

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

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

Birgit Klein<sup>a</sup>, Hermann Schildknecht<sup>a</sup>, Monika Hilker<sup>b</sup> und Siegfried Bombosch<sup>c</sup>

<sup>a</sup> Organisch-Chemisches Institut, Universität Heidelberg, Im Neuenheimer Feld 270, D-6900 Heidelberg, Bundesrepublik Deutschland

<sup>b</sup> Lehrstuhl für Tierökologie II, Universität Bayreuth, Postfach 101251, D-8580 Bayreuth, Bundesrepublik Deutschland

<sup>c</sup> 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 phythol deters oviposition of the Egyptian cotton leaf worm, *Spodoptera littoralis* (Boisd.). All compounds were identified from larval frass of *S. littoralis*.

## Einleitung

Die ägyptische Baumwolleneule, *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 Baumwollschädling 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 Bio-test wird in Literatur [2–4] eingehend beschrieben.

## 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*-Pentan gerührt; die Feststoffe mittels einer G4-Glasfritte entfernt und das Filtrat im Reinstickstoffstrom eingengt.

### 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

Reprint requests to Prof. Dr. H. Schildknecht.

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



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 digitalized 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 orangenen 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 F<sub>254</sub> 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 Auftrennung auf einige Mikroliter eingeeengt. 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  $\mu$  100) der Firma Macherey & Nagel (Stahlsäule: 250  $\times$  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

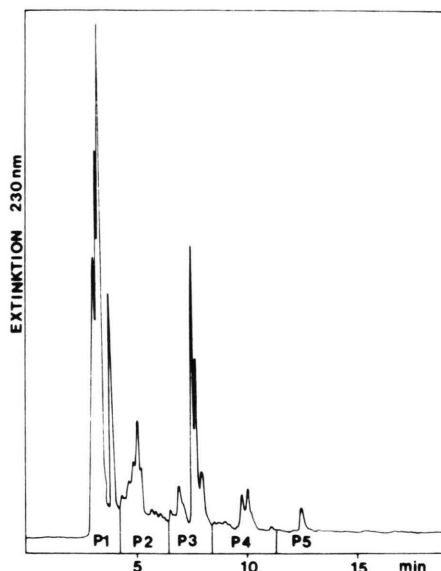


Abb. 1. HPLC-Diagramm der Fraktion DC 2 auf Nucleosil 3  $\mu$  und 100; Säule: 250  $\times$  8 mm; Durchfluß 3 ml/min; Druck 101 bar; Laufmittel: 97,5% Hexan:2,5% Ethanol.

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 Trennungsgang in flüssiger Phase aus. Nach Vortrennung des

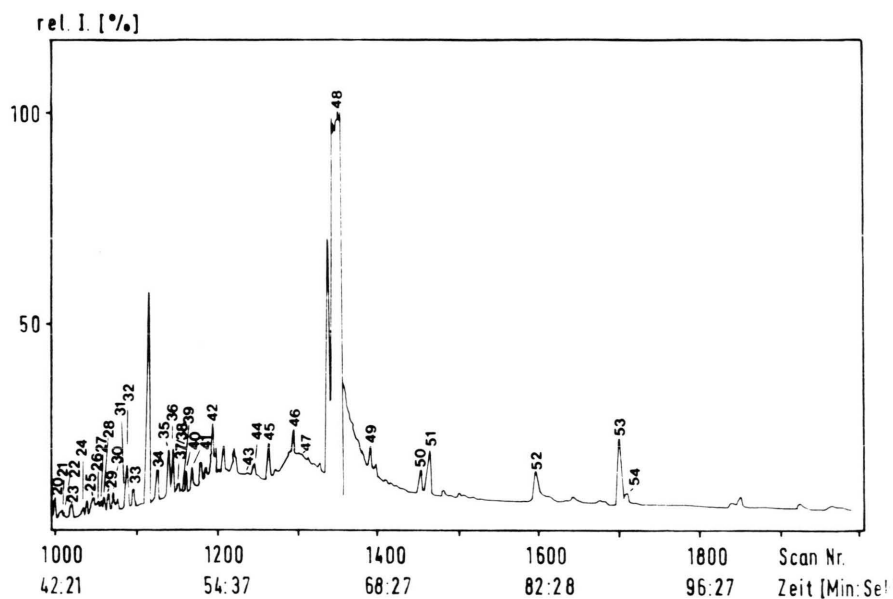
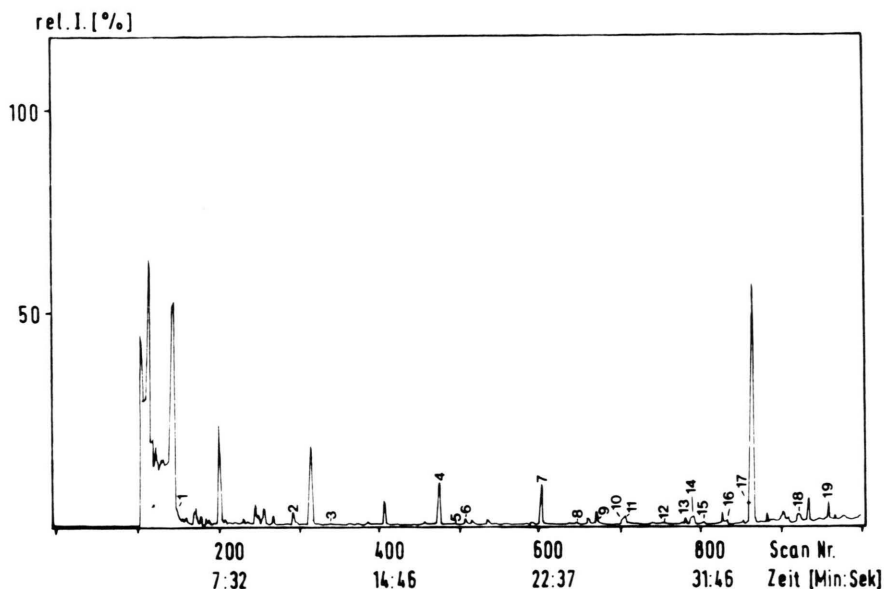


