

### Uptake of the Sex Attractant $^3\text{H}$ -Disparlure by Male Gypsy Moth Antennae (*Lymantria dispar*) [= *Porthetria dispar*]

Since the isolation, identification and synthesis<sup>1</sup> of disparlure (*cis*-7,8-epoxy-2-methyloctadecane), the sex pheromone of the female gypsy moth *Lymantria dispar* [= *Porthetria dispar*], it has been shown to be highly active with *L. dispar* and *L. monacha* in field<sup>2,3</sup> and electrophysiological tests (EAG and single cell recording)<sup>2,4,5</sup>. Radiosynthesis<sup>6</sup> of (7,8- $^3\text{H}$ )-*cis*-7,8-epoxy-2-methyloctadecane ( $^3\text{H}$ -disparlure) has permitted us to begin investigations of fundamental physicochemical and biochemical olfactory processes of the pest insect, *L. dispar*, in line with earlier studies on the perception<sup>7-12</sup> and metabolism<sup>8,10,13</sup> of  $^3\text{H}$ -bombykol, the tritiated synthetic sex pheromone<sup>14</sup> of the silkworm *Bombyx mori*.

In this study, batches of 10 antennae from newly emerged adult males of *L. dispar* were exposed for 10 sec to an air stream containing  $^3\text{H}$ -disparlure. Each batch of antennae was incubated with the pheromone for 1, 5, 10 or 30 min and then eluted (10 min) with pentane and sub-

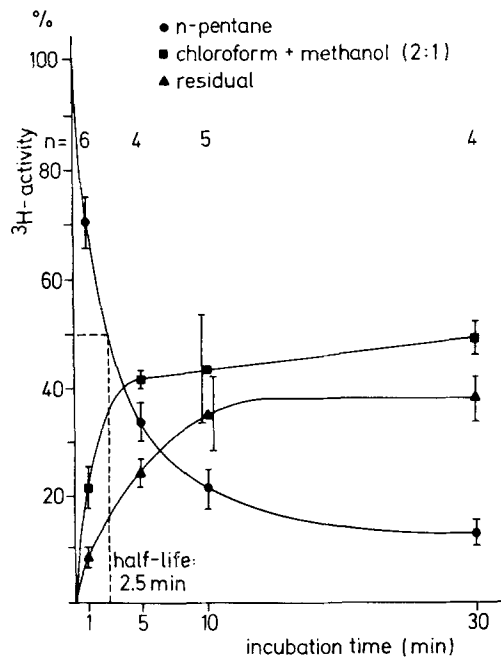
sequently with a mixture of chloroform and methanol (2:1)<sup>12</sup>. Oxidation with perchloric acid and hydrogen peroxide was used to solubilize the remaining radioactive material (residual  $^3\text{H}$ -activity). Partition of the  $^3\text{H}$ -activity among the three fractions was determined by liquid scintillation counting.

The fractional elution and partition show the distribution of  $^3\text{H}$ -activity to be a function of incubation time (Figure). At a concentration of  $5 \times 10^{11}$  disparlure molecules per antenna, an incubation time of about 2.5 min was required for approximately 1/2 of the molecules (half-life) to be retained by the antennae so strongly that it was impossible to recover this  $^3\text{H}$ -activity by elution with pentane. This solvent dissolves only relatively nonpolar compounds and acts only on lipid components of the uppermost layers of the antenna<sup>10</sup>. These results are in good agreement with those obtained in studies on the uptake of  $^3\text{H}$ -bombykol and related compounds<sup>8,10</sup> by *Bombyx* antennae, where under the same conditions used here, a half-life<sup>12</sup> of approximately 2 min was found for bombykol.

With *Bombyx* it was further demonstrated, using highly labeled  $^3\text{H}$ -bombykol and a special microtechnique<sup>11</sup>, that the first step of pheromone uptake is the adsorption of the molecules on the surface of the sensilla, 80-100% of the molecules being adsorbed within 1-2 sec; the molecules then diffuse along the sensilla surface and subsequently penetrate into the antennal branches and stem<sup>12</sup>. After *Lymantria* antennae were incubated for 30 min with  $^3\text{H}$ -disparlure, more than 10% of the  $^3\text{H}$ -activity could still be extracted with pentane (Figure). This indicates that some of the pheromone molecules remained on the surface without being strongly adsorbed and without penetrating into the branches or the stem.

