

INSTITUTE OF ECOLOGY OF VILNIUS UNIVERSITY
VILNIUS UNIVERSITY

Sandra Radžiutė

**THE INVESTIGATION OF KAIROMONES AND PHOTSENSITIZERS,
AFFECTING *LIRIOMYZA BRYONIAE* (DIPTERA, AGROMYZIDAE)**

Abstract of Doctoral Dissertation

Biomedical sciences, Ecology and Environmental Science (03 B)

Vilnius, 2009

The research was carried out at the Institute of Ecology of Vilnius University in 2005-2009.

Research

Supervisor: Prof. Dr Habil. Vincas Būda (Vilnius University, Biomedical Sciences, Ecology and Environmental science – 03B)

The defence of the doctoral dissertation is held at the Vilnius University joint council on Ecology and Environmental science:

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

Members: Dr Habil. Juozas Staniulis (Institute of Botany, Biomedical Sciences, Ecology and Environmental science – 03B)
Prof. Dr Algimantas Paulauskas (Vytautas Magnus University, Biomedical Sciences, Ecology and Environmental science – 03B)
Dr Raimondas Mozūraitis (Institute of Ecology of Vilnius University, Biomedical Sciences, Ecology and Environmental science – 03B)
Dr Vidmantas Karalius (Institute of Ecology of Vilnius University, Biomedical Sciences, Ecology and Environmental science – 03B)

Opponents: Prof. Dr Habil. Jonas Rimantas Stonis (Vilnius Pedagogical University, Biomedical Sciences, Zoology – 05B)
Ass. Prof. Dr Eduardas Budrys (Institute of Ecology of Vilnius University, Biomedical Sciences, Ecology and Environmental science – 03B)

The official defence of the dissertation will be held at a public meeting of the Council on 23rd December 2009 at 11.00 a.m. at the Institute of Ecology of Vilnius University.

Address: Akademijos 2, LT-08412 Vilnius-21, Lithuania.

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

The abstract of the doctoral dissertation was distributed on 23rd November 2009.

The dissertation is available at the library of Vilnius University and the library of the Institute of Ecology of Vilnius University.

VILNIAUS UNIVERSITETO EKOLOGIJOS INSTITUTAS
VILNIAUS UNIVERSITETAS

Sandra Radžiutė

**KAIROMONŲ IR FOTOSENSIBILIZATORIŲ, VEIKIANČIŲ *LIRIOMYZA*
BRYONIAE (DIPTERA, AGROMYZIDAE), TYRIMAI**

Daktaro disertacijos santrauka

Biomedicinos mokslai, ekologija ir aplinkotyra (03 B)

Vilnius, 2009

Disertacija rengta 2005 – 2009 metais Vilniaus universiteto Ekologijos institute.

Mokslinis

vadovas: prof. habil. dr. Vincas Būda (Vilniaus universitetas, 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: habil. dr. Juozas Staniulis (Botanikos institutas, biomedicinos mokslai, ekologija ir aplinkotyra – 03 B)
prof. dr. Algimantas Paulauskas (Vytauto Didžiojo universitetas, biomedicinos mokslai, ekologija ir aplinkotyra – 03 B)
dr. Raimondas Mozūraitis (Vilniaus universiteto Ekologijos institutas, biomedicinos mokslai, ekologija ir aplinkotyra – 03 B)
dr. Vidmantas Karalius (Vilniaus universiteto Ekologijos institutas, biomedicinos mokslai, ekologija ir aplinkotyra – 03 B)

Oponentai: prof. habil. dr. Jonas Rimantas Stonis (Vilniaus pedagoginis universitetas, biomedicinos mokslai, zoologija – 05 B)
doc. dr. Eduardas Budrys (Vilniaus universiteto Ekologijos institutas, biomedicinos mokslai, ekologija ir aplinkotyra – 03 B)

Disertacija bus ginama viešame ekologijos ir aplinkotyros mokslų krypties tarybos posėdyje, kuris įvyks 2009 m. gruodžio 23 d. 11 val., VU Ekologijos instituto salėje.

Adresas: Akademijos 2, LT-08412 Vilnius-21, Lietuva.

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

Disertacijos santrauka išplatinta 2009 m. lapkričio 23 d.

Disertaciją galima peržiūrėti Vilniaus universiteto ir VU Ekologijos instituto bibliotekose.

INTRODUCTION

Relevance of the research. Tomato leafminer *Liriomyza bryoniae* (Diptera, Agromyzidae) is one of the most abundant pest species in industrial tomato greenhouses in Lithuania and Europe (Ostrauskas et al., 2005). The larvae of leafminers feed on leaf parenchyma tissues and affect cultivated plants by causing reduction in yield and reducing the aesthetic value of ornamental plants (Parrela, 1987). Development of new, ecologically safe technologies to control pest populations is of great importance. So the application of kairomones and nontoxic, not mutagenic and environmentally friendly photoactive organic compounds (photosensitizers) combination for plant protection may be a practicable solution of the problem.

Photosensitizers are photoactive organic compounds, which can accumulate in different organisms including insects, and following exposure to visible light induce lethal photochemical reactions and death of an organism. These compounds are not mutagenic and because of rapid photodegradation in the sunlight would not pollute the environment (Ben Amor, Jori, 2000). Usually photosensitizers are incorporated into nutrition medium of insects or baits containing various nutrients (e.g., different sugars). However, effective strategy for minimizing the uptake of baits with photosensitizers by non-target insects is needed. In that case one of the possibilities is the use of species specific attractants which attract relevant species to the bait with photosensitizers.

There is no doubt that leafminers orient in the environment, locate and recognize the suitable host-plants by plant-emitted volatiles (Zhao, Kang, 2002, 2003). Plant chemical compounds, which are attractive for the pest, are attributed to kairomones. However, until recently only kairomones for one agromyzid species – *Liriomyza sativae* – are identified (Wei et al., 2005). Identification of attractive chemical compounds for leafminers as the investigation of behavioural reactions of leafminers to volatiles emitted by host-plants will help to understand essential physiological mechanisms involved in suitable host-plant searching behaviour of insects. Also the results of such research could be used to predict the abundance and distribution of the pest and to develop new biological control tools including those based on the use of photopesticides.

The aim and main tasks of the research. The aim of the study was to determine kairomones, emitted by tomato leafminer *Liriomyza bryoniae* host-plants, and investigate the effect of photosensitizers on tomato leafminer by choosing the most effective (inducing lethal effects) photosensitizing agents.

The following tasks were set to achieve this aim:

- 1) to determine the diurnal rhythm of tomato leafminer *L. bryoniae* female feeding activity;
- 2) to determine reactions of *L. bryoniae* olfactory receptors to host-plant volatiles;
- 3) to evaluate the attractiveness of different host-plant odours for polyphagous leafminer *L. bryoniae*;
- 4) to evaluate the attractiveness of different host-plants for feeding and oviposition of *L. bryoniae* adults;
- 5) to determine kairomone attractive for tomato leafminer (single chemical or mixture);
- 6) to find an effective photosensitizer which induces lethal effects and thus does not inhibit *L. bryoniae* feeding;

- 7) to evaluate the pharmacokinetics of the effective photosensitizer within *L. bryoniae* organism.

Novelty of the research. The diurnal rhythm of *Liriomyza bryoniae* female feeding activity was determined for the first time. Also, for the first time olfactory reactions of tomato leafminer *L. bryoniae* adults to host-plant and non host-plant odours were registered, and the attractiveness of host-plants was evaluated. The first attractant for *L. bryoniae* species was identified. Using GC-EAD technique, important for *L. bryoniae* plant volatiles (potential kairomones) were determined. An original method for *L. bryoniae* feeding behaviour on baits containing photosensitizers registration was developed. For the first time the efficiency of several photosensitizers depending on induced lethal effects and time of feeding on the bait with photosensitizer was compared using Agromyzidae species. The photosensitizer which can be used as effective photopesticide against tomato leafminer *L. bryoniae* was determined. Furthermore, it was ascertained that following 48 hours after hematoporphyrin dimethyl ether (HPde) intake no detectable amount of photosensitizer was found in *L. bryoniae* organism. In collaboration with Institute of Materials Science and Applied Research, for the first time the method developed in that Institute was used for the evaluation of the amount of photosensitizer and its pharmacokinetics in single insect organism (*L. bryoniae* species was used).

Scientific and practical significance. Research results extend the knowledge in the fields of chemical ecology and behaviour of agromyzids. The results are important and can be applied as follows: to identify kairomones for *L. bryoniae* species; to search for potential kairomones affecting *L. bryoniae* or other *Liriomyza* species behaviour; to develop the monitoring and environmentally friendly control tools for *L. bryoniae* species; to carry out the investigation of effective photosensitizers for *L. bryoniae*; to develop agricultural pest control strategy based on the use of photopesticides.

Defended statements:

- 1) the host-plant odours attractiveness for tomato leafminer *L. bryoniae* is influenced by the host experience at larval stage;
- 2) for feeding and oviposition polyphagous pest *L. bryoniae* prefers different host-plants;
- 3) identified, affecting *L. bryoniae* behaviour kairomone can be an additional effective monitoring tool increasing the attractiveness of traps;
- 4) economically important plant pest *L. bryoniae* is sensitive to hematoporphyrin dimethyl ether (HPde)-based photosensitization.

Approbation of results. Dissertation material was presented at the international conferences: “Chemical communication in animals. Fundamental problems” (Moscow, Russia, 2006), “23th, 24th, 25th Annual Meetings of International Society of Chemical Ecology” (Jena, Germany, 2007; Pennsylvania, USA, 2008; Neuchatel, Switzerland, 2009). Results of the research were reported in 5 scientific articles published in the journals (ISI Master Journal List) included in the database of the Institute for Scientific Information (3 of them are included in the database of the Institute for Scientific Information (ISI WOS) with *impact* factor) as well as in 3 abstracts of conferences.

Structure of dissertation. The dissertation is presented in the following chapters: Introduction, Literature Review, Material and Methods, Results and Discussion (3

subchapters), Conclusions, References (168 sources), List of publications where the dissertation material was published and Appendices. The dissertation covers 127 pages; it contains 12 tables and 37 figures. The text of the dissertation is written in Lithuanian with the abstract in English.

Acknowledgements. Heartfelt thanks to the scientific supervisor Prof., Dr. Habil. Vincas Būda and all colleagues from the Laboratory of Chemical Ecology and Behaviour for every kind of assistance and valuable advice. Many thanks to dr. Henrikas Ostrauskas and dr. Saulius Pakalniškis for useful advice and guidance in rearing tomato leafminer and carrying out field experiments; and to Erikas Lutovinovas for dipteran species identification. Also I am grateful to Evaldas Masevičius, director of UAB “Evaldo daržovės” and to the administration of UAB “Kietaviškių gausa” for the provided possibility to carry out field research. I also want to thank the Lithuanian State Science and Studies Foundation for the provided scholarships as well as World Federation of Scientists (Switzerland) for the national scholarship. And of course I am thankful to the Institute of Ecology of Vilnius University for provided possibility to pursue the doctoral studies.

LITERATURE REVIEW

This chapter reviews the biology of genus *Liriomyza*, mechanisms involved in host-plant location and recognition by leafminers as well as the damage these pests induce to economically important agricultural plant. The control tools against tomato leafminer, the historical background and current perspectives of the use of kairomones and sunlight activated photoinsecticides (photosensitizers) are also discussed.

MATERIAL AND METHODS

Material. The object of the research – tomato leafminer *Liriomyza bryoniae* Kalténbach (Diptera, Agromyzidae). *L. bryoniae* was reared on a bittersweet *Solanum dulcamara* (Solanaceae) and a field bean *Vicia faba* (Fabaceae) under laboratory conditions. Adult flies of both sexes emerged from the collected larvae were transferred into plastic oviposition cages (height 16 cm, length 7 cm) with tops covered by nylon screen and bottoms closed with sponge material. Six to eight fully unfolded leaves from the top of the bittersweet or field bean seedlings were provided to the flies for oviposition. Seedlings were replaced at 3- to 4-day intervals. Once the plants were infested with leafminer eggs, the oviposition cages were removed and plants were put in plastic bags for collecting puparia. Collected single puparium was placed in a glass vial with wet filter paper. Adult flies as well as larvae/puparia were maintained at $24 \pm 2^\circ \text{C}$ and photoperiod of 15:9 (L:D). From October to April artificial light was used – a glow-lamp, 400 W (DRLF type, for greenhouses).

The plants used in the research: bittersweet (*Solanum dulcamara* L.), tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.), deadnettle (*Lamium album* L.), downy ground-cherry (*Physalis pubescens* L.), white goosefoot (*Chenopodium album* L.) and wrinkled rose (*Rosa rugosa* Thunb.).

The photosensitizers used in the research: hematoporphyrin dimethyl ether (HPde), acridine orange (AO), methylene blue (MB), 5-aminolevulinic acid (ALA) (precursor of endogenous protoporphyrin PpIX) (“Merck”, USA). The solution of the above-mentioned photosensitizers was prepared in physiological saline ($2.5 \times 10^{-2} \text{M}$) and was stored in the dark below -10°C prior to the experiments.

Research of *L. bryoniae* females feeding behaviour. The diurnal rhythm of *L. bryoniae* female feeding activity was observed in May 2005 in the laboratory at natural photoperiod (sunrise – 5 h, sunset – 21 h), $21 \pm 2^{\circ}\text{C}$. The observation of females started at 11 h in the morning and continued for 24 hours. During the experiment the feeding punctures made by one-day-old female during one hour on a single bittersweet leaf were counted. Observations of 4-5 females were carried out simultaneously. The total number of observed females was 16. For statistical analyses t-test was used.

Registration of *L. bryoniae* antennae reactions (EAG) to host-plant volatiles. Glass capillary electrodes filled with physiological solution (NaCl, 0,9%) were put on Ag electrodes. The head of an insect was removed, and the tip of the left antenna arista was cut off. The reference electrode was inserted into the hemocoel of the cranial cavity, and the recording electrode was connected to the cut tip of the arista. Activated charcoal filtered and humidified constant airflow at a rate of 1,2 L/min passed over the antenna through a glass tube (\varnothing 6mm) positioned 1 cm from the antenna. Air containing test substances (passed through a Pasteur pipette with a piece of filtered paper (2mm \times 0,5mm) (Whatman[®] 1, England) containing 6 mg of the test plant sap) at a rate of 6 ml/s was pushed into the constant airflow by an interval of 0,5 s and in that way reached the testing antenna. For statistical analysis Wilcoxon matched pairs test was used.

