

Pheromone 97*. Der Sexualpheromonkomplex des weiblichen Blutbär *Thyria jacobaeae* (Lepidoptera, Arctiidae)

Pheromones, 97*. The Sex Pheromone Complex of the Female Arctiid Moth *Thyria jacobaeae* (Lepidoptera, Arctiidae)

Hans Jürgen Bestmann, Edelgard Janssen, Friedrich Kern, Doris Schäfer und Otto Vostrowsky

Institut für Organische Chemie der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg, D-91054 Erlangen, Bundesrepublik Deutschland

Z. Naturforsch. **49c**, 276–279 (1994);
received December 13, 1993

Thyria jacobaeae, Arctiidae, Sex Pheromone Complex, (3Z,6Z)-cis-9,10-Epoxy-3,6-eicosadiene, (3Z,6Z)-cis-9,10-Epoxy-3,6-heneicosadiene

By means of gas chromatographic, mass spectrometric methods and combined GC-electroantennogram techniques as well as activity comparison with pheromones of related species (3Z,6Z)-cis-9,10-epoxyeicosadiene **1** and (3Z,6Z)-cis-9,10-epoxyheneicosadiene **2** were identified as the biological active components of the sex pheromone complex of the female arctiid moth *Thyria jacobaeae*.

Der Blutbär *Thyria jacobaeae* (Lepidoptera, Arctiidae) ist in ganz Europa verbreitet und verdankt seinen Namen seiner charakteristischen Zeichnung. Die tiefschwarzen Deckflügel sind mit zwei roten Flecken und einem roten Streifen versehen, die Hinterflügel sind ganz rot gefärbt. Da der Falter für Fraßfeinde ungenießbar ist, fliegt er auch tagsüber und läßt sich an seinem trägen Flug erkennen. Die Wirtspflanzen der Raupen sind meist Asteraceen-Arten.

In der Schmetterlingsfamilie Arctiidae sind bisher Weibchen-Sexualpheromone für ca. 20 Arten identifiziert worden. Es handelt sich vorwiegend um ein C₂₁-Alkadienepoxid begleitet von Polyen-kohlenwasserstoffen bzw. um 2-Methylalkane der Kettenlängen C₁₆–C₁₉ für die Holomelina- und Pyrrharctica-Arten (Arn *et al.*, 1992). Frerot *et al.*

(1988) bestimmten bereits 1988 die Zusammensetzung des Pheromonkomplexes für in der Nähe von Paris vorkommende *T. jacobaeae*-Weibchen und beschrieben (3Z,6Z,9S,10R)-9,10-Epoxy-3,6-heneicosadien, (3Z,6Z)-(Z)-9,10-Epoxy-3,6-eicosadien und (3Z,6Z,9Z)-3,6,9-Heneicosatrien als die essentiellen Komponenten. Im Rahmen systematischer Untersuchungen zum Beitrag von Strukturbeziehungen von Pheromonen zur Insekten-systematik, vor allem im Hinblick auf das mögliche Auftreten lokaler „Pheromon-Rassen“, haben wir die Analyse des Pheromons neu aufgenommen.

Material und Methoden

Insektenmaterial

Die Insekten wurden in der Nähe von Zeist (Holland) gefangen und die Folgegenerationen auf Naturfutter (Jakobskreuzkraut, *Senecio jacobaea*) gezüchtet. Die Puppen wurden nach Geschlechtern getrennt und einem reversen Licht/Dunkelrhythmus von 14/10 Stunden unterworfen.

