

זיהוי הפרומון וחומרי משיכה נוספים בזבלית הקמה

Identification of the pheromone and other attractants of *Phyllopertha nazarena*

מוגש לקרן המדען הראשי משרד החקלאות

ע"י

ד"ר ענת זאדה anatzada@volcani.agri.gov.il, ד"ר דוד בן-יקיר, דניאלה פפר, שרה שטיינר, מיכאל דוידוביץ (המח' לאנטומולוגיה, המכון להגנת הצומח, מנהל המחקר החקלאי)

תמר אלון ואור רם (שה"מ)

בשיתוף: ג'ורג' קבליו (ראש פינה), ד"ר ג'ון אלן באיירס (הפקולטה לחקלאות)



תקציר: זבלית הקמה, *Asiopertha (Phyllopertha) nazarena*, היא מזיק רב שנתי בשדות הפלחה החרבה בגידולי חיטה, בקיה ותלתן. מחזור חיי הזבלית נמשך 2-3 שנים וכולל 3 דרגות דרן. אכילת השורשים ע"י זחלי (דרני) הזבלית גורמת להתנוונות צמחים צעירים ול"קרחות". באביב, הדרן בדרגה שלישית מתגלם ב"תא" אדמה בקרקע. הבוגרים מגיחים בסוף מאי ותחילת יוני, הם חיים 10-20 יום ואינם אוכלים. כדי להזדווג, נראה שהזכרים מוצאים את הנקבות בחריצי הקרקע בעזרת פרומון מין.

הצגת הבעיה: לא ניתן לדעת מראש איפה תהיה נגיעות ולא ניתן לטפל במזיק באמצעים ידידותיים

מטרות המחקר: לזהות חומרי משיכה ופרומון מין של זבלית הקמה ולבחון את השימוש בו לניטור, ללכידת יתר ולשיבוש התקשורת בין הזוויגים, במטרה להקטין את אוכלוסיית המזיק ואת נזקיו.

שיטות העבודה: דרנים של הזבלית נאספו בחודש פברואר מ"קרחות" בשדות חיטה ותלתן ברמת יששכר ואזור פוריה. הדרנים גודלו כבודדים בכלי פלסטיק בנפח 1 ליטר בתנאי שדה. לאחר גיחת הבוגרים נאספו נדיפים מנקבות וזכרים בתולים בכמה שיטות איסוף. לתערובת החומרים שנאספו ולחומרים סינתטיים שזוהו בוצעו מבחני GC-EAG, מבחנים בכלובים ובמנהרת רוח. נערכו ניסויי משיכה בשדה לזבל בקר, לחומרים צמחיים ולנדיפים שזוהו מנקבות באמצעות הטמנה חלקית בקרקע, מלכודות נפילה ומלכודות פיקוסן, בהתאמה.

תוצאות עיקריות: מבין איסופי הפרומון רק האנליזה הרציפה הניבה תוצאה לפיה מספר חומרים (שזוהו בזבליות אחרות) עשויים להוות את הפרומון בנקבות. אחד החומרים שזוהו, פרא-בנזוקינון, נתן תגובת מחוש חזקה במיוחד במחשוי זכרים, אולם הפיתיונות שנבחנו בשדה עדיין לא משכו את חיפושיות זבלית הקמה. איסופי אוירה מנקבות לא נתנו תגובה ב-GCEAD אולם משכו מאד זכרים במנהרת רוח. באנליזות GCMS של איסופים אלה לא נמצאו חומרים ייחודיים לנקבות.

מסקנות והמלצות לגבי יישום התוצאות: יתכן ומצוי מרכיב נוסף, סינרגיסטי, בפרומון אותו לא זיהינו. יש לתת את הדעת אם ניתן יהיה באמצעים הקיימים לזהות את המרכיב נוסף.

מעריכים מומלצים לבדיקת הדוח המדעי: ד"ר עזרא דונקלבלום, ד"ר רועי כספי

הצהרת החוקר הראשי: הממצאים בדו"ח זה הינם תוצאות ניסויים. הניסויים אינם מהווים המלצות לחקלאים

תאריך פברואר 2018

חתימת החוקר



תוכן העניינים

עמוד	הנושא
1	תקציר
3	מבוא
7	מטרות תכנית המחקר
7	פירוט הניסויים שבוצעו והתוצאות
17	דיון ומסקנות
21	ספרות

מבוא

משפחת הזבלתיים *Scarabaeidae*, מונה כ- 30,000 מיני חיפושיות שבמרביתם שלבי החיים הצעירים (ביצים, זחלים, דרנים, גלמים) מתפתחים בחומר אורגני או בקרקע. במשפחה זו שתי קבוצות עיקריות: זבליות, בה הבוגרים והדרנים ניזונים מצואת בעלי חיים ו- פרחיות, בה הבוגרים ניזונים מעלים ומפרחים והדרנים משורשים ומרקבובית. זבלית הקמה, *Phyllopertha nazarena*, שייכת לתת-המשפחה עליות (Rutelinae) בקבוצת הפרחיות. מזיק זה נמצא רק בישראל, בסוריה ובירדן (שוּיג, 1939). הזבלית פוגעת בגידולי חיטה, בקיה ותלתן בממשק בעל בפלחה החרבה (400-350 מ"מ גשם בשנה), מלביא וסירין שבצפון, דרך רמות יששכר, שיפולי גבעת המורה ורמות מנשה. נזקי "קרחות" בשדות הפלחה דווחו מתחילת ההתיישבות העברית באזור זה (Rivnay, 1944). דרני החיפושית מתפתחים בקרקע וניזונים מרקבובית ומשורשים וגורמים לתמותת נבטים (רבנאי, 1960). כאשר יש צפיפות גבוהה של דרנים נוצרות "קרחות" ששטחן נע בין 5% ל-50% משטח השדה (בן-יקיר וחוב' 2012). בשנים האחרונות היתה עליה משמעותית במחיר גרעיני החיטה והשחת ולכן הערך הכלכלי של נזקי הזבלית עלה בהתאם. כמו כן, באזורים הנגועים חל מעבר הדרגתי לממשק משמר קרקע (אי פליחה) בגידולי החורף שמגביר את הסיכון לנזק מהזבלית.

על פי ריבנאי (1960), החיפושיות של זבלית הקמה מגיחות מהקרקע במאי ויוני וחיות 10–20 ימים ללא הזנה. הזכרים מגיחים ראשונים ומעופפים בלהקות בשעות הבוקר ואחר הצהריים. הנקבות לא נצפו מעופפות וכנראה נשארות רוב הזמן בסדקי הקרקע. הביצים מוטלות בסדקי הקרקע או תחת אבנים. ישנן שלוש דרגות דרן, אשר התפתחותן איטית (כשנה לכל דרגה). הדרנים בדרגה הראשונה בוקעים מהביצים בתחילת החורף וניזונים מרקבובית ומשורשי צמחים. הם מקייצים (נכנסים לתרדמת קיץ) בעומק האדמה, ובתחילת

