stimulating discussions and a great atmosphere at work. I am grateful to dr. Paulius Zolubas for his help at initiating pine tree lappet moth's culture. I am grateful to Open Access Centre for Nature Research for provided possibility to use all necessary laboratory equipment. I want to thank the Lithuanian State Science and Study Foundation for the provided scholarship, also the Nature Research Centre and Vilnius University for provided possibility to pursue the doctoral studies.

I would like to thank all my relatives and friends who had sincere interest in my studies. I am grateful to all who supported me at the most difficult moment of my life...

In Memoriam Mater...

LITERATURE REVIEW

This chapter reviews the ecology and basic development features of entomopathogenic fungi (EPF) and its interaction with insects. It also provides an overview of subject insects (*Bupalus piniaria*, *Diprion pini*, *Dendrolimus pini* and *Plodia interpunctella*) basic biological and ecological features.

MATERIAL AND METHODS

Insects. Pine defoliators: bordered white moth, *Bupalus piniaria* L. (Lepidoptera: Geometridae); pine sawfly, *Diprion pini* L. (Hymenoptera: Diprionidae) and pine-tree lappet moth, *Dendrolimus pini* L. (Lepidoptera: Lasiocampidae). Stored products pest Indian meal moth

Plodia interpunctella (Hübner) (Lepidoptera: Pyralidae). Insects were reared under laboratory conditions in insects rearing chambers (PLAS LABS, INC., USA, at 20-25 °C, with 75 ± 10 % RH, and a 18:6 L:D photoperiod).

Fungi. Entomopathogenic fungi used in the tests: *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. (DPK-02-d), *Metarhizium anisopliae* (Metschnikov) Sorokin (DPK-06-d), and *Isaria farinosa* (Holmsk.) Fr. (DPK-06-f-11), *Lecanicillium psalliotae* (Treschew) Zare & W. Gams (DPK-08-v-6), *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. (DPK-08-f-5). Fungal strains used in the study were obtained from Fungi Culture Collection (Biodeterioration Research Laboratory, Institute of Botany, Nature Research Center, Vilnius, Lithuania), maintained for a long-term storage. *Aspergillus flavus* Link: Fries (MUCL 11945), were supplied by Belgian Coordinated Collection of Microorganisms – BCCM.

Substrate. Common wheat (*Triticum aestivum* L.; variety – „Zenta“) grain were used as substrate for *Plodia interpunctella* biotests.

Isolation and identification of micromycetes. Fungi from the dead larvae of *B. piniaria* collected under field conditions were isolated and identified. Each cadaver was sterilized for 1 min. in 5% sodium hydrochlorite (NaOCl), 2 min. in 75% ethanol solution and rinsed in plenty of sterile distilled water. The cadavers were left to dry for 48 hrs. After drying each caterpillar was transferred to a separate Petri dish and kept at 25 ± 2 °C, under 75 ± 10 % RH conditions. The sporulating fungi from cadavers were isolated and transferred on several growth media: Sabourand Dextrose Agar (SDA, Liofilchem, Italy), Potato Dextrose Agar (PDA, Liofilchem, Italy), Malt Extracts Agar (2 % MEA, Liofilchem, Italy) and Czapek's Agar (CA, Liofilchem, Italy). Fungi were grown on medium for 5–7 days at 26-28 °C in the dark. Fungal colonies identification was made basing on the micro-morphology and using keys of Samson 1974; Fisher *et al.*, 1982; Nelson *et al.*, 1983; Kiffer *et al.*, 1997; Sung *et al.*, 2001; Domsch *et al.*, 2007.

Preparation of entomopathogenic fungi conidial suspensions

Entomopathogenic fungi conidia were washed from airborne mycelium. Fungus culture grown in a Petri dish was flooded with 20 mL of sterile water containing 0.01% Tween 80 solution (Sigma, USA). The procedure was repeated several times to collect conidia in the total suspension. Based on a hematocytometer counting, the conidial suspension was adjusted to obtain 1×10^8 germinating conidia/mL dH₂O concentration, chosen for testing following recommendations (Freimoser *et al.*, 2003; Zimmermann, 2008).

Bioassay

Insects were tested on larval (*Bupalus piniaria*, *Diprion pini*, *Dendrolimus pini*) and egg development stages (*Dendrolimus pini*). Entomopathogenic fungi conidia suspension at the bioassay was sprayed directly on individuals with nutritional substrate. Insect larvae were kept in glass cages (in volume of 3 L) and fed with fresh needles on 10-15 cm long Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) twigs. Insects were reared under laboratory conditions in rearing chambers (PLAS LAB, INC, USA) at 20-25 °C, 70 ± 10 % RH and 16:8 L:D photoperiod. Eggs for bioassay were kept in Petri dishes under the same conditions as larvae.

Mortality of the tested insects was registered daily for 3 weeks. Cadavers were placed on sterile moistened filter paper disks in Petri dishes and incubated at 24 °C. Re-identification of fungal colonies was made basing on the micro-morphology and using keys as indicated above.

Oviposition test

For oviposition, a mated *Plodia interpunctella* female (separated from male) was introduced into a bioassay chamber (12 × 10 × 4 cm plastic box, lined with black paper), containing two potential oviposition points. These points consisted of two plastic Petri dishes (ø 3.5 cm and 1 cm in height) placed ~6 cm opposite each other. The wheat grain was used as a oviposition substrate. Three grams either of sterile, non-infected whole kernel wheat or infected with appropriate fungus kernels were overspread into opposite dishes of two potential oviposition points and box was covered with a transparent cover. The floor of a plastic box was covered with black craft paper to evaluate eggs laid out of substrate (Sambaraju, Phillips, 2008). All test boxes were placed in a growth chamber held at 25 °C, approximately 70 % RH, with 16:8 (L:D) photoperiod.

Eggs laid in the Petri dish, on the floor, and on the walls of the plastic box were counted daily (after 24, 48 and 72-hrs. of exposure). Thirty replicates were conducted per assay. Results of two-choice oviposition experiments were included as positive if female laid more than 5 eggs (Phillips, Strand, 1994).

Two choice (pitfall) olfactometer test

The test was performed as described by Uechi *et al.* (2007). The assay was conducted using pitfall olfactometers as follows: a plastic Petri dish (85 mm diameter × 20 mm high) was constructed with two holes (8 mm diameter, 50 mm apart) under each of which a plastic pipette chip (upper diameter 8 mm, lower – 6 mm, length – 20 mm) was adhered. Each chip was inserted in a glass vial (10 mL volume). On the bottom of each vial was filter paper pieces treated with 10 µL of the hexane (control) or the single synthetic volatile sample at different

dose (0.1; 1; 10 or 100 µg). A single 2-3 day-old mated *P. interpunctella* female was released per dish within dark rearing chamber at $25 \pm 2^\circ\text{C}$ and $70 \pm 5\%$ RH. After 1 hr, whether the moth was in each vial or not was recorded. The assay per one volatile (at 0.1; 1; 10 or 100 µg dose) repeated 60 times.

Solid phase microextraction technique (SPME)

SPME was adjusted to collect volatile compounds from uninfected and infected by fungi (*Aspergillus flavus*) common wheat grain. Erlenmeyer glass flask (70 mL of volume) each filled with 30 g of common wheat grain were inoculated with 5 mL of the aqueous suspension containing approximately 1×10^7 fungal conidia mL⁻¹. Control vials were containing non-contaminated grain samples. Volatile components from the headspace solid phase microextraction were absorbed by 65 µm Polydimethylsiloxane-Divinylbenzene fiber (PDMS-DVB) (Supelco, USA). Prior to the solid phase microextraction vials with infected grain were kept for 60 min., at lighting and 40 °C temperature conditions. SPME was performed for 2 hours.

Volatiles were collected 3rd to 7th day after inoculation. To detect dynamics of a volatile component produced by fungus-infected substrate (wheat grain) the SPME carried out on 1, 3, 5, 8 and 10 days after fungi inoculation.

Simultaneous gas chromatography and EAD registration (GC-EAD)

GC-EAD recordings were conducted using Clarus 500 (PerkinElmer) GC with FID and EAD detectors with DB-Wax column (column length 30m, inner diameter 0.25 mm, film thickness 25 µm, Agilent Technologies, USA). The injector, detector and EAD transfer line temperatures were 240 °C. The oven temperature program started at 40 °C (held for 2 min), then raise by 5 °C/min to 200 °C, then 10 °C/min to 240 °C (held for 10 min). Hydrogen was used as carrier gas, 1.5 mL/min.

The effluent from the column was split into two parts, one (50 %) transferred to FID and the other (50 %) to EAD in a ratio 1:1. Antenna of the insect was used as a detector to detect biologically active volatile compounds.

Only 2-3 days old *P. interpunctella* females were used in the bioassay. Glass capillary electrodes filled with physiological solution (NaCl 0.9 %; (Ilsanta, Lithuania) were put on Ag electrodes. The antenna of an insect was removed and connected between two capillary. The column of the EAD outlet was introduced into a 12 mm diameter glass tube with a constant air stream of 0.5 m/s. EAD registration was carried out using signal connection interface IDAC-232 (Syntech, The Netherlands). Compounds that elicited consistent responses in at least three consequent recordings were marked as EAD active.

Identification of EAD active volatile compounds

Wheat grain emissions which evoke EAG responses of *P. interpunctella* females were identified. GC-MS analyses were conducted using Shimadzu GC-2010 equipped with the Shimadzu GCMS-QP 2010 Plus (Shimadzu, Japan). Mass selective detector Stabilwax column (30m × 0.25 mm × 0.25 μm). EAD active compounds were identified by comparing their retention times and mass spectra with authentic synthetic standards retention times and by comparing the retention index (RI) and mass spectra which are assessed at compound database and spectral library (NIST08). Authentic synthetic standards: nonanal (purity, 95 %, SIGMA-ALDRICH, Co., USA), phenylacetaldehyde (purity, 98 %, SIGMA-ALDRICH, Co., USA), 4-oxoisophorone (purity, 98 %, SIGMA-ALDRICH, Co., USA), 3-methyl-1-butanol (purity, 98.5 %, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Germany), 1-hexanol (purity, ≥ 99 %, Fluka, Buchs, Switzerland).

Dose-response of *Plodia interpunctella* to EAG active compounds

The electroantennography (EAG) was performed as described by Weissbecker *et al.* (2004). The tested compound (at dose of 1, 10, 100 and 1000 μg) was applied to a piece of filtered paper (20mm × 5mm) (Whatman[®] 1, England) and placed to a Pasteur pipette. Air containing test substances at rate 48 mL/s was pushed into the constant airflow by an interval of 0.5 s and that way reached the testing antenna. Tested compounds: 1-hexanol, nonanal, phenylacetaldehyde, 4-oxoisophorone and – 3-methyl-1-butanol. Hexane (10 μL) was used as a control. EAG signals were recorded with a Syntech „EAG2000“ system (The Netherlands). EAG responses were measured initially in units of mV.

RESULTS AND DISCUSSION

Fungus–insect interaction

Micromycete isolation and species identification from *Bupalus piniaria* larvae

B. piniaria larvae collected in nature were reared under laboratory conditions. A complex of micromycetes was isolated from 56 dead 2nd and 3rd instar (L2-3) larvae. 86 % of tested insects had symptoms of mycosis. 36 micromycete strains belonging to 15 species and 10 genera were isolated, reared and identified during the investigation (Table 1). The diversity of identified micromycetes was calculated using the Shannon-Wiener diversity index ($H' = 1.98$).

So far, no data on isolation and identification of micromycetes from *B. piniaria* larvae have been published.

Table 1. A complex of micromycetes isolated from cadavers of *Bupalus piniaria* larvae.

1 lentelė. Mikromicetų kompleksas išskirtas iš *Bupalus piniaria* vikšrų.

| Class | Order | Family | Genus | Species | % |
|-----------------|-----------------|-----------------|--|--|--------------------------------|
| Dothideomycetes | Capnodiales | Davidiellaceae | <i>Cladosporium</i> | <i>C. herbarum</i> Pers. (Link) | 1,42 |
| Sordariomycetes | Hypocreales | Cordycipitaceae | <i>Beauveria</i> | <i>B. bassiana</i> (Bals.-Criv.) Vuill. | 6,21 |
| | | | <i>Isaria</i> | <i>I. farinosa</i> (Holmsk.) Fr. | 2,14 |
| | | | <i>Lecanicillium</i> | <i>L. lecanii</i> (Zimm.) Zare & W. Gams | 0,82 |
| | | | <i>L. psalliotae</i> (Treschew) Zare & W. Gams | 34,61 | |
| | | | <i>L. tenuipes</i> (Petch) Zare & W. Gams | 0,20 | |
| | | | Nectriaceae | <i>Fusarium</i> | <i>F. solani</i> (Mart.) Sacc. |
| | | | <i>F. subglutinans</i> (Wollenw. & Reinking) P.E. Nelson, Toussoun & Marasas | 0,61 | |
| Eurotiomycete | Eurotiales | Trichocomaceae | <i>Trichothecium</i> | <i>T. roseum</i> (Pers.) Link | 0,34 |
| | | | <i>Aspergillus</i> | <i>A. flavus</i> Link | 3,51 |
| | | | <i>Penicillium</i> | <i>P. frequentans</i> Westling | 2,93 |
| | | | | <i>P. solitum</i> var. <i>crustosum</i> (Thom) Bridge, D. Hawskw., Kozak., Onions, R.R.M. Peterson & Sackin. | 6,30 |
| Zygomycetes | Entomophtorales | Entomophtorales | <i>Massospora</i> | <i>M. cleoni</i> Wize | 1,27 |
| | Mucorales | Mucoraceae | <i>Mucor</i> | <i>M. hiemalis</i> Wehmer | 8,83 |
| | | | | <i>M. ramosissimus</i> Samouts. | 6,48 |

Sensitivity of conifer defoliators – bordered white moth *Bupalus piniaria*, pine-tree lappet moth *Dendrolimus pini* (Lepidoptera) and common pine sawfly *Diprion pini* (Hymenoptera) – to entomopathogenic fungi

***Bupalus piniaria* larvae mortality caused by fungi**

Effect of *Lecanicillium psalliotae* and *Fusarium solani* on *Bupalus piniaria* larvae. During the investigation period (10 days), the mortality caused by *Lecanicillium psalliotae* was barely 10.03 ± 1.82 % and did not differ from the mortality of the control group sprayed with sterile distilled water (14.24 ± 1.39 %). A low effect on *B. piniaria* larvae could be explained by *L. psalliotae* being a soil fungi which is effective in killing soil-living organisms such as ticks (Pirali-Kheirabad *et al.*, 2007) and nematodes (Gan *et al.*, 2007; Sung *et al.*, 2007). The effect of this fungus on Lepidoptera is not known. Our research did not reveal any effect of this fungus on *B. piniaria*.

Fusarium solani conidial suspensions (1.4×10^8 conidia mL^{-1}) more effectively inhibited vitality of larvae. The virulence of entomopathogenic fungi was not high: 29.62 ± 3.69 % mortality in 10 days after spraying.

Effect of *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* and *Isaria farinosa* on *Bupalus piniaria* larvae. The effect of *Beauveria bassiana* DPK-02-d, *Metarhizium anisopliae* DPK-06-d and *Isaria farinosa* DPK-06-f-11 strains (conidial suspension concentration of 1×10^8 conidia mL^{-1}) on 3rd and 4th (L 3–4) instar larvae of the bordered white moth was tested under laboratory conditions.

Conidial suspensions (concentration 1×10^8 conidia mL^{-1}) of *B. bassiana* and *M. anisopliae* pathogens caused 100% mortality of tested insects during the study period (21 days) (Fig. 1). However, larvae mortality dynamics differed between the two cases. By applying the *B. bassiana* group, 100 % mortality was reached in 12 days after spraying, whereas the virulence of *M. anisopliae* reached 100 % in a longer period (18 days). Mortality in the control group constituted 6.32 ± 1.21 % during the study period.

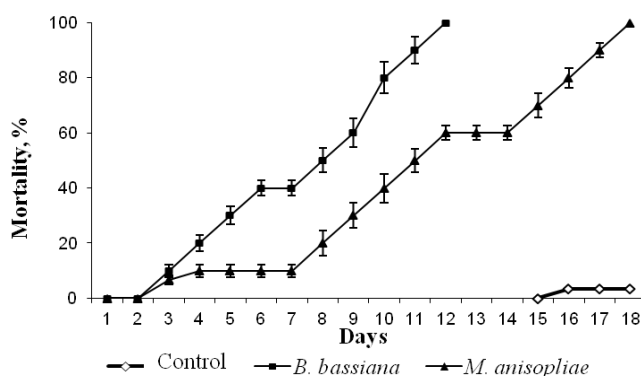


Fig. 1. Mortality of *Bupalus piniaria* larvae caused by *Beauveria bassiana* DPK-02-d and *Metarhizium anisopliae* DPK-06-d conidial suspensions (concentration 1×10^8 conidia mL^{-1}), \pm standard error. The control group was sprayed with sterile distilled water. N = 90.

