

Feromony hmyzu

od základního výzkumu k praktickému využití...



Michal Hoskovec

Fakulta lesnická a dřevařská, ČZU, Praha
Ústav organické chemie a biochemie, AVČR, Praha

Hmyzí škůdce... lze použít feromonů v boji s ním ?

- to, zda lze pro boj s daným druhem hmyzu využít jeho chemických komunikačních prostředků, je otázkou časově a instrumentálně náročného výzkumného procesu
- vlastní proces má tyto základní kroky:
 - pilotní sledování chování druhu (komunikuje chemicky?, kdy?, sex?)
 - biologické testy s živými jedinci
 - získání potřebného materiálu pro výzkum (chov, sběr...)
 - izolace feromonu (extrakce feromonových žláz, jímání těkavých látek...)
 - identifikace feromonu (analytické techniky: GC-EAD, GC-MS, NMR etc.)
 - syntéza feromonu pokud nejde o známou a dostupnou sloučeninu(-y)
 - primární biologické testy v laboratoři (větrný tunel, olfaktometry, EAD)
 - pilotní polní testy
- pokud byly předcházející kroky úspěšné, následují:
 - rozsáhlé polní testy spojené s optimalizací složení feromonu, lapáku...
 - vývoj metodiky praktického využití v lese, sadu či poli
 - ekonomická rozvaha a případná výroba a distribuce

První příběh...

Cameraria ohridella (klíněnka jírovcová)

Aesculus hippocastanum (jírovec maďal)



- čeleď Sapindaceae (mýdelníkovité)
- původní v malé oblasti Balkánského poloostrova
- od XVI. století pěstován v celé Evropě
- významný okrasný strom
- bez nebezpečných škůdců do roku 1990...

Cameraria ohridella Deshka & Dimić, 1986



- čeleď Gracillariidae (vzpřímenkovití)
- velikost: 4 – 5 mm dlouhý motýlek
- výskyt: posledních 15 let explosivní šíření po Evropě
- původ neznámý (šíří se ale z Makedonie)
- dospělci ve střední Evropě od dubna do října

Cameraria ohridella - biologie



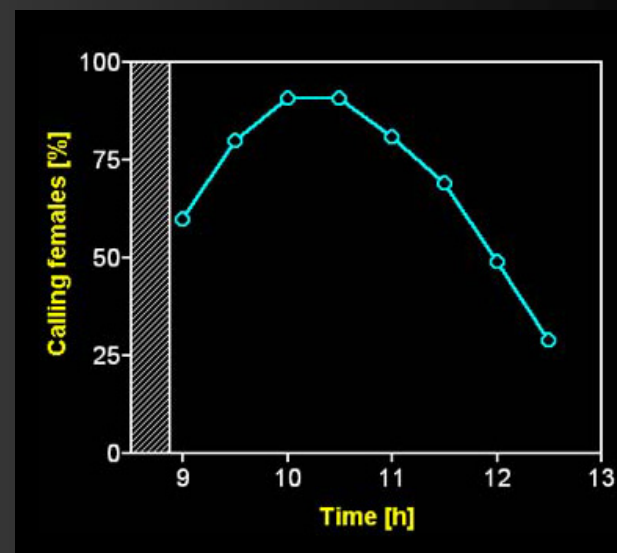
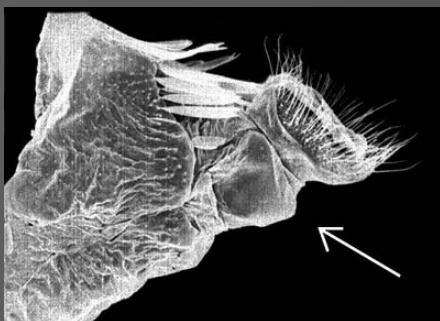
Housenky tohoto drobného motýlka vyžírá parenchym listů jírovce a tvoří v nich tak rozsáhlé miny, ve kterých se nakonec zakuklí. Klíněnka může mít až 4 generace za rok e exponenciálním nárůstem jedinců z generace na generaci. To je spolu s praktickou absencí přirozených nepřátel (parazitace housenek jen 5-10%) příčinou explozivního šíření škůdce. Pokud dojde ke kompletní defoliaci jírovců během vegetační sezony, mohou pak mít problém s akumulací živin na zimu a jaro.

První zjištění...

Úlovky samců *C. ohridella* v lepových Delta lapácích
Královská zahrada Pražského hradu (pozdní léto 1998)

Návnada	3 samičky	3 samci	Kontrola
Datum	Uloveno: samců <i>C. ohridella</i> (jiné druhy)		
30.VII. ^a	113 (27)	nd	5 (1)
10.-12.IX. ^b	56 (14)	1 (0)	1 (0)
21.-28.IX. ^b	18 (3)	0 (0)	5 (1)

^a3. generace; ^b4. generace; nd - neurčeno

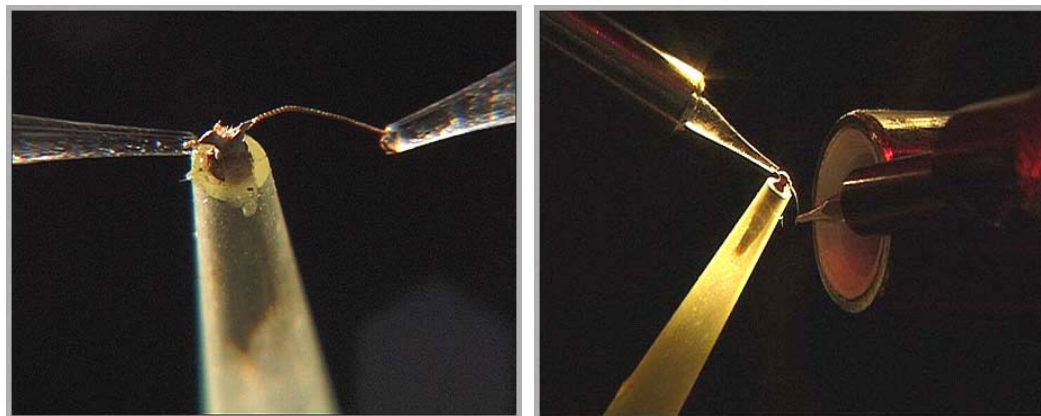
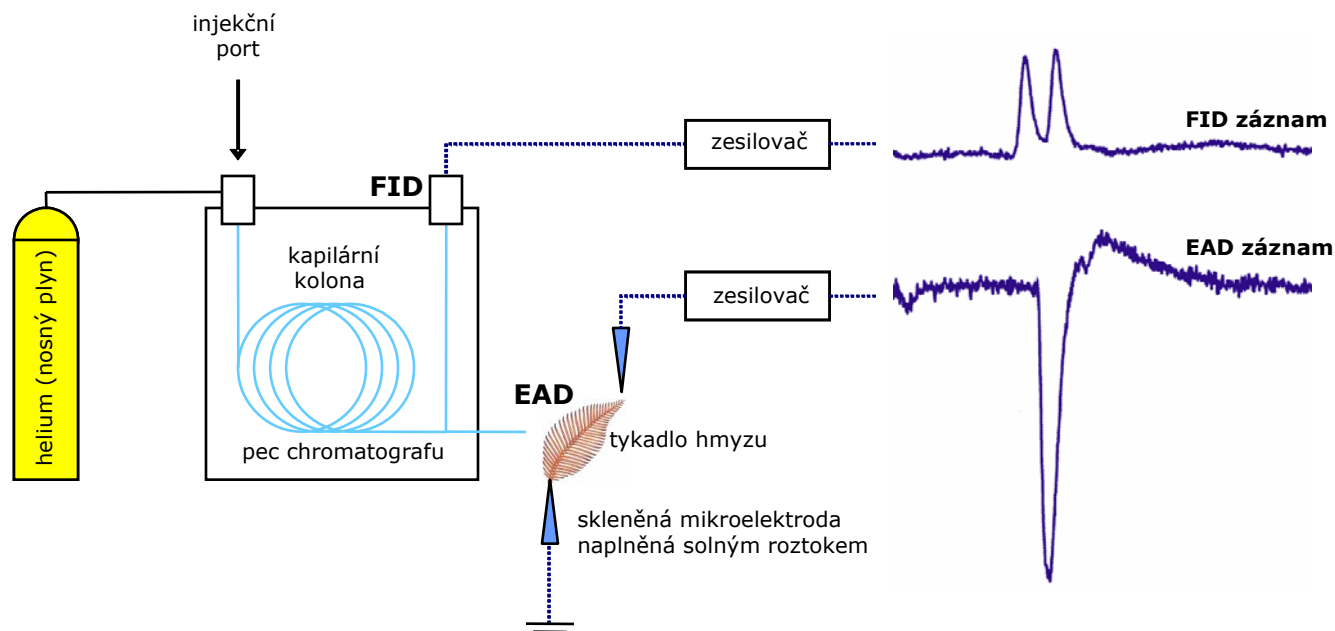


Polní pokusy a pokusy ve větrném tunelu se samičkami v klíčkách prokázaly, že samičky produkují velmi účinný sexuální feromon v časně fotofázi (LD 14:10).

