

umgesetzt und letzteres dem Hypojoditabbau zu Jodoform (C-Atome 8 + 9) unterworfen⁸. Die Resultate sind in der Tabelle zusammengestellt.

Verteilung der Radioaktivität im Cantharidin in % der Gesamtaktivität

	¹⁴ C-1-Acetat-Experiment	¹⁴ C-2-Mevalonat-Experiment
Cantharidin	100	100
C-Atome 2 + 8 + 3 + 9	67	18
C-Atome 2 + 3	66	< 1
C-Atome 8 + 9	< 1	17
C-Atome 10 + 11	< 1	20

Würde das Cantharidin durch eine Schwanz-Schwanz-Verknüpfung von 2 Isopreneinheiten aufgebaut werden, so müsste das Cantharidin aus dem Acetat-Experiment je die Hälfte der Aktivität in den Atomen 2 + 3 und 5 + 6 enthalten; beim Mevalonat-Experiment müsste die gesamte Aktivität in den C-Atomen 8 + 9 und/oder 10 + 11 lokalisiert sein. Die experimentellen Befunde zeigen, dass dieses Aufbauprinzip nicht befolgt wird.

Die im Mevalonat-Experiment in den Atomen 8–11 gefundene Aktivität von ca. $\frac{1}{3}$ lässt vermuten, dass am Cantharidinaufbau 3 Isopreneinheiten beteiligt sind.

Für die weitere Abklärung der offenbar recht komplizierten Biosynthese wurde ein Abbauweg ausgearbeitet,

der es erlauben wird, die Aktivität aller 10 C-Atome des Cantharidins einzeln zu bestimmen. Ferner erwies es sich als notwendig, eine Zuchtmethode für *L. vesicatoria* zu finden, worüber in einer weiteren Mitteilung berichtet wird⁹.

Summary. In contrast to the female, the adult males of *Lytta vesicatoria* (Coleopt. Meloidae) produced radioactive cantharidine on injection with ¹⁴C-1-acetate and ¹⁴C-2-mevalonate solutions. A partial degradation of the cantharidine showed that in the acetate experiment approximately $\frac{2}{3}$ of the activity occurred at C atoms 2 + 3 whereas with mevalonate approximately $\frac{1}{3}$ of the activity was at C atoms 8 + 9 and $\frac{1}{8}$ at C atoms 10 + 11. These results show that cantharidine is not formed by a tail to tail linkage of 2 isoprene units.

CH. SCHLATTER, E. E. WALDNER
und H. SCHMID¹⁰

Organisch-Chemisches Institut der Universität Zürich
(Schweiz), 27. Juni 1968.

⁸ Die Methode wurde mit Lithium-¹⁴C-1-acetat getestet.

⁹ D. MEYER-GRASSMANN, CH. SCHLATTER, I. SCHLATTER-LANZ, H. SCHMID und P. BOVEY, *Experientia* 24, 995 (1968).

¹⁰ Wir danken dem Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung für die Unterstützung dieser Arbeit, Herrn Dr. J. WÜRSCH (Physikalisch-chemische Abteilung der Firma F. Hoffmann-La Roche & Co. AG, Basel) für ¹⁴C-2-Mevalolacton und unserer mikroanalytischen Abteilung (Leitung H. FROHOFER) für die Aktivitätsbestimmungen.

Die Zucht von *Lytta vesicatoria*¹ im Laboratorium und Nachweis der Cantharidinsynthese in Larven

Nach Injektion von Natrium-¹⁴C-2-mevalonat und Natrium-¹⁴C-1-acetat in Adulttiere von *Lytta vesicatoria* (L.)² wurde gefunden, dass nur die Männchen diese Substanzen in messbarer Menge für den Aufbau von Cantharidin verwenden³. Wir dürfen deshalb annehmen, dass die adulten Weibchen kein Cantharidin synthetisieren. Trotzdem beträgt ihr Gehalt an Cantharidin 0,5–1% des Trockengewichts. Um zu prüfen, ob die Tiere die Substanz schon als Larven synthetisieren, war es nötig, eine geeignete Zuchtmethode zu finden.