1 pav. *Beauveria bassiana* DPK-02-d ir *Metarhizium anisopliae* DPK-06-d konidijų suspensijų (koncentracija 1×10^8 konidijų mL^{-1}) sukeltas *Bupalus piniaria* vikšrų mirtingumas, \pm standartinė paklaida. Kontrolinė grupė purkšta steriliu distiliuotu vandeniu. N = 90.

The results obtained allow to infer that *B. bassiana* and *M. anisopliae* can be effective entomopathogenic fungi for *B. piniaria* larvae. To estimate pathogenicity of fungus, LT_{50} and LT_{100} values (time during which 50 and 100 % mortality of insects is achieved) were calculated. The LT_{50} of larvae was 8 days if exposed to *B. bassiana* conidial suspensions, and 11 days if

exposed to *M. anisopliae*. The LT_{100} of larvae exposed to *B. bassiana* was significantly higher than that exposed to *M. anisopliae* (12 against 18 days) (Table 2).

Table 2. LT_{100} mortality of *Bupalus piniaria* larvae caused by entomopathogenic fungi (1×10^8 conidia mL^{-1} suspensions. * – statistical significance between LT_{100} values ($P \leq 0.05$).

2 lentelė. Entomopatogeninių grybų sukeltas LT_{50} ir LT_{100} *Bupalus piniaria* vikšrų mirtingumas, paveikus 1×10^8 konidijų mL^{-1} suspensijomis. * – statistinis patikimumas tarp LT_{100} reikšmių ($P \leq 0,05$).

| Entomopathogenic fungi strains | Impact on insects | |
|--|-------------------|-------------------|
| | LT_{50} (days) | LT_{100} (days) |
| <i>Beauveria bassiana</i> DPK-02-d | 8.0 ± 1.5 | * 11.5 ± 2.0 |
| <i>Metarhizium anisopliae</i> DPK-06-d | 10.5 ± 0.5 | * 18.0 ± 1.5 |

Low mortality of *B. piniaria* larvae was found after treatment with *I. farinosa* conidial suspension of (concentration of 1×10^8 conidia mL^{-1}). 7 days after the first spraying with *I. farinosa* conidial suspension, larvae mortality was 20.01 ± 3.42 % and hardly differed from the mortality of the control group sprayed with sterile distilled water (19.12 ± 3.16 %). After 7 days following the first spraying, the larvae were divided into 2 groups: the larvae of one group were left for further observation, and other larvae were repeatedly exposed to conidial suspension. The mortality in the first group was stable and did not change up to the end of the test, whereas the mortality of larvae of the other group increased up to 56.67 ± 6.62 % and significantly differed from mortality in the control group and the first group of larvae ($P < 0.01$, $Z = 2.46$). The results obtained allow stating that *I. farinosa* is not a sufficiently effective entomopathogenic fungus against *B. piniaria* larvae.

***Diprion pini* larvae mortality caused by fungi**

Beauveria bassiana (DPK-02-d strain) efficiently suppressed the vitality 3rd and 4th instar larvae of *Diprion pini*. The death of first larvae was observed on the sixth day from the spraying with *B. bassiana* conidial suspension (1×10^8 conidia mL^{-1}) (Fig. 2). The highest mortality of *Diprion pini* larvae was observed during the first two weeks from the start of spraying. The mortality of larvae exposed to *B. bassiana* conidial suspensions settled in 17 days with 85.61 ± 3.38 %. The mortality in the control group was 10.03 ± 1.42 % in 18 days from the beginning of spraying. Differences between control and *B. bassiana* groups were significant ($P < 0.002$, $Z = 3.30$).

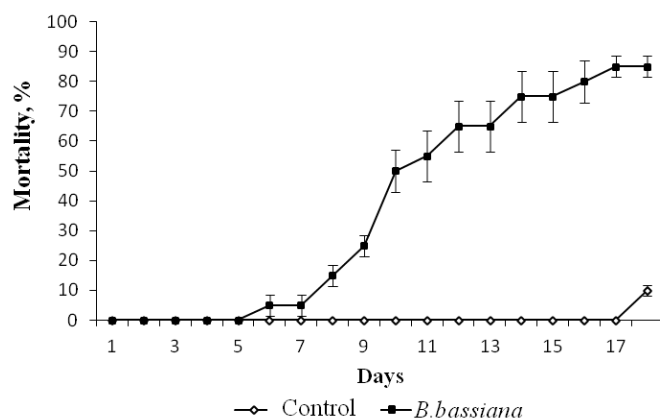


Fig. 2. *Diprion pini* larvae mortality dynamics caused by *Beauveria bassiana* DPK-02-d conidial suspension (1×10^8 conidia mL^{-1}), \pm standard error. The control group was sprayed with sterile distilled water. Mann–Whitney U test for independent samples, $P < 0.002$, $n = 60$.

2 pav. *Diprion pini* lervų mirtingumo dinamika, sukelta *Beauveria bassiana* DPK-02-d konidijų suspensijos (koncentracija 1×10^8 konidijų mL^{-1}), \pm standartinė paklaida. Kontrolė – purškimas steriliu distiliuotu vandeniu. Mann-Whitney U testas nepriklausomoms imtims, $P < 0,002$, $n = 60$.

***Dendrolimus pini* larvae mortality caused by fungi**

Exposure of 3rd and 4th instar larvae of *Dendrolimus pini* to *B. bassiana* conidial suspensions (1×10^8 conidia mL^{-1}) caused death of the first larvae on the third day after spraying (Fig. 3). The highest mortality was reached in 2 weeks (60.02 ± 6.24 %). Later, mortality stabilised and changed only insignificantly (63.33 ± 5.86 %). In the control group (sprayed with sterile distilled water), the first deaths of larvae were observed only on the 9th day after the beginning of the experiment. The total control mortality was 2.21 ± 0.25 % throughout the study period. Differences between control and *B. bassiana* groups were significant ($P < 0.001$, $Z = -4.13$).

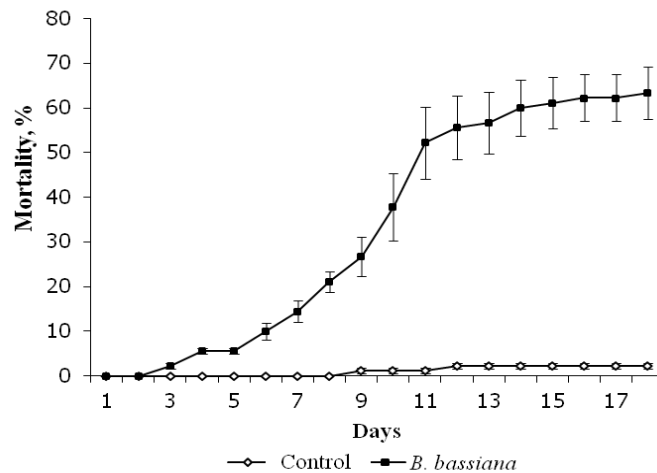


Fig. 3. Mortality of 3rd and 4th instar larvae of the *Dendrolimus pini* exposed to *B. bassiana* DPK-02-d conidia suspensions (1×10^8 conidia mL^{-1}), \pm standard error. Mann–Whitney U test for independent samples, $P < 0.001$, $n=180$.

3 pav. *B. bassiana* DPK-02-d konidijų suspensijomis (koncentracija 1×10^8 konidijų mL^{-1}) paveiktų trečio–ketvirto ūgio *Dendrolimus pini* vikšrų mirtingumas, \pm standartinė paklaida. Mann-Whitney U testas nepriklausomoms imtims, $P < 0,001$, $n=180$.

A lower mortality of the pine-tree lappet moth compared with the mortality of the bordered white moth and common pine sawfly could be due to the larvae cuticle peculiarities (larvae body is covered with dense hair which can aggravate attachment of spores of entomopathogenic fungi), improperly chosen larvae instar (L 3-4 instar larvae might not be sensitive to entomopathogenic fungi) or improperly chosen entomopathogenic fungus. Therefore, additional tests were carried out, during which different stages of development of *Dendrolimus pini* were sprayed with entomopathogenic fungi (*B. bassiana* and *M. anisopliae*) (Fig. 4).

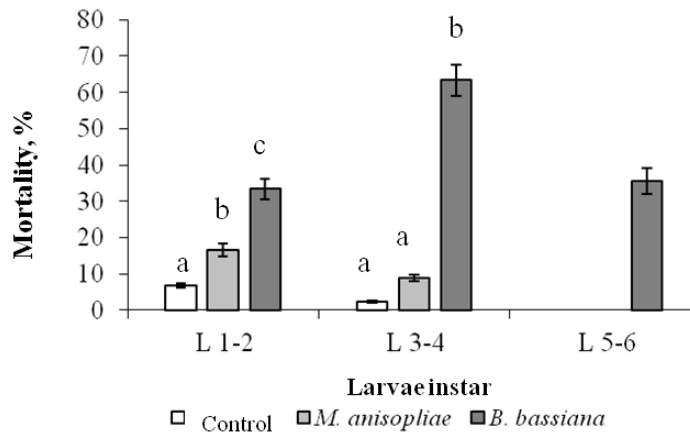


Fig. 4. Mortality of pre-imaginal development states of *Dendrolimus pini* exposed to *B. bassiana* and *M. anisopliae* conidial suspensions (1×10^8 conidia mL^{-1}), \pm standard error. The control group was sprayed with sterile distilled water. Different letters above columns indicate statistically significant differences in one larvae instar group (Mann–Whitney U test for independent samples, $P < 0.05$; $n = 810$).

4 pav. *B. bassiana* ir *M. anisopliae* konidijų suspensijomis (koncentracija 1×10^8 konidijų mL^{-1}) paveiktų *Dendrolimus pini* preimaginio vystymosi stadijų mirtingumas, \pm standartinė paklaida. Kontroliniai bandiniai purkšti steriliu distiliuotu vandeniu. Skirtingos raidės virš stulpelių žymi statistiškai patikimus skirtumus vieno vikšrų ūgio grupėje (Mann-Whitney U testas nepriklausomoms imtims, $P < 0,05$; $n = 810$).

A higher mortality in all instar groups was caused by *B. bassiana*: L1-2 – 33.33 ± 2.85 %; L3-4 – 63.33 ± 5.86 %; L5-6 – 35.55 ± 3.51 %, whereas insect mortality caused by *M. anisopliae* was low. The most sensitive to *M. anisopliae* were L1-2 larvae (16.47 ± 1.78 % mortality). Sensitivity to *M. anisopliae* was decreasing with larvae instar growing: L3-4 larvae mortality was 8.89 ± 0.85 %, and L5-6 larvae mortality was 0 %. In the control group, low mortality of insects was observed only in L1-2 and L3-4 larvae groups (6.67 ± 0.62 and 2.21 ± 0.25 %, respectively). The results obtained allow stating that all instars of *Dendrolimus pini* larvae were most sensitive to *B. bassiana* conidial suspensions.

Dependence of the effect of entomopathogenic fungi on pre-imaginal stage of development, exemplified by *Dendrolimus pini*

Only *B. bassiana* was found to be effectively suffocating egg vitality and causing 37.37 ± 3.74 % mortality ($Z = -2.75$, $P = 0.006$) (Fig. 5 A), whereas mortality in the control and *M. anisopliae* egg groups was not high – the part of unhatched eggs was 22.23 ± 5.33 % and 19.33 ± 5.69 %, respectively.

Sensitivity of larvae that hatched from survived (viable) eggs to entomopathogenic fungi was further observed (hatching larvae were not additionally sprayed with fungi

suspensions) (Fig. 5 B). In the control group, the mortality of newly hatched larvae was 1.43 ± 0.13 %, whereas the mortality of hatched larvae in *B. bassiana* and *M. anisopliae* groups was 91.06 ± 6.02 % and 100 %, respectively.

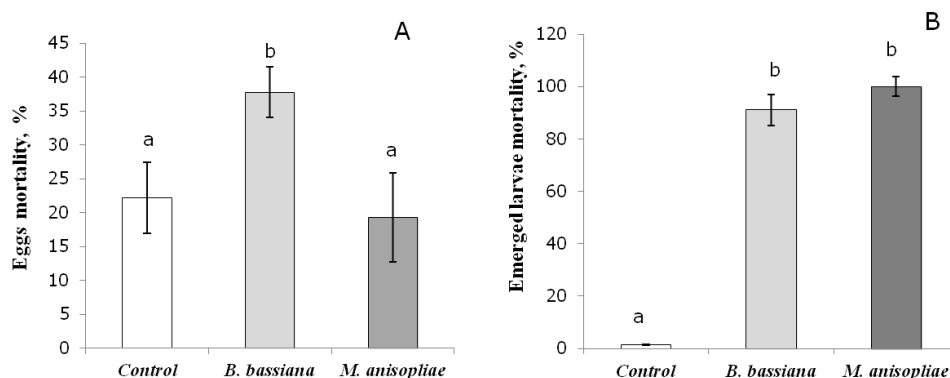


Fig. 5. **A**) Sensitivity (mortality rate) of *Dendrolimus pini* eggs ($n = 270$) to *B. bassiana* and *M. anisopliae* conidial suspensions (1×10^8 conidia mL^{-1}). The control group was sprayed with still distilled ware. **B**) Sensitivity (mortality rate) of hatched larvae. Different letters above columns indicate statistically significant differences (Mann – Whitney U test for independent samples, $P < 0.05$).

5 pav. *Dendrolimus pini*: **A**) kiaušinėlių ($n = 270$) jautrumas (per mirtingumą) *B. bassiana* ir *M. anisopliae* konidijų suspensijoms (koncentracija 1×10^8 konidijų mL^{-1}). Kontroliniai bandiniai purkšti steriliu distiliuotu vandeniu; **B**) Išsiritusių vikšrų jautrumas (per mirtingumą). Skirtingos raidės virš stulpelių žymi statistiškai patikimus skirtumus (Mann-Whitney U testas nepriklausomoms imtims, $P < 0,05$).

Entomopathogenic fungi can infect every insect development stage, including eggs (Hajek, St. Leger, 1994). According to some authors (Gopalakrishanan, Narayanan, 1989), eggs, compared with other insect development stages, are the least sensitive to entomopathogenic fungi, whereas other (Lezama-Gutierrez *et al.*, 1996; Anand, Tiwary, 2009) say that eggs are very sensitive to entomopathogenic fungi. The results of the present research show that the mortality of eggs exposed to entomopathogenic fungi, though significantly different from the mortality in the control group, was low and constituted 37.37 ± 3.74 % (mortality caused by *B. bassiana*). Such rather low effect by fungi could be due to a wax layer covering the egg and/or chemical peculiarities of a chorion (egg shell).

Insect–fungus interaction

Plodia interpunctella ability to recognise fungus-infected substrate

Plodia interpunctella egg-laying on uninfected and *Aspergillus flavus*-infected substrates

Based on literature data, a grain contaminant *Aspergillus flavus* Link: Fries (MUCL 11945), which is pathogenic to insects, animals and humans and which is spreading out in storehouses, was chosen as an object of this stage of investigation (Lugauskas, 2006; Mankevičienė *et al.*, 2006).

In control tests, a female of *Plodia interpunctella* could choose for egg-laying a control plate with sterile grain or an empty plate (without substrate). In 3 days it was found that significantly more females ($t = 5.97$, $P < 0.001$) were choosing a control plate with sterile wheat grain (79.27 ± 4.91 %) than an empty one (20.73 ± 4.43 %) (Fig. 6 A). When *P. interpunctella* had an option to chose between sterile grain (control) and grain infected with *A. flavus* (1×10^7 conidia mL⁻¹), statistically significantly more females were laying eggs on sterile grain (62.45 ± 4.43 %) than on grain infected with pathogenic fungi (37.55 ± 4.43 %, $t = 2.82$, $P = 0.008$) (Fig. 6 B).

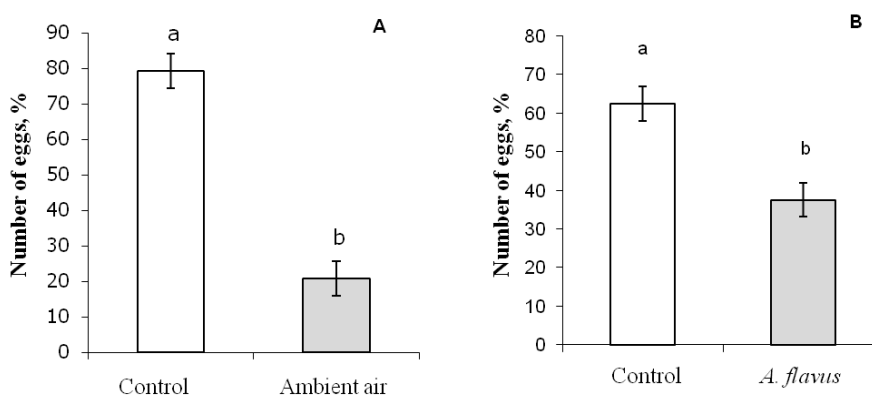


Fig. 6. *P. interpunctella* egg-laying test (percentage of eggs laid, \pm standard error): (A) control – sterile wheat grain, ambient air – plate without substrate ($n = 30$); (B) control – sterile wheat grain, *A. flavus* – wheat grain infected with *A. flavus* conidial suspension (1×10^7 conidia mL⁻¹, $n = 35$). Different letters above columns indicate significant differences (t – test for dependent samples, $P < 0.01$).