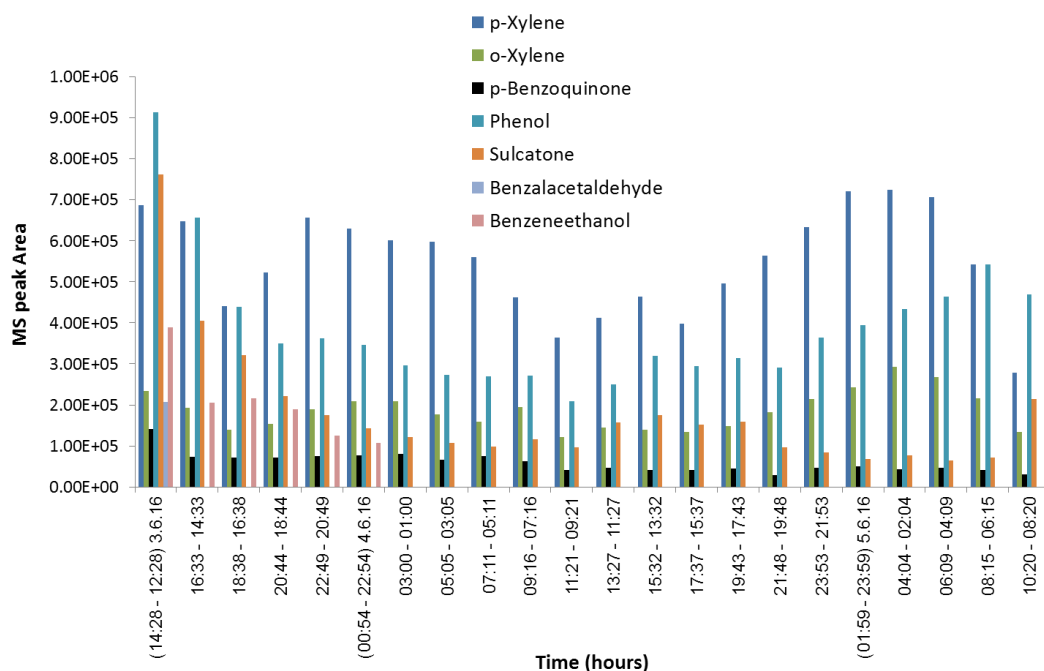
החורף הבא עולים שוב, מתנשלים לדרגה השנייה, וניזונים שוב מרקבובית ומשורשים. תהליך זה חוזר על עצמו שנה נוספת עם הדרנים בדרגה השלישית. בסוף החורף (מרץ-אפריל) הדרנים בדרגה השלישית מתגלמים בתאי אדמה בעומק של 40-70 ס"מ ומגיחים לאחר כחודש כחיפושיות.

עד כה לא ידוע איך בוחרת הנקבה את מקום ההטלה בתקופה ששדות החיטה יבשים. ניתן לשער, שכמו זבליות אחרות, הן יעדיפו להטיל באזורים עשירים בחומר אורגני. בעבר עלה חשד שזבל של בקר שרעה על שלף החיטה או פוזר כדשן בשדות מעלים את הסיכון לנגיעות בזבלית הקמה.

במיני זבליות מתת-משפחת העליות זוהו עד היום 25 פרמוני מין שונים מנקבות (Vuts et al. 2014). הפרומונים שזוהו ברוב המינים שנחקרו בתת-משפחה זו דומים מבחינה כימית. מתצפיות שדה של זבלית הקמה נראה שהזכרים מוצאים את הנקבות כדי להזדווג איתן בעזרת פרומון מין שהן מפרישות, כמקובל ברוב מיני הזבליות. זיהוי הפרומון יאפשר ניטור להערכת הסיכון לנגיעות באזור, לכידה המונית ומיקוד הפעולות להפחתת המזיק ולהקטנת הנזק הכלכלי.

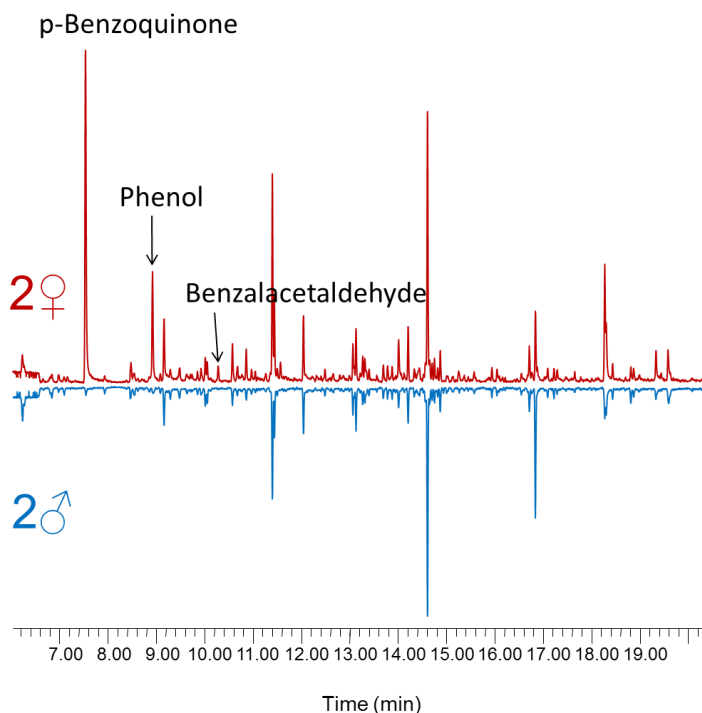
למרות שזבלית הקמה גורמת נזקים כלכליים באזורנו כבר שנים רבות (ריבנאי 1944), חסר מידע על התנהגות הבוגרים ולא פותחו אמצעים יעילים לניטור, להדברה ולגידול מעבדה שלהם. במחקר זה ניסינו להשלים את פערי הידע הללו ולהוביל לפיתוח אמצעי ניטור והדברה שיעזרו בהקטנת נזקי הזבלית.

בשנה הראשונה למחקר אספנו דרנים גדולים במספרים יחסית נמוכים באזור בית השיטה וב"קרחות" באזור פורייה מצאנו רק דרנים בינוניים. במערכת הגידול במעבדה רוב הדרנים מתו לפני שהשלימו את התפתחותם לבוגרים ורק כ-5% הגיחו כחיפושיות. בשנה השנייה הצלחנו לאסוף מאות דרנים בשדה וגידלנו כל אחד בכלי נפרד. בהמשך לקבלת בוגרים מהגידול אספנו מהם נדיפים, בצענו תצפיות במעבדה בכלובים מצולמים ובשדה על התנהגות חיפוש הנקבות של הזכרים. בחנו גם משיכה של הזבליות לזבל בקר ובצענו מספר ניסיונות עם פיתיונות שונים בתקופת שיא גיחת הזבליות בשדה. כל אלה לא משכו זווּיג ספציפי. באנליזות הדיגום הרציף לא הודגם שחרור צירקדי ברור של חומרים משני הזווּיגים ברוב הדוגמאות שהורצו מלבד בדגימת נקבה אחת. יחד עם זאת בכמה הרצות של נקבות בלטה הופעת סידרה של חומרים, p-Xylene, Styrene, o-Xylene, p-Benzoquinone, Phenol, : ארומטיים וביניהם Sulcatone, Benzalacetaldehyde, Benzeneethanol (איור 1).



איור 1: דוגמא לתוצאות אנליזה רציפה GCMS/SPME של חומרים ששחררו שתי נקבות במשך יומיים

בדגימות אנליזה רציפה של זכרים חומרים אלה בד"כ לא נראו כלל ואם הופיעו אז רק עקבות. לכן עברנו לביצוע אנליזה דיגום רציף באותו זמן מכל אחד משני הזוויגים, כל שעה לסרוגין (איור 2). באופן הזה נמצאו הבדלים בין זכרים לנקבות בשלושה חומרים - p-Benzoquinone, Phenol, Benzalacetaldehyde אך לא נצפתה שעת שיא בשחרור.



