

CHEMICKÁ KOMUNIKACE HMYZU POHLEDEM ORGANICKÉHO CHEMIKA

Přednáška nositele ceny Alfreda Badera za rok 1998. Předneseno na konferenci v Liblicích¹

MICHAL HOSKOVEC

*Ústav organické chemie a biochemie, Akademie věd České republiky, Flemingovo nám. 2, 166 10 Praha 6
e-mail: hoskovec@uochb.cas.cz*

Došlo dne 13.1.2000

Klíčová slova: chemická komunikace, semiochemikálie, feromony, obaleč východní, *Cydia molesta*, analogy feromonů

Obsah

1. Úvod
2. Cíl projektu
3. Testované sloučeniny
4. Stanovení biologické aktivity analogů feromonů
 - 4.1. Elektrofyziologické techniky
 - 4.1.1. EAG záznam
 - 4.1.2. ESG záznam
 - 4.1.3. Problém těkavosti sloučenin při EAG/ESG
 - 4.2. Testování vlivu analogů na chování motýlů (tzv. behaviorální techniky)
 - 4.2.1. Test v Petriho miskách (short-range behavior test; SRB test)
 - 4.2.2. Větrný tunel (long-range behavior test; LRB test)
5. Výsledky biologických testů a diskuse
 - 5.1. Dodecyl-chlorformiát (II)
 - 5.2. Laktonové analogy III–V (alkenolidy)
 - 5.3. Thiaanalogy VI a VII
 - 5.4. Dodecyl-acetát (VIII)
 - 5.5. Rozvětvené analogy IX–XI
6. Závěr

1. Úvod

Výzkum chemické komunikace živých organismů patří v posledních 30 letech k bouřlivě se rozvíjejícím oblastem přírodních věd. Vznikl nový, multidisciplinární vědní obor – chemická ekologie. Studium chemicko-biologických vztahů v ekosystémech umožnilo komplexní pohled na celou strukturu vnitrodruhových a mezidruhových vztahů mezi živými organismy. Díky tomu se změnil náš pohled na přírodu jako takovou – dnes již víme, že vzájemné interakce valné většiny živočichů i rostlin jsou do značné míry ovlivňovány či dokonce přímo řízeny stopovým množstvím určitých, pro daný druh či situaci, specifických organických sloučenin. Naše současné znalosti ukazují na primární úlohu chemické komunikace

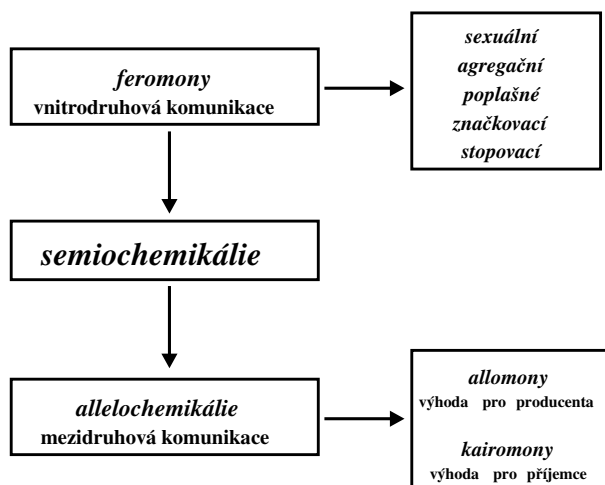
u hmyzu (*Insecta*). Přístupnost čichového orgánu – tykadla, specifita čichových receptorů a možnost laboratorních chovů činí z této živočišné třídy unikátní model pro teoretické studium. Většina současných obecných poznatků o chemické komunikaci a čichovém vnímání je odvozena právě od modelových experimentů na hmyzu. Práce v této oblasti je důležitá i z praktického hlediska – znalost principu chemické komunikace určitého druhu hmyzu nám dává strategickou výhodu v možnosti modifikace jeho chování v náš prospěch (např. využití v integrované, ekologicky nezávadné ochraně rostlin a zemědělských produktů).

Z hlediska působení semiochemikálií (dělení viz obr. 1) – látek používaných živými organismy k chemickému přenosu informace – mají největší význam feromony (řecky: φερειν – přenos, ορμων – vzruch) zajišťující vnitrodruhovou komunikaci²⁻⁴. Feromony jsou z hlediska chemické struktury množinou obsahující značné množství mnohdy i naprosto nesusourodých strukturních typů (alifatické nenasycené sloučeniny, heterocykly, makrocycly, spiroketaly, terpeny atd.).

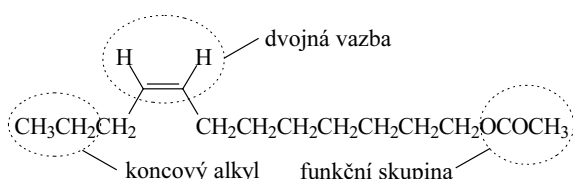
Kvantitativně i kvalitativně na nejvyšší úrovni jsou v současné době naše znalosti o sexuální chemické komunikaci u hmyzího řádu motýlů (*Lepidoptera*)⁵. Pro to jsou dva ryze praktické důvody: 1) mnoho motýlů patří mezi významné zemědělské škůdce a tím je zajištěna společenská objednávka na příslušný výzkum, 2) motýlí feromony mají relativně jednoduchou chemickou strukturu. Později se ukázalo, že motýli jsou díky již výše zmíněným výhodám velmi vhodným materiálem i pro základní výzkum v oblasti mechanismu čichového vnímání.