Během této aktivní periody samičky exponují svoje kladélko ventrálně v typicky „volací“ poloze. Hexanové oplachy kladélka volajících samiček byly vysoce aktivní ve větrném tunelu a také při elektrofyziologických pokusech (EAD – elektroantenografie).

GC-EAD

První a klíčový zdroj informací ve výzkumu infochemikálií

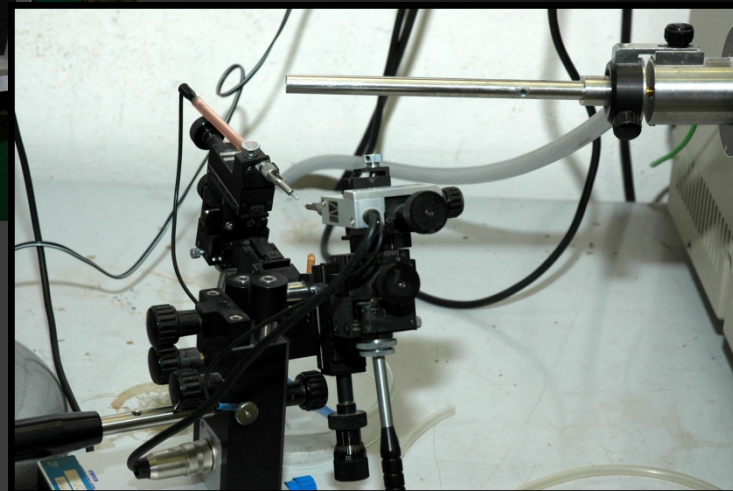


GC-EAD

starší GC-EAD v naší elektrofyziologické laboratoři

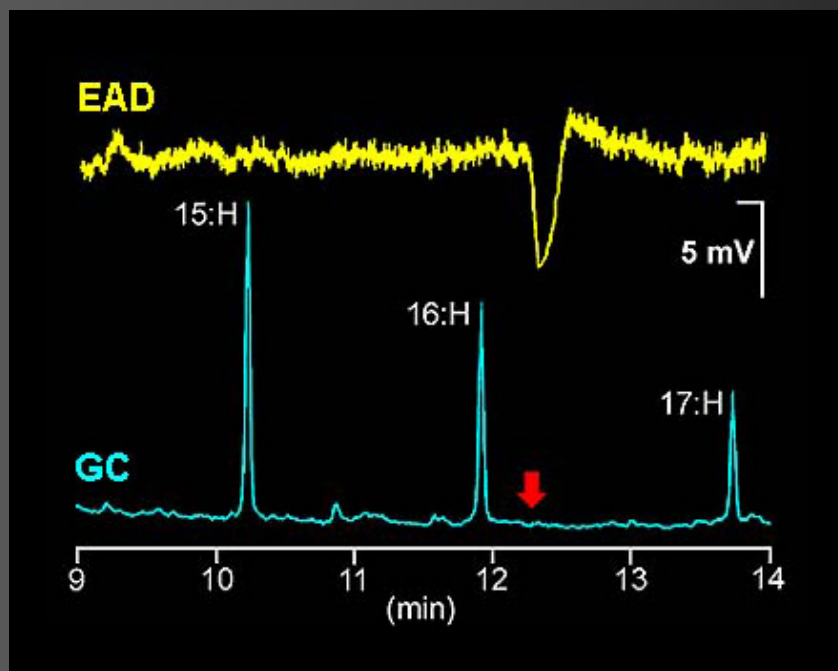


- plynový chromatograf Hewlett-Packard 5890
- splitter (dělič toku) Graphpack 3D/2
- zařízení pro úpravu efluentu Syntech
- mikromanipulátor, zesilovače, data stanice...



Kapitola I

- Předběžné GC-EAD testy hexanových extraktů z volajících samiček, kde bylo jako biologický detektor použito samčí tykadlo klíněnky, ukázaly silnou aktivitu v jedné oblasti EAD záznamu, ale bohužel jsme nenalezli žádný odpovídající pík na paralelně získaném záznamu z FID detektoru.
- Navíc ani když byl do GC-MS systému (Varian Saturn 2000; iontová past) injektován hexanový extrakt ze 100 samiček, nezískali jsme žádné rozumné hmotnostní spektrum v oblasti EAD aktivity.



Kapitola II

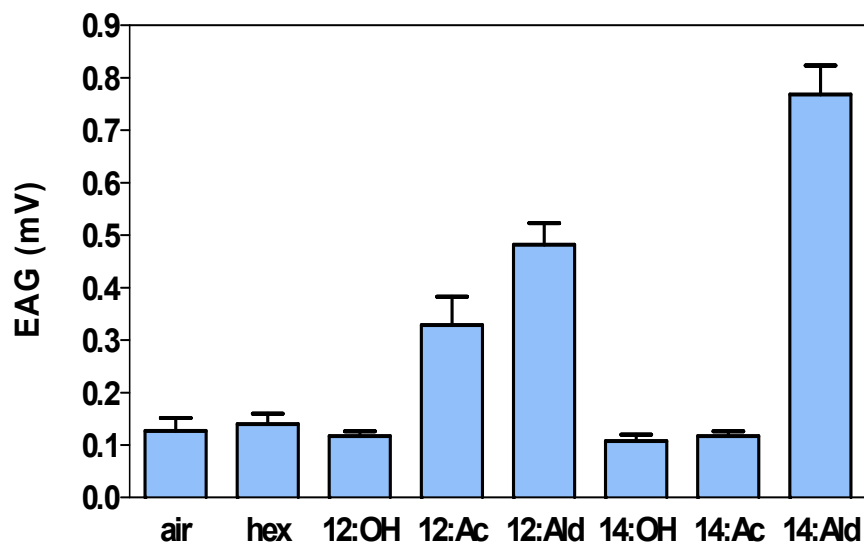
V tuto chvíli jsme měli k dispozici je následující analytické techniky:

- prověření retenčních vlastností EAG píku na různých GC fázích
- testování antenální specificity na knihovnách syntetických cílové molekule feromonu podobných sloučenin (k získání „EAG-response“ profilů)
- mikroderivatizace extraktů feromonové žlázy ve spojení s EAG

Kapitola II

PRVNÍ KROK

- získání informací o feromonech příbuzných druhů (rešerše)
- výsledky - několik typů C_{12} a C_{14} sloučenin...
- Pomocí EAG byly testovány C_{12} a C_{14} sloučeniny (aldehydy, acetáty a alkoholy)

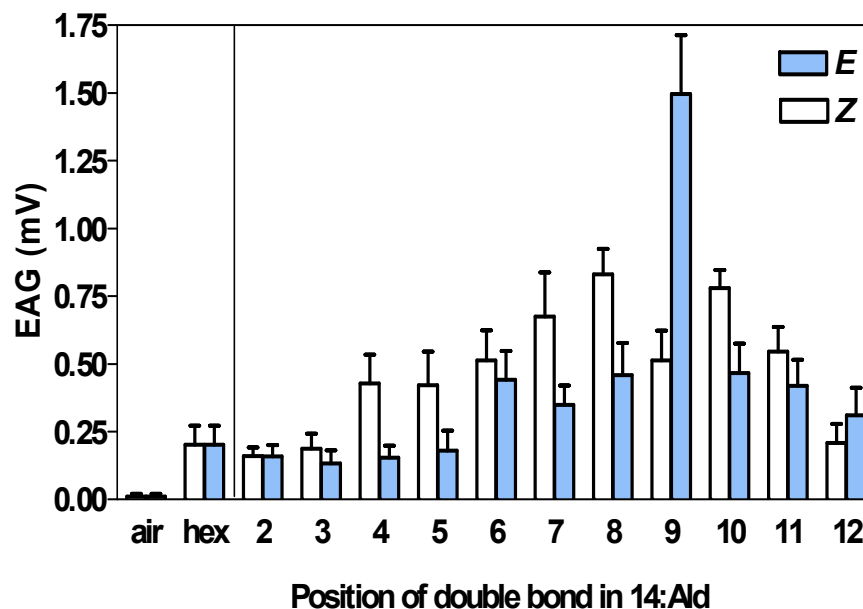


EAG prokázaly nejvyšší aktivitu u C_{14} aldehydu...

