

Feromonen: de chemische taal van insecten

Feromonen kunnen van groot belang zijn bij de ontwikkeling van milieusparende selectieve bestrijdingsmethoden voor insectenplagen. Omdat deze signaalstoffen in uiterst kleine concentraties door insecten worden afgescheiden, vergen de isolatie en de structuuropheldering ervan zeer verfijnde analytische en biologische technieken. De structuur van het sexferomoon van de Amerikaanse kakkerlak was bijvoorbeeld jarenlang een twistpunt, dat nu opgehelderd is. Ook blijken veel feromonen in tegenstelling tot wat men vroeger dacht, geen enkelvoudige stoffen te zijn maar mengsels van veelal zéér verwante verbindingen, zoals isomeren.

Reeds lang is bekend, dat dieren bepaalde stoffen afscheiden met het doel bepaalde informatie door te geven aan soortgenoten. Deze stoffen noemt men feromonen. Zij veroorzaken bij de ontvanger van de informatie een zeer specifieke reactie. Afhankelijk van de aard van deze reactie onderscheiden we onder andere:

- sexferomonen, die het tot elkaar brengen van de verschillende sexen tot doel hebben
- aggregatieferomonen, die het markeren van verzamelplaatsen, geschikt voor schuilen, copuleren en eiafzetting tot doel hebben
- alarmferomonen, die soortgenoten attent maken op naderend gevaar
- spoorvolgerferomonen, die de weg markeren tussen het nest en een voedselbron.

Het Centraal Laboratorium TNO te Delft, in samenwerking met het Laboratorium voor Insecticidenonderzoek te Wageningen,



Dr. Ir. C. J. Persoons en Dr. F. J. Ritter zullen binnenkort de Koninklijke Shell-prijs 1978 op het gebied van de exacte wetenschappen ontvangen voor hun feromoononderzoek. Op de foto toont Ritter (links) een pot met kakkerlakken, waar Persoons wat lucht met een zweem van sexferomoon inblaast. (Foto: Holland Herald)

C. J. Persoons studeerde aan de LH te Wageningen Plantenziektenkunde met als hoofdvak entomologie, bijvakken virologie, organische chemie en biochemie. Hij was van 1964-1967 werkzaam in Oeganda bij een FAO project ter bestrijding van de slaapziekte. Sinds 1967 is hij in dienst van de Nijverheidsorganisatie TNO (Hoofdafdeling Maatschappelijke Technologie TNO-Delft) als medewerker bij de Werkgroep Biochemie. Hij promoveerde in 1977 te Wageningen op een proefschrift getiteld: 'Structure elucidation of some insect pheromones'.

F. J. Ritter studeerde wis- en natuurkunde aan de RU te Utrecht. Organische chemie als hoofdvak en plantenfysiologie als bijvak. Hij promoveerde in 1956 te Delft op een proefschrift getiteld: 'Improvement of low-temperature properties of natural rubber by thiol acids'. Als postdoctoral fellow was hij een jaar werkzaam aan de Harvard University (Prof. Bloch). Sinds 1956 is hij in dienst van de Nijverheidsorganisatie TNO, momenteel als leider van de Werkgroep Biochemie.

houdt zich sinds een tiental jaren bezig met onderzoek op het gebied van bovenstaande groepen van feromonen, op grond van het feit, dat zij van groot belang kunnen zijn bij de ontwikkeling van milieusparende selectieve bestrijdingsmethoden voor insectenplagen. Dit onderzoek heeft chemische, biologische, landbouwtechnische, economische en milieutechnische aspecten. In dit artikel beperken we ons tot beschrijving van isolatie, identificatie en toepassingsmogelijkheden van enkele van de door ons onderzochte feromonen. Met name zullen we die bespreken, waarvan de structuuropheldering tot een wijziging van bestaande wetenschappelijke inzichten of herziening van eerder gepubliceerde structuurformules heeft geleid.