Chceme-li ovlivnit biochemický proces, jehož výsledkem je biologický efekt, měli bychom znát jeho mechanismus na různých úrovních biologického systému. V našem případě to znamená na molekulární úrovni objasnit povahu interakce feromonu s proteiny čichového receptoru, jejichž detailní funkce a struktura nejsou zatím zcela známy. Výše zmíněné interakce zahrnují např. vodíkové můstky, van der Waalsovy, elektrostatické, hydrofobní a hydrofilní mechanismy. V případě sexuálních feromonů motýlů (většinou jde o nízkomolekulární lineární mono/polyenické acetáty, alkoholy či aldehydy) je obecně přijímán tzv. třibodový model⁶, podle kterého molekula obsahuje tři farmakofory: 1. koncový alkyl; 2. dvojnou/dvojnou vazbu a 3. funkční skupinu (obr. 2). Klíčovou roli zde hraje geometrie dvojných vazeb – z možných izomerů je daným druhem rozpoznáván a využíván převážně jeden nebo specifická směs několika izomerů. V některých případech má „nepravý“ izomer inhibiční účinky. Proto je syntéza feromonů striktně podřízena potřebě získat geometrické izomery o co nejvyšší čistotě.

Jedním z perspektivních způsobů uplatnění feromonů v praxi je tzv. metoda dezorientace⁷⁻⁹ spočívající v narušení systému vnitrodruhové sexuální komunikace a tím i reprodukce druhu. Dezorientačního efektu lze v principu dosáhnout dvěma způsoby: použitím skutečného feromonu (jeho analogu) ve vysoké koncentraci (klasická dezorientace) nebo využitím tzv. reaktivních analogů^{10,11} schopných buď blokovat (nejlépe nevratně) čichové receptory nebo působit jako inhibitory



Obr. 1. Dělení semiochemikálií. Poznámka: Allomonem je např. semiochemikálie emitovaná predátorem, sloužící jako návnada pro jeho kořist (výhoda pro producenta). Kairomonem je např. ovipoziční feromon motýla, „zneužitý“ lumkem – parazitem k lokalizaci vajíček hostitele (výhoda pro příjemce)



Obr. 2. Strukturální prvky („farmakofory“) rozhodující o biologické aktivitě (Z)-8-dodecenyl-acetátu

feromonových katabolických enzymů. V obou případech je výsledkem tzv. čichová slepota.

Při objasňování mechanismů chemické komunikace motýlů na molekulární úrovni a designu perspektivních analogů sexuálních feromonů je nutné řešit množství experimentálních i teoretických problémů zasahujících do oblasti organické a fyzikální chemie, entomologie, etologie, fyziologie či biostatistiky. Několik následujících stran textu si klade za cíl nastínit možné způsoby řešení uvedené problematiky na příkladu projektu „Potenciální bioracionální pesticidy na bázi analogů feromonů“.

2. Cíl projektu

Cíl projektu, design nových chemických struktur, použitelných jako bioracionální insekticidy pro boj s motýlkem obalečem východním (*Cydia molesta*; celosvětově významný škůdce peckovin) měl i teoretický aspekt. Obaleč východní byl použit jako modelový druh hmyzu pro studium mechanismu čichového vnímání na úrovni receptorového systému.

3. Testované sloučeniny

Objektem našeho zájmu, hlavní složkou sexuálního feromonu obaleče východního, je (Z)-8-dodecenyl-acetát (*I*; dále Z8-12:Ac)^{5,12}. Molekula Z8-12:Ac nabízí tři strukturální

jednotky vhodné pro případnou modifikaci – koncový alkyl, *cis*-dvojnou vazbu a acetátovou funkci (obr. 2). Pokud se podíváme na struktury syntetizovaných analogů (schéma 1), můžeme je rozdělit do několika skupin. Do první skupiny reaktivních analogů (modifikovanou původní acetátovou skupinou) lze zařadit chlorformiát *II* a alkenolidy (laktany) *III–V*. Kromě předpokládané reaktivity¹³ by analogy *II–V* díky bioizostericitě záměny¹⁴ $\text{CH}_3 \rightarrow \text{Cl}$ a určité podobnosti mezi acetátovou a laktonovou funkcí mohly interagovat s receptorovými proteiny stejným způsobem jako feromon *I*. Druhá skupina obsahuje sirmé bioizostery *VI* a *VII* (náhrada dvojné vazby skupinou $-\text{CH}_2\text{S}-$ resp. $-\text{SCH}_2-$)¹⁵. U třetí skupiny je pozměněno okolí dvojné vazby původního C-skeletu molekuly. Patří sem nasycený analog *VIII* a větvené vinyl/ethyliden analogy *IX–XI*. Návrh větvených analogů *IX–XI* byl inspirován prací¹⁶ o inhibičních účincích vinylanalogu feromonu u motýla *Cryptophlebia leucotreta*. Popis syntézy látek *II–XI* je stericky příliš náročný a lze se s ním podrobně seznámit v literatuře^{17–20}.

4. Stanovení biologické aktivity analogů feromonů

4.1. Elektrofyzilogické techniky

Mezi základní způsoby testování semiochemikálií u hmyzu patří v současnosti elektrofyzilogické sledování aktivity na tykadlech lokalizovaných čichových receptorových buňkách²¹ (olfactory receptor cell – ORC). Jde o elektroantennografii (EAG), snímající sumaci změn potenciálů všech ORC na tykadle a elektroenzilografii (ESG) monitorující změny potenciálu jediné ORC. Schéma typického zařízení pro měření EAG je znázorněno na obrázku 3. ESG aparatura je až na použití střídavého zesilovače prakticky identická, místo tykadla je v případě motýlů zapojena do měřícího obvodu jediná trichoidní senzila obsahující jednu ORC. Obě techniky byly využity pro stanovení biologické aktivity analogů hlavní složky sexuálního feromonu obaleče východního (*Cydia molesta*).

