



(12) Ausschließungspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

(19) **DD** (11) **252 116 A5**

4(51) A 01 N 63/02

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21)	APA 01 N / 295 004 4	(22)	05.06.85	(44)	09.12.87
(31)	617,649	(32)	05.06.84	(33)	US
	617,650		05.06.84		

(71) siehe (73)
 (72) Wood, Irwin B.; Pankovich, John A.; Carter, Guy Th.; Torrey, Margaret J.; Greenstein, Michael, US
 (73) American Cyanamid Company, 1937 West Main Street, Stamford, Conn. 06904-0060, US

(54) Verfahren zur Bekämpfung von Pflanzennematoden

(55) Verfahren, Bekämpfung von Pflanzennematoden, Fermentationsbrühe, Vollmaische, Mikroorganismus, *Streptomyces cyaneogriseus noncyanogenus*, NRRL 15773

(57) Die Erfindung betrifft ein neues, verbessertes Verfahren zur Bekämpfung von Pflanzennematoden. Erfindungsgemäß wird auf das Blattwerk von Pflanzen, auf den Boden, in dem sie wachsen, oder in deren Stämme eine nematozid-wirksame Menge der Fermentationsbrühe oder Vollmaische des Mikroorganismus *Streptomyces cyaneogriseus noncyanogenus* mit der Hinterlegungs-Zugangsnummer NRRL 15773 aufgebracht. Die Maische enthält zweckmäßig Mittel, die als LL-F28249 α , β , γ , δ , ϵ , ζ , η , θ , ξ , κ , λ , μ , ν und ω bezeichnet sind.

Verfahren zur Bekämpfung von Pflanzennematoden

Anwendungsgebiet der Erfindung:

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Bekämpfung von Pflanzennematoden.

Charakteristik des bekannten Standes der Technik:

Zur Bekämpfung von Pflanzennematoden sind bereits zahlreiche Mittel und Verfahren bekannt, die jedoch häufig den Forderungen der Praxis nicht voll entsprechen.

Ziel der Erfindung:

Ziel der Erfindung ist es, ein verbessertes Verfahren zur Bekämpfung von Pflanzennematoden bereitzustellen. Hierzu soll ein neuer Mikroorganismus verwendet werden.

In der US-PS 3950 360 werden bestimmte durch Züchtung eines Streptomyces Mikroorganismus gewonnene antibiotische Substanzen beschrieben und daß diese Verbindungen als Insektizide und Akarazide nützlich seien. Wie man aber aus den einen solchen Mikroorganismus identifizierenden Merkmalen feststellen kann, unterscheidet sich der erfindungsgemäße

Mikroorganismus, und seine aktiven Bestandteile werden von einem völlig anderen Mikroorganismus gewonnen. Des weiteren betrifft eine ganze Serie von US-PSn bestimmte Verbindungen, die durch Fermentation von Streptomyces avermitilis, eines sich vom erfindungsgemäßen deutlich unterscheidenden Mikroorganismus, gewonnen werden (US-PS 4.171.314; US-PS 4.199.569; US-PS 4.206.205; US-PS 4.310.519; US-PS 4.333.925). Die US-PS 4.423.209 betrifft das Verfahren zur Umwandlung von einigen dieser weniger wünschenswerten Komponenten in bevorzugtere. Die erfindungsgemäßen aktiven Mittel, die als LL-F28249 α , β , γ , δ , ξ , ζ , η , θ , ι , κ , λ , μ , ν und ω identifiziert werden, stammen aus der Fermentation eines vor kurzem entdeckten und bisher noch nicht gezüchteten Mikroorganismus. Die erfindungsgemäßen Verbindungen und/oder die Fermentationsbrühe oder Vollmaisché des Mikroorganismus Streptomyces cyaneogriseus ssp noncyanogenus NRRL 15773 plus die pharmazeutisch und pharmakologisch-annehmbaren Salze davon (zusammen als Wirkstoff bezeichnet) ergeben die Mittel, mit denen das erfindungsgemäße Verfahren durchgeführt wird.

Tabelle A

Vergleich von F 28249 und ISP 5534 auf ISP-Morphologie-
Testnährsubstraten

(Zahlen stammen von NBS-ISCC)

<u>Nährsubstrat</u>		<u>F 28249</u>	<u>ISP 5534</u>
Hefe-Malz (ISP 2)	A.m. ⁱ	mittelgrau (265)	hell bis mittelgrau (264-265)
	V.m.	hell-lederfarben (75) dunkelgelb-braun	hell-lederfarben- weiß bis schwarz- blau (188)
	S.p.	hellbraun	hellbraun
Anorganische Salze Stärke (ISP 4)	A.m.	hell-oliv-grau (112) bis mittelgrau (265)	mittelgrau (265)
	V.m.	dunkelgrau bis schwarz (266-267)	grau-purpurartig- blau (204)
	S.p.	gräulich-gelb- lich-braun	keine
Glycerol- Asparagin (ISP 5)	A.m.	263 (weiß) bis gelblich-grau(93)	263 weiß bis hell- grau (264)
	V.m.	schwarz (267) bis hell-oliv- braun (96)	grau-purpurartig- blau (203-204)
	S.p.	leicht bräunlich	hell-gelblich-grau
Hafermehl (ISP 3)	A.m.	gelb-grau (93)	keine
	V.m.	farblos	farblos
	S.p.	leicht gelblich	keine

- ⁱ A.m. = Luftmyzel
V.m. = vegetatives Myzel
S.p. = lösliches Pigment

Tabelle B

Vergleich von Lederle F 28249 mit ISP 5534 (Gordon Tests)

	<u>F 28249</u>	<u>ISP 5534</u>
<u>Züchtung auf/bei</u>		
Salicin	±	-
10°	-	+
45°	+	-
<u>Erzeugung von</u>		
Urease	+	-
<u>Decarboxylierung von</u>		
Mucate	-	+
<u>Säureproduktion</u>		
Raffinose	-	+
Sucrose	-	+

Beide Stämme zeigen folgende Reaktionen:

Positiv Hydrolyse von Casein, Hypoxanthin, Xanthin, Tyrosin, Adrenin, Kartoffelstärke, Gelatine und Esculin;
Erzeugung von Phosphatase
Sensibilität für Lysezym
Decarboxylierung von Acetat, Citrat, Lactat, Malat, Oxalat und Propionat
Säureproduktion von Arabinose, Cellobiose, Dextrin, Fructose, Galactose, Glucose, Glycerol, Lactose, Maltose, Mannose, α-Methyl-D-glucosid, Rhamnose, Salicin, Trehalose.

Negativ Erzeugung von Nitratreduktase

Decarboxylierung von Benzoat und Tartrat

Säure von Adonitol, Dulcitol, Erythritol, Inositol,
Mannitol, Sorbitol, β -Methyl-D-xylosid.

Züchtung auf 5 % NaCl

Der volle Name des Mikroorganismus LL-F28249, NRRL Nr. 15773 hinsichtlich Gattung, Art und Unterart ist Streptomyces cyaneogriseus noncyanogenus; um aber abzukürzen, wird er in der Beschreibung und den Ansprüchen wie oben geschrieben angegeben.

Der Stamm wird aufgrund der Morphologie und der Zellchemie (Gehalt des L-Isomeren von Diaminopimelinsäure) der Gattung Streptomyces zugeordnet. Die Morphologie und die physiologischen Daten des Stammes stellen diesen in die Nähe von S. cyaneogriseus, wie durch ISP 5534 (ATCC 27426) vertreten. Dann wurden Vergleiche hinsichtlich der Bildung von grauen löslichen Luftmyzelpigmenten auf Nährsubstraten (Tabelle A) und geknäulten Ketten von glatten Conidien (3 bis 25 Sporen je Kette) angestellt. Der erfindungsgemäße Stamm ist gegenüber blauem löslichem Pigment negativ, worin der Vergleichsstamm, ISR 5534, positiv ist. Die Stämme zeigen ähnliche Reaktionen bei den ISP-Kohlehydrat-Verwertungstests und zeigen sich positiv bei Arabinose, Fructose, Glucose, Rhamnose und Xylose, während sie negativ bei Inositol, Mannitol, Raffinose und Sucrose reagieren (ISP 5534 leicht positiv). Die Stämme unterscheiden sich jedoch in verschiedenen Merkmalen (Tabelle B) und den 53 bei den Gordon-Tests. Diese Unterschiede unterstützen die Schaffung einer Unterart von S. cyaneogriseus für den erfindungsgemäßen Mikroorganismus.

Darlegung des Wesens der Erfindung:

Erfindungsgemäß ist das neue Verfahren zur Bekämpfung von Pflanzennematoden dadurch gekennzeichnet, daß auf das Blattwerk von Pflanzen, auf den Boden, in dem sie wachsen, oder in deren Stämme eine nemazod-wirksame Menge der Fermentationsbrühe oder Vollmaische des Mikroorganismus Streptomyces cyaneogriseus noncyanogenus mit der Hinterlegungs-Zugangsnummer NRRL 15773 aufgebracht wird.

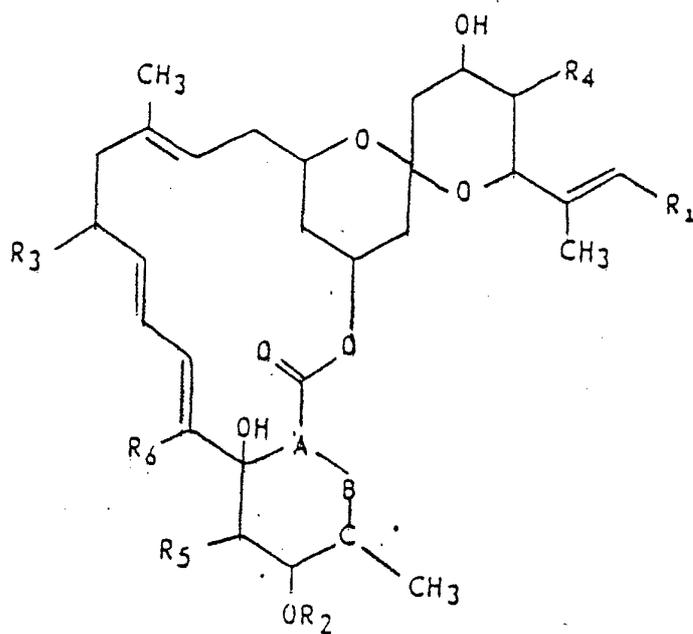
Zweckmäßig enthält hierbei die Fermentationsbrühe als LL-F 28249 α , LL-F 28249 β , LL-F 28249 γ , LL-F 28248 δ , LL-F 28249 ϵ , LL-F 28249 ζ , LL-F 28249 η , LL-F 28249 θ , LL-F 28249 ι , LL-F 28249 κ , LL-F 28249 λ , LL-F 28249 μ , LL-F 28249 ν und LL-F 28249 ω bezeichnete Mittel oder die pharmazeutisch und pharmakologisch-aanehmbaren Salze davon.

Bei einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens werden etwa 0,1 bis 1,4 kg je Hektar des Wirkstoffes aufgebracht.

Die obengenannte Kultur von Streptomyces cyaneogriseus noncyanogenus LL-F 28249, die die Mittel LL-F 28249 α , β , γ , δ , ϵ , ζ , η , θ , κ , λ , ι , μ , und ω erzeugt, wurde aus in Südaustralien gefundenem Mallee-Sand isoliert.

Das Verfahren zur Herstellung der Mittel ist Gegenstand der prioritätsgleichen Patentanmeldung AP A 61 K/277 057 1, aus der diese Anmeldung ausgeschieden wurde.

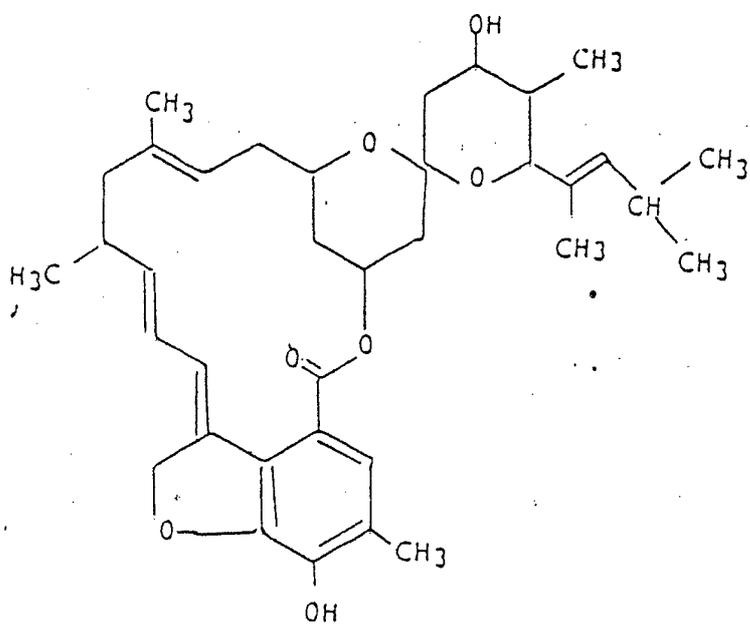
Die Struktur und die Stereochemie von LL-F 29249 sind nicht vollkommen definiert, aber die vorgeschlagenen Strukturen werden anschließend gezeigt. Die Komponente LL-F 29249 ist mit Hondamycin (Albimycin) verwandt, das in The Journal of Antibiotics, 22, Nr. 11, 521 bis 526 (1969) beschrieben ist.



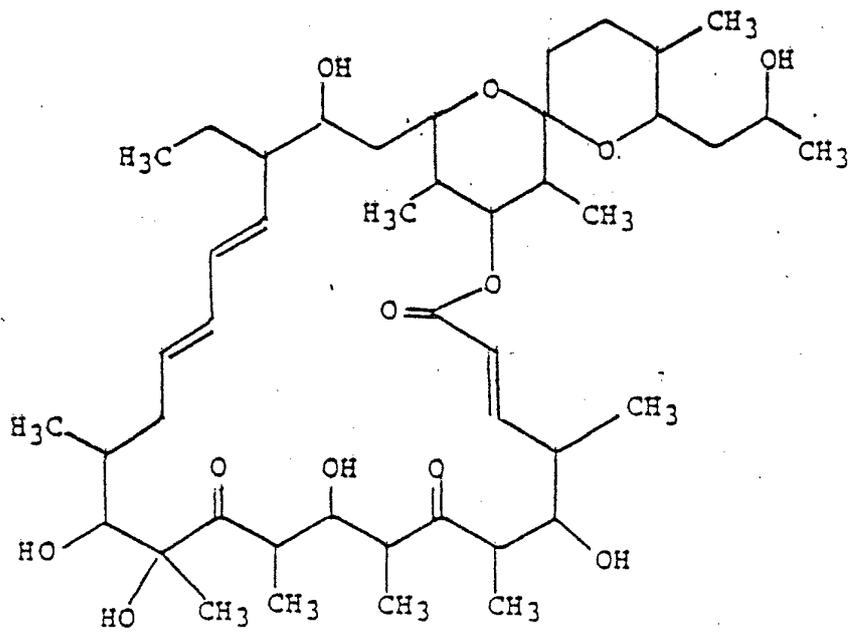
LL-F28249 α - μ

Komponente	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	R ₅ +R ₆	A-B	B-C
LL-F28249 α	CH(CH ₃) ₂	H	CH ₃	CH ₃			-O-CH ₂ -	CH-CH	CH=C
LL-F28249 β	CH ₃	H	CH ₃	CH ₃			-O-CH ₂ -	CH-CH	CH=C
LL-F28249 γ	CH ₃	CH ₃	CH ₃	CH ₃			-O-CH ₂ -	CH-CH	CH=C
LL-F28249 δ	CH ₃	CH ₃	CH ₃	CH ₃	OH	CH ₂ OH		CH-CH	CH=C
LL-F28249 ε	CH(CH ₃) ₂	H	H	CH ₃			-O-CH ₂ -	CH-CH	CH=C
LL-F28249 ζ	CH ₂ CH ₃	H	CH ₃	CH ₃			-O-CH ₂ -	CH-CH	CH=C
LL-F28249 η	CH(CH ₃) ₂	H	CH ₃	CH ₃			-O-CH ₂ -	C=CH	CH-CH
LL-F28249 θ	CH(CH ₃) ₂	H	CH ₃	CH ₂ CH ₃			-O-CH ₂ -	CH-CH	CH=C
LL-F28249 ι	CH(CH ₃) ₂	H	CH ₂ CH ₃	CH ₃			-O-CH ₂ -	CH-CH	CH=C
LL-F28249 κ	CH ₃	CH ₃	CH ₃	CH ₃	H	CH ₃		CH-CH	CH=C
LL-F28249 λ	CH(CH ₃) ₂	CH ₃	CH ₃	CH ₃			-O-CH ₂ -	CH-CH	CH=C
LL-F28249 μ	CH(CH ₃) ₂	CH ₃	CH ₃	CH ₃	H	CH ₃		CH-CH	CH=C

204 112



LL-F28249v



LL-F28249w

In den Zeichnungen stellen dar:

- Fig. 1: Charakteristisches Ultraviolett-Absorptionsspektrum der LL-F28249 α , NRRL 15773 bezeichneten Verbindung.
- Fig. 2: Charakteristisches Infrarot-Absorptionsspektrum der LL-F28249 α , NRRL 15773 bezeichneten Verbindung.
- Fig. 3: Charakteristisches magnetisches Protonen-Kernresonanzspektrum der LL-F28249 α , NRRL 15773 bezeichneten Verbindung in CDCl_3 -Lösung. -
- Fig. 4: Charakteristisches magnetisches Kohlenstoff-13-Kernresonanzspektrum der LL-F28249 α , NRRL 15773 bezeichneten Verbindung in CDCl_3 -Lösung.
- Fig. 5: Charakteristisches Elektronenstoß-Massenspektrum der LL-F28249 α , NRRL 15773 bezeichneten Verbindung.
- Fig. 6: Charakteristisches Ultraviolett-Absorptionsspektrum der LL-F28249 β , NRRL 15773 bezeichneten Verbindung.
- Fig. 7: charakteristisches Infrarot-Absorptionsspektrum der LL-F28249 β , NRRL 15773 bezeichneten Verbindung.
- Fig. 8: Charakteristisches magnetisches Protonen-Kernresonanzspektrum der LL-F28249 β , NRRL 15773 bezeichneten Verbindung in CDCl_3 .
- Fig. 9: Charakteristisches Elektronenstoß-Massenspektrum der LL-F28249 β , NRRL 15773 bezeichneten Verbindung.
- Fig. 10: Charakteristisches Ultraviolett-Absorptionsspektrum der LL-F28249 γ , NRRL 15773 bezeichneten Verbindung.

- Fig. 11: Charakteristisches Infrarot-Absorptionsspektrum der Verbindung LL-F28249 γ , NRRL 15773.
- Fig. 12: Charakteristisches magnetisches Protonen-Kernresonanzspektrum der Verbindung LL-F28249 γ , NRRL 15773, in CDCl_3 .
- Fig. 13: Charakteristisches magnetisches Kohlenstoff-13-Kernresonanzspektrum der LL-F28249 γ , NRRL 15773, bezeichneten Verbindung in CDCl_3 .
- Fig. 14: Charakteristisches Elektronenstoß-Massenspektrum der LL-F28249 γ , NRRL 15773 bezeichneten Verbindung.
- Fig. 15: Charakteristisches Ultraviolett-Absorptionsspektrum der LL-F28249 ω , NRRL 15773 bezeichneten Verbindung.
- Fig. 16: Charakteristisches Infrarot-Absorptionsspektrum der LL-F28249 ω , NRRL 15773 bezeichneten Verbindung.
- Fig. 17: Charakteristisches magnetisches Protonen-Kernresonanzspektrum der LL-F28249 ω , NRRL 15773 bezeichneten Verbindung in CDCl_3 .
- Fig. 18: Charakteristisches magnetisches Kernresonanzspektrum der LL-F28249 ϕ , NRRL 15773 bezeichneten Verbindung in CDCl_3 .
- Fig. 19: Charakteristisches Elektronenstoß-Massenspektrum der LL-F28249 ϕ , NRRL 15773 bezeichneten Verbindung.
- Fig. 20: Charakteristisches Ultraviolett-Absorptionsspektrum der LL-F28249 δ , NRRL 15773 bezeichneten Verbindung.

- Fig. 21: Charakteristisches magnetisches Protonen-Kernresonanzspektrum der LL-F28249 δ , NRRL 15773 bezeichneten Verbindung in CDCl_3 .
- Fig. 22: Charakteristisches Elektronenstoß-Massenspektrum der LL-F28249 δ , NRRL 15773 bezeichneten Verbindung.
- Fig. 23: Charakteristisches Ultraviolett-Absorptionsspektrum der LL-D28249 ϵ , NRRL 15773 bezeichneten Verbindung.
- Fig. 24: Charakteristisches magnetisches Protonen-Kernresonanzspektrum der LL-F28249 ζ , NRRL 15773 bezeichneten Verbindung in CDCl_3 .
- Fig. 25: Charakteristisches Elektronenstoß-Massenspektrum der LL-F28249 ζ , NRRL 15773 bezeichneten Verbindung.
- Fig. 26: Charakteristisches Ultraviolett-Absorptionsspektrum der LL-F28249 η , NRRL 15773 bezeichneten Verbindung.
- Fig. 27: Charakteristisches magnetisches Protonen-Kernresonanzspektrum der LL-F28249 θ , NRRL 15773 bezeichneten Verbindung in CDCl_3 .
- Fig. 28: Charakteristisches Elektronenstoß-Massenspektrum der LL-F28249 θ , NRRL 15773 bezeichneten Verbindung.
- Fig. 29: Charakteristisches Ultraviolett-Absorptionsspektrum der LL-F28249 η , NRRL 15773 bezeichneten Verbindung.
- Fig. 30: Charakteristisches magnetisches Protonen-Kernresonanzspektrum der LL-F28249 η , NRRL 15773 bezeichneten Verbindung in CDCl_3 .

- Fig. 31: Charakteristisches Elektronenstoß-Massenspektrum der LL-F28249 η , NRRL 15773 bezeichneten Verbindung.
- Fig. 32: Charakteristisches Ultraviolett-Absorptionsspektrum der LL-F28249 θ , NRRL 15773 bezeichneten Verbindung.
- Fig. 33: Charakteristisches magnetisches Protonen-Kernresonanzspektrum der LL-F28249 θ , NRRL 15773 bezeichneten Verbindung in CDCl_3 .
- Fig. 34: Charakteristisches Elektronenstoß-Massenspektrum der LL-F28249 θ , NRRL 15773 bezeichneten Verbindung.
- Fig. 35: Charakteristisches Ultraviolett-Absorptionsspektrum der LL-F28249 θ , NRRL 15773 bezeichneten Verbindung.
- Fig. 36: Charakteristisches magnetisches Protonen-Kernresonanzspektrum der LL-F28249 ι , NRRL 15773 bezeichneten Verbindung in CDCl_3 .
- Fig. 37: Charakteristisches Elektronenstoß-Massenspektrum der LL-F28249 ι , NRRL 15773 bezeichneten Verbindung.
- Fig. 38: Charakteristisches magnetisches Kohlenstoff-13-Kernresonanzspektrum der LL-F28249 β , NRRL 15773 bezeichneten Verbindung in CDCl_3 -Lösung.
- Fig. 39: Charakteristisches Ultraviolett-Absorptionsspektrum der LL-F28249 κ , NRRL 15773 bezeichneten Verbindung.
- Fig. 40: Charakteristisches Infrarot-Absorptionsspektrum der LL-F28249 κ , NRRL 15773 bezeichneten Verbindung.

- Fig. 41: Charakteristisches Elektronenstoß-Massenspektrum der LL-F28249 κ , NRRL 15773 bezeichneten Verbindung.
- Fig. 42: Charakteristisches magnetisches Protonen-Kernresonanzspektrum der LL-F28249 κ , NRRL 15773 bezeichneten Verbindung.
- Fig. 43: Charakteristisches magnetisches Kohlenstoff-13-Kernresonanzspektrum der LL-F28249 κ , NRRL 15773 bezeichneten Verbindung.
- Fig. 44: Charakteristisches Ultraviolett-Absorptionsspektrum der LL-F28249 λ , NRRL 15773 bezeichneten Verbindung.
- Fig. 45: Charakteristisches Infrarot-Absorptionsspektrum der LL-F28249 λ , NRRL 15773 bezeichneten Verbindung.
- Fig. 46: Charakteristisches Elektronenstoß-Massenspektrum der LL-F28249 λ , NRRL 15773 bezeichneten Verbindung.
- Fig. 47: Charakteristisches magnetisches Protonen-Kernresonanzspektrum der LL-F28249 λ , NRRL 15773 bezeichneten Verbindung.
- Fig. 48: Charakteristisches magnetisches Kohlenstoff-13-Kernresonanzspektrum der LL-F28249 λ , NRRL 15773 bezeichneten Verbindung.
- Fig. 49: Charakteristisches Ultraviolett-Absorptionsspektrum der LL-F28249 μ , NRRL 15773 bezeichneten Verbindung.
- Fig. 50: Charakteristisches Infrarot-Absorptionsspektrum der LL-F28249 μ , NRRL 15773 bezeichneten Verbindung.

Fig. 51: Charakteristisches Elektronenstoß-Massenspektrum der LL-F28249 μ , NRRL 15773 bezeichneten Verbindung.

Fig. 52: Charakteristisches magnetisches Protonen-Kernresonanzspektrum der LL-F28249 μ , NRRL 15773 bezeichneten Verbindung.

Fig. 53: Charakteristisches Ultraviolett-Absorptionsspektrum der LL-F28249 ν , NRRL 15773 bezeichneten Verbindung.

Fig. 54: Charakteristisches Infrarot-Absorptionsspektrum der LL-F28249 ν , NRRL 15773 bezeichneten Verbindung.

Fig. 55: Charakteristisches Elektronenstoß-Massenspektrum der LL-F28249 ν , NRRL 15773 bezeichneten Verbindung.

Fig. 56: Charakteristisches magnetisches Protonen-Kernresonanzspektrum der LL-F28249 ν , NRRL 15773 bezeichneten Verbindung.

Fig. 57: Charakteristisches magnetisches Kohlenstoff-13-Kernresonanzspektrum der LL-F28249 ν , NRRL 15773 bezeichneten Verbindung.

Es wurde entdeckt, daß die oben genannten Mittel sowie die Fermentationsbrühe und die Vollmaische des Mikroorganismus u.a. besonders wirksam für die Bekämpfung von Pflanzennematoden geeignet sind.

Die Wirksamkeit des erfindungsgemäßen Verfahrens wurde durch den Erfolg bei der Bekämpfung der frei-lebenden Bodennematode C. elegans demonstriert. Zusammensetzungen, die diese Wirkstoffe zur Bekämpfung von Pflanzennematoden enthalten, können entweder als Flüssigkeit oder oberflächenaktive Pulver formuliert werden. Flüssige Zusammensetzungen enthalten etwa 5 % bis 20 % M/M des Wirkstoffes (aktive Substanz, Fermenta-

tionsbrühe, Vollmaische oder Salze) mit entsprechenden Mengen eines Lösungsmittels wie Methanol, Ethanol, Aceton, Acetonitril, und andere und als Rest Wasser. Oberflächenaktive Pulver enthalten etwa 5 % bis 20 %, M/M des Wirkstoffes, etwa 1 % bis 10 % oberflächenaktives Mittel und inerte Trägermittel wie Tonarten, Vermiculit, Ruß oder dergleichen. Etwa 0,1 bis 1,4 kg je Hektar werden auf das Blattwerk von Pflanzen, den Boden, in dem diese wachsen, oder deren Stämme aufgebracht.

Diese Mittel sind auch als lokale Insektizide, Magengifte und systemische Insektizide wirksam und sind besonders wirksam bei der Bekämpfung von Insekten der Gattungen Lepidoptera, Coleoptera, Homoptera, Deptera und Thysanoptera. Pflanzmilben, Akariden, können ebenfalls durch die erfindungsgemäßen Mittel bekämpft werden.

Diese Mittel werden im allgemeinen als verdünnte, feste oder flüssige Zusammensetzungen auf den Fortpflanzungsboden, die Nahrungsquelle oder die Wirtspflanze solcher Insekten und/oder Akariden aufgebracht. Die Anwendungsmenge für solche Stellen umfaßt etwa 0,01 kg/ha bis etwa 8,0 kg/ha, vorzugsweise etwa 0,05 kg/ha bis etwa 0,5 kg/ha.

Für die erfindungsgemäßen oberflächenaktiven Pulver brauchbare oberflächenaktive Mittel umfassen die normalerweise für die Formulierung solcher oberflächenaktiver Pulver verwendeten, vorzugsweise Alkylbenzensulfonatriumsalze. Bentonit, Ton oder Gemische davon sind bevorzugte Trägermittel. Außerdem haben die erfindungsgemäßen Wirkstoffe auch systemische insektizide Wirksamkeit gegen m. ovinus bei Schafen gezeigt.

In der Praxis sind im allgemeinen etwa 0,02 mg/kg/Tag bis etwa 3,0 mg/kg/Tag für die Bekämpfung parasitischer Infektionen bei Rindern, Schafen und Schweinen sowie Haustieren wirksam. Für längere Anwendung können so geringe Mengen wie 0,002 mg/kg Körpergewicht/Tag angewendet werden.

In der Praxis werden auch etwa 0,1 mg je kg bis 100 mg je kg für mit Helminthen infizierte Tiere angewendet.

Die physikalisch-chemischen Merkmale der α , β , γ , δ , ϵ , ζ , η , θ , ι , κ , λ , μ , ν und ω Komponenten von LL-F28249 werden anschließend beschrieben:

LL-F28249 α :

- 1) Relative Molekülmasse: 612 (FAB-MS);
- 2) Molekülformel: $C_{36}H_{52}O_8$;
- 3) Spezifische optische Drehung $[\alpha]_D^{26} = +133 \pm 3^\circ$
(C 0,3, Aceton);
- 4) Ultraviolett-Absorptionsspektrum: wie in Fig. 1 dargestellt
UV $_{MAX}^{CH_3OH} = 244$ nm (ϵ 28 000);
- 5) Infrarot-Absorptionsspektrum: wie in Fig. II dargestellt
(KBr Scheibe): 3439, 2960, 2925, 1714, 1454, 1374, 1338, 1171, 1120, 996, 967 cm^{-1} ;
- 6) Magnetisches Protonen-Kernresonanzspektrum ($CDCl_3$): wie in Fig. III dargestellt;
- 7) Magnetisches Kohlenstoff-13-Kernresonanzspektrum ($CDCl_3$): wie in Fig. IV dargestellt und in Tabelle I beschrieben; und
- 8) Elektronenstoß-Massenspektrum: wie in Fig. V dargestellt mit genauen Massemessungen und vorgeschlagenen Elementzusammensetzungen nach Tabelle II.