Evaluation of the host-plants odour attractiveness and synthetic chemical attractiveness for tomato leafminer using Y-tube olfactometer. A Y-tube olfactometer was used (length of main tube – 10 cm; length of arms – 12 cm; embranchment angle - 45° ; inner diameter – 0,6 cm). Activated charcoal filtered and humidified air at a rate of 430 ml/min was pushed through each glass chamber (\varnothing 8 cm) containing odour sources. The source of odours was 5 host-plants (bittersweet, tomato, deadnettle, downy ground-cherry, white goosefoot) or 1,5 mL plastic vial containing 0,5 mL of testing synthetic chemical compound. Only fully unfolded leaves from the top branches of the plant were used. Number of the leaves varied from 6 to 8, depending on their size. Choice duration for a single fly was 5 min. Only unmated one-day-old adults (males and females) were used. Males were tested unfed and females were allowed to feed for 24 h after emergence. The test was carried out at $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, from 09.00 until 18.00 h. The results were analyzed statistically using chi-square test.

L. bryoniae females suitable host-plant preference for feeding and oviposition. The experiment conditions were the same as rearing *L. bryoniae*, only 2 host-plants were provided into oviposition cage. After 5 days the oviposition cage with leafminers was removed and females feeding punctures and developing larvae (in the results presented as number of eggs) were counted for each plant. At least 6 replicate cages were used for each choice experiment. For statistical analysis Wilcoxon matched pairs test was used.

Simultaneous gas chromatography and EAG registration (GC-EAD). The testing volatiles from tomato *Lycopersicon esculentum* plants were collected using a dynamic headspace collection system (adsorbent Porapak Q) and hydro distillation method. 2 μl of samples were injected splitless into a Clarus 500 (Perkin Elmer) GC equipped with an

EliteWAX column (30 m × 0.25 mm × 0.25 μm), with an extra outlet (temperature controller, TC-02, Syntech). The injector, detector, and EAD transfer line temperatures were 230°C, 240°C and 240°C, respectively. The oven temperature was set at 40°C for 2 min, increased to 150°C at a rate of 6°C/min, then increased again to 240°C at a rate 20°C/min and finally held at this temperature for 5 min. Hydrogen was used as the carrier gas (4 ml/min) and the makeup gas (4 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 of 1:1. EAG registration was carried out using a signal connection interface (IDAC 4, Syntech, The Netherlands). Data storage and analysis were carried out with a PC-based interface and software package (GCEAD version 4.4, Syntech, The Netherlands).

Some of the compounds that elicited consistent *L. bryoniae* male and female antennae responses were examined with the above-mentioned GC and standard chemicals as well as with an HP 5890 gas chromatograph equipped with an HP 5971 mass selective detector (GC/MS).

Testing for biological activity of methyl salicylate under field conditions. Field test was conducted in a 1 ha tomato greenhouse (Kietaviškės, Kaišiadorys district) in August and in 0,5 ha greenhouses where lettuce and potherbs were grown (Sakalai, Šalčininkai district) in September 2006, in Lithuania. The experiment was carried out following D.G. James (2005).

Yellow sticky cards (25×13cm) (Biobest N.V., Belgium) and aluminium foil colour traps (20×16cm) (made from laminated paper (juice packs, TetraPak) at the laboratory of Chemical Ecology and Behaviour of Institute of Ecology, Vilnius, Lithuania) were tied vertically to wire poles at a height of ~30 cm above the plant top. Cards were baited with 2 ml plastic vials containing 0.25, 0.5 and 1 ml of methyl salicylate (MeSa) or left unbaited (control). Vials were slightly plugged with cotton wool and suspended by wire at a height of ~2 cm above the centre of each card. MeSa (≥99%) obtained from Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Germany, was used undiluted. The cards were placed in three rows with 12 m between the randomized treatments with three replicates of each treatment. Sticky cards were collected after 10 days in Kietaviškės and after 14 days in Sakalai. Trapping data were analyzed using Kruskal-Wallis ANOVA by ranks. Catches in all traps containing MeSa were combined.

Registration of behaviour of feeding on the bait containing photosensitizer. Feeding activity of adult flies was estimated by the duration the insect spent demonstrating feeding behaviour (demonstrating posture with head lowered down to the bait and proboscis extended) during 30 min period. Duration of feeding/non-feeding behaviour was counted using original computer programme, which allowed recording behaviour of 5 flies simultaneously, each fly in a separate channel. The observer recorded the behaviour of a fly as feeding/non-feeding by pushing/releasing the button on a keyboard, one button for each fly. Feeding behaviour of adult flies was registered under the red light illumination at 22±1°C. Red light allowed the observer to register feeding behaviour of the flies and alongside ensured stable conditions for photosensitizer in the bait. The flies were fed in individual glass vials supplied with a small sponge moistened with feeding bait solution (1 mL sugar/water solution at the concentration of 0.2 g/mL and 150 μL photosensitizer/physiological saline solution at the concentration of 2,5×10⁻² M). In each control and test group the behaviour of 15 insects was recorded and analyzed. Only unfed, unmated 8-24 h old *L. bryoniae* males and females were used in

the experiment. The results were analyzed statistically using Wilcoxon matched pairs test.

Evaluation of photopesticidal efficiency of the photosensitizer toward *L. bryoniae*. After emergence, adults were sexed and not allowed to feed for at least 8 h. Control insects were fed with sucrose solution (0.2 g of sugar in 1 ml distilled water) and those used for testing were fed the same solution plus photosensitizer. Both control and test insects were fed for 15 h in the dark and 5 h under the red light illumination at 22 ± 1 °C. The light source used for irradiation of insects consisted of a tungsten lamp (500 W), an optical system for light focusing and an optical filter for UV and infrared light elimination ($370 \text{ nm} < \lambda < 680 \text{ nm}$). Light intensity at the position of the cells was 30 mW/cm^2 . The irradiation time reached 30 min and the total irradiation dose did not exceed 54 J. After irradiation the insects, which survived, were fed with sucrose solution and their mortality was registered every day. Groups of 10 insects per experiment were used. Each experiment was repeated three times. Standard error was estimated for every experimental point and marked in Figure as a bar. For statistical analysis Cox's F test was used.

Evaluation of the photosensitizer pharmacokinetics within the body of an insect. After insect feeding with bait containing photosensitizer, during 48-hour period every 8 hours insect groups of 12 adults (females or males) were frozen at -18°C and the amount of photosensitizer in the body was determined. Fluorescence intensity of the photosensitizer in intact cooled insects after feeding was investigated. Fluorescence spectra were detected from every cooled insect in the region 590-650nm. The size of each insect was not more than 1-2mm, thus it enabled us to detect fluorescence of HPde from the whole insect body. The pharmacokinetics of photosensitizer in the insect body was recorded by a standard luminescence spectrometer. The light-emitting diode with the output power of 2 mW and the emission band at the wavelength 394 nm was used for excitation. The total irradiation dose in the fluorescence measurements was less than 0.5 J (significantly lower than illumination in the case of the survival tests). The radiation of the diode was exposed in the spot of 2 mm in diameter on the insect. Secondary emission of the insect body was collected by a lens system and dispersed by a double monochromator (Jobin Yvon Model HRD-1). A cooled photomultiplier (Hamamatsu R1463P) connected to a photon counting system was used for data accumulation. All measurements were performed at room temperature. Each experiment was repeated three times.

RESULTS AND DISCUSSION

Diurnal rhythm of *L. bryoniae* female feeding activity. Starting the investigation of kairomones affecting tomato leafminer, it was important to determine the diurnal rhythm of *L. bryoniae* feeding activity. The obtained results allowed us to choose suitable hours for further host-plant odour attractiveness evaluation experiments. Only females were observed because only females can penetrate leaves making feeding punctures, therefore they are responsible for the host selection and damage to the plant. The most intensive *L. bryoniae* females feeding activity (when sunrise at 05.00, sunset at 21.00) is at 09.00 in the morning ($p < 0,01$, t-test). After that females feed all the day until sunset at an even rate (Fig. 1).

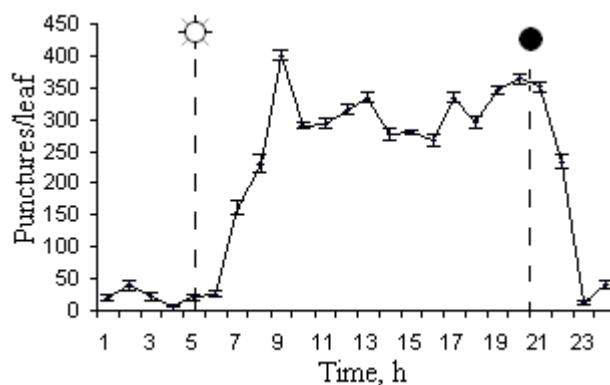


Figure 1. Diurnal rhythm of *Liriomyza bryoniae* females feeding activity (n=16). ☀ - sunrise, ● – sunset.

Į paveikslas. Liriomyza bryoniae patelių maitinimosi paros ritmas (n=16). ☀ - saulėtekis, ● – saulėlydis.

***L. bryoniae* antennae responses (EAG) to plant odours.** EAG responses of *L. bryoniae* females and males to the host-plants (bittersweet, tomato, deadnettle, downy ground-cherry) odours differed significantly from the responses to the non host-plant (wrinkled rose) odour (Fig. 2). There was noted some sexual dimorphism in *L. bryoniae* EAG reactions to host-plant volatiles: in females the highest EAG responses were evoked by downy ground-cherry ($0,62 \pm 0,08$ mV) and deadnettle volatiles ($0,66 \pm 0,08$ mV), while only downy ground-cherry ($0,84 \pm 0,11$ mV) evoked the highest EAG responses in males. The odour of deadnettle, which evoked the highest reaction in females, in males evoked only small reaction, namely $0,47 \pm 0,04$ mV ($Z=1,92$, $p=0,055$). Whereas in all other cases, EAG reactions of males to host-plant odours were slightly higher than those of females, although did not differ significantly.

The attractiveness of testing host-plant odours for *L.bryoniae*. Firstly the behavioural reactions of tomato leafminer adults to the odour of a plant on which insects had been reared were tested. In Y olfactometer, leafminers could choose between a pure airflow and an airflow with host-plant (bittersweet) odour. During the experiment some differences between the choice of males and females were observed (Fig. 3). Only the females which were allowed to feed before the experiment significantly more often chose the airflow with host-plant odour than the pure airflow ($\chi^2 = 6,25$, $p < 0,012$). Unfed females chose the airflow with host-plant odour as frequently as the pure airflow. Thus we can suggest that the experience plays an important role in females' host-plant selection. Unlike females, unfed males significantly more often chose the airflow with host-plant odour ($\chi^2 = 4,0$, $p < 0,05$). Knowing that males must find an already damaged host-plant, the behavioural reactions of males to damaged host-plant odour (prior to it 3 *L. bryoniae* females fed on that plant for 24 h) were tested. However no differences were observed (Fig. 3).

During the experiment evaluating the attractiveness of different host-plants odours for tomato leafminer, one host-plant – bittersweet – is worth-mentioning. Males were significantly more attracted to the odour of bittersweet compared to other host-plants odours (Fig. 4).

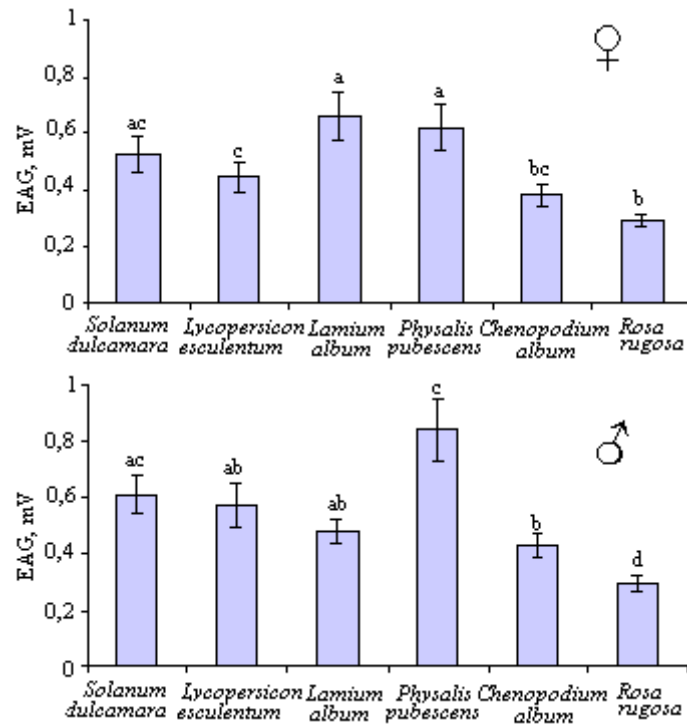


Figure 2. EAG responses of *Liriomyza bryoniae* females (above) and males (below) to different plant odours. The same letter on the bar means no significant difference (Wilcoxon matched pair test, $n > 20$).

2 paveikslas. *Liriomyza bryoniae* patelių (viršuje) ir patinėlių (apačioje) EAG reakcijos į skirtingų augalų kvapus. Skirtingos raidės virš stulpelių – reakcijų skirtumų į augalų kvapus statistinis patikimumas ($p < 0,05$, Vilkoksono ženklų kriterijus priklausomoms imtims, $n > 20$).

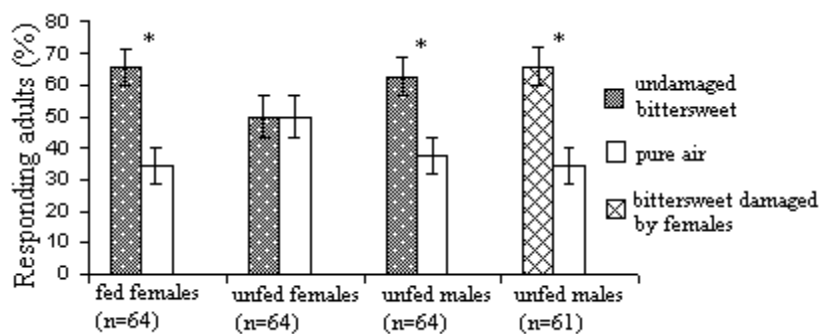


Figure 3. Choice by *Liriomyza bryoniae* in Y-olfactometer. * - values of bars in a pair differ significantly ($p < 0,05$, χ^2 test).

3 paveikslas. *Liriomyza bryoniae* pasirinkimas Y - olfaktometre. * - reikšmės tarp grupių esančių poroje skiriasi statistiškai patikimai ($p < 0,05$ pagal χ^2 kriterijū).