6 pav. *Plodia interpunctella* kiaušinėlių dėjimo testas (vidutinė sudėtų kiaušinėlių dalis procentais, \pm standartinė paklaida). A) kontrolė – sterilūs kviečių grūdai; oras – lėkštelė be substrato ($n = 30$); B) kontrolė – sterilūs kviečių grūdai, *A. flavus* – kviečių grūdai paveikti *Aspergillus flavus* konidijų suspensija (1×10^7 konidijų mL⁻¹, $n = 35$). Skirtingos raidės virš stulpelių žymi patikimus skirtumus (t – testas priklausomoms imtims, $P < 0,01$).

As to the dynamics of egg-laying, the number of eggs in the control and *A. flavus* plates was nearly the same, and no statistically significant differences were observed during the first two days ($P > 0.05$) (Fig. 7 A). On the third day from the beginning of the test, the total number of eggs laid in the control (62.45 ± 4.43 %) was statistically significantly higher than the number of eggs laid on the substrate infected with *A. flavus* (37.55 ± 4.43 %; $t = 2.82$, $P = 0.008$).

Eggs were laid either directly on the substrate (grain) or near the substrate (on the bottom, walls or lid of the box). *P. interpunctella* females significantly more eggs were laying directly on the substrate (Fig. 7 B): percentage of eggs laid in the control and on the substrate infected with *A. flavus* constituted 14.43 ± 3.67 % and 4.66 ± 1.47 %, respectively ($t = 2.62$, $P = 0.013$), on the first day, and 20.20 ± 3.76 % and 6.35 ± 1.63 %, respectively ($t = 3.66$, $P = 0.0008$), on the second day; whereas on the third day, the difference in percentage of eggs laid in the control and on the substrate infected with *A. flavus* increased: 45.43 ± 5.18 % against 7.65 ± 1.75 %, respectively ($t = 7.02$, $P < 0.0001$).

The number of eggs laid near the substrate was greater in case of the substrate infected with *A. flavus* (Fig. 7 C): percentage of eggs laid in the control and on the substrate infected with *A. flavus* was 6.11 ± 1.84 % and 15.58 ± 3.96 %, respectively ($t = -2.24$, $P = 0.032$), on the first day; 8.11 ± 1.91 % and 20.72 ± 4.09 %, respectively ($t = -2.98$, $P = 0.005$), on the second day; and 17.67 ± 3.91 % and 29.81 ± 4.32 %, respectively, on the third day, yet without statistically significant differences between the groups ($t = 1.99$, $P = 0,054$).

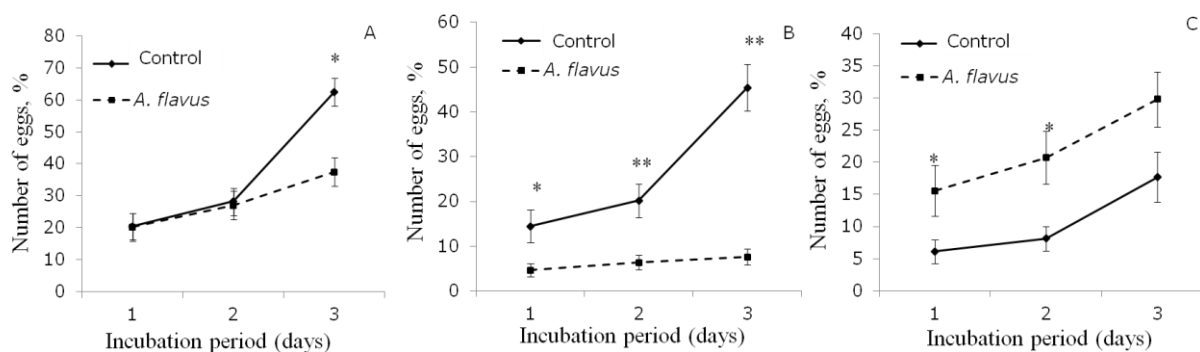


Fig. 7. Egg-laying dynamics on uninfected common wheat grain and common wheat grain infected with *A. flavus*, \pm standard error: (A) total percentage of eggs laid, (B) percentage of eggs laid directly on the substrate, (C) percentage of eggs laid near the substrate T – test for dependent samples, * – $P < 0.05$; ** – $P < 0.001$.

7 pav. Kiaušinėlių dėjimo dinamika ant neužkrėstų ir grybu *Aspergillus flavus* užkrėstų paprastojo kviečio grūdų, \pm standartinė paklaida: **A)** bendras sudėtų kiaušinėlių procentas; **B)** tiesiai ant substrato sudėtų kiaušinėlių procentas; **C)** erdvėje (šalia substrato) sudėtų kiaušinėlių procentas. T – testas priklausomoms imtims, * – $P < 0,05$; ** – $P < 0,001$.

The results obtained demonstrate that mated *P. interpunctella* females were choosing for egg-laying the uninfected substrate only on the third day after infection with fungi. During the three-day period, fungi biomass increased to such extent that the substrate became unfavourable for insects.

***Plodia interpunctella* olfactory responses to uninfected substrate and *Aspergillus flavus*-infected substrate**

To find out which volatile compounds can help *P. interpunctella* recognise uninfected and fungus-infected substrates, SPME, GC-EAD and GC-MS methods were used.

P. interpunctella female antenna receptors were found to react to 4 volatile secondary metabolites produced by uninfected grain (Fig. 8).

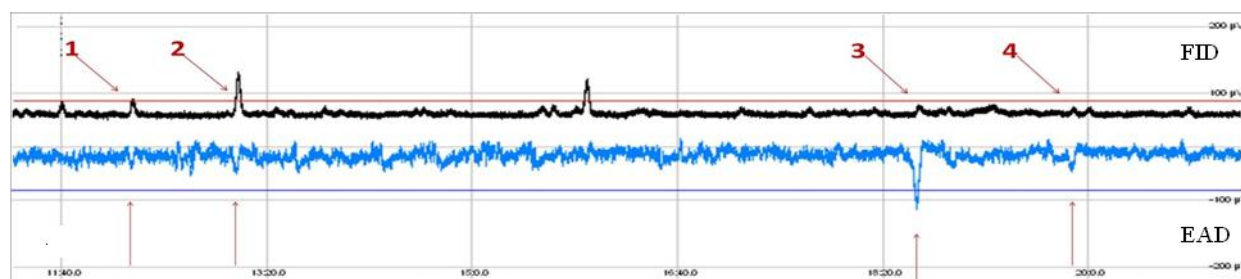


Fig. 8. *P. interpunctella* female antenna DC-EAD responses to volatile compounds produced by the common wheat *Triticum aestivum*. Digits indicate compounds evoking a permanent response of *P. interpunctella* antennae: 1 – 1-hexanol, 2 – nonanal, 3 – phenylacetaldehyde, 4 – 4-oxoisophorone.

8 pav. *Plodia interpunctella* patelių antenų DC-EAD atsakai į paprastojo kviečio (*Triticum aestivum*) grūdų skleidžiamus lakiuosius komponentus. Skaičiai žymi junginius, sukėlusius pastovų *P. interpunctella* antenų atsaką: 1 – 1-heksanolis, 2 – nonanalis, 3 – fenilacetaldehidai, 4 – 4-oksoizoforonai.

Upon comparison of EAD-active component retention indexes and mass spectra with those stored in a mass spectra database (NIST08) and with the retention time of authentic synthetic standards, the following compounds were identified: 1-hexanol, nonanal, phenylacetaldehyde and 4-oxoisophorone (Fig. 9).

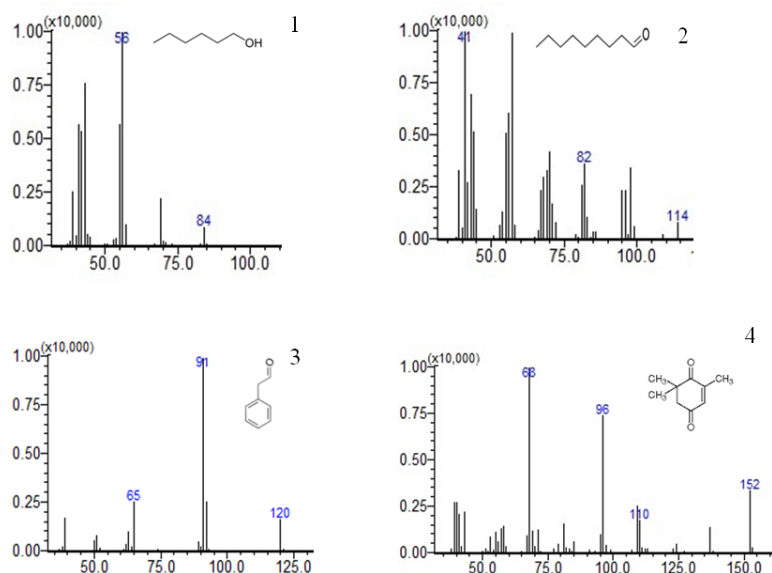


Fig. 9. Mass spectra of EAD-active volatile compounds (evoking *P. interpunctella* antenna receptor responses) produced by the common wheat *Triticum aestivum*: 1 – 1-hexanol, 2 – nonanal, 3 – phenylacetaldehyde, 4 – 4-oxoisophorone.

9 pav. EAD aktyvių (vabzdžiui *Plodia interpunctella* antenų receptorių reakcijas sukeliančių) paprastojo kviečio (*Triticum aestivum*) grūdų skleidžiamų lakiųjų komponentų masių spektrai: 1 – 1-heksanolis, 2 – nonanalis, 3 – fenilacetaldehydas, 4 – 4-oksoizoforonas.

Investigation of volatile secondary metabolites produced by the substrate infected with *A. flavus* revealed that in all cases only one component evoked repeating responses of *P. interpunctella* female antenna receptors (Fig. 10). The compound was identified as 3-methyl-1-butanol (Fig. 11).

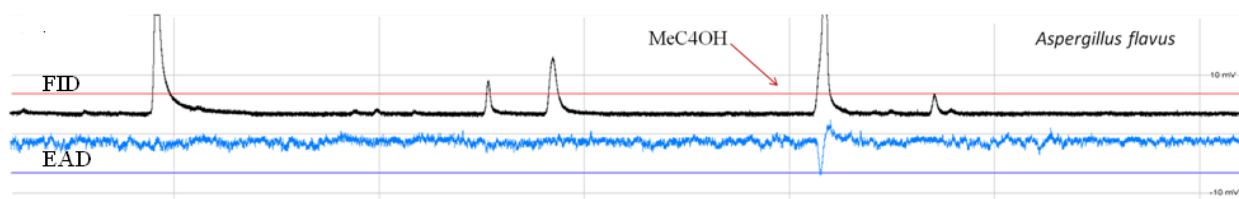


Fig. 10. *P. interpunctella* female antenna DC-EAD responses to volatile substances produced by grain infected with *Aspergillus flavus*; MeC4OH – 3-methyl-1-butanol.

10 pav. *Plodia interpunctella* patelių antenų DC-EAD atsakai į *Aspergillus flavus* užkrėstų grūdų skleidžiamas lakiąsias medžiagas; MeC4OH – 3-metil-1-butanolis.

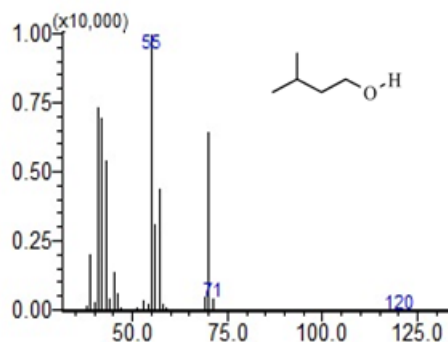


Fig. 11. Mass spectrum of 3-methyl-1-butanol.

11 pav. 3-Metil-1-butanolio masių spektras.

It might be presumed that this component could be one of the compounds relying on which insects recognise grain infected with fungi.

Dynamics of a volatile component produced by fungus-infected substrate

On the third day after infection with *A. flavus* conidial suspension (1×10^7 conidia mL⁻¹), 3-methyl-1-butanol constituted 0.15 ± 0.04 µg/g of the substrate in the grain headspace. On the fifth day after grain infection with the fungus, the amount of 3-methyl-1-butanol in the emission of volatile secondary metabolites increased significantly up to 16.62 ± 1.41 µg/g of the substrate and persisted until the tenth day after infection (16.50 ± 0.76 µg/g of the substrate).

In fungi-infected grain, abundance of volatiles which could signal about a substrate suitable for egg-laying by *P. interpunctella* females was decreasing, and the volatiles (such as 3-methyl-1-butanol) which could signal about unsuitable substrates appeared.

***Plodia interpunctella* behavioural and olfactory receptor responses to fungus-infected substrate**

Comparative analysis of *Plodia interpunctella* olfactory sensitivity to biologically active substances

The EAG method was used to test the effect of different doses of separate volatile compounds of the common wheat collected from air on olfactory receptors of *P. interpunctella* (Fig. 12). All amplitudes of EAG responses to different doses of 1-hexanol, phenylacetaldehyde and 4-oxoisophorone statistically significantly differed from the control (hexane). The threshold dose invoking significant (t – test, $P < 0.05$) EAG responses was 1 µg for all these volatiles of uninfected grain. Only the EAG mean amplitude invoked by nonanal statistically significantly differed from the EAG mean amplitude invoked by a control stimulus in case of higher doses, i.e. of 100 and 1000 µg, and constituted 0.046 ± 0.004 mV ($t = 2.63$, $P = 0.016$) and $0.069 \pm$

0.009 mV ($t = 6.52$, $P < 0.0001$), respectively. The greatest antenna responses were invoked by a 1000 μg 1-hexanol dose (0.16 ± 0.013 mV).

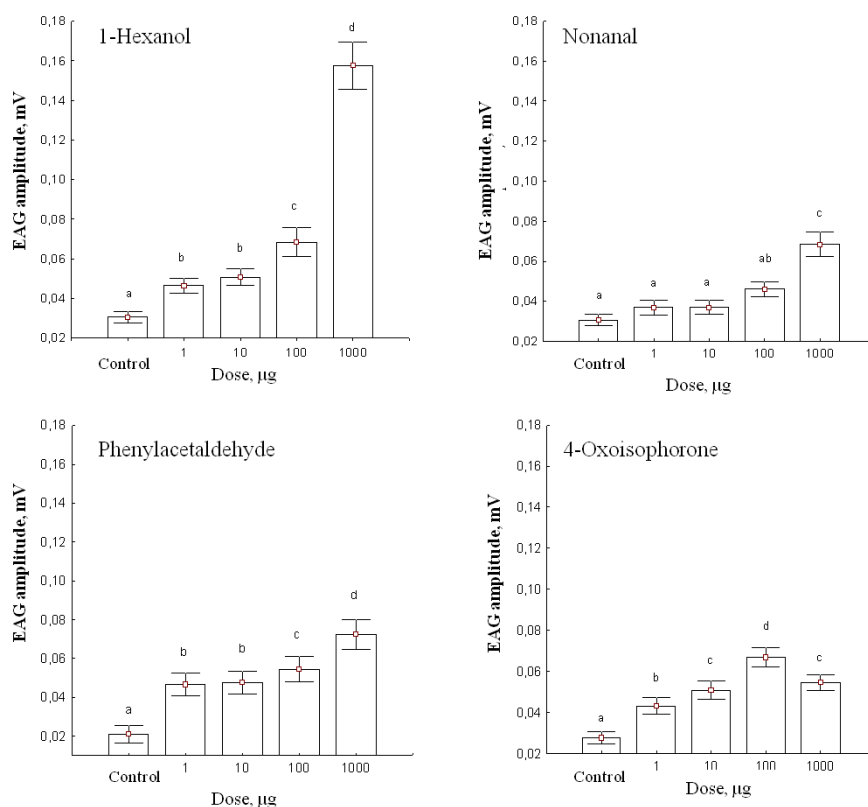


Fig. 12. *P. interpunctella* mean EAG responses (\pm standard error) to different doses of active components: 1-hexanol, nonanal, phenylacetaldehyde, 4-oxoisophorone. Different letters above columns indicate statistically significant differences (t – test for dependent samples, $P < 0.05$).