Isolatie en identificatie van feromonen

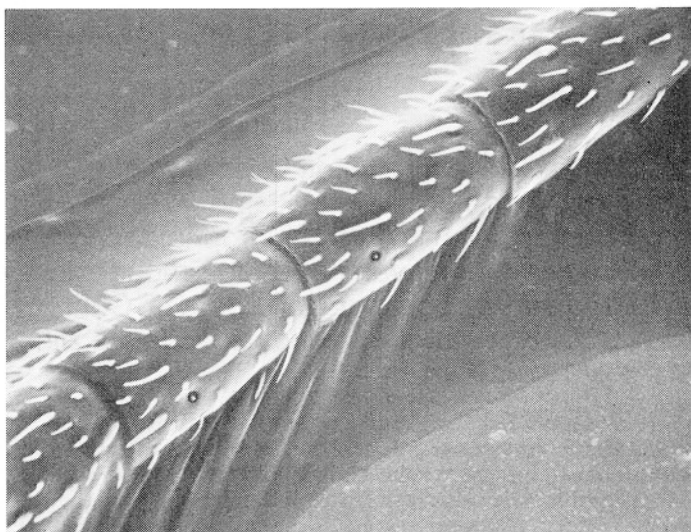
Uit lucht, die geleid is over levende insecten, kan men door absorptie van het feromoon op een vaste drager een redelijk zuiver feromoonconcentraat krijgen. Het duurt vaak lang voordat men op deze manier voldoende materiaal voor structuuridentificatie verzameld heeft. Daarom worden meestal de insecten zelf, of gedeelten van insecten waarin het feromoon bij voorkeur verwacht wordt, geëxtraheerd (1). Toch zijn dan nog vaak duizenden dieren nodig om voldoende materiaal te verzamelen.

Als leidraad bij de isolatie is een biologische toets noodzakelijk. Hiervoor worden twee technieken toegepast:

Gedragstoets. De afzonderlijke fracties worden hierbij met de betreffende dieren getoetst en de reacties bekeken. Aangezien vele insecten alleen gedurende enkele nachtelijke uren actief zijn, stuit dit bij deze dieren op praktische bezwaren. Bovendien is deze toets moeilijk te kwantificeren. Wel is deze toets beslissend en daarom onontbeerlijk.

Electroantennografie (EAG). Lucht wordt na leiden over de te onderzoeken fracties langs een antenne van het betreffende insect geleid. Wanneer de receptorcellen op de antenne door een feromoon getroffen worden veroorzaakt dit een verandering in het potentiaalverschil tussen top en basis van deze antenne. Figuur 1 geeft een gaschromatogram van een extract van een groot aantal feromoonklieren van een insect. Daarbij is naast de vlamionisatie ook de EAG als detector gebruikt. Laatstgenoemde reageert slechts op één component van het onderhavige mengsel. Het gebeurt vaak dat een verbinding wél een EAG-reactie vertoont, maar in de gedragstoets inactief is.

Na een eindzuivering met vloeistof- en/of gaschromatografie kan begonnen worden met de structuuropheldering. Wij gebruiken hiervoor een combinatie van een groot aantal microtechnieken, zoals hydrogenering, ozonolyse, reactie-gaschromatografie, massaspectrometrie, infraroodspectrometrie en kernspinresonantie spectrometrie. Dank zij de verbeterde analytische apparatuur kan met een geringe hoeveelheid moeizaam verkregen feromoon volstaan worden. Het is van groot belang gebleken om niet alleen de structuurformule maar ook de juiste ruimtelijke structuur van het feromoon vast te stellen. Het uiteindelijke structuurbewijs moet geleverd worden door vergelijking van chemische, fysische en biologische eigenschappen van het synthetisch product met die van de natuurstof.