איור 2: הבדלים בין כרומטוגרמות דיגום רציף של זכרים ונקבות שהורצו כל שעה לסרוגין

החומרים זהו ע"י ספריות ה GCMS , אינדקסי שהיה בקולונה וע"י שימוש בסטנדרטים מתאימים. חומרים אלה זהו בנקבות של כמה מינים ממשפחת ה Scarabaeoidea , (Vuts et al 2014). החומר Benzoquinone מתואר בספרות כחומר שמופרש מנקבות ששייכות לתת-המשפחה עליות Hylamorphia (Rutelinae) elegans (Quiroz et al 2007) ומעורר תגובה בזכרים. בניסיונות השדה של שנה ב (טבלה 1) נבדקו פיתיונות שונים. השיקולים לבחירת הפיתיונות נגזרו מהתקדמות תהליך הזיהוי וזמינות החומרים שהיו ברשותנו באותה העת. כ"כ נבדק הפרומון הספרותי של הזבלית היפנית *Phyllopertha divers* (Leal et al 1997) וחומרים צמחים שדווחו בספרות כמושכי זבליות ממינים קרובים (Ruther and Mayer 2005) אך כל אלה לא משכו חיפושיות.

טבלה 1. פירוט ניסיונות המשיכה של בוגרי זבלית הקמה בשנת 2016

Dates of Exper.	Material	bait composition (mg)				dispenser based on	trap	location	catches
		Treat. 1	Treat. 2	Treat. 3	Treat. 4				
15-21.5.16	Sulcatone	10				plastic vial	Compound s identified in one female on 2015	pitfall	Kochav Ayarden
	Vanillin	10							
	Geranyl acetone	10							
"	1,3-Dimethyl-2,4(1H,3H)-quinazolinedio ne	5				0.2 ml thin walled Eppendorf tube with pierced cap	<i>P. divers</i> pheromone (Leal et al ,1997)	"	"
15.5-9.6.16	Cattle dung							Wet dung	No eggs or adults
21-29.5.16	Live females							pitfall	"
9-15.6.16	phenol	10	10			plastic vial	plant and female volatiles	Picusan	"
	Z3-6-Ac		10	10					
	Z3-6-OH		10	10					
	acetone (solvent)				0.1				
20-27.6.16	phenol	10				"	female volatiles	"	"
	benzoquinone	10							
	phenylacetaldehyde	5							
	phenylethanol	5							
	acetone (solvent)	0.2	0.2						

ראוי לציין כי בשנה ב' הצלחנו להבחין בהבדלים אנטומיים בין זכר לנקבה ללא ניתוח אברי המין. לזכר בטן צרה ומחודדת יותר בהשוואה לנקבה ולעיתים איבר הרבייה של הזכר בולט החוצה מקצה הבטן.

בשנה השלישית המשכנו בביצוע אנליזות רציפות לנקבות וזכרים בודדים, כן בוצעו איסופי אווירה לקבוצת זכרים ולקבוצת נקבות. לאחר מכן בצענו ניסויי EAG ו-GCEAD וניסויי התנהגות בכלובים ובמנהרת רוח לתמיסות שהתקבלו באיסופי האווירה. חומרים שזוהו באנליזה הרציפה, חומרים הידועים בספרות כמרכיבי ריח עיקריים בצואת בקר וחומרים צמחיים הידועים כמושכים זבליות ממינים קרובים נבדקו בנוסף לכך גם בבית רשת ובשדה.

מטרות תכנית המחקר לשנה ג:

- א. איסוף הזבלית בשדה וגידול מעבדתי
- ב. איסופי אווירה ומבחני תגובת מחוש לחומרים שמקורם בזבלית
- ג. זיהוי החומרים שעוררו תגובת מחוש באמצעות GCMS
- ד. הכנה ובדיקת פיתיונות של חומרים שזוהו בזבלית וחומרים צמחיים בניסויי התנהגות במעבדה, בבית רשת ובשדה.

פירוט הניסויים שבוצעו בשנה ג ותוצאותיהם:

איסוף וגידול הזבליות:

דרנים גדולים של הזבליות נאספו בשדות עם קרחות שנגרמו מזבלית הקמה. סך הכל נאספו 392 דרנים כמפורט בטבלה 2. כל דרן הוחזק במיכל פלסטי בנפח 1 ליטר שהכיל כ-500 גרם קרקע, שהובאה מאזור איסוף הדרנים, ונשמרה ברטיבות של 70% קיבול שדה. הכלים עם הדרנים הוחזקו במרפסת פתוחה בראש פינה ממועד האסיף ועד תחילת ההתגלמות במחצית הראשונה של חודש מאי (תמונה 1).

כ-30% מהחיפושיות שהגידו במעבדה נשמרו בקירור (10 מ"צ) כדי להאריך את זמן השימוש בהן לניסיונות.

מספר דרנים	תאריך איסוף	גידול	מ' מעל פני הים	נ"צ	אתר
77	פברואר 9	תלתן	58	32°45'42.85"N 35°30'16.52"E	הזורעים
90	פברואר 21	תלתן	כנ"ל	כנ"ל	הזורעים
65	פברואר 22	חיטה	166	32°44'31.85"N 35°32'41.03"E	אלומות
160	פברואר 27	חיטה	27	32°45'27.58"N 35°29'43.39"E	הזורעים

טבלה 2. סיכום איסוף הדרנים של זבלית הקמה בשנת 2017.

סך הפרטים 392

מתחילת מאי נעשו תצפיות שבועיות של גיחת החיפושיות בשדות חיטה ותלתן נגועים. ב-19 במאי נאספו כ-40 זכרים בשדה והשתמשו בהם לניסוי המשיכה בחממה.



תמונה 1. שיטת גידול הדרנים שנאספו בפברואר 2017 עד התגלמותם (דרן בודד בכל כלי)

תוצאות: מכלל הדרנים שנאספו (392) התגלמו 46% והגיוו 30%, מהם שני שלישי זכרים והשאר נקבות. שיעורי ההתגלמות והגיוו של הדרנים שנאספו בשדה התלתן היו גבוהים במובהק בהשוואה לדרנים שנאספו בשדות חיטה (טבלה 3). מהדרנים שנאספו בשדה חיטה באלומות הגיוו רק 8%. רוב החיפושיות (90%) הגיוו בין ה-18 ל-28 במאי (טבלה 3). הזכרים הגיוו 1 עד 3 ימים מוקדם יותר מאשר הנקבות. כ-20% מהחיפושיות שהגיוו הוחזקו בקירור (10 מ"צ) למשך כמה ימים עד שהשתמשו בהם ללימוד הפרומון (טבלה 4).

טבלה 3. סיכום נתוני גיחת זבלית הקמה בשנת 2017.

אתר	גידול	תאריך איסוף	מספר דרנים	שיעור (%)	שיעור (%) גיחה	נקבות	זכרים	תאריך 50% גיחה	נקבות
הזורעים	תלתן	פברואר 9	77	52	35	9	19-מאי	22-מאי	
הזורעים	תלתן	פברואר 21	90	77	32	14	24-מאי	26-מאי	
אלומות	חיטה	פברואר 22	65	12	2	6	24-מאי	26-מאי	
הזורעים	חיטה	פברואר 27	160	39	13	9	23-מאי	24-מאי	
		סך הפרטים	392	180	77	39			

טבלה 4. סיכום השימושים במעבדה של חיפושיות זבלית הקמה שהגיוו בשנת 2017.