4.1.1. EAG záznam

Klíčovým parametrem získaným z EAG záznamu je amplituda změny potenciálů (řádu mV) po stimulaci (obr. 4). Ta je výslednicí efektivity semiochemikálie (tj. její schopnosti snižovat polarizaci ORC) a počtu aktivovaných receptorů. Pořízení EAG záznamu je méně náročné než práce s jedi-

nou ORC v případě ESG²¹. Při stanovení aktivity testované semiochemikálie (v našem případě analogu feromonu) obvykle pořizujeme EAG záznam při různých koncentracích pro získání závislosti dávky a odezvy (dose-response). Ze sigmoidních dose-response křivek se běžně odečítají následující parametry: 1) saturační odezva, 2) odezva pro standardní dávku a 3) dávka odpovídající 100 % nebo 75 % odezvě standardu

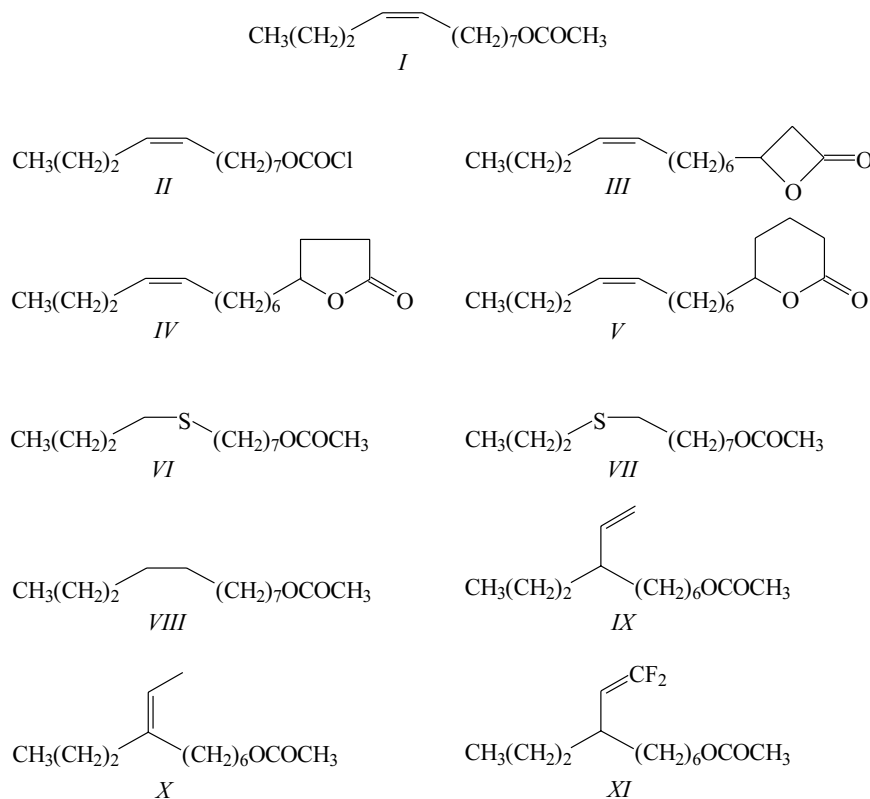
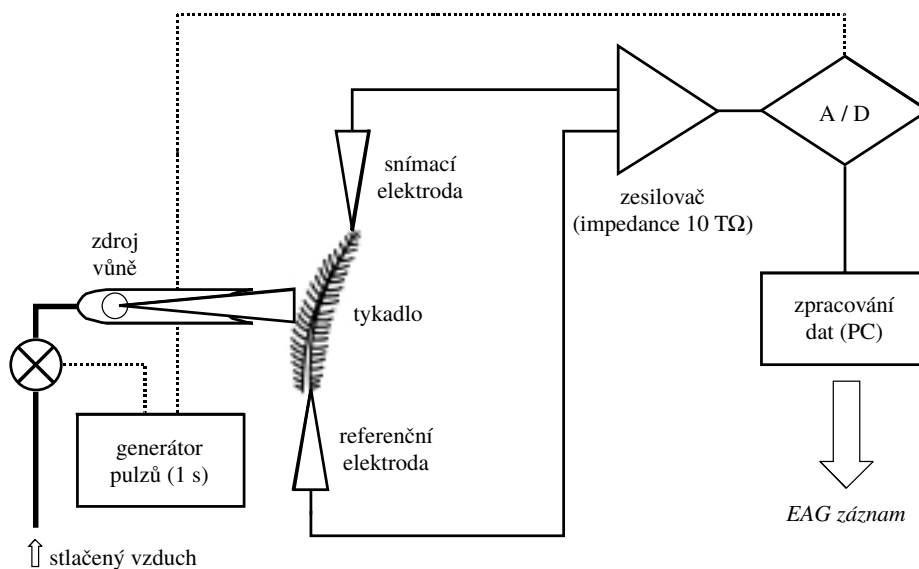
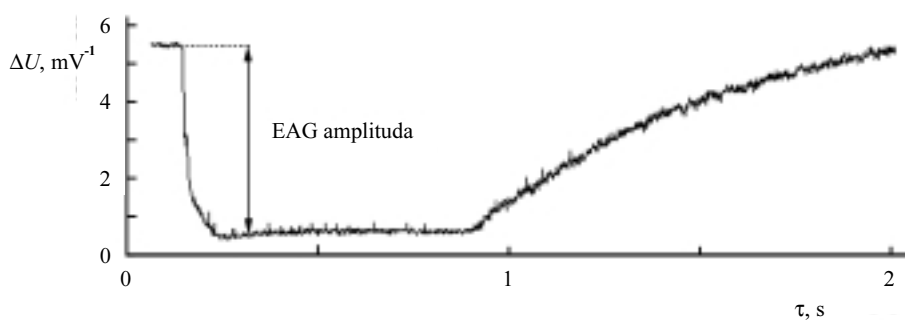


