

A kutatás legfőbb eredményei részletezve

A kutatás eredményeit a tudományos kutatások jegyzéke tartalmazza, amely 5 nemzetközi publikációból és 4 konferencia kiadványból áll. Röviden, pontokban összefoglalom az egyes eredményeket és az abból született publikációkat:

1. A kukorica zöld növényei részéből származó nonanal és dekanal 1:2,4 arányú keveréke vonzza a kukoricamoly nőtényeit laboratóriumi körülmények között.

B. P. Molnár, Z. Tóth, A. Fejes-Tóth, T. Dekker, **Z. Kárpáti** (2015) Electrophysiologically-active maize volatiles attract gravid female European Corn Borer, *Ostrinia nubilalis*. *Journal of Chemical Ecology* 41:997-1005
IF: 2.74

2. Egy korábban elkezdett vizsgálat folytatásaként sikerült feltárnunk szélcsatornában és fiziológiai mérésekkel alátámasztani a hím kukoricamoly feromonra repülésének különböző lépéseit és megmagyaráznunk azt a jelenséget, hogy miért tévesztik el az illatforrást a hímek repülés közben ha már elindultak a nekik megfelelő forrás felé.

Kárpáti Z., Tasin, M., Cardé, R. T., Dekker, T. (2013) Early quality assessment lessens pheromone specificity in a moth *Proceeding of the National Academy of Sciences USA* 110: 7377-82.
IF: 9.69

Capurro, A., Baroni, F., Kuebler, L., **Kárpáti, Z.**, Dekker, T., Lei, H., Hansson, B. S., Pearce, T. C., Olsson, S. (2014) Temporal features of spike trains in the moth antennal lobe revealed by a comparative time-frequency analysis *Plos One* 9(1): e84037
IF: 3.730

Koutroumpa, F. A., **Kárpáti, Z.**, Monsempes, C., Hill, S., Hansson, B. S., Jacquín-Joly, E., Krieger, J., Dekker T. (2014) Shifts in sensory neuron identity parallel differences in pheromone preference in the European corn borer. *Frontiers in Ecology and Evolution* 2:65.

3. Hazánkban sikerült szabadföldi körülmények között megoldani a kukoricamoly hímjeinek feromon csapdába csalogatását úgy, hogy különböző feromon dózisokat, csapdatípusokat és a két feromon komponens arányát hasonlítottam össze.

Kárpáti Z., Fejes-Tóth A., Bognár C., Szőke C., Bónis P., Marton C., Molnár B. P. (2016) Pheromone-based monitoring of the European corn borer (*Ostrinia nubilalis*) in Hungary. *Maydica* 61: 1-7.
IF: 0.64

Az eredmények részletes bemutatása

Rovartenyészetek fenntartása, feromon összetétel vizsgálat, tápnövény nevelés

Sikerült a kukoricamoly (*Ostrinia nubilalis* Hbn.) mindkét vonalának (E és Z) tenyésztését négy éven keresztül fenntartani laboratóriumi körülmények között. A Z feromon vonalhoz tartozó egyedek Kéty (Tolna megye) környékéről begyűjtött kukorica szárákból származtak, melyeket lárva alakban találtunk. Az E-vonalhoz tartozó egyedek Szlovéniából származnak szintén kukoricából. A nőstények tojócsövéből feromon kivonatot készítettem és gázkromatográf segítségével azonosítottam a feromon összetételét szintetikus standardok összehasonlításával. Ennek a módszernek a segítségével sikerült megállapítani, hogy a begyűjtött populációk melyik vonalhoz tartoznak. A tenyésztett állatok ugyanolyan módon viselkedtek és szaporodtak, mint a vadon befogott példányok és a később említett GC-EAD vizsgálatok során a csáp élettani szempontból tökéletesnek bizonyult. Mivel a laboratóriumi körülmények között tenyésztett állatok élettani tulajdonságai, beleértve a feromon összetételét is megváltozhatnak ezért folyamatosan nyomon követtem a két feromon komponens egymáshoz viszonyított arányát. Ezt a vizsgálatot gázkromatográfjal egybekötött tömegspektrométerrel végeztem el. Ezek alapján megállapítottam, hogy a tenyésztés során nem történt változás a vadon befogott állatokhoz képest azaz nem kereszteződött a két vonal. Ugyanakkor a négy év alatt folyamatosan fenntartottam a magról vetett kukorica (*Zea mays*, Pioneer P9578 fajta), komló (*Humulus lupulus*) és fekete üröm (*Artemisia vulgaris*) növényházi nevelését annak érdekében hogy a növények által kibocsátott illatanyagokat össze tudjam gyűjteni.

