

Pheromone 93 [1]. Das Sexualpheromon von *Limnaecia phragmitella* (Lepidoptera: Cosmopterigidae)

Pheromones, 93 [1]. The Sex Pheromone of the Cosmopterigid Moth *Limnaecia phragmitella* (Lepidoptera: Cosmopterigidae)

Hans Jürgen Bestmann, Friedrich Kern und Edelgard Janssen

Institut für Organische Chemie der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg,
Henkestraße 42, D-W-8520 Erlangen

und

Ivar Hasenfuß

Institut für Zoologie der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg,
Staudtstraße 5, D-W-8520 Erlangen, Bundesrepublik Deutschland

Z. Naturforsch **48c**, 515–518 (1993); eingegangen am 28. Januar 1993

Lepidoptera, *Limnaecia phragmitella*, Cosmopterigidae, Pheromone Components,
Tetradecenyl Acetate

By means of gas chromatographic, mass spectroscopic methods and combined GC-electroantennogram techniques (*E*)-11-tetradecenyl acetate and (*Z*)-11-tetradecenyl acetate were identified as the two biological active components of the sex pheromone of the female cosmopterigid moth *Limnaecia phragmitella*. The mixture of 95% (*E*)-11-tetradecenyl acetate and 5% of the (*Z*)-isomer were analyzed in the gland of females and confirmed as the most attractive synthetic blend for males in field bioassays.

Limnaecia phragmitella Stainton, 1851 (Lepidoptera, Cosmopterigidae) ist in Europa weitverbreitet und kommt auch in Nordafrika, Nordamerika, Neuseeland und lokal in Australien vor. Die Weibchen legen während der Flugzeit im Juni und Juli die befruchteten Eier an *Typha*-Arten (*Typha*-ceae, Rohrkolben, engl. bullrushes) ab, auf denen sich die frisch geschlüpften Larven entwickeln. Sie fressen die Blüten und Samen und spinnen den Blütenkolben so ein, daß eine Samenausbreitung unterbleibt. Die Verpuppung erfolgt im Innern des zusammengesponnenen Kolbens, wo die Larven gut geschützt überwintern können.

In der Schmetterlingsfamilie Cosmopterigidae wurden bisher meist einfach ungesättigte C₁₄-Aldehyde, -Alkohole und -Acetate als attraktive Lockstoffe in Feldversuchen beschrieben, seltener einfach oder doppelt ungesättigte C₁₂- oder C₁₃-Acetate [2].

Material und Methoden

Insektenmaterial

Aus einem Weihergebiet westlich von Erlangen wurden ca. 2 Wochen vor der Flugzeit im Juni und Juli von *L. phragmitella* befallene Schilfrohrkolben vom Stengel abgetrennt und die Puppen unter einem Stereomikroskop aus dem Pflanzenmaterial herausgelöst. Nach der Geschlechterbestimmung wurden die Weibchen-Puppen unter Laborbedingungen einem künstlichen Licht/Dunkelrhythmus von 14/10 h ausgesetzt und nach dem Schlüpfen beobachtet. 3,5 h nach Beginn der Scotophase konnte jeweils der Anfang der Lockphase durch einen arttypischen Habitus festgestellt werden. Im Gegensatz zu den meisten Nachtschmetterlingen, die das Abdomen dorsal exponieren, kann man bei *L. phragmitella*-Weibchen die biologisch aktive Phase an der ventralen Krümmung des Abdomens und dem rhythmischen Ein- und Ausstülpen der Pheromondrüse erkennen.

Isolierung und Identifizierung des Weibchenpheromons

Von 1–2 Tage alten Weibchen wurde während der Lockperiode das Abdomenende ab der Mitte des 8. Segments abgetrennt und mit 10 µl Diethylether 5 min extrahiert. Extrakte von mehreren

Sonderdruckanforderungen an Prof. Dr. H. J. Bestmann.

Verlag der Zeitschrift für Naturforschung,
D-W-7400 Tübingen
0939–5075/93/0500–0515 \$ 01.30/0

Weibchen, die die flüchtigen Substanzen der Intersegmentalmembran zwischen Segment 8 und 9 („Pheromondrüse“) enthielten, wurden gesammelt und später die gesamte Menge für die GC-Injektion auf 1 μ l einkondensiert. GC-gekoppelte Elektroantennogramme (EAD-GC) wurden mit 3 extrahierten Weibchendrüssen durchgeführt, deren biologisch aktive Komponenten mit Männchenantennen detektiert wurden. Für die gaschromatographisch-massenspektroskopische Analyse (GC-MS) wurden Extrakte von *ca.* 8–12 Tieren auf 1 μ l eingengt.