Entwicklungsweise der Meloiden. Die Larven der Meloiden leben, soweit dies bekannt ist, als Parasiten in Brutnestern von Solitärbiene^{4–8} (Hym. Apidae), der Grabwespe *Tachytes*⁸ (Hym., Sphecidae) oder in Eigelegen von Feldheuschrecken^{7,9} (Orth., Acrididae). Da die adulten Weibchen ihre Eier nie direkt an den Entwicklungsort der Nachkommen ablegen, müssen diese nach dem Schlüpfen aus dem Ei ihre Nahrung selber suchen^{5,7,9} oder sich von Solitärbiene^{4,7} weibchen in deren Nest transportieren lassen.

Bei allen untersuchten Arten von Meloiden wurde eine Hypermetamorphose¹⁰, das heisst das Auftreten verschiedenartiger Larvenformen im Laufe der ontogenetischen Entwicklung, festgestellt.

Bei *L. vesicatoria* ist die erste Form, die *Triungulinus*-Larve (Figuren 1 und 2) sehr beweglich und sucht aktiv ihre Nahrung, das Ei und den Pollenvorrat in einer Brutzelle der Biene *Colletes*⁵. Die zweite Form (Figur 3) ist dem Leben in der Brutzelle besonders angepasst und vermag

im Gegensatz zur ersten auf einem Honig-Pollen-Gemisch zu schwimmen. Nach 4 Häutungen verlässt die Larve das Wirtsnest und baut im Boden eine Transformationskammer, wo die dritte Form, die unbewegliche, stark sklerotinierte *Pseudochrysalis*¹⁰ (Figur 4) auftritt. Diese überwintert und häutet sich zur vierten Form (Figur 5), die der zweiten gleicht, aber keine Nahrung zu sich nimmt. Es folgt die Häutung zur Puppe und von der Puppe zur Imago. Die Imagines verlassen den Boden im Mai oder Juni und leben in Gruppen auf Oleaceen, deren Blätter sie fressen⁵.

¹ *Coleoptera, Meloidae*.

² Gesammelt in Sizilien, Palermo, 20. Mai 1967. Wir danken Prof. G. LIOTTA, Palermo, für seine Hilfe bei der Beschaffung der Käfer.

³ CH. SCHLATTER, E. WALDNER und H. SCHMID, *Experientia* 24, 994 (1968).

⁴ G. NEWPORT, *Trans. Linn. Soc. Lond.* 20, 297 (1851). – J. FABRE, *Annls Sci. nat. Zool.* 7, 299 (1857). – J. FABRE, *Annls Sci. nat. Zool.* 9, 264 (1858). – A. CROS, *Annls Sci. nat. Zool.* 14, 189 (1931). – B. HOCKING, *Can. Ent.* 81, 61 (1949).

⁵ H. BEAUREGARD, in *Les Insectes Vésicants* (Ed. Felix Alcan, Paris 1890).

⁶ J. FABRE, in *Souvenirs Entomologiques*, 3e Sér. (Libr. Delagrave, Paris 1890).

⁷ Literaturübersicht in G. PAOLI, *Memorie Soc. ent. ital.* 16, 71 (1937).

⁸ R. SELANDER, *Illinois biol. Monogr.* 28, 1 (1960).

⁹ W. HORSFALL, *Ann. ent. Soc. Am.* 34, 114 (1941).

¹⁰ Der Terminus stammt von J. FABRE (1857)⁴.