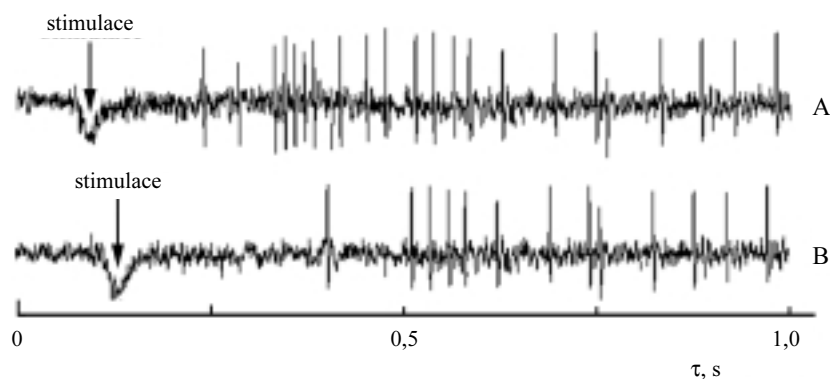
Schéma 1



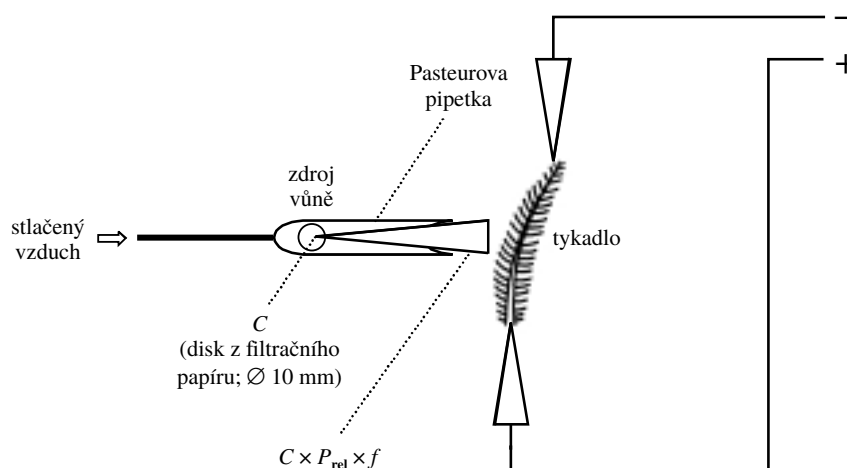
Obr. 3. Blokové schéma standardního zařízení pro elektroantenografii (EAG)



Obr. 4. Příklad elektroantenogramu (reakce tykadla samce obaleče východního na Z8-12:Ac, I)



Obr. 5. Příklad elektrosenzilogramu (reakce ORC specifické pro Z8-12:Ac, I na: A) Z8-12:Ac; B) chlorformiátu II)



Obr. 6. Schematické znázornění problému rozdílné těkavosti testovaných látek při elektrofyziologickém experimentu

(feromonu). Pro posuzování výsledků EAG měření je důležité si uvědomit fakt, že EAG odezva je odezvou všech ORC tykadla. V případě receptorového systému „naladěného“ na vícesložkový feromon pak většinou odpovídají všechny typy ORC (každá složka má vlastní typ ORC), každý typ jinou intenzitou.

4.1.2. ESG záznam

Elektrosenzilografie²¹ nám umožňuje exaktně srovnat od-

pověď specializované ORC na „vlastní“ semiochemikálii (na kterou je naladěna) s odpovědí na libovolnou testovanou sloučeninu (v našem případě na analog feromonu). Pro vyhodnocení ESG záznamů (příklad na obr. 5) je nejdůležitější frekvence tzv. akčních potenciálů (spiků) po stimulaci. Hustota spiků po stimulaci je přímo úměrná biologické aktivitě testovaných semiochemikálií, jejich amplituda je stejná u méně i více aktivních sloučenin. Nejintenzivnější odpověď vykazuje ORC obvykle po stimulaci sloučeninou na jejíž identifikaci je „naladěna“ (např. sexuální feromonu).

4.1.3. Problém těkavosti sloučenin při EAG/ESG

Amplituda EAG (či frekvence akčních potenciálů v případě ESG) je výslednicí efektivity semiochemikálie, tj. její schopnosti snižovat polarizaci ORC, a skutečné koncentraci sloučeniny, které na receptory působí. Tato koncentrace je přímo úměrná těkavosti testované sloučeniny. Při porovnávání elektrofyziologické aktivity série sloučenin jsou díky jejich rozdílné těkavosti (a tím odlišných tlaků nasycených par i při použití stejné dávky sloučenin pro elektrofyziologický experiment) získaná data používaná pro konstrukci dose-response křivek často velmi nepřesná a zavádějící (obr. 6). Při znalosti tlaku nasycených par testovaných sloučenin však lze uvedený problém snadno eliminovat korekcí na relativní těkavost vztaženou ke standardu. V našem případě je standardem feromon, Z8-12:Ac (*I*; jeho relativní těkavost $P_{REL} = P_T/P_R = 1$).

Pro samotné stanovení tlaků nasycených par (a tím i relativních těkavostí) feromonů²²⁻²⁵ a jejich analogů jsme jako první použili plynově-chromatografickou (GC) metodu vyvinutou Jensenem a Schallem²⁶. Na rozdíl od přímých technik^{27,28} stanovení tlaků nasycených par při nízkých teplotách nevyžaduje velké množství sloučeniny, náročné přístrojové vybavení a je časově poměrně nenáročná. Metoda je založena na myšlence srovnání GC retenčních časů referenční a testované sloučeniny. Fyzikálně-chemické základy metody lze shrnout do tří jednoduchých rovnic²⁹. Závislost tlaků nasycených par (P) dvou sloučenin při stejné teplotě lze vyjádřit pomocí rovnice