נקבות			זכרים		
aerations	SSGA	EAD	aerations	SSGA	EAD
16	18	8	18	10	33

דין: גידול מעבדה של זבלית הקמה שמחזור חייה בשדה אורך כ-3 שנים אינו מעשי. לכן, כדי לקבל חיפושיות בתולות לחקר הפרומון, התמקדנו באיסוף דרנים גדולים וגידולם בכלים נפרדים עד גיחתם. בחרנו לאסוף את הדרנים מאמצע פברואר עד אמצע מרץ, תקופה בה פוחתים גשמים ומתחילה ההתייבשות של גידולי החורף. זאת מפני שהדרנים יורדים לעומק

הקרקע להתגלם כאשר הצמחים והקרקע מתחילים להתייבש וקשה מאוד למצוא אותם. קושי נוסף באיסוף הדרנים הוא לזהות מי מוכן להתגלמות ומי יזדקק לשנה נוספת כדרך לפני שיתגלם. למרות שאספנו רק דרנים גדולים (דרגה 3) כ-50% מהם לא התגלמו. איכות המזון ותנאי הגידול בשדה כנראה משפיעים על סיכויי הגיחה של הדרנים. לדוגמא, שיעור הגיחה של הדרנים שנאספו השנה משדה תלתן היה גבוה פי 3 עד פי 6 מזה של אלה שנאספו בשדות חיטה. במהלך המחקר הצלחנו לשפר את תנאי הגידול ואת שיעורי הגיחה של החיפושיות מ-5% בשנה הראשונה, 20% בשנה השניה ו-30% בשנה השלישית. בעיה נוספת במחקר זה היא שחלון הזמן של גיחת הזבליות צר מאוד (כ-10 ימים). כאשר הוחזקו בתנאי אקלים טבעיים כ-90% הגיחו בעשרת הימים האחרונים של חודש מאי. כאשר הדרנים הוחזקו ב-25 מ"צ אחרי האיסוף (בשנה השניה) כ-80% מהם הגיחו בין ה-10 ל-20 במאי. לכן, צפוי שהחזקת הדרנים שנאספו בטמפרטורות שונות תאריך את תקופת הגיחה של הזבליות פי 2 עד 3 ותאפשר זמן ארוך יותר לביצוע הניסיונות.

ניסויי איסוף אוירה וזיהוי:

איסופי אוירה: בעונת 2017 בוצעו 2 איסופי אוירה עם זכרים (8 ו-10 פרטים בכל איסוף בהתאמה) ושלושה איסופים עם נקבות (9, 3 ו-4 פרטים בהתאמה). בשנים קודמות שמנו לב שכשהחיפושיות נמצאות יחד הן מתקוטטות, מה שיכול להשפיע לרעה על הפרשת פרומון מין, ולכן העונה כל פרט הוכנס לכלי זכוכית נפרד והכלים חוברו בטור זה לזה עי צינורות טפלון (תמונה 2). הכלים שבהם החיפושיות חוברו לצינורית דקה (4mm I.D. – 4X ס"מ) שהכילה חומר סופח (superQ 80/100 mesh) ונשטפה במס 1.5 מ"ל פנתאן או הקסאן ו-0.5 מ"ל דיכלורומתאן או אתר. בשל מחסור בחרקים וניסיון מהשנים הקודמות כי הסיכוי לזהות ב-GCMS חומר ייחודי מאיסוף אוירה הוא נמוך, חלק הפרטים הועברו למערכת האיסוף לאחר שהיו באנליזה ב-EAD (ונקטמו מהם האנטנות) או לאיסוף SPME במכשיר GCMS. התמיסות שהתקבלו מאיסופים אלה שימשו בעיקר למבחנים הביולוגים ב-EAD ובמנהרת רוח.



תמונה 2: מערכת איסופי אוירה טורית. בכל כלי זכוכית חיפושית בודדת.

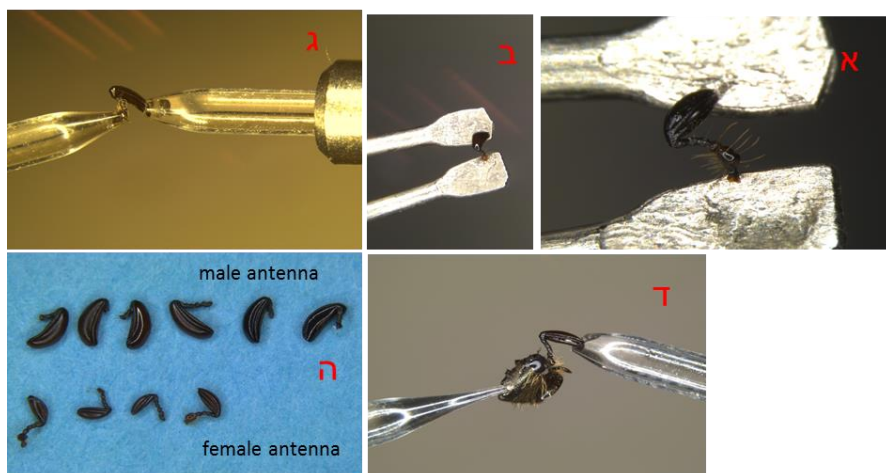
איסופי חומרים בשיטת הדיגום הרציף SSGA (GCMS -SPME): ניסיונו הקודם הראה שלשיטת איסוף זו יש את הסיכוי הגבוה ביותר לזהות חומרים ייחודיים, אולם גם פה יש להכניס לכל מערכת רק חיפושית אחת משום שהחיפושיות תוקפות זו את זו בתוך הכלי- זה פרמטר שמעלה את הסיכוי לזהות פרומון מין אם מופרש אולם מקטין את הרגישות של שיטת האיסוף. במכשיר GCMS עליו מורכבת קולונה א-פולרית RTX-5 Sil MS (30m X 0.25mm X 0.25um) נערכו 4 איסופים של נקבות שכל אחד כלל 1-2 נקבות שנדגמו ברציפות (אך כאמור בכלים נפרדים) ואיסוף נוסף שכלל שני זכרים ושתי נקבות שנדגמו בנפרד. סה"כ 5 איסופים שנערכו כל אחד מספר ימים.

תוצאות האנליזות הראו שרק החומר p-benzoquinone ייחודי לנקבות. מספר חומרים הופיעו בנקבות כעקבות כגון: p-xylene, o-xylene, 2-Ethylhexanol, D-limonene, sulcatone, Dihydromyrcenol, nonanal, decanal, 4-tert-Butylcyclohexanol acetate ורובם נמצאו גם בזכרים.

בוצעו 5 איסופים גם במכשיר GCMS נוסף עליו מורכבת קולונה פולארית VF-23 (30m X 0.25mm X 0.25um: בשניים מהם 2 ו-3 נקבות בכל אחד ובשלושת האחרים 2 נקבות ו-2 זכרים בכל אחד. קולונה כזו מאפשרת הפרדה וזיהוי של חומרים פולריים יותר. באיסופי הזכרים לא נראו חומרים ייחודיים ובאיסופי הנקבות נראו לעיתים החומרים p-Benzoquinone, נונאל, דקנאל, phenylacetaldehyde, Phenyl Ethyl alcohol, Geranyl Acetone. שחרור מסונכרן של p-Benzoquinone, phenylacetaldehyde ו- Phenyl Ethyl alcohol נצפה רק בנקבה אחת ושיאו היה בשעות הערב.

