(19)



SUOMI - FINLAND
(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS
PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN
FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) **FI 890177 A7**

(12) **JULKISEKSI TULLUT PATENTTIHAKEMUS**
PATENTANSÖKAN SOM BLIVIT OFFENTLIG
PATENT APPLICATION MADE AVAILABLE TO THE PUBLIC

(21) Patenttihakemus - Patentansökan - Patent application 890177

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation - International patent classification (IPC^4)
A01N 37/44

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date **13.01.1989**

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date **13.01.1989**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public **14.07.1989**

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date **12.06.2019**

(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet - Priority

13.01.1988 US 144883

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 • **The Board of Trustees of the University,** 506 South Wright Street Urbana, Ill. 61801, USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 • **Rebeiz, Constantin A.,** USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)
2 • **Juvik, John A.,** TOWN UNKNOWN, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)
3 • **Rebeiz, Carole C.,** USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Kolster Oy Ab, Salmisaarenaukio 1, 00180 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning - Title of the invention
Porfyriinipohjaiset hyönteismyrkyt
Porfyrinbaserade insektgifter

Porfyriinipohjaiset hyönteismyrkyt

Tässä kuvattu keksintö syntyi työssä jota tukivat apurahat U.S. Department of Agriculturesta, National Science Foundationista, Illinoisin yliopistosta, Illinois Agricultural Experiment Stationista ja John P. Trebellas Photobiotechnology Research Endowmentista.

Tämä keksintö liittyy hyönteismyrkkyvalmisteisiin ja -menetelmiin endogeenisen tetrapyrrolitason nostamiseen hyönteisissä.

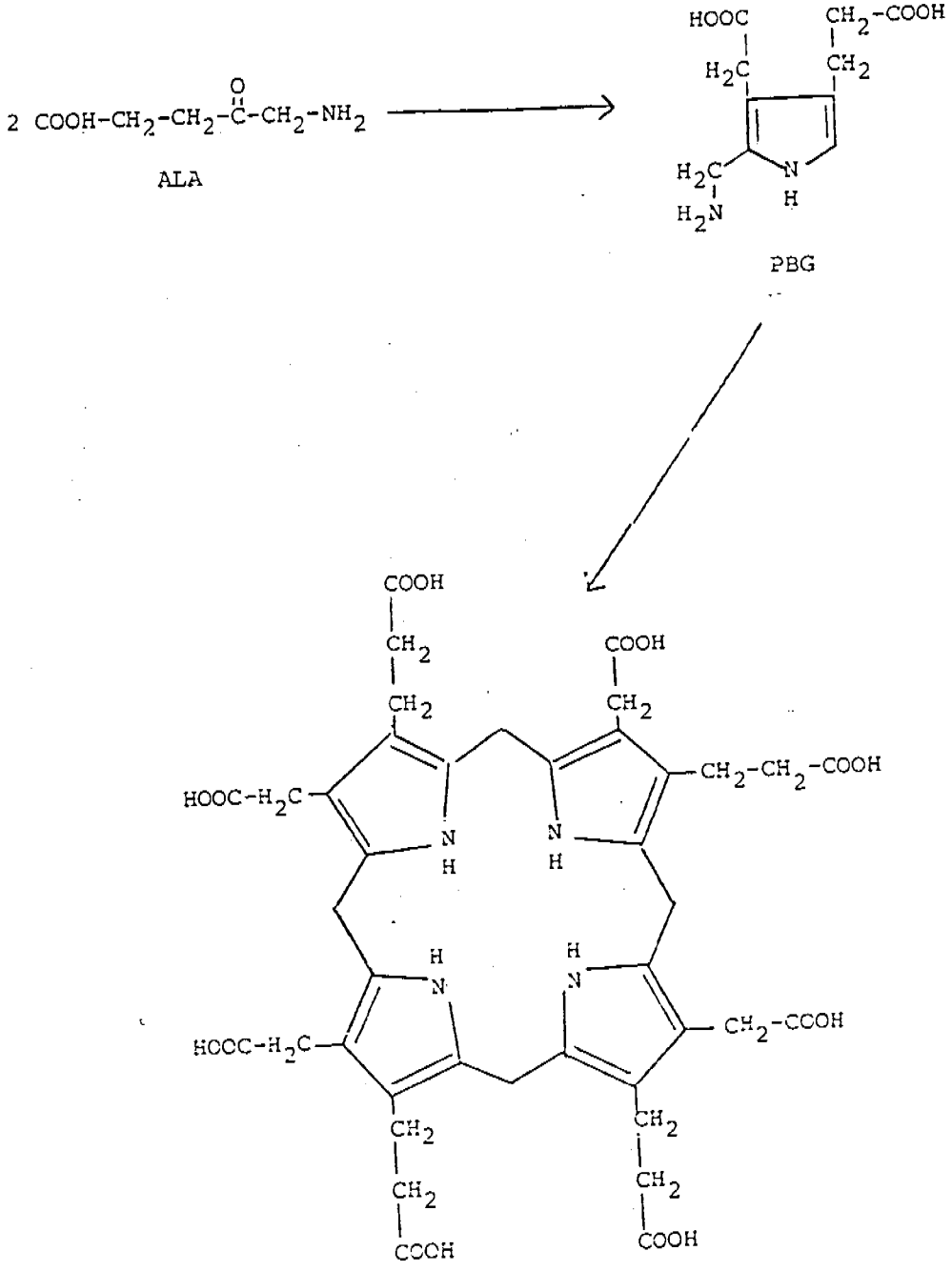
Tähän liittyvä patenttihakemus USSN 859529 kuvaa herbisidivalmisteita jotka sisältävät yhtä tai useampaa yhdistettä jotka on valittu ryhmästä johon kuuluu delta-aminolevuliinihappo, kasvien delta-aminolevuliinihappoa indusoivat aineet, aineet jotka tehostavat delta-aminolevuliinihapon muuttumista fotodynaamisiksi tetrapyrroleiksi kasveissa ja aineet jotka estävät divinyylitetrapyrrolien muuttumista monovinyylitetrapyrroleiksi kasveissa; menetelmiä fotodynaamisten tetrapyrrolien saamiseksi kertymään eläviin kasveihin käyttäen mainittuja valmisteita, ja menetelmiä kasvien tappamiseksi mainituilla valmisteilla. Mainittuja valmisteita ei kuitenkaan ole aikaisemmin tiedetty tai kuvattu insektisideiksi.