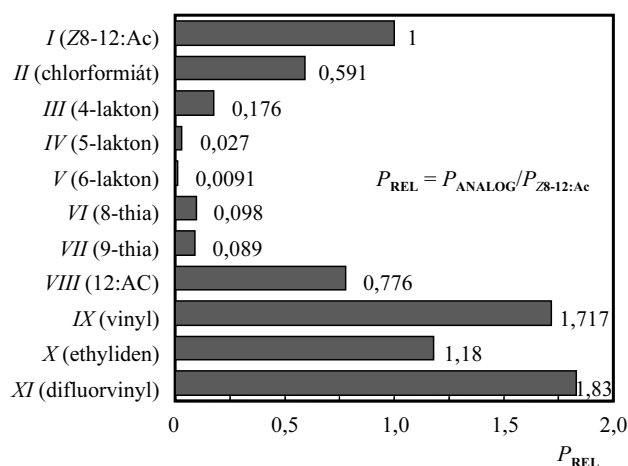
$$\ln P_T = (\Delta H_T/\Delta H_R) \ln P_R + c \quad (1)$$

kde dolní indexy T a R popisují testovanou a referenční sloučeninu a ΔH je latentní výparné teplo. Tlaky par jsou také závislé na retenčních časech

$$\ln P_T = \ln P_R - \ln (\tau_T/\tau_R) \quad (2)$$

kde τ jsou retenční časy. Kombinací a úpravou rovnic (1) a (2) získáme vztah (3)

$$\ln (\tau_T/\tau_R) = (1 - \Delta H_T/\Delta H_R) \ln P_R - c \quad (3)$$

Obr. 7. Relativní těkavosti P_{REL} Z8-12:Ac a jeho analogů

V grafickém znázornění závislosti $\ln (\tau_T/\tau_R)$ proti $\ln P_R$ je pak směrnice $1 - \Delta H_T/\Delta H_R$ a úsek na ose $-c$. Směrnici i úsek získáme lineární regresi retenčních časů testované a referenční sloučeniny naměřených za různých teplot. Takto získané hodnoty mohou být po dosažení do rovnice (1) použity pro výpočet tlaku nasycených par testované sloučeniny při libovolné teplotě za předpokladu znalosti tlaku referenční sloučeniny za téže teploty.

Jako referenční sloučeniny byly pro stanovení tlaku Z8-12:Ac (*I*) a jeho analogů zvoleny vyšší *n*-alkany (C_{14} – C_{21}) u kterých jsou známy s dostatečnou přesností tlaky nasycených par v širokém rozmezí teplot. Kromě toho splňují i požadavek na „podobné“ chromatografické chování (především polaritu) jako série testovaných sloučenin. Význam korekce na těkavost v případě analogů Z8-12:Ac (*I*) potvrzují výsledky stanovení (graf na obr. 7). Například laktonový analog *V* je více než 100× méně těkavý než feromon *I*, naopak větvené vinylanalogy *IX* a *XI* jsou téměř 2× těkavější.

4.2. Testování vlivu analogů na chování motýlů (tzv. behaviorální techniky)

Elektrofyziologické metody nám poskytují údaje o působení testovaných analogů sexuálního feromonu na úrovni feromonového receptorového systému. Pro odpověď na otázku, jak působí testované semiochemikálie na vlastní chování zkoumaných motýlů, je nutné použít některou z tzv. behaviorálních technik³⁰. Mezi ně lze zařadit testy v Petriho miskách či ve větrném tunelu (ale též testy v polních podmínkách).

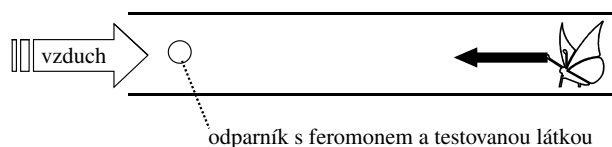
4.2.1. Test v Petriho miskách (short-range behavior test; SRB test)

Jeden z nejjednodušších behaviorálních testů je založen na sledování chování motýlího samečka umístěného v Petriho misce spolu s volající (tj. feromon emitující) samičkou v přítomnosti odparníku s testovanou látkou (100 ng analogu). Vyhodnocuje se úspěšnost kopulace ve srovnání s kontrolou (index K) bez analogu vyjádřená tzv. konfuzním koeficientem

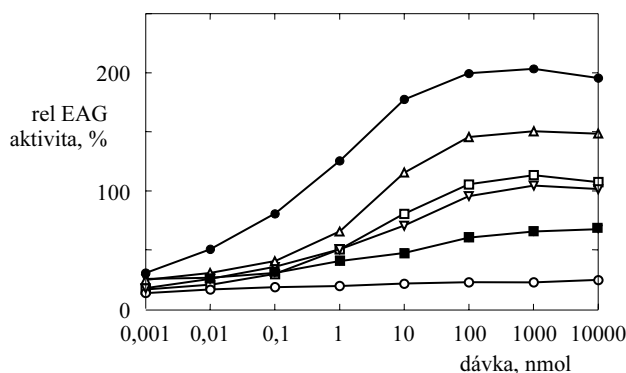
$$CC [\%] = (C_K/N_K - C_A/N_A) \times 100$$

4.2.2. Větrný tunel (long-range behavior test; LRB test)

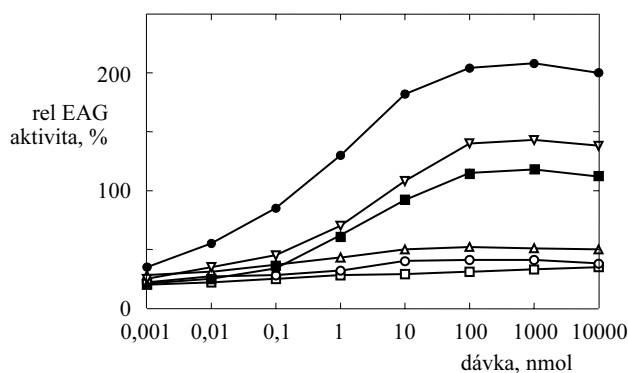
Větrný tunel z plexiskla o rozměrech 186×30×30 cm má systémem ventilátorů zajištěné laminární proudění zvlhčeného vzduchu (0,5 m.s⁻¹); řízenou teplotu, dobu a intenzitu osvětlení. Za přívodem proudu vzduchu se umísťuje odparník s testovanou semiochemikálií a na protilehlém konci tunelu se vypouští sameček motýla (obr. 8). Sledují se 4 fáze předkopulačního letového chování samečka – mávání křídel (fanning), vzlet (take off), orientovaný let (oriented flight) a dosednutí