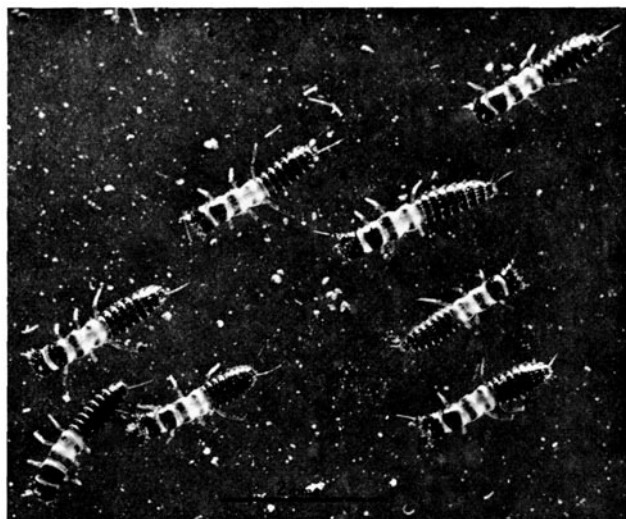


Fig. 1. Erstes Larvenstadium (*Triungulinus*-Larven).

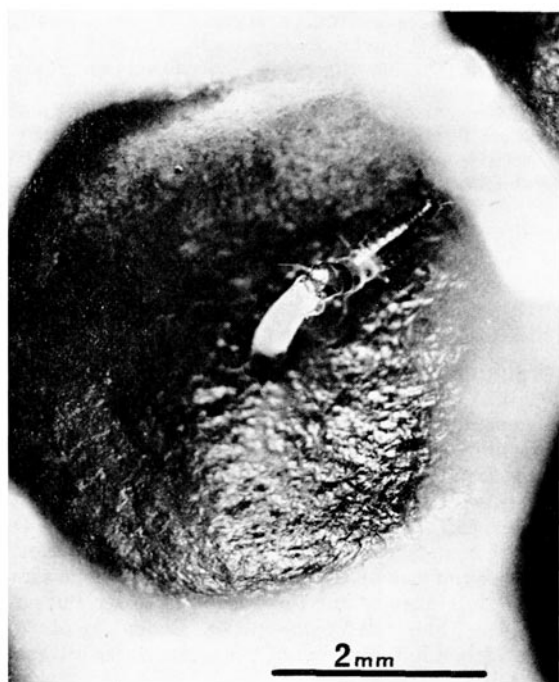


Fig. 2. Erstes Larvenstadium (*Triungulinus*-Larve). Das Tier frisst ein Ei im Innern einer Wabenzelle.

Viele Autoren versuchten, Meloiden zu züchten^{5,8,9,11-14}. Ein Züchterfolg vom Ei bis zum Adulttier war unseres Wissens nur in den wenigen Fällen möglich, bei welchen es gelang, sehr natürliche Lebensbedingungen zu schaffen,

¹¹ Verschiedene Autoren, erwähnt in H. BEAUREGARD (1890)⁵.

¹² A. CROS (1912-1929), die einzelnen Arbeiten sind in G. PAOLI (1937)⁷ zusammengestellt. - A. NAGATOMI, Jap. J. appl. Ent. Zool. 11, 62 (1967), zit. nach Rev. appl. Ent., Ser. A 55, 639 (1967).

¹³ Verschiedene Autoren, zit. in R. SELANDER (1960)⁸.

¹⁴ J. LICHENSTEIN, C. r. hebdom. Séanc. Acad. Sci., Paris, 85, 628 (1877).