Seuraavilla termeillä, yllä ja alla käytettyinä, on seuraavat merkitykset jollei erityisesti toisin mainita: ALA = delta-aminolevuliinihappo; Chl = klorofylli; Chlide = klorofyllidi; Coprogen = koproporfyrinogeeni; DP = dipyridyyli; DV = divinyyli; Mg-Proto = Mg-protoporfyriini IX; MV = monovinyyli; PA = fenantroliini; PBG = porfobilinogeeni; PChl = protoklorofylli; PChlide = protoklorofyllisidi; Pheo = fefytiini; Pheobide = feoforbidi; Proto = protoporfyriini IX; Protogen = protoporfyrinogeeni; Uro = uroporfyriinioktametyyliesteri; ja Urogen = uroporfyrinogeeni. Termit Proto, Mg-Proto, PChlide, Chlide, Chl, Pheo ja Pheobidi viittaavat varastoihin jotka koostuvat

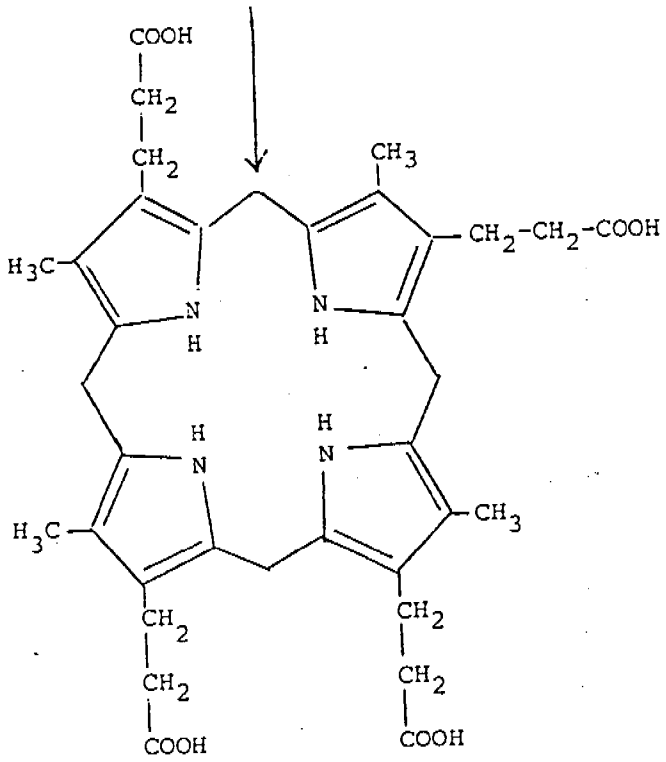
MV- ja/tai DV-komponenteista jollei niitä erityisesti edellä MV- tai DV-määre.

Delta-aminolevuliinihappoa, viisihiiliatomista aminohappoa, on useimmissa elävissä eläin- ja kasvisoluissa ja se on ensisijainen tetrapyrroliprekursori. Sitä on saatavilla joiltakin erikoistuneilta kemikaalitoimittajilta, esim. Sigma Chemical Co., St. Louis, MO. Kasveissa ALA on klorofyllin prekursori 6-haaraisen reitin kautta johon kuuluu protoporfyrinogeeni, protoporfyriini, Mg-protoporfyriini, pitkäaaltoisempia metalliporfyriinejä, protoklorofylli ja klorofyllidi [katso kuvio 1 tähän liittyvässä patenttihakemuksessa USSN 895529]. Hyönteisissä ALA muuttuu protohemiksi (ferroprotoporfyriini IX) reitin kautta johon kuuluu porfobilinogeeni, uroporfyrinogeeni, koproporfyrinogeeni, protoporfyrinogeeni, protoporfyriini IX ja ferroprotoporfyriini IX (eli protohemi):

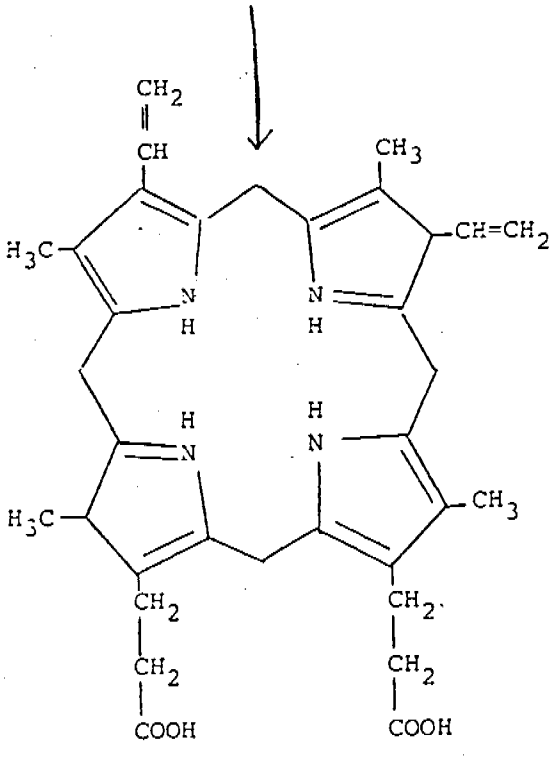
Vuokaavio A:



