

(12) Ausschließungspatent

(11) **DD 283 317 A5**



Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz  
der DDR vom 27.10.1983  
in Übereinstimmung mit den entsprechenden  
Festlegungen im Einigungsvertrag

5(51) **A 01 N 37/44**  
**A 01 N 43/36**

DEUTSCHES PATENTAMT

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

---

(21)	DD A 01 N / 325 032 3	(22)	13.01.89	(44)	10.10.90
(31)	144,883	(32)	13.01.88	(33)	US

---

(71) siehe (73)

(72) Rebeiz, Constantin A.; Juvik, John A.; Rebeiz, Carole C., US

(73) THE BOARD OF TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF ILLINOIS, 506 South Wright Street, Urbana, Ill. 61801, US

(74) Patentanwaltsbüro Berlin, Frankfurter Allee 286, Berlin, 1130, DD

---

**(54) Insektizide Zusammensetzungen, Verfahren zur Herstellung derselben und Verfahren zur Bekämpfung von Insekten**

---

(55) insektizide Zusammensetzung; Verfahren; Herstellung; Bekämpfen; Insekten; delta-Aminolävulinsäure; Auslöser; Verstärker; delta-Aminolävulinsäureumwandlung; Tetrapyrrole

(57) Die Einladung betrifft eine insektizide Zusammensetzung, ein Verfahren zur Herstellung derselben und ein Verfahren zum Bekämpfen von Insekten. Die Zusammensetzung enthält eine insektizid wirksame Menge an einer oder mehreren Verbindungen, bestehend aus delta-Aminolävulinsäure, Auslösern der delta-Aminolävulinsäure oder Verstärkern der delta-Aminolävulinsäureumwandlung in Tetrapyrrole.

**Patentansprüche:**

1. Insektizide Zusammensetzung, **gekennzeichnet durch** eine insektizid wirksame Menge an einer oder mehreren Verbindungen, bestehend aus delta-Aminolävulinsäure, Auslösern der delta-Aminolävulinsäure oder Verstärkern der delta-Aminolävulinsäureumwandlung in Tetrapyrrole sowie entsprechende Hilfs- und/oder Trägerstoffe.
2. Zusammensetzung nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß sie delta-Aminolävulinsäure enthält.
3. Zusammensetzung nach Anspruch 1 oder 2, **dadurch gekennzeichnet**, daß sie einen oder mehrere Auslöser von delta-Aminolävulinsäure enthält.
4. Zusammensetzung nach Anspruch 1, 2 oder 3, **dadurch gekennzeichnet**, daß sie einen oder mehrere Verstärker der delta-Aminolävulinsäureumwandlung in Tetrapyrrole enthält.
5. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 4, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Menge der Verbindungen ausreichend ist, etwa 0,25 bis 2 Pound delta-Aminolävulinsäure pro Acre und/oder etwa 0,1 bis 1,5 Pound Auslöser oder Verstärker pro Acre zu liefern.
6. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 5, **dadurch gekennzeichnet**, daß sie einen oder mehrere der folgenden Bestandteile enthält: Trägerstoff(e), Lösungsmittel, Puffer, Netzmittel, Dispergiermittel, Antischaummittel, Emetika, Geruchsmittel, Penetriermittel, oberflächenaktive(s) Mittel, Emulgiermittel, Begleitstoffe, Herbizid(e) und ein oder mehrere andere Insektizid(e).
7. Zusammensetzung nach Anspruch 6, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Verbindungen in einer Lösung enthalten sind, die eine Konzentration von 2 bis etwa 50 mM delta-Aminolävulinsäure und/oder von etwa 0,1 bis etwa 50 mM Auslöser oder Verstärker aufweist.
8. Zusammensetzung nach Anspruch 6, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Verbindungen in einer Zubereitung enthalten sind, die durch Insekten aufgenommen wird, und die Menge der Verbindungen ausreichend ist, etwa 10 Mikrogramm bis etwa 5 Mikrogramm delta-Aminolävulinsäure pro mg Insektenkörpermasse und/oder etwa 1 ng bis etwa 5 Mikrogramm Auslöser oder Verstärker pro mg Insektenkörpermasse zu liefern.
9. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 8, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Zusammensetzung eine oder mehrere der folgenden Verbindungen enthält: delta-Aminolävulinsäure; 2,2'-Dipyridyl; 1,10-Phenanthrolin; 4,7-Dimethyl-1,10-phenanthrolin; 4-Methyl-1,10-phenanthrolin; 5-Nitro-1,10-phenanthrolin; 5-Methyl-1,10-phenanthrolin; 5,6-Dimethyl-1,10-phenanthrolin; 4,7-Diphenyl-1,10-phenanthrolin; 5-Chlor-1,10-phenanthrolin; 3,4,7,8-Tetramethyl-1,10-phenanthrolin; 2,2'-Dithio-bis(pyridin-N-oxid); 4,4'-Dimethyl-2,2'-dipyridyl; Phenyl-2-pyridyl-ketoxim; und 2,2':6',2''-Terpyridin.
10. Verfahren zur Herstellung einer insektiziden Zusammensetzung, **dadurch gekennzeichnet**, daß man zur Formulierung der Zusammensetzung eine oder mehrere der folgenden Verbindungen mit einbezieht: delta-Aminolävulinsäure, Auslöser der delta-Aminolävulinsäure oder Verstärker der delta-Aminolävulinsäure-Umwandlung in Tetrapyrrole.
11. Verfahren nach Anspruch 10, **dadurch gekennzeichnet**, daß man delta-Aminolävulinsäure einsetzt.
12. Verfahren nach Anspruch 10 oder 11, **dadurch gekennzeichnet**, daß man einen oder mehrere Auslöser von delta-Aminolävulinsäure einsetzt.
13. Verfahren nach Anspruch 10, 11 oder 12, **dadurch gekennzeichnet**, daß man einen oder mehrere Verstärker der delta-Aminolävulinsäure-Umwandlung in Tetrapyrrole einsetzt.
14. Verfahren nach einem der Ansprüche 10 bis 13, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Menge der Verbindung ausreichend ist, etwa 0,25 bis 2 Pound delta-Aminolävulinsäure pro Acre und/oder etwa 0,1 bis 1,5 Pound Auslöser oder Verstärker pro Acre zu liefern.
15. Verfahren nach einem der Ansprüche 10 bis 14, **dadurch gekennzeichnet**, daß sie eines oder mehrere der folgenden Mittel enthält: Trägerstoffe, Lösungsmittel, Puffer, Benetzungsmittel, Dispergiermittel, Antischaummittel, Emetika, Geruchsmittel, Penetriermittel, oberflächenaktive Mittel, Emulgiermittel, Adjuvantien, Herbizide und/oder andere Insektizide.
16. Verfahren nach Anspruch 15, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Verbindungen in einer Lösung enthalten sind, die eine Konzentration von etwa 2 bis etwa 50 mM delta-Aminolävulinsäure und/oder von etwa 0,1 bis etwa 50 mM Auslöser oder Verstärker aufweist.
17. Verfahren nach Anspruch 15, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Verbindungen in einer Zubereitung enthalten sind, die von Insekten aufgenommen wird und die Menge der Verbindungen ausreichend ist, etwa 10 Mikrogramm bis etwa 5 Mikrogramm delta-

Aminolävulinsäure pro mg Insektenkörpermasse und/oder etwa 1 ng bis etwa 5 Mikrogramm Auslöser oder Verstärker pro mg Insektenkörpermasse zu liefern.

18. Verfahren zum Bekämpfen von Insekten durch Hervorrufen des Umlaufes von Tetrapyrrolen in lebenden Insekten bzw. durch Töten von Insekten, **dadurch gekennzeichnet**, daß man die Insekten mit einer Zusammensetzung in Berührung bringt, die neben üblichen Hilfs- und Trägerstoffen eine insektizid wirksame Menge einer oder mehrerer Verbindungen, bestehend aus delta-Aminolävulinsäure, Auslösern der delta-Aminolävulinsäure oder Verstärkern der delta-Aminolävulinsäureumwandlung in Tetrapyrrole enthält.
19. Verfahren nach Anspruch 18, **dadurch gekennzeichnet**, daß die behandelten Insekten zwecks Tötung für etwa 1 bis 8 Stunden im Dunklen bleiben und dann dem Licht ausgesetzt werden.
20. Verfahren nach Anspruch 19, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Licht natürliches Tageslicht ist.
21. Verfahren nach Anspruch 19, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Aussetzen an Licht über einen Zeitraum von 1 bis 14 Tagen erfolgt.
22. Verfahren nach Anspruch 10 oder 18, **dadurch gekennzeichnet**, daß man eine oder mehrere der folgenden Verbindungen einsetzt: delta-Aminolävulinsäure; 2,2'-Dipyridyl; 1,10-Phenanthrolin; 4,7-Dimethyl-1,10-phenanthrolin; 4-Methyl-1,10-phenanthrolin; 5-Nitro-1,10-phenanthrolin; 5-Methyl-1,10-phenanthrolin; 5,6-Dimethyl-1,10-phenanthrolin; 4,7-Diphenyl-1,10-phenanthrolin; 5-Chlor-1,10-phenanthrolin; 3,4,7,8-Tetramethyl-1,10-phenanthrolin; 2,2'-Dithiobis(pyridin-N-oxid); 4,4'-Dimethyl-2,2'-dipyridyl; Phenyl-2-pyridyl-ketoxim; und 2,2':6',2''-Terpyridin.

Hierzu 1 Seite Zeichnung

#### Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft eine Insektizide Zusammensetzung, ein Verfahren zur Herstellung derselben und ein Verfahren zur Bekämpfung von Insekten.

#### Charakteristik des bekannten Standes der Technik

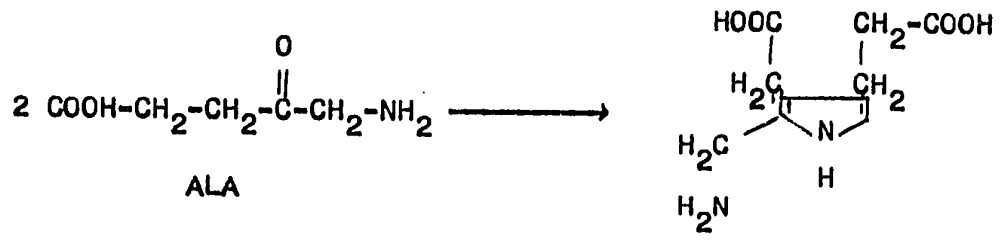
In der US-PA 895.529 werden herbizide Zusammensetzungen, die eine oder mehrere Verbindungen aufweisen, ausgewählt aus der delta-Aminolävulinsäure, Induktoren für delta-Aminolävulinsäure in Pflanzen, Verstärker der Umwandlung von delta-Aminolävulinsäure zu photodynamischen Tetrapyrrolen in Pflanzen und Inhibitoren der Umwandlung von Divinyltetrapyrrolen in Monovinyltetrapyrrole in Pflanzen umfassende Gruppe; Methoden für die Induktion der Ansammlung photodynamischer Tetrapyrrole in lebenden Pflanzen unter Verwendung der erfindungsgemäßen Zusammensetzungen und Methoden zur Abtötung von Pflanzen unter Verwendung der erfindungsgemäßen Zusammensetzungen beschrieben. Diese erfindungsgemäßen Zusammensetzungen waren bisher jedoch weder bekannt, noch sind sie als Insektizide beschrieben worden.

Wenn nicht ausdrücklich das Gegenteil gesagt wird, haben oben und anschließend die folgenden Begriffe folgende Bedeutungen:

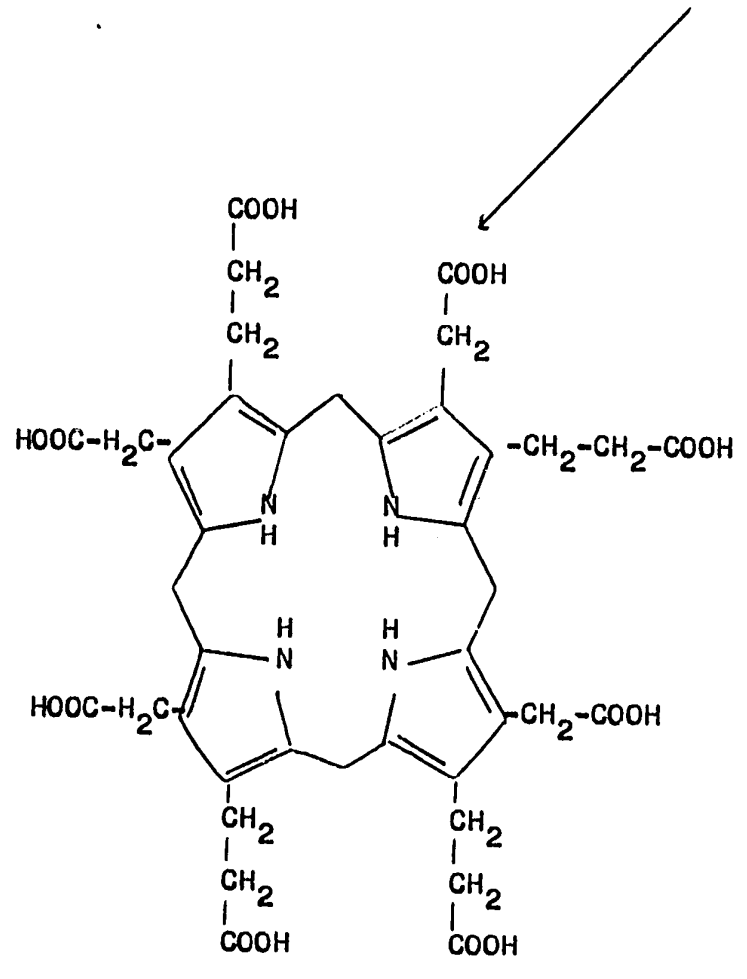
ALA = delta-Aminolävulinsäure; Chl = Chlorophyll; Chlide = Chlorophyllid; Coprogen = Coproporphyrinogen; DP = Dipyridyl; DV = Divinyl; Mg-Proto = Mg-Protoporphyrin IX; MV = Monovinyl; PA = Phenanthrolin; PBG = Porphobilinogen; PChl = Protochlorophyll; PChlide = Protochlorophyllid; Pheo = Pheophytin; Pheobide = Pheophorbid; Proto = Protoporphyrin IX; Protogen = Protoporphyrinogen; Uro = Uroporphyrin octamethylester; und Urogen = Uroporphyrinogen. Die Begriffe Proto, Mg-Proto, PChlide, Chlide, Chl, Pheo und Pheobide beziehen sich auf aus MV- und/oder DV-Bestandteilen bestehende Massen, wenn ihnen nicht ausdrücklich eine MV- oder DV-Bezeichnung vorausgeht.