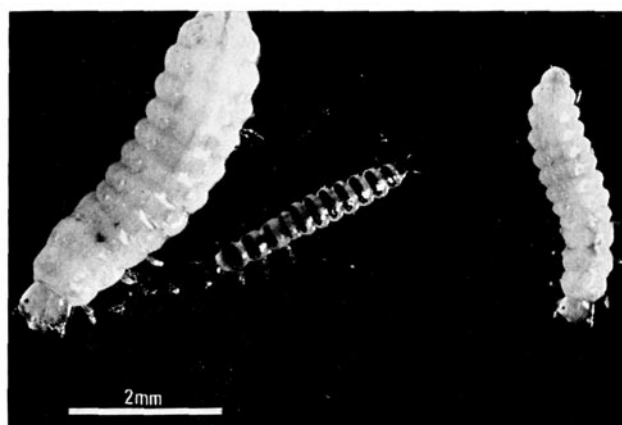


Fig. 3. Mitte: Erstes Larvenstadium (*Triungulinus*-Larve nach der Nahrungsaufnahme). Links: Zweites Larvenstadium (zweite Larvenform); rechts: Drittes Larvenstadium (zweite Larvenform).

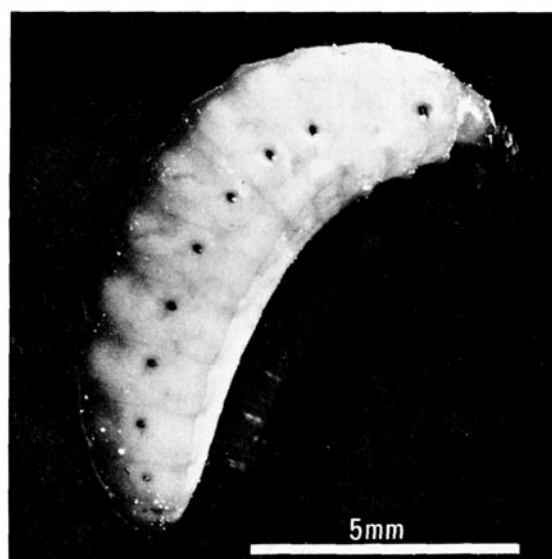


Fig. 4. Sechstes Larvenstadium (*Pseudochrysalis*).

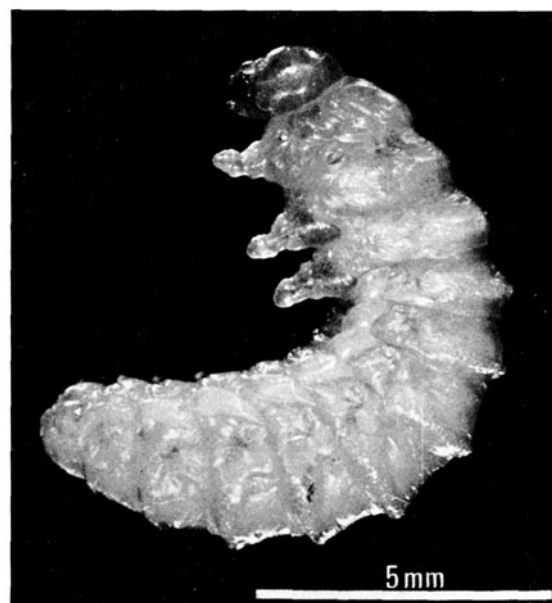


Fig. 5. Siebtes Larvenstadium (vierte Larvenform).

indem den Tieren ausgegrabene Nester von Solitärbiene oder, bei bestimmten Arten, Heuschrecken-Eigelege angeboten wurden ^{5,8,9,12}.

Bei *L. vesicatoria* zeitigten Zuchtversuche verschiedener Autoren ^{5,11} wenig erfolgversprechende Resultate. Am meisten erreichten LICHTENSTEIN ¹⁴ und BEAUREGARD ⁵, denen die Aufzucht eines einzelnen Tieres im Laboratorium mittels ausgegrabener, frischer Solitärbiennester glückte.

Wir suchten eine Methode, die es erlauben sollte, den Käfern sowohl ein Bienenei und das Honig-Pollen-Gemisch als auch die ihnen zusagende Umgebung auf einfachere Weise zu bieten.