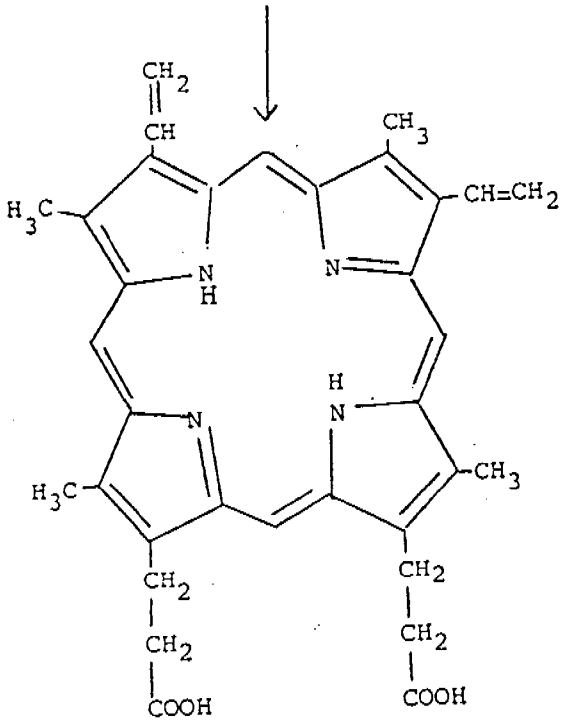
Urogeeni III



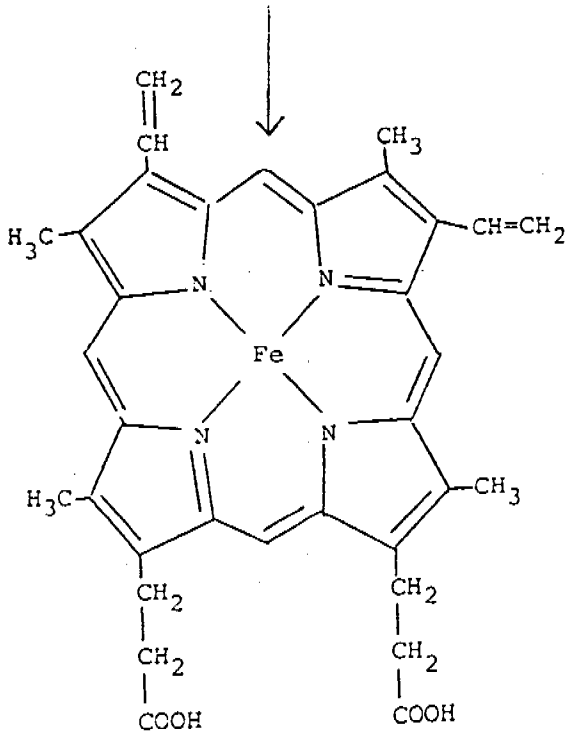
Koprogeeni III



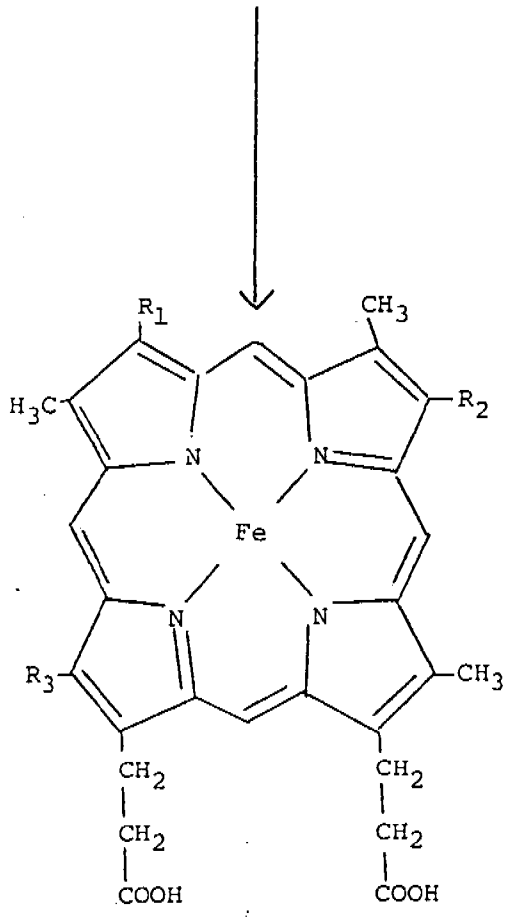
DV PROTOGEENI IX



DV PROTO IX



Fe-PROTO (PROTOHEMI)



Hemi A R_1 = -CH(OH)-CH_2-CH_2-CH=C(CH_3)---CH_2-CH=C(CH_3)---CH_2-CH_2-CH=C(CH_3)(CH_3)

R_2 = -CH=CH_2

R_3 = -CHO

Hemi C R_1 = R_2 = -CH(S-Proteiini)-CH_3

R_3 = -CH_3

[katso myös Granick, S. ja D. Mauzerall, julkaisussa Metabolic Pathways, Vol. 2 (D.M. Greenberg, ed.) (Academic Press, NY, 1961), pp. 525-616.] Protohemi ja hemit a ja c ovat kaikkien kasvi- ja eläinsolujen sytokromien prosteettisia ryhmiä.