GC-gekoppelte Elektroantennogramme wurden mit einem Packard-United-Technologies-427-Modell und einem 1:1-Säuleneluat-Split zwischen FID und biologischem Detektor (Schmetterlingsantenne) [3] aufgenommen (splitless, Inj. 240 °C, Det. 260 °C, 25 m FSCC SP2340, 0,25 mm ID, 3 min 70 °C, 70–195 °C, 4 °C/min, hold, 2 ml N₂/min). Die GC/MS-Analyse erfolgte mit einem Finnigan-MAT-90-Massenspektrometer (splitless, Inj. 200 °C, Interface 200 °C, Det. 260 °C, 25 m FSCC SE 54, 0,25 mm ID, 4 min 60 °C, 60–260 °C, 6 °C/min, 10 min 260 °C, 2 ml He/min, EI-Spektren, 1 sec/scan).

Elektrophysiologischer Test

Elektroantennogramme [4] wurden von isolierten Antennen von *L. phragmitella*-Männchen mit Glaskapillarelektroden aufgenommen. Diese waren mit wäßriger Ringerlösung gefüllt, wurden über Ag/AgCl-Draht geschoben und an der Basis und der Antennenspitze plaziert. Als Reizquelle dienten entweder Luftpulse von 1s von Testsubstanzen auf 7×20 mm großen Filterpapierstreifen in Glaskartuschen, oder in einen kontinuierlichen Luftstrom eingeleitetes GC-Säuleneffluent, das über die Schmetterlingsantenne geführt wurde. Um Kontamination zu vermeiden saugte man die Umgebungsluft des Präparats während des Versuchs kontinuierlich ab.

Attraktivitätstests mit Pheromonfallen im Freiland

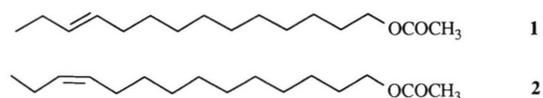
Die Attraktivität der synthetischen Pheromongemische wurde mit Leimfallen (Biotrap von Hoechst AG, Frankfurt) in dem Weihergebiet *ca.* 10 km westlich von Erlangen untersucht, aus denen die Versuchstiere stammten. Als Pheromoköder dienten kurze Gummischlauchstücke (3 cm×12 mm AD, 8 mm ID), die in einer zeltför-

migen Kunststoff-Falle 3 cm über einem Leimboden (9,5×25 cm) aufgehängt waren. Auf die Gummischlauchstücke wurden unterschiedliche Hexan-Gemische der Testsubstanzen von jeweils 1 mg Gesamtkonzentration pipettiert. Die an zwei Seiten offenen Fallen wurden in einer Nord-Süd ausgerichteten Reihe in 0,5 m Höhe so an den Schilfrohrpflanzen angebracht, daß die Öffnungen in die Hauptwindrichtung (West) gerichtet waren. Die Anordnung der jeweils 7 gleichzeitig aufgehängten Fallen war zufällig und in den 4 Testzeiträumen unterschiedlich.

Resultate und Diskussion

Im gaschromatographisch aufgetrennten Etherextrakt von drei *L. phragmitella*-Weibchendrüssen detektierte man für zwei Substanzen (**1** und **2**, Abb. 1b) mit einer Männchenantenne elektrophysiologische Reaktionen (**1** und **2**, Abb. 1a).

Im Retentionsbereich von den Drüseninhaltsstoffen **1** und **2** (Abb. 1b) lagen bei der gaschromatographischen Untersuchung mit einer SP2340-Säule Tetradecenylacetate. Daraufhin wurden synthetische, einfach ungesättigte Acetate mit unterschiedlicher Geometrie und Position der Doppelbindung im EAG an männlichen Tieren getestet. Tetradecenylacetate mit C-11-Doppelbindungsposition lösten die höchsten Antworten aus, wobei (*E*)-11-Tetradecenylacetat elektrophysiologisch wirksamer war als das (*Z*)-Isomer (**1** und **2** in Formel 1 und Abb. 1d).



Die Retentionszeiten von (*E*)-11-Tetradecenylacetat (E11–14:Ac, **1** Abb. 1c) und (*Z*)-11-Tetradecenylacetat (Z11–14:Ac, **2** Abb. 1c) stimmten im EAD-GC exakt mit denen von den Drüseninhaltsstoffen **1** und **2** (Abb. 1b) überein.

Das Massenspektrum der Hauptpheromonkomponente war identisch mit dem von E11–14:Ac. Über einen Retentionszeitvergleich auf SP2340 und SE 54-Trennsäulen mit synthetischem Material konnte die Nebenkomponente als Z11–14:Ac identifiziert werden.