12 pav. *Plodia interpunctella* vidutinės EAG reakcijos (\pm standartinė paklaida) į skirtingas aktyvių komponentų dozes: 1-heksanolis, nonanalis, fenilacetaldehidus, 4-oksoizoforonas. Skirtingos raidės virš stulpelių žymi statistiškai patikimus skirtumus (t – testas priklausomoms imtims, $P < 0,05$).

As to *P. interpunctella* female antenna responses to different doses of 3-methyl-1-butanol (Fig. 13), the mean amplitude of responses caused by 1 μg was 0.028 ± 0.005 mV and significantly differed from the control (0.021 ± 0.005 mV; $t = 2.83$, $P = 0.011$). The total EAG response caused by a 10 μg dose (0.037 ± 0.006 mV) significantly differed from the control (hexane) ($t = 6.19$, $P < 0.0001$). The greatest antenna responses caused by 100 and 1000 μg 3-methyl-1-butanol doses also significantly differed from the control: a 100 μg mean response amplitude was 0.053 ± 0.007 mV ($t = 7.68$, $P < 0.0001$), and a 1000 μg mean response amplitude was 0.081 ± 0.008 mV ($t = 9.75$, $P < 0.0001$).

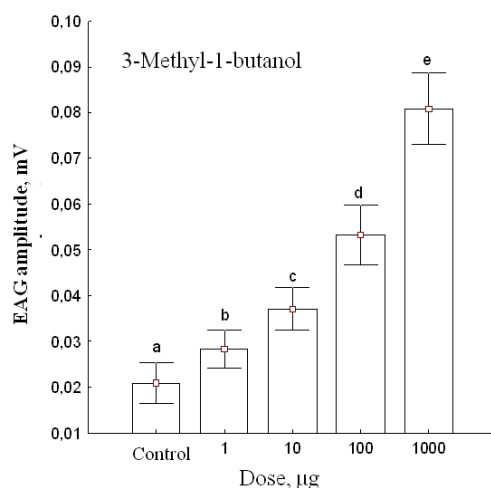


Fig. 13. EAG responses of *P. interpunctella* to different doses of 3-methyl-1-butanol. Different letters above columns indicate statistically significant differences (t – test for dependent samples, \pm standard error, $P < 0.05$).

13 pav. *P. interpunctella* EAG reakcijos į skirtingas biologiškai aktyvaus komponento 3-metil-1-butanolio dozes. Skirtingos raidės virš stulpelių žymi statistiškai patikimus skirtumus (t – testas priklausomoms imtims, \pm standartinė paklaida, $P < 0,05$).

Attractant activity of the synthetic compounds in mated females

Two-choice (pitfall) olfactometers test were used (Uechi *et al.*, 2007). At low doses 1-hexanol (0.1 and 1 μg) and nonanal (at a 0.1 μg dose) were attractive to insects. Phenylacetaldehyde was not attractive to females and, compared with the control, did not make any significant differences in either dose (G – test, $P > 0.05$). All tested doses of 4-oxoisophorone significantly differed from the control, though activity appeared to be repellent rather than attractant, i.e. females statistically significantly more often were choosing hexane (Fig. 14).

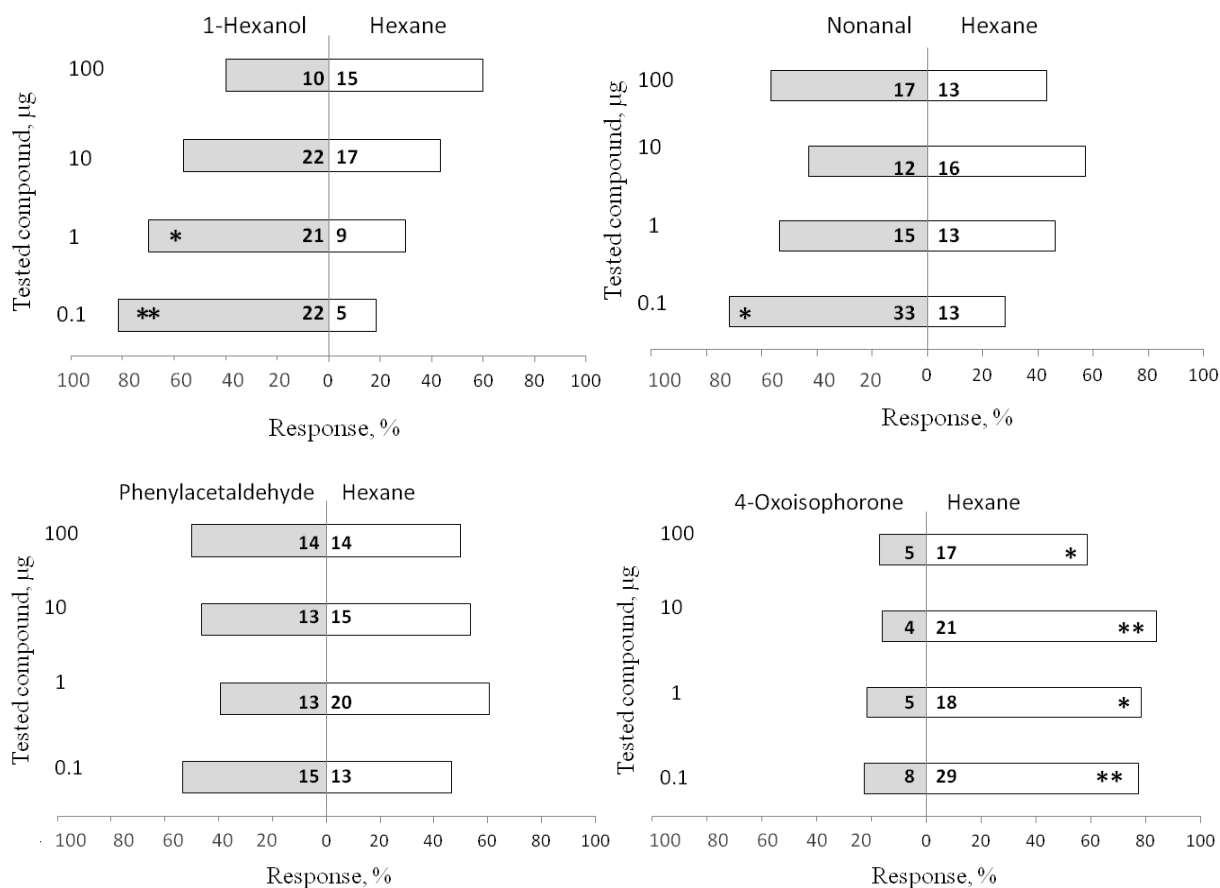


Fig. 14. Measurement of biological activity of EAG-active substances produced by uninfected grain to mated *P. interpunctella* females by using a two-choice olfactometre.* - Asteriks refer to significance level according to replicated G-tests: * $P < 0.05$, ** $P < 0.001$.

14 pav. Nepažeistų grūdų skleidžiamų EAG aktyvių medžiagų biologinio aktyvumo *P. interpunctella* apvaisintoms patelėms vertinimas dviejų pasirinkimų olfaktometru. * – žvaigždutės žymi statistiškai patikimus skirtumus (G-testas, * $P < 0,05$, ** $P < 0.001$).

The results obtained show that 1-hexanol was the most attractive to mated *P. interpunctella* females, 1-hexanol and nonanal were regarded as green leaf components (Ruther *et al.*, 2002; Uechi *et al.*, 2007). It is known that nonanal is an attractant for egg-laying to *P. interpunctella*, to a related storehouse pest *Ephestia cautella* (Walker) (Lepidoptera: Pyralidae) and to many other moth species (Uechi *et al.*, 2007, Olsson *et al.*, 2005). Investigations by Uechi *et al.* (2007) demonstrated that nonanal was attractive to mated *P. interpunctella* females only if used in low doses of 0.1 and 0.01 µg. 1-Hexanol was not known as an attractant to moths (Lepidoptera); however, attractiveness of the substance was described to several insect species from Coleoptera (Ruther *et al.*, 2002; Matsumoto, 1962), Diptera (Cruz-López *et al.*, 2006) and Homoptera (Mu *et al.*, 2012) orders.

Phenylacetaldehyde and 4-oxoisophorone are referred to as floral volatile compounds (de Vega *et al.*, 2014, Olsson *et al.*, 2005), because these substances are abundantly detected when plants are blossoming. Both substances are known as attractants for insects visiting flowers. However, in the present investigation phenylacetaldehyde (in doses of 0.1–100 µg) was not found to be attractive to *P. interpunctella* females, which allows assuming that this substance might be attractive in lower doses, whereas 4-oxoisophoron was repellent to pests. There are no literature data on attractiveness of this substance to *P. interpunctella*.

While testing attractiveness of 3-methyl-1-butanol to mated *P. interpunctella* females it was found that the highest (100 µg) dose repelled insects and they significantly more often were preferred hexane (control) ($G = 4.94$, $P = 0.026$) (Fig. 15). A 10 µg dose did not differ from the control ($G = 0.037$, $P = 0.847$). With the dose of the test substance decreasing, its attractiveness to insects was increasing. 1 and 0.1 µg doses were chosen significantly more often than the control.

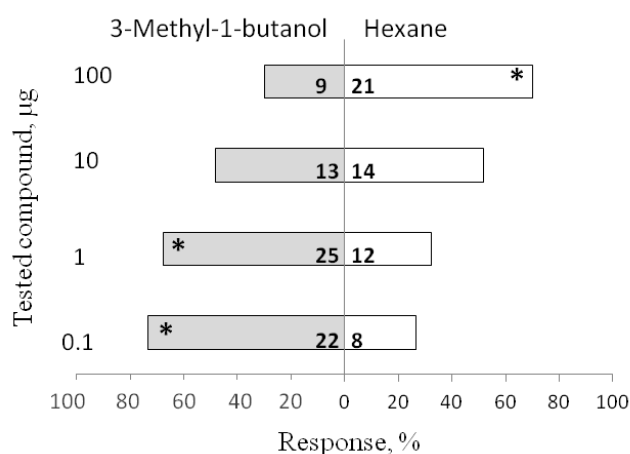


Fig. 15. Attractiveness of a biologically active component 3-methyl-1-butanol produced by *Aspergillus flavus*-infected grain to test insects. * - Asterisks refer to significance level according to replicated G-tests (* $P < 0.05$, ** $P < 0.001$).

15 pav. *Aspergillus flavus* pažeistų grūdų skleidžiamo biologiškai aktyvaus komponento 3-metil-1-butanolio patrauklumas tiriamiesiems vabzdžiams. * – žvaigždutės žymi statistiškai patikimus skirtumus (G-testas, * $P < 0,05$, ** $P < 0,001$).

3-Methyl-1-butanol is known as a volatile component produced by *A. flavus* (Kamiński *et al.*, 1972; Tuma *et al.*, 1989; Sunesson *et al.*, 1995). However, attractiveness of this volatile compound to *P. interpunctella* females (and other moths) has not been studied so far. 3-Methyl-1-butanol might be an important marker in recognising infected grain and/or their products by using electrophysiological responses of insect antennae receptors as a biosensor.

CONCLUSIONS:

1. A complex of 15 fungus species was identified in cadavers of a Bordered white moth *Bupalus piniaria* (Lepidoptera) larvae collected in a natural population, of which 10 were entomopathogenic fungi; the most abundant species were *Lecanicillium psalliotae* (34.61%) and *Fusarium solani* (24.33 %); Shannon–Wiener diversity index $H' = 1.98$.
2. Mortality of larvae exposed to fungi was found to depend on the species of the defoliating insect: *Bupalus piniaria* larvae were the most sensitive (the highest mortality during the shortest time period was detected after infection of 3rd and 4th instar larvae with conidial suspension of 10^8 mL^{-1} concentration) to *Beauveria bassiana* (100% mortality in 12 days) and *Metarhizium anisopliae* (100 % mortality in 18 days). The mortality of *Diprion pini* larvae caused by *B. bassiana* was $85.61 \pm 3.38 \%$ in 18 days. *Dendrolimus pini* larvae were the least sensitive to fungi: $63.33 \pm 5.86 \%$ mortality caused by *B. bassiana* and $8.89 \pm 0.85 \%$ mortality caused by *M. anisopliae* in 18 days.
3. Sensitivity to entomopathogenic fungi was found to depend on insect development stage: in the egg stage, the highest mortality of *Dendrolimus pini* was caused by *Beauveria bassiana* ($37.37 \pm 3.74\%$ of eggs and $91.06 \pm 6.02\%$ of larvae hatched from survived eggs) and by *Metarhizium anisopliae* ($19.33 \pm 5.69 \%$ of eggs and 100% of larvae hatched from survived eggs); in the larvae stage, the highest mortality was caused by *B. bassiana* (L1-2 – $33.33 \pm 2.85 \%$, L3-4 – $63.33 \pm 5.86 \%$, L5-6 – $35.55 \pm 3.51 \%$), and the lowest by *M. anisopliae* (L1-2 – $16.47 \pm 1.78 \%$, L3-4 – $8.89 \pm 0.85 \%$, L5-6 – 0%).
4. *Plodia interpunctella* (Lepidoptera) females recognise fungus-infected substrates: in case a choice, statistically significantly more eggs were laid on an uninfected substrate ($62.45 \pm 4.43 \%$) than on a fungus-infected substrate $37.55 \pm 4.43 \%$ ($t = 2.82$, $P = 0.008$).
5. *Plodia interpunctella* females perceive odour 4 volatile compounds (1-hexanol, nonanal, phenylacetaldehyde and 4-oxoisophorone) in a substrate suitable for egg-laying and 3-methyl-1-butanol in a fungus-infected substrate. According to changes in volatile compounds, *P. interpunctella* females could distinguish between suitable and unsuitable (fungus-infected) substrates for egg-laying.
6. Behavioural response of mated *Plodia interpunctella* females' to volatile compounds differed: 1-hexanol (1 and 0.1 μg), nonanal (0.1 μg) and low (1 and 0.1 μg) doses of 3-methyl-1-butanol were attractive, however high (100 μg) doses of 3-methyl-1-butanol were repellent. 3-methyl-1-butanol could be an important marker in recognising fungi in the substrates.

IVADAS

Darbo aktualumas.

Drugiai ir plėviasparniai – pagrindiniai spygliuočių kenkėjai, galintys sukelti masinio dauginimosi židinius ir tokiu būdu defoliuoti medžius (Žiogas, 1997; Dahlsten, Mills, 1999; Belova *et al.*, 2000). Gamtinėmis sąlygomis šių vabzdžių gausumą reguliuoja jų specifinis parazitoidų kompleksas bei vabzdžiais mintantys gyvūnai. Tačiau susidarius palankioms aplinkos sąlygoms kenkėjams vystytis ir/ar sutrikus parazitoidų ritimosi sinchroniškumui – gali susidaryti spyglius graužiančių kenkėjų masinio dauginimosi ir paplitimo židiniai. Medynuose jie gali išsilaikyti 4–7 metus (Žiogas, 1997; Ciesla, 2004), taip medžiai netenka prieaugio (Straw, 1996; Straw *et al.*, 2002; Gedminas *et al.*, 2004), nusilpsta, juos dažniau puola kamienų kenkėjai ir ligos (Cedervind *et al.*, 2003; Lynikienė *et al.*, 2004a).

Tokiems židiniams neutralizuoti dažniausiai naudojami cheminiai insekticidai, pavyzdžiui, sintetiniai piretroidai: etafenproksas, diflubenzuronas, teflubenzuronas, z-cipermetrinas ir kt. (Sierpinska, 1998; Woreta, Malinowski, 1998). Pastaraisiais dešimtmečiais jų naudojimas vis griežtinamas atsižvelgiant į neigiamą poveikį aplinkai, joje gyvenantiems gyviesiems organizmams, pavyzdžiui, plačiai naudojami cipermetrinai yra labai toksiški vandens vabzdžiams, bitėms, žuvims bei žmogaus sveikatai (Cox, 1996). Viena iš alternatyvų cheminiams insekticidams – biologiniai preparatai. Jie kuriami pirmuonių, bakulovirusų, bakterijų, nematodų ir entomopatogeninių grybų pagrindu. Pasaulyje plačiai naudojami bakterijų *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) pagrindu sukurti ir registruoti biologiniai insekticidai. Jie patvirtinti ir naudojami ES. Kovai su spygliais mintančiais vabzdžiais šie preparatai pasitelkti: Lenkijoje (Glowacka, 1996; Sierpinska, 1998, Augustyniuk-Kram, 2011), Švedijoje (Lindelow, 1997), Prancūzijoje (Augustyniuk-Kram, Kram, 2012), Lietuvoje (Lynikienė *et al.*, 2004b; Alenikovas, Gedminas, 2010). Šie preparatai naudojami tik esant palankioms aplinkos sąlygoms: purškiami tik dieną, bent 1–2 paras po preparato panaudojimo neturi lyti (antraip preparatas bus nuplautas) ir pan. Be to *Bt* preparatai veikia tik per žarnyną, todėl žūna tik aktyviai besimaitinantys kenkėjai.