Delta-Aminolävulinsäure, eine Aminosäure mit fünf Kohlenstoffatomen, ist in den meisten lebenden Tier- und Pflanzenzellen zu finden und ist der primäre Tetrapyrrol-Vorläufer. Sie kann von den verschiedensten Quellen für chemische Spezialprodukte bezogen werden, z. B. Sigma Chemical Co., St. Louis, MO. In Pflanzen ist ALA über einen sechsgliedrigen Weg ein Vorläufer von Chlorophyll, der Protoporphyrinogen, Protoporphyrin, Mg-Protoporphyrin, Metalloporphyrine längerer Wellenlänge, Protochlorophyll und Chlorophyllid umfaßt (siehe Fig. 1 der US-PA 895.529). In Insekten wird ALA auf einem Porphobilinogen, Uroporphyrinogen, Coproporphyrinogen, Protoporphyrinogen, Protoporphyrin IX und Eisen(II)-protoporphyrin IX (d. h. Protohäm) umfassenden Weg in Protohäm umgewandelt:

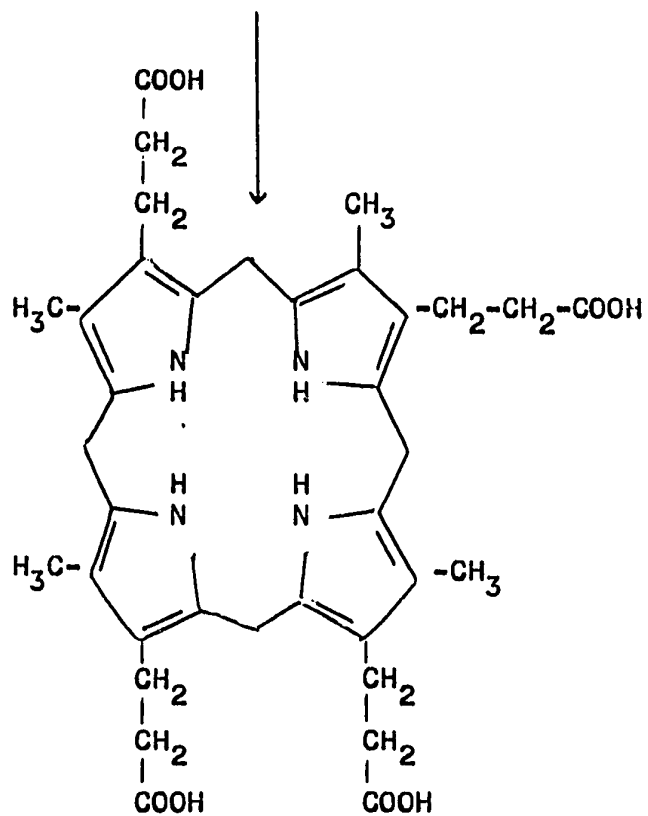
Fließschema A:



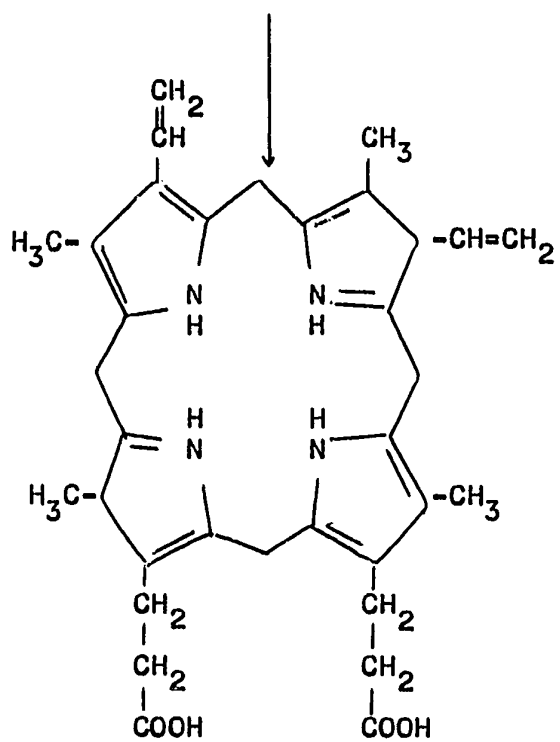
PBG



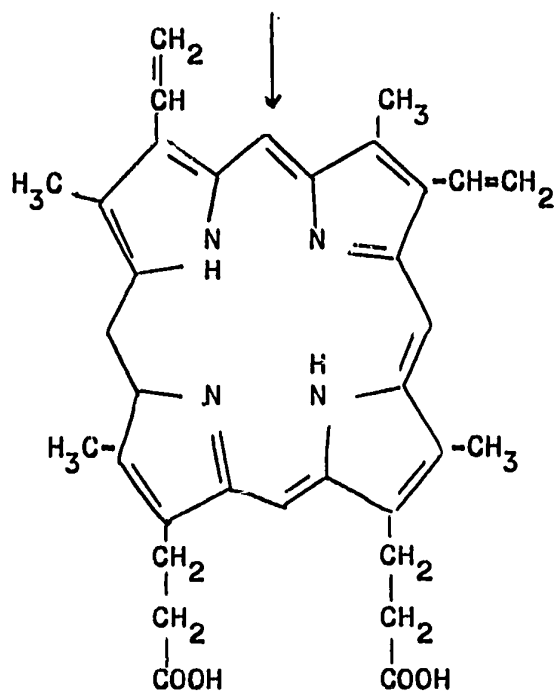
UROGEN III



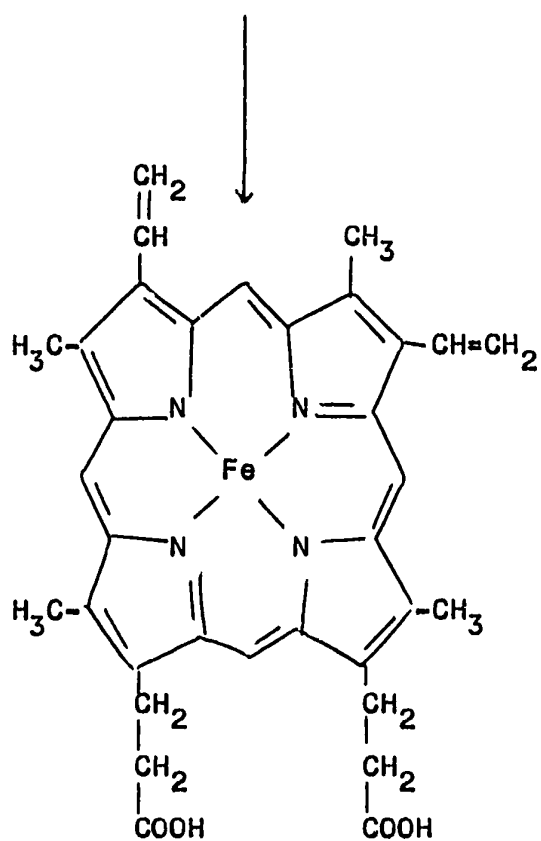
COPROGEN III



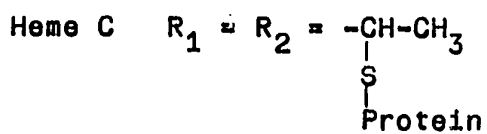
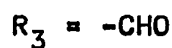
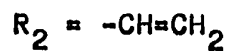
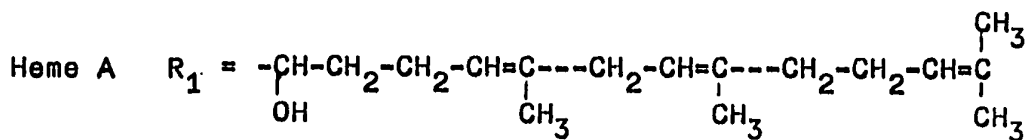
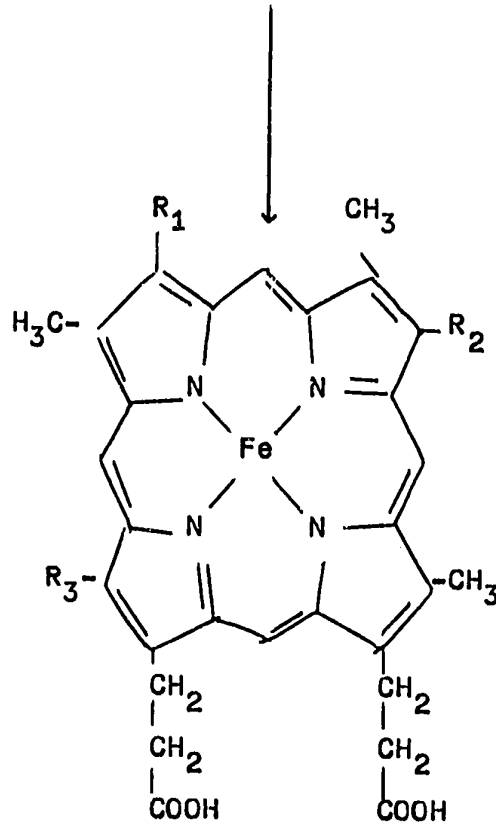
DV PROTOGEN IX



DV PROTO IX



Fe-Proto (Protoheme)



(siehe auch Granick, S. und D. Mauzerall in *Metabolic Pathways*, Bd. 2 [D. M. Greenberg, Herausg.] [Academic Press, N. Y. 1961] S. 525 bis 616). Protohäm und die Häme a und c sind prosthetische Gruppen aller Cytochrome in Pflanzen- und Tierzellen.

#### Ziel der Erfindung

Mit der Erfindung soll eine verbesserte insektizide Zusammensetzung bereitgestellt werden.

#### Darlegung des Wesens der Erfindung

Es wurde jetzt entdeckt, daß Insekten durch die Verabreichung einer Zusammensetzung, die aus einer Verbindung oder mehreren Verbindungen, ausgewählt aus der ALA, Induktoren für ALA in Insekten und Verstärker der ALA-Umwandlung zu Tetrapyrrolen in Insekten umfassenden Gruppe, besteht, getötet werden können. Die Erfindung betrifft daher eine entsprechende insektizide Zusammensetzung.

Vor allem wurde jetzt entdeckt, daß lebende Insekten angeregt werden, künstlich hohe, über die normalerweise in derartigen Insekten zu findenden Mengen hinausgehende Mengen von Tetrapyrrol-Zwischenverbindungen anzusammeln, indem sie exogenen ALA ausgesetzt werden, und daß solche künstlich induzierten hohen Mengen für das Insekt toxisch sind. Das ist überraschend, weil Insekten normalerweise Cytochrome nur in einer für das Wachstum und die Wiederherstellung ausreichenden Rate synthetisieren, und bisher hat man nicht angenommen, daß diese Rate ausreichen könnte, um eine Ansammlung lethaler Mengen derartiger Tetrapyrrol-Zwischenverbindungen zu ermöglichen.

Wenn auch der genaue Mechanismus der Toxizität unbekannt ist, so hat es doch den Anschein, als ob die angesammelten Tetrapyrrole auf einem Weg oder auf zwei Wegen wirksam werden könnten. Man nimmt an, daß die angesammelten Tetrapyrrole bei Licht die Bildung von Singulett-Sauerstoff photosensibilisieren, bei dem es sich um ein sehr starkes Oxydationsmittel handelt. Der Singulett-Sauerstoff oxidiert die Lipoprotein-Bestandteile der Zellmembranen des Insekts schnell und setzt damit eine sehr destruktive Kettenreaktion freier Radikale in Gang, die wie folgt zusammengefaßt werden kann ( $h\nu$  = Lichtquant;  $^1\text{Tet}$  = Tetrapyrrol im Singulett-Grundzustand;  $^3\text{Tet}^*$  = Tetrapyrrol im erregten Triplet-Zustand;  $^3\text{O}_2$  = Sauerstoff im Triplet-Grundzustand;  $^1\text{O}_2^*$  = Sauerstoff im erregten Singulett-Zustand; UMLP = ungesättigte Membran Lipoproteine):

- 1)  $^1\text{Tet} + h\nu \longrightarrow ^3\text{Tet}^*$
- 2)  $^3\text{Tet}^* + ^3\text{O}_2 \longrightarrow ^1\text{Tet} + ^1\text{O}_2^*$
- 3)  $^1\text{O}_2^* + (\text{UMLP}) \longrightarrow \text{Hydroperoxide}$
- 4)  $\text{Hydroperoxide} \longrightarrow \text{freie Radikale}$
- 5)  $\text{Freie Radikale} + \text{UMLP} \longrightarrow \text{weitere Hydroperoxide}$
- 6) Wiederholung der Schritte (4) und (5), bis die meisten der UMLP oxidiert sind.

Die Photosensibilisierung durch injizierte Tetrapyrrole ist in tierischen und menschlichen Geweben beschrieben worden (siehe z. B.: Ellefson, R. D., Mayo Clinic Proc. 57:454-458 (1982); Christensen, T., T. Sandquist, K. Ferer, H. Waksvik und J. Moan, Br. J. Cancer 48:35-43 (1983); Hopf, F. R., und D. G. Witten in *The Porphyrins*, Bd. 1, Dolphin, D., Herausg. (Academic Press, New York, 1978), S. 161-195; Sandeberg, S., I. Romslo, G. Hovding und R. Bjorndal, Acta Dermatovener (Stockholm) Suppl. 100:75-80 (1982); Latham, P. S. und J. R. Bloomer, Photochem. Photobiol. 37:553-557 (1983); Bickers, D. R., R. Dixit und H. Mukhtar, Biochem. Biophys. Res. Comm. 108:1032-1039 (1982), dieses Phänomen der ALA-abhängigen Tetrapyrrol-Ansammlung wurde jedoch bisher nicht bei Insekten nachgewiesen und wurde auch bisher nicht zur Abtötung unerwünschter Insektenarten angewandt.

