

## Die Verbreitung des $\beta$ -Cyan-L-alanin bei cyanogenen Lepidopteren

### The Distribution of $\beta$ -Cyano-L-alanine in Cyanogenic Lepidoptera

K. Witthohn und C. M. Naumann \*

Abteilung für Morphologie und Systematik der Tiere, Fakultät für Biologie der Universität Bielefeld, Postfach 86 40, D-4800 Bielefeld 1

Z. Naturforsch. **39 c**, 837–840 (1984);  
received March 21, 1984

Cyanogenesis,  $\beta$ -Cyano-L-alanine, Cyanoglucosides, Defense Mechanism, Lepidoptera

The toxic amino acid  $\beta$ -cyano-L-alanine is shown to be present in 21 species of the Zygaenidae, which are known to produce and store the cyanoglucosides linamarin and lotaustralin.  $\beta$ -Cyano-alanine is also reported for the first time from other cyanogenic Lepidoptera, i.e. the Acraeinae and the Heliconiinae of the nymphalid family and from other species of the Nymphalidae, which have not been known to be cyanogenic before. Cyanogenesis, including the presence of  $\beta$ -cyano-alanine and the cyanoglucosides linamarin and lotaustralin is demonstrated for the first time for the Heterogynidae.

Cyanogene Lepidopteren sind seit längerem bekannt: so berichtete bereits Jordan 1907 [1] über die Cyanwasserstoffabgabe und -resistenz der Zygaenidae, während Rothschild 1971 die Cyanogenese bei den Nymphaliden-Gattungen *Heliconius* und *Acraea* aufgrund ihrer cyanogenen Nahrungspflanzen voraussagte [2]. Seither konnte in allen drei Fällen gezeigt werden, daß die Cyanglukoside Linamarin (2- $\beta$ -D-glucopyranosyloxy-2-methyl-propionitril) und Lotaustralin ((R)-2- $\beta$ -D-glucopyranosyloxy-2-methylbutyronitril) als Cyanid-Quelle zu betrachten sind [3, 4]. Während die Larven des zunächst untersuchten Vertreters der Zygaenidae (*Zygaena filipendulae*) auf der ebenfalls cyanogenen Futterpflanze *Lotus corniculatus* (Fabaceae) leben, entwickeln sich die Nymphaliden-Gattungen *Acraea* und *Heliconius* auf Passifloraceae, die zwar cyanogen sind, jedoch nicht die in den Insekten gefundenen Cyanglukoside enthalten. Andere Vertreter der Zygaenidae leben an ebenfalls cyanoglukosid-freien Nahrungspflanzen (z.B. Polygonaceae oder Compositae) [5]. Die Vermutung,

daß die Cyanglukoside auch bei *Zygaena* und *Heliconius* – unabhängig von der Aufnahme über die Futterpflanze – aus Valin und Isoleucin *de novo* synthetisiert werden, wurde durch Wray *et al.* [6] experimentell bestätigt. Die genannten Cyanglukoside gelten als schwach toxisch [7]. Eine ungleich stärker toxisch wirkende Substanz wurde kürzlich mit dem Neurotoxin  $\beta$ -Cyanalanin im larvalen Wehrsekret und der Haemolymphe von Larven und Imagines von *Zygaena trifolii* (ESPER, 1783) gefunden [8].

Durch Vergleich der Circular-Dichroismen-Spektren von käuflichem  $\beta$ -Cyan-L-alanin und der aus *Zygaena trifolii* gewonnenen Substanz konnten wir zeigen, daß die Aminosäure stets in der L-Form vorliegt. Beide Substanzen weisen einen positiven CD-Effekt bei 207 nm ( $\Delta\epsilon = 1,0$ ) auf. Es ist anzunehmen, daß dies auch für alle übrigen  $\beta$ -cyanalanin-haltigen Vertreter der Zygaenidae und der Nymphalidae zutrifft.

Das Auftreten des  $\beta$ -Cyan-L-alanin bei Insekten setzt Cyanogenese voraus. Das  $\beta$ -Cyan-L-alanin ist ein Metabolit im Cyanid-Katabolismus. Die neurotoxisch wirkende L-Aminosäure wird für den bei Übergenuß von *Lathyrus* (Fabaceae) oder *Cassava* (Euphorbiaceae) entstehenden Lathyrismus verantwortlich gemacht [9]. Sie ist im pflanzlichen Stoffwechsel-Katabolismus eine häufig auftretende Aminosäure [10], wurde bei tierischen Organismen jedoch erst einmal bei Diplopoden nachgewiesen [11, 12].