Kaip viena iš alternatyvų apsaugai nuo pušis galinčių defoliuoti vabzdžių – entomopatogeninių grybų pagrindu pagaminti preparatai. Jų gamyba ir naudojimas pasaulyje tampa paklausesni (Sihag, 2011), nes yra nebrangūs, atsparesni nepalankiems aplinkos veiksniams (lietui, UV spinduliuotei, temperatūrai), be to patogeniniai mikromicetai gali pažeisti visas vabzdžio vystymosi stadijas (net ir tas, kurios nesimaitina). Deja, šiai dienai nėra registruotas nei vienas preparatas spygliais mintančių drugių ir plėviasparnių populiacijoms

reguliuoti. Viena to priežasčių – kad literatūroje nėra išsamių tyrimų, aprašančių entomopatogeninių grybų sąveikas su pušiniu spridžiumi *Bupalus piniaria*, pušiniu verpiku *Dendrolimus pini* ir paprastuoju pušiniu pjūkleliu *Diprion pini*. Netirtas ir šių vabzdžių jautrumas patogeniškiems mikromicetams.

Tyrimų rezultatai svarbūs ne tik fundamentinių žinių, bet ir taikomąja prasme, t. y. kuriant ir taikant kovos priemones šių kenkėjų gausumui ir plitimui reguliuoti, sumažinti daromą žalą miško ekosistemoms.

Darbo tikslas – nustatyti entomopatogeninių grybų įvairovę spyglius graužiančių vabzdžių gamtinėje populiacijoje ir šių vabzdžių jautrumą entomopatogeniniams grybams, o taip pat vabzdžių gebėjimą atpažinti grybais užkrėtą substratą (modelinių rūšių iš Hymenoptera ir Lepidoptera būrių pavyzdžiu).

Darbo uždaviniai:

Tiriamą sąveiką grybas – vabzdys

1. Išskirti ir identifikuoti pušinio sprindžiaus (*Bupalus piniaria*, Lepidoptera) gamtinėje populiacijoje sutinkamus entomopatogeninius grybus, įvertinti jų įvairovę.
2. Įvertinti spyglius graužiančių vabzdžių pušinio sprindžiaus (*Bupalus piniaria*), pušinio verpiko (*Dendrolimus pini*, Lepidoptera) ir paprastojo pušinio pjūklelio (*Diprion pini*, Hymenoptera) jautrumą entomopatogeniniams grybams.

Tiriamą sąveiką vabzdys – grybas

3. Nustatyti vabzdžių gebėjimą atpažinti grybais užkrėtą substratą remiantis pietinio ugniuko (*Plodia interpunctella*, Lepidoptera) tyrimais: įvertinti elgesines ir uoslės receptorių reakcijas į užkratą, išskirti ir identifikuoti lakius junginius, pagal kuriuos vabzdys galėtų skirti substratą be grybų ir su jais; įvertinti išskirtų ir identifikuotų junginių sintetinių analogų biologinį aktyvumą.

Darbo mokslinis naujumas

- ✓ Pirmą kartą iš pušinio sprindžiaus (*Bupalus piniaria*) vikšrų išskirti ir identifikuoti entomopatogeniniai grybai, įvertinta jų įvairovė;
- ✓ Pirmą kartą ištirtas entomopatogenų poveikis spyglius graužiantiems vabzdžiams *Bupalus piniaria*, *Dendrolimus pini* ir *Diprion pini*, jų lervinėms stadijoms;
- ✓ Pirmą kartą ištirtas *Dendrolimus pini* jautrumas entomopatogeniniams grybams preimaginio vystymosi metu;
- ✓ Pirmą kartą nustatyta, kad *Plodia interpunctella* chemoreceptoriai reaguoja į 4-oksoizoforoną ir 3-metil-1-butanolį;

- ✓ Pirmą kartą nustatytas 4-oksoizoforono ir 3-metil-1-butanolio poveikis apvaisintoms *P. interpunctella* patelėms: pirmasis junginys veikia kaip repelentas, o antrasis – kaip repelentas (didelėmis dozėmis) ir kaip atraktantas (mažomis dozėmis);
- ✓ Pirmą kartą parodyta, kad 3-metil-1-butanolis yra markeris, pagal kurį galima atpažinti grybu užterštus substratus.

Mokslinė ir praktinė darbo reikšmė

Darbo rezultatai suteikia naujų žinių apie sąveikas tarp vabzdžių ir grybų. Gauti tyrimų rezultatai gali būti taikomi:

- ✓ kuriant biologines apsaugos priemones nuo spygliais mintančių vabzdžių;
- ✓ parenkant tinkamiausią laiką biopreparatų naudojimui;
- ✓ biomarkerių kūrime;
- ✓ elektrofiziologiniams vabzdžių uoslės receptorių tyrimams.

Ginamieji teiginiai:

1. Iš gamtoje žuvusių *Bupalus piniaria* vikšrų gali būti išskirtas ne mažesnis nei 15 kultivuojamų mikromicetų rūšių kompleksas.
2. Spyglius graužiančių vabzdžių jautrumas entomopatogeniniams grybams priklauso nuo vabzdžio rūšies ir vystymosi stadijos.
3. *Plodia interpunctella* patelės kiaušinėliams dėti renkasi grybais neužkrėstą substratą.
4. Pagal substrato lakius organinius junginius galima atskirti grybais neužkrėstą ir užkrėstą substratus.

Darbo aprobavimas ir publikacijos

Disertacijos medžiaga buvo pristatyta 28-oje tarptautinėje Entomologijos draugijos konferencijoje (Birštonas, 2010), 2-oje jaunųjų mokslininkų konferencijoje „Jaunieji mokslininkai – žemės ūkio pažangai“ (Vilnius, 2013), 30-oje tarptautinėje Cheminės ekologijos draugijos konferencijoje (Urbana-Champaign, Illinois, JAV, 2014); 31-oje tarptautinėje Cheminės ekologijos draugijos konferencijoje (Stokholmas, Švedija, 2015). Tyrimų rezultatai paskelbti septyniose publikacijose: trijuose moksliniuose straipsniuose bei keturiuose konferencijų tezėse.

Darbo struktūra

Disertacijos rankraštį sudaro šie skyriai: Įvadas, Literatūros apžvalga, Tyrimų medžiaga ir metodai, Tyrimų rezultatai (skyrius susideda iš 2 poskyrių) ir jų aptarimas, Išvados, 280 literatūros šaltinių sąrašas, autoriaus mokslinių publikacijų sąrašas, Priedai. Disertacijos apimtis – 109 puslapių, 11 lentelių ir 31 paveikslo. Disertacija parašyta lietuvių kalba, o disertacijos santrauka – anglų kalba.

Padėkos

Nuoširdžiai dėkoju mokslinio darbo vadovui prof. habil. dr. Vincui Būdai už visokeriopą pagalbą ir patarimus ruošiant disertacijos rankraštį. Taip pat dėkoju dr. Dalei Pečiulytei už pagalbą planuojant ir atliekant tyrimus, už kantrybę ir neblėstančią energiją. Esu dėkinga visam Cheminės ekologijos ir elgsenos laboratorijos mokslininkų kolektyvui už pagalbą įsisavinant naujus metodus, už vertingus patarimus bei puikią atmosferą darbe. Esu dėkinga dr. Pauliui Zolubui už pagalbą įveisiant pradinę pušinio verpiko kultūrą. Dėkoju Gamtos tyrimų Atviros prieigos centrui už galimybę naudotis centre esančia aparatūra. Taip pat dėkoju Lietuvos Valstybiniam Mokslo ir studijų fondui už suteiktą stipendiją, bei Vilniaus Universiteto Ekologijos institutui už suteiktą galimybę studijuoti doktorantūroje.

Nuoširdžiai dėkoju visiems draugams ir artimiesiems, kurie visą laiką nuoširdžiai domėjosi mano darbu. Ačiū visiems palaikiusiems sunkiausią gyvenimo akimirką...

In Memoriam Mater...

LITERATŪROS APŽVALGA

Šiame skyriuje apžvelgiami pagrindiniai entomopatogeninių grybų (toliau EPG) vystymosi ir ekologijos bruožai, aptiriamos sąveikos su vabzdžiais. Taip pat apžvelgiama ir tiriamųjų vabzdžių (*Bupalus piniaria*, *Diprion pini*, *Dendrolimus pini* ir *Plodia interpunctella*) pagrindiniai morfologijos ir biologijos bruožai.

TYRIMŲ MEDŽIAGA IR METODAI

Vabzdžiai. Spygliais mintantys vabzdžiai: pušinis sprindžius – *Bupalus piniaria* L. (Lepidoptera: Geometridae), pušinis verpikas – *Dendrolimus pini* L. (Lepidoptera: Lasiocampidae), paprastasis pušinis pjūklelis – *Diprion pini* L. (Hymenoptera: Diprionidae). Modelinė rūšis – sandėlių kenkėjas, pietinis ugniukas – *Plodia interpunctella* (Hübner)

(Lepidoptera: Pyralidae). Vabzdžiai auginti laboratorinėmis sąlygomis: vabzdžių auginimo kameroje (PLAS LAB, INC, JAV) 20–25 °C temperatūroje, esant 75 ± 10 % santykiniam oro drėgnumui, 16D:8N fotoperiodui.

Entomopatogeniniai grybai. Grybų poveikio vabzdžiams tyrimams naudotos entomopatogeninių grybų kultūros: *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. (DPK-02-d), *Metarhizium anisopliae* (Metschnikov) Sorokin (DPK-06-d), *Isaria farinosa* (Holmsk.) Fr. (DPK-06-f-11), *Lecanicillium psalliotae* (Treschew) Zare & W. Gams (DPK-08-v-6), *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. (DPK-08-f-5) iš Gamtos tyrimų centro Botanikos instituto Biodestruktorių tyrimo laboratorijos Mikroorganizmų kultūrų kolekcijos. Tiriant ar vabzdys atpažįsta grybais užkrėstą mitybinį substratą naudota mikromicetų kultūra – *Aspergillus flavus* Link: Fries (MUCL 11945) buvo įsigyta iš Belgijos mikroorganizmų kolekcijos (Belgian Coordinated Collection of Microorganisms – BCCM).

Substratas. *Plodia interpunctella* biotestuose kaip substratas naudoti paprastųjų žieminių kviečių (*Triticum aestivum* L.; veislė – „Zenta“) grūdai.

Mikromicetų išskyrimas ir identifikavimas

Iš gamtinėse populiacijose surinktų negyvų *B. piniaria* vikšrų buvo išskirtas, užaugintas ir identifikuotas mikromicetų (toliau vartojamas terminas „grybai“) kompleksas. Vabzdžio kūno paviršius sterilizuotas 1 min. 5 % natrio hipochlorito (NaOCl) tirpale, 2 min. 75 % etanolyje, toliau skalautas steriliame distiliuotame vandenyje ir paliktas išdžiūti (48 val.). Po išdžiūvimo kiekvienas vikšras buvo perkeltas į atskiras Petri lėkšteles ir laikomas 25 ± 2 °C, esant 75 ± 5 % santykiniam oro drėgnumui. Prasidėjus vizualiai pastebimam grybo vystymuisi, skirtingos morfologijos grybo micelis buvo perkeltas ant kelių selektyvių agarizuotų terpių: saburo-dekstrozės, bulvių-dekstrozės, salyklo ekstrakto 2 % ir Čapeko agarų (Liofilchem, Italija). Užsėtose kultūrose buvo inkubuojamos 5–7 paras 26–28 °C temperatūroje. Išgrynintos iki monokultūros mikromicetų kolonijos identifikuotos šviesinės mikroskopijos metodu pagal morfologinius kolonijos bei sporuliacijos struktūrų požymius (Samson 1974; Fisher *et al.*, 1982; Nelson *et al.*, 1983; Kiffer *et al.*, 1997; Sung *et al.*, 2001; Domsch *et al.*, 2007).

Entomopatogeninių grybų kultūrų konidijų suspensijų ruošimas

Konidijoms nuplauti nuo orinio micelio, ant mitybinės terpės Petri lėkštelėje išauginta entomopatogeno kultūra buvo užpilta 20 mL sterilaus vandens su 0,01 % Tween 80 tirpalu (Sigma, JAV). Procedūra buvo pakartota kelis kartus surenkant nuplautas konidijas į bendrą suspensiją. Konidijų skaičius nustatytas naudojant hemocitometrą. Biotestavimo tyrimui suspensija skiedžiama iki 10⁸ konidijų mL⁻¹ koncentracijos (pagal Freimoser *et al.*, 2003; Zimmermann, 2008).

Biotestas

Testuoti skirtingų rūšių vabzdžiai lervos (*Bupalus piniaria*, *Diprion pini*, *Dendrolimus pini*) ir kiaušinėlio (*Dendrolimus pini*) stadijoje. EPG konidijų suspensija biotestuose buvo užpurškiama tiesiogiai ant individų su mitybiniu substratu. Biotestavimui vabzdžių lervos laikytos stikliniuose induose (3 L talpos eksikatoriai) ir maitinti paprastosios pušies (*Pinus sylvestris* L.) spygliais, pateikiamais kartu su 10-15 cm šakelėmis. Vabzdžiai buvo auginami klimatinėje vabzdžių auginimo kameroje (PLAS LAB, INC, JAV) esant 20–25 °C temperatūrai, 75 ± 10 % santykiniam oro drėgnumui ir 16D:8N fotoperiodui. Kiaušinėliai biotesto metu buvo laikomi Petri lėkštelėse tokiomis pat sąlygomis kaip ir lervos.

Kiekvieną dieną (3 savaites) buvo tikrinamas ir registruojamas tiriamųjų vabzdžių mirtingumas. Žuvę vabzdžiai buvo perkeliama į Petri lėkšteles su sudrėkintu filtriniu popierium ir inkubuojami 24 °C. Atsiradus micelinio apaugimo požymiams, grybai pakartotinai identifikuoti tais pačiais metodais (žr. aukščiau), kad patikrinti naudoto kamieno augimą.

Kiaušinėlių dėjimo testas

Kiaušinėlių dėjimo elgesio tyrimams naudotos 1–2 dienų amžiaus susiporavusios *Plodia interpunctella* patelės. Patelės buvo talpinamos į plastikinį indą (120 × 100 × 40 mm) su skaidriu dangteliu. Jo dugne patalpintos dvi Petri lėkštelės (Ø 35, aukštis 10 mm) 60 mm atstumu viena nuo kitos, į kurias įdėtas substratas (paprastojo kviečio grūdai) kiaušinėlių dėjimui. Į kiekvieną dėžutę buvo įleidžiama po vieną patelę ir fiksuojamas kiekvienoje dėžutės pusėje bei Petri lėkštelėje sudėtų kiaušinėlių skaičius.

Prieš atliekant kiaušinėlių dėjimo pasirinkimo bandymus buvo atlikti kontroliniai bandymai. Jų metu patelė kiaušinėlių dėjimui galėjo rinktis kontrolinę pusę su steriliais grūdais arba tuščią pusę be substrato. Kiaušinėlių dėjimas vertintas po 3 parų.

Tiriant mikromicetų poveikį kiaušinių dėjimui, vienoje lėkštelėje buvo sterilūs kviečių grūdai (3 g), o kitoje – grūdai apipurkšti *Aspergillus flavus* konidijų suspensija (10^7 konidijų mL⁻¹) ir inkubuoti vieną parą termostate (25 ± 2 °C). Kiaušinėlių dėjimas vertintas po 1, 2 ir 3 parų. Vertinant substrato tinkamumą kiaušinėlių dėjimui, atsižvelgta į Phillips, Strand (1994) ir Sambaraju, Phillips (2008) rekomendacijas rezultatai teigiamai vertinti jei kiaušinėlių skaičius bandinyje 5 ir daugiau (bandiniai su mažesniu kiaušinėlių skaičiumi į rezultatus neįtraukiami).

Cheminės medžiagos patrauklumo vertinimas dviejų pasirinkimų olfaktometru

Tyrimams naudotas dviejų pasirinkimų olfaktometras. Jis sukonstruotas pagal Uechi *et al.* (2007) metodiką. Plastikinėje Petri lėkštelėje (Ø 85 mm, aukštis 20 mm) 55 mm atstumu viena nuo kitos padarytos dvi angos (Ø 8 mm). Jose įtvirtinti 40 mm ilgio, viršuje 8 mm, apačioje 6

mm skersmens vamzdeliai. Vamzdeliai įstatyti į 10 mL talpos stiklinius buteliukus taip, kad nesiektų dugno. Buteliuko dugne buvo įdėtas filtrinis popierėlis, ant kurio užnešta 10 µL skirtingos testuojamų medžiagų dozės (0,1; 1; 10 ir 100 µg). Tyrimams naudotos 2–3 dienų amžiaus susiporavusios *Plodia interpunctella* patelės. Testavimo metu viena patelė, esant 25 ± 2 °C temperatūrai, 70 ± 5 % santykinei oro drėgmei, visiškoje tamsoje (kad būtų išvengta foto stimulo) rinkosi vieną iš medžiagų. Pasirinkimas vertintas po 1 val.