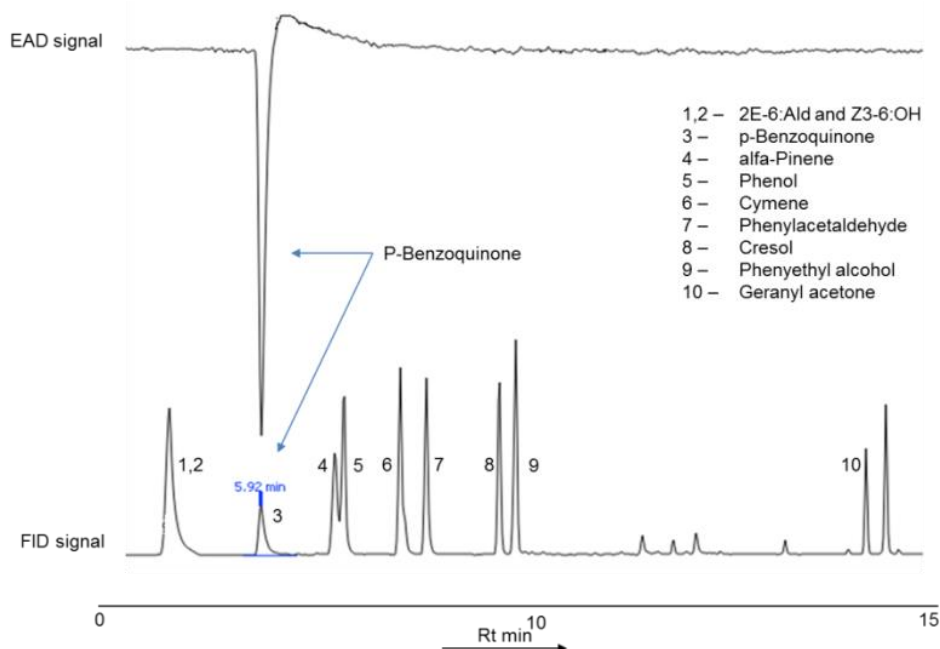
מבחנים כימיים-ביולוגיים:

מבחני EAD-GC בוצעו עם מכשיר גז כרומטוגרף GC-2010 Plus Shimadzu שאליו מחוברת מערכת EAD של חברת Synthech, CS-55 stimulus controller, Signal acquisition interface IDAC2. בתנור ה-GC מורכבת קולונה VF-5MS, 30m-25mm ID והוא תוכנת לשמור על טמפ 50 מעלות ל-2 דקות ואחכ לעלות בקצב 10 מעלות לדקה ל-230 מעלות ולהשאר כך 15 דקות. האנטנות חוברו לאלקטרודת מזלג ע"י ג'ל מוליך (Parker lab). נעשו ניסיונות לחבר את האנטנה עם או בלי הראש בין שתי אלקטרודות זכוכית עם נוזל פיזיולוגי אך הם לא צלחו (ראה תמונה 3 ג ו-ד).



תמונה 3. אנטנת זכר מחוברת לאלקטרודות מזלג עם ג'ל מוליך ב. אנטנת נקבה מחוברת לאלקטרודות מזלג עם ג'ל מוליך ג. אנטנת זכר מחוברת לאלקטרודות זכוכית עם נוזל פיזיולוגי ד. ראש ואנטנת זכר מחוברים לאלקטרודות זכוכית עם נוזל פיזיולוגי ה. הבדלים בין מחוש נקבה לזכר זבלית הקמה

במהלך הניסויים זיהינו עוד הבדל בולט בין נקבות לזכרים שכן אנטנת הזכר גדולה ומפותחת יותר (תמונה 3 ה), אך שתיהן קשיחות ומסוג Lamellate. בוצעו הרצות ב- GCEAD לחומרים שזוהו בחיפושיות או שכאלה שידועים כמושכים זבליות ממינים אחרים, ממקור צמחי או מזבל בע"ח. מבין כל החומרים שנבדקו רק החומר p-Benzoquinone גרם לתגובת אנטנה של זכרים ונקבות (איור 3), התגובה חזקה למדי בשני הזוויתים, אם כי מעט יותר חזקה בזכרים. בהמשך השתמשנו בחומר זה כרפרנס כדי לראות אם אנטנה מסוימת חיונית.



איור 3. הרצת GC-EAD של תערובת חומרים סינתטיים שזוהו בחיפושיות וחלקם ידועים בספרות כמעוררי פעילות אנטנה וכמושכים זבליות אחרות ותגובת מחושי נקבות אליהם

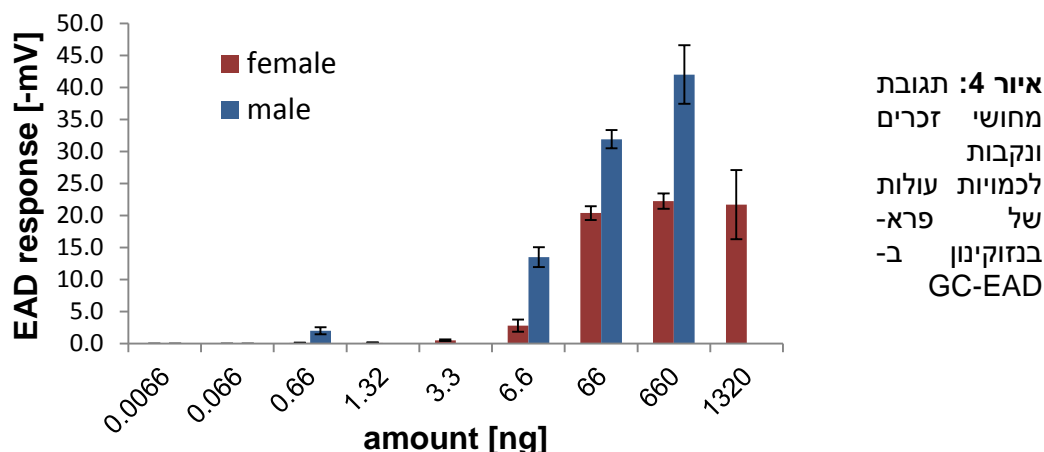
בטבלה 5 מוצגים החומרים שנבדקו ב- GCEAD. בנקבות נבדקו פחות חומרים בשל מיעוט החרקים שהיו בידנו והצורך להתמקד בתגובת הזכרים לפרומון שהסתמן שהוא כנראה נקבי.

טבלה 5. תגובות אנטנות זכרים ונקבות לחומרים שונים שנמצאו בנקבות, חומרים צמחיים ונדיפים עיקריים של זבל פרות

	List of compounds checked by GC-FID-EAD on male/female antenna	Found in	Amount	Male antenna response	Amount	Female antenna response
1	p-Benzoquinone	SPME mainly ♀	0.0066-660 ng	✓	0.0066-1320 ng	✓
2	Phenylacetaldehyde	SPME mainly ♀	100 ng	0	100 ng	0
3	Phenylethylalcohol	SPME mainly ♀	100 ng	0	100 ng	0
4	Phenol	SPME ♂ + ♀	100 ng	0	100 ng	0
5	Sulcatone (6-Me-5-Heptene-2-one)	SPME ♂ + ♀	100 ng	0		NA
6	D-Limonene	SPME mainly ♀	100 ng	0		NA
7	2Et-hexanol	SPME ♂ + ♀	100 ng	0		NA
8	Geranyl Acetone	SPME ♂ + ♀	100 ng	0	100 ng	0
9	E2-6:Ald	green leaves volatile	100 ng	0	100 ng	0
10	Z3-6:OH	green leaves volatile attractive to other Scarabaeidae	100 ng	0	100 ng	0
11	p-Xylene	SPME ♂ + ♀	100 ng	0		NA
12	Styrene	SPME ♂ + ♀	100 ng	0		NA
13	o-Xylene	SPME ♂ + ♀	100 ng	0		NA
14	alpha-Pinene	Dung	100 ng	0	100 ng	0
15	Cresol	Dung	100 ng	0	100 ng	0
16	Cymene	Dung	100 ng	0	100 ng	0
17	Geranyl Acetol	SPME ♂ + ♀	100 ng	0		NA
18	Sulcatole (6-Me 5-Hepene-2-ol)	SPME ♂ + ♀	100 ng	0		NA

מעניין לציין שבנוסף לפעילות בנזוקינון ב- EAD זיהינו פעילות מחוש לתוצר ראיזיה של בנזוקינון עם מתנול, החומר Methoxy Benzoquinone. גם חומר זה מעורר תגובה, אמנם חלשה יותר, באנטנות של שני הזוויגים (נתונים לא מובאים), יתכן בשל הדמיון הכימי לבנזוקינון, אולם הוא לא נמצא באיסופים מהחיפושיות.