Bei Dunkelheit scheinen die angesammelten Tetrapyrrole über einen anderen Mechanismus wirksam zu sein und zu erhöhten Mengen von Zn-Protoporphyrin zu führen. Zn-Proto ist keine natürliche Stoffwechsel-Zwischenverbindung des Porphyrin-Häm-Weges. Ihr Vorhandensein in lebenden Zellen und Geweben kennzeichnet gewöhnlich einen vergifteten Porphyrin-Häm-Metabolismus (siehe z. B. Lamolla, A. A. und T. Yamane, Science 186:936-938 [1974]). Die meisten Ferrochelatasen (die Enzyme, die Eisenionen in Proto zur Bildung von Häm einfügen) können Zn anstelle von Eisen in Proto zur Erzeugung von Zn-Proto, vor allem unter ungünstigen Reaktionsbedingungen, einfügen (Marks, G. S., in *Heme and Chlorophyll* [Van Nostrand, 1969], S. 146 bis 147). Da der genaue Mechanismus unbekannt ist und die Anmelde keine besondere Theorie verfolgen möchten, wird zur Zeit angenommen, daß die Ansammlung von Zn-Proto aufgrund der erfindungsgemäßen insektiziden Methoden durch die Schädigung des Ferrochelatasensystems hervorgerufen werden könnte, wodurch das Enzym Zink anstelle von Eisen(II) in einen Teil von Proto einfügt. Das könnte vielleicht bedeuten, daß Zink anstelle von Eisen(II) in einigen der prosthetischen Gruppen der entscheidenden Respirations-Enzym-Cytochrom-c-Oxidase zu finden ist. Infolgedessen können diejenigen Cytochrom-c-Oxidase-Moleküle, die Zn-Proto anstelle von Häm enthalten, gegenüber giftigen freien Radikalen nicht dicht halten, wie Sauerstoffsuperoxiden und freien Hydroxylradikalen, die normalerweise während des Krebs-Zitronensäurezyklus gebildet werden (Halliwell, B., *What's New in Plant Physiology* 15:21-24 [1984]). Unter diesen Umständen können die destruktiven freien Radikale in der biologischen Membranumgebung freigesetzt werden und zu der von freien Radikalen abhängigen Schädigung beitragen, die zum Tod von Insekten führt.

Es wurde weiterhin entdeckt, daß neben der Einwirkung von exogener ALA, die Einwirkung von Induktoren von ALA auf lebende Insekten gleichfalls zur Ansammlung beträchtlicher Mengen toxischer Tetrapyrrole in den Insektengeweben führt. Unter „Induktor von ALA“ oder „Induktor“ ist eine Verbindung zu verstehen, die bei der Anwendung für Insekten das Insekt zur Erzeugung einer höheren als normalen Menge endogener ALA stimuliert, wodurch dann die gleiche Wirkung wie bei der oben beschriebenen exogenen ALA hervorgerufen wird. Daher können die erfindungsgemäßen Zusammensetzungen einen Induktor oder mehrere Induktoren von ALA zusätzlich zu ALA oder anstelle von ALA selbst aufweisen. Nicht einschränkende Beispiele für Induktoren sind, 2,2-Dipyridyl, 1,10-Phenanthrolin, 4,7-Dimethyl-1,10-phenanthrolin, 4-Methyl-1,10-phenanthrolin, 5-Nitro-1,10-phenanthrolin, 5-Methyl-1,10-phenanthrolin, 5,6-Dimethyl-1,10-phenanthrolin, 4,7-Diphenyl-1,10-phenanthrolin, 5-Chlor-1,10-phenanthrolin, 3,4,7,8-Tetramethyl-1,10-phenanthrolin, 2,2'-Dithiobis(pyridin n-oxid), 4,4'-Dimethyl-2,2'-dipyridyl, Phenyl-2-pyridylketoxim und 2,2', 6', 2"-Terpyridin.

Es wurde weiter gefunden, daß bestimmte Verbindungen als Verstärker (enhancer) der ALA-Umwandlung in Tetrapyrrole in Insekten wirken. Unter „Verstärker von ALA“ oder „Verstärker“ wird eine Verbindung verstanden, die bei Einwirkung auf Insekten die Fähigkeit der behandelten Insekten verstärkt, endogenes und exogene ALA in insektizide Tetrapyrrole umzuwandeln. Zu den insektiziden Zusammensetzungen der vorliegenden Erfindung können somit auch gehören ein oder mehrere Verstärker von ALA zusätzlich zu oder anstelle von exogenem ALA oder Auslösern von ALA. Nicht beschränkende Beispiele von geeigneten Verstärkern sind (2,2'-Dipyridyl-1,10-Phenanthrolin; 4,7-Dimethyl-1,10-phenanthrolin; 4-Methyl-1,10-phenanthrolin; 5-Nitro-1,10-phenanthrolin; 5-Methyl-1,10-phenanthrolin; 5,6-Dimethyl-1,10-phenanthrolin; 4,7-Diphenyl-1,10-



phenanthrolin; 5-Chlor-1,10-phenanthrolin; 3,4,7,8-Tetramethyl-1,10-phenanthrolin; 2,2'-Dithiobis(pyridin-N-oxid); 4,4'-Dimethyl-2,2'-dipyridyl; Phenyl-2-pyridyl-ketoxim; und 2,2'; 6',2"-Terpyridin.)

Bestimmte Verbindungen, die als Auslöser in einer Zusammensetzung wirken, können in einer anderen Zusammensetzung oder bei unterschiedlichen Konzentrationen als Verstärker wirken. Alternativ dazu können bestimmte Verbindungen gleichzeitig als Auslöser und Verstärker wirken:

(z.B. 2,2'-Dipyridyl; 1,10-Phenanthrolin; 4,7-Dimethyl-1,10-phenanthrolin; 4-Methyl-1,10-phenanthrolin; 5-Nitro-1,10-phenanthrolin; 5-Methyl-1,10-phenanthrolin; 5-Nitro-1,10-phenanthrolin; 5-Methyl-1,10-phenanthrolin; 5,6-Dimethyl-1,10-phenanthrolin; 4,7-Diphenyl-1,10-phenanthrolin; 5-Chlor-1,10-phenanthrolin; 3,4,7,8-Tetramethyl-1,10-phenanthrolin; 2,2'-Dithiobis(pyridin-N-oxid); 4,4'-Dimethyl-2,2'-dipyridyl; Phenyl-2-pyridyl-ketoxim; und 2,2':6':2"-Terpyridin).

Die erfindungsgemäße insektiziden Verbindungen können auch Kombinationen von zwei oder mehr Verbindungen aufweisen, ausgewählt aus der ALA, Induktoren und Verstärker umfassenden Gruppe, z. B. ALA + einen oder mehrere Induktoren, ALA + einen oder mehrere Verstärker, einen oder mehrere Induktoren + einen oder mehrere Verstärker, ALA + einen oder mehrere Induktoren + einen oder mehrere Verstärker usw.

Die Zusammensetzung kann auch einen oder mehrere der folgenden Stoffe enthalten: geeignete Trägermittel (z. B. kolloidales Magnesiumaluminiumsilicat, Bimsstein, Talk oder Kombinationen davon); Lösungsmittel (z. B. Wasser, 0,45 Aceton:0,45 Ethanol:0,1 Tween 80:9 Wasser (V/V/V/V/V)), 0,45 Aceton:0,45 Methanol:0,1 Tween 80:9 Wasser (V/V/V/V/V)), 0,1 bis 1% Tween 80 in Wasser (V/V), 0,9 Polyethylenglycol (PEG):0,1 Tween 80:9 Wasser (V/V/V), 0,1 bis 0,7 PEG:0,2 bis 0,8 Methanol:0,1 Tween 80:9 Wasser (V/V/V/V), 0,0 Methanol:0,1 Tween 80:9 Wasser (V/V/V), 0,45 Aceton:0,45 Ethanol:0,2 Tween 80:0,9 Ethylenglycol:18 Wasser (V/V/V/V), oder einen oder mehrere der folgenden Stoffe: Benzen, Toluol, Xylen, Kerosin, 2-Methoxyethanol, Propylen, Glycol, Diethylenglycol, Diethylenglycoldiethylether, Formamid, Methylformamid, Cyclohexanon, Isophoron; Puffer (z. B. Zitronensäure), Netzmittel (z. B. Natrium N-methyl-N-octylsulfat, ein Alkylphenoxypolyoxyethylenethanol, Natrium-alpha-olefinsulfonat, Natriumisopropyl-naphthalensulfonat, polyoxyethyliertes Pflanzenöl); Dispergiermittel (z. B. Natriumligninsulfonat, das Natriumsalz von einem Naphthalensulfonsäure-Formaldehyd-Kondensat, Hydroxyethylcellulose);

Antischaummittel (z. B. Silicon); Brechmittel (z. B. Natriumtripolphosphat, Tetrakaliumpyrophosphat, Arecotin, Apomorphin, Kupfersulfat); Geruchsmittel (z. B. Pyridin); Penetrationsmittel; oberflächenaktive Mittel; Emulgiermittel; Zusatzmittel; Herbizide und ein oder mehrere bekannte Insektizide.

Die Zusammensetzung kann in einer Weise formuliert werden, wie sie herkömmlich für insektizide Präparate angewandt wird, z. B. als Bestandteil in dem Insektenfutter für innere systemische Verabreichung, oder als Lösung, Suspension, Emulsion, fließfähiges Konzentrat, emulgierbares Konzentrat, Gel, Paste, Schaum, Creme, Aerosol, oberflächenaktives Pulver, Stäubemittel, dispergierbare Granulate und dergleichen für äußerliche örtliche Anwendung, und zwar nach dem Fachmann bekannten Verfahrensweisen.

Die Formulierung ist so aufgebaut, daß sie eine geeignete Menge an einem oder mehreren aktiven Bestandteilen für das Zielobjekt Insekt(en) liefert. Für die topische Anwendung ist die Zusammensetzung vorzugsweise eine Lösung, Suspension, Emulsion, Aerosol, fließfähiges oder emulgierbares Konzentrat oder benetzbares Pulver. Natürlich muß die topische Formulierung so sein, daß der oder die aktive(n) Bestandteil(e) die Haut der Insekten durchdringen und sich zu den Stellen der Tetrapyrrolsynthese verlagern.

Wenn der aktive Bestandteil mit einem oder mehreren der oben genannten aktiven oder inerten Verbindungen oder Zusammensetzungen kombiniert wird, kann die Kombination bei Umgebungstemperatur oder bei Temperaturen oberhalb oder unterhalb der Umgebungstemperatur hergestellt werden, vorausgesetzt, daß die Stabilität der Endzusammensetzung nicht beeinträchtigt wird. Wenn die Zusammensetzung ALA enthält, wird die Temperatur vorzugsweise zwischen etwa 4°C und etwa 75°C gehalten. Wenn die insektizide Zusammensetzung der vorliegenden Erfindung in wäßriger Lösung vorliegt, kann der pH-Wert am isoelektrischen Punkt der (des) aktiven Bestandteile(s) liegen oder oberhalb oder unterhalb des isoelektrischen Punktes, vorausgesetzt, daß die Stabilität und Löslichkeit des aktiven Bestandteiles nicht so nachteilig beeinträchtigt wird, daß die Wirksamkeit beeinträchtigt wird. Wenn allerdings die insektizide Zusammensetzung ALA enthält, wird der pH vorzugsweise so eingestellt, daß er zwischen etwa pH3 und etwa pH8 liegt.

Wenn zwei oder mehrere Komponenten zu den insektiziden Zusammensetzungen kombiniert werden, werden sie vorzugsweise unter Bedingungen kombiniert, die eine gleichbleibende Konzentration im gesamten Gemisch sichern. Dies wird zweckmäßig erreicht durch solche Verfahrensweisen wie Rühren, Schütteln, Mischen, Vermengen usw.

In solchen Fällen, wo der aktive Bestandteil die alleinige Komponente der insektizide Zusammensetzung der vorliegenden Erfindung ist, muß der aktive Bestandteil sorgfältig hergestellt werden, um eine gleichmäßige Applikation zu erreichen. Im Falle eines festen aktiven Bestandteiles erreicht man dies zweckmäßigerweise durch Verteilung zu einem feinteiligen Pulver. Wenn eine solche alleinige Komponente in Form einer Flüssigkeit vorliegt, kann sie zweckmäßigerweise zu einem feinen Nebel bei geeigneten Temperaturen mit im Stand der Technik bekannten Methoden versprüht werden. Wenn die Nahrungs- oder topischen Zusammensetzungen in Lösung hergestellt werden, können sie zweckmäßigerweise Konzentrationen von etwa 2 bis etwa 50 mM ALA aufweisen und etwa 0,1 bis etwa 50 mM Auslöser oder Verstärker.

Entsprechend den erfindungsgemäßen Verfahren werden die zu tödenden Insekten mit einer insektiziden Zusammensetzung in Berührung gebracht, die ALA und/oder Auslöser von ALA und/oder Verstärker der ALA-Umwandlung zu Tetrapyrrolen enthält. Die insektiziden Zusammensetzungen der vorliegenden Erfindung können topisch appliziert werden, z. B. als Staub, Tränkmittel, Tauchmittel, Spray oder Nebel in einer Menge, die ausreicht, die letalen inneren Spiegel an Tetrapyrrolen zu erreichen. Die topisch zu applizierende Menge an insektizider Zusammensetzung kann variieren, abhängig von dem (den) speziell ausgewählten aktiven Bestandteil(en), wird jedoch im allgemeinen eine Menge sein, die ausreichend ist, etwa 0,25 bis 2 Pound pro Acre und/oder von etwa 0,1 bis 1,5 Pound Auslöser oder Verstärker pro Acre zu liefern. Für die Fachleute sind Mittel zur Bestimmung von optimalen Applikationsraten geläufig.

Alternativ dazu können die insektiziden Zusammensetzungen der vorliegenden Erfindung über die Nahrung verabreicht werden, die im Köder oder anderen Futterstoffen einschließlich Tränkflüssigkeiten mit der Absicht enthalten sind, die Insekten zu töten. Die zu verabreichende Menge an insektizider Zusammensetzung kann wiederum variieren, abhängig von dem (den) ausgewählten besonderen aktiven Bestandteil(en). Im allgemeinen wird die Menge so bemessen sein, daß sie etwa 10 ng bis etwa 5 Mikrogramm ALA pro mg Körpermasse und/oder etwa 1 ng bis etwa 5 Mikrogramm Auslöser oder Verstärker pro mg Körpermasse liefert.

Wenn beabsichtigt ist, das Insekt mit Hilfe des Dunkelmechanismus zu töten, dann kann das Insekt behandelt und anschließend gegen die Einwirkung von Licht abgeschirmt werden, um eine maximale Tetrapyrrol-Ansammlung zu ermöglichen. Das Insekt kann in einer beliebigen herkömmlichen Weise abgeschirmt werden, indem der Boden oder die Fläche, worin das Insekt anzutreffen ist, beispielsweise mit Stoff, dunklem Papier oder Folie abgedeckt wird. Unter Feldbedingungen besteht die ideale Methode für die Schaffung einer Periode der Dunkelinkubation darin, daß die insektizide Zusammensetzung in der Dämmerung oder während der Nacht zu einer Zeit aufgebracht wird, die so gewählt wurde, daß die Insekten mindestens eine Stunde im Dunklen verbleiben. Zur Erleichterung der Tetrapyrrol-Ansammlung ist unter Dunkelheit nicht das vollständige Fehlen von Licht zu verstehen, sondern im wesentlichen die Ausschaltung von Licht mit Wellenlängen von 380 bis 700 nm.

