

Eiablagehemmende Wirkstoffe aus dem Larvenkot von *Spodoptera littoralis* (Boisd.)

Oviposition Deterrent from Larval Frass of *Spodoptera littoralis* (Boisd.)

Birgit Klein^a, Hermann Schildknecht^a, Monika Hilker^b und Siegfried Bombosch^c

^a Organisch-Chemisches Institut, Universität Heidelberg, Im Neuenheimer Feld 270, D-6900 Heidelberg, Bundesrepublik Deutschland

^b Lehrstuhl für Tierökologie II, Universität Bayreuth, Postfach 101251, D-8580 Bayreuth, Bundesrepublik Deutschland

^c Institut für Forstzoologie, Universität Göttingen, Büsgenweg 3, D-3400 Göttingen, Bundesrepublik Deutschland

Z. Naturforsch. **45c**, 895–901 (1990); received February 2/May 14, 1990

Spodoptera littoralis, Lepidoptera, Oviposition Deterrence, Larval Frass, Egyptian Cotton Leaf Worm

A synthetic mixture containing 1-indanone, 2-pentanone, 2-methyl-3-pentanone, 3-methyl-2-pentanone, 2-methylcyclopentanone, 1-hydroxy-propanone, acetophenone, benzaldehyde, *n*-nonanal, *n*-decanal, nerolidol, eugenol, thymol, carvacrol and phytol deters oviposition of the Egyptian cotton leaf worm, *Spodoptera littoralis* (Boisd.). All compounds were identified from larval frass of *S. littoralis*.

Einleitung

Die ägyptische Baumwolleule, *Spodoptera littoralis* (Boisd.) (Lepidoptera: Noctuidae), ist im mediterranen Raum und großen Teilen Afrikas verbreitet. Die Larven sind äußerst polyphag; ihr Wirtspflanzenspektrum erstreckt sich über 112 Arten aus 44 Pflanzenfamilien [1]. Als bedeutender Baumwollsäädling ist *S. littoralis* besonders in Ägypten und Israel bekannt.

Eine Möglichkeit, zum regulierenden Eingriff in die Populationsdichte dieses Insekts, bieten die Eiablagehemmstoffe, die im Larvenkot von *S. littoralis* biologisch nachgewiesen wurden [2–4]. Eiablagehemmstoffe übermitteln einem legebereiten Weibchen, daß eine Pflanze entweder prinzipiell nicht als Wirtspflanze geeignet ist oder daß eine Pflanze bereits von Artgenossen befallen ist. Sie veranlassen die Weibchen andere Eiablageplätze aufzusuchen und bieten somit die Möglichkeit, Schädlinge von Nutzpflanzen abzuhalten. Wir untersuchten daher den Larvenkot von *S. littoralis* und identifizierten zahlreiche Verbindungen. Mit einer synthetischen Mischung, bestehend aus 15 Verbindungen, ließen sich im Labor die Eiablagen auf Testblättern signifikant reduzieren. Der Biostest wird in Literatur [2–4] eingehend beschrieben.

Reprint requests to Prof. Dr. H. Schildknecht.

Verlag der Zeitschrift für Naturforschung, D-7400 Tübingen
0341-0382/90/0700-0895 \$ 01.30/0

Experimenteller Teil

Larven, aus Eiern von Versuchsfaltern, die einer Zucht auf synthetischer Diät [5, 6] entstammen, wurden täglich mit frisch gepflückten Blättern der ägyptischen Baumwollpflanze (*Gossypium barbadense*) gefüttert. Der anfallende Larvenkot wurde täglich abgesammelt [2–4].

Extraktion

164 g im Wasserstrahlvakuum getrockneter Larvenkot wurde 48 Stunden bei Raumtemperatur mit *n*-Pantan gerührt; die Feststoffe mittels einer G4-Glasfritte entfernt und das Filtrat im Reinststickstoffstrom eingeengt.