Tápnövényekből származó illatanyagok gyűjtése

Mint tudjuk a zöld növények légterében olyan illékony anyagok vannak jelen, melyek különböző típusú válaszreakciót váltanak ki a rovarokból. Ezek az anyagok lehetnek vonzó, vagy taszító hatásúak. Jelen munkámban ezeknek az illatanyagoknak a szerepét és kémiai szerkezetét tanulmányoztam a kukoricamoly és tápnövényei esetében. Ehhez az egyik legfontosabb lépés ezen illatanyagok összegyűjtése és tárolása oldat formájában.

A kukorica, komló és fekete üröm által légtérbe kibocsátott illatanyagok gyűjtéséhez nyílt rendszerű illatanyag gyűjtő berendezést használtam mely a kukorica körüli zárt légtérből gyűjtötte össze az illatanyagokat. A készülék segítségével többször 4 órán keresztül gyűjtöttem az illatanyagokat. Az illatanyagokat SuperQ adszorbenssel kötöttem meg, majd erről 200 ul *n*-hexán segítségével eluáltam. Az így elkészített oldatokat nitrogén segítségével töményítettem be 50 ul-re, azért, hogy a minták kimutathatósága pontosabb legyen, mivel a töményítés során az oldatban lévő anyagok koncentrációja megnő és csak az oldószer távozik. Az így elkészített és betöményített kivonatot használtam fel az elektrofiziológiai vizsgálatokhoz (GC-EAD), hogy megtudjam pontosan melyek azok az aktív illatanyag komponensek a kivonatban, amelyekre a lepke csápjá válaszol, vagyis érzékeli azokat.

Perifériás elektrofiziológia (GC-EAD)

A gázkromatográfjal (GC) egybekötött elektroantennográf (GC-EAD) segítségével olyan illatanyag komponenseket lehet meghatározni, amelyeket a lepke a csápján elhelyezkedő érzékszőrök segítségével fog fel. A műszer

segítségével olyan illatanyag komponensek retenciós idejét határoztam meg, melyek biológiai aktivitást mutatnak.

Ebben a munkafázisban 2 napos, párosodott Z- -vonalhoz tartozó nőstények levágott csápját használtam fel. A vizsgálat elején a két elektróda közé befogott csápot fenil-acetaldehid illatanyaggal (pozitív kontroll) ingereltem, annak érdekében, hogy megtudjam a csáp fiziológiai állapotát, azaz, hogy a csáp életben van és a levágás során nem sérült meg. Ha erre az anyagra pozitív választ adott, akkor injektáltam be a gázkromatográfba a már korábban elkészített, kukoricából, vagy komlóból, vagy feketeürömből származó illatanyag kivonatokat "on-column" injektálási eljárással. Ekkor a gázkromatográfban lévő oszlop tömeg és polaritás alapján szétválasztotta a keveréket komponensekre, amelyek a csáphoz érkeztek. Majd a csápválasz alapján kiválasztottam azokat a komponenseket, amelyek biológiai aktivitást mutattak, vagyis a csáp reagált rá. Ezt a vizsgálatot 5 ismétlésben végeztem el.

Végeredményként sikerült az Z- és E vonalhoz tartozó nőstény lepkék csápjával megállapítani azoknak a komponenseknek a retenciós idejét, melyek biológiai aktivitást mutattak. A különböző tápnövényekből származó kivonatok más-más illat komponenseket tartalmaztak ezáltal a csáp is más-más komponensekre válaszolt. Ebből arra következtethetünk, hogy a különböző növények illatanyag összetétele másként hat a nőstényekre ezáltal jobban, vagy kevésbé vonzza őket. A kukoricából származó illatanyag kivonatból 3 aktív komponens találtam, melyek retenciós ideje 1: 4.10, 2: 7.94, 3: 9.46. A komlóból származó illatanyagok közül 5 bizonyult aktívnak, melyek retenciós ideje: 1: 4.10, 2: 5.66, 3: 7.08, 4: 7.94, 5: 9.46. A fekete ürömből származó kivonatból a következő aktív retenciós időket tudtam meghatározni: 1: 4.10, 2: 7.94, 3: 9.46. A számokból is jól látszik, hogy sok átfedés van a különböző tápnövényekből származó kivonatok komponensei között, legfőképpen a kukorica és a fekete üröm esetében. Valószínűleg ezek a komponensek és a megfelelő arányú keverékük vesznek részt a nőstények tápnövényválasztásában ahol is nem csak a komponensek jelenléte, de azok egymáshoz viszonyított aránya is nagyon fontos. A következő munkafázis az, hogy ezen komponensek kémiai szerkezetét meghatározzuk gázkromatográfal egybekötött tömegspektrométer (GC-MS) segítségével.