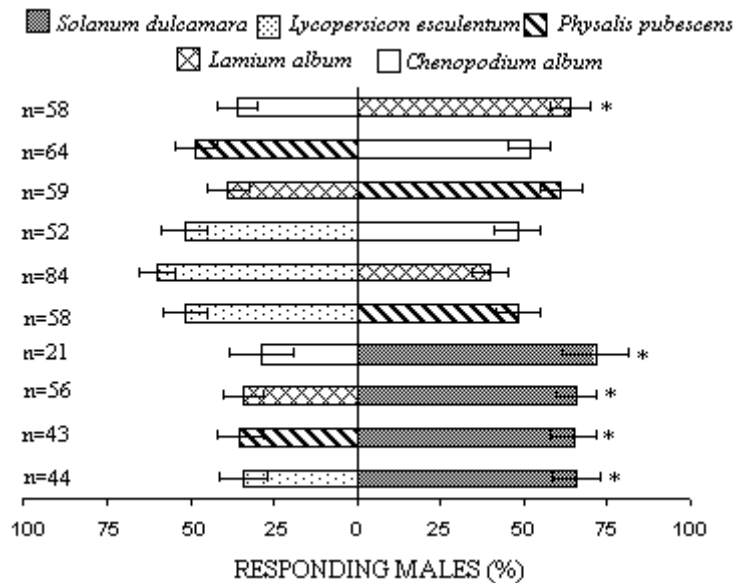


Figure 4. Choices by *Liriomyza bryoniae* males reared on bittersweet between the two host plant odours in Y-tube olfactometer. * - χ^2 , $p < 0,05$.

4 paveikslas. *Liriomyza bryoniae* patinėlių, užaugintų ant karklavijo, pasirinkimas tarp dviejų mitybinių augalų Y-olfaktometre. * - χ^2 , $p < 0,05$.

The odour of bittersweet was not the most attractive for females in all choice experiments, however this plant was the only one, whose odour was statistically significantly more attractive for females in 4 (in total 7 were made) choice experiments. Females significantly more preferred the odour of bittersweet compared to either tomato, deadnettle (when females were fed on deadnettle before the choice experiment) or white goosefoot (when females were fed on bittersweet before the choice experiment), whereas no difference was recorded in choice between bittersweet and downy ground-cherry (Fig. 5). Keeping in mind that bittersweet was a plant on which leafminers used in the above-mentioned experiment were reared (more than 3 generations), we can suggest that the Hopkins' host selection principle appears to operate in these leafminers.

The other experiment proved our suggestion that *L. bryoniae* males and females chose the odour of bittersweet because of host experience in the larval stage. *L. bryoniae* adults reared on field bean demonstrated no preference to the odour of either bittersweet or tomato (Fig. 6).

Behavioural tests in Y-tube olfactometer also demonstrated that the host odour preference by females could be modified by their host experience in the early imaginal stage. *L. bryoniae* females' choice between two host-plant odours depends on which of those plants females fed before the experiment (Fig. 5).

Choice of suitable host-plant for feeding and oviposition by *L. bryoniae*. Feeding experiments showed that bittersweet is the most suitable and attractive feeding plant (among tested plants in the experiment) for *L. bryoniae* females (Fig. 7A). In this manner bittersweet is more suitable according to its structural or nutritional characteristics and emitted chemical compounds for *L. bryoniae* feeding than tomato, deadnettle, downy

ground cherry or white goosefoot, although *L. bryoniae* females deposited more eggs on downy ground-cherry (Fig. 7B).

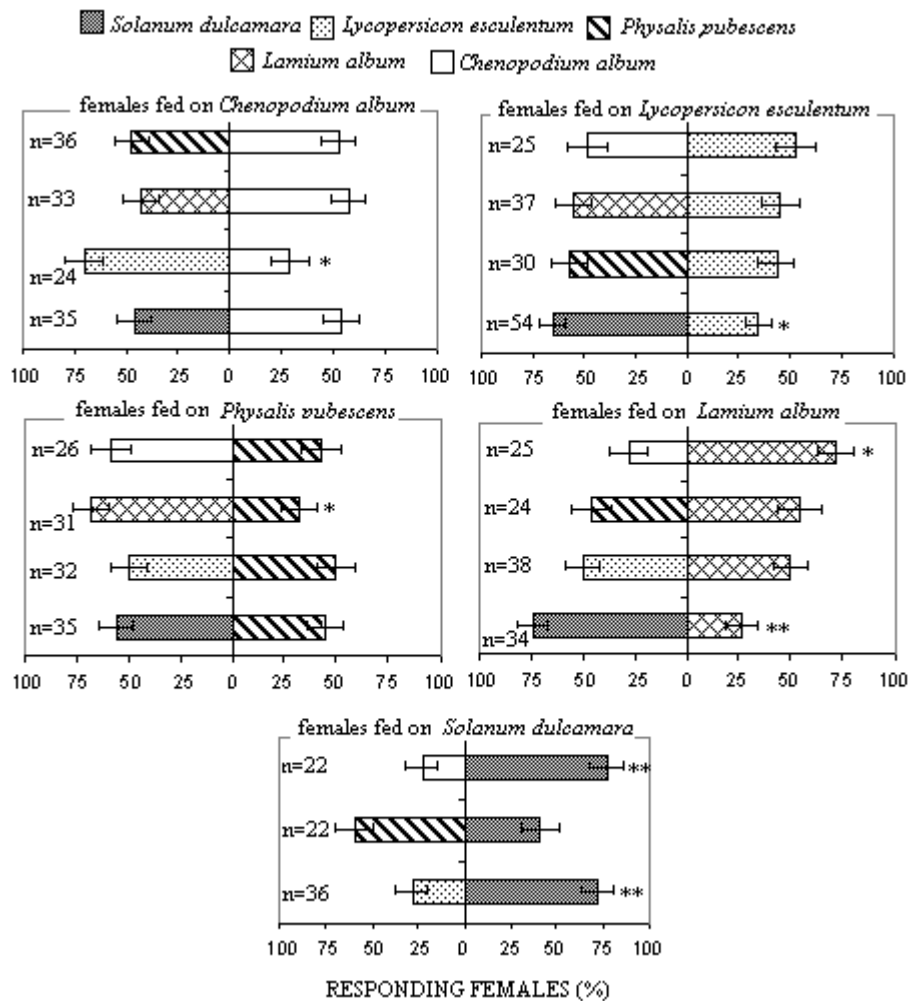


Figure 5. Choices by *Liriomyza bryoniae* females reared on a bittersweet between the two host plant odours in Y-tube olfactometer. Before the choice experiment females fed on different host plants. * - χ^2 , $p < 0,05$, ** - χ^2 , $p < 0,01$.

5 paveikslas. *Liriomyza bryoniae* patelių, užaugintų ant karklavijo, pasirinkimas tarp dviejų mitybinių augalų Y-olfaktometre. Prieš pasirinkimo bandymą patelės maitinasi ant skirtingų mitybinių augalų. * - χ^2 , $p < 0,05$, ** - χ^2 , $p < 0,01$.

So, this leafminer preferred different host plants for feeding, and for oviposition. Herein we have to pay attention to the results of electrophysiological and olfactometrical experiments. Downy ground-cherry evoked one of the highest responses in antennae of females (also of males). Moreover, females did not prefer the odour of bittersweet compared only to downy ground-cherry odour (both when females fed on bittersweet and on downy ground-cherry before the choice experiment). Hence we suppose that downy ground-cherry emits volatiles which stimulate *L. bryoniae* female oviposition.

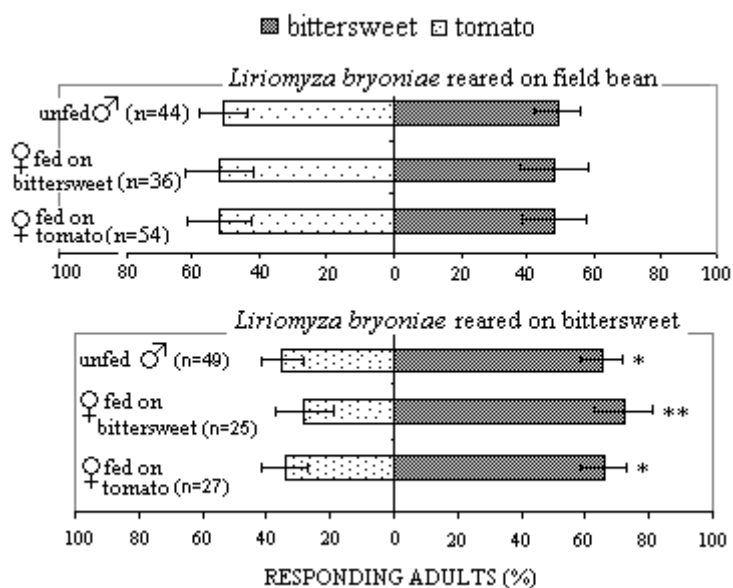


Figure 6. Choices by *Liriomyza bryoniae* adults reared on field bean and bittersweet between the two host plant odours in Y-tube olfactometer. * - χ^2 , $p < 0,05$, ** - χ^2 , $p < 0,01$.

6 paveikslas. *Liriomyza bryoniae* suaugėlių, užaugintų ant pupos ir karklavijo, pasirinkimas tarp dviejų mitybinių augalų Y-olfaktometre. * - χ^2 , $p < 0,05$, ** - χ^2 , $p < 0,01$.

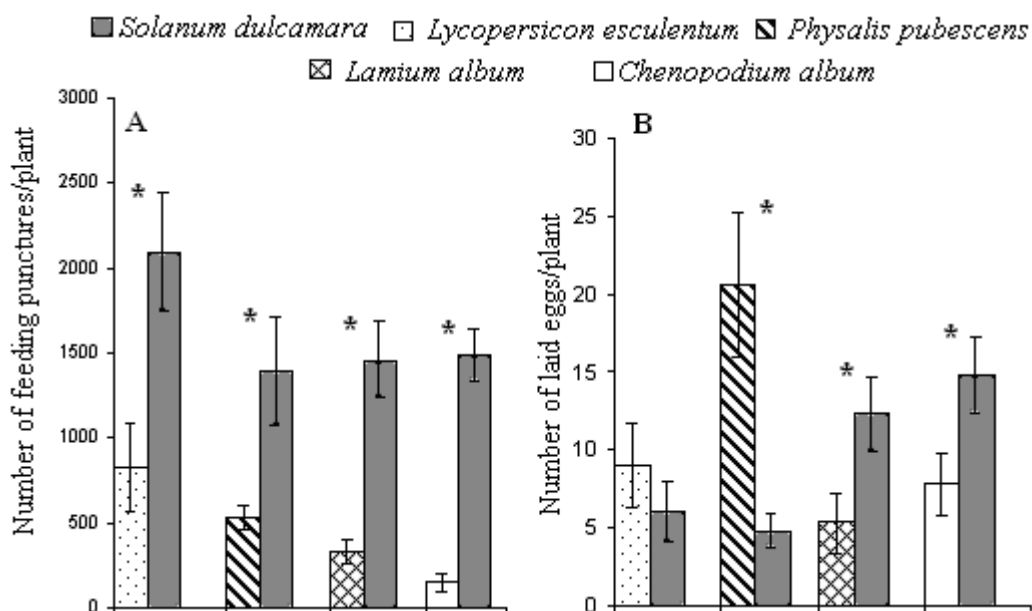


Figure 7. Mean number of feeding punctures (A) and eggs (B) deposited by *Liriomyza bryoniae* females in choice feeding and oviposition experiments for different host plants. * - values of bars in a pair differ significantly, (Wilcoxon matched pair test).

7 paveikslas. *Liriomyza bryoniae* padarytų pažeidimų (A) ir sudėtų kiaušinėlių (B) skaičiaus vidurkis ant skirtingų mitybinių augalų. * - reikšmės tarp grupių esančių poroje skiriasi statistiškai patikimai pagal Vilkoksono ženklų kriterijų priklausomoms imtims.

Potential *L. bryoniae* behaviour affecting kairomones. Our results reveal that it is very difficult to choose the most attractive host-plant for *L. bryoniae*. Polyphagous pest host-plant selection is affected by the physiological state of the insect, the host-plant suitability for feeding and oviposition, by the host experience in larval and early imaginal stage. Tomato plant, *Lycopersicon esculentum*, was chosen for investigation of *L. bryoniae* kairomones for several reasons: this plant was among preferred ones for oviposition; well known tomato chemistry can facilitate identification of kairomones; this economically important plant is very often attacked by tomato leafminer in industrial greenhouses in Lithuania (Ostrauskas et al., 2003).

Headspace collection from tomato plants was analysed by GC-EAD and seven volatile compounds in the headspace collection consistently evoked significant EAD responses in the antenna of female *L. bryoniae* (Fig. 8). Most of the compounds were in relatively small amounts, so only two volatiles were identified. They are methyl salicylate and (Z)-3-hexenol. During GC-EAD analysis of the tomato extract obtained by hydrodistillation, another 9 compounds which consistently evoked significant EAD responses in *L. bryoniae* were determined. Thus in total 16 tomato emitted chemicals are important in location and recognition of tomato by *L. bryoniae* females. Males' antennae responded to the same tomato volatiles as those of females.

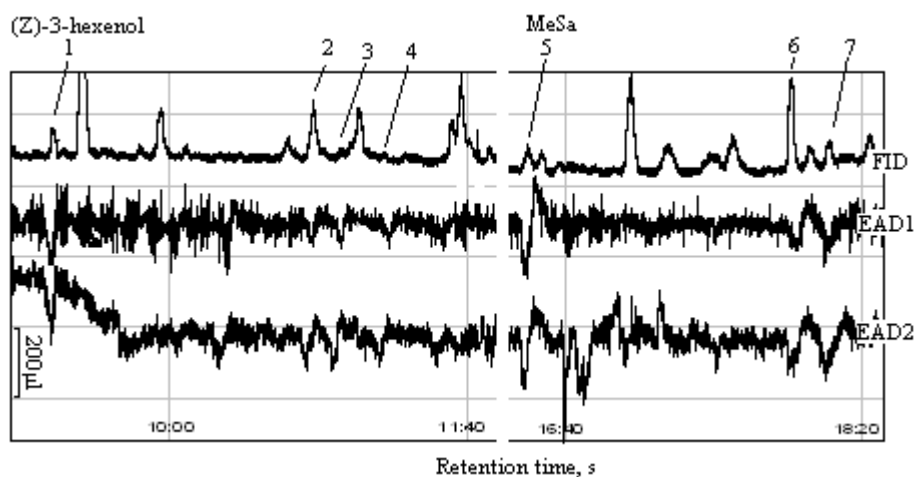


Figure 8. The part of gas chromatogram of headspace volatiles from undamaged tomato plant and recorded antennal responses of two females *Liriomyza bryoniae* (EAD1, EAD2) to volatiles. Compounds that elicited consistent responses (in at least four recordings) are marked with numbers.