Kapitola II

KROK DRUHÝ

- testování všech mononenasycených of C_{14} aldehydů (E a Z isomerů)
- testy ukázaly nejvyšší EAG aktivitu u sloučenin s polohou dvojné vazby 8 až 10



Kapitola II

KROK TŘETÍ

- Studium retenčního chování
- Kovátsovy indexy (KI) EAD píku byly stanoveny na více GC kolonách s různými fázemi se stoupající polaritou a získaná data byla provnána s KI lineárních alacetátů, alkoholů a aldehydů...

GC fáze ^a	Samičí extrakt (cca 5 samic) ^b	12:Ac	14:OH	14:Ald
DB-1 ^c	1623.3	-	-	-
DB-5 ^c	1674.4	1605.9	1610.8	1675.4
DB-WAX ^d	2031.2	-	-	-

^a J & W Sciences, 30 m × 0.25 mm × 0.25 μm

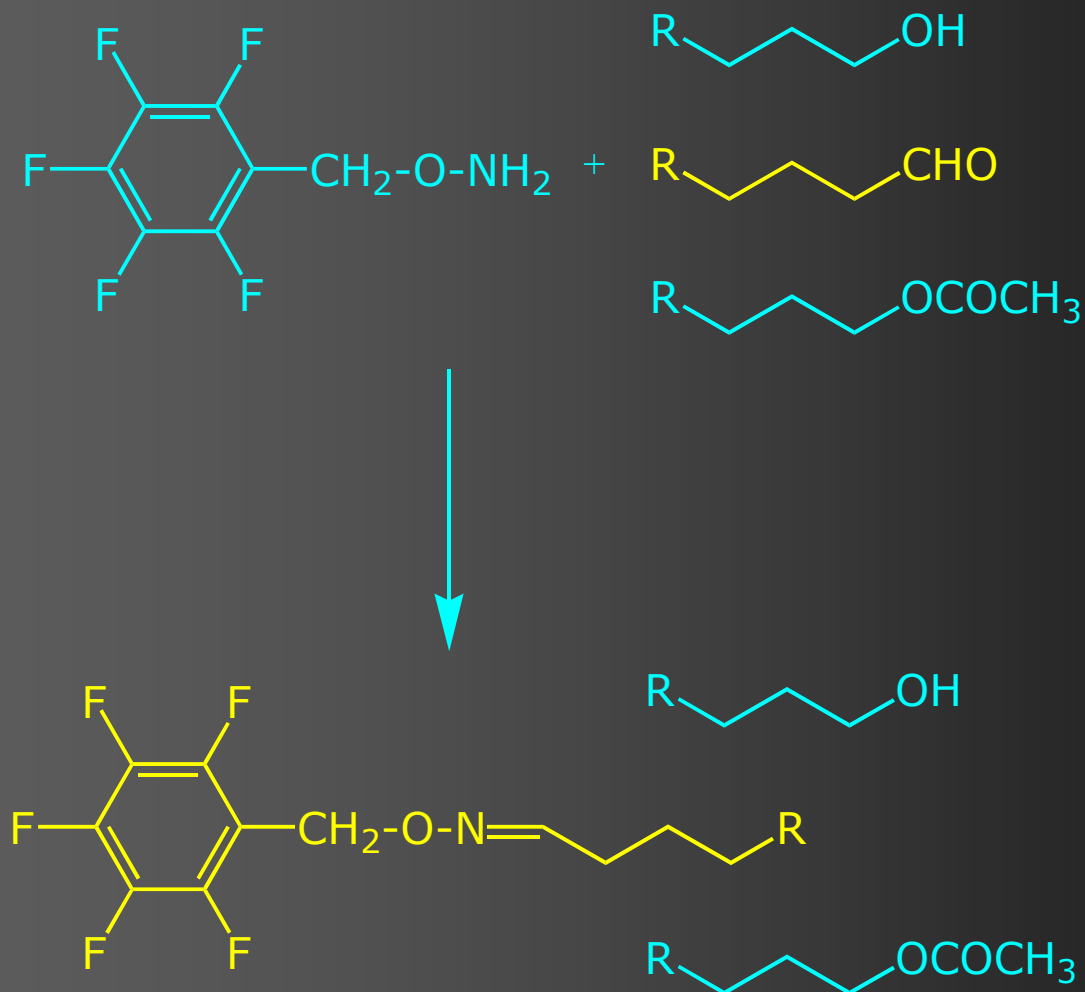
^b pro EAD záznam

^c 170 °C

^d 140-240°C @ 5°C / min

Kapitola III

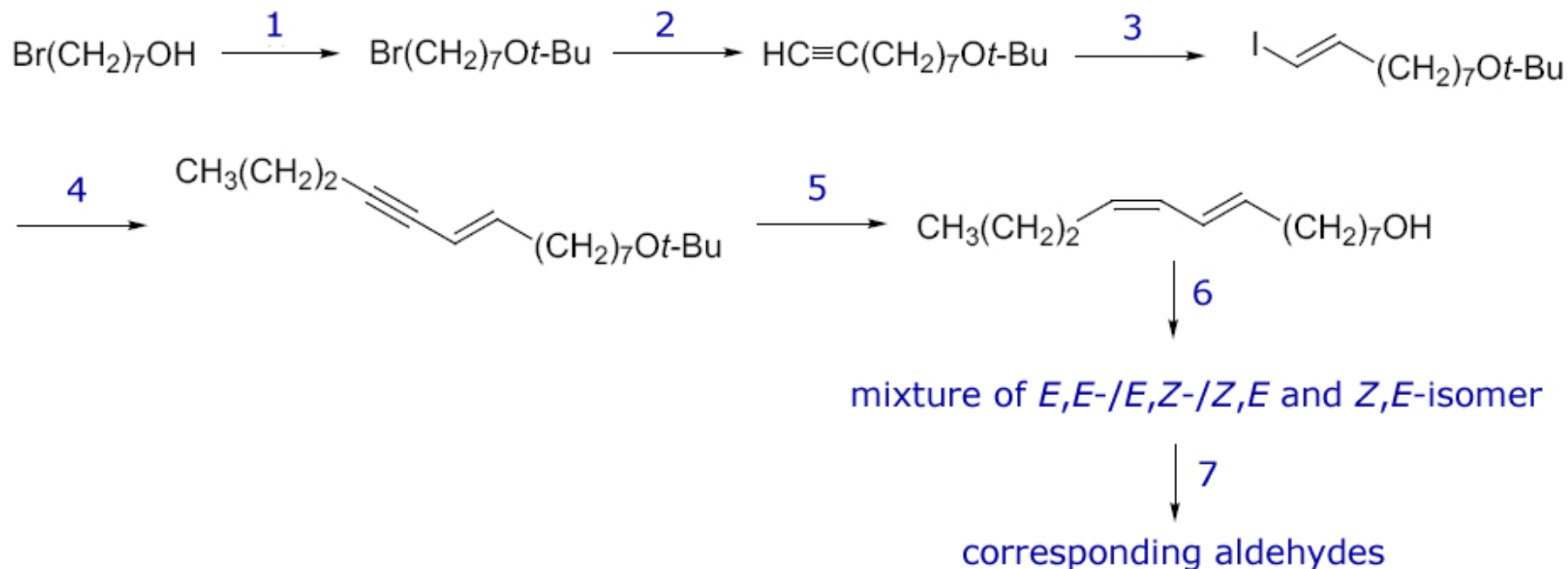
Mikroderivatizace s O-(2,3,4,5,6-pentafluorobenzyl)hydroxylaminem:



Kapitola III

- Oba získané KI / EAG profily jasně ukázaly, že molekula feromonu obsahuje aldehydickou skupinu, je nenasycené a dvojná vazba(y) musí být situována blízko atomu C-9.
- Aldehydická povaha feromonu byla potvrzena mikroderivatizací hexanových extraktů reakcí s O-(2,3,4,5,6-penta-fluorobenzyl)hydroxylamin hydrochloridem v metanolickém roztoku – ty po reakci totiž ztratily svoji aktivitu jak ve větrném tunelu tak i při EAG.
- (*E*)-tetradec-9-enal s nejvyšším EAG potenciálem měl však při behaviorálních testech nízkou aktivitu a také měl odlišné KI (1601.8 na DB-5) od přírodního extraktu. **To prostě není sexuální feromon...**
- Ze srovnání KI na DB-1 a DB-5 fázích lze spekulovat, že molekula feromonu má více dvojných vazeb. Její KI na DB-5 fázi je mnohem vyšší než na fázi DB-1, což obvykle svědčí o přítomnosti konjugovaných dvojných vazeb. Na základě těchto dat a naměřených EAG profilů jsme se rozhodli syntetizovat všechny geometrické izomery 7,9-, 8,10-, a 9,11-tetradekadienalů (12 sloučenin!).