Zuchtmethode. Waben der Honigbiene, *Apis mellifica* L., deren Zellen von der Königin frisch mit Eiern versehen worden waren, bestrichen wir beidseitig mit einem Gemisch aus flüssigem Bienenhonig und Pollen ¹⁵; dabei wurden nur die Ränder der Wabenzellen benetzt, das Innere der Zellen blieb jedoch trocken. Die mindestens einen Tag alten *Triungulinus*-Larven (Figur 1) wurden in die Zellen der waagrecht liegenden Waben gesetzt. Der Honigrand machte den Tieren das Entweichen unmöglich. Die Waben bewahrten wir bei 20° und 90% Feuchtigkeit einige Tage im Dunkeln auf. 134 von insgesamt 650 Larven begannen, das Bienenei oder das Honig-Pollen-Gemisch zu verzehren (Figur 2) und häuteten sich nach 7 ± 4 Tagen

zu einer Larvenform vom zweiten (scarabaeoiden) Typ (Figur 3). Diese setzten wir in Glastuben ein, deren Wände mit Seidenpapier ausgekleidet und die mit knetbarem Honig-Pollen-Gemisch versehen waren. Die Körperstellung der Larven beim Fressen in den Glastuben erlaubte es ihnen, den Kot an die trockene Seidenpapierauskleidung über dem Honig-Pollen-Gemisch zu heften. In der Zeit von 15 ± 2 Tagen häuteten sie sich dreimal. Die Unterscheidung der einzelnen Larvenstadien ist mit Hilfe von Messungen der Kopfkapselbreite möglich (Tabelle I). Den Larven des fünften Stadiums gaben wir Gelegenheit, sich in einem halbtrockenen, pulverisierten Lehm Boden einzugraben und die Transformationskammer zu bauen. Dort häuteten sich 102 der anfänglich angesetzten Larven zur *Pseudochrysalis* (Figur 4). Diese liessen wir bei 6–10°C und 80% Feuchtigkeit überwintern. 76 der ab Mitte März bei 13°C gehaltenen Larven häuteten sich zur vierten Form (Figur 5), 13 bleiben, voraussichtlich bis zum nächsten Frühling, in Diapause. Damit steht fest, dass *L. vesicatoria* im Gegensatz zu den Aussagen anderer Autoren ^{5,16} nicht 6, sondern 7 Larvenstadien durchläuft.

¹⁵ Aus Pollenvorräten von *A. mellifica* gewonnen.
¹⁶ J. LICHTENSTEIN, J. Pharm. Chim., Paris 30, 245 (1879).

Tabelle I. Kopfkapselbreite der einzelnen Larvenstadien

Larvenform	Larvenstadium	Kopfkapselbreite (μ) m ± s	Extrema	Anzahl gemessener Tiere	Relatives Wachstum der Kopf- kapselbreite
<i>Triungulinus</i> -Larve	L ₁	315 ± 15	290– 345	34	–
Zweite Form	L ₂	430 ± 20	370– 460	32	1,3
Zweite Form	L ₃	690 ± 60	560– 870	48	1,6
Zweite Form	L ₄	1290 ± 120	1060–1560	75	1,8
Zweite Form	L ₅	2110 ± 320	1560–3100	69	1,6
<i>Pseudochrysalis</i>	L ₆	1940 ± 200	1500–2380	68	– 0,9
Vierte Form	L ₇	2250 ± 250	1690–3120	50	1,2

m, Mittelwert; s, Standardabweichung.

Tabelle II. Versuche zum Einbau radioaktiven Acetats in Cantharidin von *Lytta*-Larven