8 paveikslas. Pomidoro skleidžiamų lakiųjų cheminių medžiagų (surinktų iš oro) chromatogramos dalis ir dviejų *Liriomyza bryoniae* patelių antenų atsakai (EAD1, EAD2) į šias medžiagas. Skaičiai žymi junginius, sukėlusius pastovų *L. bryoniae* patelių ($n \geq 4$) antenų atsaką.

Kairomonal activity of methyl salicylate (MeSa). The field test in the industrial greenhouses (Kietaviškės, Kaišiadorys district, Lithuania) revealed that agromyzid flies *L. bryoniae* were attracted by methyl salicylate. However, the colour of the trap was critical for attraction.

Statistically significant attraction to MeSa was revealed ((12.3 ± 0.7) flies/trap on average in MeSa-baited traps and (5.5 ± 1) flies/trap on average in control) ($H=3,85$, $p<0,05$) (Fig. 9). MeSa increased the attractiveness of yellow traps approximately 2.2 times.

Comparing the number of the flies captured by aluminium foil colour traps no statistically significant differences were detected between the traps baited with MeSa and the control ((1.33±0.20) and (0.66±0.33) flies/trap on average correspondingly) (Fig. 9). This indicates the absence of attractiveness of MeSa for *L. bryoniae* flies when presented in aluminium foil colour traps. Some difference in catches obtained by two control trap groups was obtained due to the difference in the trap colour: the ‘yellow control’ was more attractive compared to the ‘aluminium foil colour control’ (H=4,09, p=0,043) (Fig. 9). Basing on this particular phenomenon, commercial traps (sticky cards) were produced (Parrella, 1987). As far as we know, there were no data on the combined effect of olfactory and visual stimuli on the behaviour of agromyzids.

The data we obtained on the role of MeSa as an attractant of plant origin for herbivore insects allow attributing the compound to kairomones. MeSa is not a species specific attractant for *L. bryoniae*, it also attracts three dipteran species which belong to Syrphidae family (Molleman et al., 1997) and many other insects.

When MeSa was tested in Y-tube olfactometer differences in responses among the sexes were observed. Only *L. bryoniae* females statistically significantly preferred the airflow with MeSa (72%) compared to the pure airflow (control) (28%) ($\chi^2 = 4,84$, p=0,03, n=25). Males also showed a tendency to choose the airflow with MeSa (58%) compared with the pure airflow (42%), although statistically significant differences are absent ($\chi^2 = 0,66$, p>0,05, n=24). The differences between the behavioural reactions of males and females could be determined by the dose of MeSa used in the experiment. The used dose of Mesa could be optimal for females, but not for males.

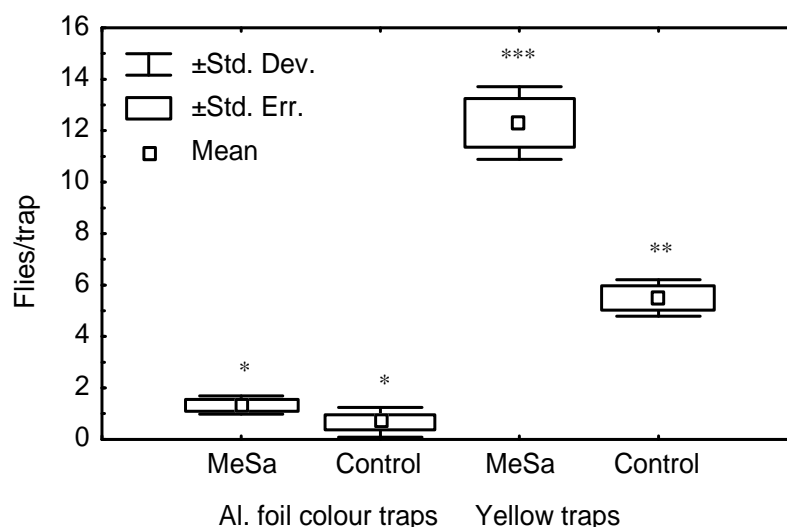


Figure 9. Mean capture of *Liriomyza bryoniae* in sticky aluminium foil-colour traps and sticky yellow traps either baited with methyl salicylate (MeSa) or containing no bait (control) in the tomato greenhouse during a 10 day period. * - values marked by different numbers of stars differ statistically significantly, p<0,05 (Kruskal-Wallis ANOVA by ranks).

9 paveikslas. *Liriomyza bryoniae* sugavimų geltonomis ir aliuminio folijos gaudyklėmis, turinčiomis metilsalicilato (MeSa) ir be MeSa (kontrolė), vidurkis pomidorų šiltnamyje 10 dienų bėgyje. * - reikšmės pažymėtos skirtingu žvaigždžių skaičiumi skiriasi statistiškai patikimai (p<0,05) pagal Kruskalio-Voliso ranginį kriterijų nepriklausomoms imtims.

MeSa is the first and the only attractant identified for the economically important leafminer *L. bryoniae*. The results we obtained are also important in applied aspects. At present yellow sticky cards are used as a monitoring tool for agromyzids both in smallholder farms and large vegetable industries. The data we obtained suggest that synthetic methyl salicylate can be an effective extra tool increasing the attractiveness of traps. This leads to a higher 'sensitivity' of a monitoring tool.

During field research two additional dipteran species were attracted by MeSa. They are *Drosophila busckii* Coquillett (Drosophilidae) and *Pollenia rudis* Fabricius (Calliphoridae). Numerous catches of the dipteran species were recorded in yellow sticky MeSa-baited traps in the greenhouse. A total of 3255 *D. busckii* specimens and 166 specimens of *P. rudis* were captured. In control traps there were 46 and 51 flies of the two dipteran species, respectively.

The mean catch ((814 ± 55) flies/trap) of vinegar flies *D. busckii* in MeSa-baited traps significantly differed from that in control traps ((12 ± 4) flies/trap) ($H=5,33$, $p=0,02$). MeSa is the first attractant for the vinegar fly *D. busckii*.

In yellow MeSa-baited traps the mean catch of *P. rudis* was 42 ± 4 flies/trap and differed significantly ($H=5,39$, $p=0,02$) from the control ((13 ± 4) flies/trap) on average. The yellow trap itself is to some extent attractive to the flies as was proved by catches in control traps. However, the application of MeSa significantly enhanced the attractiveness for the species. Thus, MeSa is an attractant for *P. rudis*. This is the second attractant for the cluster fly, *P. rudis*.

***L. bryoniae* feeding activity on bait containing different photosensitizers.** Clear sex-dependent feeding activity is demonstrated for *L. bryoniae* (Fig.10). Females feed about 1.5 times longer compared to males on control bait with no photosensitizers (i.e. average feeding duration as long as 13.25 min for a female, while the duration for a male - 8.45 min ($Z=2,21$, $p=0,027$); observation time - 30 min). This might be due to the body size (usually females are bigger than males) and biological activity of female. The same proportion in feeding duration is recorded on bait containing HPde and ALA: 13.06 min and 7.42 min for HPde ($Z=2,10$, $p=0,03$) and 13.26 min and 7.55 min for ALA ($Z=2,21$, $p=0,027$) (female/male, respectively). Thus HPde and ALA belong to the compounds with no deterrent properties for *L. bryoniae* compared to control. Deterrent properties of methylene blue are significant ($Z=2,27$, $p=0,023$) for *L. bryoniae* females with no deterrent effect for males. AO is in intermediate position as feeding on this bait results in reduced difference in feeding activity between females and males. All tested photosensitizers did not affect the feeding activity of *L. bryoniae* males (statistically significant differences are absent).

The efficacy of photoactive compounds such as pesticides depends on insect's feeding intensity and ingestion of the dye. In this context, the presence of sex-dependent difference in feeding activity of *L. bryoniae* flies is of great importance for application purposes because namely females are responsible both for pest infestation spreading (they select host-plants and lay eggs) and for damage of host-plants (they penetrate the leaf surface during feeding).

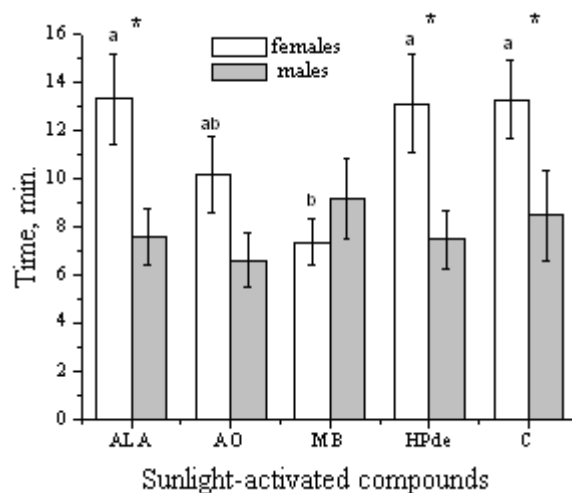


Figure 10. Feeding activity of adults of leafmining flies *Liriomyza bryoniae* (both sexes) on the bait containing different photoactive compounds. ALA - 5-aminolevulinic acid, AO – acridine orange, MB – methylene blue, HPde – hematoporphyrin dimethyl ether, C – control. Values marked with different letters differ statistically significantly within the same sex, asterisk indicates significant difference in feeding activity between the sexes (Wilcoxon matched pairs test).

10 paveikslas. *Liriomyza bryoniae* maitinimosi masalu su skirtingais fotosensibilizatoriais laikas. ALA – 5-aminolevulino rūgštis, AO - akridino oranžas, MB - metileno mėlis, HPde - hematoporfirino dimetileteris, C-kontrolė. Skirtingos raidės virš stulpelių - maitinimosi laiko skirtumų statistinis patikimumas tarp tos pačios lyties individų (Vilkoksono ženklų kriterijus priklausomoms imtims), *-statistinis patikimumas tarp skirtingos lyties individų (Vilkoksono ženklų kriterijus priklausomoms imtims).

Effect of light-activated photosensitizers on survival of *L. bryoniae*. For this experiment the photoactive compounds, which did not affect insects feeding activity, HPde, ALA and AO, were chosen.

Investigating HPde effect on tomato leafminer survival, the insects were fed on bait with HPde and exposed to artificial light. During irradiation experiment the mortality of 50% tomato leafminer males and 100% females was achieved (Fig. 11). The remaining males survived for 3 days, whereas the survival of *L. bryoniae* in control, untreated male and female groups, reached 25 and 27 days, respectively (data presented in Fig. 11 show a 9-day period only). It was determined that HPde by itself is non toxic: no significant decrease in the survival of the insects was observed after their feeding with bait containing HPde without irradiation. Also no lethal effect was induced by irradiation of *L. bryoniae* with visible light ($54\text{J}/\text{cm}^2$) in the absence of HPde.

Investigating AO and ALA effects on tomato leafminer, the same effect of the photosensitization that was observed using HPde was not achieved. The survival of the insects in control and treated groups was similar. Using AO the survival of females in control and treated groups reached 24 and 25 days ($F=1,15$, $p=0,37$), the survival of males – 18 and 23 days ($F=1,17$, $p=0,36$), respectively. Using ALA the survival of females in control and treated groups reached 19 and 25 days ($F=1,25$, $p=0,31$), the survival of males – 19 and 23 days ($F=1,55$, $p=0,16$), respectively.

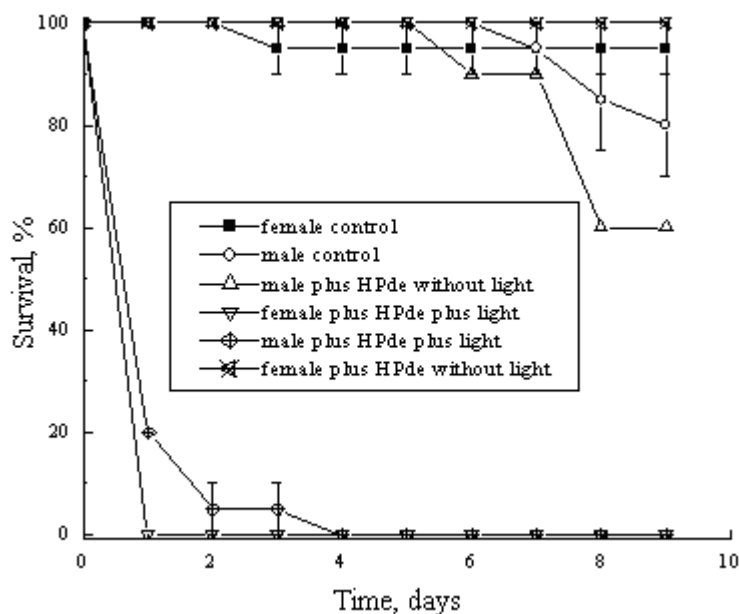


Figure 11. Survival of *Liriomyza bryoniae* after hematoporphyrin dimethyl ether (HPde) based photosensitization: the insects were exposed to a bait containing $150\mu\text{l } 2.5 \times 10^{-2} \text{ M}$ HPde, after 30 min. irradiated with broad spectrum visible light.

11 paveikslas. *Liriomyza bryoniae* išgyvenamumas po 30min. švitinimo plataus spektro matoma šviesa. Prieš bandymą vabzdžiai maitinti masalu, turinčiu hematoporfirino dimetileterio (HPde) ($150\mu\text{l } 2.5 \times 10^{-2} \text{ M}$ HPde).

Determination of hematoporphyrin dimethyl ether (HPde) amount and its accumulation in the body of *L.bryoniae*. The data obtained indicate that the amount of accumulated HPde in the body of female is much higher than that accumulated in the body of male (Fig. 12). Thus our results show that feeding duration well reflects the amount of photosensitizer obtained with the food. The insert in Fig. 12 demonstrates the pharmacokinetics of HPde in *L. bryoniae*. Hence, it is evident that the accumulation of HPde in the body of an insect is a function of time. Moreover, the amount of HPde detected in the body of female as well as male is highest 16 hours after insect feeding on bait with HPde. Following 48 hours after HPde uptake no detectable amount of the photosensitizer was found in any insect. According to our fluorimetric studies, the amount of HPde (inducing insect mortality during survival experiments) in the flies was estimated about $1.2 \times 10^{-5} \text{ g/per insect}$.