Trockensäulenchromatographie

An Kieselgel ICN Silica TSC 60 Å, Säulenlänge 19 cm, Durchmesser 2,5 cm, Füllhöhe 15 cm.

a) Laufmittel: Pentan:Aceton (8:2)

Das Kieselgel wurde trocken in die Säule eingefüllt (Füllhöhe 15 cm). Jeweils 1 ml Rohextrakt, der einer Ausgangsmenge von 8–10 g Larvenkot entsprach, wurde mit ca. 1 g Kieselgel vermischt, das Pentan im Stickstoffstrom vertrieben, und das Material auf den Säulenkopf aufgegeben. Dann wurde mit frischem Kieselgel 0,5–1 cm hoch überschichtet und das Laufmittel zugegeben. Als die Laufmittelfront das untere Säulenende erreicht



Dieses Werk wurde im Jahr 2013 vom Verlag Zeitschrift für Naturforschung in Zusammenarbeit mit der Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V. digitalisiert und unter folgender Lizenz veröffentlicht: Creative Commons Namensnennung-Keine Bearbeitung 3.0 Deutschland Lizenz.

Zum 01.01.2015 ist eine Anpassung der Lizenzbedingungen (Entfall der Creative Commons Lizenzbedingung „Keine Bearbeitung“) beabsichtigt, um eine Nachnutzung auch im Rahmen zukünftiger wissenschaftlicher Nutzungsformen zu ermöglichen.

This work has been digitized and published in 2013 by Verlag Zeitschrift für Naturforschung in cooperation with the Max Planck Society for the Advancement of Science under a Creative Commons Attribution-NoDerivs 3.0 Germany License.

On 01.01.2015 it is planned to change the License Conditions (the removal of the Creative Commons License condition "no derivative works"). This is to allow reuse in the area of future scientific usage.

hatte, wurde die Entwicklung des Chromatogramms durch Entfernen des überschüssigen Laufmittels beendet. Wir erhielten fünf unterschiedlich gefärbte Bereiche. Die isolierten Kieselgelzonen wurden in Aceton suspendiert. Das Kieselgel wurde durch Abfiltrieren über eine G4-Fritte entfernt. Das Eluat der orange gefärbten Fraktion 2 des Füllhöhenbereichs von 6,5–8 cm wirkte eiablagehemmend.

b) Laufmittel: alkoholfreies Chloroform

Jeweils 1 ml des Eluates der orangen Fraktion 2, der einer Ausgangsmenge von 12–15 g Larvenkot entsprach, wurde nach der unter a) beschriebenen Methode mit alkoholfreiem Chloroform weiter aufgetrennt und ergab vier Fraktionen. Die getrennten Zonen wurden wiederum mit Aceton vom Kieselgel eluiert. Die hellgelbe Fraktion 2/3 im Füllhöhenbereich 6,5–10,5 cm wirkte eiablagehemmend.

Präparative Dünnschichtchromatographie an Kieselgel

Zur Auftrennung der Fraktion 2/3 verwendeten wir PSC Fertigplatten Kieselgel 60 F₂₅₄ der Firma Merck (Darmstadt, F.R.G.), Schichtdicke 2 mm. Entwickelt wurde mit einem Chloroform-Pentan-Gemisch 9:1. Anhand der im UV-Licht bei 254 nm erkennbaren Substanzflecken teilten wir die 10 cm lange Trennstrecke in sechs Fraktionen auf. Die isolierten Kieselgelzonen des Chromatogramms wurden zur Elution der adsorbierten Verbindungen zwei Stunden mit Aceton gerührt. Das Kieselgel wurde durch Abfiltrieren über eine G4-Fritte abgetrennt und das Eluat zur weiteren Auf trennung auf einige Mikroliter eingeengt. Eiablagehemmend wirkten zwei Fraktionen: DC2 *R*_f-Wert 0,41–0,76, DC4 *R*_f-Wert 0,21–0,29.

Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) an Kieselgel

Die Auftrennung der Fraktion DC2 erfolgte an Kieselgel (Nucleosil 3 μ 100) der Firma Macherey & Nagel (Stahlsäule: 250 × 8 mm). Als Elutionsmittel diente ein Hexan-Ethanol-Gemisch im Verhältnis 97,5:2,5. Detektiert wurde bei 230 nm; Durchfluß 3 ml/min; Druck 101 bar. Nach dem Elutionsdiagramm schnitten wir fünf Fraktionen (P1–P5) (Abb. 1). Fraktion P5 enthält zusätzlich

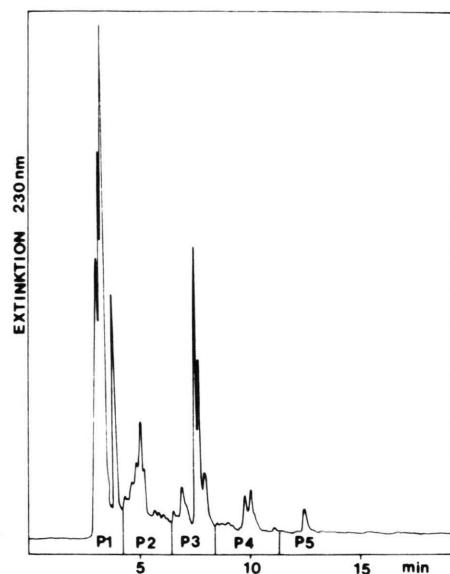


Abb. 1. HPLC-Diagramm der Fraktion DC 2 auf Nucleosil 3 μ und 100; Säule: 250 × 8 mm; Durchfluß 3 ml/min; Druck 101 bar; Laufmittel: 97,5% Hexan:2,5% Ethanol.

das Eluat, das durch Nachspülen der Trennsäule mit Aceton entstand. Zur Trennung wurde eine Latek P-400 Pumpe mit Kratos Spectroflow 773 Absorbance Detector und Knauer 2-Kanalschreiber verwendet.

GC/MS-Analyse

Die Fraktionen P3 und P5 untersuchten wir mit dem Massenspektrometer ZAB-2F der Firma Vakuum Generators kombiniert mit dem Gaschromatographen Carlo Erba 2900. Wir verwendeten eine 60 m Supelcowax 10 Fused-Silica-Kapillarsäule. Die Spektren wurden mit nominaler und genauer Massenmessung registriert. Temperaturprogramm: 40 °C 6 min, 4°/min–220 °C (Abb. 2 und 3).

Ergebnisse und Diskussion

Der Larvenkot von *S. littoralis* enthält eiablagehemmende Wirkstoffe, die in n-Pentan löslich sind [3]. Eine nennenswerte Anreicherung über die Gasphase ist nicht möglich. Zur Identifizierung der Wirkstoffe arbeiteten wir einen Trennungs gang in flüssiger Phase aus. Nach Vortrennung des