Kémiai szerkezet azonosítás (GC-MS)

Gázkromatográfal egybekötött tömegspektroszkóp (GC-MS) segítségével azonosítottam az előzőleg biológiailag aktívnek talált komponensek szerkezetét. A mérésekhez az OTKA által biztosított összegből megvásárolt GC-MS műszert használtam. A mérés során HP-5-ös, apoláris oszlopot használtam a komponensek elválasztásához, amely teljes mértékben megegyezett a korábbi periferikus mérésekhez használt GC-EAG műszerben alkalmazott oszloppal. Ezen kívül a gázkromatográfban beállított hőmérsékletprogram is azonos volt. Ezekre azért volt szükség, hogy a két mérést pontosan össze tudjam hasonlítani az aktív komponensek retenciós ideje alapján.

A mérések során sikerült az aktív komponensek szerkezetazonosítását elvégezni, melynek során a kukoricából származó kivonatban a ciklohexán, heptán, béta-mircén, szulkaton, dekán, cisz-béta-ocimén, linalool, metil-

szalicilát és a gernail aceton, nonanal és dekanal a komló kivonatban a 1-oktén, kamfén, béta-mircén, szulkaton, dekán, Z-3-hexenil-butirát, cisz-béta-ocimén, dodekán és a gernail-aceton végül a feketeüröm kivonatban a heptán, Z-3-hexenol, béta-mircén, cisz-béta-ocimén és a Z-3-hexenil acetát hozta ingerültebe a nőstény csápot a nonanal és a dekanal mellett. A szerkezetazonosítást a tömegspektrométerhez tartozó NIST elektronikus könyvtár alapján végeztem.

Rovar szélcsatornás viselkedési vizsgálatok

Egy korábban elkezdett kísérlet befejezéseként rovar szélcsatornás vizsgálatokat végeztem kukoricamoly Z-vonalhoz tartozó hímeken, annak érdekében, hogy feltárjam a hím kukoricamoly feromonra repülésének különböző lépéseit és megmagyarázzam azt a jelenséget, hogy miért tévesztik el az illatforrást a hím lepkék repülés közben ha már elindultak a nekik megfelelő feromonkeverék felé. Ugyanakkor az előzőleg GC-EAD és GC-MS segítségével meghatározott két növényi illatanyag (nonanal és dekanal) viselkedési hatását rovar szélcsatornával vizsgáltam. A vizsgálat során a GC-MS mérések eredményeire építve a két anyag 1:2,4 arányú szintetikus keverékét használtam. A komponenseket ásványi olajban hígítottam fel 1ug/ul-es koncentrációra. Kibocsátóként 1,5 ml-es üveg fiolát használtam és pamut kanóc segítségével juttattam az illatanyagokat a szélcsatorna légterébe. Munkám során 2 napos, párosodott Z vonalhoz tartozó nőstényeket használtam. A mérések során sikerült igazolni, hogy a két vegyület keveréke aktívnak bizonyult, a nőstények pozitív anemotaxist, majd forrás érintést mutattak. Ez bizonyítja, hogy a szintetikus növényi illatanyag keverék vonzó hatású a nőstények számára. A következő lépés a szabadföldi vizsgálatok elvégzése volt rovarcsapdák segítségével, mely bebizonyíthatja, hogy szabadföldi körülmények között is vonzó hatást mutat a meghatározott keverék.