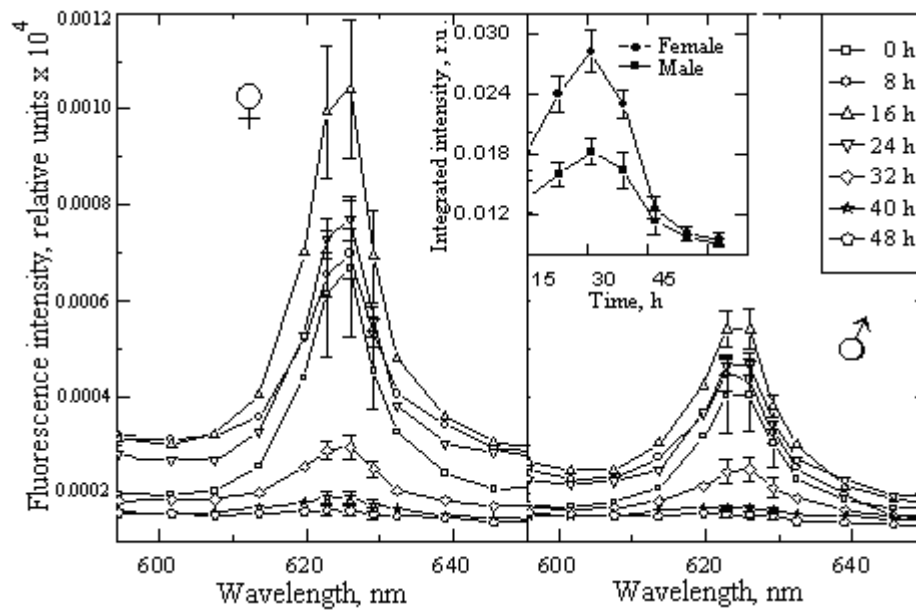


Figure 12. Fluorescence spectra of hematoporphyrin dimethyl ether (HPde) during 48h in the single female and male body. The insert depicts time-variation of the integrated luminescence signal with scattered light subtracted. The curves reflect accumulation and clearance of HPde in the body of *Liriomyza bryoniae*.

12 paveikslas. Hematoporfirino dimetileterio (HPde) fluorescenciniai spektrai *Liriomyza bryoniae* patelės ir patinėlio organizmuose praėjus skirtingam laiko tarpui nuo vabzdžių maitinimo masalu su HPde; įdėtiniam grafike – integruotas liuminescencijos signalas laike.

CONCLUSIONS

1. Diurnal rhythm of the feeding activity is characteristic for polyphagous *L. bryoniae* females: females penetrate the plant leaves only during the daytime, about 11% more intensively at the beginning of the photo phase (4 h after sunrise) than in the end of the photo phase (1h before sunset).
2. For feeding and oviposition *L. bryoniae* adults choose different host-plants: from 2,5 to 9,5 times more intensively feed on bittersweet (*Solanum dulcamara*) than tomato (*Lycopersicon esculentum*), downy ground-cherry (*Physalis pubescens*), deadnettle (*Lamium album*), white goosefoot (*Chenopodium album*), and lay from 4,3 times more eggs on downy ground-cherry than bittersweet.
3. The highest responses in olfactory receptors of *L. bryoniae* ♀♀ and ♂♂ (EAG) were evoked by downy ground-cherry volatiles: $0,62 \pm 0,08$ mV in females and $0,84 \pm 0,11$ mV in males. Deadnettle volatiles evoke the same reactions in females $0,66 \pm 0,08$ mV, however, much smaller in males $0,47 \pm 0,04$ mV ($p=0,055$).
4. The feeding of *L. bryoniae* larvae influences the behavioural reactions of the adults to host-plant odours: ♂♂ and ♀♀ reared on a bittersweet choose the odour of this plant statistically significantly more often than the odour of tomato; ♂♂ and ♀♀ reared on a field bean choose the odour of bittersweet as often as the odour of tomato. The behavioural reactions of *L. bryoniae* females to host-plant odour depend on the host-plant on which they fed in the early imaginal stage.
5. There are at least 16 chemical compounds in the blend of tomato-emitted volatiles, to which *L. bryoniae* responds. Two of them are identified: methyl salicylate and (Z)-3-hexenol. Methyl salicylate (MeSa) is attractive for *L. bryoniae* females under laboratory conditions. In the field, this compound is attractive acting with the yellow visual stimulus. MeSa is a kairomone for *L. bryoniae* leafminers.
6. Hematoporphyrin dimethyl ether (HPde) obtained by *L. bryoniae* adults induces lethal effects in the insects exposed to the sunlight during 5 min. Females die faster than males: during 30 min. females, during 3 days males. HPde does not affect the feeding activity of *L. bryoniae* females and males.
7. The effective photosensitizer hematoporphyrin dimethyl ether was not detected in the body of tomato leafminer after 48 h. It either disintegrated or was excreted.

IVADAS

Darbo aktualumas. Bulvinė liriomyza *Liriomyza bryoniae*, priklausanti minamusių Agromyzidae šeimai – vienas plačiausiai paplitusių kenkėjų pramoniniuose pomidorų šiltnamiuose Lietuvoje ir Europoje (Ostrauskas et al., 2005). Minamusių lervos minta lapo parenchiminiais audiniais ir dėl augalui daromos žalos žymiai sumažėja kultūrinių augalų derlius ar dekoratyvinių augalų estetinė vertė (Parrela, 1987). Naujų, ekologiškai saugių augalų apsaugos priemonių paieška išlieka iki šiol aktuali. Todėl kairomonų ir netoksinių, nemutageninių ir ekologiškai neutralių fotoaktyvių organinių junginių (fotosensibilizatorių) kombinacijos panaudojimas augalų apsaugai galėtų būti viena realių perspektyvų.

Fotosensibilizatoriai - fotoaktyvūs organiniai junginiai, kurie geba kauptis įvairiuose organizmuose, tame tarpe ir vabzdžio. Šios medžiagos aktyvuotos saulės ar dirbtinės šviesos skyla, sukeldamos eilę citotoksinių reakcijų vabzdžio organizme bei jo žūtį. Šie junginiai nemutageniški ir nesukeltų taršos problemų aplinkoje, kadangi saulės šviesoje fotoinsekticidiniai junginiai blykšta prarasdami savo savybes (Ben Amor, Jori, 2000). Dažniausiai fotosensibilizatoriai dedami į vabzdžių kenkėjų mitybinę terpę, arba į masalų, sudarytų iš maistinių medžiagų (pvz., įvairių cukrų) sudėtį. Tačiau taip pat reikalinga efektyvi strategija kaip sumažinti tokių masalų su fotosensibilizatoriais patekimą per mitybą į naudingų vabzdžių organizmą. Šiuo atveju vena iš galimybių būtų naudoti naikinamų vabzdžių specifinius atraktantus, kurie pritrauktų prie masalo su fotosensibilizatoriumi norimas rūšis.

Nėra abejonių, kad minamusės orientuojasi aplinkoje bei suranda ir atpažįsta mitybinius augalus jų skleidžiamų cheminių junginių dėka (Zhao, Kang, 2002, 2003). Tokios šiuos kenkėjus priviliojančios augalų skleidžiamos cheminės medžiagos priskiriamos kairomonams. Tačiau kol kas identifikuoti tik vieną minamusių rūšį – *Liriomyza sativae* - priviliojantys kairomonai (Wei et al., 2005). Atraktyvių minamusėms cheminių medžiagų nustatymas kaip ir minamusių elgesinių atsakų į mitybinių augalų skleidžiamas medžiagas ištyrimas padėtų suprasti esminius fiziologinius mechanizmus, atsakingus už vabzdžių elgseną aptinkant tinkamus mitybinius augalus. Taip pat tokių tyrimų rezultatai padėtų ateityje prognozuoti tiek šio kenkėjo gausumą, tiek plitimą, bei galėtų būti panaudoti naujų kovos priemonių, tame tarpe ir paremtų fotopesticidų taikymu, sukūrimu.

Darbo tikslas ir uždaviniai. Darbo tikslas - nustatyti bulvinės liriomyzos *Liriomyza bryoniae* mitybinių augalų skleidžiamus kairomonus, bei iširti fotosensibilizatorių poveikį bulvinei liriomyzai atrenkant efektyviausiai veikiančią (sukeliančią letalius efektus) fotosensibilizuojančią medžiagą.

Uždaviniai:

- 1) nustatyti bulvinės liriomyzos *L. bryoniae* patelių maitinimosi paros ritmą;
- 2) nustatyti *L. bryoniae* uoslės receptorių reakcijas į mitybinių augalų lakiuosius junginius;
- 3) įvertinti įvairių mitybinių augalų kvapo patrauklumą polifagai *L. bryoniae*;
- 4) įvertinti polifago *L. bryoniae* mitybinių augalų patrauklumą suaugėlio maitinimuisi ir kiaušinėlių dėjimui;
- 5) nustatyti kairomoną (vieninę medžiagą ar mišinį), atraktyvų bulvinei liriomyzai;
- 6) rasti efektyvų fotosensibilizatorių, sukeliančių letalius efektus, tačiau neslopinančio *L. bryoniae* maitinimosi;

7) įvertinti efektyvaus fotosensibilizatoriaus farmakokinetiką *L. bryoniae* organizme.

Darbo naujumas. Pirmą kartą nustatytas bulvinės lirijomyzos *Liriomyza bryoniae* patelių maitinimosi paros ritmas, užregistruotos bulvinės lirijomyzos *Liriomyza bryoniae* patelių ir patinėlių uoslinės reakcijos į mitybinių ir nemitybinio augalų kvapus bei įvertintas mitybinių augalų patrauklumas. Nustatytas pirmas atraktantas *Liriomyza bryoniae* rūšiai. Naudojant GC-EAD metodiką pirmą kartą nustatytos augalinės cheminės medžiagos (potencialūs kairomonai), svarbios *Liriomyza bryoniae* rūšiai. Sukurta originali metodika mitybos fotosensibilizatoriais elgsenos tyrimams *L. bryoniae* rūšies pavyzdžiu. Pirmą kartą palygintas kelių fotosensibilizatorių efektyvumas pagal jų sukeltus letalius efektus ir pagal maitinimosi jais laiką Agromyzidae šeimos minamusėms. Pirmą kartą nustatytas fotosensibilizatorius, kuris gali būti naudojamas kaip efektyvus fotopesticidas kovoje su bulvine lirijomyza *Liriomyza bryoniae* bei nustatyta per kiek laiko fotosensibilizatorius - hematoporfirino dimetilo eteris - pašalinamas iš *Liriomyza bryoniae* organizmo. Bendradarbiaujant su Medžiagotyros ir Taikomųjų Mokslų Institutu, jų sukurta metodika buvo pirmą kartą panaudota fotosensibilizatoriaus kiekio bei farmakokinetikos vertinimui pavienio vabzdžio organizme (*L. bryoniae* rūšies pavyzdžiu).

Mokslinė ir praktinė darbo reikšmė. Darbo rezultatai papildė Agromyzidae šeimos dvisparnių cheminės ekologijos bei elgsenos žinias. Jie yra svarbūs ir gali būti taikomi: identifikuojant *Liriomyza bryoniae* rūšies kairomonus; atliekant *Liriomyza bryoniae* bei kitų *Liriomyza* genties rūšių potencialių kairomonų paiešką; kuriant monitoringo bei ekologiškai nepavojingas kovos priemones *Liriomyza bryoniae* rūšiai; atliekant efektyviai veikiančių minamuses fotosensibilizatorių paiešką; kuriant fotopesticidų panaudojimo žemės ūkio kenkėjų gausumo reguliavimui programą.

Ginamieji darbo teiginiai:

1) mitybinių augalų kvapo patrauklumą bulvinei lirijomyzai *L. bryoniae* įtakoja vabzdžių maitinimosi patirtis lervos stadijoje;

2) polifagas *L. bryoniae* renkasi skirtingus augalus suaugėlių maitinimuisi ir kiaušinėlių dėjimui;

3) nustatytas *L. bryoniae* elgseną veikiantis kairomonas gali būti efektyvi, gaudyklių atraktyvumą didinanti šių kenkėjų monitoringo priemonė.

4) ekonomiškai svarbus augalų kenkėjas *L. bryoniae* yra jautrus fotosensibilizacijai, veikiant hematoporfirino dimetileteriu (HPde).

Darbo aprobavimas ir publikacijos. Disertacijos medžiaga buvo pristatyta tarptautinėse konferencijose: "Gyvūnų cheminė komunikacija. Fundamentalios problemos" (Maskva, Rusija, 2006), "23, 24, 25 kasmetinėse Tarptautinės Cheminės Ekologijos Draugijos konferencijose" (Jena, Vokietija, 2007; Pensilvanija, JAV, 2008; Neuchatel, Šveicarija, 2009). Tyrimų rezultatai paskelbti 5 moksliniuose straipsniuose (3 iš jų įtraukti į Mokslinės Informacijos Instituto (ISI WOS) duomenų bazes su *impact* faktoriumi) bei 3 konferencijų tezėse.

Disertacijos struktūra. Disertacijos rankraštį sudaro šie skyriai: Įvadas, Literatūros apžvalga, Medžiaga ir metodai, Rezultatai ir jų aptarimas (skyrius susideda iš 3 poskyrių), Išvados, 168 literatūros šaltinių sąrašas, autoriaus mokslinių publikacijų sąrašas, Priedai. Disertacijos apimtis – 127 puslapiai, 12 lentelių ir 37 paveikslai. Disertacija parašyta lietuvių kalba, o disertacijos santrauka – anglų kalba.

Padėkos. Nuoširdžiai dėkoju už visokeriopą pagalbą ir patarimus savo vadovui prof., habil. dr. Vincui Būdai bei visiems VUEI Cheminės ekologijos ir elgsenos laboratorijos

darbuotojams. Didelis ačiū dr. Sauliui Pakalniškiui ir dr. Henrikui Ostrauskui už naudingus patarimus ir pamokymus veisiant bulvinę lirijomyzą ir atliekant lauko eksperimentus, bei Erikui Lutovinovui už pagalbą apibūdinant dvisparnių rūšis. Dėkoju UAB “Evaldo daržovės” direktoriui Evaldui Masevičiui ir UAB “Kietaviškių gausa” už galimybę atlikti lauko tyrimus bei VU Medžiagotyros ir Taikomųjų Mokslų Institutui už fotosensibilizuojančias medžiagas. Taip pat dėkoju už suteiktas stipendijas: Lietuvos Valstybiniam Mokslo ir Studijų fondui ir World Federation of Scientists (Šveicarija), bei Vilniaus Universiteto Ekologijos Institutui už suteiktą galimybę studijuoti doktorantūroje.

LITERATŪROS APŽVALGA

Šiame skyriuje apžvelgiama *Liriomyza* genties vystymosi biologija, aptariami minamusių mitybinio augalo pasirinkimą ir atpažinimą lemiantys veiksniai bei šių vabzdžių daroma žala ekonomiškai svarbioms žemės ūkio kultūroms. Literatūros apžvalgoje taip pat analizuojamos kovos su šiais kenkėjais priemonės, aptariama kairomonų ir šviesos aktyvuojamų fotoinsekticidų (fotosensibilizatorių) naudojimo istorija bei dabarties perspektyvos.