Vorzugsweise werden die Insekten von etwa 1 Stunde bis etwa 20 Stunden in Dunkelheit gehalten. Eine bis 8 Stunden werden besonders bevorzugt. Selbstverständlich bevorzugen viele Insekten von Natur aus eine dunkle Umgebung, daher müssen keine besonderen Schritte unternommen werden, um sie nach dem Kontakt mit der insektiziden Zusammensetzung vor Licht zu schützen.

Sollen die Insekten über den Lichtmechanismus getötet werden, wird die insektizide Zusammensetzung angewandt oder verabreicht, und die Insekten werden gleichzeitig oder anschließend Licht von etwa 5 Fußkerzen oder mehr mit Wellenlängen von etwa 380 bis 700 nm ausgesetzt.

Das Licht kann von einer beliebigen herkömmlichen Quelle stammen, z. B. Glühlampe, Metallhalogenidlampe, Tageslichtlampe oder einer kaltweißen oder Oberlicht-Fluoreszenzlampe. Im Gelände ist die bevorzugte Lichtquelle selbstverständlich das Sonnenlicht. Die Insekten werden dem Licht so lange ausgesetzt, daß die meisten der ungesättigten Membranlipoproteine oxidieren können; ein Zeitraum von etwa 2 min bis zu etwa 3 Tagen wird bevorzugt.

Die mit der erfindungsgemäßen Zusammensetzung zu behandelnden Insekten können an meisten im Ei-, Larven- oder ausgewachsenen Stadium herangezogen werden. Bei Larven kann der Entwicklungszustand („Instar“) die Empfindlichkeit für die Behandlung beeinträchtigen; Larven im späteren Instar sind relativ empfindlicher gegenüber der Behandlung als Larven in den früheren oder mittleren Instar. Es kann sich daher als notwendig erweisen, die Dosismengen je nach dem Entwicklungszustand der Mehrzahl in der herangezogenen Larvenpopulation zu variieren.

Die insektizide Wirksamkeit zeigt sich durch eine Veränderung der Hautfarbe, worauf Austrocknung und Absterben folgen. Zum weiteren Verständnis der Erfindung dienen die folgenden nicht-einschränkende Beispiele. Wenn nicht ausdrücklich das Gegenteil behauptet wird, beziehen sich, wie oben und anschließend gebraucht, alle Temperaturen und Temperaturbereiche auf Grad Celsius und die Begriffe Umgebungs- und Raumtemperatur auf etwa 20°C bis 25°C. Der Begriff Prozent (%) bezieht sich auf Masseprozent und die Bezeichnungen Mol und Mole bedeuten Grammole. „Grad der Signifikanz“ bezieht sich auf die Wahrscheinlichkeit, daß von einer Population, bei der der Korrelationskoeffizient (r) gleich null ist, eine Probe der Größe n entnommen werden kann, für die der Korrelationskoeffizient dem für die betreffende Probe errechneten Wert entspricht oder diesen übersteigt. Die Abkürzung „n.s.“ steht für „nicht signifikant“.

### Ausführungsbeispiele

Anhand der folgenden Beispiele soll die Erfindung nachfolgend näher erläutert werden. Die beigefügte Zeichnung gehört zum Beispiel III.

#### Beispiel I

##### Pigmente der Futterarten, auf denen T. ni Larven gehalten wurden

Eier von *Trichoplusia ni* (Huber) (Kohlfalter, der verbreitetste Schädling bei Gemüsepflanzen in den USA) wurden von Ms. Paula Peters vom USDA Insect Biological Laboratory, Abteilung Entomologie der Universität von Missouri in Columbia, bezogen. Die Larven, Puppen und ausgewachsenen Falter wurden in Percival Inkubatoren, Modell I-60 (Percival Mfg. Co., Boone Iowa 50036) bei 25°C und 75% relativer Feuchtigkeit unter einem täglichen System von 14 Stunden Helligkeit und 10 Stunden Dunkelheit gehalten. Die Larven erhielten künstliches Futter, wobei nach den von Waldbauer, G. P., R. W. Cohen und S. Friedman, *Great Lakes Entomol.* (1984) 17:114 beschriebenen Methoden verfahren wurde. Zwanzig bis dreißig Larven wurden in einzelnen Papierbehältern von 8 Unzen mit durchsichtigen Plastedeckeln, bezogen von Lily-Tulip, Inc. (Augusta, GA), gehalten. Zur Ausschaltung von genetischen Veränderungen in der Kolonie wurden jeden Sommer wilde Kollektionen der Kultur zugesetzt. Um Mikrobenkrankheiten auf ein Mindestmaß zu reduzieren, wurden die Eier und Puppen jeder Generation oberflächensterilisiert.

Da auf Futter, das gelblich-grünes Luzernmehl enthielt, gehaltene Larven von *T. ni* eine gelblich-grüne Farbe annahmen, während auf einem Futter ohne Luzernmehl gehaltene *T. ni*-Larven visuell keine Pigmentierung zeigten, wurde der endogene Pigmentgehalt des Futters als einleitender Schritt für die Untersuchung der Induktion von Tetrapyrrolen durch chemische Behandlung ermittelt.

Die gelblich-grüne Farbe des Luzernmehl enthaltenden Futters war typisch für die gelblich-grüne Färbung von Pheos (Chls, die ihr Mg-Atom verloren haben) und von Pheobides (Chlides, die ihr Mg-Atom verloren haben). Das wurde durch spektrofluorometrische 77K Analyse bestätigt. Gramm-Mengen des Futters wurden in 6 ml Aceton:0.1 N NH<sub>4</sub>OH (9:1 V/V) homogenisiert, und der verschiedene Pigmente enthaltende wäßrige Acetonextrakt wurde durch Zentrifugieren mit 39000g in einem Zeitraum von 10 Minuten bei 0°C von Lipoproteinen und Zellbruchstücken befreit. Apolare Pigmente, wie Chls und Pheos, wurden durch Extraktion mit Hexan aus der wäßrigen Acetonlösung entfernt. Die polaren Di- und Monocarboxyl-Pigmente, wie Proto, Mg-Proto, PChlides, Chlides und Pheos, bleiben in der hexan-extrahierten wäßrigen Acetonfraktion zurück. Eine kleine Aliquote des die Chlorophyllpigmente enthaltenden Hexanextraktes wurde unter Stickstoff getrocknet, und der Rückstand wurde erneut in 80%igem Aceton für die spektrofluorometrische Bestimmung der Mengen von Chls und Pheos nach der Methode von Bazzaz, M. B., und C. A. Rebeiz, *Photochem. Photobiol.* (1979) 30:709, gelöst.

Fluoreszenzspektren wurden auf einem vollkommen korrigierten Photonen-Zähl-Spektrofluorometer, Modell SLM 8000 DS aufgezeichnet, wie in Rebeiz, C. A., A. Montazer-Zouhoor, H. J. Hopen und S. M. Wu, *Enzyme Microb. Technol.* (1984) 6:390 beschrieben wird. Die Erregung erfolgte mit 400, 420 und 440 nm. Absorptionsspektren wurden bei einer Schlitzbreite von 2 nm

auf einem Doppel-Wellenlängen-Spektrophotometer von Aminco, Modell DW-2 (Travenol Laboratories Inc., Silver Springs, MD 20910), aufgezeichnet. Als Kontrollen dienten MV Pheo a und c, hergestellt von MV Chl a bzw. c, wie in Bazzaz, M. B. und C. A. Rebeiz, Photochem. Photobiol. (1979) 30:709 beschrieben wird. Die Ergebnisse sind in Tabelle I enthalten:

**Tabelle I**

Spektrofluorometrische Eigenschaften in Ether bei 77 K der vorherrschenden Pigmente des Luzernemehl enthaltenden Futters und von auf diesem Futter gehaltenen T. ni

Versuch	Nr.	Material	Fluoreszenz bei 77 K (nm)		Pigment-Identifikation
			Rot-Emission	Soret-Erregung	
A	1	Authentisches MV Pheo b	656	440 > 450	
B	1	Authentisches MV Pheo a	666	414	
C	1	Apolarer Extrakt des Futters	655	440 > 450	MV Pheo b
			666-667	414	MV Pheo a
	3	Apolarer Extrakt des Futters	654-655	440 > 450	MV Pheobide b
			666-667	414-415	MV Pheobide a
E	1	Polarer Extrakt von T. ni	655	440 > 450	MV Pheobide b
			666-667	414	MV Pheobide a

Aufeinanderfolgende Erregungen des Etherglases des apolaren Extraktes zwischen 400 und 450 nm ergaben zwei Chl-artige Emissionsbanden mit Maxima bei 655 bzw. 666-667 nm (Tabelle I: C 1, 2). Das Soret-Erregungsspektrum der 655-nm-Emissionsbande ergab gespaltene Soret-Erregungsmaxima bei 440 nm (großes Maximum) und bei 450 nm (kleineres Maximum) (Tabelle I: C 1). Diese Emissions- und Erregungsmaxima waren denen von authentischen MV Pheo b (E 440 > E 450 F 656) identisch (Tabelle I: A). In diesem Zusammenhang bezieht sich „E 440 > 450“ auf gespaltenen Soret-Erregungs-Maxima von MV Pheo b bei 77 K in Ether, während „F 656“ das Fluoreszenz-Emissionsmaximum von MV Pheo b bei 656 nm bezeichnet. Die (E 440 > E 450 F 656) Fluoreszenzbande wurde daher als MV Pheo b identifiziert. Geringe Mengen von MV Chl b waren gleichfalls vorhanden.

Das Soret-Emissionspektrum der 666-nm-Emissionsbande zeigte ein einziges Erregungsmaximum bei 414 nm und war authentischem MV Pheo a identisch (Tabelle I: B, C 2). Diese (E 414 F 666) Fluoreszenzverbindung wurde daher als MV PHEO a identifiziert.

Die spektrofluorometrischen Eigenschaften der polaren Fraktion waren denen der apolaren Fraktion sehr ähnlich (Tabelle I: C 1-4). Die (E 440 > E 450 F 655) und (E 414 F 666-667) Verbindungen waren jedoch zu polar, als daß sie sich mit Hexan abtrennten und blieben in dem wäßrigen Acetonrückstand zurück. Sie wurden als MV Pheobide b bzw. MV Pheobide a identifiziert.

Pheobides haben die gleichen elektronischen spektroskopischen Eigenschaften wie Pheos, sind aber polarer, weil sie den langkettigen Alkohol an Position 7 des Makrozyklus verloren haben. Es wurde bestätigt, daß das Ausmaß der Veresterung an den Positionen 6 und 7 des Makrozyklus keinen Einfluß auf die elektronischen Absorptions- und Fluoreszenzeigenschaften von Tetrapyrrolen hat (siehe z. B. Belanger, F. C. und C. A. Rebeiz, J. Biol. Chem. [1982] 257:1360).

Die Mengen von Proto, Mg-Proto, Mg-Protos, PChlides und Pheobides wurden mit Hilfe der Spektrofluorometrie an Aliquoten der hexan-extrahierten polaren Acetonfraktion nach den Methoden von Rebeiz, C. A., J. R. Mattheis, B. B. Smith, C. C. Rebeiz und D. F. Dayton, Arch. Biochem. Biophys (1975) 171:549 und Bazzaz, M. B. und C. A. Rebeiz, Photochem. Photobiol. (1979) 30:709 bestimmt. Die Ergebnisse werden in Tabelle II gezeigt:

**Tabelle II**

Pigmentgehalt der Futter, auf denen die Larven gehalten wurden

Versuch	Futter	Pigmentgehalt in mMol je 100mg Protein									
		Proto	MV Chlide a	MV Chlide b	MV Pheobide a	MV Pheobide b	MV Chl a	MV Chl b	MV Pheo a	MV Pheo b	
A	Futter + A. M.	0	2,39	5,45	53,28	108,07	0	3,71	31,52	49,54	
B	Futter - A. M.	0	0	0	0	0	0,15	0,05	0,29	0,74	

worin „Futter + A. M.“ = Luzernemehl enthaltendes Futter und „Futter - A. M.“ = Futter ohne Luzernemehl bedeuten. Die Mengen von Pheobide a und b in dem Luzernemehl enthaltenden Futter werden in Tabelle II: A angeführt. Geringe Mengen von Chlide a und b waren ebenfalls vorhanden. Das Futter ohne Luzernemehl enthielt nur Spuren Mengen von chlorophyllartigen Pigmenten (Tabelle II: B).

**Beispiel II**

**Pigmente von T. ni**

Auf Luzernemehl enthaltendem oder kein Luzernemehl enthaltendem Futter gezüchtete Larven von T. ni in ihrem fünften Instar wurden entweder mit Mörser und Stößel oder mit einem Brankman Homogenisator, Modell PT 10/35 (Brinkman Instrument Co., Westbury, NY 11590) in Aceton: 0,1 N NH<sub>4</sub>OH (9:1 V/V) mit einer Menge von 6ml Lösungsmittel pro 1g frischem Gewebe homogenisiert. Polare und apolare Pigmente wurden wie in Beispiel I extrahiert. Die Ergebnisse sind aus Tabelle III zu entnehmen:

**Tabelle III**  
Pigmentgehalt von T. ni Larven

Versuch	Futter	Pigmentgehalt in mMol je 100mg Protein									
		Proto	MV	MV	MV	MV	MV	MV	MV	MV	MV
			Chlide a	Chlide b	Pheobide a	Pheobide b	Chl a	Chl b	Pheo a	Pheo b	
A	T. ni + A. M.	0	0,68	12,31	21,39	45,99	0,12	0,21	0,04	1,56	
B	T. ni - A. M.	0,2	0,14	0,25	0,04	1,88	0,27	0,07	0,07	0	

worin „T. ni + A. M.“ = auf Futter mit Luzernemehl gezüchtete Larven und „T. ni - A. M.“ = auf Futter ohne Luzernemehl gezüchtete Larven bedeuten.

Im Gegensatz zum Luzernemehlfutter, das erhebliche Mengen von MV Pheo a und b zusätzlich zu MV Pheobide a und b enthält, waren in T. ni geringe Mengen von Pheos vorhanden, deren Menge von Gruppe zu Gruppe zu variieren schien (Tabelle III: A, siehe auch folgende-Tabelle IV). Die von den Larven angesammelten Pigmente waren polarer und bestanden hauptsächlich aus Pheophorbid a und MV Pheophorbid b (Tabelle I: E; Tabelle III: A). Andererseits enthielten auf Futter ohne Luzernemehl gehaltene Larven nur Spurenmengen chlorophyllartiger Pigmente (Tabelle III: B).