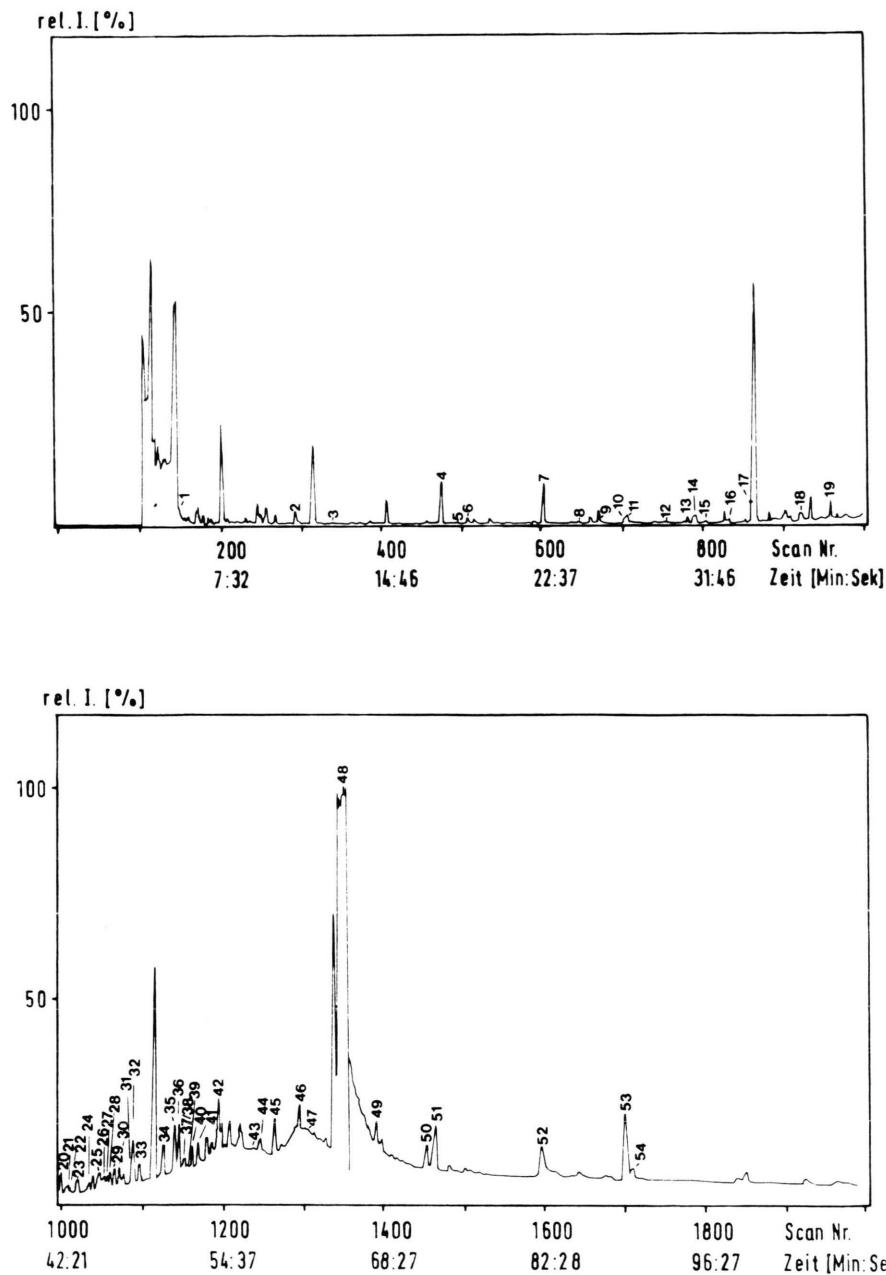


Abb. 2. Totalionenstromchromatogramm von Fraktion P 3, 60 m Supelcowax-10 Fused-Silica-Kapillarsäule, Temperaturprogramm 40 °C 6 min, 4°/min – 220 °C.

Rohextrakts an Kieselgelsäulen mit verschiedenen Laufmitteln und anschließender präparativer Dünnschichtchromatographie erhielten wir zwei eiablagehemmend wirkende Fraktionen. Eine dieser beiden Fraktionen trennten wir mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) weiter

auf. Hierbei stellte sich heraus, daß die Deterrens-wirkung dieser Fraktion durch das Zusam-menspiel von wenigstens zwei Komponenten ausgelöst wird. Keine der fünf HPLC-Fraktionen (P 1–P 5) wirkte für sich allein eiablagehemmend. Erst durch Wiedervereinigung zweier Fraktionen (P 3 + P 5)