Obr. 8. Princip větrného tunelu (LRB test)



Obr. 9. Dose-response závislosti pro Z8-12:Ac a analogy s modifikovanou acetátovou skupinou, ● *I* (Z8-12:Ac), Δ *II* (chlorformiát), ■ *III* (4-lakton), ▽ *IV* (5-lakton), ○ *V* (6-lakton), □ *VIII* (12:Ac)



Obr. 10. Dose-response závislosti pro Z8-12:Ac a analogy s modifikací v místě *cis*-dvojně vazby, ● *I* (Z8-12:Ac), ■ *VI* (8-thia), ▽ *VII* (9-thia), Δ *IX* (vinyl), ○ *X* (ethyliden), □ *XI* (difluorvinyl)

na odparník (touch/landing). Pro LRB testy na inhibiční účinky byly použity směsi přírodního feromonu (10 ng) se syntetizovanými analogy (100 ng).

5. Výsledky biologických testů a diskuse

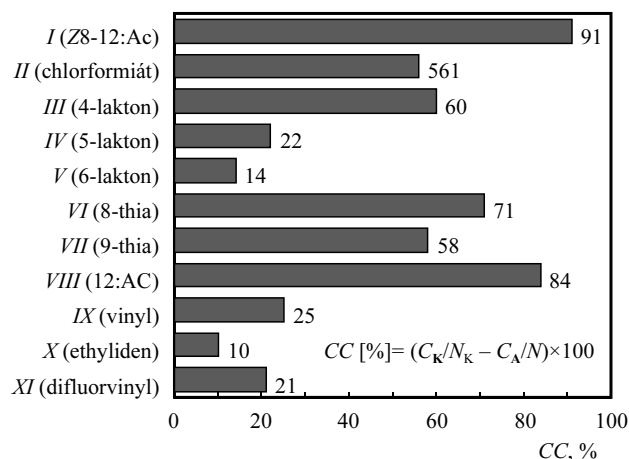
EAG aktivity syntetizovaných analogů jsou znázorněny jako dose-response křivky na obr. 9 a 10. Výsledky ESG testů (pořadí aktivity) se až na případ dodecyl-acetátu (*VIII*) v podstatě shodují s daty získanými EAG metodou. Konfuzní účinnosti testovaných sloučenin (SRB test) jsou srovnány v grafické formě na obr. 11. Pořadí inhibiční aktivity analogů v LRB testu je prakticky shodné. Celkové výsledky elektrofyziologických i behaviorálních testů jsou ve zjednodušené formě prezentovány v tabulce I.

5.1. Dodecyl-chlorformiát (*II*)

Tato sloučenina vykazuje nejvyšší elektrofyziologickou (EAG/ESG) aktivitu ze všech syntetizovaných analogů Z8-12:Ac (*I*). Výrazný je také inhibiční efekt po přidání k přírodnímu feromonu (LRB test) a konfuzní efekt při SRB testu. Samotný analog *II* dokáže ve větrném tunelu částečně nahradit feromon, neboť aktivuje první tři fáze předkopulačního letového chování samečka. Podle molekulárně-mechanického (dále MM; software HyperChem^(tm) 2, výpočty minimální energie metodou MM+) modelování je molekula analogu *II* vysoce prostorově podobná molekule feromonu *I*. Analog *II* tedy dobře mimikuje Z8-12:Ac a navíc nelze vyloučit jeho reakci s receptorovými proteiny za tvorby karbamátové vazby (a tím zablokovat čichový transdukční mechanismus).

5.2. Laktonové analogy *III*–*V* (alkenolidy)

Analog *III* (pětičlenný lakton, Z10-tetradecen-3-olid) je elektrofyziologicky málo aktivní, ale má výrazný konfuzní efekt (SRB test) a slušné inhibiční účinky v tunelu. Sloučenina podle MM modelů nemimikuje Z8-12:Ac, za inhibiční účinky zodpovídá vysoká afinita 4-členného laktonu k nukleofilům. Z10-tetradecen-3-olid by tak mohl inhibovat feromon-katabolické enzymy alkylací či acylací jejich nukleofilních skupin.



Obr. 11. Konfuzní koeficienty Z8-12:Ac a jeho analogů

Tabulka I
Biologické aktivity analogů feromonu obaleče východního (*Cydia molesta*)

Analog/Metoda	EAG ^a	ESG ^a	SRB test ^a	LRB test ^a
<i>II</i> (chlorformiát)	+++	+++	+++	+++
<i>III</i> (4-členný lakton)	+	–	+++	++
<i>IV</i> (5-členný lakton)	++	+++	–	–
<i>V</i> (6-členný lakton)	–	–	–	–
<i>VI</i> (8-thia)	++	+++	+++	+++
<i>VII</i> (9-thia)	++	++	+++	++
<i>VIII</i> (nasycený acetát)	+++	–	++	–
<i>IX</i> (vinyl)	+	+	+	+
<i>X</i> (ethyliden)	–	–	–	–
<i>XI</i> (difluorvinyl)	–	–	–	–

^a + + +: vysoká aktivita, + +: střední aktivita, +: nízká aktivita, –: neaktivní

Pětičlenný lakton (*IV*; Z11-pentadecen-4-olid) má relativně vysokou EAG/ESG aktivitu, ale minimální konfuzní a in-

hibiční účinky. Molekula analogu *IV* sice mimikuje Z8-12:Ac (MM model) ale jeho inhibiční aktivita je nízká. To lze vysvětlit podstatně menší afinitou 5-členného laktonického uskupení k nukleofilům (50–100× menší než u 4-členného laktonu *III*) (cit.³¹).