DEEL VAN DE ANTENNE van een mannelijke faraomier. Opvallend is het grote verschil in lengte en vorm van op de antenne voorkomende receptoren. (REM-opname TNO Delft, 500x)

Sexferomonen van insecten die tot dezelfde familie behoren zijn vaak chemisch sterk verwant. Dit is bijvoorbeeld het geval bij die van de familie der bladrollers. De structuur van de sexferomonen van een groot aantal bladrollers is bekend en dit heeft het mogelijk gemaakt vele analoga te synthetiseren. Screening van deze analoga m.b.v. EAG geeft vaak al een aanwijzing omtrent de aard van het feromoon. Naast de eerder genoemde toepassing is deze techniek dan ook bij de structuuropheldering van feromonen als eerste oriëntatie van groot nut gebleken.

De molecuulstructuur van feromonen

Het zou te ver voeren om in dit kader de chemische samenstelling van alle bekende feromonen te bespreken. Daarom zal worden volstaan met het geven van een aantal voorbeelden van verbindingen die als feromoon representatief zijn voor bepaalde insectenordes.

Sexferomonen van vlinders De meeste nu bekende sexferomonen zijn van deze insectengroep. In het algemeen zijn het aldehyden, of primaire alcoholen (vaak als acetaat) met een onvertakte alkylgroep, die meestal 1 of 2 dubbele bindingen bevat. Het aantal koolstofatomen varieert van 10 tot 18, en is meestal even. De stereochemische structuur is specifiek. Tot 1971 meende men dat insectenferomonen als regel, evenals hormonen, enkelvoudige verbindingen zijn. Wij vonden toen dat het sexferomoon van de bladroller *Adoxophyes orana* uit twee isomeren bestaat (2)! Dit waren positionele isomeren, slechts verschillend in de plaats van een dubbele binding. Zeer onverwacht was, dat beide componenten in gedragstoetsen afzonderlijk inactief zijn, hoewel zij beide een duidelijk signaal geven bij electronantennografie. Dit was het eerste voorbeeld van een dergelijk synergisme tussen isomere componenten van een feromoon, een verschijnsel dat sedertdien eerder regel dan uitzondering bleek te zijn.

De grafiek van de biologische activiteit, uitgezet tegen de samenstelling vertoont een scherp maximum. Het feromoon is dus niet alleen gekarakteriseerd door de molecuulstructuur van de twee componenten, maar ook door hun mengverhouding. Dat de twee componenten als zodanig niet specifiek voor de soort zijn, bleek na identificatie van het sexferomoon van de verwante bladroller *Clepsis spectrana* (2). De componenten zijn dezelfde, maar de verhouding is geheel anders. Lange tijd was het ook een algemeen verbreide opvatting, dat als een feromoon een cis-dubbele binding bevatte, het trans-isomeer een feromeenremmer moest zijn (en omgekeerd).

In 1974 ontdekten wij echter, dat het sexferomoon van de bladroller *Archips podana* (2) een mengsel van cis-11 en trans-11-tetradecenyl acetaat is. Hier werken cis en trans elkaar niet tegen, maar kunnen elkaar zelfs niet missen! In figuur 2 zijn