The  $^3\text{H}$ -material eluted after 1, 5, 10, and 30 min was analyzed immediately by thin-layer chromatography<sup>15</sup> and the radiochromatograms showed two radioactive metabolites more polar than  $^3\text{H}$ -disparlure. Our preliminary kinetic investigations indicate that the metabolism of  $^3\text{H}$ -disparlure on *Lymantria* antennae (half-life: 1.4 min) is somewhat faster than that of  $^3\text{H}$ -bombykol (half life: 3.6 min) on *Bombyx* antennae<sup>10,12</sup>.

It is interesting that the synthetic precursor of disparlure, (7,8- $^3\text{H}$ )-7,8-*cis*-2-methyloctadecene, penetrates into *Lymantria* antennae as rapidly (half-life: 2.5 min) as  $^3\text{H}$ -disparlure<sup>16</sup>. On the other hand, the uptake of  $^3\text{H}$ -disparlure and  $^3\text{H}$ -hexadecane by *Bombyx* antennae is several times slower than the uptake of  $^3\text{H}$ -bombykol<sup>16</sup>. Earlier work on the uptake of  $^3\text{H}$ -labeled bombykol,



Fractional elution of  $^3\text{H}$ -activity after incubation of antennae of ♂ *Lymantria dispar* with  $^3\text{H}$ -disparlure. Application:  $5 \times 10^{11}$  molecules per antenna. *n*, number of experiments;  $\bar{x}$ , standard deviation.

<sup>1</sup> B. A. BIERL, M. BEROZA and C. W. COLLIER, *Science* 170, 87 (1970); *J. econ. Ent.* 65, 659 (1972).

<sup>2</sup> V. E. ADLER, M. BEROZA, B. A. BIERL and R. SARMIENTO, *J. econ. Ent.* 65, 679 (1972).

<sup>3</sup> D. SCHNEIDER, R. LANGE, F. SCHWARZ and M. BEROZA, and B. A. BIERL, *Oecologia (Berl.)* 14, 19 (1974).

<sup>4</sup> R. SARMIENTO, M. BEROZA, B. A. BIERL and J. G. R. TARDIF, *J. econ. Ent.* 65, 665 (1972).

<sup>5</sup> D. SCHNEIDER, W. KAFKA and M. BEROZA, unpublished data.

<sup>6</sup> R. E. SHEADS and M. BEROZA, *J. agric. Food Chem.* 21, 751 (1973).

<sup>7</sup> D. SCHNEIDER, G. KASANG and K. E. KAISSLING, *Naturwissenschaften* 55, 395 (1968).

<sup>8</sup> G. KASANG, *Gustation and Olfaction* (Ed. G. OHLOFF; Academic Press, London and New York 1971), p. 245.

<sup>9</sup> K. E. KAISSLING and E. PRIESNER, *Naturwissenschaften* 57, 23 (1970).

<sup>10</sup> G. KASANG and K. E. KAISSLING, *Olfaction and Taste* (Ed. D. SCHNEIDER; Wissenschaftliche Verlagsges., Stuttgart 1972), p. 200.

<sup>11</sup> R. A. STEINBRECHT and G. KASANG, *Olfaction and Taste* (Ed. D. SCHNEIDER; Wissenschaftliche Verlagsges., Stuttgart 1972), p. 193.

<sup>12</sup> G. KASANG, *Naturwissenschaften* 60, 95 (1973).

<sup>13</sup> G. KASANG and N. WEISS, unpublished data.

<sup>14</sup> G. KASANG, *Z. Naturforsch.* 23b, 1331 (1968).

<sup>15</sup> G. KASANG, G. GÖLDNER and N. WEISS, *J. Chromat.* 59, 393 (1971).

<sup>16</sup> G. KASANG, unpublished data.

dihydrobombykol, and 1-hexadecanol by *Bombyx antennae* had indicated that the adsorption, penetration and metabolism of these compounds are relatively unspecific processes compared with the highly specific sensory cell response<sup>10,12</sup>. It is now apparent that the penetration of pheromones and related compounds into insect antennae is more specific than we had believed.