Abb. 2. Totalionenstromchromatogramm von Fraktion P3, 60 m Supelcowax-10 Fused-Silica-Kapillarsäule, Temperaturprogramm 40 °C 6 min, 4°/min – 220 °C.

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 Deterrenswirkung dieser Fraktion durch das Zusammenspiel von wenigstens zwei Komponenten ausgelöst wird. Keine der fünf HPLC-Fractionen (P1–P5) wirkte für sich allein eiablagehemmend. Erst durch Wiedervereinigung zweier Fraktionen (P3 + P5)

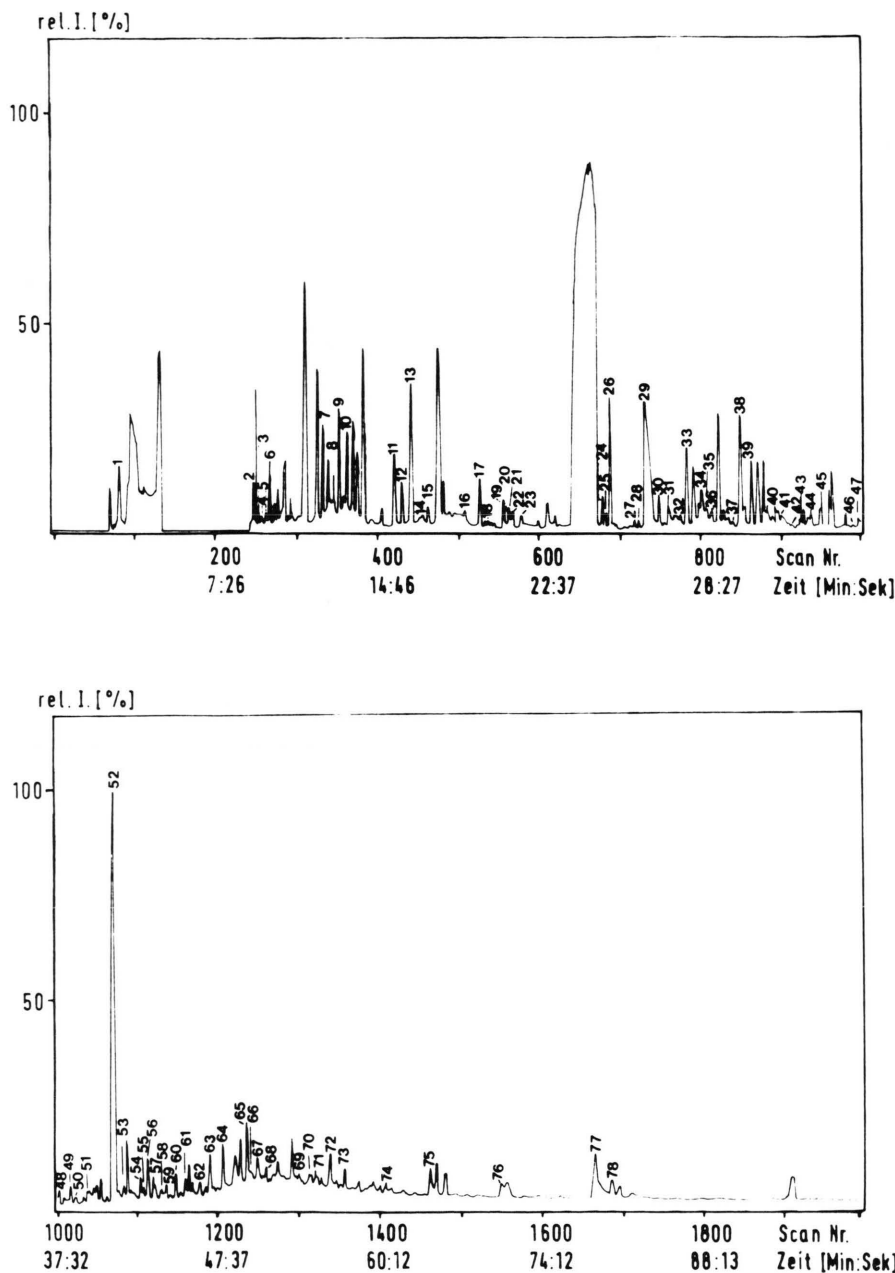


Abb. 3. Totalionenstromchromatogramm von Fraktion P5, 60 m Supelcowax-10 Fused-Silica-Kapillarsäule, Temperaturprogramm 40 °C 6 min, 4°/min – 220 °C.