LL-F28249 β :

- 1) Relative Molekülmasse: 584 (FAB-MS);
- 2) Molekülformel: $C_{34}H_{48}O_6$;
- 3) Spezifische optische Drehung: $[\alpha]_D^{26} = +125^\circ$
(C, 0,30 Aceton);
- 4) Ultraviolett-Absorptionsspektrum: wie in Fig. IV dargestellt
UV $_{MAX}^{CH_3OH} = 244$ nm (ϵ 25 600);

- 5) Infrarot-Absorptionsspektrum: Wie in Fig. VII dargestellt (KBr Scheibe): 3520, 2910, 1735, 1717, 1450, 1375, 1335, 1180, 1170, 1119, 993, 727 cm^{-1} ;
- 6) Magnetisches Protonen-Kernresonanzspektrum (CDCl_3): Wie in Fig. VIII dargestellt;
- 7) Magnetisches Kohlenstoff-13-Kernresonanzspektrum (CDCl_3): Wie in Fig. XXXVIII dargestellt und in Tabelle II A beschrieben; und
- 8) Elektronenstoß-Massenspektrum: Wie in Fig. IX dargestellt, mit genauen Massemessungen und vorgeschlagenen Elementzusammensetzungen nach Tabelle III.

LL-F28249 :

- 1) Relative Molekülmasse: 598 (FAB-MS);
- 2) Molekülformel: $\text{C}_{35}\text{H}_{50}\text{O}_8$;
- 3) Spezifische optische Drehung: $[\alpha]_D^{26} = +150 \pm 4^\circ$
(C 0,3, Aceton);
- 4) Ultraviolett-Absorptionsspektrum: Wie in Fig. X gezeigt
 $\text{UV}_{\text{MAX}}^{\text{CH}_3\text{OH}} = 244 \text{ nm } (\epsilon 27 100)$;
- 5) Infrarot-Absorptionsspektrum: Wie in Fig. XI gezeigt (KBr Scheibe): 3510, 2910, 1735, 1715, 1452, 1375, 1338, 1182, 1172, 1119, 995 cm^{-1} ;
- 6) Magnetisches Protonen-Kernresonanzspektrum (CDCl_3): Wie in Fig. XII gezeigt;
- 7) Magnetisches Kohlenstoff-13-Kernresonanzspektrum (CDCl_3): Wie in Fig. XIII gezeigt und in Tabelle IV beschrieben; und
- 8) Elektronenstoß-Massenspektrum: Wie in Fig. XIV gezeigt, mit genauen Massemessungen und vorgeschlagenen Elementzusammensetzungen nach Tabelle V.

LL-F28249c:

- 1) Relative Molekülmasse: 806 (FAB-MS);
- 2) Molekülformel: $C_{45}H_{74}O_{12}$;
- 3) Spezifische optische Drehung: $[\alpha]_D^{26} = -49 \pm 3^\circ$
(C 0,35, Methanol);
- 4) Ultraviolett-Absorptionsspektrum: Wie in Fig. XV gezeigt
 $UV^{CH_3OH} = 225 \text{ nm } (\epsilon 27 400)$
MAX 232 ($\epsilon 25 700$);
- 5) Infrarot-Absorptionsspektrum: Wie in Fig. XVI gezeigt
(KBr Scheibe): 3580, 2965, 2935, 2880, 1703, 1647, 1458,
1380, 1292, 1223, 1135, 1098, 984 cm^{-1} ;
- 6) Magnetisches Protonen-Kernresonanzspektrum ($CDCl_3$): Wie
in Fig. XVII gezeigt;
- 7) Magnetisches Kohlenstoff-13-Kernresonanzspektrum ($CDCl_3$):
Wie in Fig. XVIII gezeigt und in Tabelle VI beschrieben;
und
- 8) Elektronenstoß-Massenspektrum: Wie in Fig. XIX gezeigt,
mit genauen Massemessungen und vorgeschlagenen Elementzu-
sammensetzungen nach Tabelle VII.

LL-F28249d:

- 1) Relative Molekülmasse: 616 (EI-MS);
- 2) Molekülformel: $C_{35}H_{52}O_9$;
- 3) HPLC-Retentionsvolumen von 14,0 ml in dem in Tabelle VIII
angegebenen System;
- 4) Ultraviolett-Absorptionsspektrum (Methanol): Wie in Fig.
XX gezeigt;
- 5) Magnetisches Protonen-Kernresonanzspektrum ($CDCl_3$): Wie
in Fig. XXI gezeigt; und
- 6) Elektronenstoß-Massenspektrum: Wie in Fig. XXII gezeigt.

LL-F28249 ε :

- 1) Relative Molekülmasse: 598 (EI-MS);
- 2) Molekülformel: $C_{35}H_{50}O_8$;
- 3) HPLC-Retentionsvolumen von 14,8 ml in dem in Tabelle VIII angegebenen System;
- 4) Ultraviolett-Absorptionsspektrum (Methanol): Wie in Fig. XXIII gezeigt;
- 5) Magnetisches Protonen-Kernresonanzspektrum ($CDCl_3$): Wie in Fig. XXIV gezeigt; und
- 6) Elektronenstoß-Massenspektrum: Wie in Fig. XXV gezeigt.

LL-F28249 ζ :

- 1) Relative Molekülmasse: 598 (EI-MS);
- 2) Molekülformel: $C_{35}H_{50}O_8$;
- 3) HPLC-Retentionsvolumen von 16,0 ml in dem in Tabelle VIII angegebenen System;
- 4) Ultraviolett-Absorptionsspektrum (Methanol): Wie in Fig. XXVI gezeigt;
- 5) Magnetisches Protonen-Kernresonanzspektrum ($CDCl_3$): Wie in Fig. XXVII gezeigt; und
- 6) Elektronenstoß-Massenspektrum: Wie in Fig. XXVIII gezeigt.

LL-28249 η :

- 1) Relative Molekülmasse: 612 (EI-MS);
- 2) Molekülformel: $C_{36}H_{52}O_8$;
- 3) HPLC-Retentionsvolumen von 23,5 ml in dem in Tabelle VIII angegebenen System;
- 4) Ultraviolett-Absorptionsspektrum (Methanol): Wie in Fig. XXIX gezeigt;

- 5) Magnetisches Protonen-Kernresonanzspektrum (CDCl_3): Wie in Fig. XXX gezeigt;
- 6) Elektronenstoß-Massenspektrum: Wie in Fig. XXXI gezeigt.

LL-F28249 e :

- 1) Relative Molekülmasse: 626 (EI-MS);
- 2) Molekülformel: $\text{C}_{37}\text{H}_{54}\text{O}_8$;
- 3) HPLC-Retentionsvolumen von 24,5 ml in dem in Tabelle VIII angegebenen System;
- 4) Ultraviolett-Absorptionsspektrum (Methanol): Wie in Fig. XXXII gezeigt;
- 5) Magnetisches Protonen-Kernresonanzspektrum (CDCl_3): Wie in Fig. XXXIII gezeigt; und
- 6) Elektronenstoß-Massenspektrum: Wie in Fig. XXXIV gezeigt.

LL-28249 t :

- 1) Relative Molekülmasse: 626 (EI-MS);
- 2) Molekülformel: $\text{C}_{37}\text{H}_{54}\text{O}_8$;
- 3) HPLC-Rerentionsvolumen von 26,0 ml in dem in Tabelle VIII angegebenen System;
- 4) Ultraviolett-Absorptionsspektrum (Methanol): Wie in Fig. XXXV gezeigt;
- 5) Magnetisches Protonen-Kernresonanzspektrum (CDCl_3): Wie in Fig. XXXVI gezeigt;
- 6) Elektronenstoß-Massenspektrum: Wie in Fig. XXXVII gezeigt.

LL-F28249 K :

- 1) Relative Molekülmasse: 584 (EI-MS);
- 2) Molekülformel: $\text{C}_{35}\text{H}_{52}\text{O}_7$;

- 3) Spezifische optische Drehung: $[\alpha]_D^{26} = +189^\circ$ (C 0,165 Aceton);
- 4) Ultraviolett-Absorptionsspektrum: Wie in Fig. XXXIX gezeigt $UV_{\text{MAX}}^{\text{CH}_3\text{OH}} = 241 \text{ nm}$ (E 20 400);
- 5) Infrarot-Absorptionsspektrum: Wie in Fig. XL gezeigt (KBr Scheibe);
- 6) Elektronenstoß-Massenspektrum: Wie in Fig. XLI gezeigt;
- 7) Magnetisches Protonen-Kernresonanzspektrum (CDCl_3): Wie in Fig. XLII gezeigt; und
- 8) Magnetisches Kohlenstoff-13-Kernresonanzspektrum (CDCl_3): Wie in Fig. XLIII gezeigt und in Tabelle IX beschrieben.

LL-28249 λ :

- 1) Relative Molekülmasse: 626 (FAB-MS);
- 2) Molekülformel: $\text{C}_{37}\text{H}_{54}\text{O}_8$;
- 3) Spezifische optische Drehung: $[\alpha]_D^{26} = +145^\circ$ (C, 0,23 Aceton);
- 4) Ultraviolett-Absorptionsspektrum: Wie in Fig. XLIV gezeigt $UV_{\text{MAX}}^{\text{CH}_3\text{OH}} = 244 \text{ nm}$ (E 30 000);
- 5) Infrarot-Absorptionsspektrum: Wie in Fig. XLV gezeigt (KBr Scheibe);
- 6) Elektronenstoß-Massenspektrum: Wie in Fig. XLVI gezeigt;
- 7) Magnetisches Protonen-Kernresonanzspektrum (CDCl_3): Wie in Fig. XLVII gezeigt; und
- 8) Magnetisches Kohlenstoff-13-Kernresonanzspektrum (CDCl_3): Wie in Fig. XLVIII gezeigt und in Tabelle X beschrieben.

LL-F28249^μ:

- 1) Relative Molekülmasse: 612 (EI-MS);
- 2) Molekülformel: $C_{37}H_{56}O_7$;
- 3) Ultraviolett-Absorptionsspektrum: Wie in Fig. XLIX gezeigt

$$\underset{\text{MAX}}{\text{UV}}^{\text{CH}_3\text{OH}} = 241 \text{ nm (E 16 800)};$$
- 4) Infrarot-Absorptionsspektrum: Wie in Fig. L gezeigt (KBr Scheibe);
- 5) Elektronenstoß-Massenspektrum: Wie in Fig. LI gezeigt;
- 6) Magnetisches Protonen-Kernresonanzspektrum ($CDCl_3$): Wie in Fig. LII gezeigt.

LL-F28249^ν:

- 1) Relative Molekülmasse: 592 (EI-MS);
- 2) Molekülformel: $C_{36}H_{48}O_7$;
- 3) Spezifische optische Drehung: $[\alpha]_D^{26} = +131^\circ$ -
(C 0,325, Aceton);
- 4) Ultraviolett-Absorptionsspektrum: Wie in Fig. LIII gezeigt

$$\underset{\text{MAX}}{\text{UV}}^{\text{CH}_3\text{OH}} = 256 \text{ (E 20 500)}; 358 \text{ (E 8 830)};$$
- 5) Infrarot-Absorptionsspektrum: Wie in Fig. LIV gezeigt (KBr Scheibe);
- 6) Elektronenstoß-Massenspektrum: Wie in Fig. LV gezeigt;
- 7) Magnetisches Protonen-Kernresonanzspektrum ($CDCl_3$): Wie in Fig. LVI gezeigt; und
- 8) Magnetisches Kohlenstoff-13-Kernresonanzspektrum ($CDCl_3$): Wie in Fig. LVII gezeigt und in Tabelle XI beschrieben.

Tabelle I

Kohlenstoff-13-NMR-Daten für LL-F28249 α

Kohlenstoff	Chemische Umlagerung (ppm)	Protonen-Substitution	Kohlenstoff	Chemische Umlagerung (ppm)	Protonen-Substitution
1	173,4	q ²	18	67,8	CH
2	142,8	CH	19	67,7	CH
3	139,4	q	20	48,4	CH ₂
4	137,7	q	21	45,7	CH
5	137,3	q	22	41,1	CH ₂
6	137,2	CH	23	40,7	CH ₂
7	130,6	q	24	36,1	CH ₂
8	123,3	CH	25	36,0	CH
9	120,3 ³	CH	26	35,9	CH
10	118,0	CH	27	34,7	CH ₂
11	99,7	q	28	26,8	CH
12	80,2	q	29	22,8 ⁴	CH ₃
13	79,3	CH	30	22,2	CH ₃
14	76,7	CH	31	19,9	CH ₃
15	69,3	CH	32	15,5	CH ₃
16	68,5	CH	33	13,9	CH ₃
17	68,4	CH ₂	34	11,0	CH ₃

¹ Unterhalb von TMS; CDCl₃-Lösung.

² q = Quarternärer Kohlenstoff.

^{3, 4} Zwei unaufgelöste Signale.

Tabelle II

Massenmessungen hoher Auflösung für L-F28249

<u>m/z</u>	<u>Elementzusammensetzung</u>
612,3705	$C_{36}H_{52}O_8$
594,3543	$C_{36}H_{50}O_7$
576,3472	$C_{36}H_{48}O_6$
484,3211	$C_{30}H_{44}O_5$
482,2648	$C_{29}H_{38}O_6$
466,3097	$C_{30}H_{42}O_4$
448,2987	$C_{30}H_{40}O_3$
442,2375	$C_{26}H_{34}O_6$
425,2327	$C_{26}H_{33}O_5$
354,2181	$C_{23}H_{30}O_3$
314,1877	$C_{20}H_{26}O_3$
278,1144	$C_{15}H_{18}O_5$
265,1786	$C_{16}H_{25}O_3$
248,1405	$C_{15}H_{20}O_3$
247,1705	$C_{16}H_{23}O_2$
237,1838	$C_{15}H_{25}O_2$
219,1740	$C_{15}H_{23}O$
151,0753	$C_9H_{11}O_2$

Tabelle IIa

Kohlenstoff-13-NMR-Daten für LL-F28249 β

Kohlenstoff	Chemische Umlagerung (ppm) ^x	Kohlenstoff	Chemische Umlagerung (ppm)
1	173,3	18	68,3
2	142,6	19	67,8
3	139,5	20	67,7
4	137,7	21	48,4
5	137,3	22	45,7
6	133,9	23	41,0
7	123,8	24	40,8
8	123,4	25	36,1
9	120,3	26	35,9 ^{xx}
10	120,2	27	34,7
11	118,0	28	22,3
12	99,7	29	19,8
13	80,2	30	15,5
14	79,4	31	13,8
15	76,7	32	13,1
16	69,2	33	10,8
17	68,6		

^x Unterhalb von TMS; CDCl₃-Lösung

^{xx} Zwei unaufgelöste Signale.

Tabelle III

Massemessungen hoher Auflösung für LL-F28249 6

<u>m/z</u>	<u>Elementzusammensetzung</u>
584,3388	$C_{34}H_{48}O_8$
566,3306	$C_{34}H_{46}O_7$
456,2864	$C_{28}H_{40}O_5$
442,2392	$C_{26}H_{34}O_6$
438,2780	$C_{28}H_{38}O_4$
425,2331	$C_{26}H_{33}O_5$
354,2187	$C_{23}H_{30}O_3$
314,1858	$C_{20}H_{26}O_3$
278,1168	$C_{15}H_{18}O_5$
237,1491	$C_{14}H_{21}O_3$
219,1380	$C_{14}H_{19}O_2$
209,1534	$C_{13}H_{21}O_2$
191,1418	$C_{13}H_{19}O$
151,0750	$C_9H_{11}O_2$

Tabelle IV

Kohlenstoff-13-NMR-Daten für LL-F28249 7

<u>Kohlenstoff</u>	<u>Chemische Umlagerung¹ (ppm)</u>	<u>Kohlenstoff</u>	<u>Chemische Umlagerung (ppm)</u>
1	173,6	19	68,3
2	142,4	20	67,9
3	139,9	21	57,7
4	137,3	22	48,5
5	136,0	23	45,8
6	134,0	24	41,2
7	123,8	25	40,8
8	123,6	26	36,2
9	120,4	27	36,1
10	119,6	28	36,0
11	118,5	29	34,8
12	99,8	30	22,3
13	80,5	31	19,9
14	77,8	32	15,5
15	77,0	33	13,8
16	76,8	34	13,1
17	69,3	35	10,8
18	68,6		

¹ Unterhalb von TMS; CDCl₃-Lösung.

Tabelle V

Massemessungen hoher Auflösung für LL-F28249 γ

<u>m/z</u>	<u>Elementzusammensetzung</u>
598,3543	$C_{35}H_{50}O_8$
580,3422	$C_{35}H_{48}O_7$
562,3292	$C_{35}H_{46}O_6$
496,2824	$C_{30}H_{40}O_6$
484,2440	$C_{28}H_{36}O_7$
478,2687	$C_{30}H_{38}O_5$
456,2576	$C_{27}H_{36}O_6$
438,2772	$C_{28}H_{38}O_4$
425,2341	$C_{26}H_{33}O_5$
420,2651	$C_{28}H_{36}O_3$
354,2199	$C_{23}H_{30}O_3$
314,1875	$C_{20}H_{26}O_3$
292,1307	$C_{16}H_{20}O_5$
288,2075	$C_{19}H_{28}O_2$
248,1397	$C_{15}H_{20}O_3$
237,1490	$C_{14}H_{21}O_3$
219,1382	$C_{14}H_{19}O_2$
209,1544	$C_{13}H_{21}O_2$
191,1435	$C_{13}H_{19}O$
151,0759	$C_9H_{11}O_2$

Tabelle VI

Kohlenstoff-13-NMR-Daten für LL-F28249

Kohlenstoff	Chemische Umlagerung ¹ (ppm)	Kohlenstoff	Chemische Umlagerung (ppm)
1	220,7	23	42,2 ²
2	219,6	24	40,4
3	165,2	25	38,3
4	148,7	26	37,6
5	133,1	27	36,1
6	132,3	28	34,8
7	132,1	29	33,5
8	130,2	30	30,1
9	122,3	31	26,6
10	100,0	32	25,4
11	82,9	33	24,5
12	75,9	34	23,0
13	73,0	35	21,1
14	72,7	36	17,9
15	72,6	37	14,3
16	72,1	38	14,2
17	69,0	39	12,1
18	67,3	40	11,5
19	63,6	41	10,9
20	51,4	42	8,7
21	46,2	43	8,3
22	45,7	44	5,7

¹ Unterhalb von TMS; CDCl₃-Lösung.

² Zwei unaufgelöste Signale.

Tabelle VII

Massemessungen hoher Auflösung für LL-F28249 ω

<u>m/z</u>	<u>Elementzusammensetzung</u>
462,3350	$C_{28}H_{46}O_5$
444,3237	$C_{28}H_{44}O_4$
425,2534	$C_{23}H_{37}O_7$
407,2439	$C_{23}H_{35}O_6$
406,3046	$C_{25}H_{42}O_4$
307,2895	$C_{25}H_{39}O_3$
337,2010	$C_{19}H_{29}O_5$
297,2031	$C_{17}H_{29}O_4$
279,1944	$C_{17}H_{27}O_3$
261,1851	$C_{17}H_{25}O_2$
253,1797	$C_{15}H_{25}O_3$
235,1697	$C_{15}H_{23}O_2$
224,1754	$C_{14}H_{24}O_2$
209,1530	$C_{13}H_{21}O_2$
207,1744	$C_{14}H_{23}O$
184,1458	$C_{11}H_{20}O_2$
179,1048	$C_{11}H_{15}O_2$
173,1205	$C_9H_{17}O_3$
167,1051	$C_{10}H_{15}O_2$
155,1069	$C_9H_{15}O_2$

Tabelle VIIIHPLC Retentionsvolumina für LL-F28249 α , δ , ϵ , ζ , η , θ und ι

<u>Verbindung</u>	<u>Retentionsvolumen⁺ (ml)</u>
LL-F28249	19,8
LL-F28249	14,0
LL-F28249	14,8
LL-F28249	16,0
LL-F28249	23,5
LL-F28249	24,5
LL-F28249	26,0

⁺ Das System besteht aus einer Säule, 3,9 mm x 30 cm, gefüllt mit C₁₈-Umkehrphasen-Füllung, entwickelt mit Methanol:Wasser (80:20) bei 1,0 ml/Minute, Nachweis durch Absorptionsvermögen bei 254 nm.

Tabelle IXKohlenstoff-13-NMR-Daten für LL-F28249 K

Kohlenstoff	Chemische Umlagerung (ppm) ⁺	Kohlenstoff	Chemische Umlagerung (ppm)
1	173,9	19	56,7
2	140,7	20	48,4
3	138,3	21	47,7
4	136,6	22	41,1
5	136,5	23	40,6
6	133,8	14	37,1
7	124,7	25	36,3
8	124,4	26	36,0
9	123,8	27	35,9
10	120,1	28	34,6
11	119,5	29	22,0
12	99,7	30	19,3
13	77,2	31	16,0
14	76,6 ⁺⁺	32	13,8
15	76,5	33	13,3
16	69,3	34	13,1
17	68,6	35	10,7
18	67,3		

⁺ Unterhalb von TMS; CDCl₃-Lösung.

⁺⁺ übereinstimmend mit CDCl₃-Signalen.

Tabelle X

Kohlenstoff-13-NMR-Daten für LL-F28249 λ

Kohlenstoff	Chemische Umlagerung (ppm) ⁺	Kohlenstoff	Chemische Umlagerung (ppm)
1	173,6	19	68,3
2	142,5	20	67,9
3	139,8	21	57,8
4	137,4	22	48,6
5	137,2	23	45,8
6	136,0	24	41,2
7	130,7	25	40,9
8	123,6	26	36,1 ⁺⁺
9	120,3	27	36,0
10	119,7	28	34,9
11	118,6	29	26,9
12	99,8	30	23,0 ⁺⁺
13	80,5	31	22,4
14	77,7	32	20,0
15	77,6	33	15,7
16	76,7	34	14,0
17	69,3	35	11,1
18	68,6		

⁺ Unterhalb von TMS; CDCl₃-Lösung.

⁺⁺ Zwei unaufgelöste Signale.

Tabelle XI

Kohlenstoff-13-NMR-Daten für LL-F28249 √

<u>Kohlen-</u> <u>stoff</u>	<u>Chemische Umlagerung</u> <u>(ppm)⁺</u>	<u>Kohlen-</u> <u>stoff</u>	<u>Chemische Umlagerung</u> <u>(ppm)</u>
1	167,4	18	69,4
2	150,5	19	68,7
3	142,9	20	68,3
4	142,0	21	48,4
5	137,2 ⁺⁺	22	41,0 ⁺⁺
6	132,1	23	35,9
7	130,7	24	35,6
8	125,8	25	35,5
9	125,5	26	34,4
10	124,2	27	29,7
11	123,7	28	26,8
12	123,2	29	22,9
13	121,3	30	22,8
14	118,0	31	22,1
15	100,0	32	15,3
16	76,7	33	13,9
17	74,6	34	11,0

⁺ Unterhalb von TMS; CDCl₃-Lösung

⁺⁺ Zwei unaufgelöste Signale.

Tabelle XII

Chromatographische Werte

<u>Komponente</u>	<u>TLC + gegen Rf</u>	<u>HPLC + Retentionszeit (Minuten)</u>
α	1,00	13,8
β	0,797	9,3
γ	1,42	12,6
δ	0,758	10,4
ϵ	1,06	10,9
ζ	1,12	11,5
η	1,03	16,2
θ	1,27	17,3
ι	1,27	18,2
κ	1,83	24,7
λ	1,56	19,1
μ	1,92	38,0
ν	1,95	42,3
ω	0,212	7,1

+ Analtech Silica GHLF250 μ , entwickelt mit Ethylacetat:Me-
thylenchlorid (1:3), Nachweis durch Verkohlen mit H_2SO_4 .

++ Altex Ultrasphere ODS 5 μ , 4,6 nm x 25 cm, entwickelt
mit 85 % Methanol in Wasser bei 1,0 ml/Minute, Nachweis
durch Absorptionsvermögen bei 254 nm.

Die neuen LL-F28249 α , β , γ , δ , ϵ , ζ , η , θ , ι , κ , λ , μ , ν und ω bezeichneten Mittel werden während der Züchtung von Streptomyces cyaneogriseus noncyanogenus, NRRL 15773, unter gesteuerten Bedingungen gewonnen.

Dieser Organismus wird in der Kultursammlung der Medical Research Division, American Cyanamid Company, Pearl River, New York, unter der Kulturnummer LL-F28249 aufbewahrt. Eine lebensfähige Kultur dieses Mikroorganismus wurde bei dem Patent Culture Collection Laboratory, Northern Regional Research Center, U. S. Department of Agriculture, Peoria, Illinois 61604 hinterlegt und der ständigen Sammlung einverleibt. Er ist der Öffentlichkeit unter seiner Zugangsnummer NRRL 15773 in dieser Sammlung frei zugänglich.

Für die Herstellung dieser neuen Mittel ist die Erfindung nicht auf diesen speziellen Organismus beschränkt. Tatsächlich ist es der Wunsch und die Absicht, die Verwendung natürlich vorkommender Mutanten dieses Organismus sowie induzierter Mutanten, die von diesem Organismus durch verschiedene, dem Fachmann bekannte mutagene Maßnahmen wie Einwirkung von Stickstoffsenfgas, Röntgenbestrahlung, Ultraviolettstrahlung, N'-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin, Actinophagen und dergleichen erzeugt werden, einzubeziehen. Ebenfalls wird gewünscht und beabsichtigt, inter- und intraspezifische genetische Rekombinanten, die durch genetische, dem Fachmann bekannte Techniken wie beispielsweise Konjugation, Transduktion und genetische technische Vorgänge erzeugt wurden, mit einzubeziehen.

Allgemeine Fermentationsbedingungen

Die Züchtung von Streptomyces cyaneogriseus noncyanogenus, NRRL 15773, kann in den verschiedensten flüssigen Nährsubstraten vorgenommen werden. Für die Erzeugung der Mittel

LL-F28249 α , β , γ , δ , ϵ , ζ , η , θ , ι , κ , λ , μ , ν und ω brauchbare Substrate enthalten assimilierbare Kohlenstoffquellen wie Dextrin, Sucrose, Melasse, Glycerol usw.; eine assimilierbare Stickstoffquelle wie Protein, Proteinhydrolysat, Polypeptide, Aminosäuren, Maisquellwasser usw.; und anorganische Anionen und Kationen wie Kalium, Natrium, Ammonium, Calcium, Sulfat, Carbonat, Phosphat, Chlorid usw. Spurenelemente wie Bor, Molybdän, Kupfer usw. werden als Verunreinigungen von anderen Bestandteilen des Substrates bereitgestellt. Die Belüftung in Behältern und Flaschen wird durch Blasen von steriler Luft durch das Fermentationsmedium oder auf dessen Oberfläche erzielt. Weitere Bewegung in Tanks wird durch einen mechanischen Schnellrührer erreicht. Bei Bedarf kann ein Antischaummittel wie Siliconöl zugesetzt werden.

Ausführungsbeispiele:

Beispiel 1

Herstellung von Inokulum

Nach folgender Formel wurde ein typisches Substrat hergestellt, das für die Züchtung der verschiedenen Stufen von Inokulum verwendet wurde:

Dextrose		1,0 %
Dextrin		2,0 %
Hefeextrakt		0,5 %
NZ Amin		0,5 %
Calciumcarbonat		0,1 %
Wasser	qs	100 %

Dieses Substrat wurde sterilisiert. Eine 100-ml-Portion dieses in einem Kolben befindlichen sterilen Substrates wurde mit Myzelschnitzeln von einer Schrägagarkultur von Streptomyces cyaneogriseus noncyanogenus NRRL 15773 geimpft.

Das Substrat wurde danach 48 bis 72 Stunden lang bei 28 °C kräftig auf einem Drehschüttler bewegt, wodurch das Primärinokulum gewonnen wurde. Dieses Primärinokulum wurde anschließend zum Impfen eines Liters des obigen sterilen Substrate verwendet, das dann 48 Stunden lang bei 28 °C aerob gezüchtet wurde, um das Sekundärinokulum zu erhalten.

Beispiel 2

Fermentation

Ein Fermentationssubstrat folgender Formulierung wurde zubereitet:

Dextrin	1,0 %
Sojapepton	1,0 %
Melasse	2,0 %
Calciumcarbonat	0,1 %
Wasser	qs 100 %

Dieses Substrat wurde sterilisiert, und anschließend wurde eine 30-Liter-Portion mit einem Liter nach Beispiel 1 hergestellten Sekundärinokulum geimpft. Die Fermentation wurde bei 30 °C mit einem sterilen Luftstrom von 30 Litern pro Minute, einem Gegendruck von 8 psig und Bewegung durch einen mit 500 U/min betriebenen Schnellrührer 91 Stunden lang vorgenommen, worauf die Maische geerntet wurde.

Beispiel 3

Isolierung von LL-F28249 α , β und γ

Eine Gesamtmenge von 26 Litern der nach der Beschreibung in Beispiel 2 hergestellten Vollerntemaische wurde mit 1500 g Diatomeenerde vermischt und filtriert. Der Myzelkuchen wurde

mit 5 Litern Wasser gewaschen, und das Filtrat und die Waschlösung wurden verworfen. Der Myzelkuchen wurde im Laufe einer Stunde mit 10 Litern Methanol vermischt, anschließend filtriert und mit 5 Litern Methanol gewaschen. Der Methanolextrakt und die Methanolwaschlösung wurden zusammengenommen und zu einem wäßrigen Rückstand von etwa 1 bis 2 Litern eingedampft. In diesen wäßrigen Rückstand wurde seine doppelte Volumenmenge Methylenchlorid gegeben, und es wurde 1/2 Stunde lang gemischt. Die Methylenchloridphase wurde abgetrennt und danach zu einem Sirup eingeeengt, so daß 27 g Rohmaterial entstanden. Diese 27 g Rohmaterial wurden in einem Gemisch von Methylenchlorid und Methanol gelöst, durch Baumwolle und wasserfreies Natriumsulfat filtriert und dann eingedampft, wodurch 7,0 g eines Öls gewonnen wurden.