Larven- stadium	Anzahl gemeinsam aufgearbeiteter Larven	In den Larven vorhandene Gesamtaktivität (dpm)	Mit Benzol extrahierbare Aktivität (dpm)	Aktivität im Cantharidin (dpm)	Inkorpora- tionsrate (%)	Bemerkungen
L ₅	1	1,2 × 10 ⁷	3,5 × 10 ⁶	4950	0,05	Larve 16 h nach Injektion gestorben
L ₅	1	4,5 × 10 ⁶	1,5 × 10 ⁶	37 500	0,8	
L ₅	1	8,5 × 10 ⁵	2,0 × 10 ⁵	15 500	1,8	
L ₅	1			5800		
L ₄	1	6,4 × 10 ⁶		1850	0,03	Sehr kleines Exemplar, kurz nach Injektion gestorben
L ₄	1	1,3 × 10 ⁶		400	0,03	
L ₄	1	1,2 × 10 ⁷		1000	0,01	
L ₄	1	2,2 × 10 ⁷		< 250	< 0,001	
L ₂	5	1,2 × 10 ⁶		~ 100	~ 0,01	4 der 5 Tiere kurz nach Injektion gestorben

Synthese des Cantharidins in Larven. In 5 Larven des 2. Stadiums und je 4 Larven des 4. sowie des 5. Stadiums injizierten wir wässrige Natrium- ^{14}C -1-acetat-Lösung. Nach 24 h wurden die Tiere getötet. Die Aufarbeitungsmethode für die Larven des 2. und 4. Stadiums unterschied sich von der bereits beschriebenen⁸ darin, dass die Tiere nach Zugabe von 50 mg inaktiven Cantharidins nicht in Salzsäure, sondern in 2N 80% alkoholischer Natronlauge 30 min unter Stickstoff gekocht wurden; damit wurde erreicht, dass die ebenfalls markierten Fette verseift und das Cantharidin anschliessend durch Extraktion aus sodaalkalischer Lösung von den Fettsäuren getrennt werden konnte.

Aus den in Tabelle II zusammengestellten Resultaten geht hervor, dass alle einzeln untersuchten Larven Cantharidin aufgebaut haben; die Einbaurate variiert allerdings in weiten Grenzen. Da die Wahrscheinlichkeit, dass bei einer Geschlechtsverteilung von 1:1 alle 7 der geprüften Larven Männchen waren (eine bald nach der Injektion gestorbene Larve des 4. Stadiums wird nicht berücksichtigt), nur 0,8% beträgt, ist anzunehmen, dass die Weibchen als Larven Cantharidin synthetisieren. Mit diesen Versuchen ist nicht nachgewiesen, dass die gesamte Cantharidinmenge adulter Weibchen larvaler Herkunft ist. Es wird zu klären sein, ob frischgeschlüpfte Adultweibchen noch Cantharidin bilden können, und ob bei der Kopulation auch Cantharidin vom Männchen auf das Weibchen übertragen wird. Letzteres ist nicht ganz ausgeschlossen, weil die Substanz in den Geschlechtsorganen beider Geschlechter angereichert ist⁵.

Da Cantharidin sowohl in Adultweibchen als auch deren abgelegten Eiern und den daraus schlüpfenden *Triungulinus*-Larven vorkommen soll⁵, wurde bisher angenommen, dass der in den *Triungulinus*-Larven nachgewiesene Stoff mütterlicher Herkunft sei. Dieser Schluss ist nicht

unbedingt gerechtfertigt, da wir mit unseren Versuchen wahrscheinlich machen konnten, dass schon die Larven des 2. Stadiums Cantharidin selber synthetisieren. Die Abklärung der Verhältnisse bei *Triungulinus*-Larven ist uns noch nicht gelungen, da die kleinen, aber stark sklerotisierten Tiere die Injektion nicht überlebten.

Über die biologische Bedeutung des Geschlechtsunterschiedes der Cantharidin-Synthese ist noch nichts bekannt¹⁷.

Summary. Adult males of *Lytta vesicatoria* (Coleopt., Meloidae) synthesize cantharidin, but females do not, although the substance is present in the females too. We developed a method for rearing larvae of this parasitic beetle in the laboratory. It is shown that there exist 7 larval stages and 4 hypermetamorphic forms (*triungulinus*, second larva, *pseudochrysalis* and fourth larva). Larvae from the second to the fifth stage (second larva) synthesize cantharidin. Therefore, we conclude that the substance present in the adult female is at least in part synthesized in the larval period. Nothing is known about the biological significance of this biochemical sexual dimorphism.