Lakiųjų komponentų surinkimas kietafaze mikroekstrakcija (SPME)

Norint sužinoti kokius lakiuosius komponentus išskiria paprastojo kviečio (*Triticum aestivum*) grūdai (arba toliau tiriamajame darbe – substratas) užkrėtus juos patogeniniu mikromicetu *Aspergillus flavus* (konidijų suspensija – 10^7 konidijų mL⁻¹), buvo atlikta kietafazė mikroekstrakcija. Bandytui 30 g užkrėtų paprastojo kviečio (*Triticum aestivum* L.) grūdų buvo auginami 3 paras stiklinėje kūginėje kolboje (tūris 70 mL). Taip pat paruošta ir kontrolinė grūdų grupė (purkšta distiliuotu vandeniu). Lakiųjų komponentų iš viršerdvės kietafazė mikroekstrakcija buvo atlikta strypeliu, padengtu 65 µm storio polidimetilsiloksano-divinilbenzeno (PDMS–DVB) sluoksniu (Supelco, JAV). Prieš atliekant kietafazę ekstrakciją, indas su grūdais, užkrėtais *Aspergillus flavus*, laikomas uždarytas 60 min., esant pastoviai 40 °C temperatūrai ir pastoviam apšvietimui. Kietafazė mikroekstrakcija iš viršerdvės atliekama 2 val.

Lakiųjų junginių surinkimas atliktas nuo mikromicetais užkrėtų grūdų, inkubuotų 3 – 7 paras. Surinktas lakiųjų komponentų mišinys buvo naudojamas DC–EAD tyrimuose.

Tiriant mikromicetais užkrėtų kviečių grūdų (substrato) išskiriamų antrinių metabolitų dinamiką, SPME vykdyta nuo 1, 3, 5, 8 ir 10 paras inkubuotų grūdų, užkrėtų *Aspergillus flavus*.

Dujų chromatografijos ir EAG registravimas vienu metu (DC-EAD)

Lakiųjų antrinių metabolitų analizė atlikta dujų chromatografu Clarus 500 (Perkin Elmer, JAV) su liepsnos jonizacijos detektoriumi (angl. FID – *Flame Ionization Detector*) ir DB–Wax kolonėle (ilgis 30 m, vidinis skersmuo 0,25 mm, sorbento sluoksnio storis 25 µm, Agilent Technologies, JAV). DC–EAD injektoriaus, detektoriaus ir EAD perdavimo linijos temperatūra buvo 240 °C. DC kolonėlės termostato temperatūra programuota tokiu būdu: pradinė 40 °C palaikyta 2 min., po to 5 °C/min greičiu pakelta iki 200 °C ir vėliau 10 °C/min greičiu pakelta iki 240 °C. Galutinė temperatūra buvo palaikoma dar 10 min. Dujos nešėjos – vandenilis, 1,5 mL/min.

Iš kolonėlės išėjusios medžiagos (santykiu 1:1) nukreipiamos į FID ir EAD. Vabzdžio antena panaudojama, kaip detektorius nustatantis biologiškai aktyvius lakiuosius komponentus.

Tyrimams naudotos 2–3 dienų amžiaus *P. interpunctella* patelių antenos. Antena buvo įstatoma į stiklinius kapiliarus, kurie užpildyti 0,9 % NaCl tirpalu (Ilsanta, Lietuva). Tuomet kapiliarai buvo įtvirtinti tarp dviejų sidabro (Ag) elektrodų. Antena buvo atsukama į pastovios oro srovės srautą, kuris praėjęs anglies filtrus ir oro drėkintuvą, tekėjo 5 m/s greičiu stikliniu vamzdeliu (Ø 12 mm). Tiriamo mišinio komponentai iš chromatografo patenka į švaraus sudrėkinto oro srautą, kuriuo apipučiama antena. Lakaus junginio sukeliamas elektrinis signalas sustiprinamas IDAC-232 (Syntech, Olandija). Lakus mišinio komponentas įvertintas kaip aktyvus, kai EAG sutampa su smaile chromatogramoje ir atsakymas pasikartoja mažiausiai 3 kartus į tą pačią medžiagą.

EAD aktyvių lakiųjų komponentų identifikacija

Grūdų išskiriamų lakiųjų komponentų, sukeliančių *P. interpunctella* EAD reakcijas, identifikacija atlikta dujų chromatografu GC 2010 su masių selektyviu detektoriumi GCMS-QP 2010 Plus (Shimadzu, Japonija).

EAD aktyvūs komponentai buvo identifikuojami palyginant jų sulaikymo laikus ir masių spektrus su autentiškų sintetinių standartų sulaikymo laikais, palyginant sulaikymo indeksus (RI) ir masių spektrus su referuojamais kompiuterinėje masių spektrų bibliotekoje (NIST08). Sintetiniai standartai buvo: nonanalis (grynumas 95 %, SIGMA-ALDRICH, Co., JAV), fenilacetaldehidas (grynumas 98 %, SIGMA-ALDRICH, Co., JAV), 4-oksoizoforonas (grynumas 98 %, SIGMA-ALDRICH, Co., JAV), 3-metil-1-butanolis (grynumas 98,5 %, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Vokietija) ir 1-heksanolis (grynumas ≥ 99 %, Fluka, Buchs, Šveicarija).

***Plodia interpunctella* EAG reakcijos į skirtingas aktyviųjų komponentų dozes**

Elektroantenogramų (EAG) registravimas buvo paruoštas remiantis Weissbecker *et al.* (2004) metodika. Ant filtrinio popieriaus juostelės (20mm × 5mm) (Whatman[®]1, Anglija) buvo užnešama tam tikra testuojamos medžiagos dozė: 1, 10, 100 arba 1000 µg. Nugarinus tirpiklį juostelė dedama į Pastero pipetę, pro kurią 48 mL/s greičiu įpučiamas oras (0,5 s laikotarpiu) į pastovų oro srautą, kuriuo nuolat apipučiama antena. Tokiu būdu testuojamos medžiagos pastovios oro srovės pagalba pasiekia vabzdžio anteną. Testuotos medžiagos: 1-heksanolis, nonanalis, fenilacetaldehidas, 4-oksoizoforonas ir 3-metil-1-butanolis. Kontrolei naudota 10 µL nugarinto heksano. EAG signalas registruotas Syntech programa „EAG2000“ (Olandija). Reakcijos dydis mV nustatytas pagal pikinę amplitudę.

TYRIMŲ REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

Sąveika grybas – vabzdys

Mikromicetų išskyrimas ir rūšių identifikavimas iš *Bupalus piniaria* vikšrų

Gamtoje surinkti pušinio sprindžiaus *B. piniaria* vikšrai auginti laboratorinėmis sąlygomis. Iš 56 žuvusių antro–trečio ūgio vikšrų buvo išskirtas mikromicetų kompleksas. Mikožės simptomus turėjo 86 % tirtųjų vabzdžių. Tyrimo metu, išskirti, užauginti ir identifiukuoti 36 mikromicetų kamienai, priklausantys 15 rūšių, 10 genčių (1 lentelė). Vertinant identifiukuotų mikromicetų įvairovę, apskaičiuotas Shannon-Wiener įvairovės indeksas – $H' = 1,98$

Duomenų apie mikromicetų išskyrimą ir identifikavimą iš *B. piniaria* vikšrų iki šiol nebuvo skelbta.

Spyglius graužiančių vabzdžių pušinio sprindžiaus, *Bupalus piniaria*, pušinio verpiko, *Dendrolimus pini* (Lepidoptera) ir paprastojo pušinio pjūklelio, *Diprion pini* (Hymenoptera) jautrumas entomopatogeniniams grybams

Grybų sukeltas mirtingumas *Bupalus piniaria* vikšrams

Lecanicillium psalliotae ir *Fusarium solani* poveikis *Bupalus piniaria* vikšrams. *Lecanicillium psalliotae* sukeltas mirtingumas per tyrimo laikotarpį (10 dienų) tesiekė $10,03 \pm 1,82$ % ir nesiskyrė nuo kontrolinės grupės, purkštos steriliu distiliuotu vandeniu, mirtingumo ($14,24 \pm 1,39$ %). Nežymus poveikis *B. piniaria* vikšrams gali būti paaiškintas tuo, kad *L. psalliotae* yra dirvos mikromicetas, efektyvus naikinant dirvožemyje gyvenančius organizmus, tokius kaip erkės (Pirali-Kheirabad *et al.*, 2007), nematodai (Gan *et al.*, 2007; Sung *et al.*, 2007). Šio grybo poveikis drugiams nėra žinomas. Mūsų tyrimo rezultatai rodo, kad tokio poveikio *B. piniaria* rūšiai nėra.

Fusarium solani konidijų suspensijos, ($1,4 \times 10^8$ konidijų mL⁻¹) efektyviau slopino vikšrų gyvybingumą. Entomopatogeninių mikromicetų virulentiškumas nebuvo aukštas: per 10 dienų nuo purškimo mirtingumas pasiekė 29,62–30,69 %.

Beauveria bassiana, *Metarhizium anisopliae* ir *Isaria farinosa* poveikis *Bupalus piniaria* vikšrams. Lietuvoje išskirtų mikromicetų *Beauveria bassiana* DPK-02-d, *Metarhizium anisopliae* DPK-06-d ir *Isaria farinosa* DPK-06-f-11 kamienų (konidijų suspensijų koncentracija – 1×10^8 konidijų mL⁻¹) poveikis trečio–ketvirto (L 3–4) ūgio pušinio sprindžio vikšrams buvo tirtas laboratorinėmis sąlygomis.

B. bassiana ir *M. anisopliae* patogenų konidijų suspensijos per tyrimo laikotarpį (21 diena) sukėlė 100 % tiriamųjų vabzdžių mirtingumą (1 pav.). Tačiau vikšrų mirtingumo dinamika abiem atvejais skiriasi. Per 12 dienų nuo purškimo buvo *B. bassiana* grupėje buvo pasiektas 100 % mirtingumas. Tuo tarpu *M. anisopliae* virulentiškumas taip pat pasiekė 100 %, tačiau per ilgesnį tyrimo laikotarpį – 18 dienų (2 lentelė). Kontrolės mirtingumas per visą tyrimo laikotarpį sudarė $6,32 \pm 1,21\%$.

Gauti rezultatai leidžia teigti, kad *B. bassiana* ir *M. anisopliae* gali būti efektyvūs entomopatogenai *B. piniaria* vikšrams. Mikromicetų patogeniškumui įvertinti apskaičiuotos LT_{50} ir LT_{100} reikšmės (laikas, per kurį sukeliama 50 ir 100 % tiriamųjų vabzdžių mirtingumą). *B. bassiana* konidijų suspensijomis paveiktų vikšrų LT_{50} buvo 8 dienos, o *M. anisopliae* – 11 dienų. Kalbant apie LT_{100} *B. bassiana* virulentiškumas buvo patikimai didesnis už *M. anisopliae* ir sudarė 12 ir 18 dienų atitinkamai (2 lentelė).

Nedidelis *B. piniaria* vikšrų mirtingumas nustatytas naudojant *I. farinosa* konidijų suspensiją (koncentracija 1×10^8 konidijų mL^{-1}). Praėjus 7 dienoms po pirmojo purškimo *I. farinosa* konidijų suspensija vikšrų mirtingumas siekė $20,01 \pm 3,42\%$ ir mažai skyrėsi nuo kontrolinės grupės, purkštos steriliu distiliuotu vandeniu ($19,12 \pm 3,16\%$ mirtingumas). Vikšrai po 7 dienų nuo pirmojo purškimo padalinti į 2 grupes: pirmosios grupės palikti toliau stebėti mirtingumą, antrosios – pakartotinai paveikti konidijų suspensija. Pirmos grupės mirtingumas nusistovėjo ir nekito iki bandymo pabaigos. Antros grupės mirtingumas pakilo iki $56,67 \pm 6,62\%$ ir patikimai skyrėsi nuo kontrolinės bei pirmo purškimo grupių ($P < 0,01$, $Z = 2,46$). Gauti rezultatai leidžia teigti, kad *I. farinosa* nėra pakankamai efektyvus kaip entomopatogenas *B. piniaria* vikšrams.

Grybų sukeltas mirtingumas *Diprion pini* lervoms

Beauveria bassiana (DPK-02-d kamienas) efektyviai slopina trečio–ketvirto ūgio *Diprion pini* lervų gyvybingumą. Pirmųjų lervų žuvimas stebėtas šeštą dieną nuo purškimo *B. bassiana* konidijų suspensija (1×10^8 konidijų mL^{-1}) (2 pav.). *D. pini* lervų didžiausias mirtingumas stebimas pirmas dvi savaites nuo purškimo pradžios. *B. bassiana* konidijų suspensijomis paveiktų lervų mirtingumas nusistovėjo per 17 dienų ir siekė $85,61 \pm 3,38\%$. Kontrolinės grupės mirtingumas per 18 dienų nuo purškimo pradžios tesudarė $10,03 \pm 1,42\%$. Skirtumai tarp kontrolinės ir *B. bassiana* grupių buvo patikimi ($P < 0,002$, $Z = 3,30$).

Grybų sukeltas mirtingumas *Dendrolimus pini* vikšrams

Paveikus *Dendrolimus pini* trečio–ketvirto ūgio vikšrų grupes konidijų suspensijomis (1×10^8 konidijų mL^{-1}), pirmųjų vikšrų žuvimas sukeliama trečią dieną (3 pav.). Didžiausias mirtingumas pasiekiamas per 2 savaites ir sudaro $60,02 \pm 6,24$. Vėliau mirtingumas nusistovi ir

kinta nežymiai ($63,33 \pm 5,86$ %). Kontrolinėje (purkšta steriliu distiliuotu vandeniu) pirmieji vikšrų žuvimai stebėti tik 9-tą dieną nuo eksperimento pradžios. Bendras kontrolės mirtingumas per visą tyrimo laikotarpį sudarė $2,21 \pm 0,25$ %. Skirtumai tarp kontrolinės ir *B. bassiana* grupių buvo patikimi ir sudarė $P < 0,001$ ($Z = -4,13$).

Mažesnę pušinio verpiko mirtingumą (lyginant su pušiniu sprindžiumi ir paprastuoju pušiniu pjūkleliu) galėjo lemti vikšro kutikulės savybės (vikšro kūnas padengtas tankiais plaukeliais, kurie gali apsunkinti EPG sporų prisitvirtinimą), netinkamai pasirinktas vikšrų ūgis (gal L 3–4 ūgio vikšrai nejautrūs entomopatogeniniams grybams) arba netinkamai pasirinktas entomopatogenas. Todėl atlikti papildomi tyrimai entomopatogeniniais mikromicetais (*B. bassiana* ir *M. anisopliae*) krečiant skirtingas *Dendrolimus pini* vystymosi stadijas (pav. 4).

Didžiausią mirtingumą visose amžiaus grupėse sukelia *B. bassiana*: L1-2 – $33,33 \pm 2,85$ %; L3-4 – $63,33 \pm 5,86$ %; L5-6 – $35,55 \pm 3,51$ %. Tuo tarpu grybo *M. anisopliae* vabzdžiams sukeltas mirtingumas buvo žemas. Jautriausi šiam patogeniui buvo L1-2 vikšrai, jų mirtingumas sudarė $16,47 \pm 1,78$ %. Augant vikšrų ūgiui, jautrumas patogeniui mažėja: L3-4 mirtingumas siekia $8,89 \pm 0,85$ %, o L5-6 – 0 %, t. y. mirtingumas nesukeliamas. Kontrolinėje grupėje, nedidelis vikšrų mirtingumas stebimas tik L1-2 ir L3-4 ūgio grupėse ir sudaro $6,67 \pm 0,62$ ir $2,21 \pm 0,25$ % atitinkamai. Gauti duomenys, leidžia teigti, kad visi *Dendrolimus pini* vikšrų ūgiai jautriausi *B. bassiana* konidijų suspensijoms.

Entomopatogeninių grybų poveikio priklausomybė nuo preimaginio vystymosi stadijos, *Dendrolimus pini* pavyzdžiu

Nustatyta, kad tik *B. bassiana* efektyviai slopino kiaušinėlių gyvybingumą ir sukėlė $37,37 \pm 3,74$ % mirtingumą ($Z = -2,75$, $P = 0,006$) (5 A pav.). Tuo tarpu kontrolėje ir *M. anisopliae* kiaušinėlių grupėse mirtingumas buvo neaukštas ir atitinkamai neišsiritusių kiaušinėlių dalis siekė $22,23 \pm 5,33$ % ir $19,33 \pm 5,69$ %.