Eine 170-g-Portion Silicagel wurde in 12,5 % Ethylacetat in Methylenchlorid aufgeschlämmt und zur Bildung einer Säule von 2,5 x 58 cm gegossen. Das Öl wurde in 12,5 % Ethylacetat in Methylenchlorid gelöst und auf die Säule aufgegeben. Die Säule wurde mit dem gleichen Lösungsmittelgemisch entwickelt. Die mobile Phase wurde anfangs mit 1,3 ml/Minute geführt, und 15-Minuten-Fraktionen wurde gesammelt. Nach 10 Fraktionen verlangsamte sich die Fließgeschwindigkeit auf etwa 0,5 ml/Minute, so nahmen die Fraktionen 1 bis 10 von 20 ml gleichmäßig auf etwa 10 ml ab und die Fraktionen 11 bis 98 auf etwa 7 ml. Bei Fraktion 99 wurde die Fließgeschwindigkeit erhöht, um 25-ml-Fraktionen in 10 Minuten zu erhalten. Insgesamt wurden 105 Fraktionen gesammelt. Diese Fraktionen wurden durch Dünnschichtchromatographie in Ethylacetat:Methylenchlorid (1:1) getestet.

Die Fraktionen 30 bis 54 wurden zusammengenommen und eingedampft und ergaben 1,08 g eines LL-F28249 \bar{f} enthaltenden Öls.

Die Fraktionen 55 bis 62 wurden zusammengenommen und eingedampft und ergaben 150 mg LL-F28249 α und β enthaltenden Feststoff.

Die 150 mg des LL-F28249 α und β enthaltenden Feststoffes wurden durch präparative HPLC unter Anwendung einer Umkehrphasensäule (Whatman C8, 2,2 x 50 cm), die mit 80 % (V/V) Methanol in Wasser entwickelt wurde, chromatographiert. Die Fließgeschwindigkeit betrug etwa 10 ml/Minute, und 2-Minuten-Fractionen wurden gesammelt.

Die Fraktionen 58 bis 69 wurden zusammengenommen, das Methanol wurde verdampft, t-Butanol wurde zugegeben, und das Gemisch wurde lyophilisiert, wodurch 60 mg reines LL-F28249 α gewonnen wurden.

Die Fraktionen 40 bis 43 wurden zusammengenommen, das Methanol wurde verdampft, und die zurückbleibende wäßrige Suspension wurde mit Methylenchlorid extrahiert, wodurch nach Eindampfung 10 mg reines LL-F28249 β gewonnen wurden.

Die 1,08 g des LL-F28249 γ enthaltenden Öles wurden in 10 % Ethylacetat in Methylenchlorid gelöst und auf eine mit Silicagel gefüllte Säule (2,5 x 50 cm) aufgegeben. Die Säule wurde mit 10 % Ethylacetat in Methylenchlorid entwickelt, wobei die Eluierung bei einer Fließgeschwindigkeit von 2 ml/Minute erfolgte und 12-Minuten-Fractionen gesammelt wurden. Die Fraktionen 19 bis 29 wurden zusammengenommen und zu einem Rückstand eingedampft. Dieser Rückstand wurde durch präparative Umkehrphasenchromatographie, wie für die α und β Komponenten beschrieben, gereinigt. Die Fraktionen 55 bis 62 wurden zusammengenommen, das Methanol wurde unter Vakuum verdampft, t-Butanol wurde zugegeben, und das Gemisch wurde lyophilisiert und ergab 60 mg reines LL-F28249 γ .

Beispiel 4

Großtechnische Fermentation

Ein Inokulum von Streptomyces cyaneogriseus noncyanogenus, NRRL 15773 wurde nach der Beschreibung von Beispiel 1 hergestellt, wobei 100 ml Primärinokulum zur Erzeugung von 10 Litern Sekundärinokulum verwendet wurden.

Zwei 300-Liter-Fermentationen wurden nach der Beschreibung von Beispiel 2 durchgeführt, wobei 10 Liter des obigen Sekundärinokulums für je 300 Liter Fermentationssubstrat verwendet wurden. Nach Ablauf von 118 Stunden wurden die Maischen geerntet.

Beispiel 5

Isolierung von LL-F28249c

Eine Gesamtmenge von 450 Litern Erntemaische von den zwei in Beispiel 4 beschriebenen 300-Liter-Fermentationen wurden wie im ersten Teil von Beispiel 3 beschrieben behandelt, so daß Rohmaterial in Form eines Sirups gewonnen wurde.

Dieser sirupartige Rückstand wurde mit Hexan zur Entfernung nicht-polarer Stoffe gewaschen, und die zurückbleibenden 9 g unlösliches Material wurden der Sephadex LH-20-Verteilungschromatographie unterzogen.

Die Chromatographie-Säule wurde mit 9 Litern Sephadex LH-20, das zuvor in Methanol gequollen worden war, vorbereitet, um eine Säule von 10 x 110 cm zu erhalten. Die Säule wurde equilibriert, indem etwa 4800 ml mobile Phase (Methylenchlorid: Hexan:Methanol (10:10:1) mit einer Fließgeschwindigkeit von 5 ml/Minute hindurchgeleitet wurden. Die 9 g unlösliches Ma-

terial wurden in 50 ml der mobilen Phase auf die Säule aufgegeben. Es wurde ein erster Vorlauf von 2150 ml mit einer Fließgeschwindigkeit von 5 ml/Minute erzielt. Die Fließgeschwindigkeit wurde anschließend auf 8 ml/Minute erhöht, und Fraktionen wurden aller 45 Minuten gesammelt. Die Fraktionen 9 bis 12 wurden zusammengenommen, und die Lösungsmittel wurden unter Vakuum verdampft, so daß 4,9 g Rückstand gewonnen wurden.

Dieser Rückstand wurde in einem 1:1-Gemisch von Cyclohexan und Ethylacetat gelöst und bei Raumtemperatur zum langsamen Verdunsten stehen gelassen. Durch die Zugabe von n-Hexan entstand ein Präzipitat, das gesammelt wurde und 3,1 g Feststoff ergab.

Eine 3,0-g-Portion dieses Feststoffes wurde durch Ausfällung aus 25 ml Methylenchlorid unter Verwendung von 50 ml n-Hexan weiter gereinigt.

Das auf diese Weise gewonnene Präzipitat wurde wieder in 15 ml Methylenchlorid gelöst und mit 25 ml n-Hexan ausgefällt, so daß 510 mg reines LL-F28249 ω gewonnen wurden.

Beispiel 6

Isolierung von LL-F28249 d, e, g, n, o und l

Die Fraktionen 4 bis 7 von der in Beispiel 5 beschriebenen Sephadex-LH-20-Säule wurden zusammengenommen und die Lösungsmittel unter Vakuum verdampft, so daß 1,9 g Rückstand blieben.

Dieser Rückstand wurde auf einer 200-g-Silicagel-Säule (2,5 cm x 83 cm) unter Verwendung von 10 % Ethylacetat in Methylenchlorid als Eluierungsmittel chromatographiert. Die

Fließgeschwindigkeit betrug etwa 2 ml/Minute, und Fraktionen wurden alle 12 Minuten gesammelt.

Die Fraktionen 65 bis 67 und 73 bis 79 wurden alle zusammen-
genommen und die Lösungsmittel unter Vakuum verdampft, so
daß 250 mg Rückstand blieben.

Diese 250 mg Rückstand wurden der präparativen Umkehrphasen-
chromatographie nach der Beschreibung in Beispiel 3 unter-
zogen, nur wurde 75 % Methanol in Wasser als mobile Phase
verwendet. Die Fließgeschwindigkeit betrug etwa 10 ml/Minute.
Die erste 2000-ml-Portion Eluat wurde in den Abfall geleitet,
danach wurden 72 Fraktionen in Abständen von 2,0 Minuten ge-
sammelt. Nachdem ein weiterer Teil Eluat beseitigt worden war,
wurden (zwischen 300 und 400 ml) Fraktionen wieder, aber im
Abstand von 2,5 Minuten gesammelt.

Die Fraktionen wurden wie unten angegeben zusammengenommen.
Die zusammengenommenen Fraktionen wurden über Nacht unter
einer Abzugshaube zum Verdunsten stehen gelassen, danach
wurden die Komponenten in Methylenchlorid extrahiert. Nach
der Verdampfung des Lösungsmittels wurde jeweils etwa 1 mg
von den reinen Komponenten gewonnen.

<u>Zusammengenommene Fraktionen</u>	<u>Verbindung</u>
7 - 10	LL-F28249 J
19 - 22	LL-F28249 E
28 - 31	LL-F28249 L
81 - 83	LL-F28249 n
86 - 88	LL-F28249 0
93 - 95	LL-F28249 l

Beispiel 7

Isolierung von LL-F28249 κ , λ , μ und ν

Eine Gesamtmenge von 390 Litern der Fermentationsmaische, die von den nach der Beschreibung in Beispiel 2 durchgeführten Fermentationen geerntet worden war, wurde im wesentlichen nach der Beschreibung im ersten Abschnitt von Beispiel 3 behandelt und ergab 120 ml Methylenchloridkonzentrat. Dieses Konzentrat wurde mit 200 ml Hexan verdünnt und über Nacht bei 4 °C gekühlt. Das resultierende Präzipitat wurde durch Filtration entfernt und verworfen. Das Filtrat wurde mit 300 ml Hexan verdünnt. Das resultierende Präzipitat (A) wurde durch Filtration gesammelt und aufbewahrt. Dieses Filtrat wurde zur Trockne eingedampft, und der ölige Rückstand wurde danach in 200 ml Methylenchlorid gelöst und mit 1700 ml Hexan verdünnt. Das resultierende Präzipitat (B) wurde durch Filtration gesammelt und aufbewahrt. Dieses Filtrat wurde zu einem öligen Rückstand eingeengt, der dann wieder in 50 ml Methylenchlorid gelöst wurde, 950 ml Methanol wurden dazugegeben, und diese Lösung wurde 3 Tage lang bei 4 °C aufbewahrt. Das resultierende Präzipitat wurde durch Filtration entfernt und verworfen. Das Filtrat wurde zur Trockne eingedampft, und der Rückstand (C) wurde mit (A) und (B) zusammengenommen und der Chromatographie wie folgt unterzogen: 5,0 x 109 cm-Säule war mit breiligem Woelm-TSC-Silicagel in Ethylacetat+Methylenchlorid (1:9) gefüllt. Die Säule wurde mit dem gleichen Lösungsmittelgemisch bei einer Geschwindigkeit von 25 ml/Minute entwickelt. Die ersten 2 Liter Auslaufstrom wurden verworfen, dann wurden sechzehn 400-ml-Fractionen gesammelt.

Die Fractionen 2 und 3 wurden zusammengenommen und eingedampft und ergaben 3,9 g öliges Material (D).

Die Fraktionen 4 bis 7 wurden zusammengenommen und eingedampft und ergaben 9,5 g öliges Material, das in Hexan gelöst und auf einer mit 300 g breiigem Woelm-Silicagel in Ethylacetat:Hexan (1:4) gefüllten 2,5 x 110 cm-Säule chromatographiert wurde. Die Säule wurde mit dem gleichen Lösungsmittelsystem mit einer Geschwindigkeit von 4 ml/Minute entwickelt, wobei Fraktionen in Abständen von 7 Minuten gesammelt wurden.

Die Fraktionen 45 bis 54 wurden zusammengenommen und eingedampft und ergaben 0,3 g Material (E).

Die Fraktionen 63 bis 135 wurden zusammengenommen, bis zur Trockne eingedampft, danach wieder in 6-Butanol gelöst und lyophilisiert und ergaben 4,6 g gräulichen Feststoff (F).

LL-F28249 K und μ

Material (D) und (E) wurden zusammengenommen und auf einer mit 300 g Woelm-Silicagel gefüllten 2,5 x 110 cm-Säule unter Entwicklung mit Ethylacetat:Hexan (1:9) chromatographiert. Die Fließgeschwindigkeit wurde auf 4 ml/Minute gehalten, und Fraktionen wurden in Abständen von 7 Minuten gesammelt.

Die Fraktionen 67 bis 115 wurden zusammengenommen und zur Trockne eingedampft und ergaben 920 mg Rückstand (G).

Dieser Rückstand (G) wurde durch präparative HPLC unter Verwendung einer Umkehrphasensäule (Whatman C8, 2,2 x 50 cm) und Entwicklung mit 85 % (V/V) Methanol in Wasser chromatographiert. Die Fließgeschwindigkeit betrug etwa 10 ml/Minute, und in Abhängigkeit von 2,5 Minuten wurden Fraktionen gesammelt.

Die Fraktionen 33 bis 40 wurden zusammengenommen, zur Entfernung von Methanol eingeengt und anschließend mit Methylencchlorid extrahiert. Der nach dem Eindampfen gewonnene Rückstand wurde in t-Butanol gelöst und danach lyophilisiert und ergab 60 mg LL-F28249 .

Die Fraktionen 52 bis 58 wurden ähnlich behandelt und ergaben eine geringe Menge LL-F28249 .

LL-F28249 λ

Eine 1-g-Portion von Material (F) wurde nach obiger Beschreibung durch Umkehrphasen-HPLC chromatographiert, nur wurden 80 % (V/V) Methanol in Wasser als Eluierungsmittel verwendet.

Die Fraktionen 61 bis 75 wurden zusammengenommen und wie oben behandelt, so daß 100 mg LL-F28249 λ gewonnen wurden.

LL-F28249 √

Eine 396-g-Portion eines Materials, das im wesentlichen das gleiche wie das obige Material (D) war, wurde in 500 ml Methanol gelöst und anschließend mehrere Stunden lang bei 4 °C gekühlt. Das resultierende Präzipitat wurde durch Filtration entfernt, mit kaltem Methanol gewaschen und verworfen. Das mit der Waschlösung zusammengenommene Filtrat wurde eingedampft. Das zurückbleibende Öl wurde in Hexan gelöst und auf eine mit trockenem Silicagel gefüllte 5 x 50-cm-Säule (Mallinkrodt SilicAR cc-7) aufgegeben. Die Säule wurde mit Ethylacetat:Hexan (1,5:8,5) mit einer Geschwindigkeit von etwa 50 ml/Minute eluiert.

Es wurden vier Fraktionen gesammelt:

<u>Fraktion</u>	<u>Volumen (Liter)</u>
1	1
2	4
3	1
4	2

Fraktion 3 wurde eingedampft und ergab 5,0 g Rückstand, der durch präparative Umkehrphasen-HPLC (Waters C₁₈, 5 x 60 cm) gereinigt wurde. Die Säule wurde anfangs mit 16 Litern 80 % Methanol in Wasser (V/V) bei 100 ml/Minute entwickelt, anschließend mit 6,4 Litern 84 % Methanol in Wasser (V/V). Der erste Liter Auslaufstrom wurde verworfen, und danach wurden Fraktionen von 400 ml gesammelt.

Die Fraktionen 44 bis 47 wurden zusammengenommen und wie oben beschrieben behandelt, so daß 390 mg LL-F28249 \diamond als schwach gelber Feststoff gewonnen wurden.

Beispiel 8

Anti-nematode Wirksamkeit von LL-F28249, NRRL 15773

Bei diesem in vitro Versuch soll die frei lebende Nematode Caenorhabditis elegans (C. elegans) zum Nachweis der anti-nematoden Wirksamkeit von Fermentationsbrühen gegen Bodenmikroorganismen benutzt werden. Das Versuchsverfahren besteht darin, daß 50 μ l jeder Brühe in eine der 96 Vertiefungen einer Mikrokulturplatte mikropipottiert werden und 10 μ l einer drei bis vier Tage alten Kultur von C. elegans (in allen Entwicklungsstadien), in C. briggsae Maintenance Medium suspendiert, hinzugegeben werden. Die Wirkungen der Fermentationsbrühen werden beobachtet und 48 Stunden nach dem ersten Vermischen von Brühe und Nematoden notiert.

LL-F28249, NRRL 15773, Brühe tötete alle ausgewachsenen Organismen und reduzierte das Überleben und die Beweglichkeit verschiedener Larvenstadien sowohl bei dem ersten Versuch als auch bei einem Wiederholungsversuch erheblich.

Beispiel 9

Insektizide Wirksamkeit der erfindungsgemäßen Verbindungen

Die insektizide Aktivität der erfindungsgemäßen Verbindungen gegen eine Vielzahl von Insekten bei verschiedenen Konzentrationen von Wirkstoff in Aceton-Wasser-Lösungen wird durch die folgenden insektiziden Testbeispiele bestimmt. Die Ergebnisse dieses Tests sind in Tabelle XVI zusammengefaßt.

A) Heliothis virescens, Eier, Baumwollkapselwurm.

Ein junges 7 bis 8 cm langes Baumwollblatt wird in eine Test-suspension eingetaucht und drei Sekunden lang darin bewegt. Eier werden auf Mull gesammelt, der in Quadrate von 10 bis 20 mm geschnitten wird, die etwa 50 bis 100 Eier (6 bis 30 Stunden alt) enthalten. Ein Mullquadrat mit Eiern wird gleichfalls in die Testsuspension eingetaucht und auf das behandelte Blatt gelegt. Die Kombination wird zum Trocknen unter den Abzug gelegt. Danach wird die Kombination in eine 8-Unzen-Dixie-Schale Nr. 2168-ST (240 ml, 6 cm hoch, oberer Durchmesser 9,5 cm, unterer Durchmesser 8 cm) gegeben, die ein 5 cm langes Stück feuchten Dentaldocht enthält. Ein durchsichtiger Platedeckel wird oben auf die Schale gelegt, und die Behandlung wird drei (3) Tage lang weitergeführt, bevor Sterblichkeitszählungen vorgenommen werden.

B) Aphis fabae, gemischte Instar, Bohnenblattläuse.

Töpfe, die eine etwa 5 cm hohe einzelne Pflanze der Kapuziner-

kresse (Tropaeolum sp) enthalten, werden mit etwa 100 Blattläusen einen Tag vor dem Versuch infiziert. In einem Abzug wurde jede Pflanze mit der Testsuspension bei 2 Umdrehungen auf einem Drehtisch mit 4 U/min unter Verwendung eines DeVil-luss-Zerstäuber Nr. 154 gespritzt. Die Töpfe werden seitlich auf weiße Emailleschüsseln gesetzt und zwei (2) Tage lang dort gehalten. Danach werden die Sterblichkeitsbeurteilungen der Blattläuse vorgenommen.

C) Empoasca abrupta, Erwachsene "Westliche Kartoffelblatt hüpfer"

Ein etwa 5 cm langes Sieva-Limabohnenblatt wird in die Testsuspension eingetaucht und drei (3) Sekunden lang darin bewegt und danach zum Trocknen unter einen Abzug gelegt. Das Blatt wird in eine 100 x 10 mm große Petrischale gelegt, die ein feuchtes Filterpapier auf dem Schalenboden enthält. Danach werden 10 ausgewachsene "Blatthüpfer" in jede Schale gegeben, und die Behandlung wird drei (3) Tage lang fortgeführt, worauf die Sterblichkeitszählungen vorgenommen werden.

D) Trichoplusia ni, dritte Instar-Larven, "Kohlspanner".

Die bis zu einer Länge von 7 bis 8 cm gewachsenen Blätter einer Sieva-Limabohnenpflanze werden in eine Testsuspension eingetaucht und drei (3) Sekunden lang darin bewegt und danach zum Trocknen unter einen Abzug gelegt. Ein Blatt wird danach abgeschnitten und in eine 100 x 10 mm große Petrischale, die ein feuchtes Filterpapier auf dem Boden enthält, gelegt, und zehn dritte Instar-Larven werden darin untergebracht. Die Schale wird drei (3) Tage stehen gelassen, bevor Beurteilungen über die Sterblichkeit und reduzierte Futteraufnahme angestellt werden.

E) Spodoptera eridanis, dritte Instar-Larven, "Südlicher Heerwurm".

Die Blätter einer Sieva-Limabohnenpflanze mit einer Länge von 7 bis 8 cm werden in die Testsuspension eingetaucht und drei (3) Sekunden lang darin bewegt und dann zum Trocknen unter einen Abzug gelegt. Ein Blatt wird danach abgeschnitten und in eine, ein feuchtes Filterpapier auf dem Boden enthaltende Petrischale von 100 x 10 mm gelegt, und zehn (10) dritte Instar-Larven werden hinzugegeben. Die Schale wird fünf (5) Tage lang stehen gelassen, bevor Beurteilungen hinsichtlich der Sterblichkeit, reduzierten Futteraufnahme oder irgendwelcher Störungen der normalen Häutung angestellt werden.

F) Heliothis virescens, dritte Instar-Larven, Baumwollkapselwurm

Baumwollkeimblätter werden in die Testsuspension eingetaucht und zum Trocknen unter einen Abzug gelegt. Das Keimblatt wird in 4 Stücke geschnitten, und jedes Stück wird in eine 30-ml-Plastemedizinschale, die ein 5 bis 7 mm langes Stück feuchten Dentaldoctes enthält, gegeben. In jede Schale wird eine dritte Instar-Larve gelegt, und ein Pappdeckel wird auf jede Schale gelegt. Die Behandlungen werden drei (3) Tage lang fortgeführt, bevor Zählungen der Sterblichkeit und Beurteilungen über reduzierte Futteraufnahme angestellt werden.

G) Musca domestica, Hausfliege.

Die verlangte Konzentration der Testverbindung wird zu dem Standard-CSMA-Luzerne-Kleie-Larvenmedium gegeben. Null bis 4 Stunden alte Hausfliegen Eier werden in das behandelte Medium gegeben. Das behandelte Medium wird stehen gelassen, und Beobachtungen hinsichtlich des Eischlüpfens, Larvenwachstums und des Auskriechens von erwachsenen Tieren werden angestellt.

H) Tribolium confusum, amerikanischer Reismehlkäfer.

Amerikanische Reismehlkäfer (Tribolium confusum) werden von Laboratoriumskolonien, die auf einem Gemisch von Weizenvollkorn- und Weißmehl gezüchtet wurden, bezogen. Für diesen Test wird Weißmehl mit einer Acetonlösung des Testmaterials behandelt, wofür 1 ml Lösung pro 5 Gramm Mehl in einem 30-ml-Weithalskolben verwendet werden. Das Aceton kann über Nacht unter einem Abzug verdunsten. Der Inhalt wird mit einem Spachtel gerührt, um durch die Testlösung gebildete Klumpen zu zerteilen. Der Kolben wird danach auf einen VORTES-GENIE^R-Vibrationsmischer gestellt, um die Testmaterialien gründlich mit dem Futter zu vermischen. Zehn ausgewachsene amerikanische Reismehlkäfer werden in jeden Kolben gegeben und der Kolben wird lose verschlossen. Nach fünf (5) Tagen Zeit zur Eiablage werden die Käfer entnommen und Aufzeichnungen über die Sterblichkeit gemacht. Zwei (2) und vier (4) Wochen nach dem anfänglichen Befall werden Beobachtungen über die Anzahl und Größe der von den sich entwickelnden Larven im behandelten Mehl erzeugten Spuren angestellt. Solche Beobachtungen liefern einen Hinweis auf verzögertes Wachstum. Absterben von Eiern oder Larven oder irgendwelche anderen Störungen im normalen Entwicklungsverlauf. Nach etwa neun (9) Wochen bei 27 °C schlüpfen die erwachsenen Käfer, und die abschließenden Beobachtungen werden durch Sieben des Inhalts jedes Kolbens durch ein 50-Maschen-Sieb vorgenommen. Diese Beobachtungen betreffen die Anzahl erwachsener Tiere, Puppen und Larven, sowie die Untersuchung der Rückstände, die nicht durch das Sieb hindurchgingen, um zu ermitteln, ob sich darin irgendwelche abgestorbenen Eier oder Neonaten befinden.

I) Tetranychus urticae (P-resistenter Stamm), Gemeine Spinnmilbe

Sieva-Limabohnenpflanzen mit 7 bis 8 cm langen Blättern werden ausgewählt und auf eine Pflanze je Topf reduziert. Ein kleines Stück wird von einem der Hauptkolonie entnommenen Blatt abgeschnitten und auf jedes Blatt der Testpflanzen gelegt. Das erfolgt etwa zwei (2) Stunden vor der Behandlung, damit die Milben auf die Testpflanze kriechen und Eier ablegen können. Die Größe des abgeschnittenen Stückes wird variiert, damit etwa 100 Milben je Blatt erhalten werden. Zum Zeitpunkt der Behandlung wird das zur Übertragung der Milben verwendete Blattstück entfernt und weggeworfen. Die mit Milben infizierten Pflanzen werden in die Testformulierung eingetaucht und drei (3) Sekunden lang darin bewegt und unter einen Abzug zum Trocknen gelegt. Die Pflanzen werden zwei (2) Tage lang stehen gelassen, bevor mit den Beurteilungen über die Abtötung ausgewachsener Tiere unter Verwendung des ersten Blattes begonnen wird. Das zweite Blatt wird weitere fünf (5) Tage an der Pflanze gelassen, bevor Beobachtungen über die Abtötung von Eiern und/oder frisch geschlüpfte Nymphen angestellt werden.

J) "Südl cher Heerwurm" (Spodoptera eridania), dritte Instar, systemischer Stengelschnitt-Test.

Die Verbindung wird als Emulsion formuliert, die 0,1 g Testmaterial, 0,1 g polyethoxyliertes Pflanzenöl in 0,4 g Wasser, 10 ml Aceton und 90 ml Wasser enthält. Dieses Gemisch wird zehnfach mit Wasser verdünnt, um die 100 ppm Emulsion für den Test zu gewinnen. Sieva-Limabohnenpflanzen mit gerade entwickelten Primärblättern werden für diesen Versuch verwendet. Diese Blätter werden mindestens 2,5 cm über dem Erdboden abgeschnitten, um eine Verunreinigung mit Bodenbakterien zu verhindern, die zu einem Faulen des Stengels während des Tests führen könnten. Die zerschnittenen Stengel

werden in die Testemulsion gelegt. Nach drei (3) Tagen Aufnahme, wird ein Blatt abgeschnitten und in eine 100 x 10 mm große Petrischale, die ein feuchtes Filterpapier auf dem Boden und zehn dritte Instar-Larven enthält, gelegt. Nach drei (3) Tagen werden Zählungen der Sterblichkeit und Beurteilungen über reduzierte Futteraufnahme angestellt.

K) Thrips palmi, Blasenfüßer.

Stark infizierte Blätter von Baumwollsämlingen werden unter Feldbedingungen mit den verlangten Konzentrationen gespritzt. Die Anzahl der Blasenfüßer wird vor und nach dem Spritzen gezählt. Die prozentuale Bekämpfung basiert auf diesen Zählungen.

L) Tetranychus urticae (P-resistenter Stamm), Gemeine Spinnmilbe

Die Verbindung wird als Emulsion formuliert, die 0,1 g des Testmaterials, 0,1 g polyethoxyliertes Pflanzenöl in 0,4 g Wasser, 10 ml Aceton und 90 ml Wasser enthält. Dieses Gemisch wird zehnfach mit Wasser verdünnt, um die 100 ppm Emulsion für den Versuch zu gewinnen. Sieva-Limabohnenpflanzen mit gerade entwickelten Primärblättern werden für den Versuch verwendet. Sie werden mindestens 2,5 cm über dem Erdboden abgeschnitten, um eine Verunreinigung durch Bodenbakterien zu verhindern, die zum Faulen des Stengels während des Tests führen könnten. Die geschnittenen Stengel werden in die Testemulsion gegeben. Jedes Blatt wird mit annähernd 100 ausgewachsenen Milben infiziert und drei (3) Tage lang liegen gelassen, bevor Zählungen der Sterblichkeit vorgenommen werden.

Tabelle XVI

Insektizide und mitizide Aktivität von F-28249α und F-28249 γ

Prozentuale Sterblichkeit

Verbindung in ppm	Systemische Pflanzenaktivität												
	Kohl- käfer	Südl. Heer- wurm	Baum- koll- kap- sel- wurm	Südl. Heer- wurm	Baum- koll- kap- sel- wurm	Eier	Boh- nen	Blatt- laus	Westl. Kar- tof- fel- blatt- läus	Reis- mehl- käfer- larven u./oder -Puppen	Haus- flie- gen larven	Blat- sen füser	Mil- ben
F-28249	1000	100	100	100	100	-	-	-	55 ⁺	100	100	93	-
F-28249	300	100 ⁺	100	100	100	100	-	-	50	-	100	89	100
F-28249	100	-	60 ⁺	100 ⁺	100	100	100	100	-	97	-	-	100
F-28249	1000	-	40	50 ⁺	100	100	100	100	20	-	-	-	100
F-28249	100	-	0	0	0	0	100	100	0	-	-	-	90

+ Futteraufnahme reduziert (Anti-Freß-Eigenschaften)

Patentansprüche:

1. Verfahren zur Bekämpfung von Pflanzennematoden, gekennzeichnet dadurch, daß auf das Blattwerk von Pflanzen, auf den Boden, in dem sie wachsen, oder in deren Stämme eine nematozid-wirksame Menge einer Fermentationsbrühe oder Vollmaische des Mikroorganismus Streptomyces cyaneogriseus noncyanogenus mit der Hinterlegungs-Zugangsnummer NRRL 15773 aufgebracht wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, gekennzeichnet dadurch, daß die Fermentationsbrühe oder Vollmaische des Mikroorganismus Streptomyces cyaneogriseus noncyanogenus mit der Hinterlegungs-Zugangsnummer NRRL 15773 Mittel enthält, die als LL-F28249 α , LL-F28249 β , LL-F28249 γ , LL-F28249 δ , LL-F28249 ϵ , LL-F28249 ζ , LL-F28249 η , LL-F28249 θ , LL-F28249 ι , LL-F28249 κ , LL-F28249 λ , LL-F28249 μ , LL-F28249 ν und LL-F28249 ω bezeichnet werden.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, gekennzeichnet dadurch, daß etwa 0,1 bis 1,4 kg Fermentationsbrühe oder Vollmaische je Hektar aufgebracht werden.