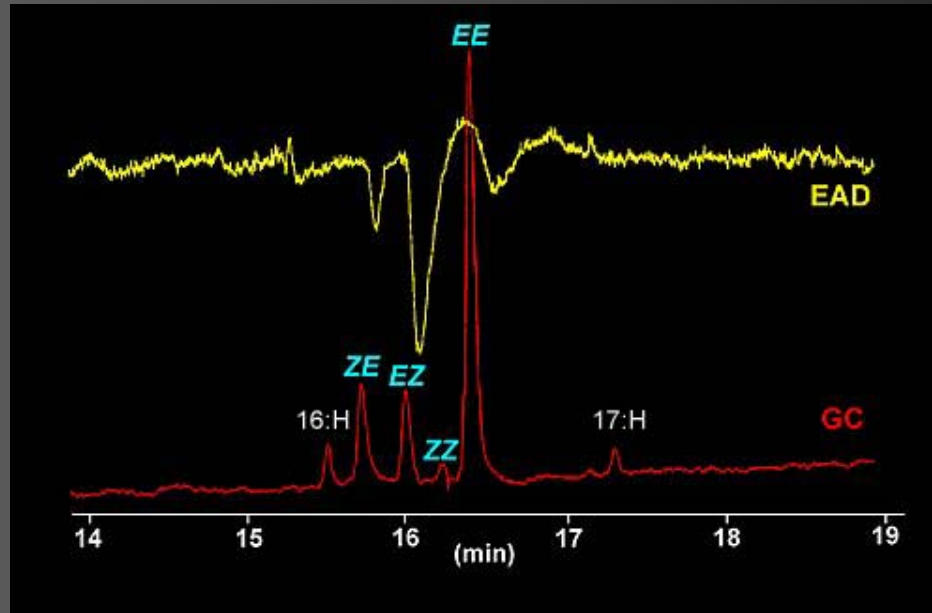
Kapitola IV – syntéza feromonu (8,14-řada)



- 1. Ochránění hydroxylové skupiny:** 2-methylpropan (Amberlyst v hexanu)
- 2. Prodloužení C-řetězce:** $\text{LiC}\equiv\text{CH}$ / THF, DMPU
- 3. Hydroaluminace a jodace:** a) DIBAH / THF; b) I_2 / THF; c) NaOH vodný roztok
- 4. Cross-coupling:** 1-pentyn / $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$, CuCl v butylaminu
- 5. Redukce:** a) dicyklohexylboran / THF; b) CH_3COOH ; c) NaOH; d) H_2O_2
Odchránění hydroxylové skupiny: a) FeCl_3 / CH_3COOH ; b) NaOH
- 6. Isomerizace dvojných vazeb:** fenylmerkaptan v benzenu
- 7. Oxidace:** PCC / octan sodný v CH_2Cl_2

Kapitola IV

- GC-EAD analýza všech tří syntetizovaných izomerních směsí ukázala že pouze směs izomerů **8,10-tetradekadienalů (8,10-14:Ald)** vykazuje nejvyšší aktivitu



- Geometrické isomery **8,10-14:Ald** byly separovány pomocí plynové chromatografie (GC) a my získali GC-EAD profily jednotlivých isomerů. Ačkoli samčí tykadlo bylo citlivé na více než jeden isomer, z výběru jsme eliminovali *Z,E*- a *E,E*-isomery. ***E,Z*-isomer** vykazoval vyšší EAD aktivitu než *Z,Z*. *E,Z*-isomer byl testován pomocí GC-EAD na více GC fázích a retenční chování jeho EAD píku **se vždy zcela shodovalo** (při sub-ng množství) s retenčním chováním extraktu volajících samiček.

Kapitola IV

- Při experimentech ve větrném tunelu 1 - 0.1 pg již **E8,Z10-14:Ald** vykazovalo vysokou atraktivitu pro samce, srovnatelnou s atraktivitou extraktu tří samičích feromonových žláz.

Srovnání Kovátsových indexů (založených na retenčním času *n*-alkanů jako standardů) EAD píku *C. ohridella* samičího extraktu s některými syntetickými sloučeninami

GC fáze ^a	Samičí extrakty (ca 5 samic) ^b	12:Ac	14:OH	14:Ald	<i>E,Z</i> -8,10-14:Ald
DB-1 ^c	1623.3	-	-	-	1623.9
DB-5 ^c	1674.4	1605.9	1610.8	1675.4	1674.3
DB-WAX ^d	2031.2	-	-	-	2031.8

^aJ & W Sciences, 30m×0.25 mm, f.t. 0.25 μm

^bpro EAD záznam

^c170 °C

^d140-240°C @ 5°C / min

Kapitola IV– Vítězství...

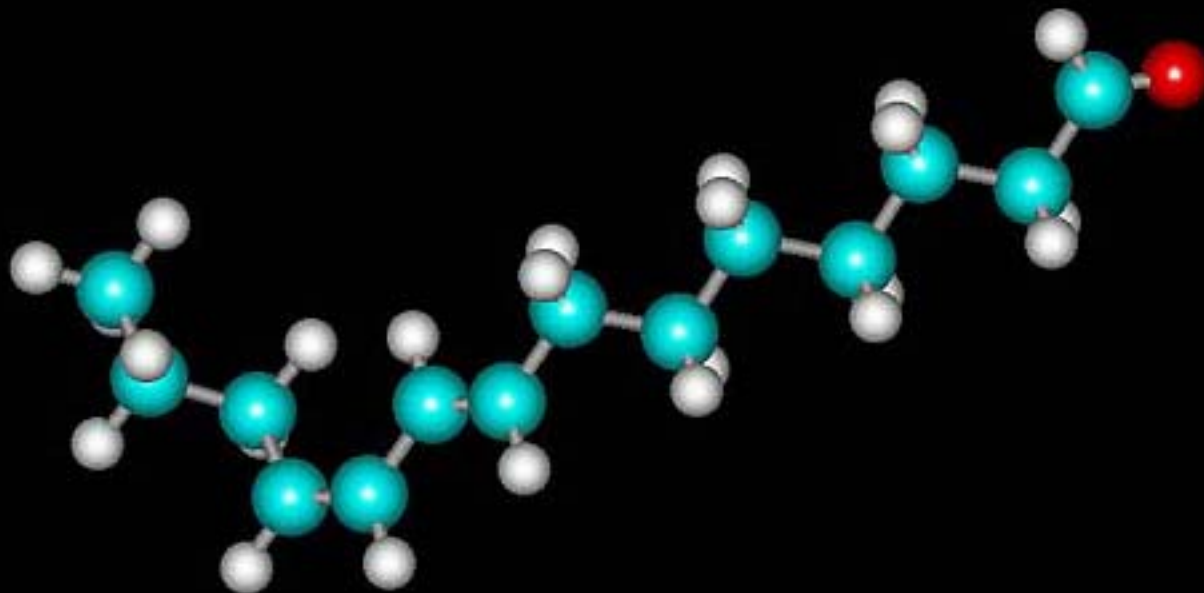
- Při polních testech bylo jako návnady v lepkové pasti použito 5 ng *E8,Z10-14:Ald* vysoce atraktivního pro samce *Cameraria ohridella*



vysledek prvního terenního testu syntetického *E8,Z10-14:Ald*
(420 samců *Cameraria ohridella* chyceno přes noc...)