**Zusammenfassung.** Mit radiometrischen Methoden wird an *Lymantria dispar* (= *Porthetria dispar*) und *Bombyx mori* demonstriert, dass die Penetration markierter Pheromon-Moleküle in den Antennen der männlichen Falter spezifischer verläuft, als früher angenommen wurde. <sup>3</sup>H-Disparlure wird auf den Antennen

von *Lymantria dispar* etwas schneller abgebaut als <sup>3</sup>H-Bombykol auf den Antennen von *Bombyx mori*.

G. KASANG, BARBARA KNAUER and M. BEROZA

Max-Planck-Institut für Biochemie  
D-8033 Martinsried/München (Germany);  
and Max-Planck-Institut für Verhaltensphysiologie,  
Seewiesen über Starnberg (Germany); and  
Agricultural Environmental Quality Institute,  
United States Department of Agriculture,  
Agricultural Research Center,  
Beltsville (Maryland 20705, USA),  
11 October 1973.

### Kinetik des Abbaus fester n-Alkane durch *Actinomucor elegans* (CBS 104 29)

Die Möglichkeit aus Rohölen «Single-Cell»-Proteine in Fermentern zu produzieren<sup>1</sup> hat die Diskussion über die Abbaumechanismen von n-Alkanen auf flüssig-flüssig-Systeme versteift. Dies hat zur Folge, dass sich die meisten Autoren auf Kettenlängen bis C<sub>18</sub> beschränken müssen; länger-kettige Paraffine fallen bei physiologischen Temperaturen aus und ballen sich zusammen. Auch der Versuch inerte Trägeröle wie Squalan oder Pristan zu verwenden, führte wegen der beschränkten Löslichkeit der n-Paraffine über C<sub>20</sub> nicht weiter<sup>2,3</sup>. Wie aus der Zusammenstellung von STEVENSON<sup>4</sup> über Bodenlipide hervorgeht, sind oekologisch aber gerade die n-Paraffine einer Kettenlänge von über C<sub>20</sub> von Bedeutung. Wir suchten deshalb ein in-vitro-System zur Untersuchung des Abbaus fester n-Alkane.

Obwohl HOPKINS<sup>5</sup> schon 1931 die Verwertung der n-Paraffine bis Triacontan (C<sub>30</sub>) durch *Aspergillus versicolor* demonstrierte, wurden vor allem Bakterien, Schleimpilze und Hefen auf ihre Fähigkeit, n-Alkane als C-Quellen zu verwerten, untersucht<sup>6</sup>. Erst neuere Arbeiten<sup>7-11</sup> befassten sich wieder mit hyphenbildenden Pilzen, doch wird eine Kettenlänge von C<sub>20</sub> als Substrat nicht überschritten.

**Material und Methode.** Wir isolierten *A. elegans* aus Gartenerde und arbeiteten mit dem Stamm CBS 104 29 weiter. Als Inokulum für die Versuche dienten tiefgefrorene Zellen aus Fermenteransätzen. Das Impfgut (40 mg

Trockengewicht) wurde unter eine dünne Schicht homogenen Paraffingemisches, bestehend aus je 0,005 g C<sub>14</sub>, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 28, 32, 36 und Squalan (2, 6, 10, 15, 19, 23-Hexamethyltetracosan) verteilt. Als Kulturgefäße fanden 1-L Fernbachkolben mit je 100 ml Medium nach Munk<sup>2</sup> (ohne Glukose) Verwendung.

Durch Ernte ganzer Kolben, Extraktion des Restsubstrates und gaschromatographische Analyse wurde der Abbau der einzelnen Paraffine im Gemisch verfolgt. (Fractovap GI der Firma Carlo Erba, Glassäule 1 m lang, 3 mm Querschnitt; Chromosorb G, SE 52 1%; Temperaturprogramm 80–300°C, 7°C/min).