- Hierzu 57 Blatt Zeichnungen -

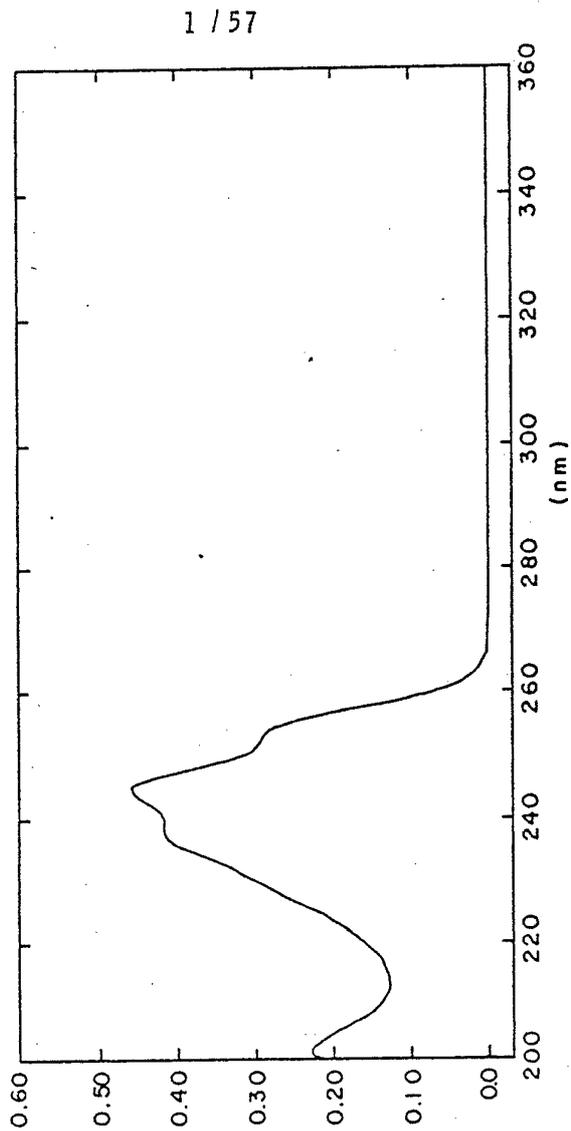


FIG I

2157

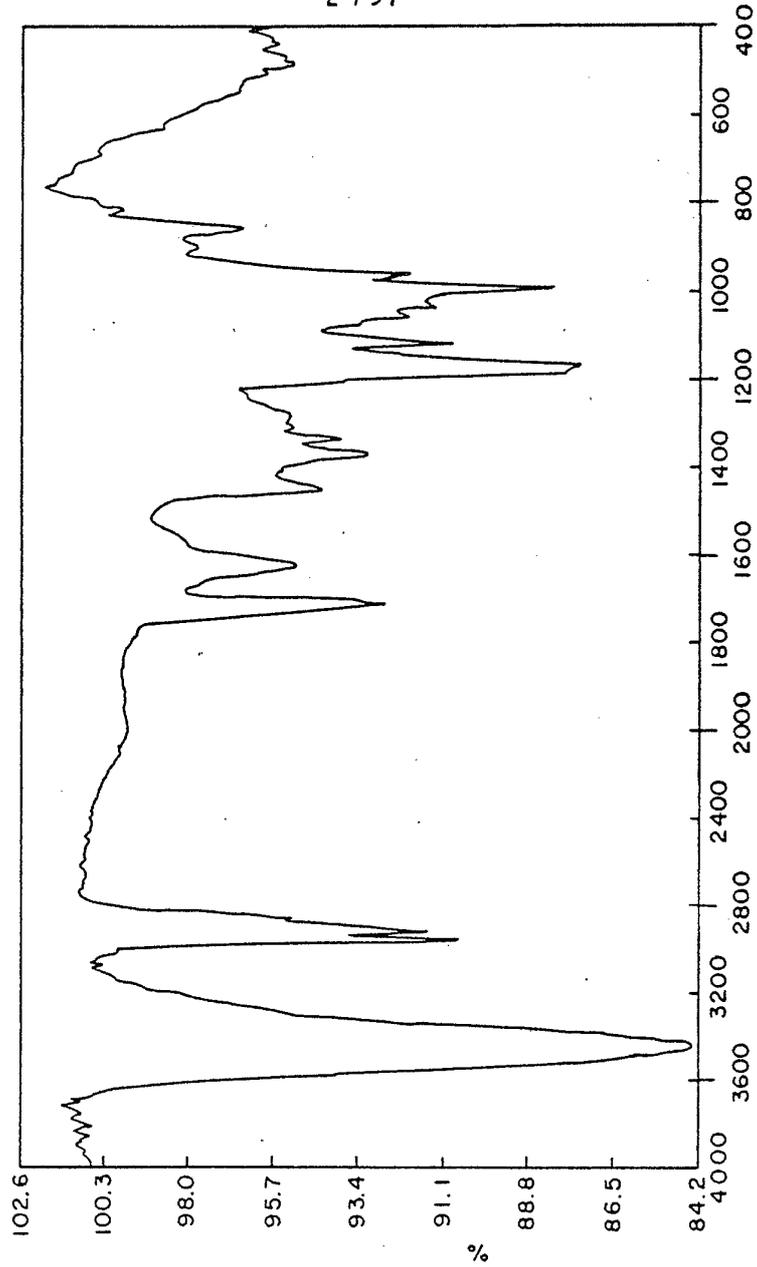


FIG II

-31086- 377846

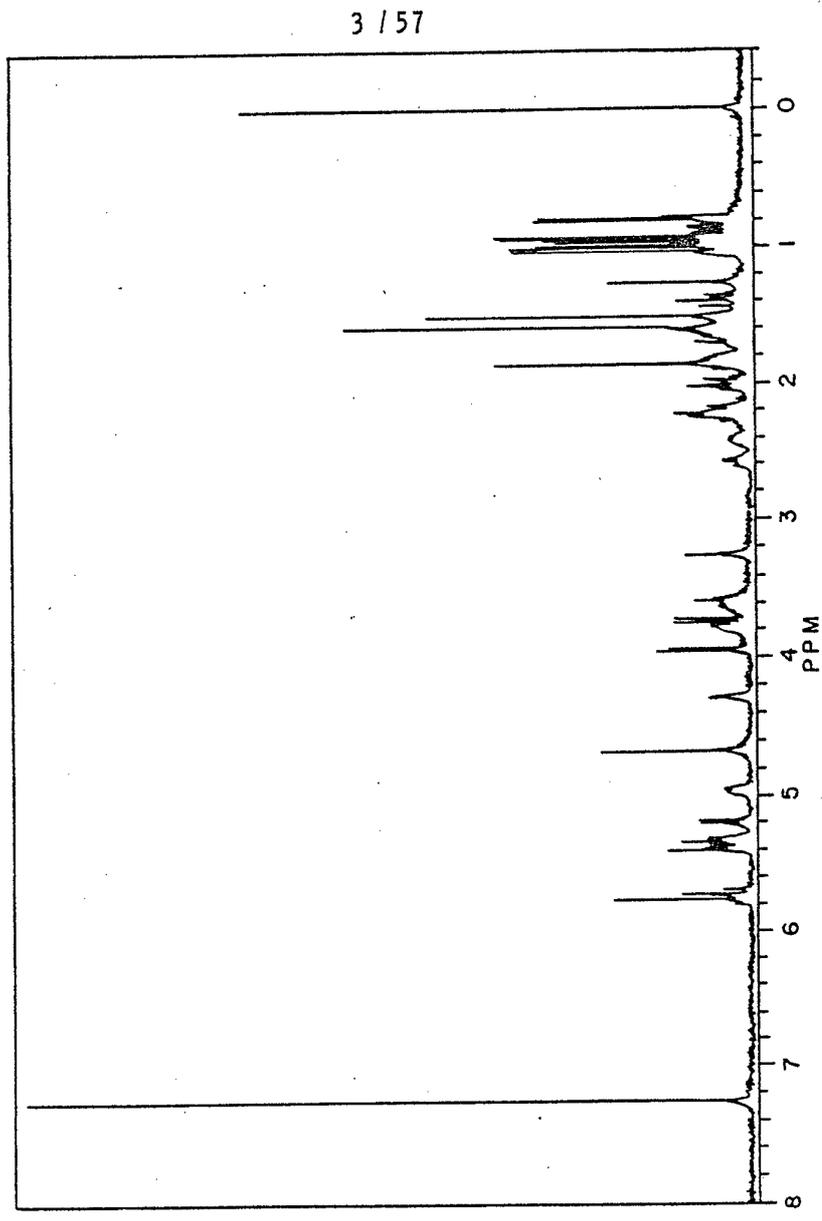


FIG III

-31086- 377848

4157

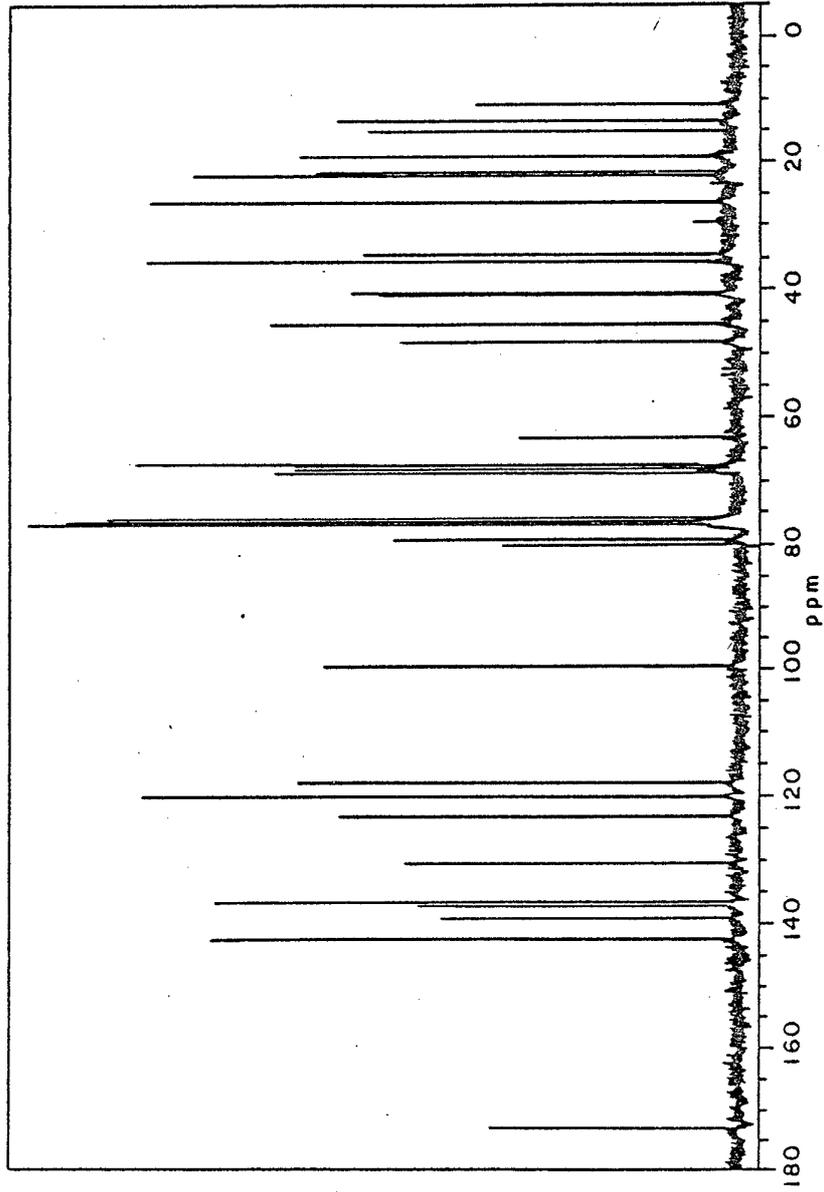
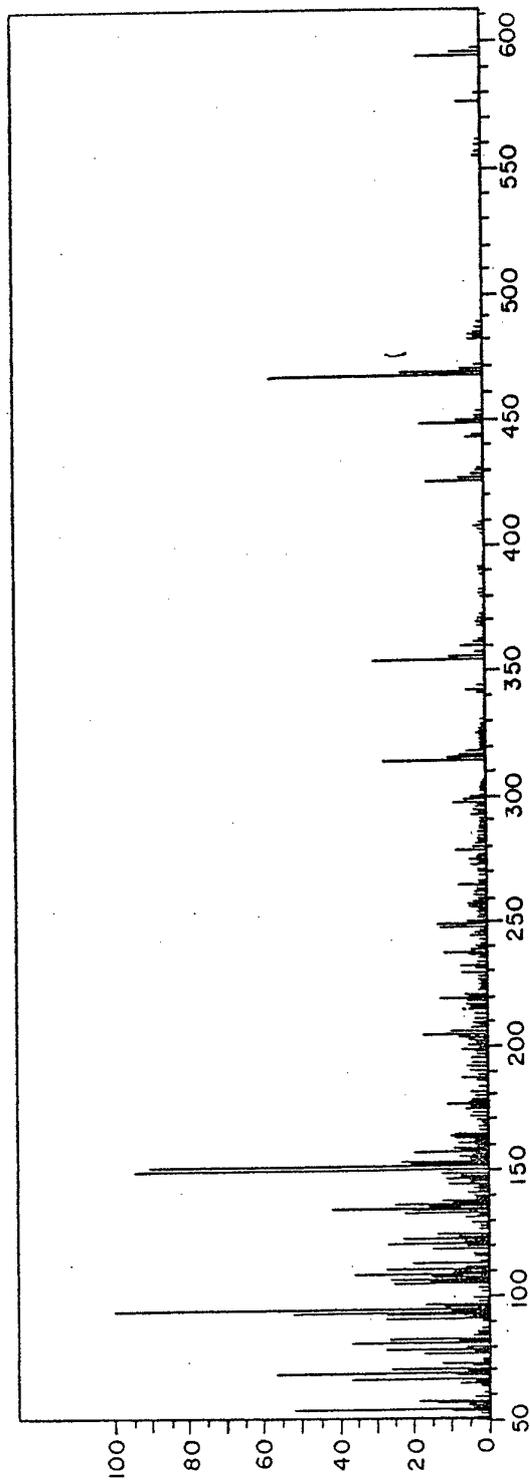


FIG IV

-310.86- 377846



5157

FIG V

6157

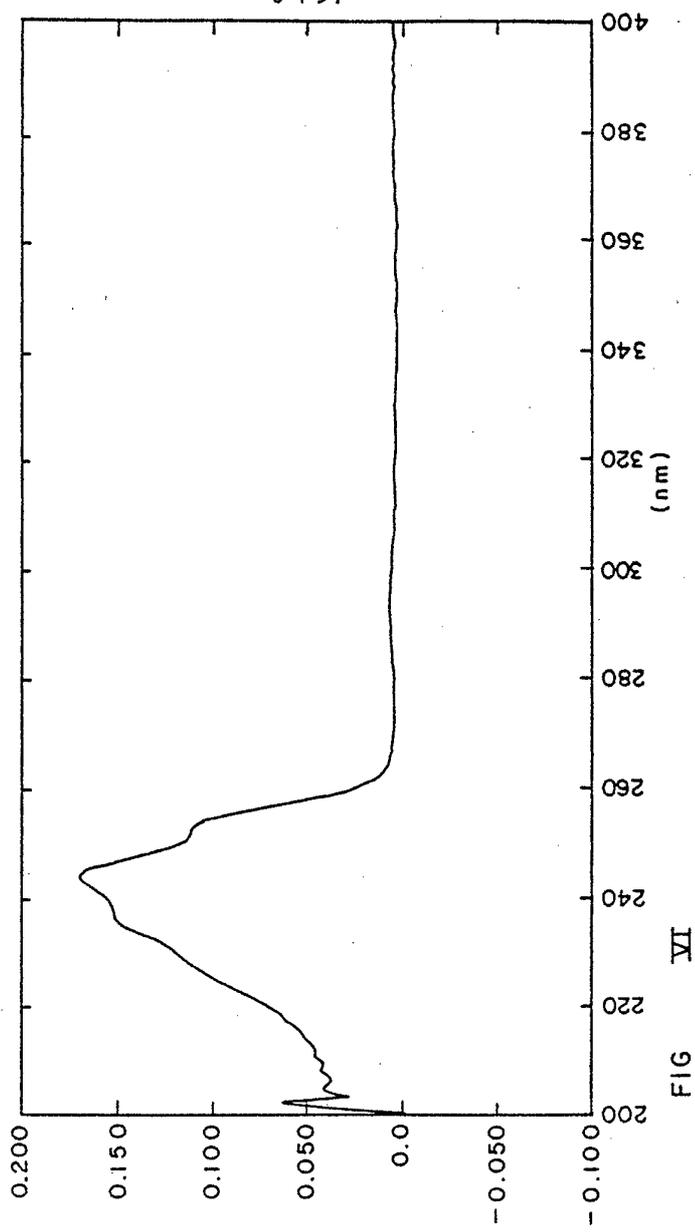


FIG VI

-310.86- 377843

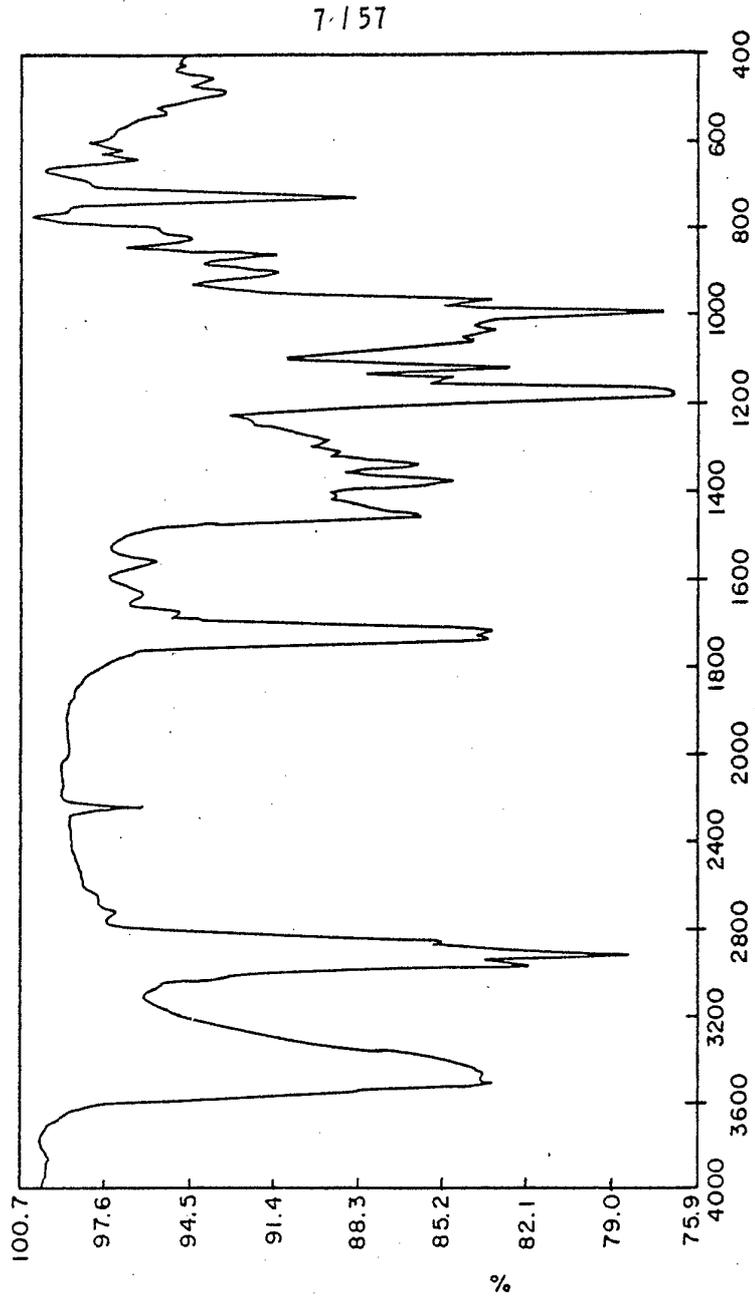


FIG VII

-310.86- 377848

8 / 57

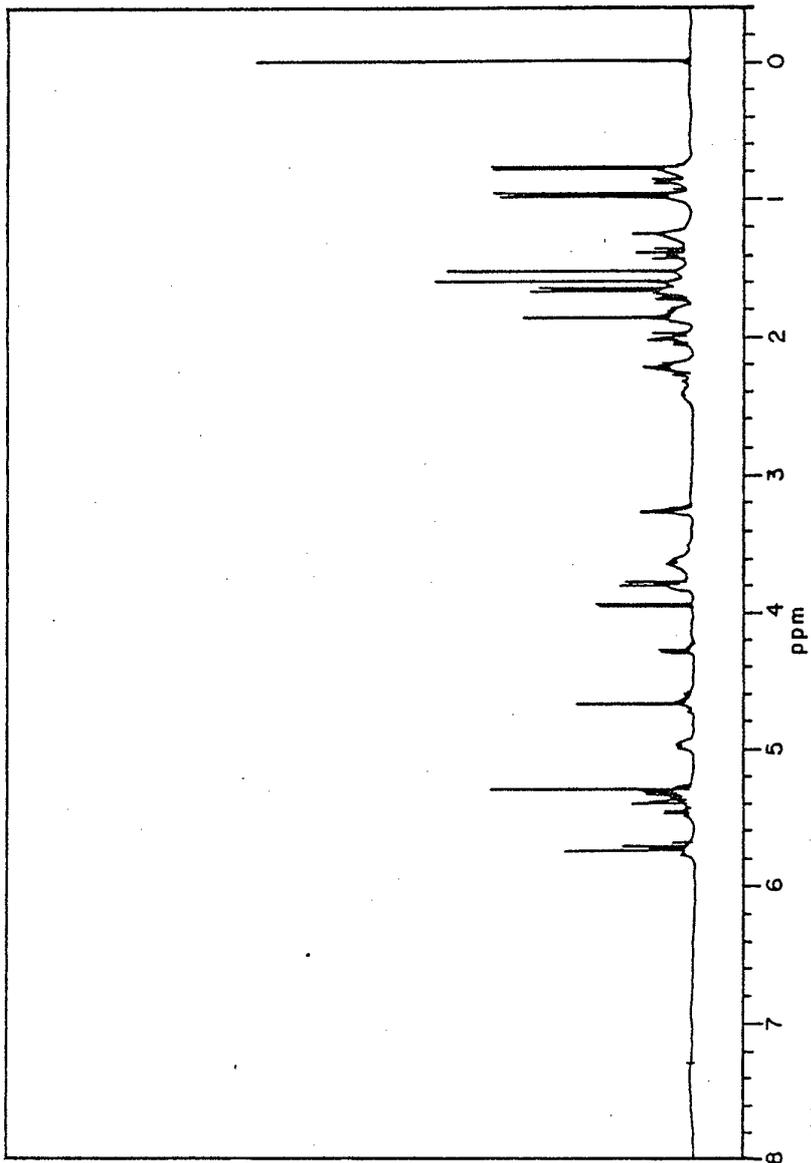
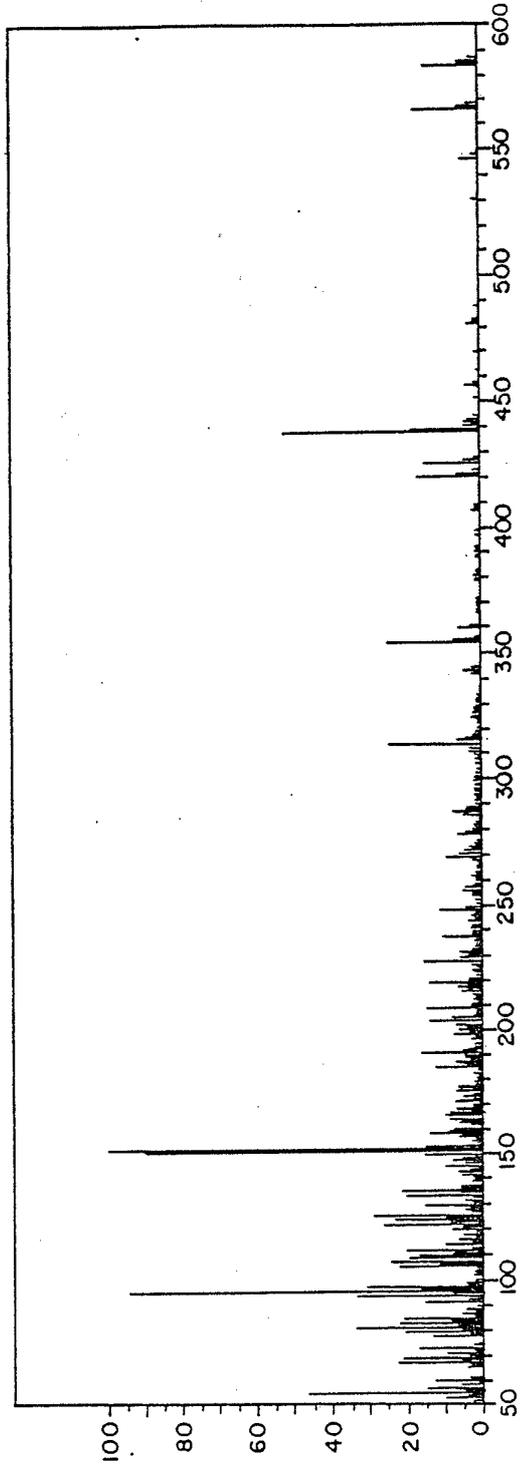