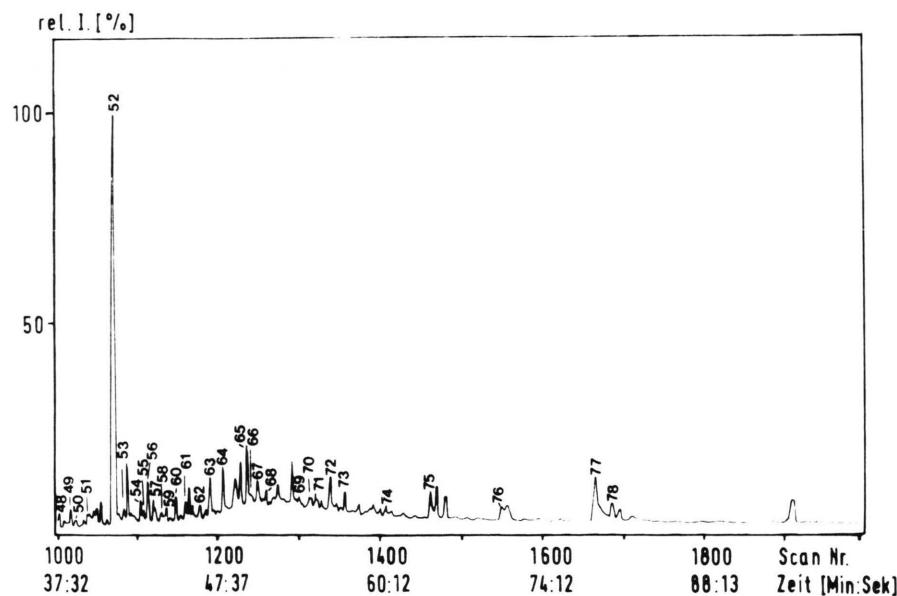
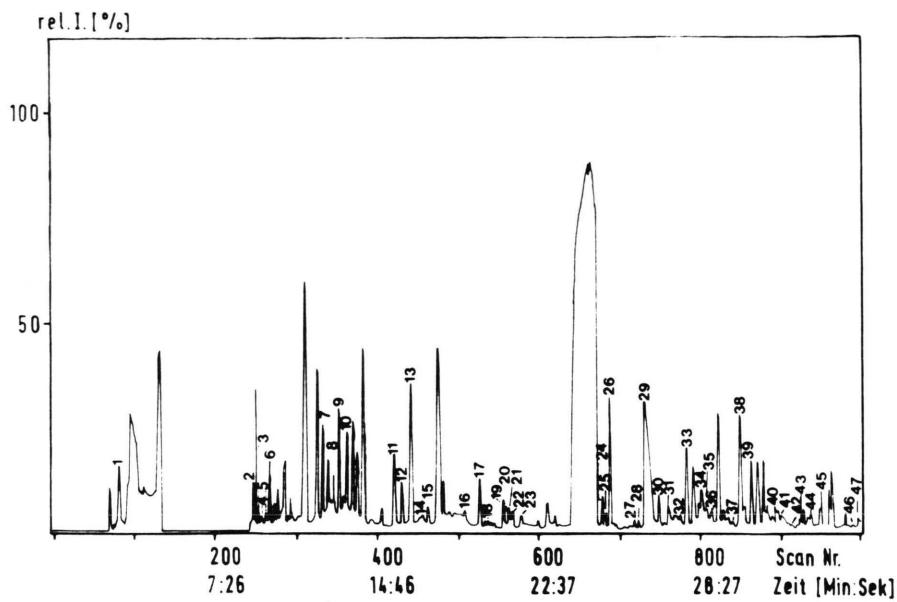


Abb. 3. Totalionenstrom-chromatogramm von Fraktion P 5, 60 m Supelcowax-10 Fused-Silica-Kapillarsäule, Temperaturprogramm 40 °C 6 min, 4°/min – 220 °C.

erhält man die biologische Wirkung zurück. Diese beiden Fraktionen untersuchten wir mittels hochauflösender Kapillar-GC-MS-Kopplung.

Die Tabellen I und II geben einen Überblick über die aus den Fraktionen P3 und P5 aufgrund der massenspektrometrischen Fragmentierung,

des Spektrenvergleiches und des Retentionszeitenvergleiches identifizierten Verbindungen. Die Tabellen enthalten auch die bei der Spurenanalytik unvermeidbaren Artefakte.

Die aus beiden Fraktionen identifizierten Verbindungen nahmen wir als Grundlage zur Herstel-

Tab. I. Überblick über die aus der HPLC-Faktion P3 identifizierten Verbindungen.