Šestičlenný lakton (*V*; Z12-hexadecen-5-olid) není biologicky aktivní, tj. nenapodobuje původní feromon a nemá ani inhibiční účinky. Důvodem je příliš velký zásah do geometrie původního Z8-12:Ac (*I*) v místě koncové acetátové skupiny (MM model) a předpokládaná nízká reaktivita 6-členného laktonového uskupení sloučeniny *V*.

5.3. Thiaanalogy *VI* a *VII*

Obě dvě sloučeniny mají vysokou elektrofyziologickou (EAG / ESG) aktivitu a též značný konfuční efekt při SRB behaviorálním testu. Při směsných EAG experimentech (směsi s Z8-12:Ac v poměrech 1:10 a 1: 100) zvyšují odpověď tykadla o 50–70 %.

Podle MM modelů oba thiaanalogy dobře mimikují Z8-12:Ac a navíc jejich flexibilní molekuly pravděpodobně interagují i s receptory minoritních komponent sexuálního feromonu. Látky *VI* a *VII* mají konfuční efekt srovnatelný s feromonem (díky desetinné těkavosti při 10-ti násobné dávce). Obě látky se chovají jako agonisté Z8-12:Ac, spíše modifikují než inhibují percepci feromonu.

5.4. Dodecyl-acetát (*VIII*)

Tento ester byl nově identifikován³² ve feromonové směsi produkované samičkou obaleče východního. Nejde tedy o analog feromonu, ale o minoritní komponentu sexuálního feromonu. Proto sloučenina *VIII* vykazuje vysokou EAG odezvu celého tykadla a minimální ESG odezvu buněk specializovaných na hlavní složku Z8-12:Ac. To vše spolehlivě indikuje přítomnost doposud anatomicky nelokalizovaných, k identifikaci 12:Ac určených specifických receptorů, na samčím tykadle obaleče *Cydia molesta*.

5.5. Rozvětvené analogy *IX–XI*

Elektrofyziologická (EAG/ESG) aktivita vinylanalogu *IX* je velmi nízká a i jeho konfuční efekt v LRB testu je nevýrazný. Při směsných EAG experimentech (směsi s Z8-12:Ac 1:10 a 1:100) snižuje odpověď tykadla cca o 20 %. Podle MM modelů analog *IX* nemimikuje Z8-12:Ac, tj. jeho slabé inhibiční účinky nejsou spojeny se schopností „napodobit“ původní molekulu hlavní složky feromonu. Analog *IX* je pravděpodobně schopen inhibovat EAG odpověď na úrovni tykadla (nutné další ověření).

Ethylidenanalog (*X*) a difluorvinylanalog (*XI*) jsou díky velkým zásahům do struktury molekuly Z8-12:Ac (MM modely) látky s velmi nízkou elektrofyziologickou i behaviorální aktivitou.

6. Závěr

Získané údaje o biologické aktivitě sloučenin *II–XI* nás opravňují konstatovat, že inhibiční vlastnosti analogů nejsou spojeny pouze s jejich schopností napodobit (mimikovat) pů-

vodní molekulu Z8-12:Ac. Na základě provedených experimentů můžeme uvažovat o dvou odlišných hypotetických mechanismech působení syntetizovaných analogů: 1) Zablokování receptorového systému feromon mimikujícím analogem (thiaanalogy *VI* a *VII*, částečně chlorformiát *II*), 2) Zablokování normálních transportních a enzymatických procesů v receptoru díky možné alkylaci či acylaci nukleofilních skupin receptorových proteinů a / nebo katabolických enzymů (chlorformiát *II* a 4-členný lakton *III*).

Perspektivní sloučeniny (*II*, *III*, *VI* a *VII*) budou podrobeny dalšímu intenzivnímu biochemickému a biologickému studiu. Z praktického hlediska si zaslouží zvláštní pozornost thiaanalogy *VI* a *VII*. Jednoduchá syntéza a vyšší environmentální stabilita ve srovnání s hlavní složkou feromonu (Z8-12:Ac) jsou významnými aktivy obou analogů pro jejich potenciální využití^{9,33,34} v integrované ochraně sadů před obalečem východním.

Řešení uvedeného komplexního projektu pro nás znamenalo nutnost poprvé spojit „síly“ nejenom v oblasti organické syntézy a fyziologie hmyzu, ale řešit i otázky fyzikálně-chemické (těkavosti semiochemikálií) či molekulárně-mechanické a etologické (design behaviorálních testů). Kromě „praktických“ výstupů (nové biologicky aktivní analogy semiochemikálií) vidím hlavní význam tohoto projektu ve vypracování obecně použitelného interdisciplinárního modelu řešení podobných problémů vztahů chemická struktura – biologická aktivita v oblasti chemické ekologie.

Tato práce vznikla za finanční podpory grantu č. DHR-5600-G-00-1051-00, Program in Science and Technology Cooperation, agentury USAID (United States Agency for International Development).