FIG VIII

-310.86- 377846



9 / 57

FIG IX

10 / 57

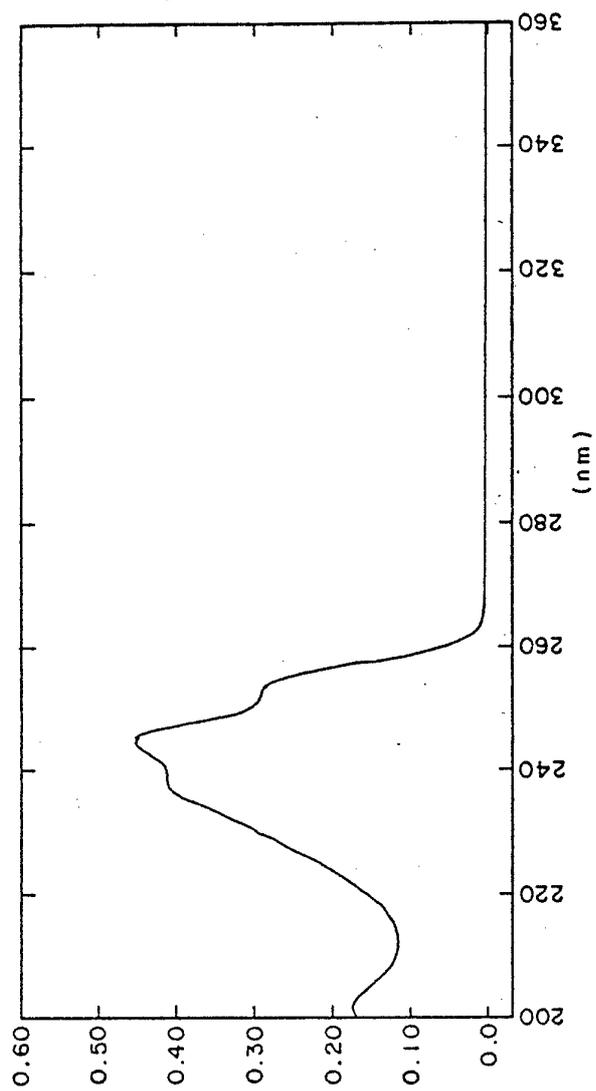


FIG X

-31086- 377846

100 100

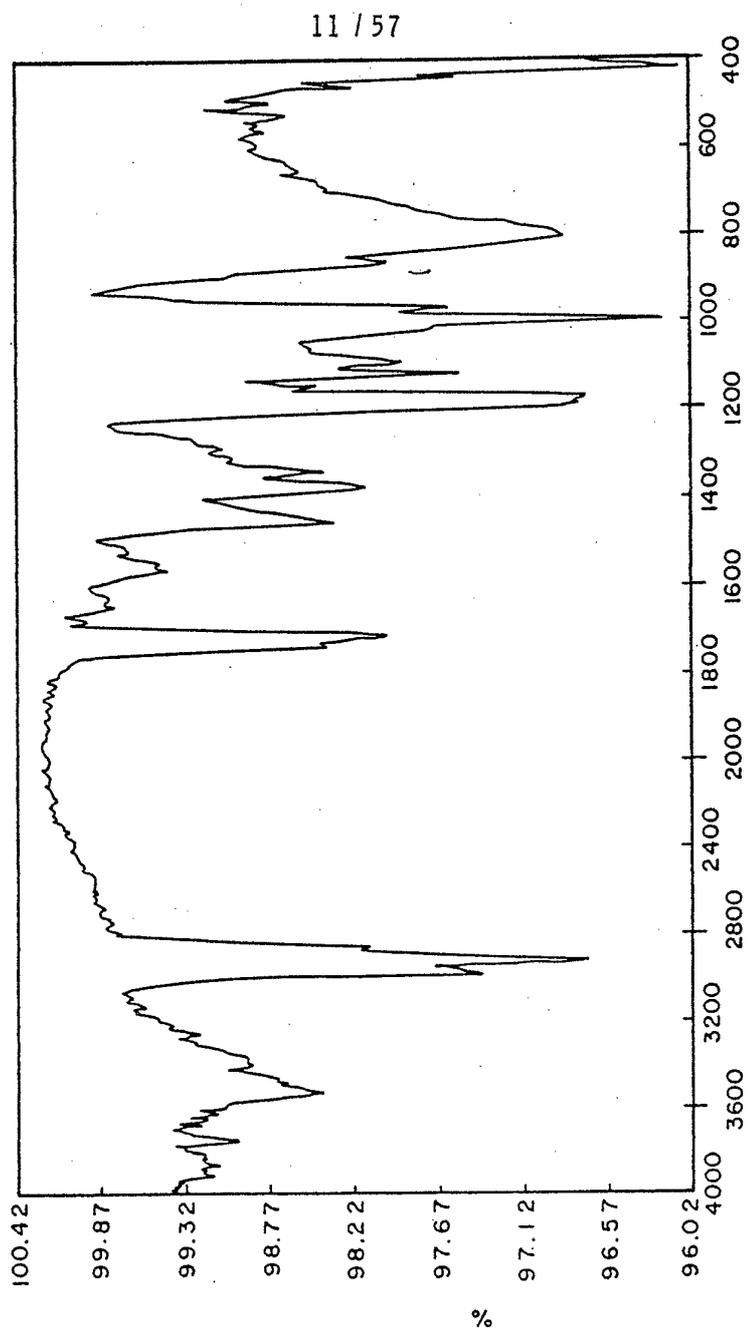


FIG XI

-31086- 377846

12 / 57

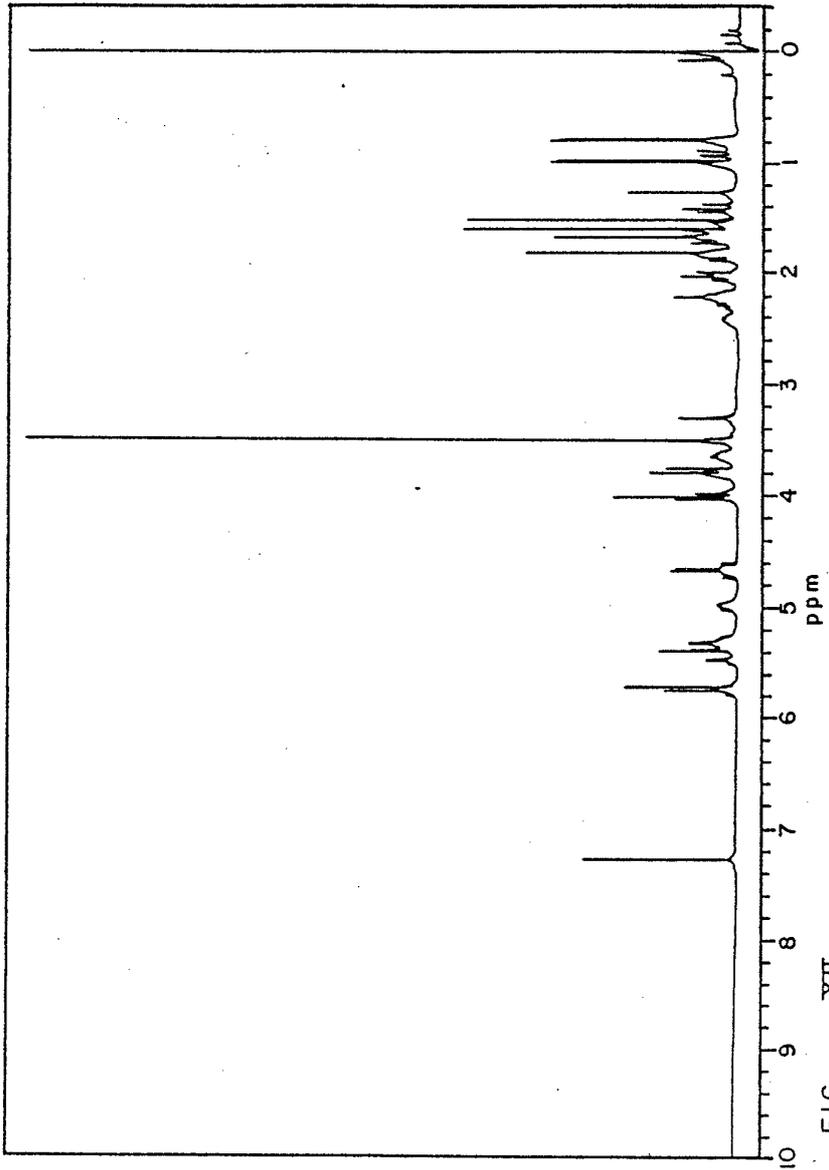


FIG XII

13 / 57

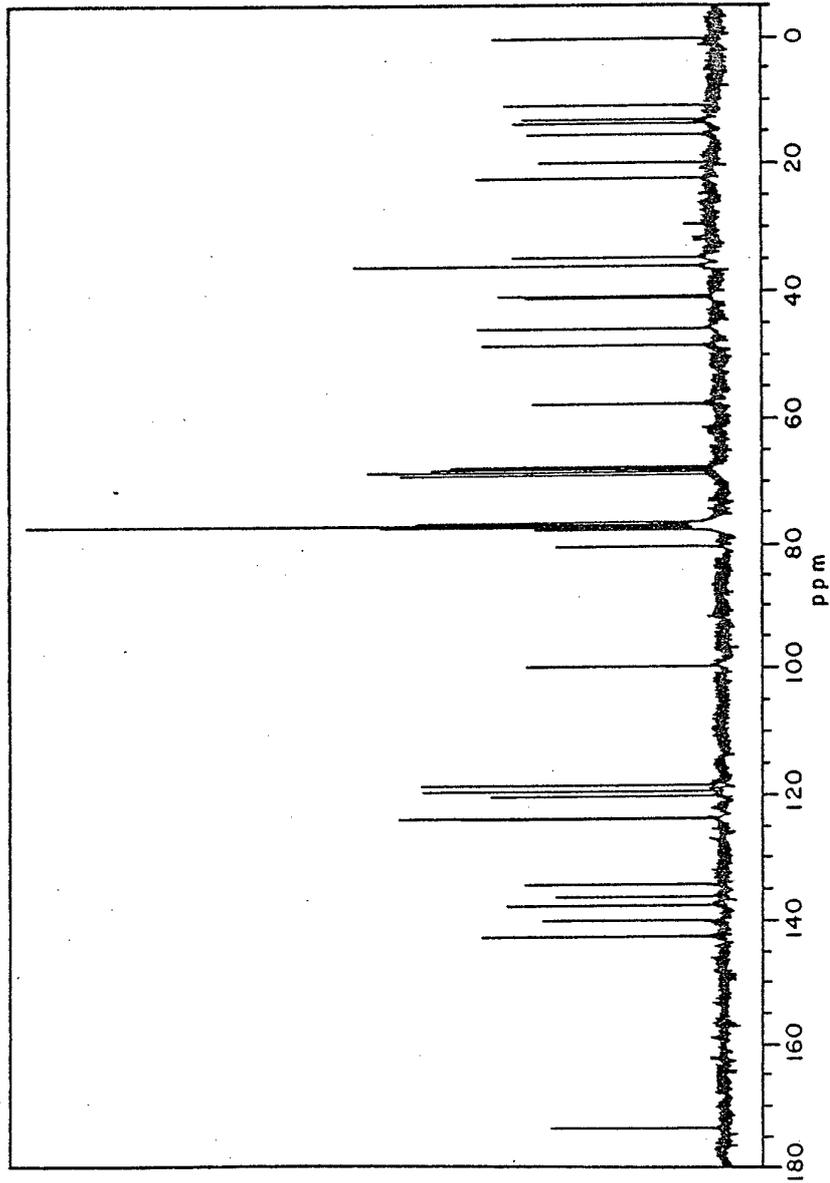
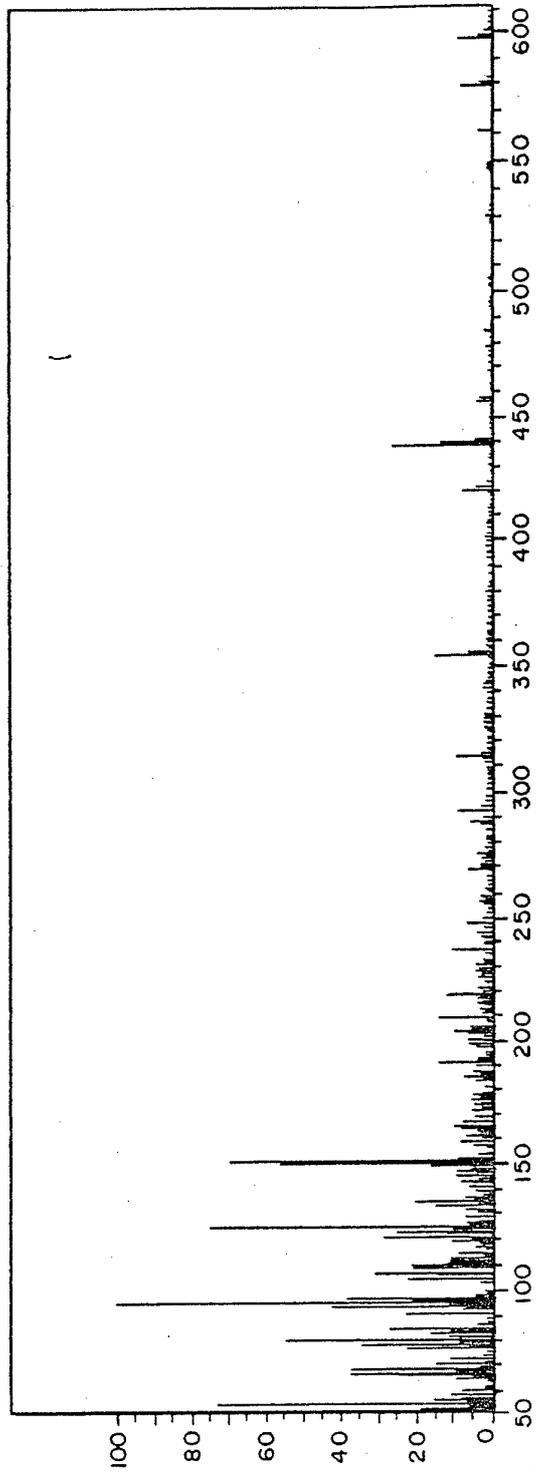


FIG XIII



14 / 57

FIG XIV

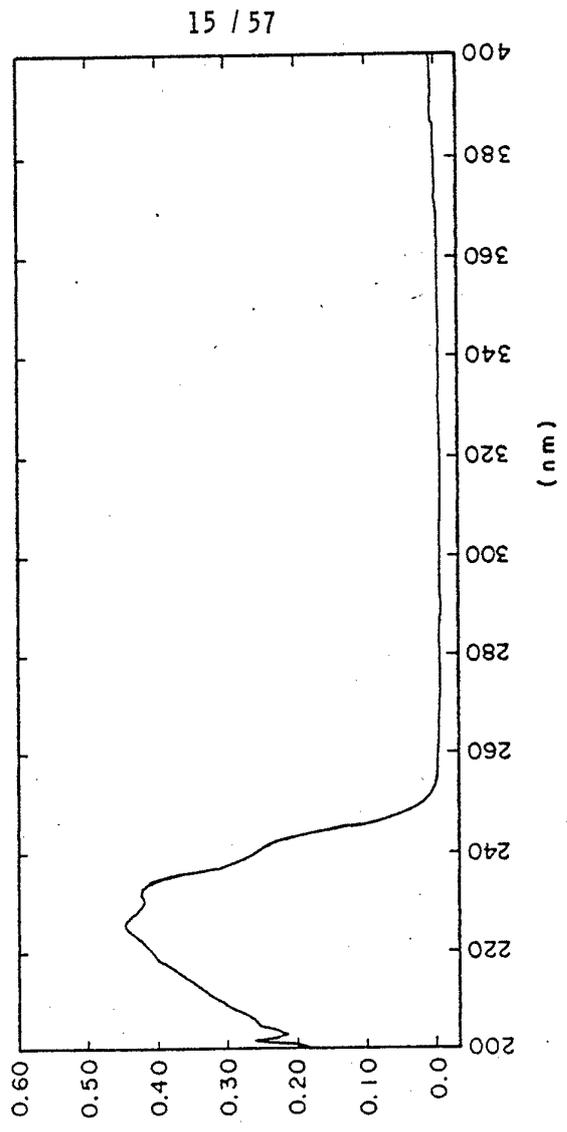


FIG XV

-31086- 377845

16 / 57

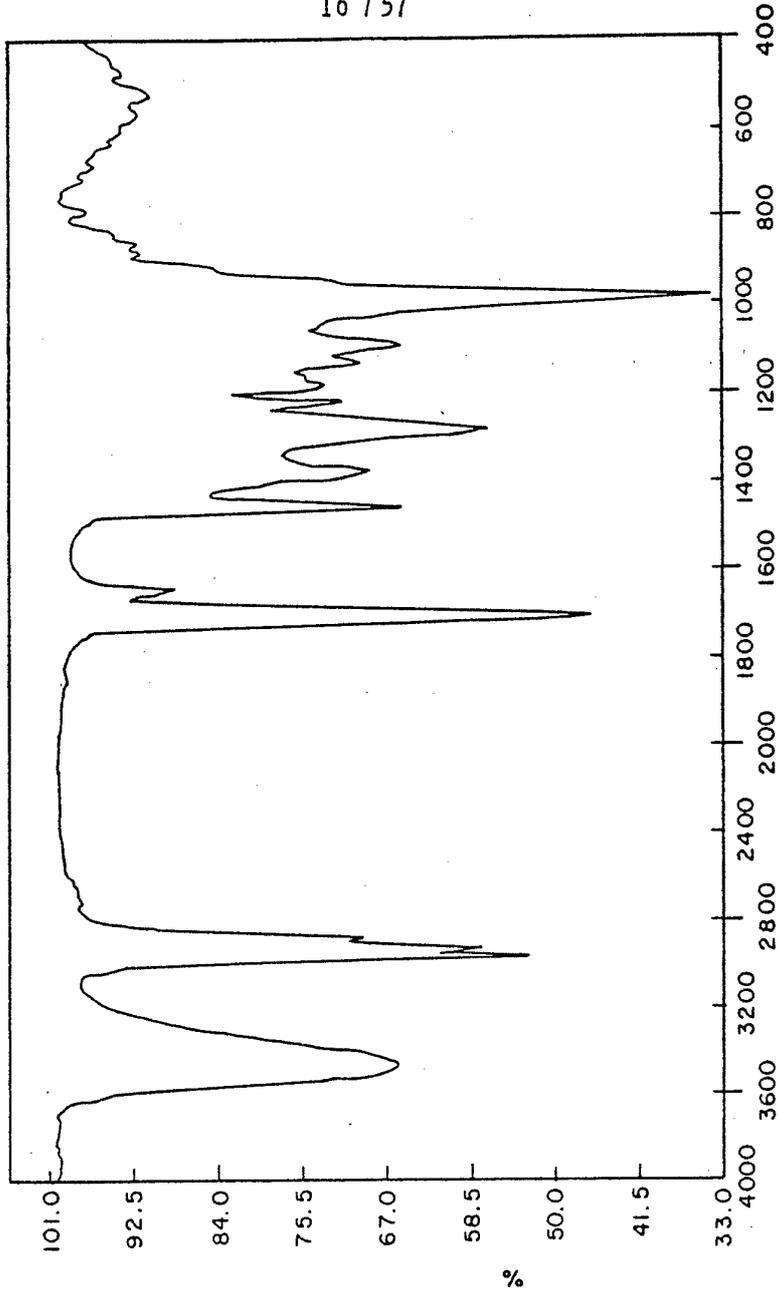


FIG XVI

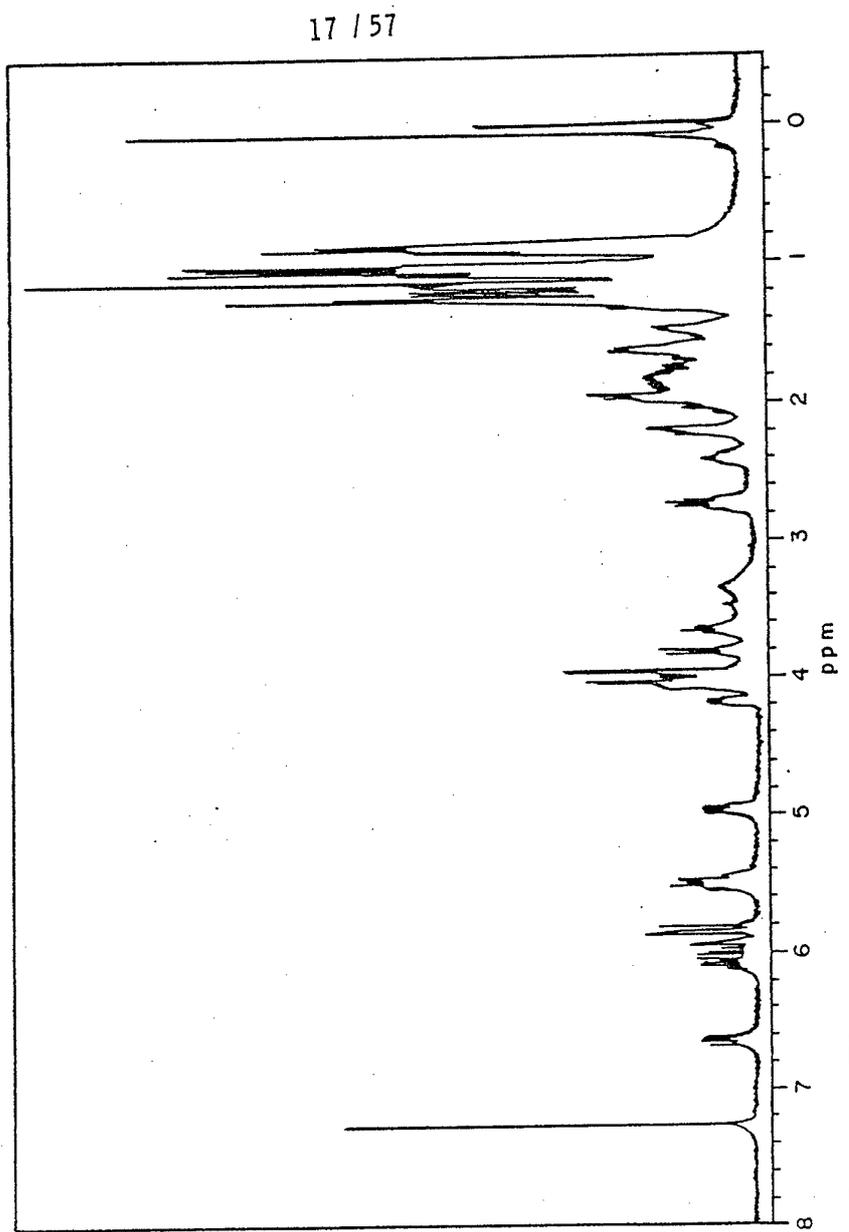


FIG XVII

18 / 57

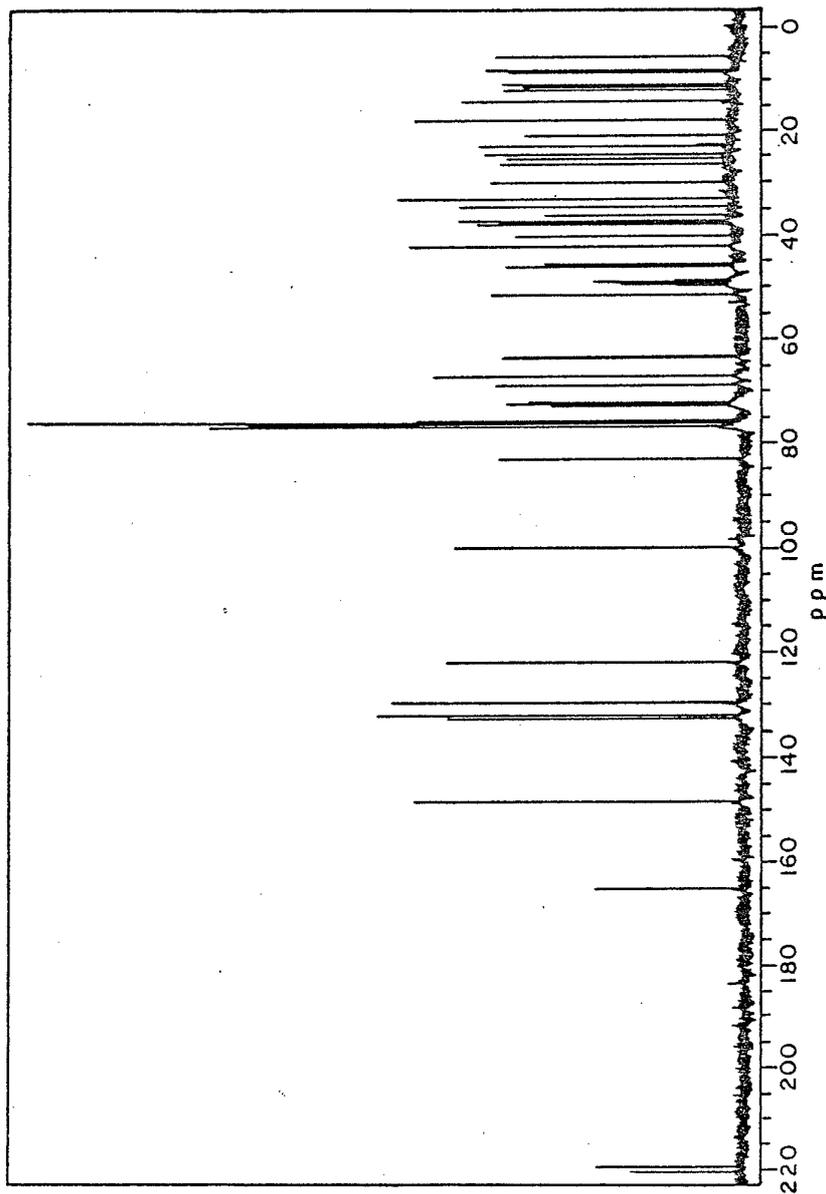


FIG XVIII

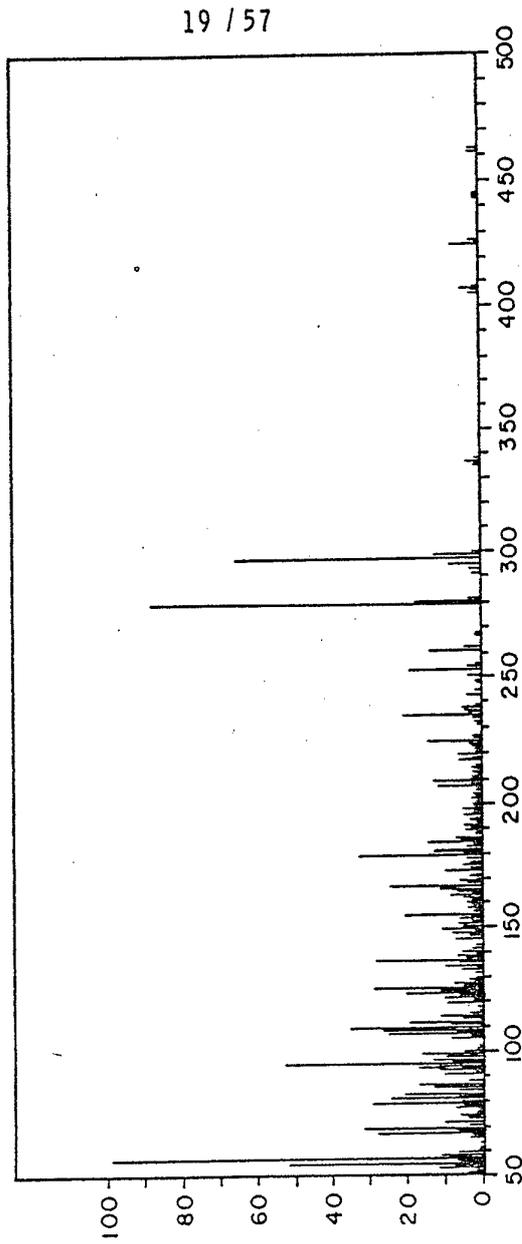


FIG XIX

20 / 57

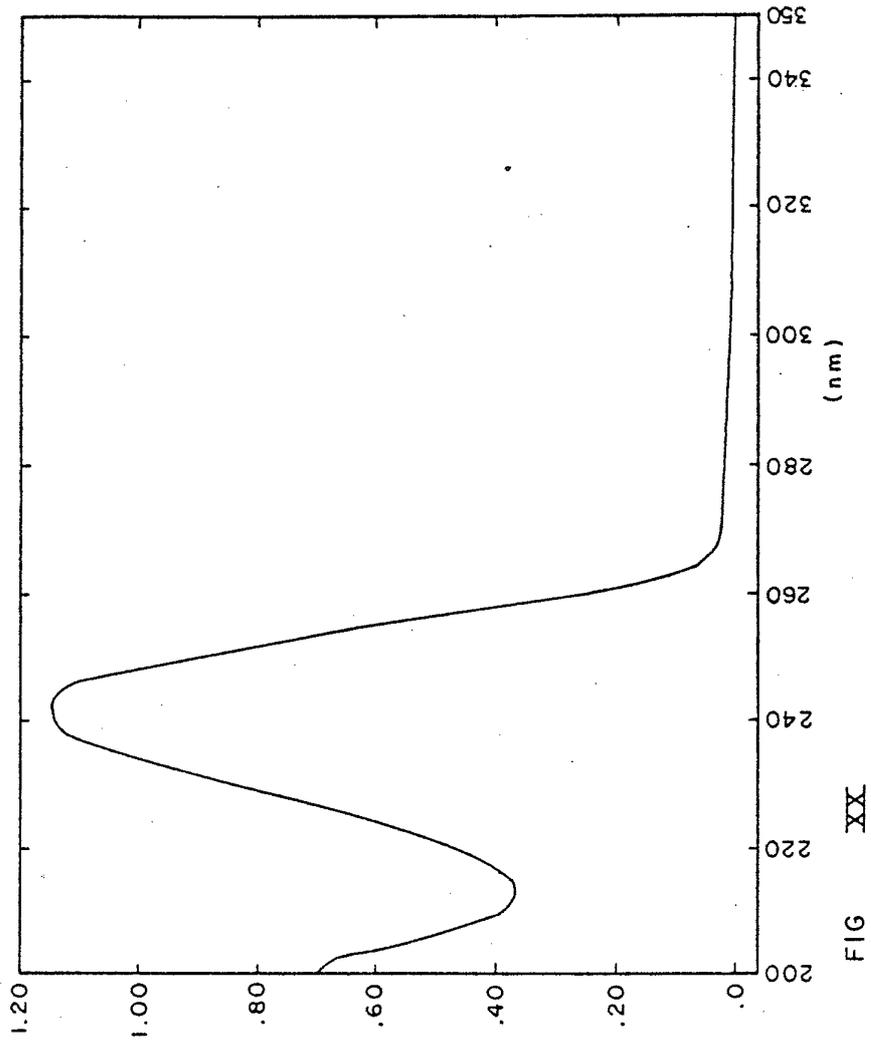


FIG XX

21 / 57

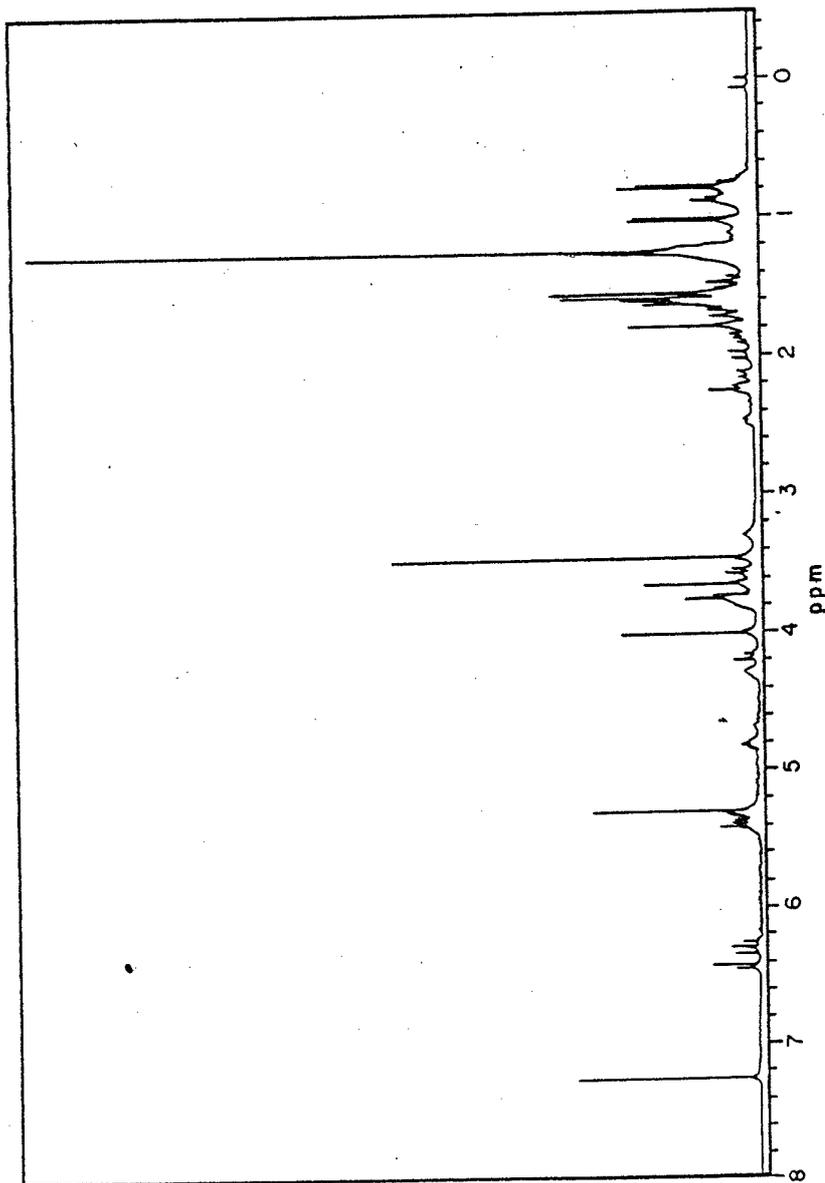
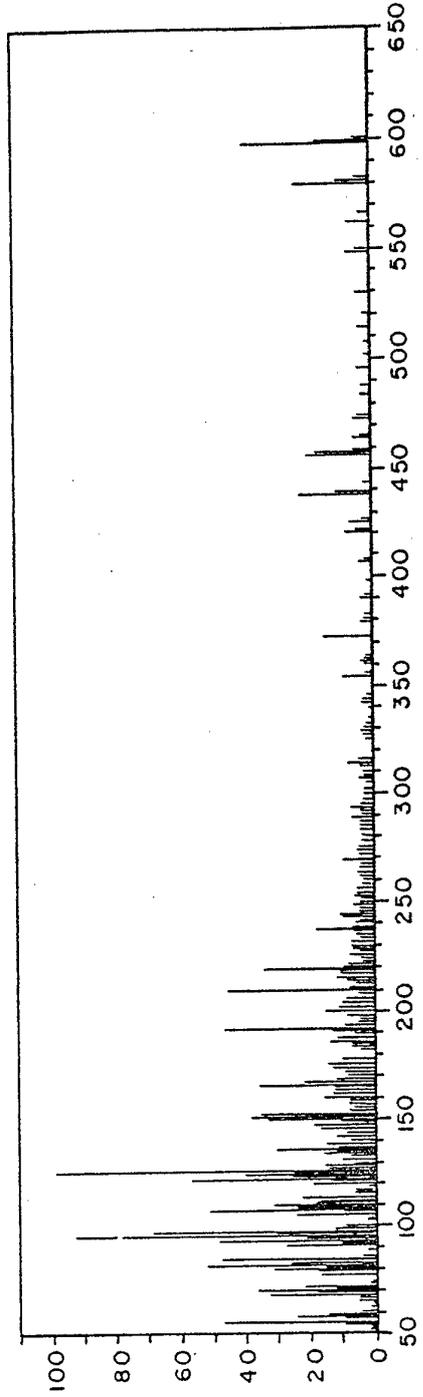