In dosisabhängigen EAG-Kennlinien reagierte die Männchenantenne auf die Hauptkomponente

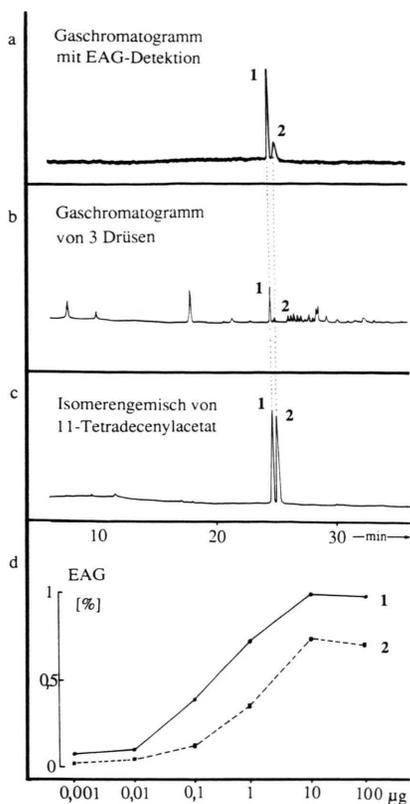


Abb. 1a. GC-gekoppeltes Elektroantennogramm einer Männchenantenne (EAD-GC) mit Etherextrakt von 3 *Limnaecia phragmitella*-Weibchendrüsen; b. Gaschromatogramm eines Etherextraktes von 3 *L. phragmitella*-Weibchendrüsen; c. Gaschromatographisch aufgetrenntes Isomerenmischung von synthetischen E 11-14:Ac **1** und Z 11-14:Ac **2**; d. Dosis-Antwortkurve einer *L. phragmitella*-Männchenantenne mit synthetischem E 11-14:Ac **1** und Z 11-14:Ac **2**.

E 11-14:Ac (**1**, Abb. 1d) ungefähr zehnmal empfindlicher, als auf das in geringer Menge in der Weibchendrüse vorhandene (Z)-Isomer (**2**, Abb. 1d).

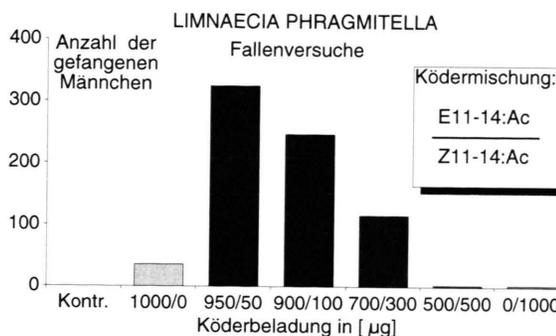


Abb. 2. Graphische Darstellung der Attraktivitätstests mit Pheromonfallen für *L. phragmitella*-Männchen im Freiland. Die Pheromonköder waren mit synthetischen Lockstoffen unterschiedlicher Gemische von E 11-14:Ac/Z 11-14:Ac beladen, Falle Nr. 1 mit reinem Lösungsmittel (Hexan) diente als Kontrolle.

In dem betreffenden Weihergebiet bei Erlangen wurden zur Flugzeit Leimfallen ausgehängt, die mit Pheromonködern unterschiedlicher Gemische von E 11-14:Ac und Z 11-14:Ac, jeweils in einer Gesamtkonzentration von 1 mg pro Pheromonfalle, beladen waren (Tab. I). Die meisten Tiere fanden sich in Fallen mit einem Mischungsverhältnis 95/5 Prozent von E 11-14:Ac/Z 11-14:Ac (Abb. 2), was mit dem chemisch analysierten Mengenverhältnis der Pheromonkomponenten in der Drüse übereinstimmt.

In Freilandexperimenten zur Aufklärung der Pheromonzusammensetzung von *Loxostege sticticalis* (Lepidoptera: Pyralidae) fanden sich als Nebenfänge mit geometrischen Isomerenmischungen von 11-Tetradecenylacetat auch *Limnaecia phragmitella* in den Fallen [5].

Danksagung

Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die Unterstützung dieser Arbeiten.

Tab. I. Attraktivitätstests für *L. phragmitella*-Männchen mit Pheromonfallen im Freiland.

Falle Nr.	Köderbeladung in [µg]		Anzahl gefangener Männchen			
	E 11-14:Ac	Z 11-14:Ac	6.-11. Juli	11.-15. Juli	15.-20. Juli	20.-24. Juli
1	—	—	0	0	0	0
2	1000	—	19	7	10	1
3	950	50	72	86	85	83
4	900	100	54	60	69	65
5	700	300	9	47	53	8
6	500	500	1	0	1	2
7	—	1000	2	1	0	1

- [1] Als 92. Mitteilung gilt: H. J. Bestmann, J. Erler, O. Vostrowsky und L. T. Wasserthal, *Z. Naturforsch.* **48c**, 510–514 (1993).
- [2] H. Arn, M. Tóth und E. Priesner, List of Sex Pheromones of Lepidoptera and Related Attractants, OILB-SROP (Ed.), Paris 1986.
- [3] L. J. Wadhams, The Coupled Gas Chromatography-Single Cell Recording Technique. In: *Techniques in Pheromone Research* (H. E. Hummel und T. A. Miller, Eds.), S. 179, Springer-Verlag, New York, Berlin, Heidelberg, Tokyo 1984.
- [4] D. Schneider, *Z. vergl. Physiol.* **40**, 8 (1957); D. Schneider, *Jahrbuch der Max-Planck-Gesellschaft* **1963**, 150.
- [5] D. L. Struble und C. E. Lilly, *Can. Entomol.* **109**, 261 (1977).