Nyt on huomattu että hyönteisiä voidaan tappaa antamalla niille valmistetta joka sisältää yhtä tai useampaa yhdistettä ryhmästä johon kuuluvat ALA, ALA:n indusoijat hyönteisissä ja aineet jotka edistävät ALA:n muuttumista tetrapyrroleiksi hyönteisissä.

Erityisesti on nyt huomattu että altistamalla ulkopuoliselle ALA:lle voidaan eläviin hyönteisiin saada kertymään luonnottoman suuria määriä tetrapyrrolivälituotteita, paljon enemmän kuin sellaisissa hyönteisissä yleensä on, ja että sellaiset aikaansaadut luonnottoman korkeat määrät ovat hyönteiselle myrkyllisiä. Tämä on yllättävää, koska hyönteiset normaalisti syntetisoivat sytokromeja vain sen verran kuin tarvitaan kasvuun ja ylläpitoon, eikä aiemmin uskottu että tämä määrä riittäisi siihen että sellaisia tetrapyrrolivälituotteita kertyisi tappavia määriä.

Myrkyllisyyden mekanismia ei tunneta täydellisesti, mutta näyttää siltä että kertyneet tetrapyrrolit voivat vaikuttaa yhdellä kahdesta tavasta. Uskotaan, että kertyneet tetrapyrrolit valossa herkistävät singlettihapen muodostumista joka on hyvin voimakas hapetin. Singlettihappi hapettaa nopeasti hyönteisten solumembraanien lipoproteiinikomponentit saattaen siten liikkeelle hyvin tuhoisan vapaaradikaaliketjureaktion, joka voidaan tiivistäen kuvata seuraavasti (hv = valofotoni; ^{1}Tet = tetrapyrroli singlettiperustilassa; ^{3}Tet* = tetrapyrroli triplettivarautuneessa tilassa; $^3O_2$ = happi triplettiperustilassa; $^1O_2$* = happi singlettivarautuneessa tilassa; UMLP = tyydyttymättömät membraanilipoproteiinit):

1) ^{1}Tet + hv ----------> ^{3}Tet*

2) ^{3}Tet + $^3O_2$ ----------> ^{1}Tet + $^1O_2$*

3) $^1O_2$* + (UMLP) ----------> vetyperoksidit

4) vetyperoksidit ----------> vapaat radikaalit

5) vapaat radikaalit + UMLP ---> lisää vetyperoksideja

6) vaiheiden (4) ja (5) toisto kunnes suurin osa UMLP:stä on hapettunut

Valoherkistyminen injisoiduilla tetrapyrroleilla on kuvattu eläimissä ja ihmiskudoksissa [katso esim. Ellefson, R.D., Mayo Clinic Proc. 57:454-458 (1982); Christensen, T., T. Sandquist, K. Feren, H. Waksvik ja J. Moan, Br. J. Cancer 48:35-43 (1983); Hopf, F.R. ja D.G. Whitten, The Profyrins, Vol. 1, Dolphin, D., ed. (Academic Press, New York, 1978), ss. 161-195; Sandeberg, S., I. Romslo, G. Hovding, ja R. Bjorndal, Acta Dermatovener (Stockholm) Suppl. 100:75-80 (1982); Latham, P.S. ja J.R. Bloomer, Photochem. Photobiol. 37:553-557 (1983); Bickers, D.R., R.Dixit ja H. Mukhtar, Biochim. Biophys. Res. Comm. 108:1032-1039 (1982)], mutta tätä ALA-riippuvaa tetrapyrrolin kertymisilmiötä ei ennen ole osoitettu hyönteisissä eikä sitä ole ennen sovellettu haitallisten hyönteislajien tappamiseen.

Näyttää siltä että kertyneet tetrapyrrolit pimeässä vaikuttavat toisen mekanismin avulla ja tuloksena on kohonnut Zn-protoporfyriinitaso. Zn-proto ei ole porfyriini-hemi-polun luonnollinen välituote. Sen esiintyminen elävissä soluissa ja kudoksissa merkitsee tavallisesti myrkyttynyttä porfyriini-hemiaineenvaihduntaa [katso esim. Lamolla, A.A. ja T. Yamane, Science 186:936-938 (1974)]. Useimmat ferrokelataasit (entsyymit jotka lisäävät ferrorautaa Protoon hemin muodostamiseksi) voivat lisätä Zn raudan sijasta Protoon jolloin saadaan Zn-Proto, erityisesti epäedullisissa reaktio-olosuhteissa [Marks, G.S., Heme and Chlorophyll (Van Nostrand, 1969), ss. 146-147. Vaikka täsmällistä mekanismia ei tunneta ja hakijat eivät halua sitoutua tiettyyn teoriaan, nykyisin uskotaan että

Zn-Proton kertyminen tämän keksinnön insektisidisten menetelmien seurauksena johtuu vaurioista ferrokelataasisysteemissä, jotka saavat entsyymin lisäämään sinkkiä ferroraudan sijasta osaan Protosta. Lopulta tämä merkitsee, että sinkkiä raudan sijasta löytyy osasta prosteettisia ryhmiä ratkaisevassa hengitysentsyymissä sytokromi c oksidaasissa. Tämän seurauksena ne sytokromi c oksidaasimolekyylit jotka sisältävät Zn-Protoa hemin sijasta eivät kykene pitämään tiukasti kiinni myrkyllisistä vapaista radikaaleista kuten happisuperoksideista ja vedyn vapaista radikaaleista joita syntyy normaalisti Krebsin sitruunahappokierrossa [Halliwell, B., What's New in Plant Physiology 15:21-24 (1984)]. Näissä olosuhteissa tuhoisat vapaat radikaalit voivat vapautua biologiseen membraaniympäristöön ja aiheuttaa vapaista radikaaleista riippuvaa tuhoa joka johtaa hyönteisen kuolemaan.