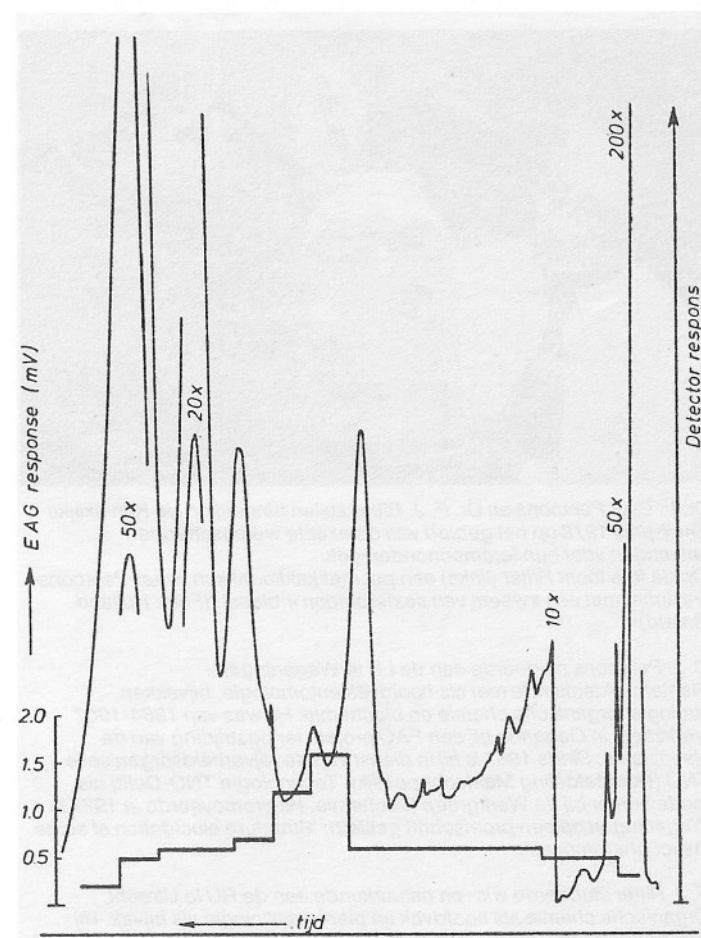
voor verschillende vlindersoorten de vangsten in sexvallen uitgezet tegen de mengverhouding van de desbetreffende feromooncomponenten (1-2). Het blijkt, dat sommige grafieken een scherp maximum bezitten, terwijl andere een tamelijk breed plateau vertonen.

Het enige bekende sexferomoon, dat uit een oneven aantal koolstofatomen bestaat, is het sexferomoon van het aardappelmotje, *Phthorimeae operculella*. Hiervan konden wij de samenstelling ophelderen. Het is een mengsel van trans-4, cis-7-tridecadienyl acetaat en trans-4, cis-7, cis-10-tridecatrienyl acetaat (1). Deze laatste verbinding is bovendien het enige bekende sexferomoon met drie C=C-banden.

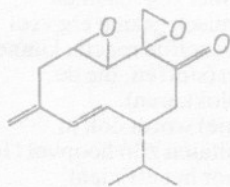
Het sexferomoon van de Amerikaanse kakkerlak. In 1963 beschreven Jacobson en medewerkers de structuuridentificatie van het sexferomoon van dit insect. In 1965 moesten zij deze bewering echter herroepen op grond van biologische inactiviteit van het volgens hun formule gesynthetiseerde product. Het duurde tot 1976 alvorens wij een nieuwe structuur voor dit feromoon (periplanon-B) publiceerden (3). Het was één van de twee verbindingen, waarvan wij in 1974 de isolatie en elementairformules ($C_{15}H_{20}O_2$, periplanon-A; $C_{15}H_{20}O_3$, periplanon-b) konden vermelden (4).

Door middel van extractie van faeces en maagdarmanalen, verzameld van vele tienduizenden maagdelijke wijfjes over een periode van 5 tot 6 jaar, waren wij in staat ca. 250 µg zuiver periplanon-B te isoleren.

Met behulp van diverse analytische technieken (onder andere gaschromatografie/massaspectrometrie, infrarood spectrometrie, kernspinresonantie spectrometrie) kon de structuur van periplanon-B bepaald worden (1); de preciese localisering van de diverse substituenten rond de cyclodeceenring kostte de meeste moeite.



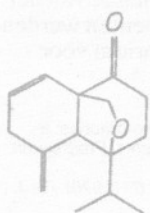
GASCHROMATOGRAM van een ruw extract van een bladroller. Hoewel het mengsel uit vele componenten bestaat, reageert de EAG-detector slechts op één bepaalde verbinding in het chromatogram. (Figuur 1)



Structuur van periplanon-B

Afgezien van de stereochemie kon de juistheid van bovengenoemde structuur reeds bevestigd worden door synthese. De door ons geïdentificeerde verbinding vertoont geen enkele gelijkenis met de door Jacobson en medewerkers beschreven verbinding.