LITERATURA

1. Hoskovec M.: Chem. Listy 92, 941 (1998).
2. Baker R., Herbert R. H.: Nat. Prod. Reports 1984, 299.
3. *Techniques in Pheromone Research* (Hummer H. E., Miller T. A., ed.). Springer, New York 1984.
4. *CRC Handbook of Natural Pesticides* (Morgan, E. D., Mandava, ed.), sv. VI. CRC Press, Boca Raton 1988.
5. Arn H., Tóth M., v databázi: *List of Sex Pheromones of Lepidoptera and Related Attractants* (Arn H., Tóth M., Priesner E., ed.). Internetová databáze Pherolist: <http://nysaes.cornell.edu/pheronet/>.
6. Hoskovec M., Kalinová B., Konečný K., Koutek B., Vrkoč J.: J. Chem. Ecol. 19, 735 (1993).
7. Rice R. E., Kirsch P., v knize: *Applications of Pheromones and Other Attractants* (Ridgway R. L., Silverstein R. M., Inscoe M. N., ed.), kap. 13. Marcel Dekker, New York 1990.
8. Voght H., Schropp A., Neumann U., Eichhorn K. W.: J. Appl. Entomol. 115, 217 (1993).
9. Cardé R. T., Minks P. M.: Annu. Rev. Entomol. 40, 559 (1995).
10. Prestwich G. D., Carvalho J. F., Ding Y. S., Hendricks D. E.: Experientia 42, 964 (1986).
11. Parilla A., Guerrero A.: Chem. Senses 19, 185 (1994).
12. Cardé A. M., Baker T. C., Cardé R. T.: J. Chem. Ecol. 5, 423 (1979).
13. Mayer R. J., Louis-Flamberg P., Elliott J. D., Fischer M.,

- Leber J.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 169, 610 (1990).
14. Silvermann R. B.: *The Organic Chemistry of Drug Design and Drug Action*, kap. 2. Academic, San Diego 1992.
 15. Camps F., Gasol V., Guerrero A.: *J. Chem. Ecol.* 16, 1155 (1990).
 16. Burger B. V., Le Roux M., Mackenroth W. M., Spies H. S., Hofmeyr J. H.: *Tetrahedron Lett.* 31, 5771 (1990).
 17. Hoskovec M., Šaman D., Koutek B.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 59, 1211 (1994).
 18. Hoskovec M., Koutek B., Lazar J., Kalinová B., Brožová E., Streinz L., Vrkoč, J.: *Helv. Chim. Acta* 77, 1281 (1994).
 19. Hoskovec M., Hovorka O., Kalinová B., Koutek B., Streinz L., Svatoš A., Šebek P., Šaman D., Vrkoč J.: *Bioorg. Med. Chem.* 4, 479 (1996).
 20. Hoskovec M., Hovorka O., Kalinová B., Koutek B., Svatoš A., Vlček K., Vrkoč J.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 63, 1031 (1998).
 21. Bjostad L. B., v knize: *Methods in Chemical Ecology, Chemical Methods* (Millar J. G., Haynes K. F., ed.), sv. 1, kap. 9. Kluwer Academic Publishers, Norwell 1998.
 22. Koutek B., Hoskovec M., Konečný K., Vrkoč J.: *J. Chromatogr.* 626, 215 (1992).
 23. Koutek B., Hoskovec M., Vrkočová P., Konečný K., Felzl L.: *J. Chromatogr. A* 679, 307 (1994).
 24. Koutek B., Hoskovec M., Vrkočová P., Konečný K., Felzl L.: *J. Chromatogr. A* 719, 391 (1996).
 25. Koutek B., Hoskovec M., Vrkočová P., Felzl L.: *J. Chromatogr. A* 759, 93 (1997).
 26. Jensen D. J., Schall E. D.: *J. Agr. Food Chem.* 14, 123 (1966).
 27. Murray J. J., Pottier R. F., Pupp C.: *Can. J. Chem.* 52, 275 (1983).
 28. Spencer W. F., Clith M. M.: *Residue Rev.* 85, 57 (1983).
 29. Hamilton D. J.: *J. Chromatogr.* 195, 75 (1980).
 30. Hare J. D., v knize: *Methods in Chemical Ecology, Bioassay Methods* (Millar J. G., Haynes K. F., ed.), sv. 2, kap. 5. Kluwer Academic Publishers, Norwell 1998.
 31. Hemminki K.: *Chem. Biol. Interact.* 34, 323 (1981).
 32. Lacey M. J., Sanders C. J.: *J. Chem. Ecol.* 18, 1421 (1992).
 33. Bartell R. J.: *Physiol. Entomol.* 7, 353 (1982).
 34. Rice R. E., Kirsch P., v knize: *Behaviour-Modifying Chemicals for Insect Management. Applications of Pheromones and Other Attractants* (Ridgway R. L., Silverstein R. M., Inscoc M. N., ed.), kap. 13. Marcel Dekker, New York 1990.

M. Hoskovec (*Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague*): **Insect Chemical Communication from the Viewpoint of the Organic Chemist**

The multiscience complexity of the research in the field of the insect chemical communication is demonstrated on the project Biorational Pesticides Based on Pheromone Analogues. The project dealt with the design, synthesis and structure – biological activity studies of sex pheromone analogues of some important insect pests, such as the oriental fruit moth (*Cydia molesta*). Ten new analogues of (Z)-dec-8-en-1-yl acetate (*I*) with the modified acetate group (*II–V*) or alkene moiety (*VI–XI*) were tested for their biological activity by electroantennography (EAG), electrosensillography (ESG), short-range sexual stimulation and activation in the flight tunnel. All the structure modifications resulted in compounds whose electrophysiological activities were lower than that of *I* following the order *I* > *II* > *VII* > *IV* > *VIII* = *IV* = *VI* >>> *V* = *IX* = *X* = *XI*. In behaviour experiments, some of the synthesised compounds were found to generally reduce the ability of males to find a pheromone source. The highest inhibitory effect was observed for chloroformate *II*, the four-membered lactone *III* and the thia analogues *VI* and *VII*. The results support the view that inhibitory properties of the analogues should not be entirely associated with their pheromone-mimicking capabilities.