On lisäksi huomattu, että altistumisen ulkopuoliselle ALA:lle lisäksi elävien hyönteisten altistuminen ALA:n indusoijille johtaa siihen että suuria määriä myrkyllisiä tetrapyrroleja kertyy hyönteisen kudoksiin. Sanalla "ALA:n indusoija" tai "indusoija" tarkoitetaan yhdistettä joka hyönteisiin käytettynä stimuloi hyönteisen tuottamaan normaalia suuremman määrän sisäistä ALA:ta jolla sitten on sama vaikutus kuin yllä kuvattu ulkoisen ALA:n vaikutus. Niinpä tämän keksinnön hyönteismyrkkyyhdisteet voivat sisältää yhtä tai useampaa ALA:n indusoijaa itse ALA:n lisäksi tai sen sijasta. Ei-rajoittavia esimerkkejä indusoijista ovat 2,2'-dipyridyyli; 1,10-fenantroliini; 4,7-dimetyyli-1,10-fenantroliini; 4-metyyli-1,10-fenantroliini; 5-nitro-1,10-fenantroliini; 5-metyyli-1,10-fenantroliini; 5,6-dimetyyli-1,10-fenantroliini; 4,7-difenyyli-1,10-fenantroliini; 5-kloori-1,10-fenantroliini; 3,4,7,8-tetrametyyli-1,10-fenantroliini; 2,2'-ditiobis(pyridiini-N-oksidi); 4,4'-dimetyyli-2,2'-dipyridyyli; fenyyli-2-pyridyyliketoksiimi; ja 2,2':6',2"-terpyridiini.

On lisäksi huomattu, että tietyt yhdisteet toimivat tehostimena ALA:n muutoksessa tetrapyrroleiksi hyönteisissä. "ALA:n tehostimella" tai "tehostimella" tarkoitetaan yhdistettä joka hyönteisiin käytettynä tehostaa käsitellyn hyönteisen kykyä muuntaa sisäistä tai ulkoista ALA:a myrkyllisiksi tetrapyrroleiksi. Niinpä tämän keksinnön hyönteismyrkkyvalmiste voi myös sisältää yhtä tai useampaa ALA:n tehostinta ulkoisen ALA:n tai ALA:n indusoijien lisäksi tai sijasta. Ei-rajoittavia esimerkkejä sopivista tehostimista ovat 2,2'-dipyridyyli; 1,10-fenantroliini; 4,7-dimetyyli-1,10-fenantroliini; 4-metyyli-1,10-fenantroliini; 5-nitro-1,10-fenantroliini; 5-metyyli-1,10-fenantroliini; 5,6-dimetyyli-1,10-fenantroliini; 4,7-difenyyli-1,10-fenantroliini; 5-kloori-1,10-fenantroliini; 3,4,7,8-tetrametyyli-1,10-fenantroliini; 2,2'-ditiobis(pyridiini-N-oksidi); 4,4'-dimetyyli-2,2'-dipyridyyli; fenyyli-2-pyridyyliketoksiimi; ja 2,2':6',2"-terpyridiini. Tietyt yhdisteet jotka toimivat indusoijina yhdessä valmisteessa voivat toimia tehostimina toisessa valmisteessa tai eri konsentraationa. Vaihtoehtoisesti tietyt yhdisteet (esim. 2,2'-dipyridyyli; 1,10-fenantroliini; 4,7-dimetyyli-1,10-fenantroliini; 4-metyyli-1,10-fenantroliini; 5-nitro-1,10-fenantroliini; 5-metyyli-1,10-fenantroliini; 5,6-dimetyyli-1,10-fenantroliini; 4,7-difenyyli-1,10-fenantroliini; 5-kloori-1,10-fenantroliini; 3,4,7,8-tetrametyyli-1,10-fenantroliini; 2,2'-ditiobis(pyridiini-N-oksidi); 4,4'-dimetyyli-2,2'-dipyridyyli; fenyyli-2-pyridyyliketoksiimi; ja 2,2':6',2"-terpyridiini) voivat toimia samanaikaisesti indusoijina ja tehostimina.

Tämän keksinnön hyönteismyrkkyvalmisteet voivat myös sisältää yhdistelmiä kahdesta tai useammasta yhdisteestä jotka on valittu ryhmästä joka käsittää ALA:n, indusoijat ja tehostimet, esim. ALA + yksi tai useampia indusoijia, ALA + yksi tai useampia tehostimia, ALA + yksi tai useampia indusoijia + yksi tai useampia tehostimia,

yksi tai useampia indusoijia + yksi tai useampia tehostimia; jne.