Verbindung	
1	Nonan
2	2-Methyl-2-Pentanol
3	3-Methyl-3-Pentanol
4	Dodecan
5	3-Methylcyclopentanon
6	2-Hexanol
7	Tridecan
8	Cyclohexanol
9	Methylstyrol
10	<i>n</i> -Nonanal
11	Tetradecan
12	Essigsäure
13	Keton
14	<i>n</i> -Decanal
15	C ₇ H ₆ Cl ₂
16	1-Octanol
17	Hexadecan
18	Heptadecan
19	delta-Cadinen
20	Capronsäure
21	1-Undecanol
22	Guajacol
23	C ₁₅ H ₂₆ O
24	ungesättigter Kohlenwasserstoff
25	C ₁₅ H ₂₆ O
26	2-Ethylcapronsäure
27	<i>n</i> -Heptansäure
28	ungesättigter Kohlenwasserstoff
29	1-Dodecanol
30	Calamen
31	1-Indanon
32	Myristinsäureisopropylester
33	Nerolidol
34	Caprylsäure
35	Keton
36	<i>n</i> -Nonansäure
37	Eugenol
38	Thymol
39	T-Muurolol
40	Carvacrol
41	Palmitinsäureisopropylester
42	Caprinsäure
43	Terephthalsäuredimethylester
44	C ₇ H ₉ OCl ₃
45	Benzoesäure
46	Laurinsäure
47	<i>trans-trans</i> -Farnesol
48	Phthalsäureester
49	Phythol
50	Myristinsäure
51	?
52	?
53	Palmitinsäure
54	C ₁₂ H ₉ OCl
55	C ₁₂ H ₈ Cl ₂

Tabl. II. Überblick über die aus der HPLC-Faktion P5 identifizierten Verbindungen.

Verbindung	
1	Ethylchlorid
2	2-Pantanon
3	2-Methyl-3-pantanone
4	2-Methyl-2-butanol
5	3-Methyl-2-pantanone
6	2-Butanol
7	2-Methyl-2-pantanone
8	3-Methyl-3-pantanone
9	2-Pantanone
10	1-Methoxy-2-propanol
11	2-Methoxy-ethanol
12	2-Methylcyclopentanon
13	Dodecan
14	Crotylalkohol
15	3-Methylcyclopentanon
16	1-Pantanone
17	1-Chlor-2-methyl-2-propanol
18	Isocyanäurecyclohexylester
19	Cyclohexanon
20	Acetoin
21	Tridecan
22	Cyclopentanol
23	1-Hydroxy-2-propanone
24	1-Chlor-2-butanol
25	Nonanal
26	<i>trans</i> -2-Hexen-1-ol
27	Tetradecan
28	α -Angelicalacton
29	Essigsäure
30	Furfural
31	Keton
32	Phoron
33	3-Chloro-2-butanol
34	Ameisensäure
35	Benzaldehyd
36	Propionsäure
37	<i>iso</i> -Buttersäure
38	D ₆ -Dimethylsulfoxid
39	Nonanal-diethylacetal
40	Decanal-diethylacetal
41	Ethylenglycol
42	γ -Butyrolacton
43	Acetophenon
44	Carbaminsäureethylester
45	<i>n</i> -Heptadecan
46	Acetamid
47	Formylpiperidin
48	<i>n</i> -Octadecan
49	6-Methyl-Valerolacton
50	δ -Valerolacton
51	Capronsäure
52	Benzylalkohol
53	D ₆ -Dimethylsulfon
54	2-Ethylcapronsäure
55	<i>n</i> -Heptansäure
56	1-Dodecanol
57	Diethylenglycol
58	<i>n</i> -Icosan

Tabl. II. Überblick über die aus der HPLC-Faktion P 5 identifizierten Verbindungen. (Fortsetzg.)