Es war nunmehr von Interesse zu prüfen, ob  $\beta$ -Cyanalanin auch bei den nicht-aposematisch gezeichneten Zygaenidae, die ebenfalls cyanglukosidhaltig sind [13, 14], vorkommt. Außerdem war zu prüfen, ob auch die Nymphaliden *Acraea* und *Heliconius* im Cyanid-Metabolismus befähigt sind,  $\beta$ -Cyanalanin zu synthetisieren. Da die Substanz schließlich bei allen, auch den nicht-aposematischen Zygaenidae und bei der mit dieser Familie nächstverwandten Familie Heterogynidae (Heterogynis) [15] nachweisen ließ (vgl. Tab. I), wurden schließlich auch noch weitere Unterfamilien der Nymphalidae (*sensu lato*) untersucht, um festzustellen, ob  $\beta$ -Cyanalanin etwa auch über die bisher bekannten cyanglukosid-haltigen Formen hinaus weiter verbreitet ist.

Zur Untersuchung gelangte sowohl luftgetrocknetes als auch frisch-totes, sowie in flüssigem Stickstoff konserviertes Material. Mit wenigen Ausnahmen

\* 33. Beitrag zur Kenntnis der Gattung *Zygaena* F. und ihrer Vorstufen (Lepidoptera, Zygaenidae) (32: Comp. Biochem. Physiol.: in press).

Sonderdruckanforderungen an Prof. Dr. C. M. Naumann.  
0341-0382/84/0700-0837 \$ 01.30/0



Table I. Vorkommen von  $\beta$ -Cyanalanin, Linamarin/Lotaustralin und aposematischer Zeichnungsmuster (sofern belegt) bei verschiedenen Vertretern der Zygaenidae und Nymphalidae (tr = luftgetrocknet, le = frischtot, N<sub>2</sub> = tiefgekühlte Nativ-Proben).

Art	Konserv.	$\beta$ -Cyanalanin	Linamarin <sup>a</sup> Lotaustralin	aposematische Zeichnung
<b>Zygaenidae</b>				
<b>Procridinae</b>				
<i>Rhagades pruni</i>	N <sub>2</sub>	+	+	—
<i>Procris manni</i>	tr	+	?	—
<b>Chalcosiinae</b>				
<i>Agalope bifasciata</i>	tr	+	+	—
<i>Campylotes histrionicus</i>	tr	+	+	+
<i>Aglaope infausta</i>	N <sub>2</sub>	+	+	+
<b>Zygaeninae</b>				
<i>Pryeria sinica</i> (imago)	tr	+	+	—
<i>Pryeria sinica</i> (larva)	le	+	?	+
<i>Orna nebulosa</i> (imago)	tr	+	+	—
<i>Orna nebulosa</i> (larva)	le	+	?	—
<i>Neurosymploca caffra</i> (auctorum)	tr	+	+	+
<i>Reissita simonyi</i>	tr	+	+	+
<i>Epizygaenella caschmirensis</i>	tr	+	+	+
<i>Zygaena orana</i>	tr	+	+	+
<i>Z. carniolica</i> (imago)	tr	+	+	+
<i>Z. carniolica</i> (larva)	le	+	?	+
<i>Z. fausta</i>	tr	+	+	+
<i>Z. viciae</i>	tr	+	+	+
<i>Z. dorycnii</i>	N <sub>2</sub>	+	+	+
<i>Z. hippocrepidis</i>	tr	+	+	+
<i>Z. transalpina</i> (larva)	le	+	+	+
<i>Z. trifolii imago</i>	tr	+	+	+
<i>Z. trifolii</i> (larva)	le	+	+	+
<i>Z. lonicerae</i> (larva)	le	+	?	+
<i>Z. corsica</i>	tr	+	+	+
<i>Z. punctum</i>	tr	+	?	+
<b>Heterogynidae</b>				
<i>Heterogynis spec.</i> (♀) (Nord-Italien, Ferrara di Monte Baldo, 1000 m)	N <sub>2</sub>	+	+	—

wurden ausschließlich Imagines untersucht. Die Nachweise mißlangen bei luftgetrocknetem Material, das 10 Jahre und älter war, verliefen jedoch bei jüngeren Proben der gleichen Art positiv. Zur Analyse wurden die Proben vollständig homogenisiert und mit ammoniakalischem Methanol extrahiert. Durch zweidimensionale Dünnschichtchromatographie an Kieselgel 60-Platten (Laufmittel: 1. CHCl<sub>3</sub>/MeOH/25% NH<sub>3</sub>, 5:5:1 (v, v); 2. *n*-BuOH/H<sub>2</sub>O/HOAc, 4:2:1), ließ sich  $\beta$ -Cyanalanin ( $r_{f1} = 0,55$ ,  $r_{f2} = 0,19$ ) leicht von anderen Aminosäuren abtrennen und durch Ansprühen mit Ninhydrin nachweisen. Im Gegensatz zu den üblichen Aminosäuren ergibt die Farbreaktion mit Ninhydrin für  $\beta$ -Cyanalanin einen charakteristi-