FIG XXI



22 157

FIG XXII

23 157

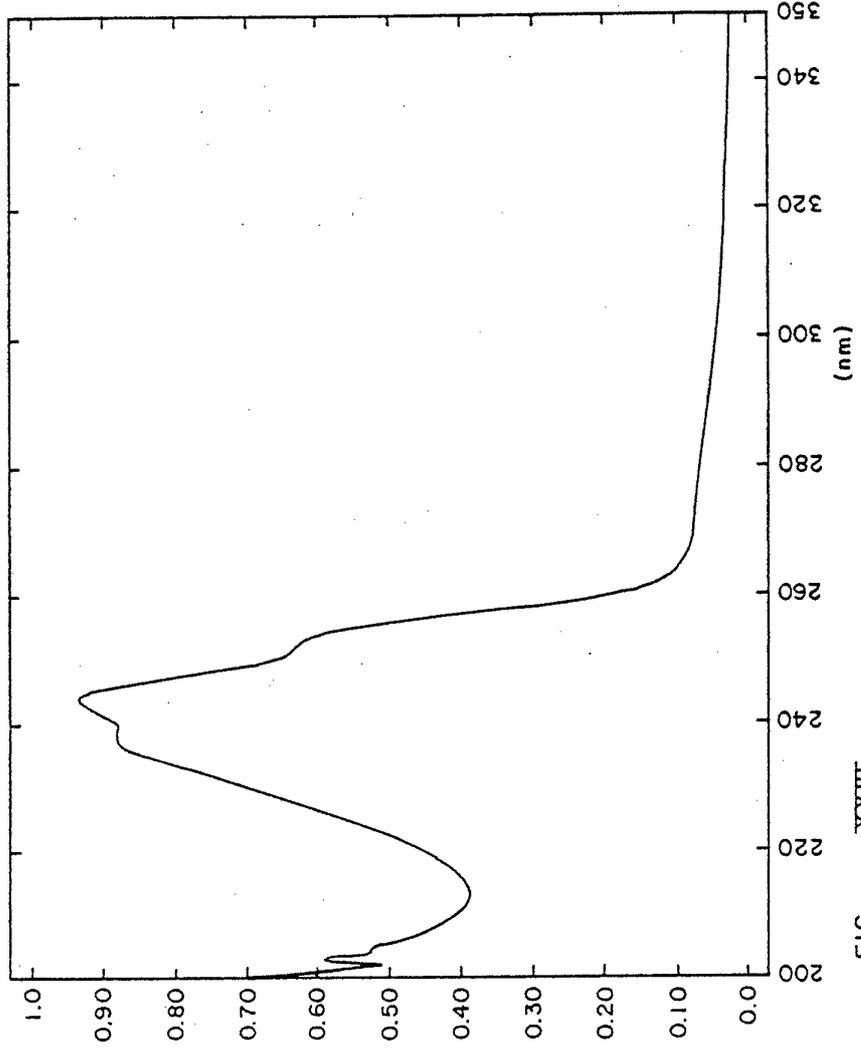


FIG XXIII

24 157

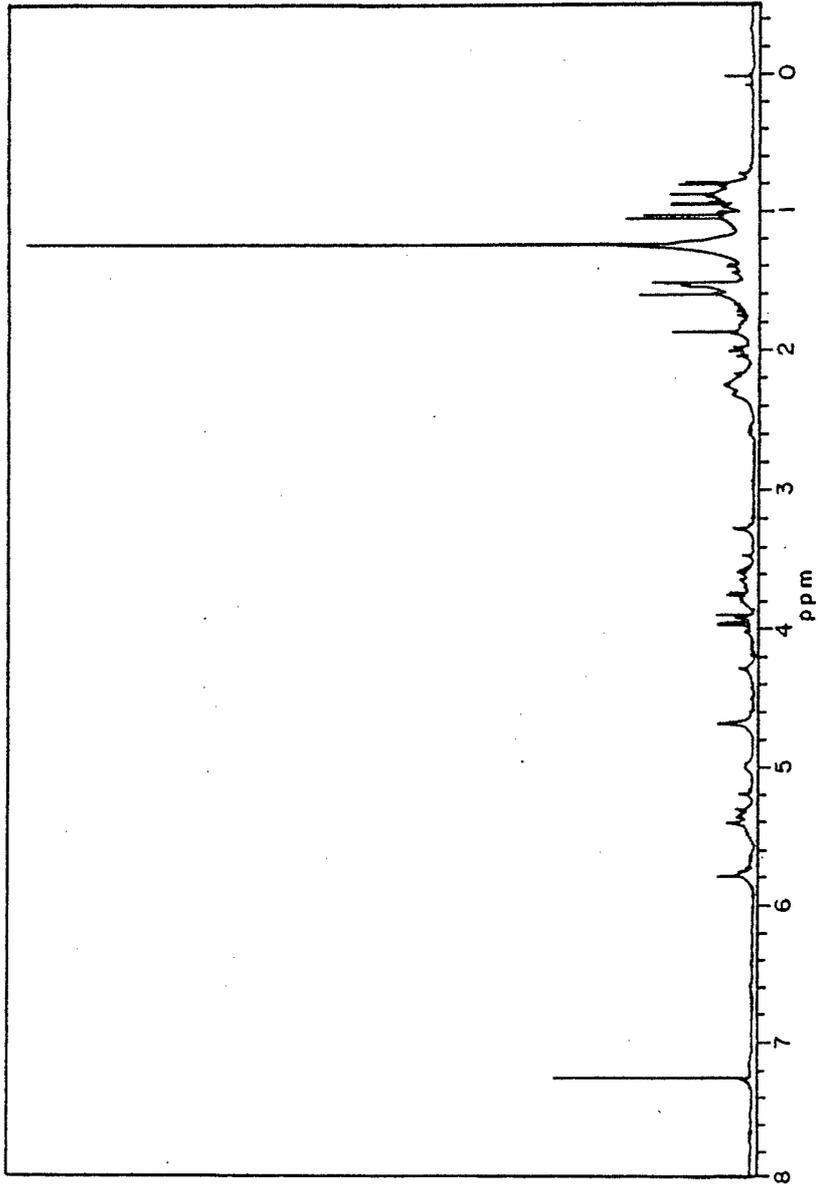
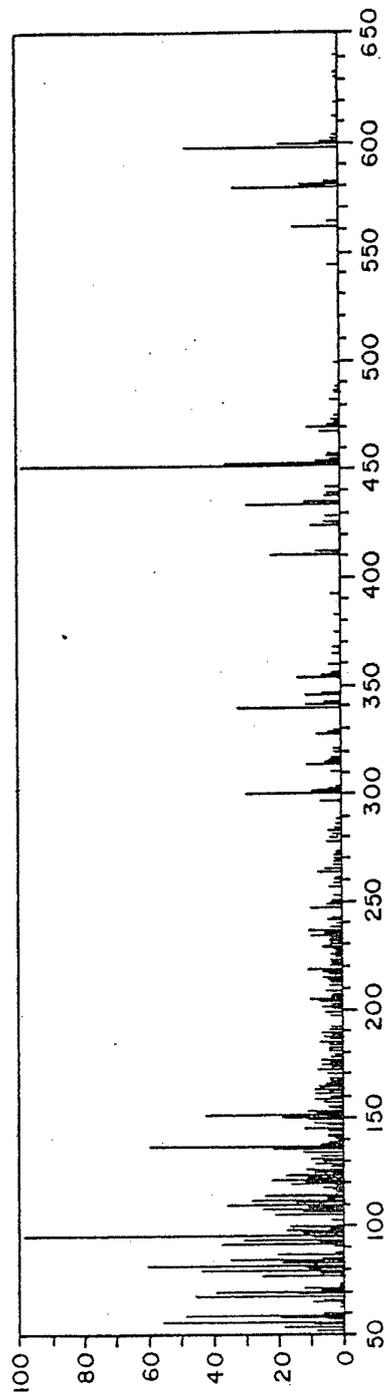