Verbindung	
59	Myristinsäuremethylester
60	Myristinsäureisopropylester
61	Caprylsäure
62	Pentadecansäuremethylester
63	Keton
64	Nonansäure
65	Palmitinsäureisopropylester
66	Palmitinsäureethylester
67	Caprinsäure
68	Terephthalsäuredimethylester
69	n-Tetracosan
70	Stearinsäuremethylester
71	Benzoësäure
72	Laurinsäure
73	n-Pentacosan
74	Phythol
75	Myristinsäure
76	Pentadecansäure
77	Palmitinsäure
78	Phthalimid

lung mehrerer synthetischer Mischungen, um so die für die Hemmwirkung in Frage kommenden Verbindungen einkreisen zu können. Wichtig bei der Zusammenstellung war, die Komponenten in den natürlichen Mengenverhältnissen zu mischen. Verändert man das natürliche, von einer Spezies verwendete Mengenverhältnis der Komponenten eines Wirkstoffkomplexes, so kann dies zu einem veränderten Muster der Sinneszellerregung führen. Eine vom natürlichen Verhalten abweichende Reaktion kann die Folge sein [7].

Da die eiablagehemmende Wirkung nur dann auftritt, wenn man die beiden HPLC-Faktionen P 3 und P 5 mischt, mußten auch die synthetischen Testlösungen Substanzen aus beiden Faktionen enthalten. Wir berücksichtigten bei der Zusammenstellung bevorzugt Substanzen, für die auch schon bei anderen Insekten ein Einfluß auf das Verhalten nachgewiesen wurde [7–11]. Neben einer unwirksamen synthetischen Mischung M 1 bewirkt die Mischung M 2 eine leichte Reduzierung der Eiablagen auf Testblättern, während die aus 15 Komponenten bestehende Mischung M 3 signifikant eiablagehemmend wirkt (Tabelle III). Es finden sich nur ca. 20% der Eiablagen auf den Testblättern mit dem Deterrens, während sich auf den Kontrollblättern (behandelt mit den reinen Lösungsmitteln) ca. 80% der Eiablagen befinden.

Tab. III. Zusammensetzung der synthetischen Mischungen.

a)	Mischung M 1 = keine Hemmwirkung 40% Eiablagen Testblätter / 60% Eiablagen Kontrollblätter;
b)	Mischung M 2 = leichte Hemmwirkung 33% Eiablagen Testblätter / 67% Eiablagen Kontrollblätter;
c)	Mischung M 3 = signifikante Hemmwirkung 20% Eiablagen Testblätter / 80% Eiablagen Kontrollblätter.
	Substanz- Verbindung klasse
	Mikroliter bzw. Mikrogramm/ 100 ml Aceton
a)	
n-Alkane	<i>n</i> -Dodecan 40 <i>n</i> -Tridecan 11 <i>n</i> -Tetradecan 4,5 <i>n</i> -Hexadecan 3 <i>n</i> -Heptadecan 3 <i>n</i> -Eicosan 4,5
Ketone	3-Methylcyclopentanon 5 2-Methylcyclopentanon 8,5
Alkohole	Guajacol 2,5
Terpene	Nerolidol 6,5 Eugenol 16,5 Thymol 8 Carvacrol 8 Phythol 90
Lactone	alpha-Angelicalacton 4 gamma-Butyrolacton 2
b)	
Alkohole	Benzylalkohol 84 Guajacol 2,5 <i>trans</i> -2-Hexen-1-ol 28
Aldehyde	Benzaldehyd 5
Terpene	Nerolidol 6,5 Eugenol 16,5 Thymol 8 Carvacrol 8 Phythol 90
c)	
Ketone	1-Indanon 5,5 2-Pantanone 10 2-Methyl-3-pantanone 6 3-Methyl-2-pantanone 9 2-Methylcyclopentanon 8,5 1-Hydroxy-propanone 8 Acetophenone 7
Aldehyde	Benzaldehyd 5 <i>n</i> -Nonanal 6 <i>n</i> -Decanal 2
Terpene	Nerolidol 6,5 Eugenol 16,5 Thymol 8 Carvacrol 8 Phythol 90

Ein Vergleich der Inhaltsstoffe der drei Mischungen läßt den Schluß zu, daß der Benzaldehyd und die Terpene eine entscheidende Rolle bei der Hemmwirkung spielen. Ihr Einfluß reicht jedoch allein nicht aus, erst durch Zugabe weiterer Carbo-nylverbindungen erhält man die volle, den natürlichen Extrakten entsprechende Deterrenswirkung.