Valmiste voi myös sisältää yhtä tai useampia seuraavista: sopivaa kantajaa (kantajia) [esim. kolloidista magnesiumalumiinisilikaattia, hohkakiveä, talkkia tai niiden yhdistelmiä]; liuottimia [esim. vettä, 0,45 asetonia:0,45 etanolia:0,1 Tween 80:9 vettä (v/v/v/v), 0,45 asetonia:0,45 metanolia:0,1 Tween 80:9 vettä (v/v/v/v), 0,1-1 % Tween 80 vedessä (v/v), 0,9 polyetyleeniglykolia (PEG):0,1 Tween 80:9 vettä (v/v/v), 0,1-0,7 % PEG:0,2-0,8 metanolia:0,1 Tween 80:9 vettä (v/v/v/v), 0,9 metanolia:0,1 Tween 80:9 vettä (v/v/v), 0,45 asetonia:0,45 etanolia:0,2 Tween 80:0,9 etyleeniglykolia:18 vettä (v/v/v/v), tai yhtä tai useampaa seuraavista: bentseeni, tolueeni, ksyleeni, kerosiini, 2-metoksietanoli, propyleeniglykoli, dietyleeniglykoli, dietyleeniglykolidietyylieetteri, formamidi, metyyliformamidi, sykloheksanoni, isoforoni]; puskureita [esim. sitruunahappoa], kostutusaineita [esim. natrium N-metyyli-N-oleyylitauraattia, alkyylifenoksipolyoksietyleenietanolia, natrium-alfa-olefiinisulfonaattia, natriumisopropyylinaftaleenisulfonaattia, polyoksietyloitua kasvisöljyä]; dispergointiaineita [esim. natriumligniinisulfonaattia, naftaleenisulfonihappoformaldehydikondensaatin natriumsuola, hydroksietyyliselluloosa]; vaahdonpoistoaineita [esim. silikoni]; emetiinejä [esim natriumtripolyfosfaatti, tetrakaliumpyrofosfaatti, arekotiini, apomorfiini, kuparisulfaatti]; hajuaineita [esim. pyridiini]; läpäisyaineita; pinta-aktiivisia aineita; emulgointiaineita; adjuvantteja; herbisidejä; ja yhtä tai useampaa muuta tunnettua insektisidiä.

Valmiste voidaan muodostaa millä tahansa tavanomaisesti hyönteismyrkkyvalmisteisiin käytetyllä tavalla, esim. lisäaineena hyönteisen ruokaan sisäisesti systeemisesti annettavaksi, tai liuoksena, suspensiona, emulsiona, valuvana tiivisteenä, emulgoituvana tiivisteenä, geelinä,

voiteena, vaahtona, aerosolina, kostutettavana jauheena, pölytteenä, dispergoituvina rakeina ja vastaavina ulkoista paikallista käyttöä varten, alaa taitavien tuntemien menetelmien mukaisesti. Valmiste tehdään siten, että se toimittaa sopivan määrän yhtä tai useampaa aktiivista ainetta kohdehyönteisiin. Paikalliseen käyttöön valmiste on edullisesti liuos, suspensio, aerosoli, valuva tai emulgoituva tiiviste tai kostutettava jauhe. Paikallisen valmisteen on tietysti oltava sellainen että aktiivinen aine läpäisee hyönteisen kudoksen ja kulkeutuu tetrapyrrolisynteesipaikoille.

Kun aktiivinen aine yhdistetään yhden tai useamman aktiivisen tai inertin yhdisteen tai yllä mainitun valmisteen kanssa, ne voidaan yhdistää vallitsevassa lämpötilassa tai vallitsevaa lämpötilaa alemmassa tai ylemmässä lämpötilassa, kunhan lopullisen valmisteen stabiilisuus ei häiriinny. Kun valmiste sisältää ALA, lämpötila on edullista pitää noin 4°C ja 75°C välillä. Kun tämän keksinnön hyönteismyrkkyvalmiste on vesiliuos, pH voi olla aktiivisten aineiden isoelektrisessä pisteessä tai yli tai alle isoelektrisen pisteen, kunhan aktiivisen aineen stabiilius tai liukoisuus ei häiriinny niin paljon että se vaikuttaisi tehoon. Kuitenkin silloin kun hyönteismyrkkyvalmiste sisältää ALA, pH on edullista säätää siten että se on suunnilleen arvon 3 ja 8 välillä.

Kun kaksi tai useampia komponentteja yhdistetään hyönteismyrkkyvalmisteiden muodostamiseksi ne on edullista yhdistää sellaisissa olosuhteissa että varmistetaan tasainen konsentraatio koko seoksessa. Tämä tehdään käytännöllisesti sellaisilla menetelmillä kuin sekoittaminen, ravistaminen, jne.

Niissä tapauksissa joissa aktiivinen aine on tämän keksinnön hyönteismyrkkyvalmisteen ainoa komponentti, aktiivinen aine on huolella valmistettava tasaisen levityksen aikaansaamiseksi. Kiinteän aktiivisen aineen tapauk-

sessa tämä tehdään käytännöllisesti jakamalla hienoksi jauheeksi. Kun sellainen ainoa komponentti on nesteen muodossa, se voidaan käytännöllisesti atomisoida hienoksi sumuksi sopivissa lämpötiloissa alaa taitavien hyvin tuntemilla menetelmillä. Kun ruoka- tai paikalliset valmisteet tehdään liuoksena ne voivat käytännöllisesti sisältää ALA:a suunnilleen konsentraationa 2 - 50 mM ja indusoijaa tai tehostinta suunnilleen 0,1 - 50 mM.

Tämän keksinnön menetelmien mukaan tapettavat hyönteiset saatetaan kosketukseen ALA:a ja/tai ALA:n indusoijia ja/tai ALA:n tetrapyrroleiksi muuttumista tehostavia aineita sisältävän hyönteismyrkkyvalmisteen kanssa. Tämän keksinnön hyönteismyrkkyvalmisteita voidaan käyttää paikallisesti, esim. pölytteenä, kasteluaineena, ruiskutteena tai sumuna riittävänä määränä saavuttamaan tappava sisäinen tetrapyrrolimäärä. Paikallisesti käytettävän hyönteismyrkkyvalmisteen määrä vaihtelee riippuen valituista aktiivisista aineista, mutta se on yleensä määrä joka riittää tuottamaan suunnilleen 0,25 - 2 kg ALA hehtaaria kohden ja/tai suunnilleen 0,1 - 1,5 kg indusoijaa tai tehostinta hehtaaria kohden. Optimikäyttömäärien määritystavat ovat tuttuja alaa taitaville.