לשני חומרים אלה בוצעה בדיקת dose response ב- עזרת GCEAD. לכל נקודה בגרף השתמשנו ב- 1-2 אנטנות מ- 3 זכרים. איור 4 מראה את תגובות המחושים למינונים עולים של בנזוקינון.

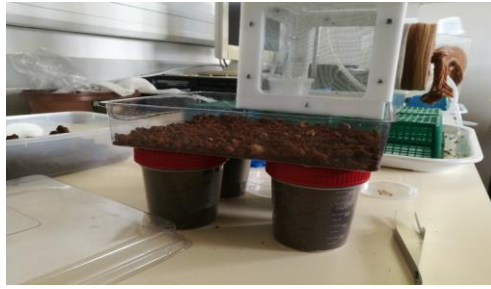


בנוסף להרצות EAD-GC עם החומרים הסטנדרטים, בצענו גם הרצות לתמיסות של איסופי אוירה מזכרים ומנקבות. בין הרצה להרצה הרצנו גם 100 ng של בנזוקינן על מנת לראות אם האנטנה, החתוכה ומצויה בין שתי אלקטרודות, עדיין חיונית. הרצות של איסופי אוירה מזכרים נבדקו על מחושי נקבות ולהיפך. לא נראתה כל תגובת מחוש לחומרים מאיסופי האוירה.

ניסויי התנהגות בזירות קטנות במעבדה:

ניסיון 1: בוצע בכלוב רשת בגודל 30*30 ס"מ בו שוחררו 5 זכרים בני יום אחד. על נייר ווטמן הוטענו שלושת החומרים Phenyl acetaldehyde 0.2mg, Phenyl ethylalcohol 0.2mg p-Benzoquinone 1mg במתנול. מתנול נקי שימש כפרנס. הכלוב צולם למשך 24 שעות 23-24.5.17. בתאריך 24.05.17 בשעה 8:40 הוטענו על אותו נייר אותם חומרים באותה כמות, בשעה 10:55 הפיתיון הישן הוצא והוכנס פיתיון עם 1 מיליגרם של p-Benzoquinone בהמשך היום הוכנס פיתיון עם 50 מיליגרם של p-Benzoquinone. לא נראתה כל התעניינות של הזכרים בפיתיונות.

ניסיון 2: ארבע פיתיונות הונחו בתחתית של ארבע צנצנות פלסטיק 200 מ"ל, הצנצנות מולאו באדמה ועליהם הוקמה במה עם חורים בתחתית שמולאה אדמה (ראה תמונה 4). על הבמה שוחררו עשרה זכרים לכמה שעות. פיתיון 1- בקורת –מתנול, פיתיון 2- p-Benzoquinone 10ug, פיתיון 3- Z3-6:OH 10ug and p-Benzoquinone 10ug, פיתיון 4- p-Benzoquinone 10ug, Phenyl acetaldehyde 10ug and Phenyl ethylalcohol 10ug. בסוף הניסוי בדקנו את מספר החיפושיות שנכנסו לכל צנצנת. לא היה הבדל בין הטיפול השונים.



תמונה 4: זירת ניסוי התנהגות 2 ו-3, מבט מהצד.

ניסיון 3: ארבע פיתיונות הונחו בתחתית של ארבע צנצנות כנ"ל. על הבמה שוחררו עשר זכרים לכמה שעות. הפיתיונות היו: 1- בקורת – מתנול, 2- מתנול, 3- מתנול, 4- p -Benzoquinone 10ug. לאחר 18 שעות בדקנו כמות חיפושיות מצויות בכל צנצנת. התוצאה היתה שבכל הצנצנות נמצאו 2-3 חיפושיות וחיפושית אחת נותרה בחוץ.

ניסיון 4: הניסיונות הבאים בוצעו במנהרת רוח שגודלה $44 \times 170 \times 44$ ס"מ. מהירות הרוח היתה 1.6 מ' לשניה. הטמפ' בחדר 26-28 מעלות ועוצמת האור בחדר 1080 lux, כל הניסויים בוצעו בסביבות השעה 15:00 PM. במרחק 26 ס"מ מכניסת האויר למנהרה הצבנו לרוחב המנהרה חוט מתכת באורך 31 ס"מ ובגובה 2 ס"מ (ראה תמונה 5). במרכז חוט המתכת תלינו (עי פלסטלינה) קפילריית זכוכית 5 μ שנחתכה ל- 3 μ . בקפילרה זו הטענו את החומרים שנבדקו. בכל ניסוי חיכינו לסולבנט שיתנדף מהקפילרה ואז שחררנו במנהרה 5 פרטים במרחק 30 ס"מ מהקפילרה לכוון המאוורר (המושך אויר). לכל בדיקה נעשו לפחות 6 חזרות.



תמונה 5: מנהרת הרוח ששימשה לניסויי התנהגות

7.6.17 משיכת זכרים: נבדקה תנועת הזכרים לכיוון מספר ריכוזים של בנזוקינון (מ- 1 ננוגרם ל-1 מיקרוגרם) שהוטענו בקפילרה. הזכרים לא נמשכו למקור הריח. בשלב הבא בדקנו באותו האופן את תמיסות של איסופי האוירה (בפנתאן) שנאספו מהחיפושיות. תמיסה אחת שהכילה איסופי אוירה של 9 נקבות במשך 299 שעות משכה במנהרה 93% מהזכרים

בעוד שבדיקת הבקורת עם פנתאן לא משכה. חזרנו על הניסוי עם תמיסת איסוף של 8 זכרים שנאספה במשך 346 שעות – כאן רק 6% מהזכרים נעו לכיוון הקפילרה.

12.6.17 משיכת נקבות: חזרנו על ניסויים אלה עם תמיסות איסופי האוירה כשבזירה משוחררות נקבות (במקום זכרים). התוצאה היתה שרק 23% מהנקבות נמשכו לאיסוף אוירת הנקבות ורק 3% מהנקבות נמשכו לאיסוף אוירת הזכרים.

15.6.17 משיכת זכרים: במועד זה נבדקו תערובות ng 10-100 של בנזוקינון עם חומרים צמחיים (תערובת המוצגת באיור 3) וכן עם phenylethanol, phenyl acetaldehyde. מידת המשיכה היתה 10% ו- 3% בהתאמה. תמיסה אתרית של אוירת 4 נקבות שנאספה במשך 212 שעות משכה 83% מהזכרים. תמיסת אוירת נקבות, שמשכה בתאריך 7.6.17 93% מהזכרים, נמהלה פי 10 ומשכה רק 46% מהזכרים. נבדקה גם המשיכה לחומר Methoxy Benzoquinone והוא משך רק 16% מהזכרים.