schon blauen Farbfleck [16]. Darüber hinaus wurden zur Überprüfung die  $r_f$ -Werte der Chromatogramme vermessen. Die Ergebnisse der durchgeführten Reaktionen sind in Tab. I wiedergegeben.

Es zeigt sich, daß alle cyanglukosid-haltigen Formen — auch die nicht-apsematisch gezeichneten Formen der Zygaenidae und die hier erstmals als cyanogen gemeldeten Heterogynidae —  $\beta$ -Cyanalanin enthalten. Unerwartet war hingegen der Nachweis des  $\beta$ -Cyanalanins bei den Danaeinae (*Danaus chrysippus*), einer Unterfamilie der Nymphalidae, die dafür bekannt ist, daß die ♂♂-Imagines von verschiedenen Pflanzenfamilien Pyrrolizidin-Alkaloide aufnehmen [17], die als Vorstufen für männliche Pheromone dienen. Pyrro-

Tabelle I. (Fortsetzung)

Art	Konserv.	$\beta$ -Cyanalanin	Linamarin <sup>a</sup> Lotaustralin	aposematische Zeichnung
<b>Nymphalidae</b>				
<b>Acraeinae</b>				
<i>Acraea horta</i>	tr	+	+	+
<b>Charaxinae</b>				
<i>Charaxes jasius</i>	tr	—	?	—
<b>Danainae</b>				
<i>Danaus chrysippus</i>	tr	+	?	+
<i>D. gilippus</i>	tr	—	?	—
<b>Heliconiinae</b>				
<i>Dione vanillae</i>	tr	+	+	+
<i>Heliconius doris</i>	tr	+	+	+
<i>H. charitonia</i>	tr	+	+	+
<b>Nymphalinae</b>				
<i>Apatura icia</i>	tr	—		—
<i>A. ilia f. clythie</i>	tr	—		—
<i>Vanessa atalanta</i>	tr	(+) <sup>b</sup>	—	c
<i>V. cardui</i>	tr	(+) <sup>b</sup>		c
<i>Aglaia urticae</i>	tr	—		—
<i>Inachis io</i>	tr	—		+
<i>Nymphalis polychloros</i>	tr	—		—
<i>Polygonia c-album</i>	tr	—		—
<i>Araschnia levana</i>	tr	—		—
<i>Euphydryas aurinia</i>	tr	—		—
<i>Melitaea cinxia</i>	tr	—		—
<i>Argynnis paphia</i>	tr	—		—
<b>Satyrinae</b>				
<i>Melanargia lachesis</i>	tr	—		c
<i>Lasiommata megera</i>	tr	—	—	—
<i>Maniola jurtina</i>	tr	(+) <sup>b</sup>	—	—

<sup>a</sup> Nach [3], [13] und [14].<sup>b</sup> Schwache, aber eindeutige Ninhydrin-Reaktion der Dünnschichtchromatogramme.<sup>c</sup> Biologische Bedeutung des Zeichnungsmusters unklar.

lizidin-Alkaloide gelten als für Vertebraten giftige Substanzen [18]. Darüber hinaus enthalten die an Apocynaceae, Asclepiadaceae und Moraceae lebenden Danainae Cardenolide (Herzglykoside), die ebenfalls als für Vertebraten giftig bekannt sind [19]. Die Tatsache, daß wir  $\beta$ -Cyanalanin lediglich bei *Danaus chrysippus*, nicht jedoch bei *D. gilippus* finden konnten, ist insofern nicht überraschend, als seit den Untersuchungen von Brower [20] bekannt ist, daß auch der Cardenolid-Gehalt einzelner *Danaus-chrysippus*-Populationen erheblich variieren kann, dort in Abhängigkeit vom Cardenolid-Gehalt der Futterpflanze. Dies kann entsprechend auch für den Gehalt an  $\beta$ -Cyanalanin zutreffen. Mit  $\beta$ -Cyanalanin ist somit eine weitere toxische Substanz der

Danainae nachgewiesen. Überraschend ist das Auftreten des  $\beta$ -Cyanalanin bei den Nymphalinae *Vanessa atalanta* und *V. cardui* sowie bei der Satyrinae *Maniola jurtina*. Wenn die Reaktionsstärke mit Ninhydrin in diesen Fällen auch nicht der bei den cyanglukosid-haltigen Zygaenidae bzw. *Heliconius* oder *Acraea* entspricht, so kann an der Identifizierung des  $\beta$ -Cyanalanin aufgrund der übereinstimmenden  $r_f$ -Werte und der Farbreaktion kein Zweifel bestehen. Die beiden *Vanessa*-Arten leben an *Carduus* (Compositae) bzw. *Urtica* (Urticaceae), von Larven der Satyrinae ist bekannt, daß sie an verschiedenen Gramineae leben.