MEDŽIAGA IR METODIKA

Tyrimų objektas – bulvinė lirijomyza *Liriomyza bryoniae* Kaltenbach (Diptera, Agromyzidae). *L. bryoniae* buvo auginama ant karklavijo *Solanum dulcamara* (Solanaceae) ir pupos *Vicia faba* (Fabaceae) laboratorinėmis sąlygomis. Suaugėliai suleidžiami į plastikinį keturkampį narvelį (16 cm aukščio, 7 cm pločio), kurio viršus uždengtas nailono tinkleliu, o apačia – poralonu. Narvelyje su 1 patele ir 2-3 patinėliais patalpinami pirmi šeši ar aštuoni pilnai išsiskleidę augalo lapai. Praėjus 3-4 dienoms narvelis su minamusėmis perkeliamas ant kito augalo. Augalas su *L. bryoniae* lervomis apsakamas plastikiniu maišeliu, į kurį surenkamos iš lapų į dirvą krentančios lėliukės. Minamusių lėliukės po vieną talpinamos į stiklinius mėgintuvėlius su drėgnu filtriniu popieriumi. Minamusės veisiamos esant $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$ temperatūrai, bei 15D:9N fotoperiodui. Spalio-balandžio mėn. buvo naudojamas dirbtinis apšvietimas – kaitinamoji, 400 W lempa (DRLF tipo, skirta šiltnamiams).

Tyrimuose naudoti augalai: pelkinis karklavijas, *Solanum dulcamara* L. (Solanaceae), pomidoras, *Lycopersicon esculentum* Mill. (Solanaceae), baltoji balanda, *Chenopodium album* L. (Amaranthaceae), baltažiedė notrelė, *Lamium album* L. (Lamiaceae), plaukuotoji dumplūnė, *Physalis pubescens* L. (Solanaceae), pupa, *Vicia faba* (Fabaceae), raukšlėtalapis erškėtis, *Rosa rugosa* Thunb. (Rosaceae).

Tyrimuose naudoti fotosensibilizatoriai: hematoporfirino dimetileteris (HPde), akridino oranžas (AO), metileno mėlis (MM) bei protoporfirino PpIX pirmtakas 5-amino levulino rūgštis (ALR) (“Merck”, JAV). Minėtos medžiagos buvo ištirpintos fiziologiniame tirpale ($2.5 \times 10^{-2}\text{M}$) ir iki bandymų laikomos -10°C .

L. bryoniae patelių maitinimosi elgsenos tyrimai. *L. bryoniae* patelių maitinimosi paros ritmas stebėtas 2005 m gegužės mėn. laboratorijoje, esant natūraliam fotorežimui (saulė tekėjo – 5 val., leidosi – 21 val.) bei $21 \pm 2^{\circ}\text{C}$ temperatūrai. Patelių stebėjimas

buvo pradedamas 11 val. ryte ir tęsiamas visą parą, t.y. 24 val. Tyrimų metu buvo skaičiuojami 1 dienos amžiaus patelių per 1 val. ant 1 karklavijo lapo padaryti maitinimosi pažeidimai. Vienu metu buvo stebimos 4-5 patelės. Iš viso stebėta 16 bulvinės lirijomyzos patelių. Statistinė analizė atlikta naudojant t-studento kriterijų.

L. bryoniae antenų sensilių reakcijų į lakiąsias chemines medžiagas registravimas. Stikliniai kapiliarai buvo užpildomi fiziologiniu tirpalu (NaCl, 0,9%) ir užmaunami ant Ag elektrodų. Vabzdžio galva atskiriama nuo kūno, kairiosios antenos aristos galiukas nukerpamas. Vienas kapiliaras įvedamas į galvos ertmę, kitas sujungiamas su nukirpta arista. Pastovi oro srovė, praėjusi anglies filtrus ir oro drėkintuvą, tekėjo 1,2 mL/min greičiu stikliniu vamzdeliu (Ø 6 mm), kurio galas nuo antenos buvo nutolęs 1 cm atstumu. Oras su testuojamomis cheminėmis medžiagomis (tai oras, praėjęs pro pastero pipetę su filtrinio popieriaus (Whatman® 1, Anglija) gabalėliu (2 mm × 0,5 mm), ant kurio buvo užnešama 6 mg testuojamo augalo sulčių) 6 mL/s greičiu buvo įpučiamas į pastovios oro srovės srautą 0,5 s laikotarpyje ir tokiu būdu pasiekdavo vabzdžio anteną. Statistinei analizei naudotas Vilkoksono ženklų kriterijų priklausomoms imtims.

Mitybinių augalų ir sintetinės cheminės medžiagos patrauklumo bulvinei lirijomyzai įvertinimas naudojant Y-tipo olfaktometrą. Tyrimuose naudojamas Y tipo olfaktometras (pagrindinio vamzdelio ilgis – 10 cm; atšakų ilgis – 12 cm; išsišakojimo kampas - 45°; vidinis diametras – 0,6 cm). Oro srovė 430 mL/min greičiu buvo leidžiama per aktyvuotos anglies filtrus, oro drėkintuvus ir stiklines talpas, į kurias buvo talpinami kvapų šaltiniai (6-8 pilnai išsiskleidę mitybinio augalo viršūnės lapai arba 1,5 mL plastikinis mėgintuvėlis, pripildytas 0,5 mL testuojamo sintetinio junginio). Bandyme buvo testuojami tik nesiporavę 1 dienos suaugėliai. Patinėliai prieš bandymą maitinami nebuvo. Patelės prieš bandymą ~ 24 val. galėjo maitintis vienu iš dviejų poroje esančių mitybinių augalų, vieną iš kurių olfaktometriniu bandymo metu turėdavo pasirinkti. Patelės ir patinėliai po vieną buvo leidžiami į olfaktometrą bei stebimi 5 min. Bandymai buvo atliekami dienos metu tarp 9 ir 18 val., esant $25 \pm 2^\circ\text{C}$ temperatūrai. Rezultatų statistinė analizė atlikta naudojant χ^2 kriterijų.

L. bryoniae patelių maitinimuisi ir kiaušinėlių dėjimui tinkamo augalo pasirinkimo tyrimai. Bandymai atlikti su bulvine lirijomyza, kurios lervos vystėsi maitinantis pupų *Vicia faba* lapais. Tyrimo sąlygos tokios pat kaip ir veisiant *L. bryoniae*, tik į veisimo plastikinį indą talpinami 2 mitybiniai augalai. Po 5 dienų narvelis su minamusėmis nuimamas nuo augalų ir suskaičiuojamos augalų lapuose patelių mitybos metu padarytos pažaidos. Po 3 – 5 dienų iš padėtų kiaušinėlių išsiritę lervutės, kurios tuoj pat pradeda maitintis ir ant augalų lapų pasirodo minos. Kadangi buvo svarbu suskaičiuoti apvaisintus kiaušinėlius, tai buvo nustatomas minų skaičius ir vertinamas kaip sudėtų kiaušinėlių skaičius. Statistinei analizei naudotas Vilkoksono ženklų kriterijus priklausomoms imtims.

Dujų chromatografijos ir EAG registravimas vienu metu (DC-EAD). Testuojamos pomidoro lakiosios medžiagos buvo surenkamos iš oro (adsorbentas Porapak Q) ir hidrodistiliacijos metodu. 2 µL tirpalo injekuojama “splitless” režimu į dujų chromatografą (DC) Clarus 500 (Perkin Elmer) su įmontuota EliteWax kolonėlė (30 m × 0.25 mm × 0.25 µm) ir papildomu išėjimu (temperatūros reguliatorius, TC-02, Syntech). Injektoriaus, detektoriaus ir EAD perdavimo linijos temperatūros buvo atitinkamai 230°C, 240°C ir 240°C. DC termostato temperatūra programuojama sekančiai: 2 min. izoterminė 40°C temperatūra, po to 6°C/min greičiu temperatūra kilo iki 150°C, tada 20°C/min greičiu vėl kilo iki 240°C ir ši temperatūra palaikoma 5 min. Vandenilis -

dujos-nešėjos (4 mL/min), azotas - pagalbinės dujos (4 mL/min). Iš kolonėlės išėjusios testuojamo mišinio medžiagos buvo suskirstomos į dvi dalis: viena dalis (50%) nukreipiama į LJD, kita (50%) – į EAD. EAG registravime naudotas signalų sujungimo įtaisas (IDAC 4, Syntech, Olandija), duomenys kaupiami ir analizuojami naudojant kompiuterinių programų paketą GCEAD version 4.4 (Syntech, Olandija).

Kai kurios pomidoro skleidžiamos medžiagos, sukėlusios pastovius *L. bryoniae* patelių ir patinėlių antenų atsakus, buvo identifikuotos minėtu dujų chromatografu panaudojus cheminius standartus bei HP 5890 dujų chromatografu su HP 5971 masių selektyvumo detektoriumi (DC/MS).

Metilsalicilato biologinio aktyvumo testavimas lauko sąlygomis. Lauko tyrimai atlikti 1 ha pomidorų šiltnamyje (Kietaviškės, Kaišiadorių raj.), rugpjūčio mėn., bei 0,5 ha salotų ir prieskoninių augalų šiltnamiuose (Sakalai, Šalčininkų raj.), rugsėjo mėn. (2006). Geltonos (25×13cm) (Biobest N.V., Belgija) ir aliuminio folijos (20×16cm) (pagamintos iš TetraPak sulčių pakelių, išteptų „Pestifix“ (Tartu, Estija) klijais Vilniaus Universiteto Ekologijos Instituto Cheminės ekologijos ir elgsenos laboratorijoje) spalvos lipnios kortelės buvo iškabintos ant varinių vielų ~30 cm aukštyje nuo augalų viršūnių. Prie kiekvienos gaudyklės 2 cm aukštyje nuo centro buvo tvirtinami 2 mL talpos plastmasiniai mėgintuvėliai su 0.25, 0.5 ir 1 ml metilsalicilato (MeSa, ≥99%, Carl Roth GmbH, Germany) ir lengvai užkemšami vatos gabalėliu. Kontrolinėse gaudyklėse mėgintuvėliai paliekami tušti. Gaudyklės iškabintos trimis eilėmis, 12 m atstumu viena nuo kitos, atsitiktine tvarka. Kiekvieno bandymo atlikti trys pakartojimai. Po 10 dienų Kietaviškių ir po 14 dienų Sakalų šiltnamiuose gaudyklės buvo surenkamos, sugavimai analizuojami naudojant Kruskalio-Voliso ranginį kriterijų nepriklausomoms imtims.

Minamusių maitinimosi masalu su fotosensibilizatoriais elgsenos registravimas. Minamusių suaugėlių mitybos masalu su fotosensibilizatoriumi aktyvumas buvo vertinamas pagal laiką, kurį vabzdys praleido demonstruodamas mitybos elgesį (besimaitinantis vabzdys buvo šalia mitybos šaltinio (masalo) su nuleista žemyn galva ir ištiestu straubliuku), vabzdį stebint 30 min. Registruojant mitybos/nemitybos elgesio aktų trukmę buvo naudojama originali kompiuterio programa, leidusi vienu metu registruoti 5 suaugėlių elgesį, vienam suaugėliui priskiriant atskirą kanalą, tai yra atskirą klaviatūros (paspaudimo/atleidimo) mygtuką. Mitybos/nemitybos elgesys buvo registruojamas paspaudžiant/atleidžiant kompiuterio klaviatūros mygtuką. Stebėjimas atliktas prie raudonos šviesos, $22 \pm 1^\circ\text{C}$. Raudona šviesa užtikrina fotosensibilizatoriaus stabilumą masale. Minamusių stebėjimo metu buvo maitinamos individualiuose mėgintuvėliuose. Mitybos šaltinis – poralono gabalėlis sudrėkintas masalu (1 mL cukraus/vandens tirpalo (koncentracija 0,2 g/mL) ir 150 μL fotosensibilizatoriaus/fiziologinio tirpalo mišinio (koncentracija $2,5 \times 10^{-2}$ M). Tyrimai atlikti su nemaitintais, 8-24 val. amžiaus *L. bryoniae* patinėliais ir patelėmis. Kiekvieną kontrolinę ir testuojamų vabzdžių grupę sudarė 15 suaugėlių. Statistinė maitinimosi skirtumų analizė atlikta naudojant Vilkoksono ženklų kriterijų priklausomoms imtims.

Fotosensibilizatorių toksiškumo *L. bryoniae* minamūsėms vertinimas. Kontrolinė vabzdžių grupė maitinasi tik cukraus tirpalu (0,2 g cukraus/1 mL distiliuoto vandens), o testuojamoji – cukraus tirpalu su fotosensibilizatoriumi. Abi vabzdžių grupės buvo maitinamos 15 val. tamsoje ir 5 val. prie raudonos šviesos esant $22 \pm 1^\circ\text{C}$ temperatūrai. Vabzdžių švitinimui buvo naudojamas dirbtinis šviesos šaltinis, sudarytas iš volframo lempos (500W), optinės sistemos šviesos fokusavimui ir optinio filtro UV ir infraraudonųjų spindulių eliminavimui ($370 \text{ nm} < \lambda < 680 \text{ nm}$). Šviesos intensyvumas

ląstelių lygmenyje – 30 mW/cm^2 . Vabzdžiai buvo švitinami 30 min., suminė švitinimo dozė neviršijo 54 J. Po švitinimo išgyvenę vabzdžiai buvo maitinami cukraus tirpalu, jų mirtingumas registruojamas kiekvieną dieną. Tiek testuojamąją, tiek kontrolinę vabzdžių grupę sudarė 10 patelių arba patinėlių. Atlikti 2-3 eksperimento pakartojimai su kiekviena grupe. Standartinė paklaida skaičiuojama kiekvienam eksperimento taškui ir grafikuose žymima kaip atkarpa. Statistinė išgyvenamumo analizė atlikta naudojant Cox'o F testą.