Behalve deze verbinding konden wij uit faeces nog ca. 30 μg van een tweede biologisch actieve verbinding isoleren (periplanon-A). Deze verbinding bleek echter snel te isomeriseren tot een biologisch inactief product (5). De structuur hiervan bleek te zijn:



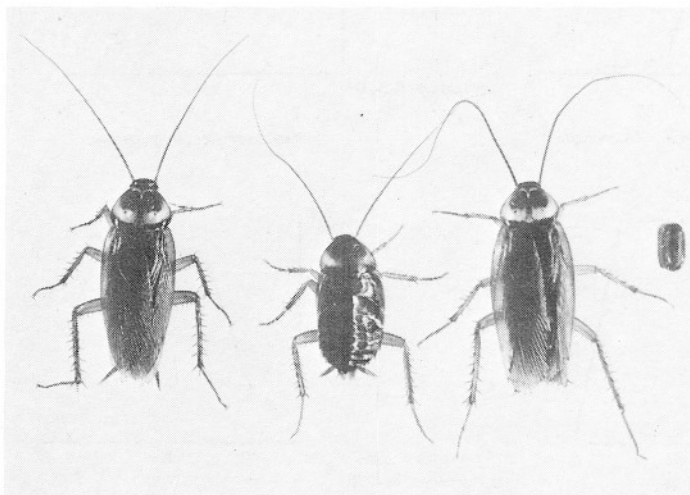
Structuur van het biologisch inactieve isomerisatieproduct van periplanon-A

Het lijkt daarom aannemelijk dat periplanon-A sterk verwant is aan periplanon-B (5). De definitieve structuuropheldering van de eerstgenoemde verbinding is nog onderwerp van studie, terwijl ook de uiteindelijke bevestiging van de structuur door synthese nog gegeven moet worden.

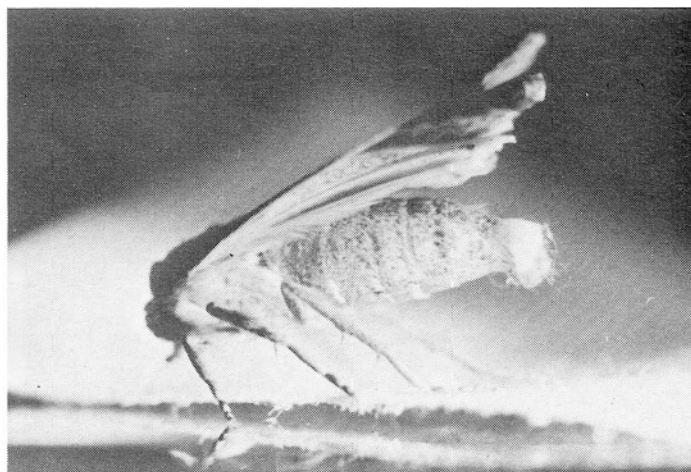
Spoorvolgferomonen. Deze spelen vooral een rol bij de sociale insecten zoals mieren en termieten. Zij markeren de weg tussen nest en voedselbron.

Hoewel de spoorvolgferomonen ook vaak mengsels zijn van meerdere componenten, blijken de afzonderlijke componenten hier vaak wel actief; dit in tegenstelling tot de sexferomonen van vlinders. Chemisch gezien kunnen deze componenten sterk verschillend zijn. Zo bevat het spoorvolgferomoon van de faraomier naast enkele alkaloiden het terpenoid faranal als belangrijkste component (6).

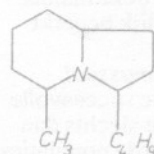
Het terpenoid overtreft verre de spoorvolgactiviteit van de beide alkaloiden: $2 \cdot 10^{-10} \text{ g m}^{-1}$ doet de mieren dit spoor nog volgen; d.w.z. 10 mg zou voldoende zijn om een spoor rond de aarde te kunnen leggen.