Die Auswertung der Chromatogramme erfolgte durch Messung der Spitzenhöhe. Der Abbau wurde als Bruchteil von Hexatriacontan errechnet. Squalan wird durch *A. elegans* abgebaut und eignet sich als Bezugsgrösse deshalb nicht.

**Resultate und Diskussion.** Durch *A. elegans* werden im Bereiche der Kettenlängen von C<sub>14</sub> bis C<sub>32</sub> die kürzeren n-Alkane aus einem homogenen Gemisch bevorzugt abgebaut (Figur 1). Über der Kettenlänge C<sub>28</sub> nimmt das Paraffinaufnahme- und/oder -abbauvermögen rasch ab. Figur 2 wurde unmittelbar aus der Kurvenschar der Figur 1 gelesen. Mit den Kettenlängen C<sub>14</sub> bis C<sub>18</sub> schliesst die Kurve an die Befunde von GOMA<sup>12</sup> an, welche an *Candida lipolytica* in Fermentern gewonnen wurden. Auch wir erhalten mit *A. elegans* in Oberflächenkulturen einen «Plafond» der Zeit bis zum 50%-Abbau über die Kettenlängen C<sub>14</sub>-C<sub>18</sub>, zeigen aber, dass sich die Werte nach Octadecan wieder vergrössern. Den Knick zwischen C<sub>18</sub> und C<sub>19</sub> und die neue «Terrasse» von C<sub>21</sub> bis C<sub>25</sub> interpretieren wir als neues Paraffinaufnahme- und/oder Paraffinoxidationssystem. Den drei Abbausystemen nach

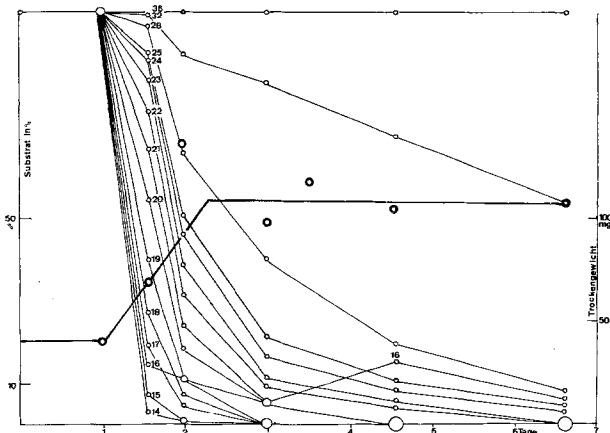


Fig. 1. Abnahme von n-Alkanen aus einem homogenen Gemisch und Zunahme des Trockengewichtes bei Inkubation mit *A. elegans*. Die Längen der Kohlenstoffkette sind als Zahlen eingetragen (Beispiel: 14 = Tetradecan).

- 1 A. CHAMPAGNAT, Nature Lond. 197, 13 (1963).
- 2 V. MUNK, O. VOLFOVA, M. DOSTALEK, J. MOSTECKY und K. PECKA, Folia microbiol. Praha 14, 334 (1969).
- 3 M. J. JOHNSON, Chemy Ind. 5, 1532 (1964).
- 4 F. J. STEVENSON, J. Am. Oil. Chem. Soc. 43, 203 (1966).
- 5 S. J. HOPKINS und A. CH. CHIBNALL, Biochem. J. 26, 133 (1932).
- 6 G. W. FUHS, Arch. Microbiol. 39, 374 (1961).
- 7 C. E. LOWERY, J. W. FOSTER und P. JURTSCHUK: Arch. Mikrobiol. 60, 246 (1968).
- 8 B. F. PELZ und H. J. REHM, Arch. Mikrobiol. 84, 20 (1972).
- 9 B. F. PELZ und H. J. REHM, Arch. Mikrobiol. 92, 153 (1973).
- 10 J. J. PERRY und C. E. CERNIGLIA, J. gen. appl. Microbiol. 19, 151 (1973).
- 11 S. I. NOVIKOVA, A. A. BONDARCHUK, E. Z. KOVAL' und G. D. VASILENKO, Mikrobiol. Mosk. 38, 270 (1969).
- 12 G. GOMA, A. PAREILLEUX und G. DURAND, Arch. Mikrobiol. 88, 97 (1973).