Isolierung und Identifizierung des Pheromons

Frisch geschlüpfte weibliche Tiere wurden um 7.5 h in der Scotophase mit CO₂ betäubt und das 8. und 9. Abdomensegment mit der Intersegmentalmembran („Pheromondrüse“) unter dem Mikroskop abgetrennt. Jeweils a) eine separierte Drüse wurde in eine Glaskapillare für die GC-Analyse mittels Feststoffprobengeber (Attygalle *et al.*, 1987) eingeschmolzen oder b) zwei Drüsen mit 15 µl Hexan extrahiert und der Hexanextrakt zur Analyse verwendet. Die GC-Analysen wurden mittels Gaschromatograph HP 5890 A, ausgestattet mit FID, splitless Injektor, Feststoffprobengeber und Integrator, durchgeführt (Inj. 240 °C, Det. 260 °C, 25 m FSCC SE 52, 2 min 60 °C, 60–200 °C, 6 °C/min, hold, 1 ml N₂/min). GC-gekoppelte Elektroantennogramme (Struble und Arn, 1984) wurden mittels Packard-United-Technologies 427, 1:1 Split zwischen FID und Elektroantennogrammdetektor (EAD) registriert (splitless, Inj. 240 °C, Det. 260 °C, 25 m FSCC SP2340, 5 min 70 °C, 70–195 °C, 5 °C/min, hold, 1 ml N₂/min). Die GCMS-Analysen erfolgten mit einem Finnigan MAT90 Massenspektrometer (splitless, Inj. 200 °C, Interface 200 °C, 25 m FSCC SE 52, 70 eV EI-Spektren, 1 sec/scan, 1 ml He/min).

* Pheromone 96: Bestmann *et al.* (1994a); Pheromone 95: Bestmann *et al.* (1994b).

Sonderdruckanforderungen an Prof. Dr. H. J. Bestmann, Telefax: 091 31-85-68 64.

Verlag der Zeitschrift für Naturforschung,
D-72072 Tübingen
0939–5075/94/0300–0276 \$ 03.00/0



Elektroantennographischer Test

Elektroantennogramme EAG (Schneider, 1957) wurden von isolierten Antennen von *T. jacobaeae*-Männchen mit Glaskapillarelektroden (Ag/AgCl, Ringerlösung) aufgenommen. Als Reizquelle diente ein Luftpuls von 1 sec Dauer und Testsubstanzen auf Filterpapierstreifen bzw. das in einen kontinuierlichen Luftstrom eingeleitete GC-Säuleneffluent (EAD-Detektor), das über die Schmetterlingsantenne geführt wurde.

Resultat und Diskussion

Bei den frisch geschlüpften adulten Weibchen konnte beim „Locken“, dem Sezernieren des Sexualpheromons, keine spezielle Lockstellung beobachtet werden, dafür aber das rhythmische „Ausstülpen“ der Pheromondrüsen ab 5.5 h in der Scotophase bis zum Beginn der Photophase (10 h). Zum Zeitpunkt des größten Pheromongehalts der Tiere, der durch Messung der EAG-Aktivität von Drüsenextrakten bestimmt wurde (7.5 h in der Scotophase), wurden die flüchtigen Inhaltsstoffe der Intersegmentalmembran jeweils eines Weibchens unter Verwendung des Feststoffprobengebers gaschromatographisch aufgetrennt und dabei für zwei Substanzen (**1** und **2**, Abb. 1a) mit einer konspezifischen Männchenantenne als „biologischer Detektor“ elektrophysiologische Reaktionen festgestellt.

Die GC-massenspektrometrische Analyse der überwiegenden Hauptmenge **2** der Drüsenextrakte ergab bei EI-Ionisation ein Massenspektrum mit dem Molekülion m/z 306 ($C_{21}H_{38}O$, 2%) und einem Basispeak mit m/z 79 (100%). Weitere charakteristische Ionen waren m/z 288 (1%), 183 (10%), 151 (4%), 122 (16%), 108 (58%), 93

(43%), 67 (49%), 55 (58%) und 41 (75%), das Ion m/z 183 wies auf die Anwesenheit einer Epoxidfunktion in 9/10-Position in einer C_{21} -Kohlenwasserstoffkette hin (Bierl-Leonhardt *et al.*, 1980), m/z 108 (C_8H_{12}) ist mit der Spaltung der C-8/C-9-Bindung zu erklären.

Die gaschromatographisch zuerst eluierte Verbindung **1** ergab im Prinzip das gleiche Spektrum und dieselben Schlüsselfragmente wie **2**, jedoch ein Molekülion m/z 292 (2%) und dem zu 183 verkürzten homologen Bruchstück m/z 169, so daß die Nebenmenge **1** als das um eine CH_2 -Gruppe verkürzte Nor-Homologe mit gleichen Epoxid- und Doppelbindungspositionen identifiziert werden konnte. Durch Vergleich sowohl der Massenspektren als auch der Retentionszeiten mit authentischen Verbindungen, die uns als Gemisch der positionsisomeren (*Z*)-Monoepoxide aus einer früheren Arbeit zur Verfügung standen (Bestmann *et al.*, 1992), konnte **1** und **2** die Struktur (3*Z*,6*Z*)-*cis*-9,10-Epoxy-3,6-eicosadien bzw. (3*Z*,6*Z*)-*cis*-9,10-Epoxy-3,6-heneicosadien zugeordnet werden (Formel 1). Dieses Isomerengemisch läßt sich einfach durch Epoxidierung der entsprechenden C_{20} - und C_{21} -(3*Z*,6*Z*,9*Z*)-3,6,9-Alkatriene mit *m*-Chlorperbenzoesäure darstellen. Alle drei entstehenden Isomere lassen sich gaschromatographisch trennen und unterscheiden sich außerdem charakteristisch durch ihr Massenspektrum, so daß die Strukturzuordnung eindeutig ist.