FIG XXIV



25 / 57

FIG XXXV

26 / 57

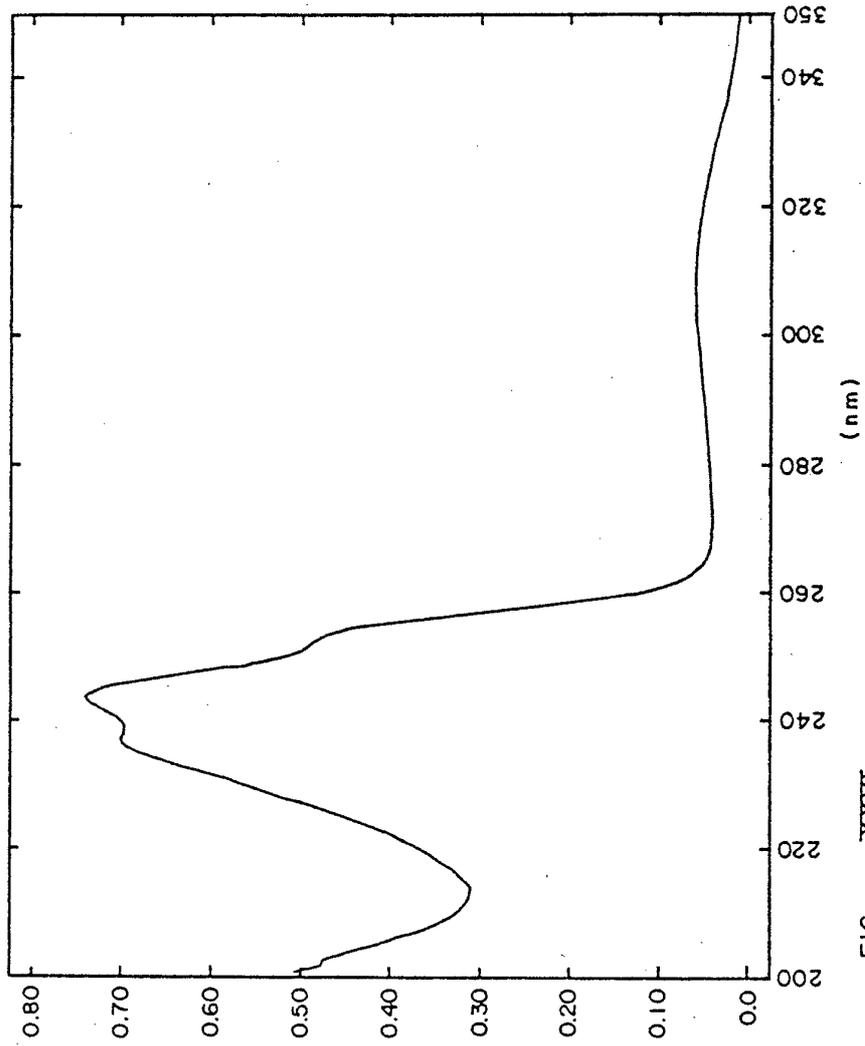


FIG XXXVI

27 157

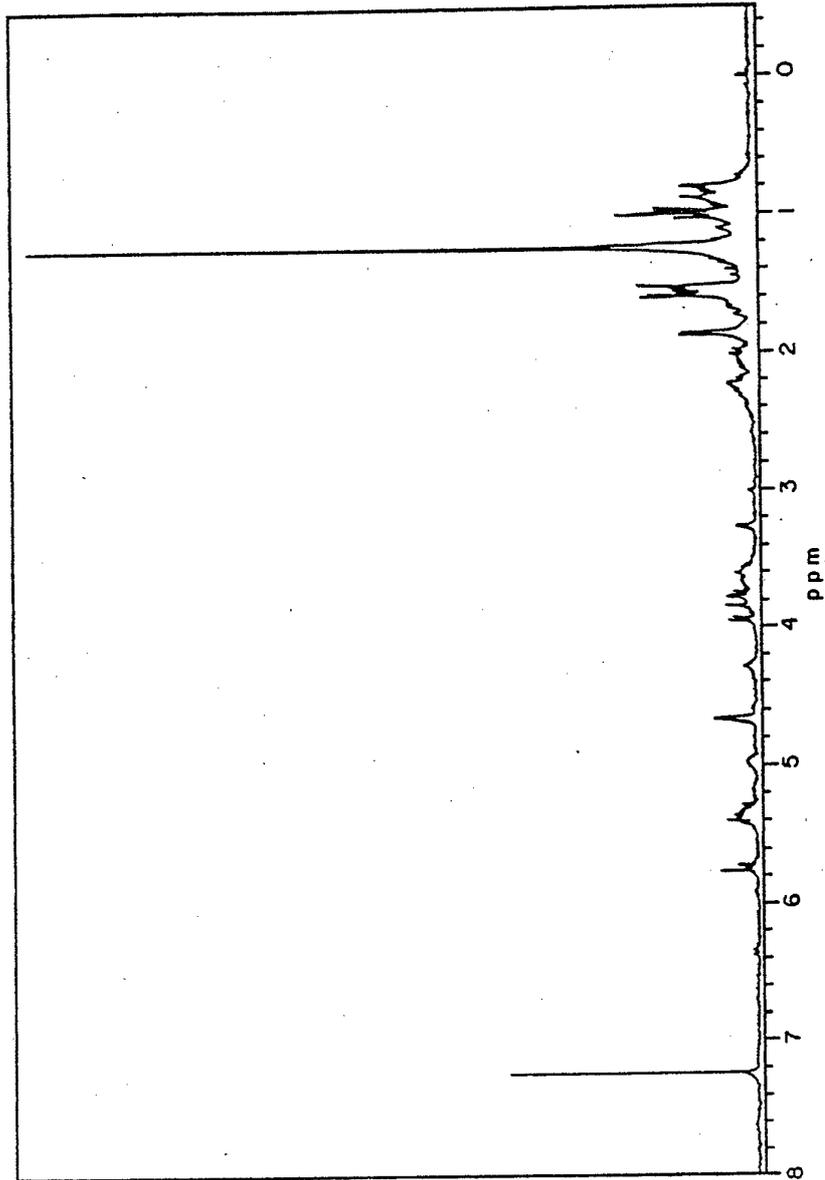


FIG XXXVII

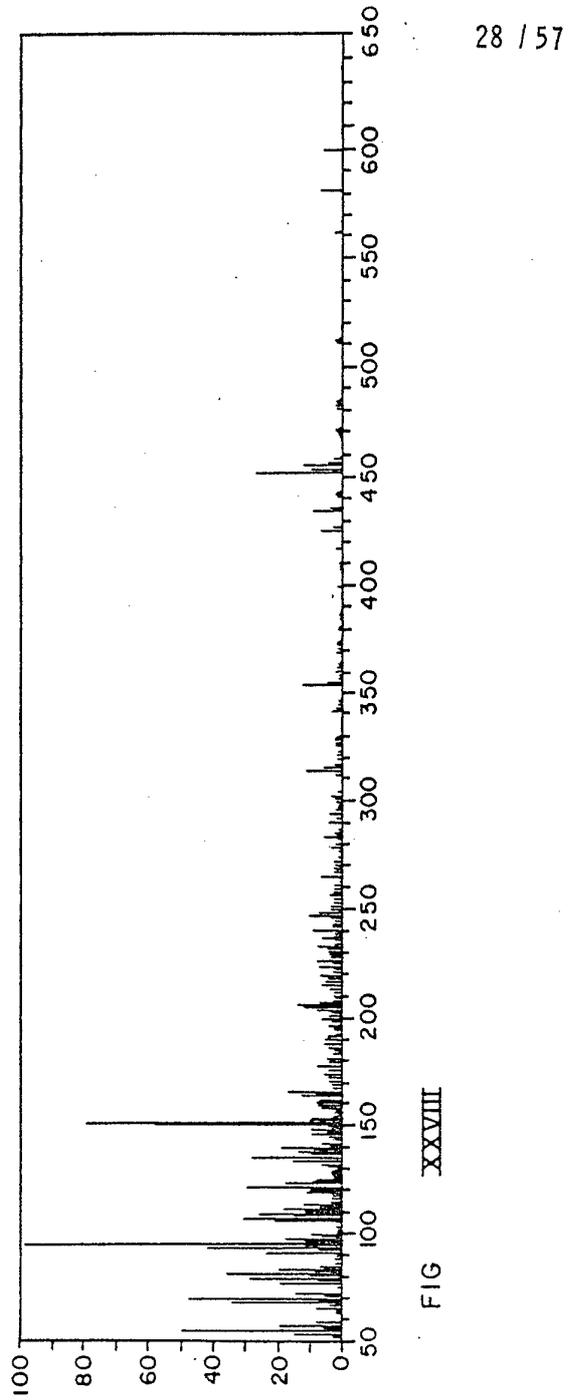


FIG XXVIII

29 157

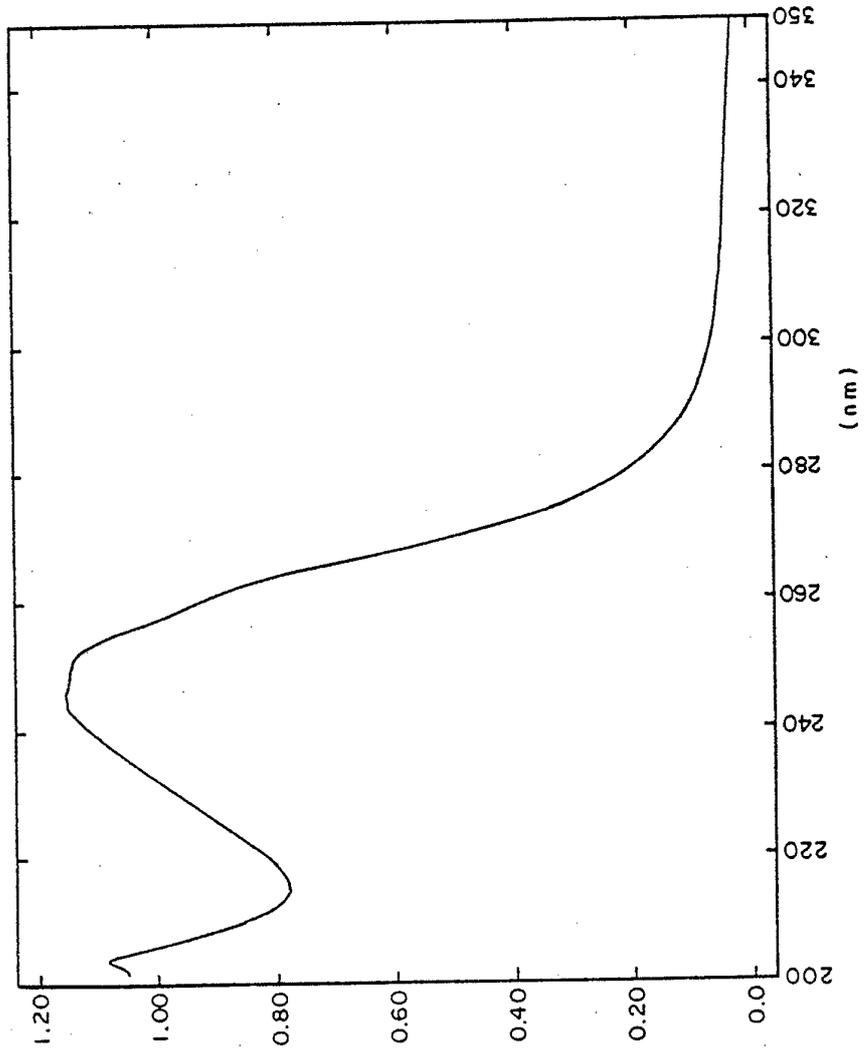


FIG XXIX

30 157

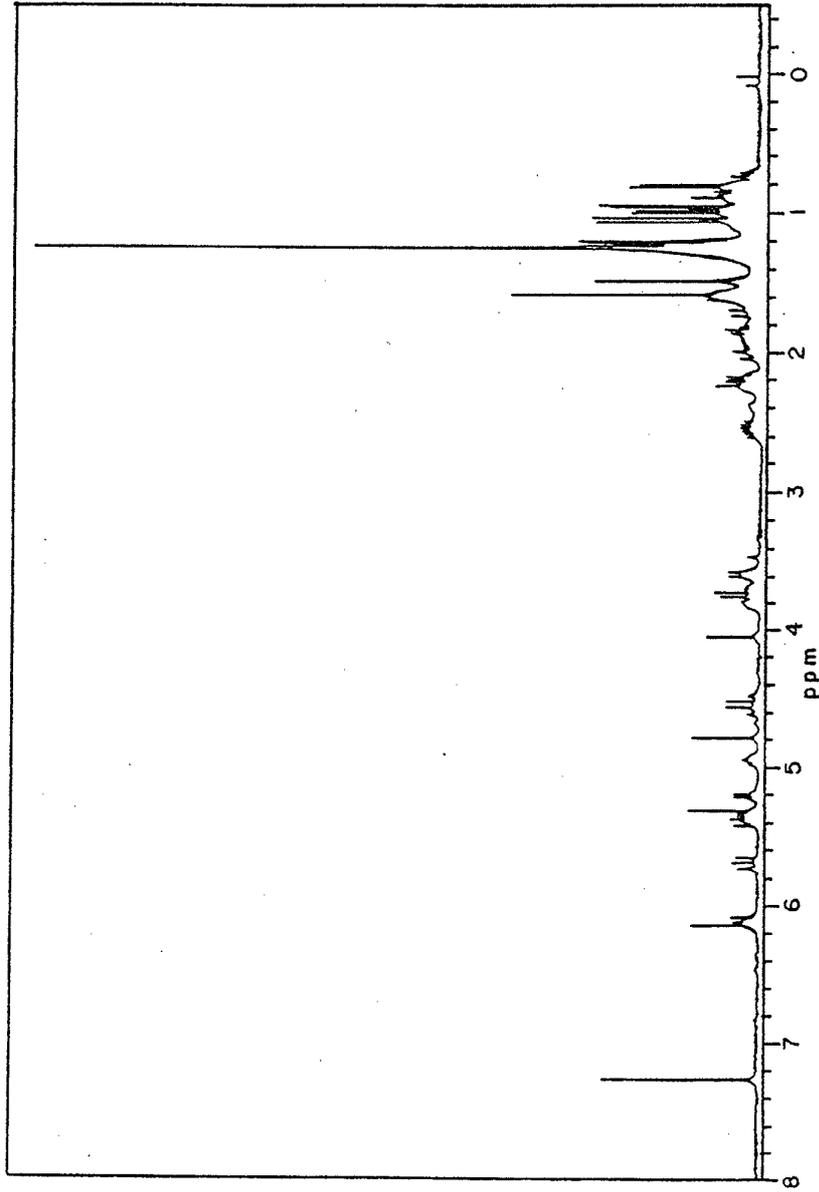


FIG XXX

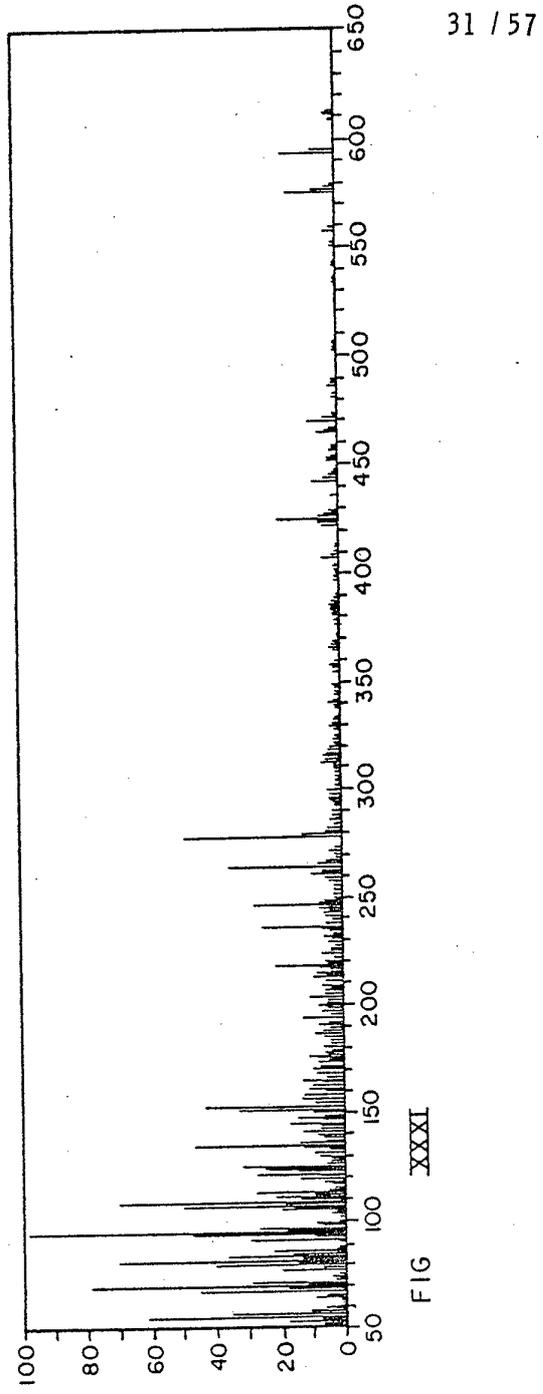


FIG XXXI

32 / 57

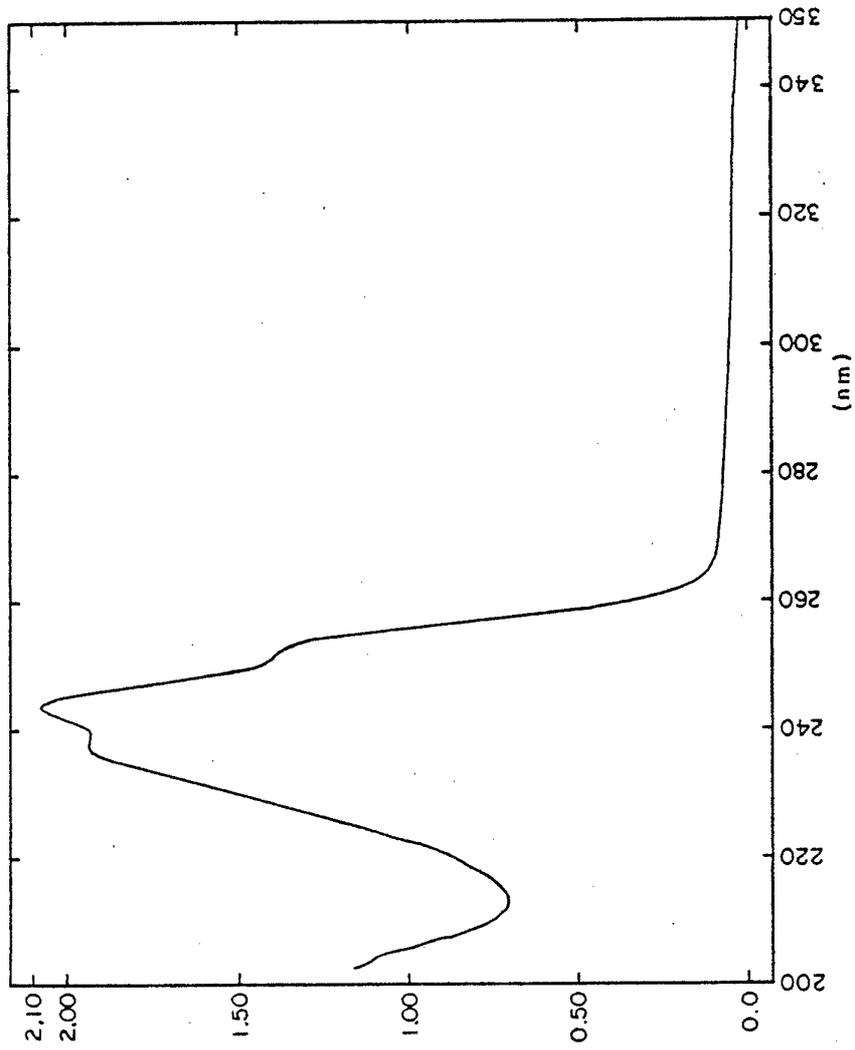


FIG XXXII

33 / 57

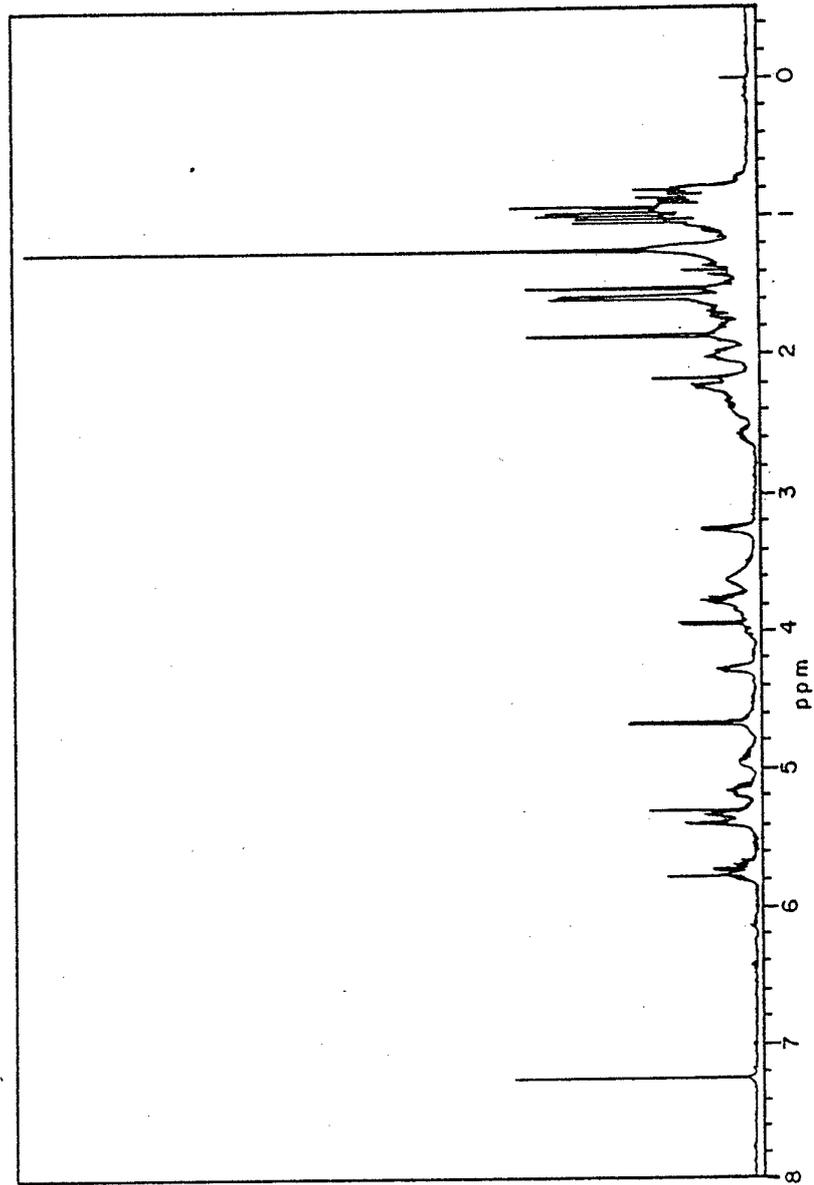


FIG XXXIII

34 / 57

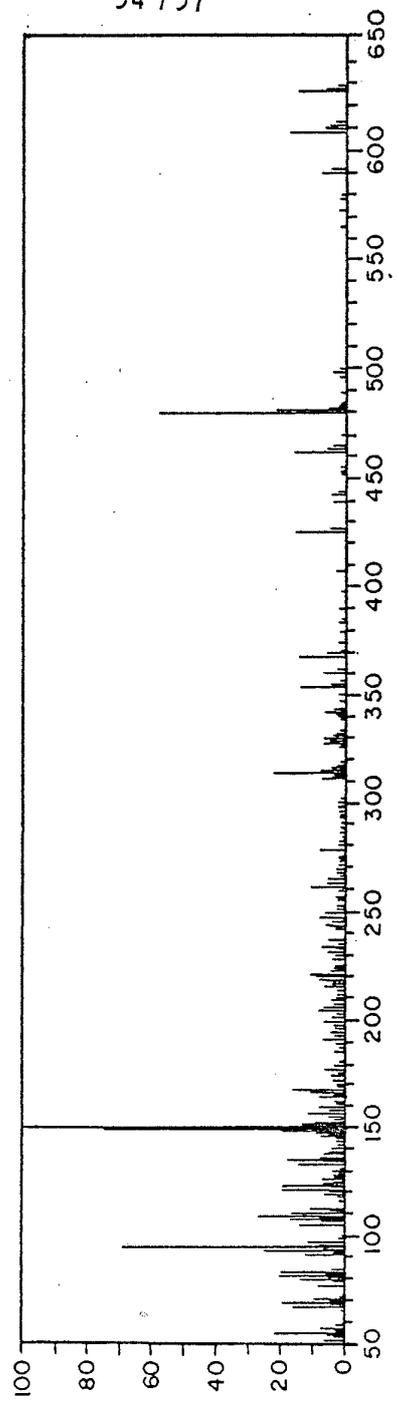


FIG XXXIV

35 / 57

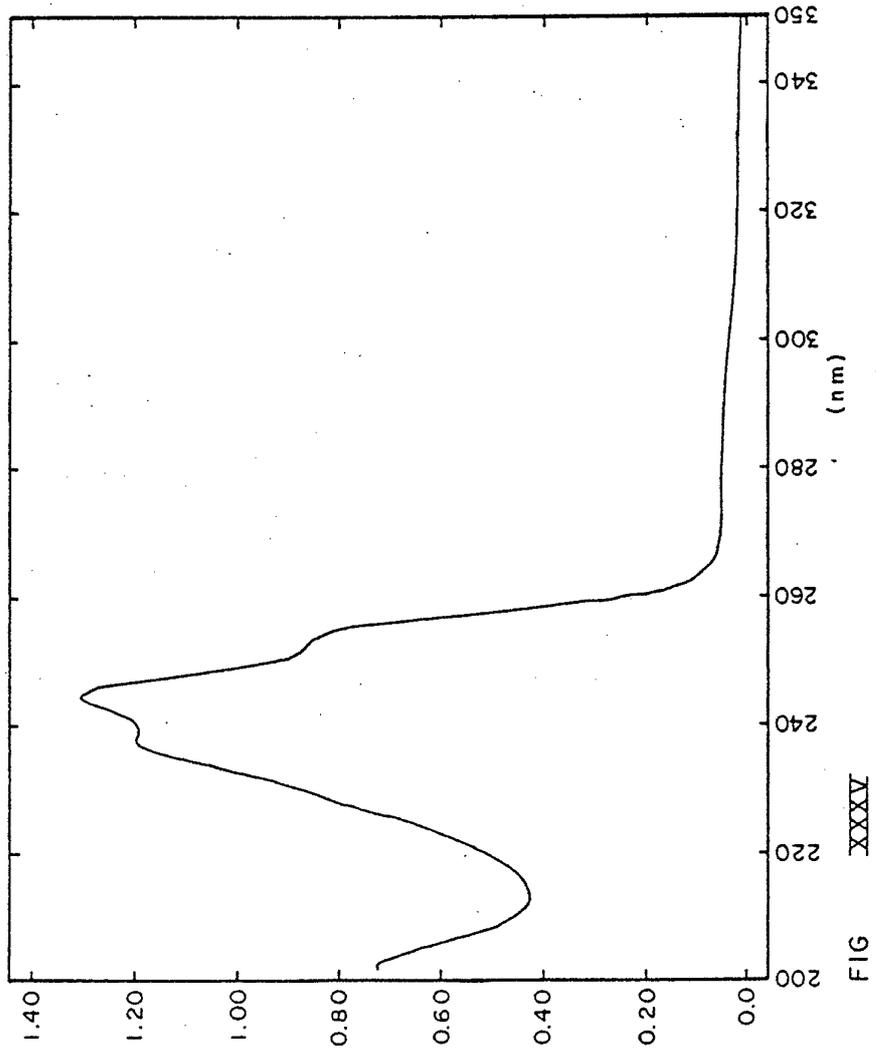


FIG XXXV

36 / 57

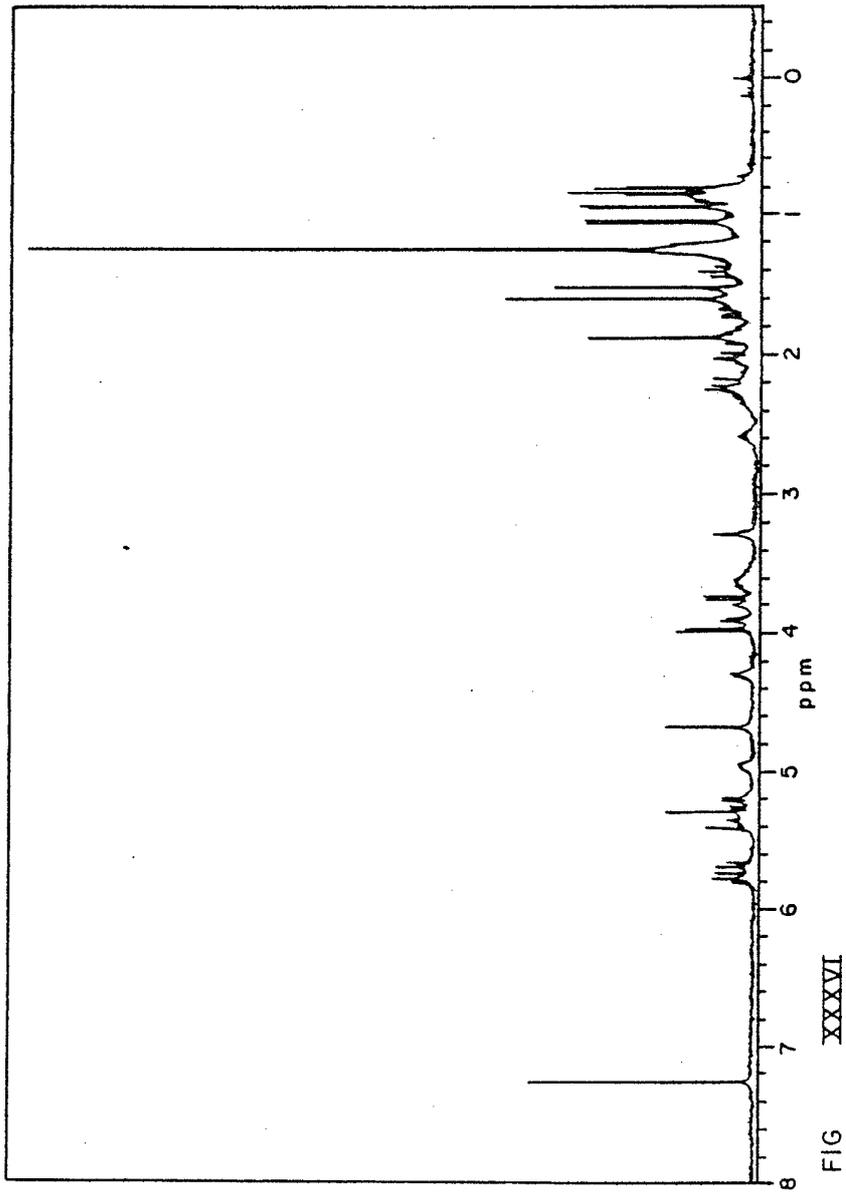


FIG XXXVI

37 / 57

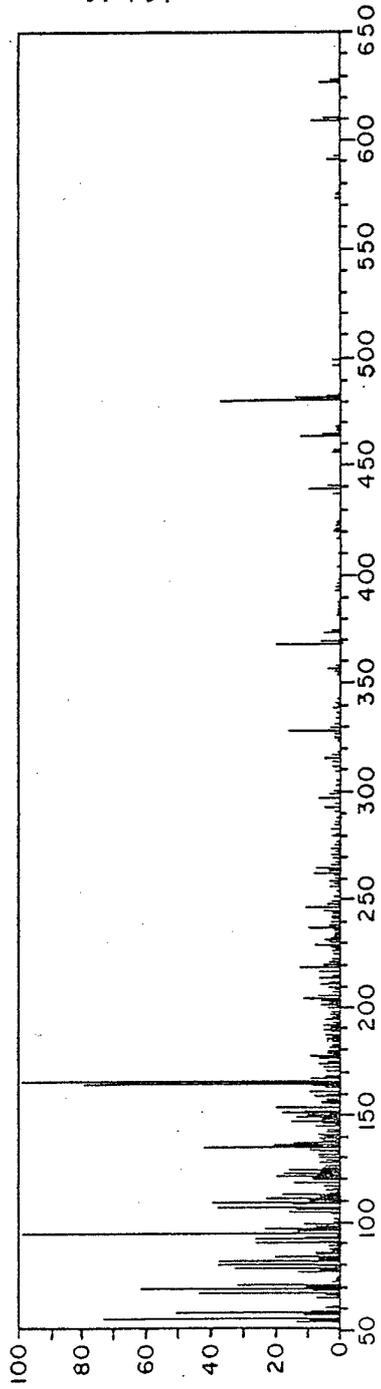


FIG XXXVII

38 / 57

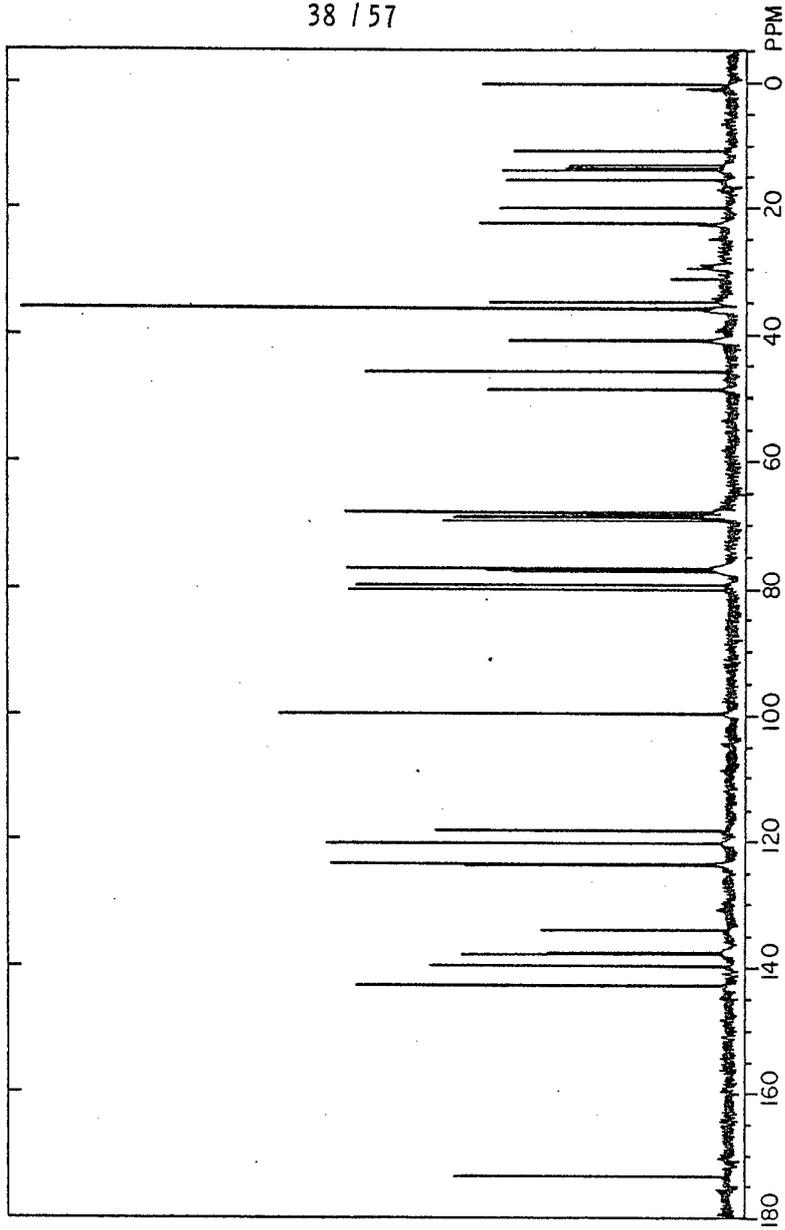


FIG XXXVIII

39 / 57

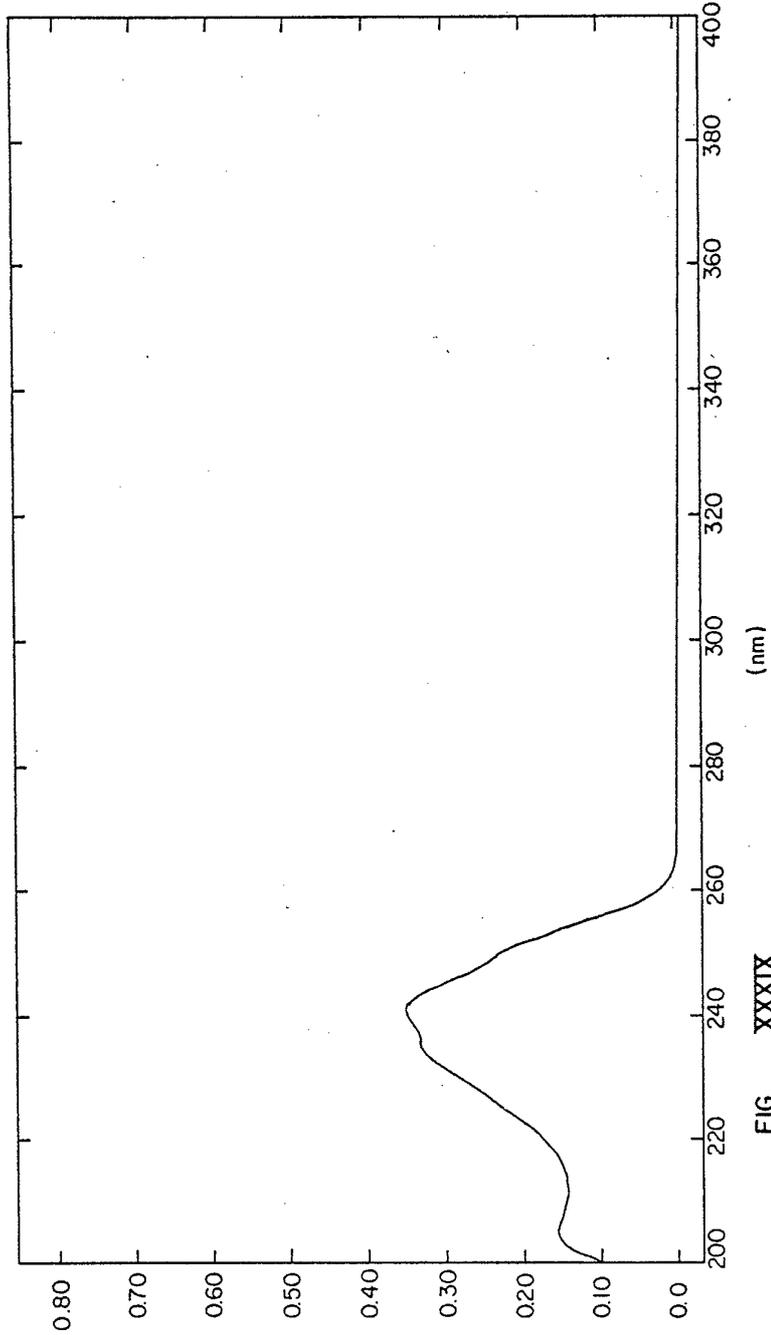


FIG XXXIX

40 / 57

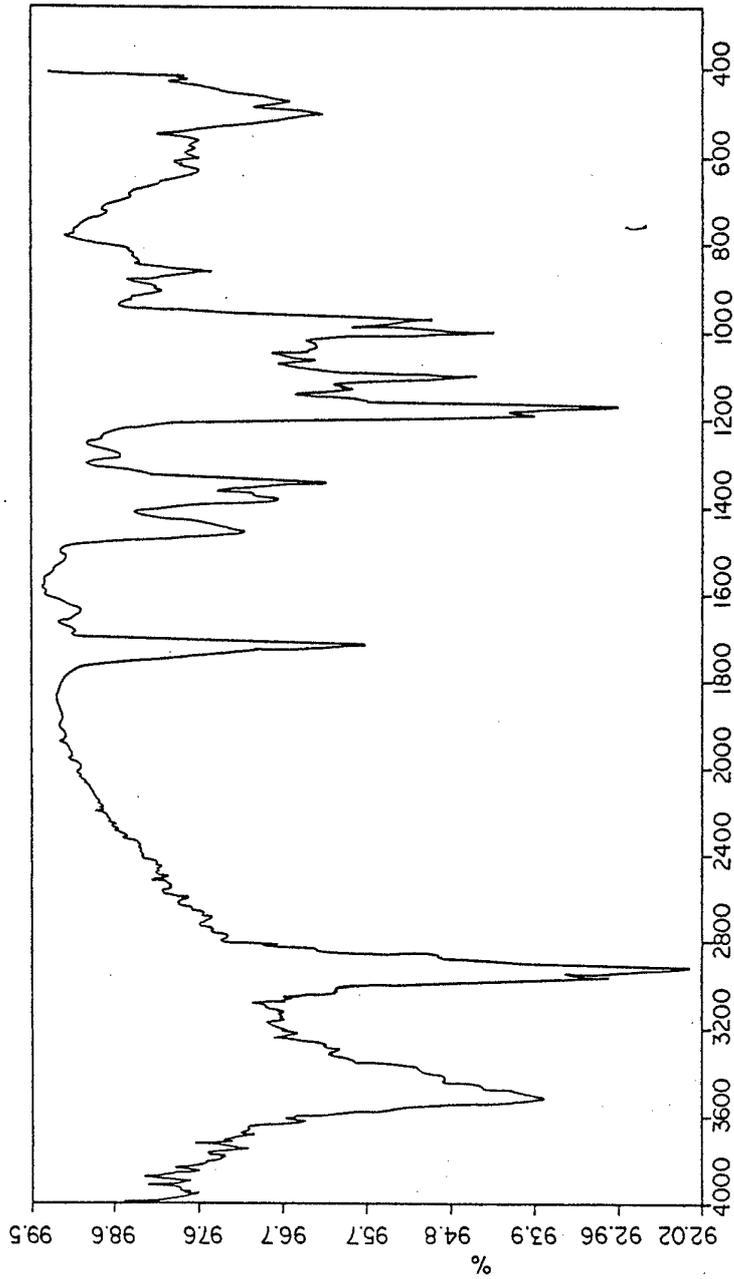


FIG XL

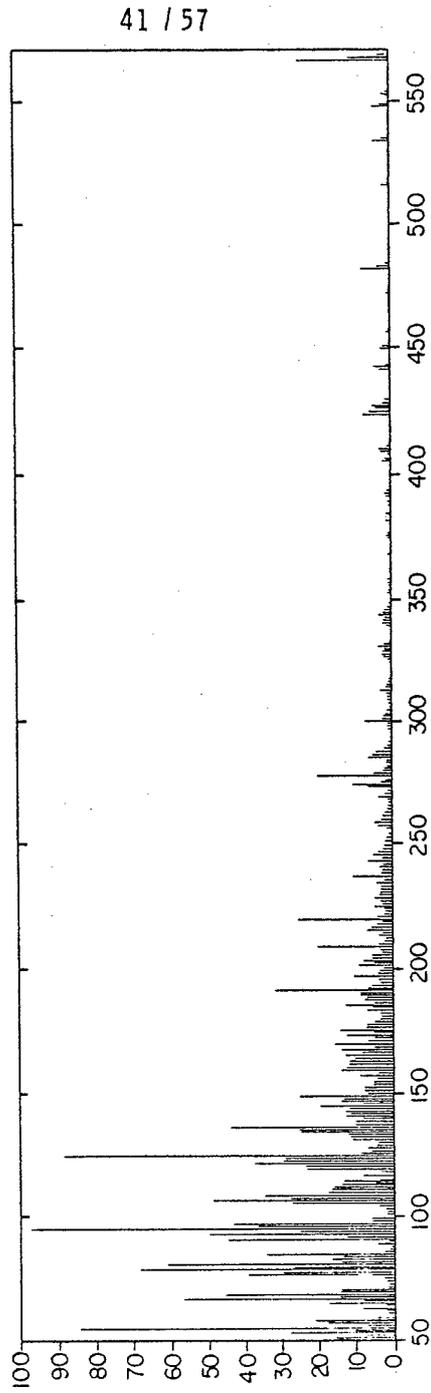


FIG XLI