Toliau stebimas vikšrų, išsiritusių iš likusių (gyvybingų) kiaušinėlių, jautrumas entomopatogeniniams grybams (besiritantys vikšrai papildomai nebuvo purškiami mikromicetų suspensijomis) (5 B pav.). Kontrolėje naujai išsiritusių vikšrų mirtingumas sudarė $1,43 \pm 0,13$ %. Tuo tarpu, išsiritusių vikšrų mirtingumas *B. bassiana* ir *M. anisopliae* grupėse atitinkamai sudarė $91,06 \pm 6,02$ % ir 100 %.

EPG gali parazituoti visas vabzdžio vystymosi stadijas, tame tarpe ir kiaušinėlius (Hajek, St. Leger, 1994). Vienų autorių teigimu, kiaušinėliai, lyginant su kitomis vabzdžio vystymosi stadijomis yra mažiausiai jautrūs EPG (Gopalakrishanan, Narrayanan, 1989), kitų tyrimai rodo, kad kiaušinėliai labai jautrūs EPG infekcijoms (Lezama-Gutierrez *et al.*, 1996; Anand, Tiwary, 2009). Gauti duomenys rodo, kad paveikus entomopatogenais kiaušinėlius, pastarųjų

mirtingumas, nors ir patikimai skiriasi nuo kontrolės, tačiau išlieka nedidelis ir sudaro $37,37 \pm 3,74$ % (*B. bassiana* sukeltas mirtingumas). Sąlyginai nedidelis poveikis gali būti apspręstas kiaušinėlių dengiančio vaškinio sluoksnio ir/ar choriono (kiaušinėlio dangalo) cheminių savybių.

Sąveika vabzdys – grybas

***Plodia interpunctella* gebėjimo atpažinti grybais užkrėstą substratą tyrimas**

***Plodia interpunctella* kiaušinėlių dėjimas ant neužkrėsto ir *Aspergillus flavus* užkrėsto substrato**

Remiantis literatūros duomenimis šiam tyrimų etapui buvo pasirinktas vabzdžiams, gyvūnams ir žmogui patogeninis, sandėliavimo sąlygomis plintantis grūdų kontaminantas – *Aspergillus flavus* Link: Fries (MUCL 11945) (Lugauskas, 2006; Mankevičienė *et al.*, 2006).

Buvo atlikti kontroliniai bandymai – patelė turėjo galimybę kiaušinėlių dėjimui pasirinkti kontrolinę lėkštelę su steriliais grūdais arba tuščią – be substrato. Po 3 parų nustatyta, kad patelės statistiškai patikimai ($t = 5,97$, $P < 0,001$) rinkosi kontrolinę lėkštelę su kviečių grūdais ($79,27 \pm 4,91$ %) nei tuščią (be substrato) ($20,73 \pm 4,43$ %). (6 pav. A). Leidus *P. interpunctella* rinktis tarp sterilių (kontrolė) ir *A. flavus* užkrėstų grūdų, patelės patikimai daugiau kiaušinėlių dėjo kontrolėje ($62,45 \pm 4,43$ %) nei paveiktoje patogeniniais mikromicetais pusėje ($37,55 \pm 4,43$ %) ($t = 2,82$, $P = 0,008$) (6 pav. B).

Vertinant kiaušinėlių dėjimą, atsižvelgta į dinamiką. Per pirmas dvi dienas bendra sudėtų kiaušinėlių dalis kontrolinėje ir *A. flavus* pusėje buvo beveik vienoda ir statistiškai patikimai nesiskyrė $P > 0,05$ (7 pav. A). Trečią dieną nuo tyrimo pradžios bendra sudėtų kiaušinėlių dalis kontrolėje $62,45 \pm 4,43$ % buvo statistiškai patikimai didesnė nei ant substrato užkrėsto *A. flavus* $37,55 \pm 4,43$ % ($t = 2,82$, $P = 0,008$) (7 pav. A).

Vertinant kiaušinėlių dėjimą vertinome ir sudėtų kiaušinėlių išsidėstymą erdvėje: tiesiai ant substrato (grūdų) ir šalia substrato (ant dėžutės dugno, sienelių ar dangčio). Patelės per visą tyrimo laikotarpį patikimai daugiau kiaušinėlius dėjo tiesiai ant substrato (7 pav. B): pirmą dieną kiaušinėlių dalis kontrolėje ir substrate su *A. flavus* sudarė $14,43 \pm 3,67$ ir $4,66 \pm 1,47$ ($t = 2,62$, $P = 0,013$); antrą dieną atitinkamai $20,20 \pm 3,76$ % ir $6,35 \pm 1,63$ % ($t = 3,66$, $P = 0,0008$); trečią dieną skirtumas tarp abiejų pusių išaugo – kontrolėje sudėtų kiaušinėlių dalis sudarė $45,43 \pm 5,18$ %, o grybu *A. flavus* užkrėstoje pusėje – $7,65 \pm 1,75$ % ($t = 7,02$, $P < 0,0001$).

Per visą tyrimo laikotarpį erdvėje šalia substrato daugiau kiaušinėlių buvo sudėta *A. flavus* užkrėstoje substrato pusėje (7 pav. C): pirmą dieną kiaušinėlių dalis kontrolėje ir *A. flavus* pusėje sudarė $6,11 \pm 1,84$ ir $15,58 \pm 3,96$ ($t = -2,24$, $P = 0,032$), antrą dieną atitinkamai $8,11 \pm 1,91$ % ir $20,72 \pm 4,09$ % ($t = -2,98$, $P = 0,005$), trečią dieną sudėtų kiaušinėlių dalis kontrolėje

sudarė $17,67 \pm 3,91$ %, o *A. flavus* pusėje – $29,81 \pm 4,32$ %, tačiau patikimų skirtumų tarp grupių nebuvo ($t = 1,99$, $P = 0,054$).

Gauti rezultatai leidžia teigti, kad apvaisintos *P. interpunctella* patelės kiaušinėlių dėjimui renkasi mikromicetais neužkrėstą substratą tik trečią dieną po užkrėtimo grybu. Tuo metu besivystydamas mikromicetas priaugina tokį biomasės kiekį, jog substratas tampa nepatrauklus vabzdžiams. Tuo tarpu *A. flavus* užkrėstuose grūduose, stebimas kiaušinėlių dėjimas šalia substrato.

***Plodia interpunctella* uoslės reakcijos į neužkrėstą ir *Aspergillus flavus* grybais užkrėstą substratą**

Siekiant nustatyti kokie lakūs junginiai dalyvauja modelinei vabzdžių rūšiai, *P. interpunctella*, atpažįstant neužkrėstus ir mikromicetais užkrėstus substratus, taikant SPME metodą surinkti ir DC-EAD bei DC-MS metodais nustatyti neužkrėstų ir užkrėstų grūdų produkuojami lakūs antriniai metabolitai, sukelianys vabzdžio antenų receptorių reakcijas.

Buvo nustatyta, kad *P. interpunctella* patelių antenų receptoriai reaguoja į 4 lakius antrinius metabolitus, išskiriamus neužkrėstų grūdų (8 pav.). Palyginus EAD aktyvių komponentų sulaikymo indeksus ir masių spektrus su referuojamais kompiuterinėje masių spektrų bibliotekoje (NIST08), bei autentiškų sintetinių standartų sulaikymo trukme, junginiai buvo identifikuoti kaip: 1-heksanolis, nonanolis, fenilacetaldehidas ir 4-oksoizoforonas (9 pav.).

Tiriant grybu – *A. flavus* užkrėsto substrato produkuojamus lakius antrinius metabolitus, nustatyta, kad pasikartojančius *P. interpunctella* patelių antenų receptorių atsakus visais atvejais sukelia tik vienas komponentas. Junginys identifikuotas kaip 3-metil-1-butanolis. Šiame tyrimų etape galime daryti prielaidą, kad šis komponentas galėtų būti vienas iš junginių, pagal kuriuos vabzdžiai atpažįsta mikromicetais užterštus grūdus.

Iš grybais užkrėsto substrato išsiskiriančio lakaus komponento dinamika

Trečią dieną po užkrėtimo *A. flavus* konidijų suspensija (1×10^7 konidijų mL⁻¹) grūdų viršerdyje jau detektuojama $0,15 \pm 0,04$ µg/g substrato šio komponento. Penktą dieną po grūdų užkrėtimo mikromicetu 3-metil-1-butanolio kiekis lakių antrinių metabolitų emisijoje labai išauga ir siekia $16,62 \pm 1,41$ µg/g substrato ir laikosi iki dešimtos dienos po užkrėtimo ($16,50 \pm 0,76$ µg/g substrato).

Mikromicetu užkrėstuose grūduose lakių medžiagų, kurios galėtų būti signalinės atpažįstant *P. interpunctella* patelėms tinkamą substratą kiaušinių dėjimui, mažėja ir atsiranda lakios medžiagos (tokios kaip 3-metil-1-butanolis), kurios galėtų signalizuoti apie netinkamą substratą.

***Plodia interpunctella* elgesinės ir uoslės receptorių reakcijos į grybais užkrėstą substratą**

***Plodia interpunctella* uoslės jautrumo biologiškai aktyvioms medžiagoms lyginamoji analizė**

EAG metodu patikrintas iš oro surinktų paprastojo kviečio *Triticum aestivum* pavienių lakių medžiagų skirtingų dozių poveikis *P. interpunctella* uoslės receptoriams (12 pav.). Visos EAG reakcijų amplitudės į skirtingas 1-heksanolio, fenilacetaldehido ir 4-oksoizoforono dozes statistiškai patikimai skyrėsi nuo kontrolės (heksano). Visoms šioms nepažeisto grūdo lakiosioms medžiagoms slenkstinė dozė sukianti patikimus (t – testas, $P < 0,05$) EAG atsakus, buvo 1 μg . Tik nonanalio sukeltų EAG vidutinė amplitudė statistiškai patikimai skyrėsi nuo kontroliniu stimulu sukeltos EAG vidutinės amplitudės esant didesnėms, t. y., 100 ir 1000 μg dozėms ir atitinkamai sudarė $0,046 \pm 0,004$ mV ($t = 2,63$, $P = 0,016$) ir $0,069 \pm 0,009$ mV ($t = 6,52$, $P < 0,0001$). Didžiausius antenų reakcijų atsakus sukėlė 1000 μg 1-heksanolio dozė $0,16 \pm 0,013$ mV.

Registruotos *P. interpunctella* patelių antenų reakcijos į sintetinės *A. flavus* pažeistų grūdų skleidžiamos lakios medžiagos 3-metil-1-butanolio dozes (13 pav.). 1 μg sukeltų reakcijų vidutinė amplitudė buvo $0,028 \pm 0,005$ mV ir patikimai skyrėsi nuo kontrolės $0,021 \pm 0,005$ mV ($t = 2,83$, $P = 0,011$). 10 μg tiriamosios medžiagos dozės sukelta suminė EAG reakcija $0,037 \pm 0,006$ mV patikimai skyrėsi nuo kontrolės (heksano) ($t = 6,19$, $P < 0,0001$). Didžiausios (100 ir 1000 μg) 3-metil-1-butanolio dozių sukeltos antenų reakcijos taip pat patikimai skyrėsi nuo kontrolės: 100 μg vidutinė reakcijos amplitudė buvo $0,053 \pm 0,007$ mV ($t = 7,68$, $P < 0,0001$), 1000 μg – $0,081 \pm 0,008$ mV ($t = 9,75$, $P < 0,0001$).

Substrato skleidžiamų lakiųjų medžiagų patrauklumo vertinimas dviejų pasirinkimų olfaktometru

Mažas 1-heksanolio dozes (0,1 ir 1 μg) patelės rinkosi statistiškai patikimai dažniau nei kontrolę (heksaną). Nonanalis patrauklus vabzdžiams esant 0,01 μg dozei. Fenilacetaldehidas nebuvo patrauklus patelėms ir lyginant su kontrole patikimų skirtumų nei vienoje dozėje nesudarė (G – testas, $P > 0,05$). Visos tiriamosios 4-oksoizoforono dozės patikimai skyrėsi nuo kontrolės, tačiau aktyvumas buvo repelentiškas, t.y. patelės statistiškai patikimai dažniau rinkosi heksaną (3 lentelė).

Gauti rezultatai leidžia teigti, kad 1-heksanolis buvo patraukliausias apvaisintoms *P. interpunctella* patelėms. 1-Heksanolis ir nonanalis – priskiriami „žaliesiems lapo komponentams“ (Ruther *et al.*, 2002; Uechi *et al.*, 2007). Žinoma, kad nonanalis yra atraktantas kiaušinėlių dėjimui *P. interpunctella*, giminingai sandėlių kenkėjų rūšiai *Ephestia cautella* (Walker) (Lepidoptera: Pyralidae) bei daugeliui kitų drugių rūšių (Uechi *et al.*, 2007, Olsson *et*

al., 2005). Uechi *et al.* (2007) atlikti tyrimai parodė, kad nonanalis atraktyvus apvaisintoms *P. interpunctella* patelėms tik mažomis dozėmis 0,1 ir 0,01 µg. 1-Heksanolis nebuvo žinomas kaip atraktantas drugiams (Lepidoptera), tačiau medžiagos atraktyvumas aprašytas kelioms vabzdžių rūšims iš Coleoptera (Ruther *et al.*, 2002; Matsumoto, 1962), Diptera (Cruz-López *et al.*, 2006), Homoptera (Mu *et al.*, 2012) būrių.

Fenilacetaldehidas ir 4-oksoizoforonas – priskiriami „žiedų lakiesiems komponentams“ (de Vega *et al.*, 2014, Olsson *et al.*, 2005), nes šių medžiagų gausiai aptinkama augalams žydint. Abi medžiagos žinomos kaip atraktantai žiedus lankantiems vabzdžiams. Tačiau mūsų tiriamajame darbe ši medžiaga (tirtomis dozėmis 0,1-100 µg) nebuvo patraukli pietinio ugniuko patelėms. Tai leidžia kelti hipotezę, kad medžiaga gali būti atraktyvi mažesnėmis dozėmis. Tuo tarpu 4-oksoizoforonas tiriamajame darbe buvo repelentiškas kenkėjams. Literatūroje nėra duomenų apie šios pavienės medžiagos patrauklumą *P. interpunctella*.

Tiriant 3-metil-1-butanolio patrauklumą apvaisintoms *P. interpunctella* patelėms, buvo nustatyta, kad didžiausia tirta 100 µg dozė atbaidė vabzdžius ir jie statistiškai patikimiau rinkosi heksaną (kontrolę) ($G = 4,94$, $P = 0,026$) (14 pav.). 10 µg dozė nesiskyrė nuo kontrolės ($G = 0,037$, $P = 0,847$). Mažėjant tiriamosios medžiagos dozei didėjo jos patrauklumas vabzdžiui. 1 ir 0,1 µg dozės patelės rinkosi patikimai dažniau nei kontrolę.

Kaip *A. flavus* skleidžiamas lakusis komponentas, 3-metil-1-butanolis žinomas jau senai (Kamiński *et al.*, 1972; Tuma *et al.*, 1989; Sunesson *et al.*, 1995) Tačiau pavienės lakiosios medžiagos atraktyvumas pietinio ugniuko patelėms (ir kitiems drugiams) iki šiol nebuvo tirtas. 3-Metil-1-butanolis gali būti svarbus markeris atpažįstant užterštus grūdus ir/ar jų produktus panaudojant vabzdžio antenų receptorių elektrofiziologinius atsakus kaip biosensorių.