Zur Bestimmung der Stelle der Pigmentansammlung wurden die Haut, Hämolymphe und Eingeweide von T. ni Larven im fünften Instar, die auf dem Luzernemehlhaltigen Futter gehalten worden waren, abgetrennt und auf den Pigmentgehalt hin analysiert. Hämolymphe wurden von 9 bis 10 mit einem Futter ohne Luzerne gefütterten Larven und von 9 bis 10 mit einem Futter mit Luzerne gefütterten Larven gesammelt, indem die Haut über die Herzkammer an einem hinteren Segment des Bauches der Larve vorsichtig durchstochen wurde. Die entnommene Hämolymphe wurde in einer Spritze Nr. 22 gesammelt und sofort in kaltes Aceton:0,1 N NH<sub>4</sub>OH (9:1 V/V) gespritzt. Nach dem Sammeln der Hämolymphe wurden die Larven in flüssigem Stickstoff gefroren, danach wurden sie teilweise aufgetaut, bevor die Haut mit einem scharfen Skalpell längs aufgeschlitzt wurde. Die aufgetaute Haut (d. h. das Integument des Insekts) wurde dann sorgfältig von den noch gefrorenen Eingeweiden abgezogen. Die Haut wurde zum weiteren Waschen in eiskaltes destilliertes Wasser gelegt, während die Eingeweide in eiskaltes Aceton:0,1 N NH<sub>4</sub>OH (9:1 V/V) gebracht wurden. Die Haut wurde dreimal mit destilliertem Wasser gespült, dann zur Homogenisierung in kaltes Aceton:0,1 N NH<sub>4</sub>OH (9:1 V/V) gegeben. Die Fraktionen von Hämolymphe, Eingeweiden und Integument wurden in kaltem Aceton:0,1 N NH<sub>4</sub>OH (9:1 V/V) mit Mörser und Stößel homogenisiert und nach der Verfahrensweise von Beispiel I extrahiert. Die Ergebnisse sind in Tabelle IV enthalten:

**Tabelle IV**  
Pigmentgehalt verschiedener Gewebe von auf einem Futter mit Luzernemehl gezüchteten Larven von T. ni

	Pigmentgehalt in nMol je 100mg Protein									
	Proto	MV	MV	MV	MV	MV	MV	MV	MV	MV
		Chlide a	Chlide b	Pheobide a	Pheobide b	Chl a	Chl b	Pheo a	Pheo b	
Haut	0	0,05	0,12	0,42	1,03	0,13	0,05	0,07	0,08	
Eingeweide	0	0,39	2,61	12,22	18,05	0,38	0,49	9,75	17,32	
Hämolymphe	0,07	0,25	0,13	0,18	1,19	0,98	0,50	0,18	0	

Wie in Tabelle IV angeführt wird, wurde der größte Teil des Pigments in den Eingeweiden gefunden. Geringe Mengen Pigment wurden gleichfalls im Integument und in der Hämolymphe nachgewiesen.

**Beispiel III**  
Ansammlung von Protoporphyrin IX in mit Delta-Aminolävulinäure und 2,2'-Dipyridyl behandelten T. ni  
(Hierzu beigefügte Fig.)

Ein Block von Futter (2,5 cm × 1,5 cm × 1 cm) und 20 bis 30 T. ni Larven in ihrem dritten Instar wurden in einen Papierbehälter von 8 Unzen (Durchmesser 9 cm) gegeben, und der Behälter wurde mit 0,35 ml von 40 mM ALA + 30 mM 2,2'-DP in Aceton:Ethylalkohol:Tween 80:Wasser (0,45:0,45:0,1:9 V/V/V/V), auf einen pH-Wert von 3,5 eingestellt, bespritzt. Die Lösung wurde als feiner Nebel mit einem durchschnittlichen Tröpfchendurchmesser von etwa 50 Mikrometer aufgebracht. Das entsprach einer Spritzrate von 40 Gallonen je Acre. Die Behandlungen wurden viermal wiederholt. Die gespritzten Behälter wurden mit einem durchsichtigen Plastendeckel abgedeckt, und die behandelten Larven wurden anschließend über Nacht (17 h, im allgemeinen von 4 h nachmittags an einem bestimmten Tag bis 9 h morgens am nächsten Tag) in der Dunkelheit bei 28°C inkubiert, bevor die Extraktion wie in Beispiel II vorgenommen wurde. Die Ergebnisse sind in Tabelle V enthalten:



worin sich „Larvensterben“ auf % Tode zu Beginn der vierten Photoperiode, d.h. nach 3 Tagen im Gewächshaus bezieht, und „Δ-Veränderung“ die Differenz im Pigmentgehalt zwischen den mit ALA + 2,2'-DP behandelten Larven und den Kontrolllarven nach 17 Stunden der Dunkelinkubationsperiode nach dem Spritzen bedeutet.

Die ALA + 2,2'-DP-Behandlung resultierte in beträchtlicher Proto-Ansammlung und signifikantem Larvensterben. Das prozentuale Larvensterben zeigte einen hohen Korrelationsgrad mit der Proto-Ansammlung (Tabelle VI). Das häufigste Sterben war in der ersten Photoperiode zu verzeichnen. Innerhalb von Minuten bis zu wenigen Stunden nach der Einwirkung von Licht wurden die Larven infolge des Verlustes an Körperflüssigkeit träge und schlaff; der Tod war von ausgedehnter Austrocknung begleitet.

Zur Bestimmung der Stelle der Proto-Ansammlung wurden Integument, Hämolymphe und Eingeweide der mit ALA + 2,2'-DP behandelten Larven in ihrem frühen fünften Instar abgetrennt und wie in Beispiel II auf den Pigmentgehalt hin analysiert. Auf einer Basis  $\mu\text{g}$  Proteineinheit wurden etwa 59% des angesammelten Proto in der Hämolymphe, 35% in den Eingeweiden und 6% im Integument beobachtet.

**Beispiel V**

**Auswirkungen der Protoporphyrin-Ansammlung auf das Larvensterben und die Körpergewichtsveränderung im Dunkeln und bei Licht**

Im Laufe der Versuchsdurchführungen wurde festgestellt, daß die ALA + 2,2'-DP-Behandlung zu beträchtlichem Larvensterben bei Dunkelheit sowie auch bei Helligkeit führte. Um bestimmen zu können, ob das von ALA + 2,2'-DP abhängige Larvensterben ein photodynamisches Phänomen war oder nicht, wurden T. ni Larven im dritten Instar entweder nur mit Lösungsmittel (Kontrollen) oder mit 40 nM ALA + 30 mM 2,2'-DP, eingestellt auf einen pH-Wert von 3,5, wie in Beispiel III gespritzt. Die gespritzten Larven konnten über Nacht durch 17 Stunden Inkubation bei 28°C im Dunkeln Proto ansammeln. Am nächsten Morgen wurden einige der Larven im Gewächshaus 0,3 oder 6h lang dem Licht ausgesetzt, bevor die Pigment Extraktion wie in Beispiel II vorgenommen wurde. Der gleichen Lichtbehandlung unterzogene Duplikatproben wurden 48, 45 bzw. 42 Stunden ins Dunkle zurückgebracht, bevor die Ermittlung des durchschnittlichen Larvensterbens wie in Beispiel V erfolgte. Eine weitere Beurteilung der von der Behandlung abhängigen Schädigungen bei überlebenden Larven wurde durch die Bestimmung des Körpergewichtes nach einer photoperiodischen Einwirkung im Gewächshaus von 3 Tagen vorgenommen. Die Ergebnisse der beiden Experimente werden in Tabelle VII wiedergegeben:

**Tabelle VII**

**Einfluß der Proto-Ansammlung auf das Sterben von T. ni Larven und die Körpergewichtsveränderung in der Dunkelheit und bei Licht**

Versuch	Nr.	Hell/Dunkel-Regime nach dem Spritzen und 17h Dunkelinkubation	Proto-Gehalt nach 17h Dunkelinkubation nach dem Spritzen und 0 bis 6h Helligkeit (nMol/100 mg Protein)	Larvensterben nach dem Spritzen		Körpergewicht nach Behandlg. pro lebende Larve nach der 65-h-Gesamtpériode (mg)
				17h Dunkelinkubation (%)	Gesamtpériode 65h	
A	1	Kontrolle, zwei Photoperioden von 14h hell + 10h	0,2 <sup>a</sup>	1	12	45,1
A	2	behandelt, 0h hell + 48h dunkel	62,0 <sup>a</sup>	28	31	44,5
A	3	behandelt, 3h hell + 45h dunkel	0,4 <sup>b</sup>	21	60	43,4
A	4	behandelt, 6h hell + 42h dunkel	1,1 <sup>c</sup>	22	73	26,6
A	5	behandelt, zwei Photoperioden, 14h hell + 10h dunkel	62,0 <sup>a</sup>	19	80	16,6
B	1	Kontrolle, zwei Photoperioden von 14h hell + 10h dunkel	0,2 <sup>a</sup>	0	22	44,1
B	2	behandelt, 0h hell + 48h dunkel	40,1 <sup>a</sup>	19	48	45,7
B	3	behandelt, 3h hell + 45h dunkel	1,2 <sup>b</sup>	20	65	32,1
B	4	behandelt, 6h hell + 42h dunkel	0,6 <sup>c</sup>	21	77	20,5
B	5	behandelt, zwei Photoperioden von 14h hell + 10h dunkel	40,1 <sup>a</sup>	22	95	3,6
Korrelationskoeffizient					0,808 <sup>d</sup>	-0,851 <sup>e</sup>
Signifikanzgrad					5%	1%

a Proto-Gehalt 17h Dunkelinkubationsperiode nach Spritzung

b Proto-Gehalt nach 17h Dunkelinkubationsperiode und 3h Helligkeit nach Spritzung

c Proto-Gehalt nach 17h Dunkelinkubationsperiode und 6h Helligkeit nach Spritzung

d Korrelation zwischen Larvensterben und Ausmaß der Lichteinwirkung nach Spritzung.

Bei Berechnung des Korrelationskoeffizienten wurde das Larvensterben der Kontrolle von dem der behandelten Larven subtrahiert.

- e Korrelation zwischen dem Ausmaß der Lichteinwirkung nach Spritzung und durchschnittlicher Körpergewichtsveränderung je überlebender Larve. Bei der Berechnung der Korrelationskoeffizienten wurde das durchschnittliche Körpergewicht der Kontrolllarven von dem der behandelten Larven subtrahiert.

Die Behandlung der Larven mit ALA + 2,2'-DP resultierte in der Ansammlung von Proto. Vor irgendwelcher Einwirkung von Licht war auch ein signifikantes Ausmaß von Larvensterben bei den behandelten Larven am Ende der 17-h-Dunkelinkubationsperiode nach dem Spritzen zu beobachten (Tabelle VII: A 2, B 2). Weitere Dunkelinkubation führte zu weiterem Larvensterben. Diese Art des Larvensterbens wird hierin als dunkelabhängiges Larvensterben bezeichnet. Bei den Larven, die die Dunkel-Larvenabsterb-Periode überlebten, war kein nachweisbarer Körpergewichtsverlust festzustellen (Tabelle VII: A 1, 2; B 1, 2). Diese Ergebnisse zeigten, daß die von ALA + 2,2'-DP abhängige Proto-Ansammlung von Larvensterben im Dunkeln begleitet war.

Eine drei- bis sechsstündige Belichtung der Larven, die während der 17-h-Dunkelinkubation nach dem Spritzen Proto angesammelt hatten, führte zur Zerstörung und zum Verschwinden des angesammelten Proto (Tabelle VII: A 2-4; B 2-4). Die Sterblichkeit der behandelten Larven, die der 3- oder 6stündigen Belichtung ausgesetzt worden waren, bevor sie wieder 45 bzw. 42h im Dunkeln gehalten wurden, überstieg den Grad der Dunkel-Larvensterblichkeit (Tabelle VII: A 2-4; B 2-4). Diese Art des Larvensterbens wird hierin als lichtabhängiges Larvensterben bezeichnet. Diese Form der Sterblichkeit zeigte eine signifikante Korrelation mit der Dauer der Belichtung (Tabelle VII: Spalte 6). Außerdem zeigten die die Lichtbehandlung überlebenden Larven eine signifikante Inhibition der Körpergewichtszunahme gegenüber den unbehandelten Kontrollen, die nur mit Lösungsmittel gespritzt worden waren (Tabelle VII, Spalte 7). Die Korrelation zwischen der Dauer der Nach-Behandlung-Lichteinwirkung und der Inhibition der Körpergewichtszunahme war äußerst signifikant (Tabelle VII, Spalte 7).

Insgesamt zeigten diese Ergebnisse, daß die Ansammlung von Proto neben dem Dunkel-Larvensterben zu einer lichtabhängigen oder photodynamischen Larvensterblichkeit führte. Darüber hinaus verschwand das angesammelte Proto während der Belichtung, vermutlich infolge von Photozerstörung.

#### Beispiel VI

#### Synergistische Einflüsse von ALA + 2,2'-DP auf die Proto-Ansammlung und das Larvensterben bei T. ni

Die relativen Wirkungen von ALA + 2,2'-DP auf die Protoansammlung und das Larvensterben von drittem Instar T. ni, die wie in Beispiel III behandelt und wie in Beispiel II ermittelt worden waren, werden in Tabelle VIII: A beschrieben:

Tabelle VIII:

Synergistische Einflüsse von ALA + 2,2'-DP auf die Herbeiführung von Protoansammlung und Larvensterben bei T. ni

Versuch	Nr.	Behandlung	Proto-Gehalt (nMol/100 mg Protein)	Larvensterben nach 3 Tagen im Gewächshaus (%)
A	1	Kontrolle	0	6
	2	40mM ALA	2,5	26
	3	30mM 2,2'-DP	15,5	41
	4	40mM ALA + 30mM 2,2'-DP	80,4	90
B	1	Kontrolle	0	2
	2	30mM 2,2'-DP	11	61
	3	30mM 2,2'-DP + 10mM ALA	75	86
	4	30mM 2,2'-DP + 20mM ALA	89	76
	5	30mM 2,2'-DP + 40mM ALA	73	92
C	1	Kontrolle	0	7
	2	15mM 2,2'-DP	1	22
	3	15mM 2,2'-DP + 10mM ALA	8	42
	4	15mM 2,2'-DP + 20mM ALA	34	40
	5	15mM 2,2'-DP + 40mM ALA	27	43
D	1	Kontrolle	0,2	5
	2	40mM ALA	1,1	7
	3	40mM ALA + 5mM 2,2'-DP	3,8	4
	4	40mM ALA + 10mM 2,2'-DP	6,7	18
	5	40mM ALA + 20mM 2,2'-DP	12,1	34
	6	40mM ALA + 30mM 2,2'-DP	15,3	71
Korrelation zwischen Proto-Gehalt und Larvensterben			0,857	
Signifikanzgrad				0,1%

Delta-Aminolävulinsäure alleine resultierte in einem mäßigen Grad der Proto-Ansammlung und des Larvensterbens (Tabelle VIII; A 2). Ohne zugesetzte ALA war 2,2'-Dipyridyl für die Herbeiführung von Proto-Ansammlung und Larvensterben wirksamer als ALA (Tabelle VIII: A 2, 3); d. h. ohne zugesetzte ALA wirkte 2,2'-DP als Induktor für die Proto-Ansammlung. Schließlich wurden die synergistischen Wirkungen von ALA + 2,2'-DP deutlich, wenn die beiden Chemikalien gemeinsam für die Behandlung von T. ni Larven eingesetzt wurden. Unter diesen Bedingungen lag die Proto-Ansammlung (80,4 nMol) und das Larvensterben (90%) weit über der Summe von Proto-Ansammlung (2,5 + 15,5 = 18 nMol) und Larvensterben (26 + 41 = 67%), die durch die getrennten Behandlungen mit ALA und 2,2'-DP erzielt wurden (Tabelle VIII: A 2-4).