Vaihtoehtoisesti tämän keksinnön hyönteismyrkkyvalmisteita voidaan antaa ravinnon kautta, lisättyinä syötteihin tai muuhun ruokaan tai juomaan jota tapettavat hyönteiset nauttivat. Annettava hyönteismyrkkymäärä vaihtelee jälleen riippuen käytetystä aktiivisesta aineesta, mutta se on yleensä riittävä määrä tuottamaan suunnilleen 10 ng - 5 µg ALA ruumiinpainon mg:aa kohden ja/tai suunnilleen 1 ng - 5 µg indusoijaa tai tehostetta ruumiinpainon mg:aa kohden.

Jos halutaan että hyönteinen kuolee pimeämekanismin kautta, hyönteinen voidaan käsitellä ja sitten suojata valolta, jolloin saadaan maksimitetrapyrrolikertymä. Hyönteinen voidaan suojata millä tahansa tavanomaisella taval-

la kuten peittämällä maa-ala tai alue jolla hyönteistä esiintyy kankaalla, tummalla paperilla tai foliolla. Kenttäoloissa ideaalinen tapa saada aikaan pimeä inkubaatioaika on käyttää hyönteismyrkkyvalmistetta hämärän aikaan tai yöllä sellaiseen aikaan että hyönteiset jäävät pimeään vähintään tunniksi. On ymmärrettävä että tetrapyrrolin kertymisen aikaansaamiseksi pimeän ei tarvitse olla täydellistä valonpuutetta vaan ainoastaan aallonpituuksien 380 ja 780 nm välillä olevan valon lähes täydellistä puuttumista. Edullisesti hyönteisiä pidetään pimeässä noin 1 - 20 tuntia. 1 - 8 tuntia on erityisen edullista. Tietysti monet hyönteiset pitävät luonnostaan pimeästä ympäristöstä, eikä mihinkään erityistoimiin tarvitse ruveta niiden suojelemiseksi valolta hyönteismyrkkyvalmisteella käsittelyn jälkeen.

Jos hyönteiset halutaan tappaa valomekanismin avulla, annetaan hyönteismyrkkyvalmistetta ja sen jälkeen hyönteiset altistetaan noin 5 ftcd tai voimakkaammalle valolle aallonpituuksilla 380 - 700 nm. Valo voidaan saada mistä tahansa tavanomaisesta lähteestä, esim. hehkulampusta, metallihalidilampusta, aurinkolampusta tai kylmävalo- tai päivänvaloloistelampusta. Kentällä edullisin valonlähde on tietysti auringonvalo. Hyönteiset altistetaan valolle riittäväksi ajaksi hapettamaan suurimman osan tyydyttymättömistä membraanilipoproteiineista; edullinen aika on noin 2 min - 3 vuorokautta.

Tällä keksinnöllä käsiteltävät hyönteiset voivat olla muna-, toukka- tai aikuisvaiheessa. Toukissa kehitysaste voi vaikuttaa alttiuteen käsittelylle; myöhemmillä kehitysasteilla olevat toukat ovat suhteessa herkempiä käsittelylle kuin toukat aikaisella tai keskiasteella. Niinpä voi olla tarpeen vaihdella annostusta riippuen kohteena olevan toukkapopulaation enemmistön kehitysasteesta.

Hyönteismyrkyn vaikutusta osoittaa ihon värin muutos, jota seuraa kuivuminen ja kuolema.

Lisää tietoa tästä keksinnöstä voidaan saada seuraavista ei-rajoittavista esimerkeistä. Yllä ja alla käytettynä, jollei toisin mainita, kaikki lämpötilat ja lämpötila-alueet viittaavat celcius-järjestelmään ja termit ympäristön tai huoneenlämpö viittaavat noin 20 - 25°C:seen. Termi prosentti tai (%) viittaa painoprosenttiin ja termit mooli ja moolia viittaavat grammamooleihin. "Merkitsevyystaso" viittaa todennäköisyyteen että populaatiosta jolle korrelaatiokerroin (r) on nolla, voidaan ottaa kokoa n oleva näyte, jonka korrelaatiokerroin on sama tai suurempi kuin annetulle näytteelle laskettu arvo r. Lyhenne "n.s." tarkoittaa "ei merkitsevä".

ESIMERKKI I

Trichoplusia ni (Hubner) (tupsumetalliyökkönen, laajimmalle levinnyt vihannestuholainen yhdysvalloissa) munia saatiin Paula Petersiltä USDA Insect Biological Control Laboratory, Department of Entomology, University of Missouri at Columbia. Toukat, kotelot ja aikuiset yökköset kasvatettiin Percival Model I-60 -inkubaattoreissa (Percival Mfg. Co., Boone, Iowa 50036) 25°C ja 75 % suhteellisessa kosteudessa siten että vuorokaudessa oli 14 tuntia valoa ja 10 tuntia pimeää. Toukkia pidettiin keinotekoisella dieetillä seuraten menetelmiä jotka on kuvannut Waldbauer, G.P., R.W. Cohen ja S. Friedman, Great Lakes Entomol. (1984) 17:114. Kaksi- kolmekymmentä toukkaa kasvatettiin erillisissä 8 unssin paperiastioissa joissa oli kirkkaat muovikannet, hankittu Lily-Tulip Inc:ltä (Augusta, GA). Geneettisten muutosten välttämiseksi viljelmään lisättiin villiä keräysaineistoa joka kesä. Mikrobitautien minimoimiseksi kunkin sukupolven munat ja kotelot pintasteriloitiin.