IŠVADOS:

1. Gamtinėje populiacijoje iš žuvusių pušinio sprindžiaus, *Bupalus piniaria* (Lepidoptera) individų identifikuotas 15 grybų rūšių kompleksas, 10 iš jų – entomopatogeniniai; gausiausios rūšys – *Lecanicillium psalliotae* (34,61 %) ir *Fusarium solani* (24,33 %). Shannon–Wiener įvairovės indeksas $H' = 1,98$.
2. Lervų mirtingumas veikiant grybams, priklauso nuo spyglius graužiančio vabzdžio rūšies: *Bupalus piniaria* vikšrai yra jautriausi (didžiausias mirtingumas per trumpiausią laiką trečio-ketvirto ūgio lervas paveikus konidijų koncentracija 10^8 mL^{-1}) *Beauveria bassiana* grybui – 100 % mirtingumas per 12 dienų, *Metarhizium anisopliae* – 100 % mirtingumas per 18 d.; *Diprion pini* lervoms *B. bassiana* grybų sukeltas mirtingumas siekia $85,61 \pm 3,38$ % per 18 d.; *Dendrolimus pini* vikšrai mažiausiai jautrūs grybams: grybų *B. bassiana* sukeltas mirtingumas – $63,33 \pm 5,86$ %, *M. anisopliae* – $8,89 \pm 0,85$ % per 18 d.
3. Jautrumas entomopatogeniniams grybams priklauso nuo vabzdžio vystymosi stadijos: kiaušinėlio stadijoje *Dendrolimus pini* didžiausią mirtingumą sukelia *B. bassiana* ($37,37 \pm 3,74$ % kiaušinėlių ir $91,06 \pm 6,02$ % vikšrų, išsiritusių iš likusių kiaušinėlių), *M. anisopliae* ($19,33 \pm 5,69$ % kiaušinėlių ir 100 % vikšrų, išsiritusių iš likusių kiaušinėlių); lervos stadijoje didžiausią mirtingumą sukelia *B. bassiana* (L1-2 – $33,33 \pm 2,85$ %; L3-4 – $63,33 \pm 5,86$ %; L5-6 – $35,55 \pm 3,51$ %), mažiausią – *M. anisopliae* (L1-2 – $16,47 \pm 1,78$ %; L3-4 – $8,89 \pm 0,85$ %, L5-6 – 0 %).
4. Grybais užkrėstą substratą *Plodia interpunctella* (Lepidoptera) patelės atpažįsta: esant pasirinkimui statistiškai patikimai daugiau kiaušinėlių deda grybais neužkrėstame – $62,45 \pm 4,43$ % nei užkrėstame substrate – $37,55 \pm 4,43$ % ($t = 2,82$, $P = 0,008$).
5. *Plodia interpunctella* patelės užuodžia: kiaušinėliams tinkamo dėti substrato 4 lakiuosius junginius – 1-heksanolį, nonanalį, fenilacetaldehidą, 4-oksoizoforoną; bei grybais užkrėstame substrate – 3-metil-1-butanolį. Pagal lakiųjų junginių pokyčius *Plodia interpunctella* patelės gali skirti kiaušinėlių dėjimui tinkamą ir netinkamą (užkrėstą grybu) substratą.
6. *Plodia interpunctella* apvaisintos patelės į išskirtus lakiuosius junginius reaguoja skirtingai: 1-heksanolis (1 ir 0,1 μg), nonanalis (0,1 μg) bei mažos (1 ir 0,1 μg) 3-metil-1-butanolio dozės joms yra atraktyvios; didelės (100 μg) pastarojo junginio dozės – repelentiškos. 3-metil-1-butanolis gali būti svarbus markeris atpažįstant substratuose esančius grybus.

REFERENCES

LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Alenikovas M., Gedminas A., 2010. Aviapurškimo poveikio entomofaunai ir aplinkai vertinimas ir visuomenės informavimas. Lietuvos agrarinių ir miškų mokslų centro filialas, Miškų institutas, 1–35.
2. Anand R., Tiwary B. N., 2009. Pathogenicity of entomopathogenic fungi to eggs and larvae of *Spodoptera litura*, the common cutworm. *Biocontrol Science and Technology*, 19(9): 919–929.
3. Augustyniuk-Kram A., Kram K. J., 2012. Entomopathogenic fungi as an important natural regulator of insect outbreaks in forests (review). In: Forest Ecosystems – More than Just Trees (Blanco J. A., Lo Y-H., eds.). Shanghai: InTech Publishing, pp. 265–293.
4. Belova O., Milišauskas Z., Padaiga V., Valenta V., Vasiliauskas A., Zolubas P., Žiogas A., 2000. Miško apsaugos vadovas. Kaunas.
5. Cedervind J., Pettersson M., Långström B., 2003. Attack dynamics of the pine shoot beetle, *Tomicus piniperda* (Col.; Scolytinae) in Scots pine stands defoliated by *Bupalus piniaria* (Lep.; Geometridae). *Agricultural and Forest Entomology*, 5(3): 253–261.
6. Ciesla W. M., 2004. EXFOR Database Pest Report: *Dendrolimus pini*. USDA Forest Service.
7. Cox C., 1996. Insecticide factsheet: Cypermethrin. *Journal of Pesticide Reform*, 16(2): 15–20.
8. Cruz-López L., Malo E. A., Toledo J., Virgen A., Del Mazo A., Rojas J. C., 2006. A new potential attractant for *Anastrepha obliqua* from *Spondias mombin* fruits. *Journal of Chemical Ecology*, 32(2): 351–365.
9. Dahlsten D. L., Mills N. J., 1999. Biological control of forest insects. In: Handbook of biological control (Bellows T. S., Fisher T. W., Caltagirone L. E., Dahlsten D. L., Gordh G., Huffaker C. B., eds.). Academic Press, London, pp. 761–788.
10. de Vega C., Herreraa C. M., Dotterl S., 2014. Floral volatiles play a key role in specialized ant pollination. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*, 16: 32–42.
11. Domsch K. H., Gams W. P., Anderson T. Compendium of soil fungi. Academic Press, London, 2007, pp. 860.
12. Fisher N. L., Buergess L. W., Toussoun T. A., Nelson P. E., 1982. Carnation leaves as a substrate and for preserving cultures of *Fusarium* species. *Phytopathology*, 72: 151–153.
13. Freimoser F. M., Screen S., Bagga S., Hu G., St Leger R. J., 2003. Expressed sequence tag (EST) analysis of two subspecies of *Metarhizium anisopliae* reveals a plethora of secreted proteins with potential activity in insect hosts. *Microbiology* 149: 239–247.
14. Gan Z., Yang J., Tao N., Liang L., Mi O., Li M., Zhang K.-O., 2007. Cloning of the gene *Lecanicillium psalliotae* chitinase Lpch1 and identification of its potential role in the biocontrol of root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 76(6): 1309–1317.
15. Gedminas A., Vaivada S., Lynikienė J., 2004. Spyglius graužiančių kenkėjų įtaka pušų radikaliajam prieaugiui. *Ekologija*, 1: 16–20.
16. Glowacka B., 1996. The Control of the Nun Moth with the Use of *Bacillus thuringiensis* in Poland. Proceedings of the First Joint Meeting. Bulletin-OILB-SROP, pp. 57–60.
17. Gopalakrishanan C., Narayanan K., 1989. Studies on the entomopathogenic susceptibility of *Heliothis armigera* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) to the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* var *anisopliae*. *Tulloch. Entomol.*, 14: 191–198.
18. Hajek A. E., St. Leger R. J., 1994. Interactions between fungal pathogens and insect host. *Annual Review of Entomology*, 39: 293–322.
19. Haynes K. J., Allstadt A. J., Klimetzek D., 2014. Forest defoliator outbreaks under climate change: effects on the frequency and severity of outbreaks of five pine insect pests. *Global Change Biology*, pp. 1–15, doi: 10.1111.
20. Kamiński E., Libbey L. M., Stawicki S., Wasowicz E., 1972. Identification of the predominant volatile compounds produced by *Aspergillus flavus*. *Applied Microbiology*, 24(5): 721–6.

21. Kiffer E., Morelet M., 1997. The Deuteromycetes. Mitosporic Fungi. Classification and generic keys. USA: Science Publishers Inc., pp. 1–272.
22. Lezama-Gutierrez R., Alatorre-Rosas R., Boijalil-Jaber L. F., Molina-Ochoa J., Arenas-Vargas M., Gonzalez-Ramirez M., Rebolledo-Dominguez O., 1996. Virulence of five entomopathogenic fungi (Hyphomycetes) against *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) eggs and neonate larvae. *Vedalia*, 3: 35–39.
23. Lindelow A., 1997. Outbreak of pine looper moth in Sweden. *Tallamataruroft pa Uokensas. Vaxtyddsnotiser*, 5: 100–103.
24. Lugauskas A., 2006. Mikotoksinų kaupimosi maiste dėsningumai ir prevencinių saugos priemonių paieška. *Maisto chemija ir technologija*, 40(2): 16–27.
25. Lynikienė J., Gedminas A., Vaivada S., 2004a. Spyglius graužiančių kenkėjų įtaka pušų sanitarinei būklei. *Ekologija*, 3: 38–42.
26. Lynikienė J., Gedminas A., Vaivada S., 2004b. Biologinių ir cheminių insekticidų poveikis pušynų paklotės nariuotakojų gausai pušinio pelėdgalvio (*Panolis flammea* Shiff.) židiniuose. *Miškininkystė*, 1: 16–20.
27. Mankevičienė A., Dabkevičius Z., Mačkinitė R., Cesevičienė J., 2006. Žieminių kviečių grūdų užterštumo mikromicetais ir mikotoksinais priklausomumas nuo tręšimo lygio. *Žemdirbystė*, 93(3): 131–140.
28. Matsumoto Y., 1962. A dual effect of coumarin, olfactory attraction and feeding inhibition on the vegetable weevil adult, in relation to the uneatability of sweet clover leaves. *Applied Entomology and Zoology*, 6: 141–149.
29. Mu D., Cui L., Ge J., Wang M.-X., Liu L.-F., Yu X.-P., Zhang Q.-H., Han B.-Y., 2012. Behavioral responses for evaluating the attractiveness of specific tea shoot volatiles to the tea green leafhopper, *Empoasca vitis*. *Insect Science*, 19: 229–238.
30. Nelson P. E., Toussoun T. A., Marasas W. F. O., 1983. *Fusarium* species: an illustrated manual for identification. The Pennsylvania State University Press, University Park, pp. 193.
31. Olsson P.-O. C., Anderbrant O., Löfstedt C., Borg-Karlson A.-K., Liblikas I., 2005. Electrophysiological and behavioral response to chocolate volatiles in both sexes of the pyralid moths *Ephestia cautella* and *Plodia interpunctella*. *Journal of Chemical Ecology*, 31: 2947–2961.
32. Phillips T. W., Strand M. R., 1994. Larval secretions and food odors affect orientation in female *Plodia-Interpunctella*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 71: 185–192.
33. Pirali-Kheirabadi K., Haddadzadek H., Razzaghi-Abyaneh M., Bokaie S., Zare R., Ghazavi M., Ahams-ghahfarokhi M., 2007. Biological control of *Rhipicephallus* (Boophilus) *annulatus* by different strains of *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana* and *Lecanicillium psalliotae* fungi. *Parasitology Research*, 100(6): 1297–1302.
34. Ruther J., Reinecke A., Hilker M., 2002. Plant volatiles in the sexual communication of *Melolontha hippocastani*: response towards time-dependent bouquets and novel function of (Z)-3-hexen-1-ol as a sexual kairomone. *Ecological Entomology*, 27: 76–83.
35. Sambaraju K. R., Phillips T. W., 2008. Effects of physical and chemical factors on oviposition by *Plodia interpunctella* (Lepidoptera: Pyralidae). *Annals of Entomological Society of America*, 101(5): 955–963.
36. Samson R. A., 1974. *Paecilomyces* and some allied Hyphomycetes. *Studies in Mycology*, 6: 1–119.
37. Sierpinska A., 1998. Towards an Integrated Management of *Dendrolimus pini* L.. In: Population Dynamics Impacts, and Integrated Management of Forest Defoliating Insects (McManus M. I., Liebhold A. M., eds.). USDA Forest Service General Technical Report NE-247, Banská Stianica, Slovak Republic, pp. 129–142.
38. Sihag R. C., 2011. Use of biopesticides for the control of insect pests. Department of Zoology & Agriculture, CCS Haryana Agricultural University, 1–42.
39. Straw N. A., 1996. The impact of pine looper moth, *Bupalus piniaria* L. (Lepidoptera; Geometridae) on the growth of Scots pine in Tentsmuir Forest, Scotland. *Forest Ecology and Management*, 87(1–3): 209–232.
40. Straw N. A., Armour H. L., Day K. R., 2002. The financial costs of defoliation of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) by pine looper moth (*Bupalus piniaria* L.). *Forestry*, 75: 525–536.

41. Sunesson A-L., Vaes W. H. J., Nilsson C-A., Blomquist G., Andersson B., Carlson R., 1995. Identification of volatile metabolites from five fungal species cultivated on two media. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(8): 2911–2918.
42. Sung G. H., Zare R., Spatafora J., Gams W., 2001. A revision of *Verticillium* sect. *Prostrata*. II. Generic delimitation using ribosomal DNA sequences. *Nova Hedwigia*, 72: 29–46.
43. Sung G. H., Hywell-Jones N. L., Sung J.-M., Luangsa-Ard J. J., Shreshtha B., Spatafora J. W., 2007. Phylogenetic classification of *Cordyceps* and the *Clavicipitaceous* fungi. *Studies in Mycology*, 57: 55–59.
44. Tuma D., Sinha R. N., Muir W. E., Abramson D., 1989. Odor volatiles associated with microflora in damp ventilated and non-ventilated bin-stored bulk wheat. *International Journal of Food Microbiology*, 8(2): 103–119.
45. Uechi K., Matsuyama S., Suzuki T., 2007. Oviposition attractants for *Plodia interpunctella* (Hübner) (Lepidoptera: Pyralidae) in the volatiles of whole wheat flour. *Journal of Stored Products Research*, 43: 193–201.
46. Weissbecker B., Holighaus G., Schütz S., 2004. Gas chromatography with parallel mass spectrometric and electroantennographic detection – analysis of wood odour by direct coupling of insect olfaction and mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1056: 209–216.
47. Woreta D., Malinowski. H., 1998. Activity of several contact insecticides against selected forest insect pest in Poland. In: Proceedings: Population Dynamics, Impacts, and Integrated Management of Forest Defoliating Insects (McManus M. L., Liebhold A. M., eds.). USDA Forest Service General Technical Report NE-247, Warsaw, Poland, pp. 317–321.
48. Zimmermann G., 2008. The entomopathogenic fungi *Isaria farinosa* (formerly *Paecilomyces farinosus*) and the *Isaria fumosorosea* species complex (formely *Paecilomyces fumosoroseus*): biology, ecology and use in biological control. *Biological Science and Technology*, 18(9): 865–901.
49. Žiogas A. Miško entomologija. Kaunas, 1997.

LIST OF PUBLICATIONS ON THE DISSERTATION TOPIC

MOKSLINĖS PUBLIKACIJOS DISERTACIJOS TEMA

1. Pečiulytė D., Nedveckytė I., Dirginčiūtė-Volodkienė V., Būda V., 2010. Pine defoliator *Bupalus piniaria* (L.) (Lepidoptera: Geometridae) and its entomopathogenic fungi. 1. Fungi isolation and testing on larvae. *Ekologija*, 56(1–2): 34–40.
2. Nedveckytė I., Pečiulytė D., Dirginčiūtė-Volodkienė V., Būda V., 2011. Pine defoliator *Bupalus piniaria* (L.) (Lepidoptera: Geometridae) and its entomopathogenic fungi. 2. Pathogenicity of *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* and *Paecilomyces farinosus*. *Ekologija*, 57(1): 12–20.
3. Nedveckytė I., Pečiulytė D., Būda V., 2014. Entomopatogeniniai grybai: įvairovė ir sąveikos su vabzdžiais ypatumai. *Ekologija*, 60(3): 39–53.

ABSTRACTS OF CONFERENCE REPORTS

KONFERENCIJŲ TEZĖS

1. Nedveckytė I., Pečiulytė D., Dirginčiūtė-Volodkienė V., Būda V., 2010. Susceptibility of coniferous forest defoliators to entomopathogenic fungi. *XXVIII Nordic – Baltic Congress of Entomology*. Birštonas, August 2–7: 57.
2. Nedveckytė I., Pečiulytė D., 2013. Entomopatogeninių grybų poveikis *Dendrolimus pini* L. ir *Diprion pini* L. rūšims. Antroji jaunųjų mokslininkų konferencija „Jaunieji mokslininkai – žemės ūkio pažangai“. Vilnius, Lapkričio 9: 40.
3. Butkienė R., Nedveckytė I., Pečiulytė D., Apšegaitė V., Blažytė-Čereškienė L., Būda V., 2014. Search for electrophysiological test to reveal cereal contamination by microfungi based on EAG of *Plodia interpunctella*. *The 30th ISCE Annual Meeting*. Meeting Overview, 8–12 July, Urbana-Champaign, Illinois, USA: 150
4. Nedveckytė I., Pečiulytė D., Blažytė-Čereškienė L., Butkienė R., Būda V., 2015. Oviposition responses of *Plodia interpunctella* (Hübner) (Lepidoptera: Pyralidae) to cereal contaminated by fungi *The 31st ISCE Annual Meeting*. Meeting Overview, 29th June - 3rd July 2015: 329.

CURRICULUM VITAE

Name: Irena Nedveckytė

Date and place of birth:

14 January 1982, Vilnius, Lithuania

Education:

2000-2004 Bachelor's Degree in Biology, Faculty of Natural Sciences, Vilnius University

2004-2006 Master's Degree in Ecology and Environmental Sciences, Vilnius University

2008-2014 PhD studies in Ecology and Environmental Sciences, Nature Research Centre

Contacts:

Nature Research Centre, Laboratory of Chemical and Behavioural Ecology

Akademijos Str. 2, LT-08412

Vilnius, Lithuania

e-mail: inedveckyte@gmail.com