**Beispiel VII**

**Steigerung der ALA-Umwandlung zu Protoporphyrin durch 2,2'-Dipyridyl**

Um bestimmen zu können, ob 2,2'-DP außer seinen induzierenden Eigenschaften (Tabelle VIII: A3) verstärkende Eigenschaften ausübte, wie aus Tabelle VIII: A hervorgehen könnte, wurden seine Wirkungen auf die Proto-Ansammlung und das gleichzeitige Larvensterben in Gegenwart verschiedener Mengen zugesetzter ALA untersucht. Wie in Beispiel III wurden Larven in ihrem dritten Instar gespritzt und wie in Beispiel II analysiert. Bei hoher (30mM) und mittlerer (15mM) Konzentration zeigte 2,2'-DP zusätzlich zu seinen Protoinduzierenden Eigenschaften auch verstärkende Eigenschaften. Die protoinduzierenden Eigenschaften von 2,2'-DP wurden durch die Erhöhung der Proto-Ansammlung und das gleichzeitige Larvensterben ohne zugesetzte ALA demonstriert (Tabelle VIII: B2, C2). Die verstärkenden Eigenschaften von 2,2'-DP zeigten sich durch die drastische Zunahme der Proto-Ansammlung und des Larvensterbens bei den mit ALA + 2,2'-DP behandelten Larven, und zwar infolge der erheblich verbesserten Umwandlung exogener ALA zu Proto, die über der bei einer Behandlung mit 2,2'-DP alleine lag (Tabelle VIII: B3-5, C3-5). Schließlich wird die Abhängigkeit der 2,2'-DP-verstärkenden Eigenschaften auf die 2,2'-DP-Konzentration in Tabelle VIII: D beschrieben.

Obwohl 2,2'-DP ohne zugesetzte ALA als Induktor für die Proto-Ansammlung wirkte, zeigen die obenstehenden Ergebnisse insgesamt, daß es in Gegenwart exogener ALA auch als Verstärker bei der Umwandlung von ALA zu Proto wirksam war. 2,2'-DP ist somit eine Beispiel für einen Induktor-Verstärker bei der Tetrapyrrol-Biosynthese.

**Beispiel VIII**

**Einfluß des pH-Wertes auf die von ALA + 2,2'-DP abhängige Proto-Ansammlung und das Larvensterben bei T. ni**

Delta-Aminolävulinsäure ist ein Zwitterion, d. h. seine Gesamtladung ist eine Funktion des pH-Wertes. Da sein isoionischer Punkt bei einem pH-Wert von 6,47 liegt, erreicht es eine positive Ladung unter 6,47 und eine negative Ladung über diesem pH-Wert. Da die Translokation von Zwitterionen in biologische Gewebe durch die Stärke der elektrischen Gesamtladung am Ion beeinflußt wird, wurde der Einfluß dieses Parameters auf die Translokation von ALA und 2,2'-DP in die behandelten Larven untersucht. Das Ausmaß der Translokation von ALA und 2,2'-DP in die T. ni Larven wurde vom Ausmaß der Proto-Ansammlung und das Larvensterbens abgeleitet.

T. ni Larven im dritten Instar wurden nach der Verfahrensweise von Beispiel III mit 30nM 2,2'-DP + 40mM ALA-Lösungen bei pH 3,5 und 5,5 (ALA positiv geladen) und pH 7,5 (ALA negativ geladen) gespritzt. Wie gewöhnlich wurden die Kontrollen nur mit Lösungsmittel gespritzt. Nach der 17-h-Dunkelinkubationsperiode nach der Behandlung wurden einige der Larven zur Proto-Bestimmung nach der Verfahrensweise von Beispiel II extrahiert, während Duplikatproben im Gewächshaus dem Licht ausgesetzt wurden. Das Larvensterben wurde nach 3 Tagen im Gewächshaus ermittelt. Die Ergebnisse sind in Tabelle IX enthalten.

**Tabelle IX**

Einfluß des pH-Wertes auf die von ALA + 2,2'-DP abhängige Proto-Ansammlung in T. ni Larven

Versuch	Nr.	Behandlung	Proto-Gehalt (nMol/100mg Protein)	Larvensterben nach 3 Tagen im Gewächshaus (%)
A	1	Kontrolle	0,1	3
	2	Behandelt, pH 3,5	85,0	81
	3	Behandelt, pH 5,5	73,8	85
	4	Behandelt, pH 7,5	108,5	80
B	1	Kontrolle	0,0	1
	2	Behandelt, pH 3,5	96,7	75
	3	Behandelt, pH 5,5	110,4	82
	4	Behandelt, pH 7,5	73,7	85
Korrelationskoeffizient			0,007 <sup>a</sup>	0,540 <sup>b</sup>
Signifikanzgrad			n. s.	n. s.

a Korrelation zwischen pH-Wert und Proto-Gehalt bei mit ALA + 2,2'-DP behandelten Larven

b Korrelation zwischen pH-Wert und Larvensterben bei mit ALA + 2,2'-DP behandelten Larven

Wie aus Tabelle IX hervorgeht, wurden erhebliche Mengen Proto von den behandelten Larven bei allen pH-Werten gebildet. Das Sterben der Larven war gleichfalls bei allen pH-Werten beträchtlich. Zwischen pH 3,5 und 7,5 schien weder die Proto-Ansammlung noch das Larvensterben mit dem pH-Wert in Beziehung zu stehen. Insgesamt zeigten diese Ergebnisse, daß die Translokation von ALA + 2,2'-DP in T. ni Larven und die anschließende Umwandlung von ALA in Proto durch Larven nicht genau vom pH-Wert im Bereich von 3,5 bis 7,5 abhängig waren.

**Beispiel IX**

**Abhängigkeit des Larvensterbens bei mit ALA + 2,2'-DP behandelten T. ni vom Alter der Larven**

Es wurde die Abhängigkeit des Larvensterbens bei mit ALA + 2,2'-DP behandelten T. ni vom Alter der behandelten Larven untersucht. T. ni Larven im ersten, zweiten, dritten und vierten Instar wurden mit 40mM ALA + 30mM 2,2'-DP mit einem pH-Wert von 3,5 wie in Beispiel III behandelt. Nach einer 17-h-Dunkelinkubationsperiode wurden die behandelten und die Kontrollarven im Gewächshaus dem Licht ausgesetzt. Das Larvensterben wurde nach 3 Tagen im Gewächshaus ermittelt. Die Ergebnisse sind in Tabelle X enthalten:



**Tabelle X**

Abhängigkeit der Empfindlichkeit von T. ni bei der ALA + 2,2'-DP-Behandlung vom Instar der behandelten Larven

Versuch	Nr.	Instar <sup>a</sup>	Larvensterben über die Kontrollen hinaus nach 3 Tagen im Gewächshaus (%)
A	1	1	76
	2	2	42
	3	3	43
B	1	1	64
	2	2	63
	3	3	27
C	1	2	75
	2	3	28
	3	4	11
D	1	2	70
	2	3	23
	3	4	11
Korrelationskoeffizient zwischen der Einstufung des Instar und dem Larvensterben			0,397
Signifikanzgrad			0,1%

a 1, 2, 3 bezieht sich auf erstes, zweites bzw. drittes Instar

Tabelle X zeigt, daß die Empfindlichkeit von T. ni gegenüber der Behandlung mit ALA + 2,2'-DP der Einstufung des Instar umgekehrt proportional war, wobei die jungen ersten Instar-Larven am empfindlichsten waren und die älteren vierten Instar am wenigsten empfindlich waren.

Um bestimmen zu können, ob die Empfindlichkeit gegenüber der Behandlung mit ALA + 2,2'-DP vom Entwicklungsstadium innerhalb eines bestimmten Instar abhängig ist, wurden T. ni Larven in den ersten, mittleren und letzten Stadien von dritten und vierten Instars mit ALA + 2,2'-DP wie oben behandelt. Die Ergebnisse sind in Tabelle XI enthalten:

**Tabelle XI**

Abhängigkeit der Empfindlichkeit bei T. ni gegenüber ALA + 2,2'-DP vom Entwicklungsstadium innerhalb eines bestimmten Instar

Versuch	Nr.	Stadium des Instar	Empfindlichkeits-Einstufung	Larvensterben über die Kontrollen nach 3 Tagen im Gewächshaus hinaus	
				vor Normalisierung (%)	nach Normalisierung (%)
A	1	mittleres drittes	1	47	52
	2	frühes drittes	2	60	66
	3	spätes drittes	3	91	100
B	1	mittleres drittes	1	47	92
	2	frühes drittes	2	39	76
	3	spätes drittes	3	51	100
C	1	mittleres viertes	1	21	57
	2	frühes viertes	2	18	49
	3	spätes viertes	3	27	100
D	1	mittleres viertes	1	26	54
	2	frühes viertes	2	35	73
	3	spätes viertes	3	48	100
Korrelation zwischen dem Entwicklungsstadium innerhalb einer Instar und dem Larvensterben				0,739	
Signifikanzgrad				1%	

Die Ergebnisse zeigen, daß bei einem bestimmten Instar das späte Stadium das empfindlichste war, worauf das frühe bzw. mittlere Stadium folgte. Das läßt darauf schließen, daß die Larven um so empfindlicher gegen die ALA + 2,2'-Behandlung waren, je mehr sie sich der Apolyse näherten (Abtrennung der Kutikula von der Epidermis). Die mittleren, frühen und späten Stadien in jedem betreffenden Instar wurden mit einer Einstufung von 1, 2 oder 3 bezeichnet, wobei „1“ das am wenigsten empfindliche Stadium und „3“ das empfindlichste Stadium bezeichnet. Um statistische Differenzen in der Empfindlichkeit zwischen dem dritten und vierten Instar (siehe Tabelle X) auszuschalten, wurden alle Prozentangaben von toten Larven innerhalb jedes Experiments auf den gleichen Wert normalisiert. Letzterer wurde mit 100 gewählt und stellte das prozentuale Sterben im späten Stadium innerhalb jedes Instar dar (Tabelle XI, letzte Spalte). Auf diese Weise wurde es möglich, die Beziehung zwischen dem Larvensterben und dem frühen, mittleren und späten Stadium des Instar, ungeachtet der Einstufung des Instar, zu testen.

Wie aus Tabelle XI hervorgeht, war diese Beziehung äußerst signifikant, wobei das frühe und mittlere Stadium des Instar weniger empfindlich gegenüber der ALA + 2,2'-DP-Behandlung als das späte Stadium des Instar war. Diese Periode der maximalen Empfindlichkeit entspricht der Periode, in der die Larven bewegungslos sind und die neue Kutikula für das nächste Instar aktiv unter der alten Kutikula synthetisiert wird.

**Beispiel X**

**Beziehung zwischen Larvenarten, ALA + 2,2'-DP-abhängiger Proto-Ansammlung und Larvensterben**

Zur Ermittlung, ob die von ALA + 2,2'-DP-abhängige Proto-Ansammlung und das Larvensterben allgemeine Erscheinungen bei allen Insektenlarven waren oder für einige bestimmte Insektenarten spezifisch waren, wurde eine Untersuchung der Reaktion verschiedener Larvenarten auf die ALA + 2,2'-DP-Behandlung durchgeführt.

Kolonien des Getreidebohrers *Heliothis zea* (Boddi) (Lepidoptera: Noctuidae) wurden aus von Dr. Gilbert Waldbauer, in der Abteilung für Entomologie der Universität von Illinois in Urbana-Champaign, gelieferten Eiern gezüchtet. Die Larven erhielten das gleiche Futter wie die *T. ni* oben.

Die Larven von *H. zea* wurden wie in Beispiel III gespritzt; im Gegensatz zu *T. ni* waren die Larven von *H. zea* jedoch kannibalisch und mußten anders behandelt werden. Fünfundzwanzig 1 cm lange Larven (Mischung von drittem und viertem Instar) wurden einzeln mit einem Futterwürfel in einzelne Fächer (3 cm × 5 cm × 1,5 cm) eines 25zelligen Plastebehälters (Bioserve, Inc. Frenchtown, NJ 08825) gesetzt. Um die Larven in ihren betreffenden Fächern zu halten, wurde der Plastebehälter mit einer Glasplatte abgedeckt. Die Glasplatte wurde vor dem Spritzen abgenommen und anschließend sofort wieder aufgelegt. Das Spritzen erfolgte wie für die *T. ni* beschrieben. Die gespritzten Behälter wurden mit einer Glasplatte abgedeckt, bevor sie 17 h lang bei 25°C im Dunkeln gehalten wurden.

Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle XII enthalten:

**Tabelle XII**

Abhängigkeit der ALA + 2,2'-DP-abhängigen Proto-Ansammlung und des Larvensterbens von den Larvenarten

Versuch	Behandlung von <i>H. zea</i>	Proto-Gehalt (nMol/100 mg Protein)	Larvensterben bei <i>H. zea</i> nach 3 Tagen im Gewächshaus (%)
A	Kontrolle	0	0
	behandelt	2,5	7
	Veränderung	2,5	7
B	Kontrolle	0	0
	behandelt	1,4	33
	Veränderung	1,4	33

Die Behandlungen mit 40 mM ALA + 30 mM 2,2'-DP, die zu beträchtlichen Ausmaßen der Proto-Ansammlung und signifikantem Larvensterben bei *T. ni* führten (Tabellen VI bis IX), resultierten in einem geringen Grad der Proto-Ansammlung bei *H. zea*. Das Larvensterben war auch viel geringer als bei *T. ni* (Tabelle XII). Zur Zeit ist noch nicht bekannt, ob die geringere Rate der Proto-Ansammlung und die gleichzeitig geringere Rate des Larvensterbens bei mit ALA + 2,2'-DP behandelten *H. zea* gegenüber *T. ni* (a) auf Unterschiede in der Translokation der angewandten Chemikalien auf die inneren Gewebe des Insekts oder (b) auf einige grundlegendere biochemische Unterschiede in der Regulierung des Porphyrin-Häm-Weges zwischen zwei Arten zurückzuführen ist. Bei mit ALA + 2,2'-DP behandelten *T. ni* wird das meiste Proto in der Hämolymphe angesammelt. Daraus kann auf eine ausreichende Translokation von ALA + 2,2'-DP an die vorgesehenen Stellen geschlossen werden. Ob auch eine Translokation dieser Chemikalien an die inneren Gewebe von *H. zea* erfolgt, ist nicht bekannt.

Aus diesen Ergebnissen geht hervor, daß einige Larvenarten gegenüber der ALA + 2,2'-DP-Behandlung empfindlicher sind als andere. Da es sehr erwünscht ist, schädliche Insekten zu vernichten und dabei nützliche zu schonen, sollte die unterschiedliche Suszeptibilität verschiedener Insektenarten gegenüber porphyrischen Insektiziden bei der Entwicklung arten-spezifischer porphyrischer Insektizide ausgenutzt werden.

**Beispiel XI**

**Wirksamkeit der ALA + 2,2'-DP-Behandlung ohne Dunkelperiode nach dem Spritzen**

Zweite Instar-Larven von *T. ni* wurden mit ALA + 2,2'-DP gespritzt und einer 17-h-Dunkelinkubationsperiode unterzogen, bevor sie im Gewächshaus dem Licht ausgesetzt wurden (Dunkel-Spritzung). Ähnliche Larven wurden mit ALA + 2,2'-DP im Gewächshaus zu Beginn der Lichtphase einer 14-h-Helligkeit-10-h-Dunkelheit-Photoperiode gespritzt (Hell-Spritzung). Die Ergebnisse der vier Experimente sind in Tabelle XIII enthalten:

**Tabelle XIII**  
Vergleich der Wirksamkeit von ALA + 2,2'-DP-Hell-Spritzungen mit Dunkel-Spritzungen bei T. ni

Versuch	Behandlung	Larvensterben nach 3 Tagen im Gewächshaus (%)
A	DSP Kontrolle	21
	DSP 20mM ALA + 15mM 2,2'-DP	90
	DSP Δ-Veränderung	69
B	LSP Kontrolle	25
	LSP 20mM ALA + 15mM 2,2'-DP	94
	LSP Δ-Veränderung	69
C	DSP Kontrolle	14
	DSP 40mM ALA + 30mM 2,2'-DP	93
	DSP Δ-Veränderung	79
D	LSP Kontrolle	5
	LSP 40mM ALA + 30mM 2,2'-DP	83
	LSP Δ-Veränderung	78

worin „DSP“ = Dunkelspritzung, „LSP“ = Hellspritzung bedeuten. Die Hellspritzungen waren für das Larvensterben genauso wirksam wie die Dunkelspritzungen. Auch diese Ergebnisse waren den in USSN 825.529 angeführten Ergebnissen der photodynamischen Dunkel- und Hell-Herbizidbehandlungen sehr ähnlich.

#### Beispiel XII

##### 1,10-Phenanthroling als Induktor/Verstärker

Zur Ermittlung, ob Chemikalien, die bei Pflanzen induzierende und verstärkende Tetrapyrrol-Eigenschaften zeigten, ähnliche Eigenschaften bei Insekten zeigen würden, wurde der Einfluß von verschiedenen bekannten Verstärkern und Induktoren für die Tetrapyrrol-Ansammlung in Pflanzen hinsichtlich der Tetrapyrrol-Ansammlung bei T. ni untersucht. Dritte Instar-Larven von T. ni wurden mit einer Lösung von 40mM ALA + 30mM 1,10-PA nach der in Beispiel III für ALA + 2,2'-DP beschriebenen Weise gespritzt. Die Kontroll- und behandelten Larven wurden wie in Beispiel II beschrieben behandelt und analysiert. Die Ergebnisse dieser Experimente sind in Tabelle XIV wiedergegeben:

**Tabelle XIV**

Synergistische Einflüsse von ALA + 1,10-PA auf die Herbeiführung der Ansammlung von Proto- und Zn-Proto und das Larvensterben bei T. ni

Versuch	Nr.	Behandlung	nMol/100mg Protein		Larvensterben nach 3 Tagen im Gewächshaus (%)
			Proto-Gehalt	Zn-Proto-Gehalt	
A	1	Kontrolle	0,19	0	0
	2	40mM ALA	3,18	0	16,8
	3	30mM 1,10-PA	35,26	4,45	69,6
	4	40mM ALA + 30mM 1,10-PA	151,92	3,75	93
B	1	Kontrolle	0	0	6,1
	2	40mM ALA	2,08	0	5,3
	3	30mM 1,10-PA	18,55	1,08	74,7
	4	40mM ALA + 30mM 1,10-PA	227,77	6,15	93,3
Korrelationskoeffizient			0,78 <sup>a</sup>	0,862 <sup>b</sup>	
Signifikanzgrad			5%	1%	

a Korrelation zwischen Larvensterben und Proto-Ansammlung

b Korrelation zwischen Larvensterben und Zn-Proto-Ansammlung

Wie auch bei 2,2'-DP beobachtet wurde (Tabelle VIII), zeigte 1,10-PA sehr starke Tetrapyrrol-induzierende-verstärkende-Eigenschaften, wie durch den sehr starken Synergismus bei der Proto-Ansammlung gezeigt wurde, der bei der gleichzeitigen Verwendung von ALA und 1,10-PA zu verzeichnen war.

Außer der massiven Ansammlung von Proto resultierte die Behandlung mit 1,10-PA mit oder ohne ALA in der Bildung geringerer Mengen von Zn-Proto. Die Korrelation zwischen Zn-Proto-Ansammlung und Larvensterben war äußerst signifikant. Daraus konnte gefolgert werden, daß die Bildung von Zn-Proto irgendwie mit dem Larvensterben in enger Beziehung steht.

Andere Experimente hatten das Ziel, zu ermitteln, ob Zn-Proto tatsächlich enzymatisch gebildet wurde oder nicht. Beispielsweise resultierte die Zugabe von 1,10-PA zu Proto, gelöst in 80%igem Aceton, nach 17-stündiger Inkubation nicht in der Bildung von Zn-Proto. Bei anderen Experimenten wurden lebende und tote Larven von T. ni mit 40mM ALA + 30mM 1,10 PA genau nach der Beschreibung in Tabelle XIV behandelt. Die toten Larven waren durch 5 Minuten Sieden in Wasser von 100°C vor dem Spritzen getötet worden. Die Ergebnisse enthält Tabelle XV:

**Tabelle XV**  
Einfluß der ALA + 1,10-PA-Behandlung auf die Zn-Proto- und Proto-Ansammlung in lebenden gegenüber toten Larven von *T. ni*

Versuch	Nr.	Behandlung	nMol/100mg Protein		Larvensterben nach 3 Tagen im Gewächshaus (%)
			Proto-Gehalt	Zn-Proto-Gehalt	
A	1	Kontrolle	0	0	0
	2	Tote Larven behandelt mit 40mM ALA + 30mM 1,10-PA	0	0	-
	3	Lebende Larven behandelt mit 40mM ALA + 30mM 1,10-PA	242,7	3,25	93,4
B	1	Kontrolle	0,11	0	0
	2	Tote Larven behandelt mit 40mM ALA + 30mM 1,10-PA	0	0	-
	3	Lebende Larven behandelt mit 40mM ALA + 30mM 1,10-PA	251,23	4,43	100

Wie gezeigt, waren nur lebende Insekten mit aktivem Metabolismus in der Lage, Proto und Zn-Proto anzusammeln. Insgesamt zeigen diese Ergebnisse doch deutlich, daß die Bildung von Proto und Zn-Proto durch die behandelten Insekten eine Folge von enzymatischer Aktivität war.

**Beispiel XIII**

**Verabreichung der ALA + 1,10-PA Behandlung im Futter**

Unter bestimmten Feldbedingungen ist es manchmal besser, ein Insektizid als Köder und nicht als Spritzmittel anzuwenden. Die folgenden Experimente wurden daher durchgeführt, um die Wirksamkeit porphyrischer Insektizide zu demonstrieren, wenn sie als Köder eingesetzt wurden.

Bei einem Experiment wurden Futterwürfel von Waldbauers Medium mit einer Gesamtmenge von 1,5ml pro 10ml festes Futter gespritzt. Ein Drittel des Volumens wurde auf einmal gespritzt. Die Futterwürfel wurden getrocknet, dann wurde der Vorgang noch zweimal wiederholt. Unbehandelte Larven wurden dann mit dem behandelten Futter 17 Stunden lang im Dunkeln gehalten. Alternativ wurden die Larven zusammen mit ihrem Futter genau wie in Beispiel III gespritzt. Die Ergebnisse sind in Tabelle XVI enthalten:

**Tabelle XVI**

Einfluß der Zugabe von ALA + 1,10-PA zum Futter auf das Sterben von *T. ni*

Nr.	Behandlung	Larvensterben innerhalb der ersten 8 min bei Licht (%)	Larvensterben nach 3 Tagen im Gewächshaus (%)
1	Kontrolle	0	2,2
2	Nur Futter mit 40mM ALA + 30mM 1,10-PA gespritzt	62,5	95,9
3	Futter und Insekt mit 40mM ALA + 30mM 1,10-PA gespritzt	91,2	96,7

Wie zu sehen ist, war die Anwendung der Chemikalien nur mit dem Futter ebenso wirksam für das Larvensterben, wie das Spritzen von Insekt und seinem Futter. Außerdem konnte beobachtet werden, daß der größte Teil des Larvensterbens bei Insekten, die das behandelte Futter aufgenommen hatten, in den ersten 8 Minuten der Lichteinwirkung erfolgte, wobei erhebliches Sterben in den ersten 2 Minuten bei Licht zu verzeichnen war.

Bei einem anderen Versuch wurden die ALA und 1,10-PA in einer Menge von 16 bzw. 12 mM in das Futter eingemischt. Das Futter wurde mit der ALA und 1,10-PA 5 Minuten lang bei 37°C in einem Mischer vermischt. Die Larven wurden 17 Stunden lang in der Dunkelheit auf dem vorbereiteten Futter gehalten, bevor sie dem Licht ausgesetzt wurden. Die Ergebnisse sind in Tabelle XVII enthalten.

**Tabelle XVII**  
Einfluß von ALA + 1,10-PA-Zugabe zum Futter auf das Larvensterben von T. ni

Nr.	Behandlung	Larvensterben innerhalb der ersten 8 min bei Licht (%)	Larvensterben nach 3 Tagen im Gewächshaus (%)
1	Kontrolle	0	4
2	Futter, das 16 mM ALA + 12 mM 1,10-PA enthält	91,9	100

Bei einem anderen Experiment wurde das Futter in einem Konvektionsofen erhitzt, und die ALA und 1,10-PA wurden dann bei 57°C zu dem erwärmten Futter gegeben. Die Mischung wurde dann 45 Sekunden lang in einem Sorval Omnimixer (Omni Co. International, CT 06706) vermischt. Die Ergebnisse enthält Tabelle XVIII:

**Tabelle XVIII**  
Einfluß von ALA + 1,10-PA-Zugabe zum Futter auf das Larvensterben von T. ni

Nr.	Behandlung	Larvensterben innerhalb der ersten 8 min bei Licht (%)	Larvensterben nach 3 Tagen im Gewächshaus (%)
1	Kontrolle	0	14,5
2	16 mM ALA enthaltendes Futter	0	5,2
3	12 mM 1,10-PA enthaltendes Futter	0	40,4
4	16 mM ALA + 12 mM 1,10-PA enthaltendes Futter	94,4	94,4

Wie in Tabelle VII (2) und VIII (4) gezeigt wird, resultierte das Einmischen der Chemikalien in das Futter in einer ausgezeichneten Maßnahme für das Larvensterben. Es wurde der gleiche Synergismus zwischen ALA und 1,10-PA beobachtet wie bei der Anwendung der beiden Chemikalien als Spritzmittel (Tabelle XV im Vergleich zu Tabelle VIII). Insgesamt geht aus diesen Ergebnissen hervor, daß porphyrische Insektizide sowohl als Spritzmittel als auch als Köder wirksam sein können.

**Beispiel XIV**

**Verabreichung von Auslöser und/oder Verstärker alternativ**

Waldbauers Medium wurde in einem Konvektionsofen auf 57 bis 65°C erwärmt und mit 4 mM ALA und 3 mM einer der verschiedenen Testverbindungen vereinigt. Das Gemisch wurde dann 2 Minuten in einem Sorval-Omnimixer vermischt. T. ni-Larven wurden mit der behandelten Nahrung in der Dunkelheit über 17 Stunden wie oben gehalten. Am Ende des Dunkelzeitraumes (vor dem Aussetzen an Licht) und nach drei Tagen im Gewächshaus wurde der Larventod bestimmt. Eine Kontrollbestimmung an nicht behandelter Nahrung erfolgte für jede getestete Verbindung. Die Ergebnisse sind in Tabelle XIX aufgeführt:

**Tabelle XIX**  
Wirkung von ALA + verschiedenen alternativen Auslösern und/oder Verstärkern in der Nahrung an Hand des Todes von T. ni Larven

	Kontrolle	Larventod am Ende des Dunkelzeitraumes %	Larventod nach 3 Tagen im Gewächshaus %
1,10-Phenanthrolin	0	0	100
4,7-Dimethyl-1,10-phenanthrolin	0	0	100
4-Methyl-1,10-phenanthrolin	0	0	99
5-Nitro-1,10-phenanthrolin	0	0	99
5-Methyl-1,10-phenanthrolin	0	0	97
5,6-Dimethyl-1,10-phenanthrolin	0	0	97
4,7-Diphenyl-1,10-phenanthrolin	0	0	97
5-Chlor-1,10-phenanthrolin	0	0	96
3,4,7,8-Tetramethyl-1,10-phenanthrolin	0	0	85
2,2'-Dithiobis(pyridin N-oxid)	0	0	73
4,4'-Dimethyl-2,2'-dipyridyl	0	0	71
Phenyl 2-pyridyl ketoxim	0	0	71
2,2'; 6',2"-Terpyridin	0	0	70
4,7-Dihydroxy-1,10-phenanthrolin	0	0	49

Tabelle XIX (Forts.)