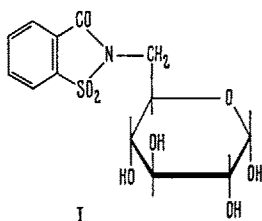
DIETRICH MEYER, CH. SCHLATTER,
I. SCHLATTER-LANZ, H. SCHMID und P. BOVEY

Entomologisches Institut der Eidgenössischen Technischen Hochschule, 8006 Zürich und Organisch-Chemisches Institut der Universität, 8006 Zürich (Schweiz),
27. Juni 1968.

¹⁷ Wir danken dem Schweizerischen Nationalfonds für seine finanzielle Unterstützung.

Synthesis and Taste Properties of an *N*-(Glucose)-saccharin Compound

It is generally concluded that substitution of the imide N-H in the saccharin molecule results in loss of sweetness^{1,2}. The main reason for this might be the loss of water solubility, which would be true for most *N*-substituted derivatives. For instance, *N*-methyl saccharin would not be considered a valid study case, though its tastelessness was recently used³ to suggest that the *N*-methyl prevents approach to the taste receptor site. Substituting a sugar, on the other hand, at the imide nitrogen should give a water-soluble derivative, which might then retain the sweetness of saccharin. Because it was thought that the glucose moiety, in addition to permitting water solubility, might enhance the sweetness or alter the bitter aftertaste of saccharin, these 2 sweetening agents have been combined in a single molecule by the synthesis of 6-deoxy-6-(*o*-sulfobenzimido)-D-glucose (I).



3, 5-*O*-Benzylidene-1, 2-*O*-isopropylidene-6-*O*-*p*-toluenesulfonyl-D-glucopyranose⁴ was treated with sodium saccharin in dimethylformamide at 135° for 19 h. Upon con-

centration and dilution with water, a brown solid was obtained. After chromatography on a silica-gel column (CHCl_3 as eluting solvent) followed by crystallizations from isopropyl alcohol and ethanol, a 29% yield of 3, 5-*O*-benzylidene-6-deoxy-1, 2-*O*-isopropylidene-6-(*o*-sulfobenzimido)-D-glucose⁵ was realized, as a broad-melting but analytically pure powder, $[\alpha]_D^{25} + 38.1^\circ$ (c 0.52, chloroform). The benzylidene and isopropylidene blocking groups were removed by treatment with an acidic ion-exchange resin (Amberlite IR-120H) in 50% ethanol at 60–70°. A 71% yield of crystalline product was obtained, apparently a mixture of anomers of I, m.p. 180–187°, $[\alpha]_D^{25} + 36.3^\circ$ (c 0.97, water) $\rightarrow + 32.7^\circ$ (24 h). Two further recrystallizations from ethanol gave the α -anomer (I) as white needles⁵, m.p. 204.5–206°, $[\alpha]_D^{25} + 42.1^\circ$ (c 0.98, water) $\rightarrow + 32.7^\circ$ (24 h). Water solubility had an upper limit of about 10%.

A 0.01 *M* aqueous solution of the compound was strongly bitter, with no appreciable sweetness, and an unpleasant aftertaste. The strong flavor indicated that there was good interaction of I with the receptor sites, at least with the

¹ G. H. HAMOR, *Science* 134, 1416 (1961).

² R. W. MONCRIEFF, in *The Chemical Senses* (John Wiley and Sons, Inc., New York 1946), p. 277.

³ E. DZENDOLET, *Perception and Psychophysics* 3, 65 (1968).

⁴ E. J. REIST, R. R. SPENCER and B. R. BAKER, *J. Am. chem. Soc.* 82, 2025 (1960).

⁵ Elemental analyses and IR- and NMR-spectra were consistent with the assigned structure.