Die Tatsache, daß neben der eiablagehemmend wirkenden Mischung zwei synthetische Mischungen (M 1 und M 2) inaktiv waren, sehen wir als Beweis dafür, daß der Deterrenceffekt aus dem Zusammenwirken biologisch relevanter Verbindungen resultiert, und nicht auf der Anwesenheit unspezifisch störender Substanzen beruht. Im Einklang mit den Verhältnissen bei anderen Insekten [12, 13] wird bei *S. littoralis* das Eiablageverhalten nicht durch eine einzige Komponente beeinflußt. Das Sexualpheromon von *S. littoralis* besteht ebenfalls aus mehreren Komponenten. Es konnten fünf ungesättigte Acetate nachgewiesen werden [14]. Die Vorteile von Mehrkomponentensystemen wurden von Bergstrom [15] diskutiert. Mit Hilfe von Multikomponentensystemen kann beispiels-

weise ein Zeit- und Raumgradient von Komponenten erzeugt werden, der auf dem unterschiedlichen Dampfdruck oder der unterschiedlichen Polarität der beteiligten Substanzen beruht. Aus der Kombination einfacher unspezifischer Substanzen in verschiedenen Proportionen resultiert eine hohe Spezifität der Signale. Zur Zeit werden weitere synthetische Mischungen auf ihre biologische Wirksamkeit hin getestet, um aus den 15 für die Deterrenswirkung in Frage kommenden Verbindungen die aktiven Komponenten weiter einzukreisen. Die Frage, ob das Eiablagedeterrens pflanzlichen oder tierischen Ursprungs ist, können wir noch nicht beantworten [2].

Dank

Wir danken dem Bundesminister für Forschung und Technologie (Projekt Nr. 038 530), der Deutschen Forschungsgemeinschaft (Schi 30/18-1) und dem Fonds der Chemischen Industrie für die finanzielle Förderung dieser Arbeit.

- [1] M. A. Moussa, M. A. Zaher und F. Kotby, Bull. Soc. Ent. Egypte **44**, 241–251 (1960).
- [2] M. Hilker, Dissertation, Göttingen 1986.
- [3] M. Hilker und B. Klein, J. Chem. Ecol. **15**, No. 3, 929–938 (1989).
- [4] M. Hilker, Naturwissenschaften **72**, 485–486 (1985).
- [5] R. Patana, USDA Production Research Report **108**, 6 (1969).
- [6] H. H. Shorey und R. L. Hale, J. Econ. Entomol. **58**, 522–524 (1965).
- [7] H. J. Bestmann und Vostrowsky, Die Naturwissenschaften, Heft **10**, 457–471 (1982).
- [8] K. N. Saxena und A. Basit, J. Chem. Ecol. **8**, No. 2, 329–337 (1982).
- [9] R. Karrer, Dissertation, Heidelberg 1987.
- [10] J. W. Wheeler, M. S. Blum und R. L. Torgerson, Science **187**, 254–255 (1975).
- [11] K. Hirai, J. Chem. Ecol. **8**, No. 10, 1263–1270 (1982).
- [12] J. A. Kamm und R. G. Buttery, Environ. Entomol. **15**, 388–391 (1986).
- [13] A. Sakai, H. Honda, K. Oshima und J. Yamamoto, J. Pest. Science **11**, 163–167 (1986).
- [14] E. Dunkelblum und M. Kehat, Insect Biochem. **17**, No. 6, 877–881 (1987).
- [15] G. Bergstrom, in: Chemical Ecology: Odour Communication in Animals, Biomedical Press (F. J. Ritter, ed.), S. 187–200, Elsevier, North-Holland 1979.