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-Fraktion 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 <sub>7</sub> H <sub>6</sub> Cl <sub>2</sub>	
16 1-Octanol	
17 Hexadecan	
18 Heptadecan	
19 delta-Cadinen	
20 Capronsäure	
21 1-Undecanol	
22 Guajacol	
23 C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O	
24 ungesättigter Kohlenwasserstoff	
25 C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> 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 <sub>7</sub> H <sub>7</sub> OCl <sub>3</sub>	
44 Benzoesäure	
45 Laurinsäure	
46 <i>trans-trans</i> -Farnesol	
47 Phthalsäureester	
48 Phythol	
49 Myristinsäure	
50 ?	
51 ?	
52 Palmitinsäure	
53 C <sub>12</sub> H <sub>9</sub> OCl	
54 C <sub>12</sub> H <sub>8</sub> Cl <sub>2</sub>	

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

Verbindung	
1 Ethylchlorid	
2 2-Pentanon	
3 2-Methyl-3-pentanon	
4 2-Methyl-2-butanol	
5 3-Methyl-2-pentanon	
6 2-Butanol	
7 2-Methyl-2-pentanol	
8 3-Methyl-3-pentanol	
9 2-Pentanol	
10 1-Methoxy-2-propanol	
11 2-Methoxy-ethanol	
12 2-Methylcyclopentanon	
13 Dodecan	
14 Crotylalkohol	
15 3-Methylcyclopentanon	
16 1-Pentanol	
17 1-Chlor-2-methyl-2-propanol	
18 Isocyansäurecyclohexylester	
19 Cyclohexanon	
20 Acetoin	
21 Tridecan	
22 Cyclopentanol	
23 1-Hydroxy-2-propanon	
24 1-Chlor-2-butanol	
25 Nonanal	
26 <i>trans</i> -2-Hexen-1-ol	
27 Tetradecan	
28 $\alpha$ -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 <sub>6</sub> -Dimethylsulfoxid	
39 Nonanaldiethylacetal	
40 Decanaldiethylacetal	
41 Ethylenglycol	
42 $\gamma$ -Butyrolacton	
43 Acetophenon	
44 Carbaminsäureethylester	
45 <i>n</i> -Heptadecan	
46 Acetamid	
47 Formylpiperidin	
48 <i>n</i> -Octadecan	
49 6-Methyl-Valerolacton	
50 $\delta$ -Valerolacton	
51 Capronsäure	
52 Benzylalkohol	
53 D <sub>6</sub> -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-Fraktion P5 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	<i>n</i> -Tetracosan
70	Stearinsäuremethylester
71	Benzoesäure
72	Laurinsäure
73	<i>n</i> -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 Sinneszellenerregung führen. Eine vom natürlichen Verhalten abweichende Reaktion kann die Folge sein [7].

Da die eiablagehemmende Wirkung nur dann auftritt, wenn man die beiden HPLC-Fraktionen P3 und P5 mischt, mußten auch die synthetischen Testlösungen Substanzen aus beiden Fraktionen 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 M1 bewirkt die Mischung M2 eine leichte Reduzierung der Eiablagen auf Testblättern, während die aus 15 Komponenten bestehende Mischung M3 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 M1 = keine Hemmwirkung  
40% Eiablagen Testblätter / 60% Eiablagen Kontrollblätter;  
b) Mischung M2 = leichte Hemmwirkung  
33% Eiablagen Testblätter / 67% Eiablagen Kontrollblätter;  
c) Mischung M3 = signifikante Hemmwirkung  
20% Eiablagen Testblätter / 80% Eiablagen Kontrollblätter.

Substanz- klasse	Verbindung	Mikroliter bzw. Mikrogramm/ 100 ml Aceton
a)		
<i>n</i> -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-Pentanon	10
	2-Methyl-3-pentanon	6
	3-Methyl-2-pentanon	9
	2-Methylcyclopentanon	8,5
	1-Hydroxy-propanon	8
	Acetophenon	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 (M1 und M2) inaktiv waren, sehen wir als Beweis dafür, daß der Deterrenseffekt 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 Bergstroem [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. Bergstroem, in: Chemical Ecology: Odour Communication in Animals, Biomedical Press (F. J. Ritter, ed.), S. 187–200, Elsevier, North-Holland 1979.