- Všechna výše zmíněná data potvrdila, že *E8,Z10-14:Ald* je hlavní složka sexuálního feromonu klíněnky jírovcové (*Cameraria ohridella*)

Kapitola IV– Vítězství...



(8E,10Z)-tetradeka-8,10-dienal

(8E,10Z)-Tetradeca-8,10-dienal byl v době řešení projektu (1999) nově objevený sexuální feromon a první identifikovaný sexuální feromon u rodu *Cameraria*. Jeho ostatní isomery byly popsány jako atraktanty samců jiných druhů motýlů; E,E pro *Acrocercops* sp. a Z,Z pro *Phyllonorycter* sp. Systém E,Z-konjugovaných dvojných vazeb je u molekul motýlích feromonů poměrně běžný, lze ho například nalézt u bombykolu, prvního popsaném sexuálním feromonu...

Shrnutí

Hmyzí tykadlo se zde ukázalo jako silný analytický nástroj v okamžiku, kdy klasická GC-MS technika dosáhla svého limitu citlivosti. Je **extrémně citlivé k feromonovým složkám** díky specializovaným receptorům, které jsou při zvýšených koncentracích schopny odpovědět i na strukturní analogy feromonů. Využitím těchto schopností tykadla a pomocí knihoven analogických struktur jsme pak byli schopni postupně, krok za krokem, odhalit strukturu vlastního feromonu.

Feromon sám je komerčně vyráběn v ČR a je ve formě lapáků celoevropsky používán pro monitorování výskytu klíněnky při optimalizaci účinného zásahu speciálními insekticidy a tím tak také minimalizaci ekologické zátěže.

Svatoš A., Kalinová B., Hoskovec M., Kindl J. and Hrdý I.:
Chemical Communication in Horse-Chestnut Leafminer *Cameraria ohridella* Deschka & Dimić
Plant Protection Science **35**, 10-13 (1999).

Svatoš A., Kalinová B., Hoskovec M., Kindl J., Hovorka O. and Hrdý I.:
Identification of a new lepidopteran sex pheromone in picogram quantities using an antennal biodetector: (8E,10Z)-tetradeca-8,10-dienal from *Cameraria ohridella*.
Tetrahedron Letters **40**, 7011-7014 (1999).

Hoskovec M., Šaman D., and Svatoš A.:
Synthesis of (8E,14Z)-tetradeca-8,10-dienal, sex pheromone of horse chestnut leafminer (*Cameraria ohridella*) and all its geometrical isomers.
Collection of Czechoslovak Chemical Communications **65**, 511-523 (2000).

Kalinová B., Svatoš A., Kindl J., Hovorka O., Hrdý I., Kuldová J. and Hoskovec M.:
Sex pheromone of horse-chestnut leafminer *Cameraria ohridella* and its use in a pheromone-based monitoring systems.
Journal of Chemical Ecology **29**, 387-404 (2003).

Druhý příběh...

Euzophera batangensis (zavíječ cicimkový)

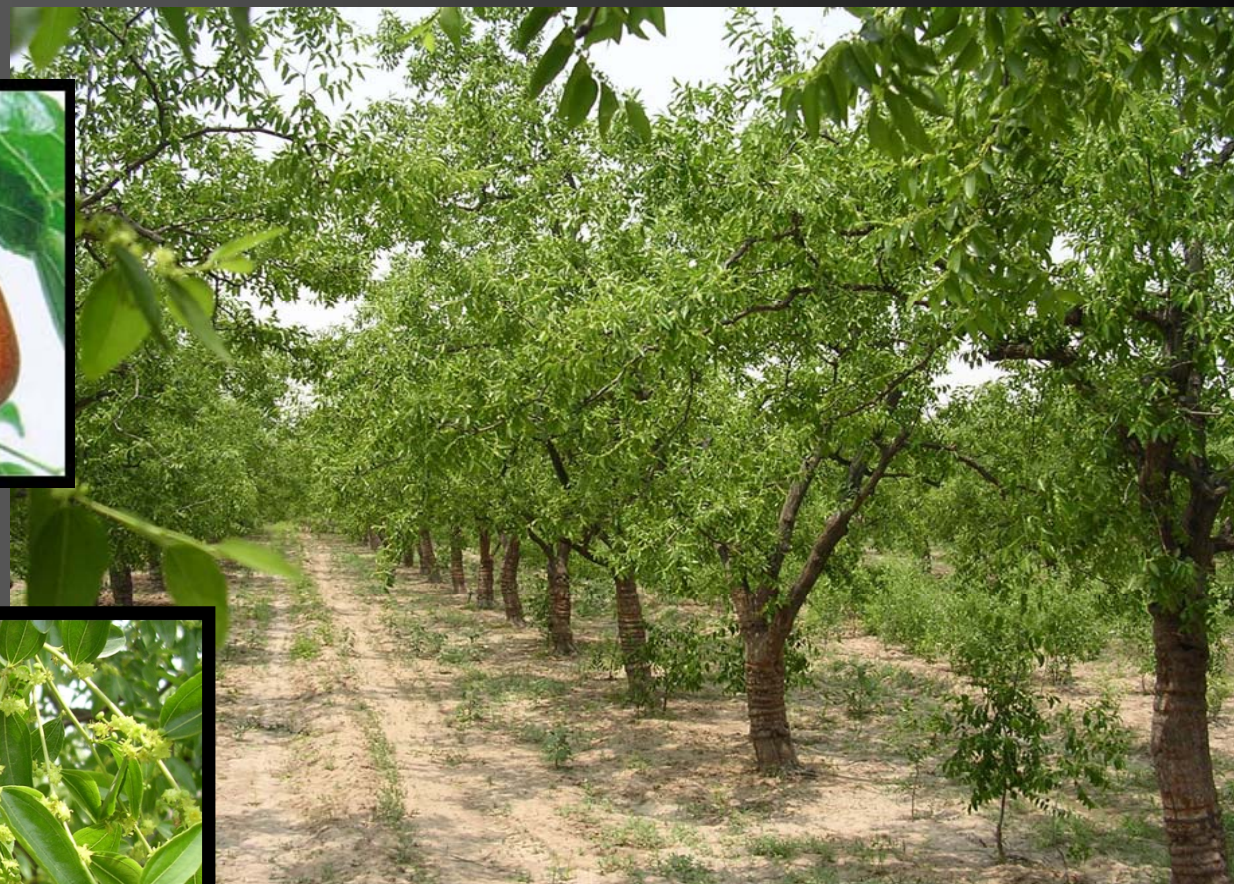
Euzophera batangensis Caradja, 1939



- čeleď Pyralidae (zavíječovití)
- výskyt: Čína, Korea, Japonsko
- vývoj pod kůrou stromů
- původně neškodný polyfágní druh
- až 5 generací za rok



Ziziphus jujuba (čínská datle, cicimek jujuba)



- čeleď Rhamnaceae (řešetlákovité)
- 900 000 ha sadů jev v provincii Hebei !
- velmi důležitá ovocná dřevina
- více než 750 kultivarů

Ziziphus jujuba – “kroužkování”