Fotosensibilizatoriaus farmakokinetikos vertinimas vabzdžio organizme. Po vabzdžių maitinimo masalu su fotosensibilizatoriumi 48 val. laikotarpyje kas 8 val. vabzdžių grupės po 12 suaugėlių (patinėlių arba patelių) buvo užšaldomos -18°C temperatūroje ir nustatomas fotosensibilizatoriaus kiekis jų organizme. Vertinant HPde farmakokinetiką *L. bryoniae* organizme buvo tiriamas HPde fluorescencijos intensyvumas užšaldytuose vabzdžiuose. Fluorescencijos spektrai buvo užrašomi nuo kiekvieno atskiro individo 590-650 nm bangos ilgių ruože. Kadangi vabzdžių dydis buvo 1 - 2 mm, tai leido nustatyti HPde fluorescenciją nuo viso vabzdžio kūno. Fotosensibilizatoriaus farmakokinetika vabzdžio organizme buvo registruojama naudojant standartinį liuminescencinį spektrometrą. Sužaditimui sukelti naudojamas šviesą skleidžiantis 2 mW galingumo diodas, (skleidžiamos šviesos bangos ilgis - 394 nm). Suminė apšvitos dozė - mažesnė nei 0,5 J (žymiai mažesnė už naudotą vabzdžių išgyvenamumo testuose). Diodo skleidžiama šviesa ant vabzdžio kūno išsidėstė 2 mm skersmens taške. Antrinis spinduliavimas nuo vabzdžio kūno buvo surenkamas lęšių sistema ir išsklaidomas dvigubo monochromatoriaus (Jobin Yvon Model HRD-1) pagalba. Duomenų surinkimui naudotas atvėsintas fotodaugintuvas (Hamamatsu R1463P) sujungtas su fotonus skaičiuojančia sistema. Visi matavimai atlikti kambario temperatūroje. Atlikti 3 bandymo pakartojimai su kiekviena vabzdžių grupe.

REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

***L. bryoniae* patelių maitinimosi paros ritmas.** Kairomonų tyrimų pradiniam etape buvo svarbu nustatyti bulvinės liriomyzos maitinimosi paros ritmą, kadangi nuo gautų rezultatų priklausė, kokių paros metu bus atliekami tolimesni tyrimai, susiję su mitybinių augalų pasirinkimu. Bandyje buvo stebėtos tik patelės, kadangi tik jos geba lape padaryti maitinimosi pažeidimus, taigi yra atsakingos už mitybinio augalo pasirinkimą bei daromą žalą. *Liriomyza bryoniae* patelių didžiausias maitinimosi intensyvumas (saulei tekant 5val., o leidžiantis 21val.) yra 9 val. ryte ($p < 0,01$, pagal t-studento kriterijų). Po to patelės beveik tolygiai maitinasi visą dieną iki saulėlydžio (1 pav.)

***L. bryoniae* antenų sensilių suminės reakcijos (EAG) į augalų kvapus.** *Liriomyza bryoniae* patelių ir patinėlių reakcijos į mitybinių augalų (karklavijo, pomidoro, baltažiedės notrelės, plaukuotosios dumplūnės) kvapus skiriasi statistiškai patikimai nuo reakcijos į nemitybinio augalo (raukšlėtalapio erškėčio) kvapą (2 pav.). Taip pat pastebėti reakcijų skirtumai, priklausantys nuo minamųjų lyties: didžiausias patelių antenų sensilių reakcijas iššaukė plaukuotoji dumplūnė ($0,62 \pm 0,08 \text{ mV}$) ir baltažiedė notrelė ($0,66 \pm 0,08 \text{ mV}$), o patinėlių - tik plaukuotoji dumplūnė ($0,84 \pm 0,11 \text{ mV}$). Notrelės kvapas sukėlė didžiausią reakciją patelėms, patinėliams sukėlė tik nedidelę, $0,47 \pm 0,04 \text{ mV}$ dydžio reakciją ($Z=1,92$, $p=0,055$). Tuo tarpu visais kitais atvejais

patinėlių antenų sensilių reakcijos į mitybinių augalų kvapus buvo šiek tiek didesnės nei patelių, nors statistiškai patikimai ir nesiskyrė.

Mitybinių augalų kvapo patrauklumas *L. bryoniae*. Pirmiausiai buvo tiriamos bulvinės liriomyzų suaugėlių reakcijos į augalo, ant kurio jos buvo veisiamos, kvapą, tai yra minamusės Y-tipo olfaktometre galėjo rinktis arba gryno oro srovę, arba oro srovę su augalo (karklavijo) kvapu. Bandymo metu išryškėjo skirtumai tarp patelių ir patinėlių pasirinkimo (3 pav.). Tik prieš bandymą ant augalo pasimaitinusios patelės patikimai dažniau rinkosi oro srovę su augalo kvapu nei gryno oro srovę ($\chi^2 = 6,25$, $p < 0,012$). Nesimaitinusios patelės oro srovę su augalo kvapu rinkosi tiek pat dažnai kaip ir gryno oro srovę. Tai leidžia manyti, kad patelėms renkantis mitybinį augalą svarbų vaidmenį vaidina patirtis. Skirtingai nuo patelių nemaitinti patinėliai patikimai dažniau rinkosi oro srovę su augalo kvapu ($\chi^2 = 4,0$, $p < 0,05$). Kadangi patinėliams svarbu surasti jau pažeistą augalą, buvo tiriamos ir jų reakcijos į augalo, ant kurio prieš eksperimentą maitinosi bulvinės liriomyzų patelės, kvapą. Tačiau jokių pasirinkimo skirtumų pastebėta nebuvo (3 pav.).

Vertinant įvairių mitybinių augalų kvapo patrauklumą bulvinei liriomyzai tiek patelių, tiek patinėlių atveju išsiskyrė vienas augalas – karklavijas. Patinėliams šio augalo kvapas buvo patrauklesnis už kitų tyrime naudotų mitybinių augalų kvapus (4 pav.). Patelėms karklavijo kvapas nebuvo visais atvejais patraukliausias, tačiau tai vienintelis augalas kurio kvapas 4 (iš 7 atliktų) pasirinkimo tyrimuose buvo statistiškai patikimai patrauklesnis už kitų tuose tyrimuose naudotų augalų kvapus. Bulvinės liriomyzų patelėms karklavijo kvapas buvo patrauklesnis už pomidoro, notrelės (tuo atveju, kai prieš bandymą patelės maitinosi notrele), bei balandos (tuo atveju, kai prieš bandymą patelės maitinosi karklaviju) kvapą (5 pav.). Atsižvelgiant į tai, kad karklavijas yra augalas, kuriame vystėsi minamusės (daugiau nei 3 kartos) naudotos šiame bandyme, galima daryti prielaidą, kad *L. bryoniae* augalą-šeimininką renkasi pagal Hopkinso principą, t.y., kad dauguma vabzdžių suaugėlių pirmenybę teikia tiems augalams-šeimininkams, kuriais jie mito būdami lervos stadijoje. Mūsų prielaidą, kad bulvinės liriomyzų patelės ir patinėliai renkasi karklavijo kvapą labiau nei kitus dėl įgytos patirties lervos stadijos metu patvirtina kito bandymo rezultatai. *L. bryoniae* suaugėliai užaugę misdami pupų *Vicia faba* lapų parenchiminiais audiniais pasirinkimo tarp karklavijo ir pomidoro kvapų Y-olfaktometre metu pirmenybės karklavijo kvapui nebeteikė (6 pav.).

Taip pat šių olfaktometrinių bandymų metu buvo pastebėta, kad *L. bryoniae* patelių augalo pasirinkimą gali modifikuoti jų patirtis ir ankstyvojoje suaugėlio stadijoje. *L. bryoniae* patelių pasirinkimas tarp dviejų augalų kvapų dar priklauso ir nuo to, kuriuo iš augalų jos maitinosi prieš pasirinkimą (5 pav.).

Augalo tinkamo *L. bryoniae* patelių maitinimuisi ir kiaušinėlių dėjimui pasirinkimas. Analizuojant tyrimo metu gautus rezultatus galima teigti, jog *L. bryoniae* maitinimuisi patraukliausias ir tinkamiausias mitybinis augalas (iš bandyme tirtų) – karklavijas *S. dulcamara* (7A pav.). Taigi karklavijas pagal savo struktūrinės ar maistinės savybes bei skleidžiamas chemines medžiagas bulvinės liriomyzų mitybai yra labiau tinkamas nei pomidoras, baltažiedė notrelė, plaukuotoji dumplūnė ar baltoji balanda.

Vertinant bulvinės liriomyzų tinkamo augalo kiaušinėlių dėjimui pasirinkimą, taip pat galima išskirti vieną augalą, tai - plaukuotoji dumplūnė (7B pav.). Čia reikėtų atkreipti dėmesį ir į elektrofiziologinių bei olfaktometrinių tyrimų rezultatus. Dumplūnė

sukėlė vienas iš didžiausių *L. bryoniae* patelių (taip pat ir patinėlių) antenų sensilių reakcijas. Taip pat plaukuotoji dumplūnė buvo vienintelis augalas, kurio kvapas olfaktometriniuose bandymuose savo patrauklumu patelėms nenusileido karklavijo kvapui tiek bulvinės lirijomyzos patelėms prieš bandymą maitinantis karklaviju, tiek dumplūne. Taigi galima daryti prielaidą, kad plaukuotoji dumplūnė skleidžia medžiagas, skatinančias *L. bryoniae* patelių kiaušinėlių dėjimą.

Potencialūs, *L. bryoniae* elgseną lemiantys kairomonai. Iš aukščiau aptartų rezultatų matyti, kad išrinkti vieną, patraukliausią *L. bryoniae* mitybinį augalą labai sunku. Polifagas mitybinį augalą renkasi priklausomai nuo jo fiziologinės būklės, nuo mitybinio augalo tinkamumo maitinimuisi ir kiaušinėlių dėjimui, nuo vabzdžio įgytos patirties lervos stadijoje. Kairomonų tyrimams buvo pasirinktas pomidoras *Lycopersicon esculentum* dėl kelių priežasčių: jis buvo vienas patraukliausių augalų bulvinės lirijomyzos kiaušinėlių dėjimui; tai vienas geriausiai chemiškai iširtų bulvinės lirijomyzos mitybinių augalų, kas palengvina kairomonų identifikavimą; tai ekonomiškai svarbus augalas, labai dažnai kenčiantis nuo minėto kenkėjo antpuolių pramoniniuose šiltnamiuose Lietuvoje (Ostrauskas et al., 2003). Naudojant DC-EAD metodiką buvo nustatyti 7 junginiai iš oro surinktame pomidoro skleidžiamų lakiųjų medžiagų mišinyje, kurie sukėlė didžiausius ir pastovius *L. bryoniae* patelių antenų sensilių atsakus (8 pav.). Daugumos minėtų aktyvių junginių kiekiai buvo labai maži, todėl kol kas identifikuoti tik du iš jų. Tai – metilsalicilatas ir (Z)-3-heksenolis. Mišinio, gauto hidrodistiliacijos metodu, analizės metu nustatytos dar 9 medžiagos, sukėlusios pastovius *L. bryoniae* patelių antenų sensilių atsakus. Taigi iš viso nustatyta 16 pomidoro skleidžiamų medžiagų, kurios yra svarbios *L. bryoniae* patelėms aptinkant ir atpažįstant pomidorą. Atliekant tokius pat tyrimus su bulvinės lirijomyzos patinėliais, pastarieji reagavo į tas pačias pomidoro skleidžiamas medžiagas kaip ir patelės.

Metilsalicilato kairomoninės savybės. Lauko bandymų Kietaviškių pomidorų šiltnamiuose metu nustatyta, kad metilsalicilatas (MeSa) yra atraktyvus *L. bryoniae*, ir kad jo atraktyvumą įtakoja gaudyklių spalva.

Buvo nustatytas statistiškai patikimas MeSa atraktyvumas bulvinei lirijomyzai naudojant geltonas gaudyklės (sugautų individų skaičiaus vidurkis geltonose, MeSa turinčiose gaudyklėse – $12,3 \pm 0,7$ vabzdžiai/gaudyklėj, geltonose kontrolinėse gaudyklėse be MeSa – $5,5 \pm 1$ vabzdžiai/gaudyklėj) ($H=3,85$, $p<0,05$) (9 pav.). MeSa padidino geltonų gaudyklių patrauklumą beveik 2,2 karto.

Lyginant *L. bryoniae* sugavimus aliuminio folijos spalvos gaudyklėmis statistiškai patikimų skirtumų gauta nebuvo (sugautų individų skaičiaus vidurkis MeSa turinčiose gaudyklėse – $1,33 \pm 0,20$ vabzdžiai/gaudyklėj, kontrolinėse gaudyklėse – $0,66 \pm 0,33$ vabzdžiai/gaudyklėj) (9 pav.). Taigi MeSa nėra atraktyvus *L. bryoniae* rūšiai, kuomet naudojamas su aliuminio folijos spalvos gaudyklėmis. Bulvinės lirijomyzos sugavimų skirtumai tarp dviejų kontrolinių gaudyklių grupių buvo gauti dėl skirtingos gaudyklių spalvos: geltonos spalvos kontrolinės gaudyklės buvo kur kas patrauklesnės už aliuminio folijos spalvos kontrolines gaudyklės ($H=4,09$, $p=0,043$) (9 pav.). Naudojantis šia savybe buvo kuriamos komercinės gaudyklės (geltonos lipnios kortelės) (Parella, 1987). Literatūroje duomenų apie kombinuotą dviejų stimulų (regimojo ir uodžiamojo) poveikį Agromyzidae elgsenai rasta nebuvo.

Gauti duomenys apie MeSa kaip augalinės kilmės atraktantą augalėdžiams vabzdžiams leidžia šį junginį priskirti kairomonams. MeSa nėra specifinis *L. bryoniae* atraktantas: ši

medžiaga privilioja dar 3 rūšių dvisparnius, priklausančius Syrphidae šeimai (Molleman et al., 1997).

Tiriant MeSa patrauklumą bulvinei lirijomyzai laboratorinėmis sąlygomis Y olfaktometre, išryškėjo skirtumai tarp skirtingos lyties individų. Olfaktometrinių bandymų metu buvo nustatyta, kad tik patelės patikimai dažniau renkasi oro srovę su metilsalicilato kvapu (72%) ($\chi^2 = 4,84$, $p=0,03$, $n=25$). Patinėliams taip pat būdinga tendencija dažniau rinktis oro srovę su MeSa kvapu (58%) nei oro srovę be MeSa kvapo (42%), nors statistiškai patikimo skirtumo nenustatyta ($\chi^2 = 0,67$, $p=0,41$, $n=24$). Skirtumus tarp patelių ir patinėlių elgesinių reakcijų galėjo lemti tyrimuose naudota MeSa dozė, kuri galėjo būti optimali patelėms, bet ne patinėliams.

MeSa yra pirmas ir vienintelis atraktantas identifikuotas ekonomiškai svarbiai *L. bryoniae* rūšiai. Gauti rezultatai svarbūs taikymo aspektu. Šiuo metu geltonos lipnios kortelės yra naudojamos kaip monitoringo priemonė Agromyzidae rūšims tiek mažose, tiek dideliuose pramoniniuose ūkiuose. Remiantis gautais rezultatais galima teigti, kad sintetinis metilsalicilatas gali būti efektyvi papildoma priemonė padidinanti gaudyklų patrauklumą ir taip padidinanti monitoringo priemonių „jautrumą“.