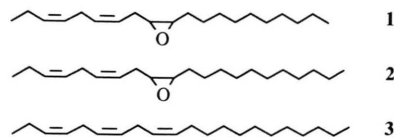
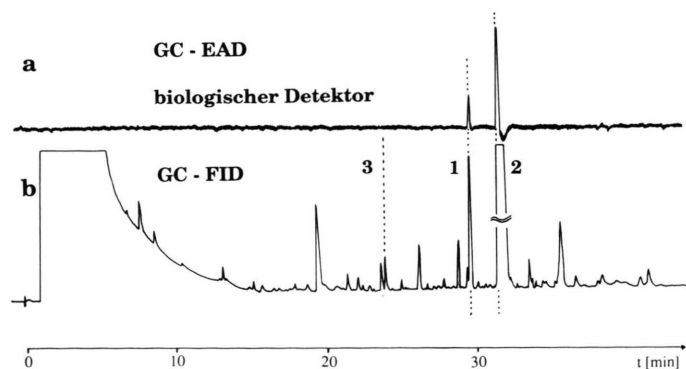


Abb. 1. a. Gaschromatogramm (FSCC SP2340) der flüchtigen Inhaltsstoffe der Pheromondrüse eines *T. jacobaeae*-Weibchens mit einer Männchenantenne als biologischer Detektor (**1** (3*Z*,6*Z*)-*cis*-9,10-Epoxy-3,6-eicosadien, **2** (3*Z*,6*Z*)-*cis*-9,10-Epoxy-3,6-heneicosadien, Feststoffprobengeber); b. FID-Chromatogramm des Hexanextrakts weiblicher Hinterleibsdrüsen (**1**, **2** und **3** 3,6,9-Heneicosatrien).

Neben den physiologisch aktiven Verbindungen **1** und **2** wurden außerdem eine Anzahl gesättigter Kohlenwasserstoffe der Kettenlänge C₁₉ bis C₂₈ gefunden, die üblicherweise immer in Pheromonextrakten gefunden werden. Weiterhin ließ sich das der Pheromonkomponente **2** entsprechende Alkatrien (3Z,6Z,9Z)-3,6,9-Heneicosatrien **3** (Formel 1 und Abb. 1b) eindeutig identifizieren. Letzteres wurde ebenso in der französischen Population dieser Art gefunden und von den Autoren als eine der „drei Komponenten der Pheromonsekretion“ beschrieben. Da jedoch im Falle der hier untersuchten Tiere durch Fehlen eines EAD-GC-Signals für **3** (Abb. 1a) keine sensorische Wirksamkeit festgestellt werden konnte, müssen wir die Verbindung eindeutig als Pheromonkomponente ausklammern.

Um dies zu erhärten, bedienten wir uns eines elektrophysiologischen Kreuzexperiments zwischen der Pheromonsekretion weiblicher *Arctia caja* (Lepidoptera, Arctiidae), die von uns erst kürzlich untersucht wurde (Bestmann *et al.*, 1992), und den Antennen der *T. jacobaeae*-Männchen. *A. caja* produziert neben der Hauptkomponente **1** ebenso die Verbindungen **2** und **3**, jedoch stehen die beiden letzteren etwa im Verhältnis 1:20, d. h. im Vergleich zu *T. jacobaeae* ist etwa 30mal mehr **3** gegenüber **2** vorhanden. Doch auch mit diesem an Alkatrien **3** deutlich „angereicherten“ Pheromonkomplex konnte bei der GC-Analyse mit der Antenne von *Thyria jacobaeae* als EAD-Detektor für diese Verbindung keinerlei sensorische Wirksamkeit festgestellt werden.