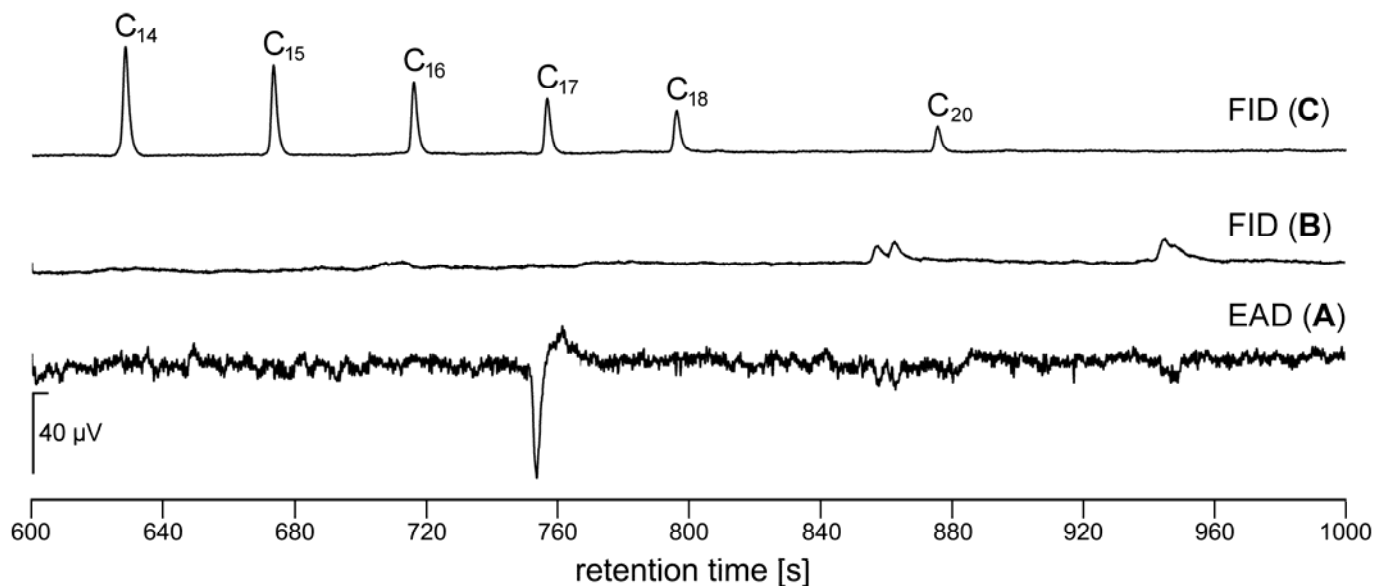


- běžná sadařská praxe v Číně (prevence zpětného toku živin)
- zvýšení úrody až o 30%
- skutečný “prostřený stůl” pro *E. batangensis* (samičky kladou vajíčka do čerstvých řezů)

Euzophera batangensis – škůdce & opatření



- světelné a keповé pasti mají nízký efekt
- insekticidy (?-cena, ?-životní prostředí)
- šance pro feromonové pasti a integrovanou ochranu rostlin



Sekce GC-EAD / GC-FID záznamů

A/B: hexanové extrakty feromonových žláz *E. batangensis* (1 samička)

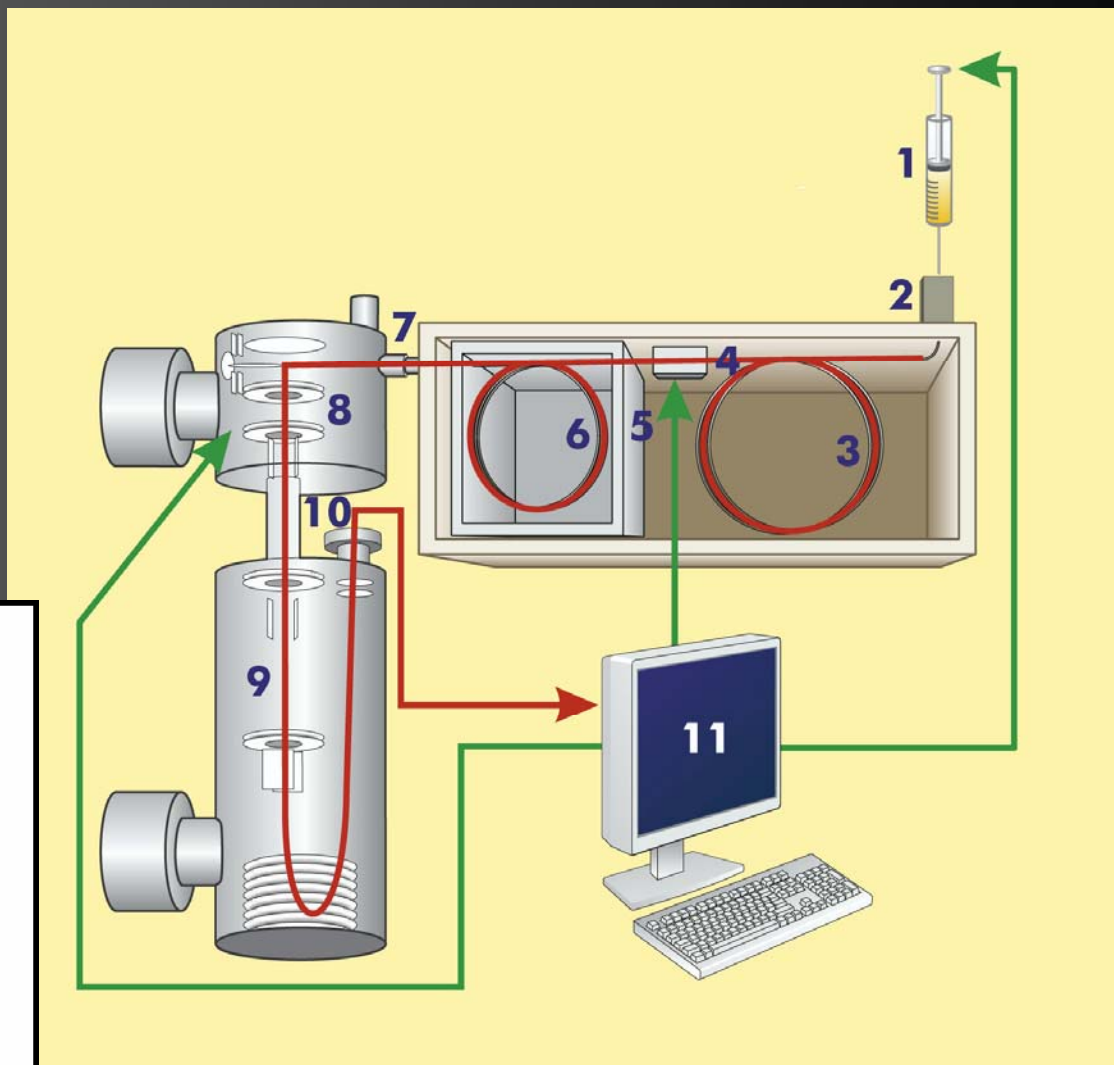
C: *n*-alkany (C₁₄ - C₂₀) standardy na DB-5 fázi.

První výsledky

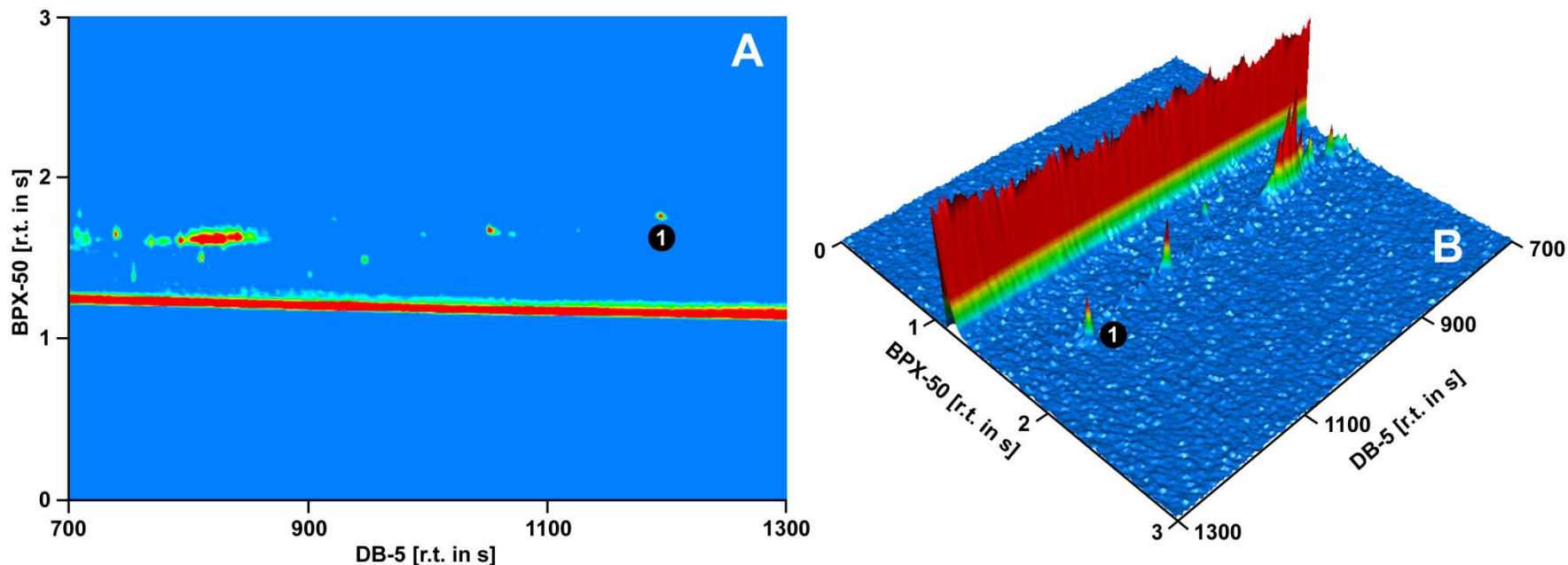
- blízko KI = 1700 jsme sledovali silnou EAD aktivitu (feromon??)
- žádná FID odpověď ve stejném úseku chromatogramu
- potřebujeme citlivější detektor (TOFMS?) nebo více samiček...
- nebo musíme použít knihovny sloučenin (časově náročné a je nutné mít mnoho samců)