Lauko bandymų metu buvo nustatytos dar dvi dvisparnių rūšys, kurioms MeSa buvo patrauklus. Tai *Drosophila busckii* Coquillett (Drosophilidae) ir *Pollenia rudis* Fabricius (Calliphoridae). Bendras pagautų rūšių skaičius geltonomis gaudyklėmis su MeSa buvo 3255 *D. busckii* ir 166 *P. rudis*. Kontrolinėse geltonose gaudyklėse atitinkamai buvo pagauta 46 ir 51 šių dvisparnių rūšių.

D. busckii sugavimų vidurkis geltonomis, MeSa turinčiomis gaudyklėmis (814 ± 55 vabzdžiai/gaudyklė) statistiškai patikimai skyrėsi nuo sugavimų vidurkio kontrolinėmis gaudyklėmis be MeSa (12 ± 4 vabzdžiai/gaudyklė) ($H=5,33$, $p = 0,02$). MeSa yra pirmas šiai rūšiai identifikuotas atraktantas. *P. rudis* sugavimų vidurkis geltonomis, MeSa turinčiomis gaudyklėmis (42 ± 4 vabzdžiai/gaudyklė) taip pat statistiškai patikimai skyrėsi nuo sugavimų vidurkio geltonomis kontrolinėmis gaudyklėmis be MeSa (13 ± 4 vabzdžiai/gaudyklė) ($H=5,39$, $p = 0,02$). Nors geltona spalva pati buvo patraukli šiai rūšiai, MeSa statistiškai patikimai padidino gaudyklų patrauklumą, todėl gali būti priskiriamas *P. rudis* atraktantams. Tai yra antras atraktantas, nustatytas šiai rūšiai.

***L. bryoniae* mitybos masalu su skirtingais fotosensibilizatoriais aktyvumas.** Bulvinės lirijomyzos mitybos aktyvumas tiek masalu, į kurio sudėtį įėjo skirtingi fotosensibilizuojantys junginiai, tiek kontroliniu masalu be fotosensibilizatoriaus priklauso nuo vabzdžio lyties. Patelės 1,5 karto ilgiau maitinasi kontroliniu masalu nei patinėliai (patelių vidutinė maitinimosi trukmė 30 min. laikotarpyje – 13,25 min., o patinėlių – 8,45 min. ($Z=2,21$, $p=0,027$)) (10 pav.). Šį skirtumą galėjo lemti tiek skirtingos lyties vabzdžių kūno masės skirtumai (patelės stambesnės už patinėlius), tiek patelių biologinis aktyvumas. Tokios pačios maitinimosi trukmės proporcijos buvo registruotos minamusėms maitinantis masalu, į kurio sudėtį įėjo HPde arba ALR: maitinantis masalu su HPde patelių vidutinė maitinimosi trukmė buvo 13,06 min., o patinėlių – 7,42 min. ($Z=2,10$, $p=0,03$), maitinantis masalu su ALR atitinkamai 13,26 min. ir 7,55 min. ($Z=2,21$, $p=0,027$). Tad HPde ir ALR neįtakoja *L. bryoniae* patelių maitinimosi lyginant šias dvi medžiagas su kontrole. Tuo tarpu metileno mėlis pasižymi deterento savybėmis, kadangi žymiai sutrumpina patelių maitinimosi masalu laiką ($Z=2,27$, $p=0,023$). Akridino oranžas pagal deterentiškumą *L. bryoniae* patelėms laipsniškai priklauso tarpiniams junginiams. Patelėms ir patinėliams maitinantis masalu su minėta fotoaktyvia medžiaga mitybos aktyvumo skirtumai tarp lyčių sumažėjo. *L. bryoniae*

patinėlių maitinimuisi visi minėti fotosensibilizatoriai įtakos nedaro (statistiškai patikimų skirtumų nėra).

Fotoaktyvių junginių efektyvumas priklauso nuo vabzdžių maitinimosi jais aktyvumo, tai yra nuo patekusio į vabzdžio organizmą fotosensibilizatoriaus kiekio. Šiame kontekste mūsų bandymo metu nustatyti mitybos aktyvumo skirtumai tarp patelių ir patinėlių yra labai svarbūs taikymui, kadangi tik patelės atsakingos už kenkėjų paplitimą (pasirenka mitybinius augalus ir deda kiaušinėlius) bei mitybiniam augalams daromą žalą (geba pradurti lapo paviršių maitinimosi metu).

Šviesos aktyvuotų fotosensibilizatorių poveikis *L. bryoniae* išgyvenamumui. Fotosensibilizatorių poveikio bulvinei lirijomyzai efektyvumo tyrimams buvo pasirinkti tie fotoaktyvūs junginiai, kurie vabzdžių mitybos aktyvumo nekeitė: HPde, ALR, AO.

Tiriant HPde poveikį bulvinei lirijomyzai, vabzdžiai buvo maitinami masalu su HPde ir švitinami dirbtiniu šviesos šaltiniu. Jau švitinimo bandymų metu žuvo 50% bulvinės minamusės patinėlių ir 100% patelių (11 pav.). Likusieji patinėliai išgyveno iki 3 parų. Tuo tarpu patinėliai kontrolinėje grupėje išgyveno iki 25 parų, o patelės - iki 27 parų (duomenys pateikti 11 pav. rodo tik 9 dienų periodą). Nustatyta, kad pats HPde nėra toksiškas: nebuvo pastebėta jokio žymaus bulvinės lirijomyzos patelių ir patinėlių išgyvenamumo sumažėjimo po jų maitinimo masalu su HPde nesant švitinimui. Taip pat jokio poveikio nesukėlė ir vabzdžių švitinimas matoma šviesa (54J), kai vabzdžiai buvo maitinami masalu be HPde.

Tiriant AO ir ALR poveikį bulvinei lirijomyzai panašaus fotosensibilizacijos poveikio, koks buvo stebėtas naudojant HPde, nustatyta nebuvo. Vabzdžių išgyvenamumas tiek kontrolinėje, tiek testuojamojoje grupėse buvo panašus: naudojant AO patelės kontrolinėje grupėje išgyveno iki 24d., o testuojamojoje - iki 25d. ($F=1,15$, $p=0,37$), patinėliai – atitinkamai iki 18d. ir iki 23d. ($F=1,17$, $p=0,36$); naudojant ALR patelės kontrolinėje grupėje išgyveno iki 19d., o testuojamojoje - iki 25d. ($F=1,25$, $p=0,31$), patinėliai – atitinkamai iki 19d. ir iki 23d. ($F=1,55$, $p=0,16$).

Hematoporfirino dimetileterio (HPde) kiekio ir jo akumuliacijos *L. bryoniae* organizme nustatymas. Gauti duomenys rodo, kad santykinis HPde kiekis, susikaupęs bulvinės lirijomyzos patelės organizme yra daug didesnis už HPde kiekį patinėlio organizme (12 pav.). Taigi šie duomenys rodo, kad maitinimosi trukmė gerai atspindi su maistu gaunamo fotosensibilizatoriaus kiekį. Taip pat įdėtinis grafikas 12 paveiksle rodo, kad HPde akumuliacija *L. bryoniae* organizme priklauso nuo laiko. Didžiausias HPde kiekis tiek patelės, tiek patino organizme būna praėjus 16 val. po vabzdžių maitinimo masalu su HPde. Praėjus 48 val. po HPde patekimo su maistu tiek į patelių, tiek į patinėlių organizmą, fotosensibilizatoriaus vabzdžiuose rasta nebuvo. Remiantis fluorimetriniais tyrimais buvo apskaičiuotas HPde kiekis minamusėse, sukėlęs jų mirtingumą minėtų išgyvenamumo eksperimentų metu. Tai – $1,2 \times 10^{-5}$ g/vabzdžiui.

IŠVADOS

1. Polifago *L. bryoniae* patelėms būdingas maitinimosi paros ritmas: patelės perforuoja mitybinio augalo lapus tik šviesiuoju paros metu, apie 11% intensyviau fotofazės pradžioje (4 val. po saulėtekio) nei fotofazės pabaigoje (1val. iki saulėlydžio).
2. *L. bryoniae* suaugėliai maitinimuisi ir kiaušinėlių dėjimui renkasi skirtingus augalus: nuo 2,5 iki 9,5 kartų intensyviau maitinasi karklaviju (*Solanum dulcamara*) nei pomidoru (*Lycopersicon esculentum*), dumplūne (*Physalis pubescens*), notrele (*Lamium album*), balanda (*Chenopodium album*), o kiaušinėlius deda nuo 4,3 kartų daugiau ant dumplūnės nei karklavijo.
3. *L. bryoniae* ♀♀ ir ♂♂ uoslės receptorių didžiausias reakcijas (EAG) sukelia dumplūnės išskiriamos lakiosios medžiagos: $0,62 \pm 0,08$ mV patelėms ir $0,84 \pm 0,11$ mV patinams. Notrelės medžiagos sukelia tokias pat reakcijas patelėms $0,66 \pm 0,08$ mV, tačiau kur kas mažesnes patinams $0,47 \pm 0,04$ mV ($p=0,055$).
4. *L. bryoniae* elgesines reakcijas į mitybinio augalo kvapą įtakoja lervos maitinimasis: ♂♂ ir ♀♀ užauginti ant karklavijo, šio augalo kvapą renkasi statistiškai patikimai dažniau nei pomidoro; ♂♂ ir ♀♀ užauginti ant pupos karklavijo kvapą renkasi taip pat dažnai kai ir pomidoro. *L. bryoniae* patelių elgesinės reakcijos į mitybinio augalo kvapą priklauso ir nuo augalo, kuriuo maitinosis ankstyvojoje suaugėlio stadijoje.
5. Pomidoro į aplinką skleidžiamų medžiagų mišinyje yra ne mažiau kaip 16 cheminių junginių, į kurias reaguoja *L. bryoniae*. Iš jų identifikuotos dvi: metilsalicilatas ir (Z)-3-heksenolis. Metilsalicilatas (MeSa) yra patrauklus *L. bryoniae* patelėms laboratorijos sąlygomis. Lauko sąlygomis ši medžiaga atraktyvi veikdama kartu su geltonos spalvos regimuoju stimulu. MeSa *L. bryoniae* minamusėms yra kairomonas.
6. Į *L. bryoniae* suaugėlių organizmą patekęs fotosensibilizatorius hematoporfirino dimetileteris (HPde) per 5 min. sukelia letalius efektus vabzdžiams patekus į saulės šviesą. Patelės žūsta greičiau nei patinėliai: per 30 min. patelės, per 3 paras patinėliai. HPde *L. bryoniae* patelių ir patinėlių maitinimosi neįtakoja.
7. Efektyvaus fotosensibilizatoriaus hematoporfirino dimetileterio per 48 val. bulvinės lirijomyzos organizme nelieka. Jis pašalinamas arba suskyla.

LIST OF PUBLICATIONS CONTAINING THE MATERIAL OF THE DISSERTATION

MOKSLINĖS PUBLIKACIJOS DISERTACIJOS TEMA

1. Lukšienė Ž., Būda V., **Radžiutė S.** 2005. Effects of visible-light-activated hematoporphyrin dimethyl ether on the survival of leafminer *Liriomyza bryoniae*. *Ekologija* 3: 17-21.
2. Būda V., Lukšienė Ž., **Radžiutė S.**, Kurilčik N., Juršėnas S. 2006. Search for photoinsecticides: effect of hematoporphyrin dimethyl ether on leafmining pest *Liriomyza bryoniae* (Diptera: Agromyzidae). *Agronomy research* 4 (special issue): 141-146.
3. Lukšienė Ž., Kurilčik N., Juršėnas S., **Radžiutė S.**, Būda V. 2007. Towards environmentally and human friendly insect pest control technologies: Photosensitization of leafminer flies *Liriomyza bryoniae*. *Journal of photochemistry and photobiology B: Biology* 89(1): 15-21.
4. Būda V., **Radžiutė S.** 2008. Kairomone attractant for the leafmining fly, *Liriomyza bryoniae* (Diptera, Agromyzidae). *Zeitschrift für Naturforschung* 63c: 615-618.
5. Būda V., **Radžiutė S.**, Lutovinovas E. 2009. Attractant for Vinegar Fly, *Drosophila busckii*, and Cluster Fly, *Pollenia rudis* (Diptera: Drosophilidae et Calliphoridae). *Zeitschrift für Naturforschung* 64c: 267-270.

ABSTRACTS OF CONFERENCE REPORTS

KONFERENCIJŲ TEZĖS

1. **Radžiutė S.**, Būda V. 2006. Ольфакторная (ЭФГ и поведенческая) реакция полифага *Liriomyza bryoniae* (Diptera, Agromyzidae) на летучие вещества кормовых растений. 'Химическая коммуникация животных. Фундаментальные проблемы', Материалы конференции. 29 Ноября - 1 Декабря, Москва, Россия, с. 17.
2. Būda V., **Radžiutė S.** 2008. Reaction of leafminer *Liriomyza bryoniae* to plant volatiles. *The 25th ISCE Anniversary Meeting Overview. 17-22 August, Pennsylvania, USA*, p. 155.
3. **Radžiutė S.**, Apšegaitė V., Butkienė R., Būda V. 2009. GC-EAD responses of tomato leafminer *Liriomyza bryoniae* (Diptera, Agromyzidae) females to tomato headspace volatiles. *The 25th ISCE Annual Meeting. Meeting Overview, 23-27 August, Neuchatel, Switzerland*, p. 264.

CURRICULUM VITAE

Name: Sandra Radžiutė

Date and place of birth:

6 April, 1979, Radviliškis, Lithuania

Office address:

Institute of Ecology of Vilnius University, Akademijos 2, LT-08412
Vilnius-21, Lithuania.

Phone +370 5 272 92 42

E-mail: sandrar@ekoi.lt, sansara99@hotmail.com

Education:

2005-2009 PhD studies at the Institute of Ecology of Vilnius University.

2001-2003 Master's Degree in Ecology and Environmental Studies, Centre for Environmental Studies, Vilnius University.

1997-2001 Bachelor's Degree in Ecological Biology, Faculty of Natural Sciences, Vilnius University.

Appointment and position:

A junior researcher in Laboratory of Chemical and Behaviour Ecology at the Institute of Ecology of Vilnius University (2009-present);

An engineer in Laboratory of Chemical and Behaviour Ecology at the Institute of Ecology of Vilnius University (2003–2005).