Es muß davon ausgegangen werden, daß die Befähigung zur  $\beta$ -Cyanalanin-Synthese innerhalb

der Lepidopteren wenigstens zweimal, möglicherweise innerhalb der Nymphalidae jedoch mehrfach konvergent erworben wurde. In den drei cyanglukosidhaltigen Gruppen Zygaenidae, Acraeinae und Heliconiinae wird allerdings trotz der unterschiedlichen Ausgangssituation der gleiche Cyanid-Abbauweg über das  $\beta$ -Cyanalanin eingeschlagen. Dies deutet auf einen diesen Weg begünstigenden Selektionsvorteil hin, der vermutlich in der Toxizität des  $\beta$ -Cyanalanin zu suchen ist und dem Organismus einen besseren Schutz gegen Freßfeinde verleiht. Unter dieser Annahme (die wir z. Z. experimentell zu überprüfen suchen) ist auch der Mehraufwand

für die Entwicklung eines Entgiftungsmechanismus verständlich, die die Lepidopteren vor den neurotoxischen Eigenschaften des  $\beta$ -Cyanalanin schützen.

#### Dank

Die Untersuchungen wurden mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft durchgeführt, der wir hierfür danken möchten. Herr Prof. Dr. A. Nahrstedt, Institut für Pharmazeutische Biologie der Universität Braunschweig, hat entgegenkommenderweise die Anwesenheit der Cyanglukoside Linamarin und Lotaustralin bei einigen Proben überprüft.

- [1] K. Jordan, in A. Seitz: Die Großschmetterlinge der Erde, **Vol. 2**; Kernen-Verlag, Stuttgart.
- [2] M. Rothschild, in R. Creed (Ed.): Ecological genetics and evolution, 202–233, Blackwells Scientific Publications, Oxford 1971.
- [3] R. H. Davis and A. Nahrstedt, *Comp. Biochem. Physiol.* **64B**, 395 (1979).
- [4] A. Nahrstedt and R. H. Davis, *Comp. Biochem. Physiol.* **68B**, 575 (1981).
- [5] W. Forster and Th. Wohlfahrt: Die Schmetterlinge Mitteleuropas, **Vol. 3**. Franckh-Verlag, Stuttgart 1960.
- [6] V. Wray, R. H. Davis, and A. Nahrstedt, *Z. Naturforsch.* **38c**, 583 (1983).
- [7] D. J. Philbrick, D. C. Hill, and J. C. Alexander, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **42**, 539 (1977).
- [8] K. Witthohn and C. M. Naumann, *Comp. Biochem. Physiol.* in press (1984).
- [9] J. P. Ferris, in Z. Rappoport: The chemistry of the cyano group, 717–742. Interscience Publishers, London 1970.
- [10] H. R. Henrickson and E. E. Conn, *J. Biol. Chem.* **244**, 2632 (1969).
- [11] S. S. Duffey, E. W. Underhill, and G. H. N. Towers, *Comp. Biochem. Physiol.* **47B**, 753 (1974).
- [12] S. S. Duffey and G. H. N. Towers, *Can. J. Zool.* **56**, 7 (1978).
- [13] R. H. Davis and A. Nahrstedt, *Comp. Biochem. Physiol.* **71B**, 329 (1982).
- [14] R. H. Davis, A. Nahrstedt, and C. Naumann, in Vorbereitung.
- [15] W. Dierl, *Zool. Jb. Syst.* **91**, 201 (1964).
- [16] U. Schwarzmeier, *Chem. Ber.* **109**, 3379 (1976).
- [17] M. Boppré, *Ent. Exp. Appl.* **24**, 264 (1978).
- [18] R. Schöenthal, *Cancer Res.* **28**, 2237 (1968).
- [19] P. R. Ehrlich and P. H. Raven, *Evolution* **18**, 586 (1964).
- [20] L. P. Brower, in K. L. Chamber (Ed.): *Biochemical Coevolution*, Oregon State University Press, Corvallis 1970.