LECO Pegasus IVD – schema

1. vzorek
2. injekční port
3. 1D kolona (30 m, DB-5)
4. kryomodulátor
5. sekundární GC pec
6. 2D kolona (2 m, BPX-50)
7. transfer kapilára do MS
8. iontový zdroj
9. letová trubice s iontovou optikou
10. detektor
11. řízení a zpracování dat



E. batangensis – analýza feromonové žlázy



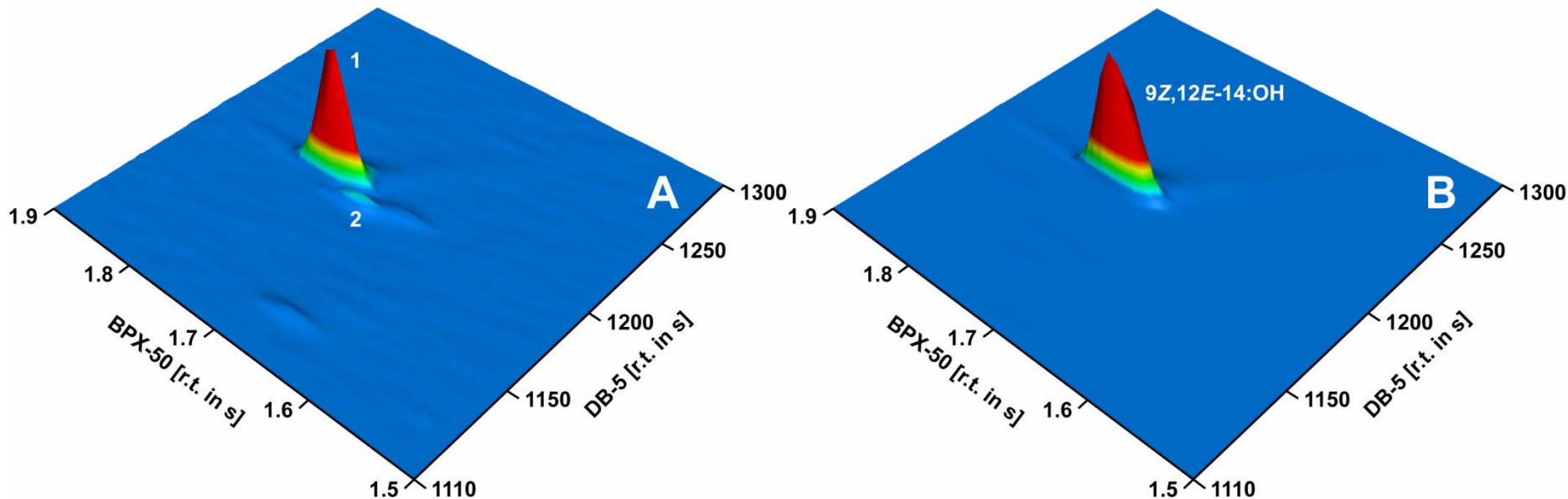
GCxGC/TOFMS analýza samičí feromonové žlázy *E. batangensis* (z jedné samičky !)

Chromatogramy (**A**: contour plot; **B**: 3D-surface plot 180° otočený pro lepší viditelnost píků) na hmotě **31**.

Malý pík označený (1) se shoduje (NIST, EAD a retenční chování) s 9*Z*,12*E*-tetradeka-9,12-dien-1-olem.

Dobře separovaná "zed" chemického šumu (krvácení kolony, stopy hexanu, etc.) demonstruje sílu Kompherehensivní dvojrozměrné plynové chromatografie a enormní nárůst citlivosti.

E. batangensis – analýza feromonové žlázy



Zvětšené EAD-aktivní oblasti GCxGC/TOFMS chromatogramu (3D-surface plot) na hmotě 31

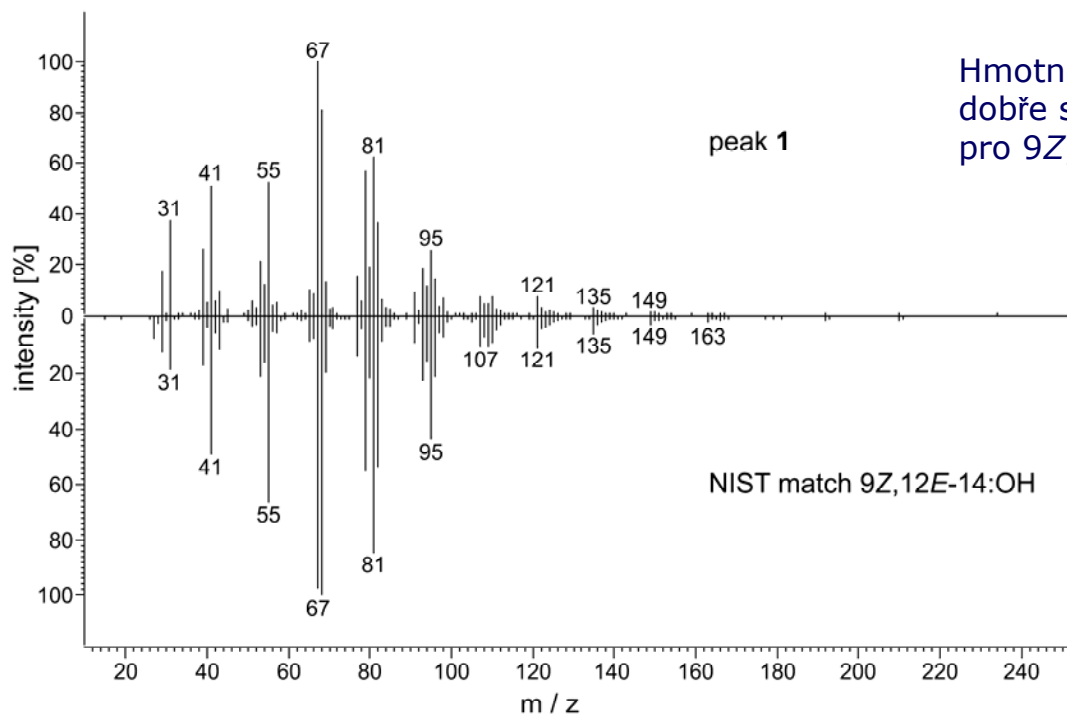
A: analýza jedné samičí feromonové žlázy *Euzophera batangensis*

B: analýza syntetického 9Z,12E-tetradeka-9,12-dien-1-olu (100 pg)

Pík označený (1) představuje hlavní složku feromonu (**A**) 9Z,12E-14:OH (a jeho standard v obr. **B**), drobný pík (2) odpovídá 9Z-tetradec-9-en-1-olu.