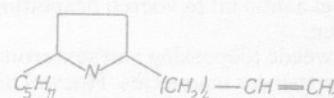
KAKKERLAK. Veel onderzoek is verricht naar de identiteit van het sexferomoon van het hier afgebeelde insect: de Amerikaanse kakkerlak, *Periplaneta americana*. Van links naar rechts: mannetje, nimf, vrouwtje en eipakket. (Foto: TNO, Delft)



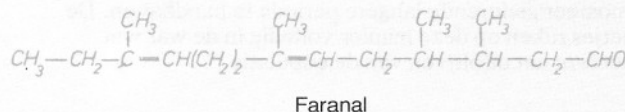
AFSCHEIDING VAN SEXFEROMOON. Vrouwelijk motje *Spodoptera exigua*, in de zogenaamde 'calling position', de periode waarin het sexferomoon wordt afgescheiden. Opvallend is de merkwaardige stand van het motje (deels gestrekte poten en iets opgeheven vleugels). Aan het achterlichaam is nog net een deel van de uitgestulpte klier zichtbaar, waaruit het feromoon vrijkomt. (Foto: TNO, Delft)



Monomorfine I



Monomorfine III



Faranal

Componenten uit het geurspoor van de faraomier

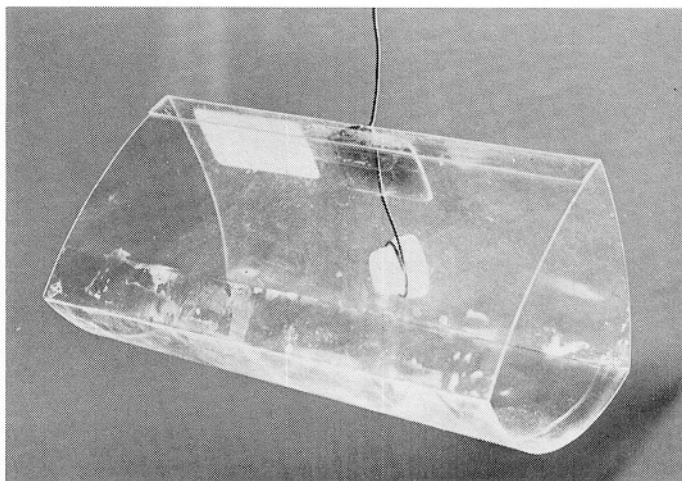
Ook spoorvolgferomonen van termieten kunnen onderling sterk in hun chemische samenstelling verschillen. Een verbinding met uitgesproken spoorvolgeigenschappen is het cis-3, cis-6, trans-8-dodecatrienol, het spoorvolgferomoon van een aantal Reticulitermes-soorten (2).

Bij *R. santonensis* induceert deze verbinding nog spoorvolgging bij $10^{-12} - 10^{-11} \text{ g m}^{-1}$ (dit is ca. 10^8 moleculen per mm^3).

Bij het geslacht *Nasutitermes* is het spoorvolgferomoon een diterpeen met een ring van 14 koolstofatomen (2). Ook bij termieten zijn aanwijzingen gevonden dat spoorvolgferomonen mengsels zijn van meerdere componenten. Soort-specificiteit wordt waarschijnlijk bewerkstelligd door secundaire verbindingen met een grotere vluchtigheid.

De bestrijding van plagen

De huidige toepassing van feromonen in bestaande bestrijdingschema's is vooral gericht op het ontwikkelen van **signaleringsystemen**. Een vroegtijdige waarschuwing dat een insect aanwezig is, is van het grootste belang om een nauwkeurige planning te maken van eventueel uit te voeren chemische bestrijdingen. In Nederland is de bestrijding van de bladrollers *Adoxophyes orana* en *Archips podana* grotendeels gebaseerd op een dergelijk waarschuwingssysteem (7). Hiertoe worden in boomgaarden overal in Nederland zgn. sexvallen opgehangen, waarin een kleine hoeveelheid synthetisch feromoon blijft een dergelijke val enkele maanden attractief. Nadat de eerste mannetjes in een dergelijke val gesignaleerd



SEXVAL zoals die bij het onderzoek van feromonen gebruikt wordt. In de val is in het midden duidelijk het polyethylendopje zichtbaar, waaruit het synthetische feromoon geleidelijk vrijkomt. De wanden van de transparante val worden met lijm gestreken. (Foto: TNO, Delft)

zijn, kan men voldoende nauwkeurig berekenen, wanneer de eerste larven zullen verschijnen. Een bespuiting op dat moment uitgevoerd treft zeer specifiek deze soort (8). Op deze manier kan het aantal uit te voeren bespuitingen aanzienlijk beperkt worden.