Auch getrennt durchgeführte Elektroantennogramm-Messungen ergaben für das 3,6,9-Alka-

trien **3** nur die für einen Kohlenwasserstoff dieser Struktur zu erwartende schwache elektrophysiologische Wirksamkeit. Dieser Befund steht in Einklang mit den EAG-Ergebnissen der französischen Autoren (Frerot *et al.*, 1988), die in vergleichenden Messungen für **3** Aktivitäten fanden, die nur etwa den von vollkommen artfremden Acetatpheromonen entsprachen und deutlich schwächer als die des sowohl art- als auch strukturfremden Lymantriiden-Epoxypheromons Disparlure (*cis*-7,8-Epoxy-2-methyloctadecan) waren.

Damit können wir abschließend feststellen, daß die beiden in geographisch verschiedenen Regionen vorkommenden *T. jacobaeae*-Stämme sicherlich die gleichen Stoffe produzieren, es sich jedoch nur bei den Epoxiden **1** und **2** um essentielle Komponenten des Pheromonkomplexes handelt. Wir nehmen an, daß die Alkatrienverbindung **3** eine Biosynthese-Vorstufe darstellt, die nicht zur sensorischen Wirksamkeit beiträgt.

Die beiden Epoxide **1** und **2** sind chiral und es sind für die beiden Enantiomeren jeweils unterschiedliche Aktivitäten zu erwarten. Die Bestimmung der absoluten Konfiguration bzw. des Enantiomerenverhältnisses der Naturstoffe läßt sich aufgrund des geringen Substanzgehalts an Falterpheromonen meist nur indirekt, d. h. durch Testung der biologischen Wirksamkeit der Antipoden bestimmen. Mit entsprechenden Synthesen sind wir beschäftigt.

Dank

Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die Unterstützung dieser Arbeiten.

- Arn H., Toth M. und Priesner E. (1992), List of Sex Pheromones of Lepidoptera and Related Attractants, OILB-SROP/WPRS-IOBC (ed.), 2nd ed., S. 104–106.
- Attygalle A. B., Herrig M., Vostrowsky O. und Bestmann H. J. (1987), Technique for Injecting Intact Glands for Analysis of Sex Pheromones of Lepidoptera by Capillary Gas Chromatography: Reinvestigation of the Pheromone Complex of *Mamestra brassicae*. J. Chem. Ecol. **13**, 1299–1311.
- Bestmann H. J., Haak U., Kern F. und Hölldobler B. (1994a), 2,4-Dimethyl-5-hexanolide, a Trail Pheromone Component of the Carpenter Ant *Camponotus herculeanus* (Hymenoptera: Formicidae, Formicinae). Naturwissenschaften, in Vorbereitung.
- Bestmann H. J., Fett D., Garbe W., Martichonok V. und Vostrowsky O. (1994b), Darstellung deuteriummarkierter Lepidopterenpheromone und Analoges zum Studium der Pheromonbiosynthese. Liebigs Ann. Chem. **1994**, 133–143.
- Bestmann H. J., Kern F., Mineif A., Platz H. und Vostrowsky O. (1992), Der Sexualpheromonkomplex des „Braunen Bären“ *Arctia caja* (Lepidoptera: Arctiidae). Z. Naturforsch. **47c**, 132–135.
- Bierl-Leonhardt B. A., Devilbiss E. D. und Plimmer J. R. (1980), Location of double-bond position in long-chain aldehydes and acetates by mass spectral analysis of epoxide derivatives. J. Chromatographic Sci. **1980**, 364–367.
- Frerot B., Renou M., Malosse C. und Descoins C. (1988), Isolation and identification of the active components of the female Arctiid *Tyria jacobaeae*: biological determination of the absolute configuration of the major component. Entomol. Exp. Appl. **46**, 281–289.
- Schneider D. (1957), Elektrophysiologische Untersuchungen von Chemo- und Mechanorezeptoren der Antenne des Seidenspinners *Bombyx mori* L. Z. vergl. Physiol. **40**, 8–41.
- Struble D. L. und Arn H. (1984), Combined Gas Chromatography and Electroantennogram Recording of Insect Olfactory Responses, in: Techniques in Pheromone Research (Hummel H. E. und Miller T. A., eds.), Springer Verlag, New York, Berlin, Heidelberg, Tokyo, S. 161–178.