Szabadföldi rovarcsapdázásos viselkedési vizsgálatok

Ebben a vizsgálat sorozatban célom az volt, hogy olyan vonzó, szintetikus illatanyag keveréket (kairomon) találjak, mely képes a kukoricamoly nőstényeit csapdába csalogatni. Az előzőekben kémiaileg meghatározott vegyületek szabadföldi viselkedési hatásának vizsgálatát kezdtem el. Első lépésként a nonanal és dekanal hatását vizsgáltam. A kísérleteket Törökszentmiklós és Kéty határában egy kettős hasznosítású (Acaro fajta) siló kukoricatábla szélén végeztem. A nonanal és dekanal 1:2,4 arányú keverékét egy új típusú kibocsátóba („kanócos” kibocsátó) helyeztem és két különböző csapdatípust (delta és vertikális műanyag ragacslap) hasonítottam össze 5 ismétlésben. A csapdák összesen 3 db nőstény lepkét fogtak. Az alacsony fogásnak több oka is lehet: 1.) nagyon alacsony volt a populáció sűrűség, ezért kevés lepke volt a területen, 2.) az összeállított keverék még nem megfelelő a nőstény lepkék csalogatására. Folytatásként az újonnan kukoricából, komlóból és feketeürömből azonosított vegyületek keverékét próbáltam ki hozzáadva a korábban azonosított nonanal és dekanal keverékhez. A kísérleteket Bicske határában is elvégeztem, a komponenseket 1:1:1 arányban kevertem össze, kibocsátóként ismét a kanócos diszpenzert

és delta csapdatípust használtam. Sajnos ezek a csapdák sem csalogatták a nőstény kukoricamolyokat. Ugyanakkor a kairomont tartalmazó csapdák kipróbálása mellett sikerült egy megbízható feromon csapdát kidolgoznom, ami képes a hím egyedeket csapdába csalogatni. Ennél a kísérletnél különböző csapdatípusokat, a két, már korábban meghatározott feromon komponens különböző arányit és különböző dózisokat hasonlítottam össze. Ez azért fontos, mert később egy kombinált kairomonnal és feromonnal közösen csalétkezett csapda alkalmas lehet mind a két nem csalogatására. Ezek alapján megismételtem a kísérleteket 2016 nyarán is, mivel az előző évben valószínűleg nagyon alacsony volt a populáció sűrűség. Sajnos a 2016 évi szabadföldi kísérletek sem hoztak pozitív eredményt, vagyis a különböző, kukoricából, komlóból és feketülőmből származó illatanyagok sem mutattak vonzó hatást a kukoricamoly nőstényire.

Neuroanatómiai vizsgálatok

Céлом az volt, hogy a kukoricamoly két vonala közti neuroanatómiai különbséget feltárjam. Ebben a vizsgálatban Z- és E-vonalhoz tartozó nőstények szaglólébenyében elhelyezkedő glomerulusok térfogatbeli különbségeit terveztem összehasonlítani. Ezt azért csináltam, mert az agyban ez a terület felelős az illatanyagok felfogásáért és itt található olyan különbséget ami alátámaszthatja a különböző vonalokhoz tartozó nőstények eltérő tápnövényekhez való, illatanyagokon alapuló vonzódását. Feltételezésem szerint nem az egyes glomerulusok számában, azaz egy esetlegesen új glomerulus feltűnésében bíztam, hanem a már meglévő glomerulusok eltérő térfogatbeli különbségében. Ha méretbeli különbséget találok a két azonos térbeli helyzetű glomerulus között akkor ebből arra következtethetek, hogy periférikus szinten különbség van a receptor neuronok számában, mivel több receptor neuronnak több axonja érkezik ugyanazon glomerulusba ezáltal több a szinapszis és nagyobb a térfogat. Első lépésként formaldehides fixálás után az agyat kiboncoltam a fejből majd alfa-synapsin elsődleges antitesttel, majd anti-egér Ig (kecske) másodlagos antitesttel jelöltem. Az agyakakat lézer-konfokális mikroszkóppal vizsgáltam. Az eredmények alapján sajnos nem találtam térfogatbeli különbséget a Z- és E-vonalhoz tartozó nőstények szaglólébenyében elhelyezkedő glomerulusai között. Ezzel párhuzamosan megpróbáltam a Z-vonalhoz tartozó nőstényeknél a nonanalra és a dekanalra válaszoló receptor neuronok jelölését is, annak érdekében, hogy azonosítani tudjam azokat a glomerulusokat amelyek ezekért az illatanyagokért felelősek. A jelölést neurobiotin-avidin jelölőanyaggal végeztem, majd ez előzőekben leírt módszerrel vizsgáltam a szaglólébenyt konfokális mikroszkóp segítségével. Sajnos ez a módszer nem hozott sikert, mivel nem sikerült a jelölés, nem láttam semmiféle jelölt neuront a szaglólébenyben.