Een tweede toepassing van sexferomonen is het *massaal wegvangen* der mannetjes. Hoewel hiervan enkele succesvolle toepassingen vermeld zijn (9) heeft deze methode slechts dan succes wanneer men te maken heeft met geïsoleerde populaties van lage dichtheden.

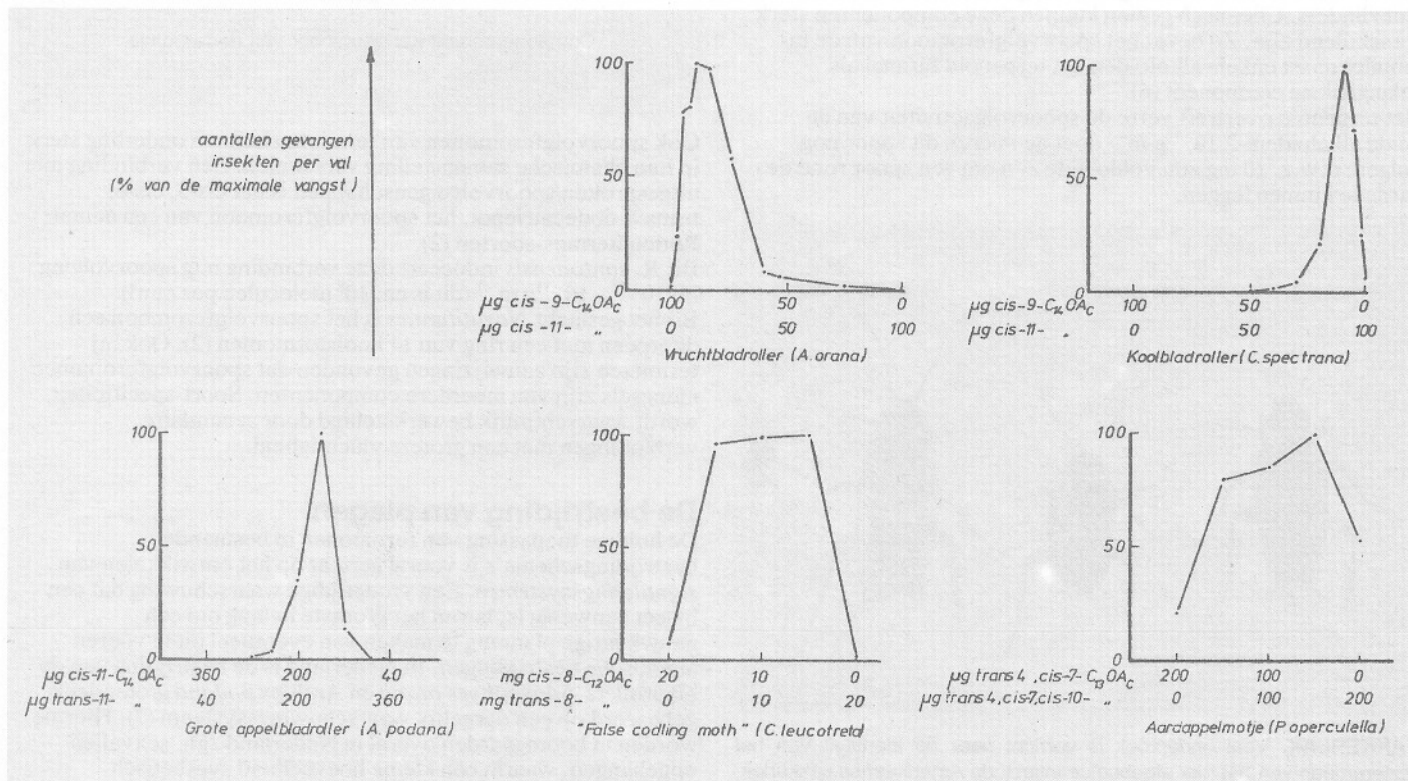
Meer hoopgevend is de zogenaamde *verwarringstechniek*. Hierbij wordt getracht een constant niveau aan sexferomoon in de atmosfeer gedurende langere periode te handhaven. De mannetjes raken op deze manier volledig in de war wat resulteert in het uitblijven van de copulatie.