ניסויי משיכה בזירות בית רשת ושדה:

הכנת נדיפיות עם פיתיונות: הפיתיונות שנבחרו התבססו על תוצאות איסוף נדיפים משתי נקבות שבוצעו בשנה שעברה. כאמור, באסופים אלה זוהו 3 חומרים ייחודיים לנקבות:

p-Benzoquinone Phenyl acetaldehyde, Phenyl ethyl alcohol (ratio 5:1:1)
חומרים נדיפים הידועים מצואת בקר הם (Dormont et al 2010):
 α -Pinene, p-Cresol, p-Cymene

מחומרים אלה הוכנו נדיפיות והיקש המתוארים להלן (טיפולים):

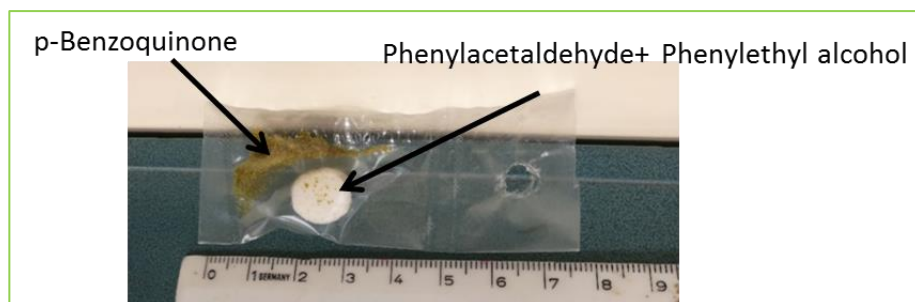
(1) 100 מ"ג p-Benzoquinone שהוטען בשרוול פלסטי (פוליאתילן בעובי 0.03 מ"מ).

(2) 100 מ"ג p-Benzoquinone שהוטענו על שרוול פלסטי + 20 מ"ג Phenyl acetaldehyde ו-20 מ"ג Phenyl ethyl alcohol שהוטענו על גליל צמר גפן דנטאלי באורך 0.5 ס"מ שהוכנס לשרוול הנ"ל (תמונה 6).

(3) היקש עם שרוול הפלסטי וגליל דנטאלי לא מוטענים.

(4) 100 מ"ג α -Pinene, 100 מ"ג p-Cresol + 50 מ"ג p-Cymene שהוטענו כמו בטיפול

2.



תמונה 6: הנדיפית בה השתמשנו לניסויי המשיכה של חיפושיות זבלית הקמה.

בחינת משיכת הזכרים בחממה: הניסוי בוצע בחממה קטנה בגודל 5×8 מ' בחוות הניסיונות בצמח. הנדיפיות הוצבו על קיסם במרכז בקערה בקוטר 30 ס"מ שמולאה בכ-10 ס"מ קרקע מהשדות מהן נאספו הדרנים והחיפושיות. הקערות כוסו בבד שחור למנוע משיכה אופטית של החיפושיות. בבית הרשת הוצבו 6 קערות, שתיים מכל טיפול, על פי המתואר בטבלה 6 ובתמונה 7. יומיים לפני הניסוי נאספו כ-40 זכרים בשדה ששחררו במרכז החממה ב-21 במאי בשעות הבוקר. הקערות נבדקו כל שעתיים במהלך היום ולמחרת בבוקר.

2	1
3	3
1	2

טבלה 6. מבנה ניסוי המשיכה של חיפושיות זבלית הקמה בחממה, צמח, מאי 2017. המספרים מציינים מהו הטיפול שנמצא בכל קערה בחממה (ראה למעלה).



תמונה 7. ניסוי משיכת זכרי זבלית הקמה בחממה, צמח, מאי 2017.

תוצאות: כשעתיים לאחר השחרור של החיפושיות נמצא זכר אחד בקערה של טיפול 1 (p-Benzoquinone). בשאר מועדי הבדיקה לא נמצאו חיפושיות בקערות.

בחינת משיכת חיפושיות בשדה: הניסיונות בוצעו בשני שדות חיטה באזור הזורעים. הפיתיונות הוצבו במלכודות פרומון מסוג Picusan® שבתוכן קערה עם שמן פרפין לאיסוף החרקים (תמונה 8). לכל טיפול היו 5 מלכודות (חזרות) אשר הוצבו באקראי במרחק 10 מ' ביניהן. היו שני מחזורי לכידה שנמשכו שבוע מה-21 במאי. במחזור הראשון נבחנו טיפולים 1, 2 ו-3 (היקש) ובמחזור השני נבחנו טיפולים 4 ו-3 (היקש).



תמונה 8. מלכודת פרומון מסוג Picusan® שפותחה לחדקנית הדקל האדומה.

תוצאות: בתום מחזור הלכידות הראשון (29 מאי) נמצא זכר אחד במלכודת של טיפול 1 (p-Benzoquinone). בתום מחזור הלכידות השני לא נמצאו חיפושיות במלכודות.

תוצאות ניסויי המשיכה מראות כי החיפושיות אינן נמשכות ל - p-Benzoquinone שזוהה רק בנקבות ומעורר תגובת מחוש חזקה ב -EAD, בזכרים מעט יותר מהנקבות. הן גם אינן נמשכות לבנזוקינן בשילוב עם פנילאצטאלדהיד ופניל-אתנול ולחומרים נדיפים שזוהו בספרות כמאפייני ריח זבל בקר.

דיון ומסקנות תלת-שנתי:

איסוף וגידול הזבליות: תקופת איסוף הדרנים נמשכה מסוף ינואר עד תחילת אפריל. מיקום ה"קרחות", המעיד על פעילות אוכלוסייה צפופה של דרנים, אינו קבוע ולכן במהלך החודש הראשון לאחר נביטת החיטה או התלתן בשדות ערכנו תצפיות לזיהוי "קרחות" באזורים ה"מועדים לנזק". למרות זאת, בחלק מהקרחות נמצאו מעט מאוד דרנים (בעיקר בחודש מרץ). נראה שהדרנים המוכנים להתגלמות יורדים לעומק הקרקע במהלך חודש מרץ. הדרנים שנשארו בשכבת הקרקע העליונה בסוף מרץ לא הגיעו לגודל מתאים להתגלמות ושיעורי הגיחה שלהם היו נמוכים מאוד (ראה טבלה 7 2015 ו-2016). בתחילת המחקר ניסינו לגדל את הדרנים מזמן האיסוף ועד למועד הגיחה בקבוצות קטנות בתוך נפח קרקע גדול שבו מפל רטיבות (בן-יקיר וחוב' 2012) אך רוב הדרנים מתו לפני הגיחה. לכן, עברנו לגידול דרנים בודדים בנפח קרקע קטן תוך שמירה על רטיבות קרקע קבועה (70% קיבול קרקע). בשיטה זאת הגיחו כ-24% מהדרנים שנאספו בשדות החיטה ו-45% מהדרנים שנאספו בשדות התלתן. נראה שתנאי הגידול של הדרנים בשדות התלתן היו טובים יותר מאשר בשדות החיטה ולכן שיעור הגיחה עלה בצורה משמעותית. כאשר הדרנים גודלו בתנאי "חצר" (2015 ו-2017) רוב החיפושיות הגיחו בשבוע האחרון של מאי, ללא השפעה משמעותית לתאריך איסוף שלהם. בשנת 2016 גודלו הדרנים בביתן בטמפרטורה של 25 מ"צ דבר שגרם להקדמה של כשבועיים בגיחת החיפושיות. תקופת הגיחה נמשכת כ-10 ימים ולכן יש זמן קצר מאוד לביצוע הניסיונות. גידול הדרנים בטמפרטורות שונות יאפשר להאריך את תקופת הגיחה וכך יהיה זמן ארוך יותר לביצוע הניסיונות.

טבלה 7. סיכום איסוף הדרנים, גידולם וגיחת הבוגרים במהלך שלושת שנות המחקר.