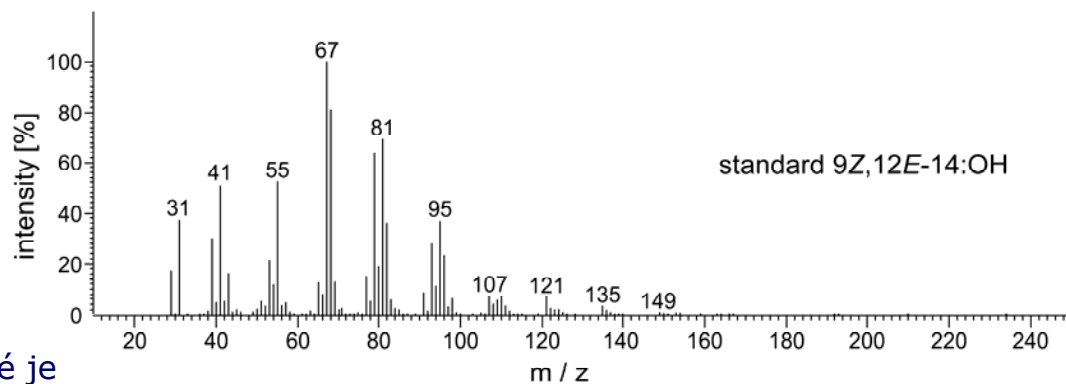
Závěr: díky GCxGC/TOFMS byly identifikovány dvě složky feromonu

E. batangensis – analýza feromonové žlázy



Hmotnostní spektrum píku **1** se shoduje dobře se spektrem z NIST knihovny pro *9Z,12E*-tetradeka-9,12-dien-1-ol

NIST match *9Z,12E*-14:OH



...a hmotnostní spektrum syntetického *9Z,12E*-tetradeka-9,12-dien-1-olu, které je prakticky identické

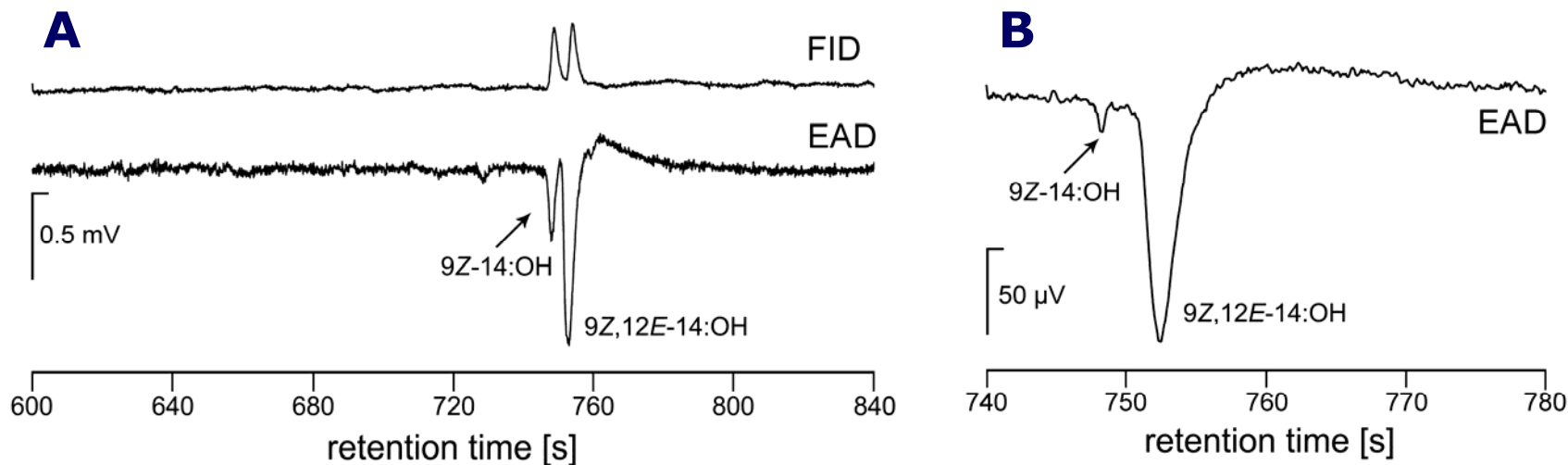
Význam of 2D-GC retenčních dat

Sloučenina	KI [1.dimenze]	Retenční čas^{a,c} [s, 1.dimenze]	Retenční čas^{b,c} [s, 2.dimenze]
Standardy			
9Z-tetradec-9-en-1-ol	1676	1188	1.700
9Z,12E-tetradeka-9,12-dien-1-ol	1681	1194	1.750
Analyty			
Pík 2	1676	1190	1.709
Pík 1	1681	1194	1.758

^a DB-5 (30 m × 250 μm ID × 0.25 μm film)

^b BPX-50 (2 m × 100 μm ID × 0.1 μm film)

^c teplotní program: 50 °C @ 2 min, pak na 300 °C s 10 °C/min, a konečně 10 min @ 300 °C



Sekce GC-EAD / GC-FID záznamu

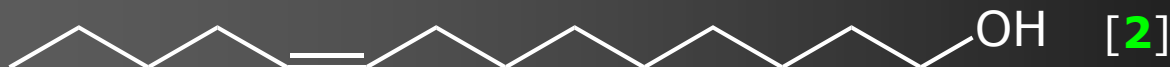
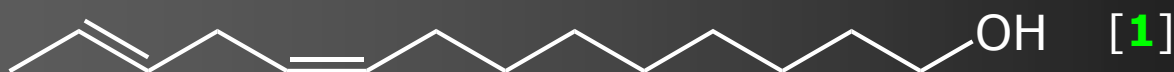
A: koinjekce (10 ng) syntetického 9Z,12E-tetradeka-9,12-dien-1-olu a 9Z-tetradec-9-en-1-olu

B: hexaneový extrakt samičí feromonové žlázy *E. batangensis* (~ 5 samiček); odpověď tykadla na obě předpokládané feromonové složky je dobře viditelná

Další výsledky: 9Z-tetradec-9-en-1-ol byl identifikován jako elektrofysiologicky aktivní součást extraktu samičí feromonové žlázy *E. batangensis*

Závěr

- naše studie ukázala **vynikající použitelnost GC×GC/TOFMS techniky pro analýzu těkavých infochemikálií**
- Na základě dat GC-EAD a GC×GC/TOFMS analýz lze považovat **9Z,12E-tetradeka-9,12-dien-1-ol [1]** a **9Z-tetradec-9-en-1-ol [2]** za složky samičího sexuálního feromonu zavíječe *Euzophera batangensis*



- rozsáhlé několikaleté terénní testy v Číně potvrdily naši hypotézu
- feromonové pasti jsou používány pro IPM škůdce v Číně (patentováno)

Kalinová B., Jiroš P., Žďárek J., Wen, X., Hoskovec M.:

GC × GC/TOFMS technique - A new tool in identification of insect pheromones: Analysis of the persimmon bark borer sex pheromone gland. *Talanta* **69** (3): 542-547, 2006.

Způsoby využití feromonů v praxi

- monitoring
- masový odchyt (mass trapping)
- dezorientace
- „kill and trap“ metodiky

Ideální je začlenění využití feromonů do systémů **integrované ochrany proti škůdcům** (Integrated pest management - **IPM**)

Definice IPM: proti se škůdcům na základě analýzy konkrétních podmínek kombinují metody chemické, biologické, pěstební, fyzikální regulace ve spojení s vhodným výběrem a kombinací odrůd. Výhodou IPM je především vyšší účinnost, nižší cena a nižší zátěž pro ekosystémy.

IPM v bodech...

- stanovení akceptovatelné úrovně výskytu škůdce (cílem není vyhlazení) a jeho správná biologická determinace [feromony !]
- preventivní zemědělské techniky (výběr vhodných odrůd, zdravotní stav rostlin, péče o rostliny, karanténa...)
- monitoring výskytu škůdce [feromony !]
- mechanická kontrola (ruční sběr, bariéry, pasti, „luxování“...)
- biologická kontrola (parazité a predátoři, bioinsekticidy, mikroorganismy a viry, [feromony !])
- odpovědné využití pesticidů (malé přesně cílené dávky, časování, moderní insekticidy nebo sloučeniny přírodního původu – nikotin, pyrethroidy, juvenilní hormony, „trap and kill“ [feromony !])

Feromony v praxi

- v současné době se vyrábějí a prodávají feromony a feromonové lapáky pro cca 300 druhů hmyzu (převaha motýlích škůdců)
- některé významné druhy hmyzu jsou pomocí různých technik použití feromonů úspěšně udržovány na ekonomicky únosné úrovni nebo jsou feromonové systémy používány pro jejich monitoring
- příklady
 - bekyně velkohlavá a bekyně mniška v USA a Kanadě
 - listokaz *Popillia japonica* v USA
 - květopas bavlníkový (*Anthonomus grandis*) v USA
 - moucha domácí (mucholapky, celosvětově)
 - kůrovci (severní polokoule)
 - obaleč jablečný (celosvětově)
- v budoucnu se uvažuje i o použití feromonů pro monitoring vzácných a ohrožených druhů hmyzu