Hetzelfde effect kan men ook bereiken met zogenaamde para-feromonen (verbindingen, die chemisch gezien erg veel lijken op het natuurlijke feromoon en eenzelfde reactie kunnen opwekken) of met feromoon-inhibitoren (stoffen, die de werking van het natuurlijke feromoon blokkeren).

Deze laatste methode (feromoon-inhibitie) wordt ook in Nederland onderzocht en de eerste resultaten zijn hoopvol (10). Een probleem vormt nog de techniek voor het efficiënt verspreiden van de inhibitor. Momenteel maakt men gebruik van micro-incapsulering in een afbreekbaar polymeer; deze korrels worden in het te behandelen gebied verspreid. Bij de toepassing van de spoorvolgferomonen van mieren en termieten moeten we aan geheel andere technieken denken. Hierbij gaat het primair om het uitroeien van de nesten, waarin de koninginnen zich bevinden. Deze nesten zijn vaak moeilijk op te sporen en slecht bereikbaar. Met behulp van deze spoorvolgferomonen kan men nu trachten zoveel van een vergiftigd aas door de werkers naar het nest te laten brengen, dat het gehele nest vergiftigd wordt.

Het hier beschreven werk werd uitgevoerd in nauwe samenwerking met de afdeling Analytische Chemie van het Centraal Laboratorium TNO. De veldexperimenten werden uitgevoerd in samenwerking met het Laboratorium voor Insecticidenonderzoek te Wageningen.

1. Persoons, C. J., Structure elucidation of some insect pheromones: a contribution to the development of selective pest control agents. Proefschrift Landbouwhogeschool, Wageningen, Sept. 1977.
2. Ritter, F. J., and Persoons, C. J., Drug Design, Vol. VII, 59 (1976). (E. J. Ariens, Ed.).
3. Persoons, C. J., Verwiel, P. E. J., Ritter, F. J., Talman, E., Nooijen, P. E. J., and Nooijen, W. J., Tetrahedron Letters **24**, 2055 (1976).
4. Persoons, C. J., Ritter, F. J., and Lichtendonk, W. J., Proc. Koninkl. Ned. Acad. Wetensch. **77** (2), 201 (1974).
5. Talman, E., Verwiel, P. E. J., Ritter, F. J., and Persoons, C. J., Proc. Int. Mass Spectrometry Symp. on Natural Products, Rehovot, Israel, August 1977 (to be published in Israel J. Chem.).
6. Ritter, F. J., Brüggemann-Rotgans, I. E. M., Verwiel, P. E. J., Persoons, C. J., and Talman, E., Tetrahedron Letters **30**, 2617 (1977).
7. Brader, L., C. R. 5th Symp. Lutte Intégrée en Vergers, Bolzano, O.I.L.B./S.R.O.P. **9**, (1975).
8. Minks, A. K., and de Jong, D. J., J. Ec. Entomol. **68**, 729 (1975).
9. Boness, von, M., Z. ang. Ent. **82**, 104 (1976).
10. Minks, A. K., Voerman, S. and Klun, J. A., Ent. Exp. & Appl. **20**, 163 (1976).



VANGCURVEN van verschillende vlinders, waarvan de feromoonstelling werd bepaald op het Centraal Laboratorium TNO te Delft. (Figuur 2)