גיחת החיפושיות			גידול דרנים			איסוף דרנים				שנה	
זכרים	% גיחה	50% גיחה	מס' לכלי	כלי (נפח קרקע)	אתר	גודל	מספר	תאריך	גידול	אתר	2015
50	5	26-מאי	3	צינור (1.8 ל')	בית רשת וולקני	גדול	40	26 ינואר	חיסה	בית השיטה	2015
כנ"ל	5	30-מאי	כנ"ל	כנ"ל	כנ"ל	גדול	30	9 מרץ	חיסה	בית השיטה	
-	0	-	כנ"ל	כנ"ל	כנ"ל	בינוני	50	11 מרץ	חיסה	פזריה מזרח	
-	0	-	1	כוס (0.6 ל')	כנ"ל	בינוני	20	16 אפריל	חיסה	פזריה צפ' + דר'	
40	13	16-מאי	1	כוס (0.6 ל')	ביתן גידול וולקני *	גדול	16	28 פברואר	חיסה	היוגב	2016
כנ"ל	27	11-מאי	כנ"ל	כנ"ל	כנ"ל	כנ"ל	110	8 מרץ	חיסה	היוגב	
כנ"ל	23	11-מאי	כנ"ל	כנ"ל	כנ"ל	כנ"ל	44	20 מרץ	חיסה	היוגב	
60	8	28-מאי	כנ"ל	כנ"ל	כנ"ל	בינוני	213	29 מרץ	חיסה	כאוכב	2017
80	44	20-מאי	1	כוס (0.6 ל')	חצר בראש פינה	גדול	77	9 פברואר	תלתן	הזורעים	2017
70	46	25-מאי	כנ"ל	כנ"ל	כנ"ל	כנ"ל	90	21 פברואר	תלתן	הזורעים	
25	8	25-מאי	כנ"ל	כנ"ל	כנ"ל	כנ"ל	65	22 פברואר	חיסה	אלומות	
59	22	24-מאי	כנ"ל	כנ"ל	כנ"ל	כנ"ל	160	27 פברואר	חיסה	הזורעים	

* טמפ' 25 מ"צ *

ניסויי משיכה בשדה: פעילות בוגרי הזבלית בשדה החלה באמצע מאי ונמשכה כ-3 שבועות. בתקופה זאת נצפו בשדה רק זכרים. ניסיונות המשיכה התמקדו בתקופת פעילות הבוגרים אך עקב הזמן הקצר כמה מהניסיונות בוצעו בשוליים המאוחרים של תקופת הפעילות (8 ביוני עד 8 ביולי). לא נצפתה משיכה של הזכרים לנקבות או לחומרים נדיפים שנאספו מהם וגם לא נצפתה משיכה של הבוגרים לצואת בקר או לחומרים נדיפים שלה (טבלה 8) למרות שידועה נטייתן של זבליות להגיב לחומרים אלה (Dormont et al 2010). גם הפרומון של הזבלית היפנית *P. diversa* (Leal et al 1997) וגם חומרים צמחיים הידועים כמושכי הזבלית האירופאית *Phyllopertha horticola* (Ruther & Mayer 2004, Ruther 2005) לא משכו את בוגרי זבלית הקמה. השתמשנו בשני סוגי מלכודות (נפילה ו- Picusan) אך אין ביכולתנו להשוות ביניהן בגלל העדר לכידות. החומר בנזוקינון שמצאנו בנקבות זבלית הקמה נמצא גם בזבלית מהמין *Hylamorpha elegans*, מצ'ילה (Quiroz et al 2007), אולם רק בתערובת עם שמן אתרי של פונדקאי צמחי עיקרי של מין זה, *Nothofagus obliqua*, הוא משך יותר זכרים ביחס לבקורת (אצטון). במאמר שסקר את כל הידוע על חומרי משיכה בזבליות, כולל תת המשפחה Rutelinae, מסקנת החוקרים היתה שכנראה הפרומון במינים אלה עובד רק עם חומר צמחי, בעיקר כזה שמשתחרר בזמן שהחיפושיות ניזונות על הפונדקאי (Vuts et al 2014). נראה כי גם בזבלית הקמה יש לשלב את הבנזוקינון עם חומר נוסף, שמקורו או בזבלית עצמה (עדיין לא נמצא) או בפונדקאי ולכן יתכן שיש להמשיך במחקר בכיוונים אלה.

ניסויי התנהגות במעבדה: ניתן להבחין בקלות, ללא צורך בניתוח אברי הרבייה, בין זכרים לנקבות הזבלית עפ"י השוני במבנה הבטן (לזכר בטן צרה ומחודדת) ובעיקר עפ"י גודל האנטנה- לזכר לאנטנה גדולה במיוחד ביחס לגודל ראשו. מנהרת רוח היא כנראה שיטת בדיקה טובה יותר ביחס לשיטות בהן השתמשנו קודם- כלובים עם מצלמה (נבדקו בשנה ב) וצנצנות (שנה ג). נראה כי בתוך תמיסות אווירית הנקבות מצוי מרכיב פרומוני נוסף לבנזוקינון שבשל רמתו הנמוכה עדיין לא הצלחנו לזהותו בגלאים הכימיים (MS) ובגלאים הביולוגיים (GCEAD). יתכן ובשל מיעוט מספר החיפושיות והזמן הקצר שעמד לרשותנו לא הצלחנו לבצע מספיק חזרות במכשירים אלה על מנת לגלותו. יש סבירות נמוכה כי בנזוקינון הוא פרומון אצקה, ולא של מין/התקהלות, משום שלמרות שתגובת המחוש אליו חזקה ובו בעת החיפושיות אינן מגיעות אליו, הרי שבד"כ פרומוני אצקה מופרשים בכמויות מאד גבוהות ובזבלית זו כמות הבנזוקינון שזוהתה היתה נמוכה למדי, בד"כ ברמת עקבות (באיסופי אוירה בנזוקינון כלל לא זוהה). כ"כ חומר זה זוהה כפרומון מין במינים קרובים. מעל לכל יש לזכור שהזכרים נמשכו לאיסופי אוירה של הנקבות בניסויי מנהרת הרוח, הרבה יותר מהנקבות, מה שמחזק את ההנחה שמדובר פה בפרומון מין.

טבלה 8. סיכום ניסויי לכידה בשדה

[illegible]

* Leal et al 1997

ספרות:

בן-יקיר, ד., מ. חן, ד. שדה, א. צוקרמן, י. שטיינברג, ר. יפעה, א. אברבנאל וז. בולביק. 2012. לימוד הפנולוגיה והנזקים של זבלית הקמה ובחינת אמצעים להדברתה. "ניר ותלם" ספטמבר (40): 31-37.

Dormont L., Jay-Robert P., Bessière J.M., Rapior S. and Lumaret J.P. (2010) Innate olfactory preferences in dung beetles J Exp Biol 213, 3177-3186.

Leal S. W., Zarbin H. G. P., Wojtasek H., Kuwahara S., Hasegawa M. , Ueda Y. (1997) Medicinal alkaloid as a sex pheromone. Nature 385: 213.

Quiroz A., Palma R., Etcheverri´A P., Navarro V., Rebolledo R. (2007). Males of *Hylamorpha elegans burmeister* (coleoptera: scarabaeidae) are Attracted to odors released from conspecific females. Envir Entomol. 36(2): 272-280.

Ruther J. (2004). Male-biassed response of garden chafer, *Phyllopertha horticola* L to leaf alcohol and attraction of both sexes to floral plant volatiles. Chemoecology 14:187-192.

Ruther J., Mayer C. J.,(2005). Response of garden chafer, *Phyllopertha horticola*, to plant volatiles: from screening to application. Entomol Exp et Appl. 115 : 51–59

Vuts J., Imrei Z., Birkett M.A., Pickett J.A., Woodcock C.M., Tóth M. (2014). Semiochemistry of the Scarabaeoidea. J Chem Ecol. 40:190–210