	Kontrolle	Larventod am Ende des Dunkel- zeitraumes %	Larventod nach 3 Tagen im Gewächshaus %
2,9-Dimethyl-4,7-diphenyl-1,10-phenanthrolin	0	0	39
Niflumsäure	0	0	35
N-Benzyl-N-nicotinoylnicotinamid	0	0	34
Dimidiumbromid-Monohydrat	0	0	24
Nicotinsäure	0	0	22
Ethidiumbromid	0	0	16
Phenanthren	0	0	13
Ethynicotin	0	0	9
3-Hydroxypicolinsäure	0	0	9
Bathocuproindisulfonsäure	0	0	8
2-Hydroxynicotinsäure	0	0	8
4-Hydroxy-7-methyl-1,18-naphthylidin-3-carbonsäure	0	0	8
1-Isochinolincarbonsäure	0	0	6
Picolinsäure	0	0	5
2-Hydroxy-6-methylpyridin-3-carbonsäure	0	0	4
N-Methylnicotinamid	0	0	4
Benzylviologendichlorid-Monohydrat	0	0	0
1,1-Diheptyl-4,4'-dipyridinium-Dibromid	0	0	0
4-Hydroxy-7-trifluormethyl-3-chinolincarbonsäure	0	3	16
Diethyl-3,4-pyridindicarboxylat	0	3	11
Methylnicotinat	0	1	9

Wiederholte Versuche mit 4 mM ALA allein ergab den Tod der Larven nach drei Tagen im Gewächshaus, die durchweg zwischen 0 und 5% liefen. Somit zeigen die obigen Ergebnisse klar, daß 1,10-Phenanthrolin; 4,7-Dimethyl-1,10-phenanthrolin; 4-Methyl-1,10-phenanthrolin; 5-Nitro-1,10-phenanthrolin; 5-Methyl-1,10-phenanthrolin; 5,6-Dimethyl-1,10-phenanthrolin; 5-Chlor-1,10-phenanthrolin; 3,4,7,8-Tetramethyl-1,10-phenanthrolin; 2,2'-Dithiobis(pyridin-N-oxid); 4,4'-Dimethyl-2,2'-dipyridyl; Phenyl-2-pyridylketoxim; und 2,2':6',2"-Terpyridin als Auslöser und/oder Verstärker von ALA wirken und effektive Licht-aktive Insektizide sind.

#### Beispiel XV

##### Wirkung von ALA und 1,10-Phenanthrolin auf Larven von *Mamestra brassicae*

Die Wirkung von aufgenommenem Insektizid, das ALA und 1,10-Phenanthrolin enthielt, wurde an Larven von *Mamestra brassicae* untersucht, einem wichtigen Schädling in kreuzblütigen Pflanzen.

Die Nahrung wurde in einem rostfreien Stahlkessel unter Einsatz eines Kenwood Küchenmixers wie folgt hergestellt:

(1) 1530 ml entmineralisiertes Wasser, 504 g gemahlener Mais (maximale Teilchengröße 1 mm), 135 g Brauereihefe und 135 g Weizenkeime wurden bei Zimmertemperatur miteinander vereinigt.

(2) 5,4 g Parahydroxymethylbenzoesäure wurden in 12 ml Ethanol bei 90°C verdünnt, und die gesamten 12 Milliliter wurden zum Gemisch von Stufe (1) oben gegeben.

(3) 1530 ml Wasser wurden mit 72 g Agar und 6 g Benzoesäure zusammengegeben und das Gemisch zum Kochen gebracht. Dann ließ man das Gemisch auf 70°C abkühlen und zu dem aus Stufe (2) oben erhaltenen Gemisch hinzugeben.

(4) Das aus Stufe (3) oben erhaltene Gemisch ließ man auf 40°C abkühlen. Dann wurden 18 g Ascorbinsäure als Oxidationshemmer hinzugegeben.

(5) Das erhaltene Gemisch wurde homogenisiert und zur Verwendung als Standardnahrung gelagert.

Die behandelte Nahrung wurde durch Lösen einer entsprechenden Menge an aktiven Bestandteilen bzw. aktiven Bestandteilen in Ethanol und Hinzusetzen von 1 ml dieser Lösung zu 9 ml entmineralisiertem Wasser hergestellt. Die gesamten 10 ml der erhaltenen Ethanol:Wasser- (1:9 Vol./Vol.-) Lösung, die die entsprechende Menge an aktiven Bestandteile(n) enthielt, wurde anschließend zu dem Gemisch gegeben, das man nach Stufe (3) oben erhalten hatte, also vor Zugabe der Ascorbinsäure.

Kolonien von *M. brassicae* wurden mit unbehandelter Standardnahrung massengezchtet. Nach Erreichen des dritten Stadiums der Larven wurden Gruppen von jeweils 20 Larven von der Standardnahrung auf verschiedene Testnahrungen umgesetzt, die die aktiven Bestandteile enthielten. Die Schalen wurden in Aluminiumfolie eingeschlagen, und dann ließ man die Larven von der Testnahrung nach Bedarf über einen Zeitraum von 16 Stunden in der Dunkelheit fressen. Danach wurde die Folie entfernt, und die Larven wurden künstlichem Licht ausgesetzt (400 Watt Quecksilberdampflampe bei 50 cm). Die Kontrollgruppe wurde mit unbehandelter Nahrung gefüttert. Die Ergebnisse sind aus Tabelle XX zu entnehmen.

**Tabelle XX**  
Wirkung von ALA und 1,10-Phenanthrolin auf Larven von *M. brassicae*

	% Mortalität	
	vor dem Aussetzen an Licht	nach dem Aussetzen an Licht für 2 min
16mM ALA + 12mM 1,10-Phenanthrolin	0	100
2mM ALA + 1,5mM 1,10-Phenanthrolin	0	100
Kontrolle	0	0

Die Lichtwirkung ist dramatisch: unmittelbar nach dem Aussetzen an Licht begannen sich die Insekten zu krümmen und starben. Innerhalb von zwei Minuten wurden 100% der behandelten Insekten getötet. Dieser Versuch wurde dreimal mit identischen Ergebnissen wiederholt.

**Beispiel XVI**

**Wirkung von ALA und 6-Aminonicotinamid auf die adulte Form von *Blattella germanica***

Die Wirkung von aufgenommenem Insektizid, das ALA und 6-Aminonicotinamid enthielt, wurde an dem Haushaltsschädling *Blattella germanica* (Deutsche Küchenschabe) getestet.

Die Standardnahrung, bestehend aus einem Gemisch gemahlener Körner (Mais, Weizen, Reis und Weizenkleie), Rohrzucker, Sojaprotein, Eier, Fenchelextrakt, vollständiges Futter für Laboratoriumsmäuse und entmineralisiertem Wasser.

Die behandelte Nahrung wurde durch Lösen einer entsprechenden Menge der (des) aktiven Bestandteile(s) in Ethanol, Vereinigen von 1 Teil dieser Ethanollösung mit 19 Teilen Wasser und Hinzusetzen von 1 ml der erhaltenen Lösung zu 5g der Nahrung hergestellt. Vor der Verwendung ließ man das Futter trocknen.

Auf einer unbehandelten Standardnahrung wurden Kolonien von *B. germanica* bis zur adulten Form massenvermehrt. An einem frühen Nachmittag im November in Marseilles (Frankreich), wurden 10 adulte Männchen in jede der drei Petrischalen zusammen mit 5g von einer der Testnahrungen gegeben. Man ließ die Schalen oben auf dem Arbeitstisch stehen, wo sie gewöhnliches Zimmerlicht (fluoreszierendes und Tageslicht) für den Rest des Tages erhielten (etwa 3,5 Stunden). Man ließ die Schalen weiter unter gewöhnlichen Zimmerbedingungen (Umgebungslicht und -temperatur) vier Tage stehen, um übliche Haushaltsbedingungen zu simulieren. Man setzte sie der natürlichen Dunkelheit während jeder Nacht für etwa 13 Stunden und dem Umgebungslicht für etwa 11 Stunden während jeden Tages aus. Eine vierte Schale mit Kontrolltieren wurde mit (unbehandelter) Standardnahrung versehen. An jedem Nachmittag erfolgten Mortalitätszählungen. Die Ergebnisse sind aus der Tabelle XXI zu entnehmen.

**Tabelle XXI**

Wirkung von ALA und 6-Aminonicotinamid auf die adulte Form von *Blattella germanica*

Aktiver Bestandteil	Konzentration (mg/g Nahrung)	% Mortalität			
		ausgesetzte Tage			
		1	2	3	4
Kontrolle	0	0	0	0	0
ALA	1	0	0	0	0
6-Aminonicotinamid	1	0	0	0	0
ALA + 6-Aminonicotinamid	1 + 1	50	70	90	100

Diese Ergebnisse zeigen, daß 6-Aminonicotinamid ein wirksamer Auslöser und/oder Verstärker von ALA ist und insektizide Zusammensetzungen der vorliegenden Erfindung wirksam gegen Insekten unter gewöhnlichen Innenraumverhältnissen von Umgebungslicht und Dunkelheit sind.

Die chemische Induktion von Insektenlarven, Proto und Zn-Proto anzusammeln, die zum Larvensterben bei Dunkelheit und Tageslicht führt, bietet neuartige insektizide Zusammensetzungen und Methoden. Es wird vorgeschlagen, daß sich der Begriff „porphyrische Insektizide“ auf diese Erscheinung beziehen soll. Bei Licht verschwindet das angesammelte Proto und Zn-Proto innerhalb von Stunden aus dem Insektengewebe. Dieses Vorgehen ist der in USSN 895.529 gezeigten Entwicklung photodynamischer Herbizide ähnlich. Allerdings traten die den mit diesen Herbiziden behandelten Pflanzen zugefügten Schädigungen nur bei Tageslicht ein und sie waren ausschließlich photodynamischer Natur. Außerdem waren die am stärksten schädigenden Tetrapyrrole Mg-Tetrapyrrole, die zu dem biosynthetischen Chl-Weg gehörten.

Es wird angenommen, daß der Mg-Zweig des biosynthetischen Tetrapyrrol-Weges, der zur Chl-Biosynthese führt, in Insekten nicht funktioniert. Folglich kann die Biosynthese von Mg-enthaltenden Zwischenverbindungen des biosynthetischen Chl-Weges in mit ALA oder mit ALA + 2,2'-DP behandelten *T. ni* nicht nachgewiesen werden. Daher stammen die chlorophyllartigen Pigmente, die den Larven ihre gelblich-grüne Färbung verleihen, aller Wahrscheinlichkeit nach von den chlorophyllartigen Pigmenten des Futters (Tabellen II, III, IV). Alle Insekten enthalten jedoch Cytochrome, die als Elektronenträger bei der oxydativen Phosphorylierung wirken. Zur Zeit nimmt man an, daß die Häm-Komponente von Cytochromen von Proto gebildet wird, das seinerseits von ALA über den biosynthetischen Porphyrin-Weg gebildet wird (Fließschema A oben). Die ALA-abhängige Ansammlung von Proto und Zn-Proto durch *T. ni* stimmt mit dieser Hypothese vollkommen überein.

Im Gegensatz zu den Beobachtungen bei Pflanzen ist die Dunkel-Ansammlung von Proto in *T. ni* von Larvensterben in der Dunkelheit begleitet (Tabelle VII). Bei Licht scheint eine beträchtliche Zunahme von Proto nicht unbedingt zu erfolgen, wohl aber für das Auftreten photodynamischer Schädigung erforderlich zu sein (Tabellen VII, XIII). Diese Schlußfolgerung beruht auf zwei Beobachtungen: (a) Bei Helligkeit ist keine massive Ansammlung von Proto zu beobachten, wahrscheinlich als Folge der dauernden Photozerstörung des biosynthetisierten Proto (Tabelle VII), und (b) Hell-Spritzungen (die keine Dunkel-Inkubationsperiode nach dem Spritzen einschließen, während der sich Proto ansammeln könnte) waren für die Herbeiführung

des Larvensterbens ebenso wirksam wie Dunkel-Spritzungen, die eine solche Dunkel-Inkubationsperiode nach dem Spritzen vor der Einwirkung von Tageslicht umfaßten (Tabelle XIII). Insgesamt geht aus diesen Ergebnissen hervor, daß für das Eintreten photodynamischer Schädigungen bei behandelten Insekten eine dauernde Bildung kleiner Mengen von Proto in Rate<sup>n</sup> erforderlich ist, die gerade für die Einleitung schädigender Kettenreaktionen freier Radikale groß genug sind.

Eines der Hauptprobleme, mit dem die Insektizidindustrie konfrontiert wird, ist die alarmierende Geschwindigkeit, mit der die Insekten Resistenz gegenüber Insektiziden entwickeln. Gewöhnlich ist das eine Folge von Mutationen, die den Entgiftungsmechanismus von Insekten verstärken oder die lipophilen Eigenschaften des Toxins verändern können und dadurch seine Membranpermeabilität reduzieren. Das führt seinerseits zu einer beträchtlichen Verkürzung der nützlichen Haltbarkeitsdauer neu eingeführter Insektizide und senkt deren wirtschaftlichen Wert. Da die erfindungsgemäße chemische Abwandlung des Porphyrin-Häm-Weges mehr als einen metabolischen Schritt zu umfassen scheint, nimmt man an, daß es für Insekten schwieriger ist Resistenz gegenüber porphyrischen Insektiziden zu entwickeln. Selbst wenn es einigen der Insekten gelingen sollte, Resistenz gegenüber der Tetrapyrrol-Ansammlung zu entwickeln, indem die Möglichkeit zur raschen Zerstörung der angesammelten Tetrapyrrole geschaffen wird, werden dadurch die mutierten Insekten gegenüber photodynamischen Schädigungen bei Licht vermutlich nicht geschützt. Wie aus den Tabellen VII und XIII entnommen werden kann, wird Proto bei Helligkeit aller Wahrscheinlichkeit nach fast so schnell zerstört, wie es gebildet wird; eine so minimale Ansammlung reicht jedoch aus, um ausgedehnte photodynamische Schädigungen bei den Larven hervorzurufen. Außerdem wäre eine Mutation, die die Proto- und Cytochrom-Biosynthese insgesamt blockiert, höchst wahrscheinlich lethal.

Weitere Beispiele von Zusammensetzungen und Anwendungsmöglichkeiten im Rahmen des Inhaltes und Geltungsbereiches der Erfindung werden dem Fachmann nach Berücksichtigung der obigen Ausführungen deutlich werden, und folglich sollten nur die in den Ansprüchen genannten Einschränkungen dafür gelten.