JJ

42 / 57

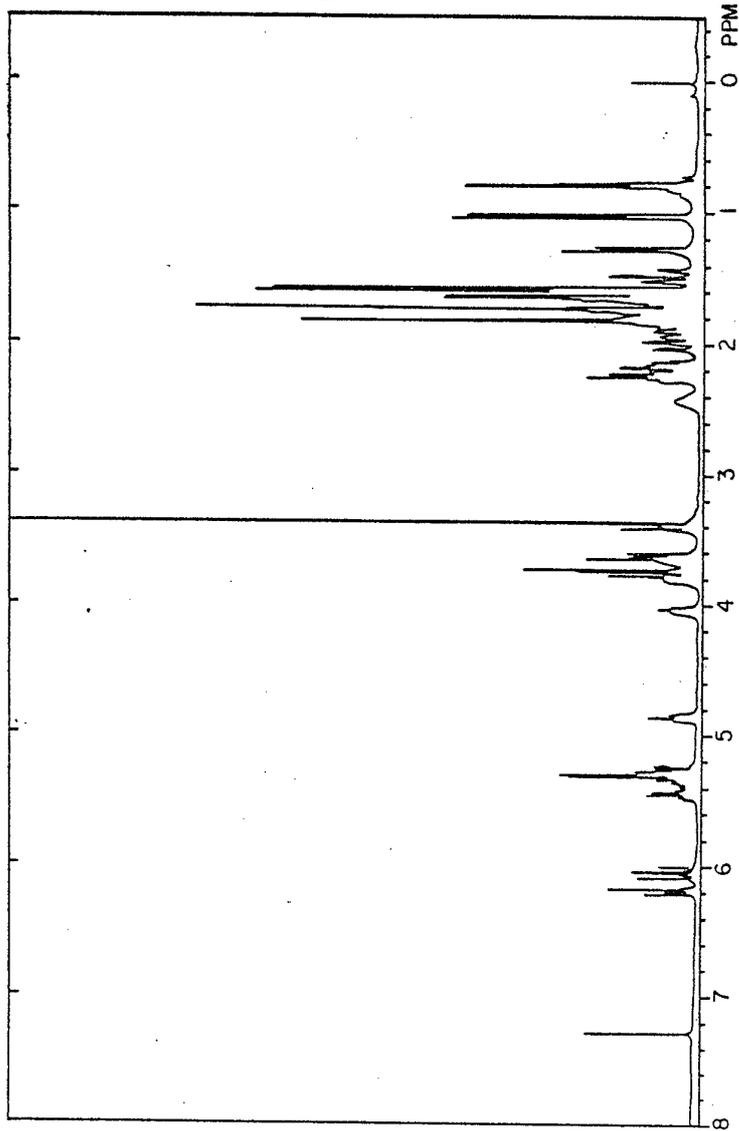


FIG XLII

-31086- 377846

43 / 57

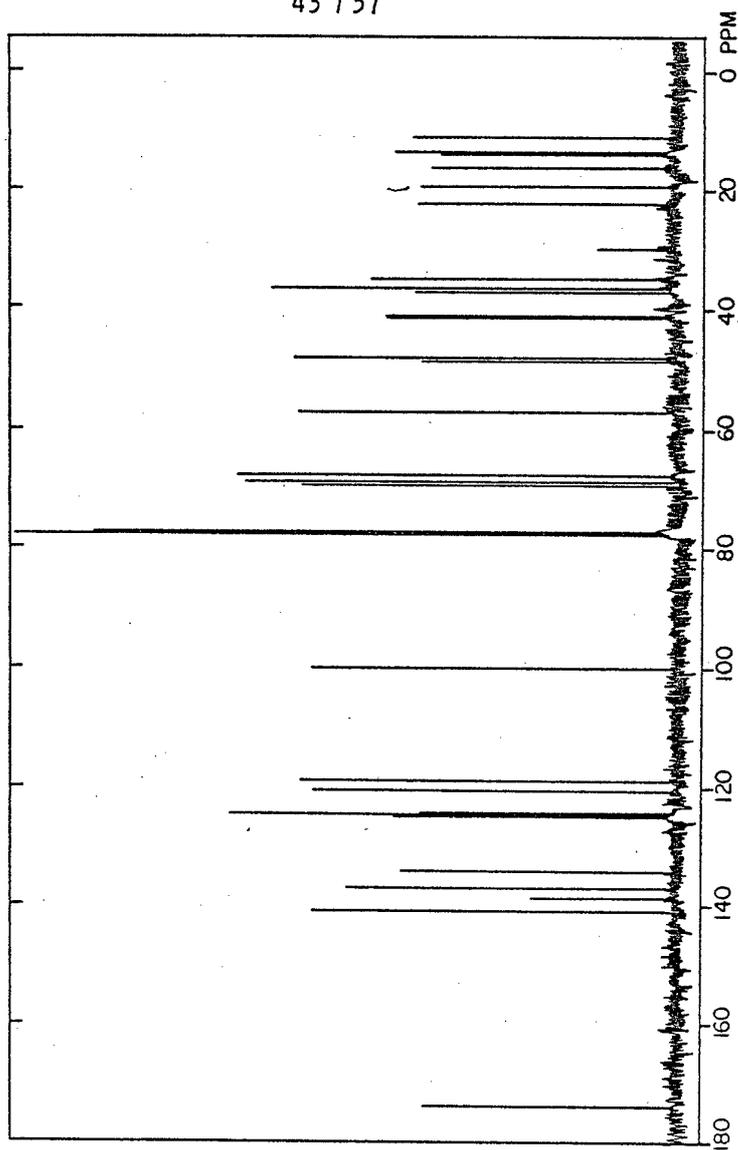


FIG XLIII

44 / 57

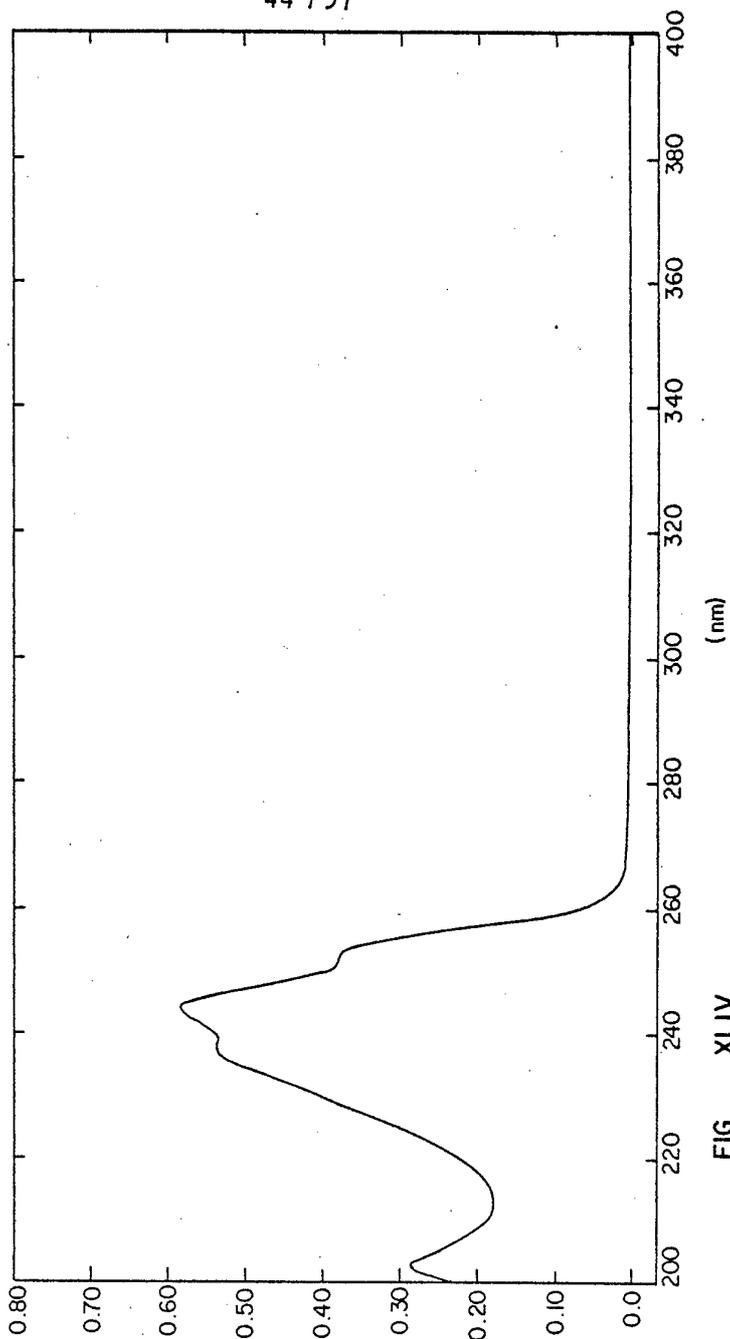


FIG XLIV

-31086- 377846

45 / 57

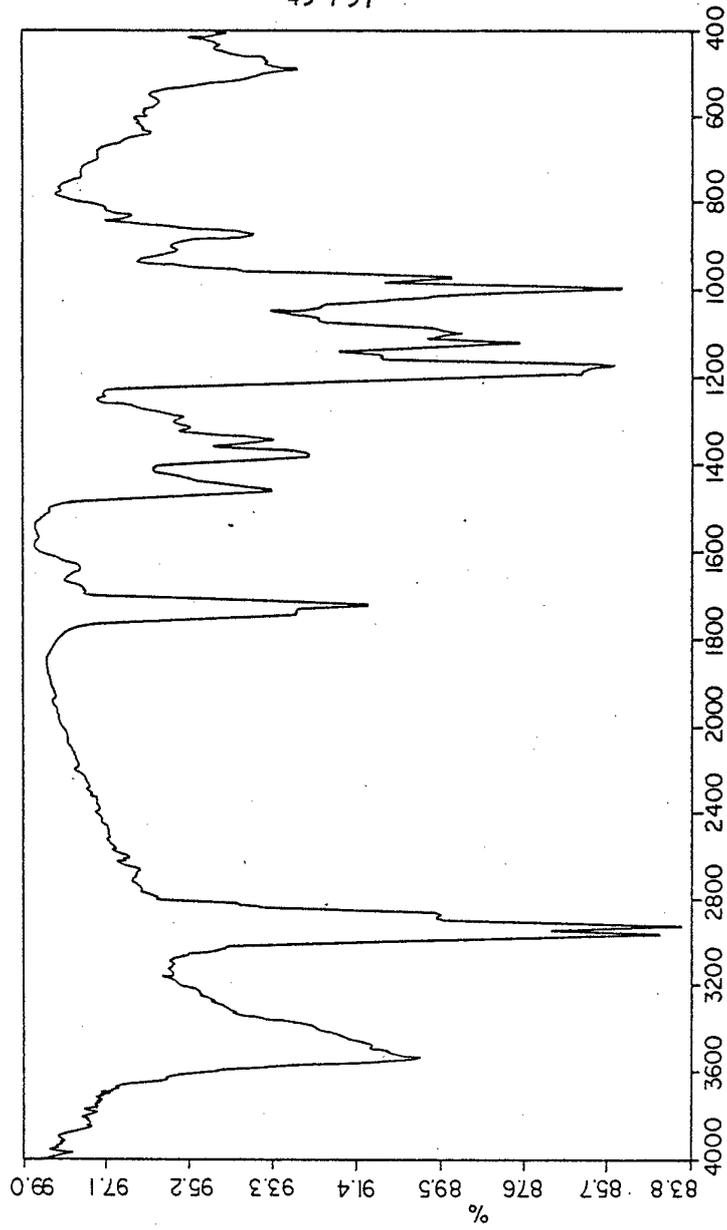


FIG XLV

-310.86- 377846

46 / 57

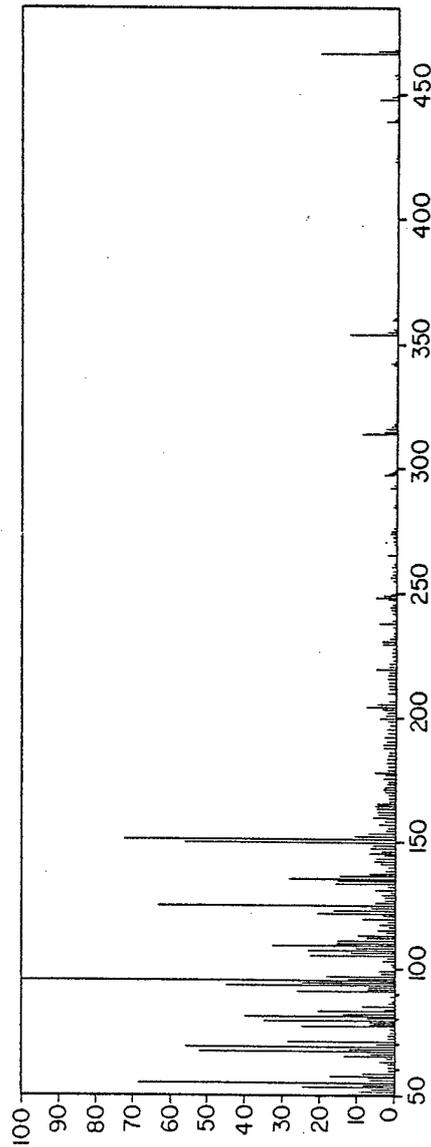


FIG XLVI

47 157

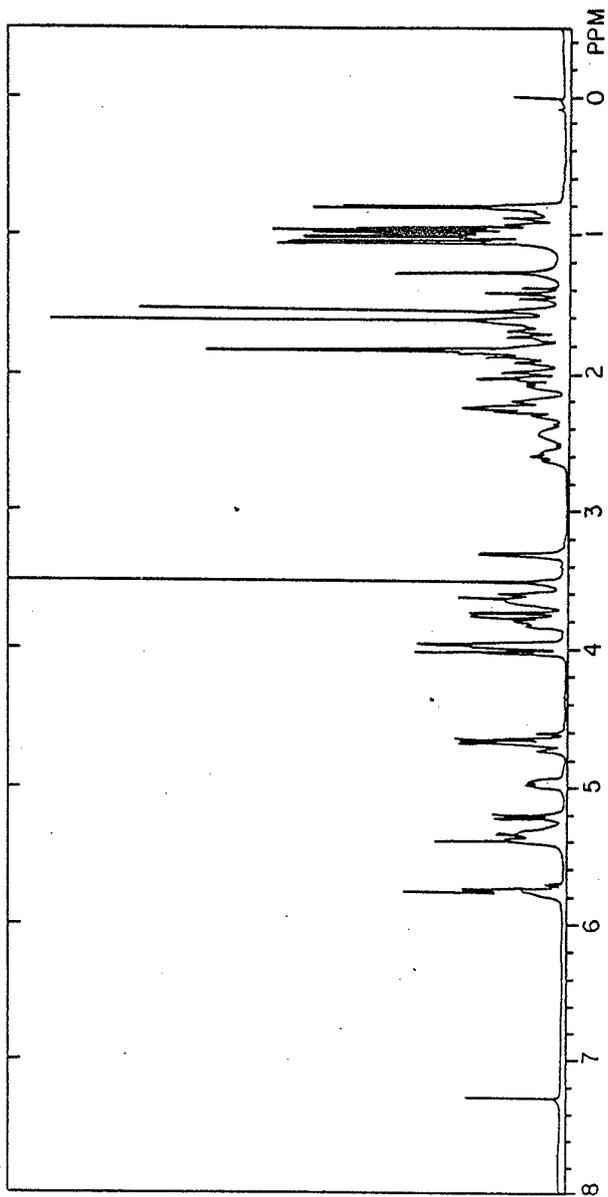


FIG XLVII

-31086- 37784G

48 157

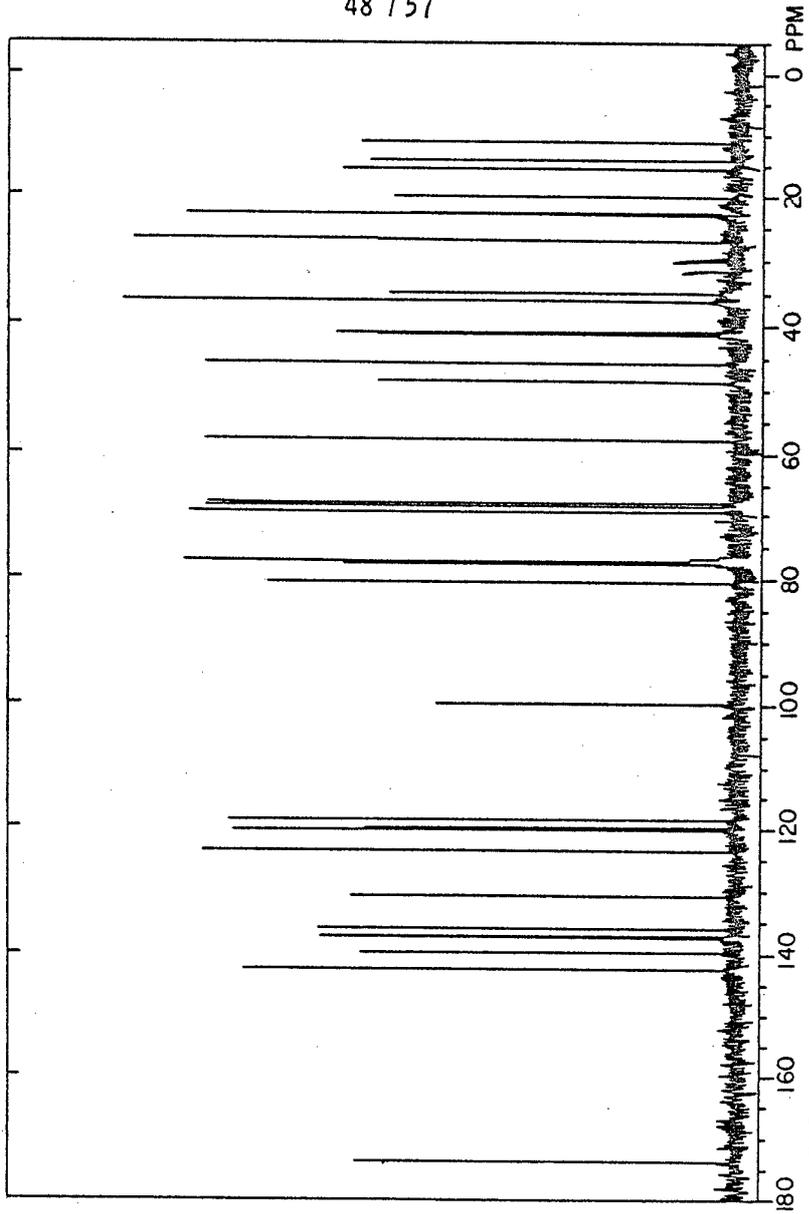


FIG XLVIII

-31086- 377845

49 / 57

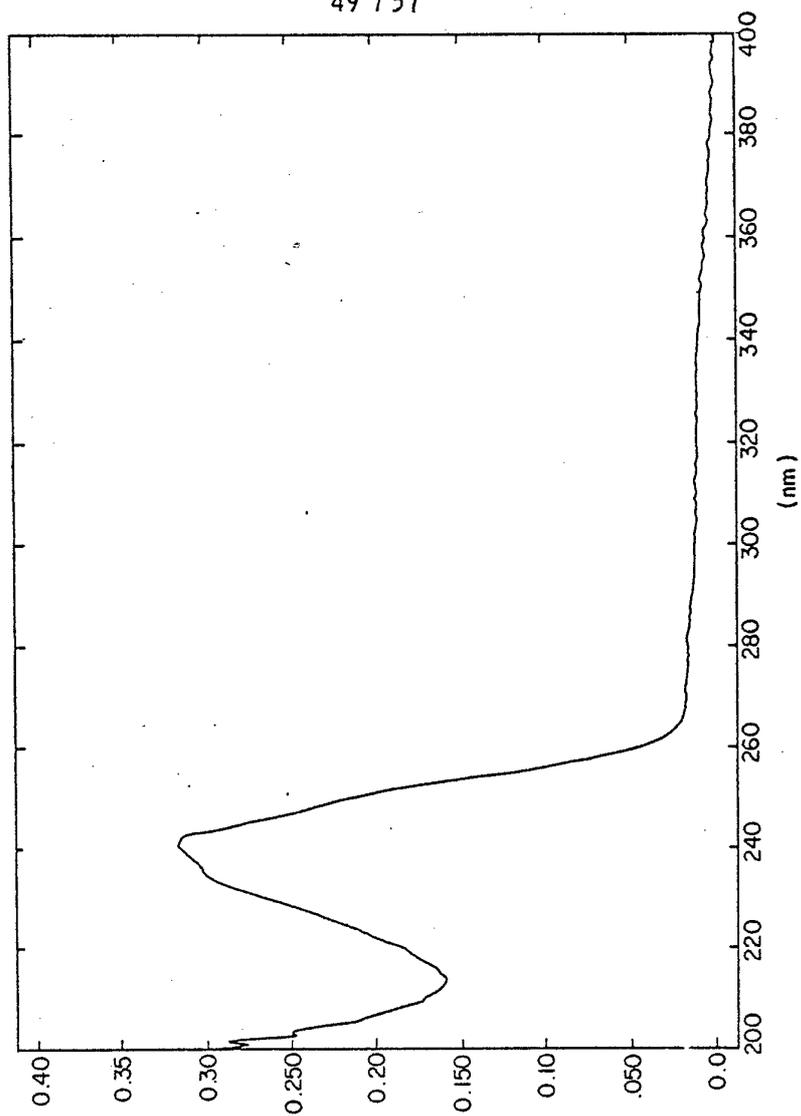
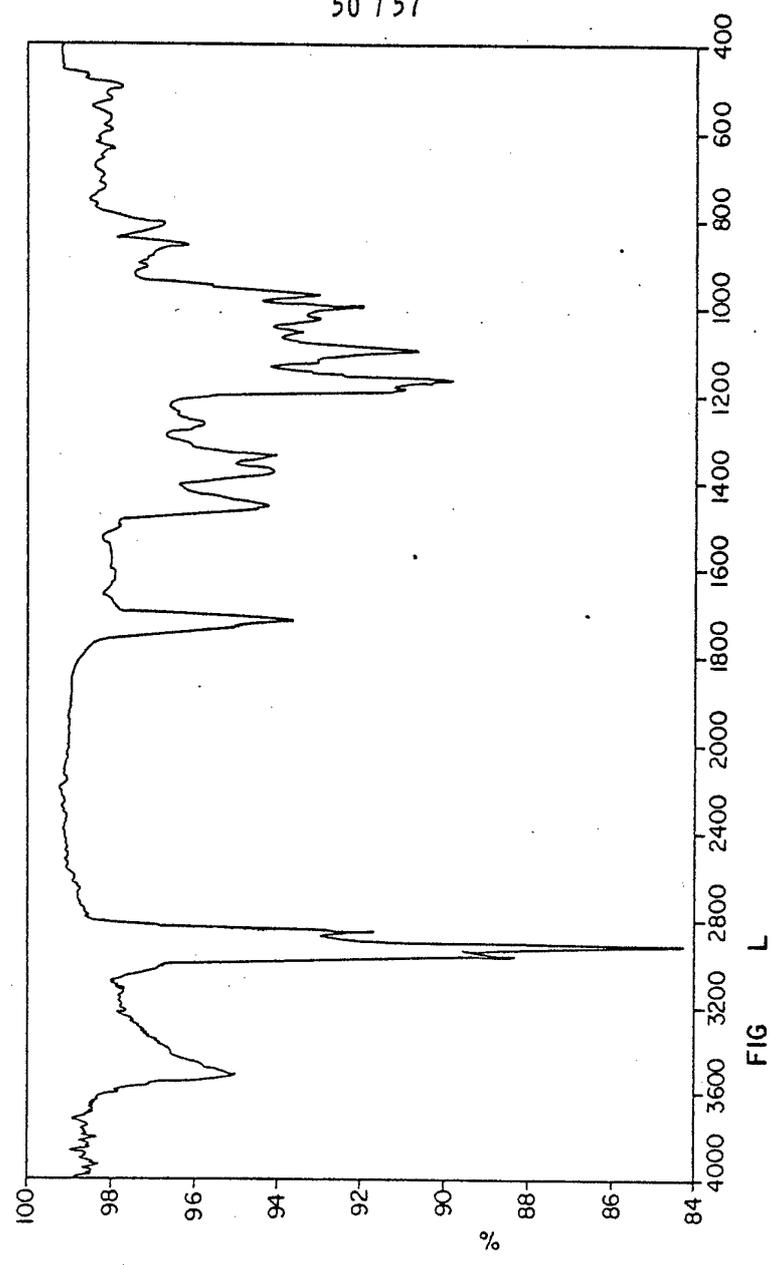


FIG XLIX

50 / 57



51 / 57

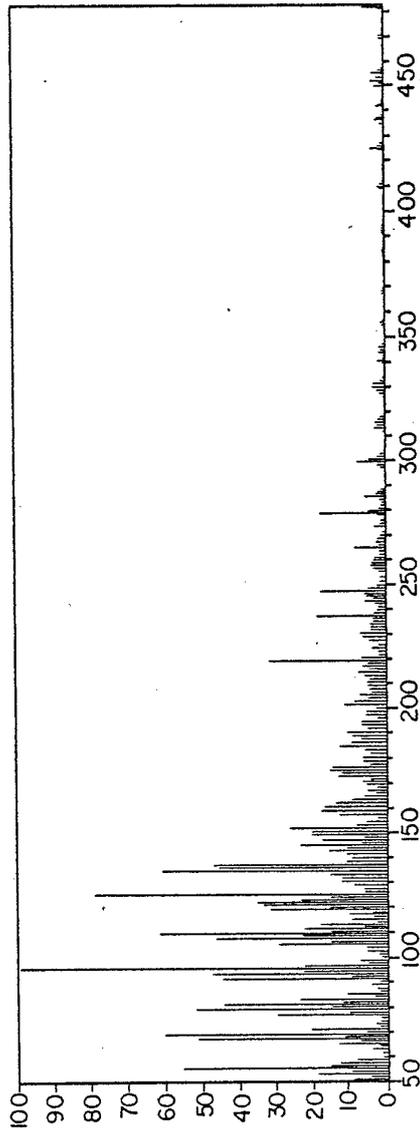
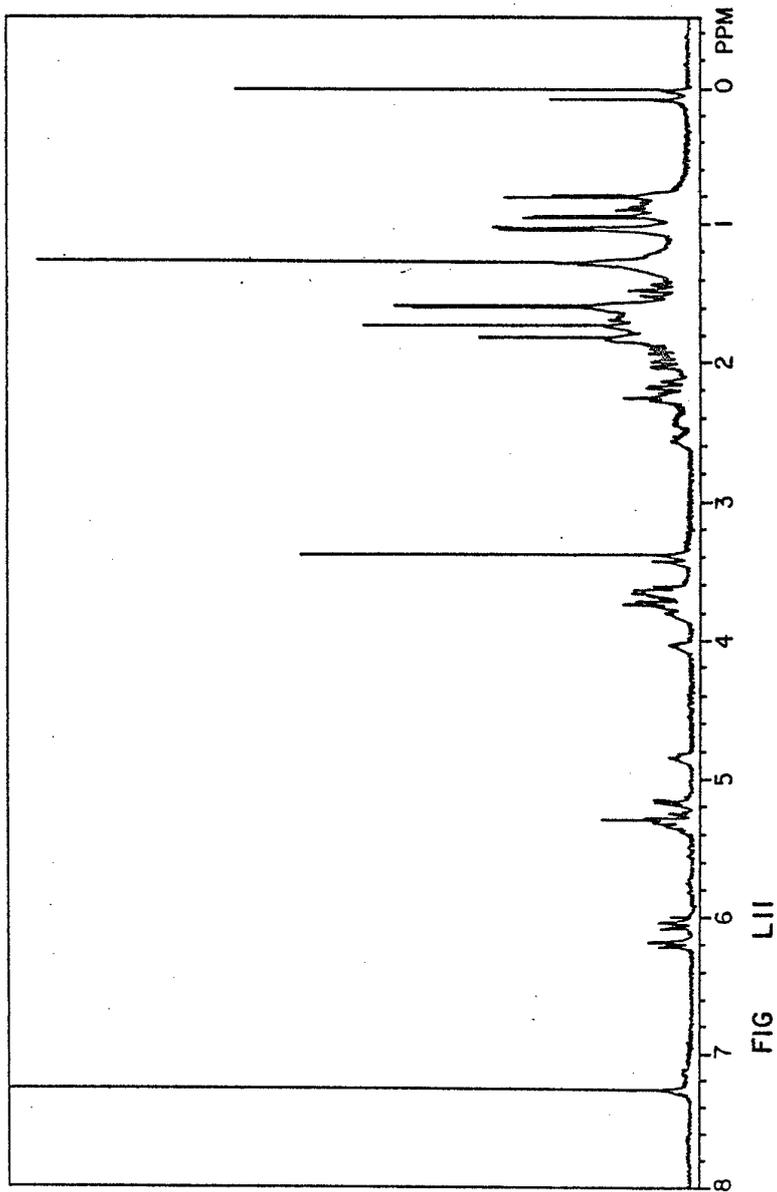


FIG LI

52157



53 / 57

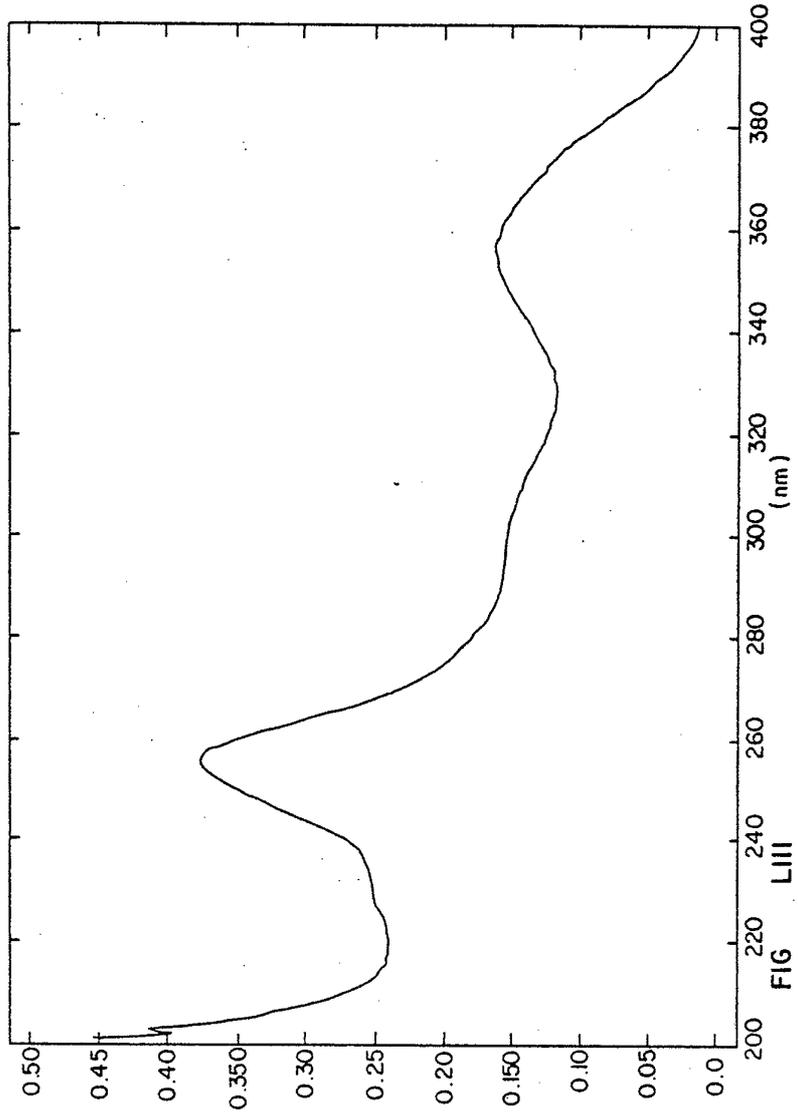
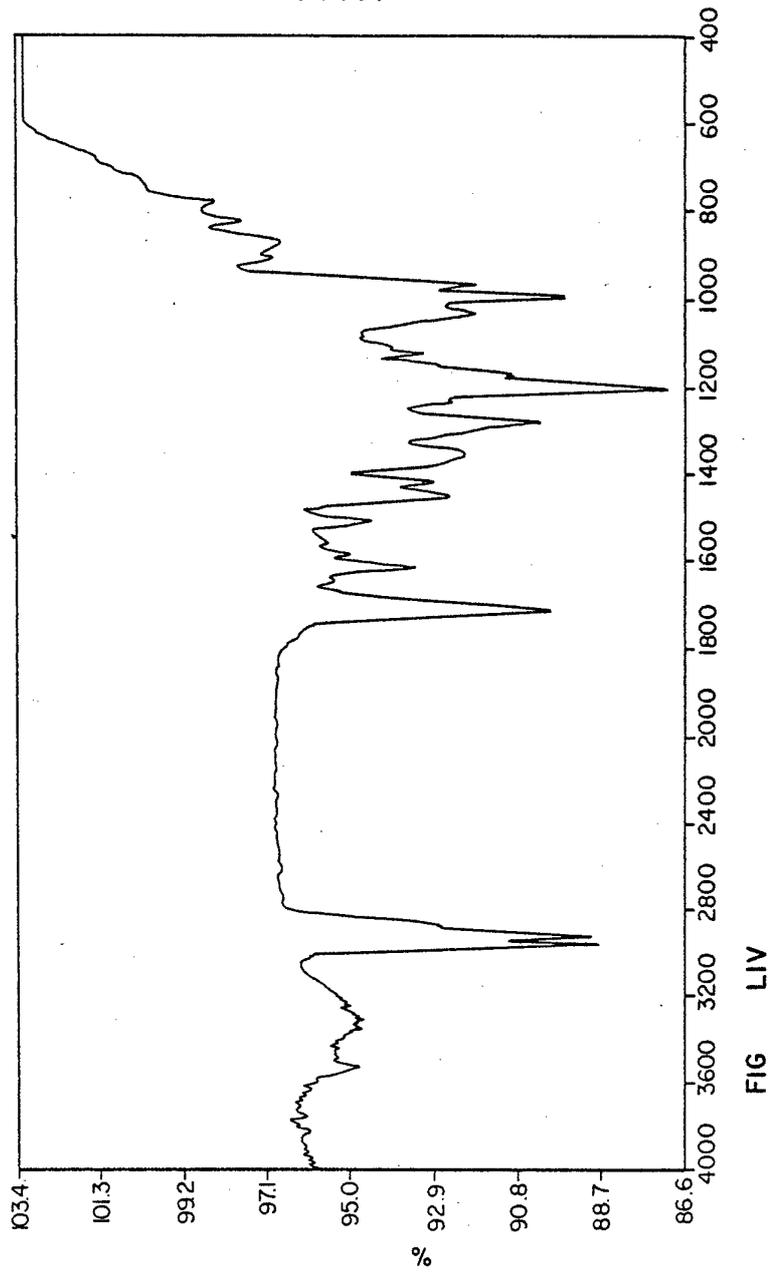


FIG LIII

424 118

54 / 57



-310.86- 377846

55 / 57

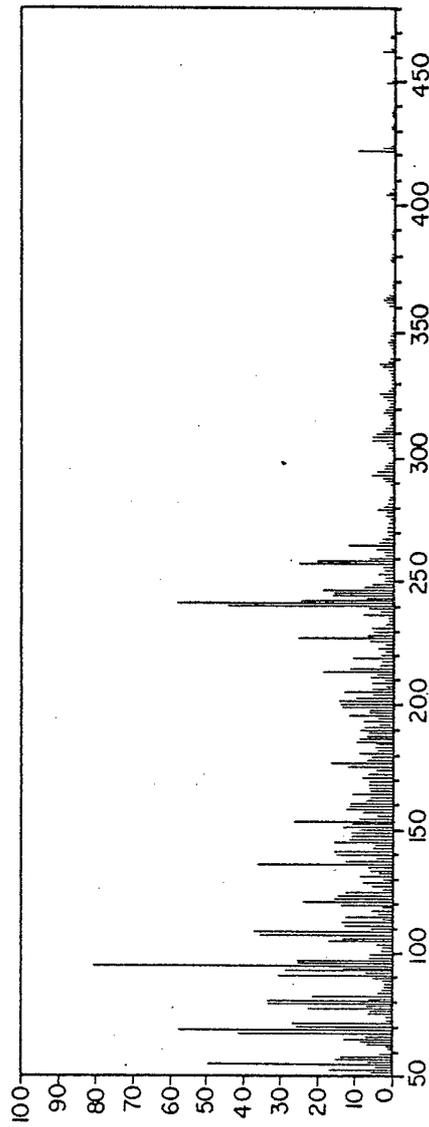
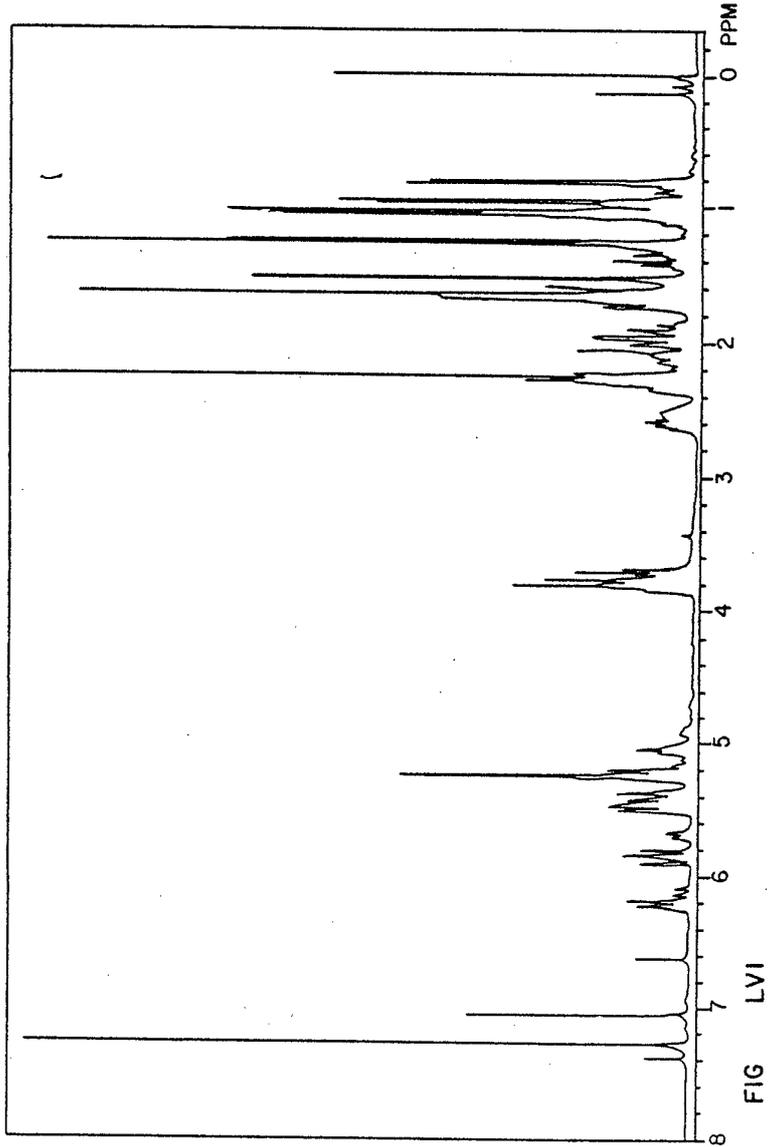


FIG LV

56 / 57



57 157