Koska T. ni -toukat joita kasvatettiin keltavihreää sinimailasjauhetta sisältävällä dieetillä saivat kellan-

vihreän värin, kun taas ne T. ni -toukat jotka kasvoivat dieetillä ilman sinimailasjauhetta olivat vailla näkyvää pigmenttiä, tutkittiin ensin ravinnon endogeeninen pigmenttimäärä ensi vaiheena kohti tetrapyrrolien induktion tutkimista kemiallisella käsittelyllä.

Sinimailasjauhetta sisältävän dieetin kellanvihreä väri oli tyypillinen Pheos:ille (Chls joka on menettänyt Mg-atominsa) ja Pheobideille (Chlide joka on menettänyt Mg-atominsa). Tämä varmistettiin 77°K spektrofluorimetrisellä analyysillä. Gramma-annoksia ruokaa homogenoitiin 6 ml:ssa asetonia:0,1 N NH_4OH (9:1 v/v) ja syntyvä vesipitoinen asetoniuute joka sisälsi eri pigmenttejä puhdistettiin lipoproteiineista ja solujätteistä sentrifugoimalla 39000 g 10 min ajan 0°C:ssa. Apolaariset pigmentit kuten Chls ja Pheos poistettiin vesipitoisesta asetoniliuoksesta uuttamalla heksaanilla. Polaarisemmat di- ja monokarboksyylipigmentit kuten Proto, Mg-Proto, PChlidet, Chlidet ja Pheos jäivät heksaaniuutettuun vesipitoiseen asetonifraktioon. Pieni määrä klorofyllipigmentit sisältävää heksaaniuutetta kuivattiin typpikaasun alla ja jäämä liuotettiin 80 % asetoniin Chls- ja Pheos-määrien spektrofluorimetriseksi määrittämiseksi Bazzaz, M.B.:n ja C.A. Rebeizin, Photochem. Photobiol. (1979) 30:709 menetelmän mukaisesti.

Fluoresenssispektrit talletettiin täysin korjatulla fotonilaskentaspektrofluorimetrillä Model SLM 8000DS, kuten on kuvattu julkaisussa Rebeiz, C.A., A. Montazer-Zouhoor, H.J. Hopen ja S.M. Wu, Enzyme Microb. Technol. (1984) 6:390. Viritys oli 400, 420 ja 440 nm. Absorptiospektrit mitattiin 2 nm rakoleveydellä Aminco malli DW-2 kaksoisaallonpituusspektrofotometrilla (Travenol Laboratories Inc., Silver Springs, MD 20910). Kontrollit olivat MV Pheo a ja b valmistettuna MV Chl a:sta ja b:stä kuten on kuvattu julkaisussa Bazzaz, M.B. ja C.A. Rebeiz, Photochem. Photobiol. (1979) 30:709. Tulokset esitetään taulukossa I:

TAULUKKO I

Sinimailasjauhetta sisältävän ravinnon ja sillä kasvatettujen T. ni pääasiallisten pigmenttien spektrofluorimetriset ominaisuudet eetterissä 77°K

Koe	#	Materiaali	Fluoresenssi 77°K (nm)		Pigmentin tunnistus
			Punainen emissio	Soret viritys	
A	1	Autenttinen MV Pheo b	656	440>450	
B	1	Autenttinen MV Pheo a	666	414	
C	1	Apolaarinen uute ravinnosta	655	440>450	MV Pheo b
	2		666-667	414	MV Pheo a
	3	Polaarinen uute ravinnosta	654-655	440>450	MV Pheobidi b
	4		666-667	414-415	MV Pheobidi a
E	1	Polaarinen T. ni -uute	655	440>450	MV Pheobidi b
			666-667	414	MV Pheobidi a

Peräkkäiset apolaarisen uutteen eetterilasin viritykset välillä 400 ja 450 nm saivat aikaan kaksi Chl-maista emissiojuovaa joiden maksimit olivat 655 ja 666-667 nm (taulukko I: C 1, 2). 655 nm emissiojuovan Soret-viritysspektri osoitti jaetut Soret-viritysmaksimit 440 nm (suuri maksimi) ja 450 nm (pienempi maksimi) (taulukko I: C 1). Nämä emissio- ja viritysmaksimit olivat identtiset autenttisen MV Pheo b (E440>E450F656) (taulukko I: A) vastaavien kanssa. Tässä yhteydessä "E440>450" viittaa MV Pheo b:n jakautuneeseen Soret-viritysmaksimiin 77°K eetterissä, kun taas "F656" viittaa MV Pheo b:n fluoresenssiemissiomaksimiin 656 nm:ssa. (E440>E450F656) fluoresenssijuova tunnistettiin siksi MV Pheo b:ksi. Läsnä oli myös pieniä määriä MV Chl b.

666 nm emissiojuovan Soret-viritysspektrissä oli yksi viritysmaksimi 414 nm:ssa ja se oli identtinen autenttisen MV Pheo a:n kanssa (taulukko I: B, C 2). Tämä (E414F666) fluoresoiva yhdiste tunnistettiin siksi MV Pheo a:ksi.

Polaarisen fraktion spektrofotometriset ominaisuudet olivat hyvin samanlaiset kuin apolaarisen fraktion (taulukko I:C 1-4). (E440>E450F655) ja (E414F666-667) -yhdisteet olivat kuitenkin liian polaarisia jakautuakseen heksaanin avulla ja pysyivät vesipitoisessa asetonijäämässä. Ne tunnistettiin MV Pheobidi b:llä ja MV Pheobidi a:lla. Pheobideilla on samat elektronispektroskooppiset ominaisuudet kuin Pheoilla mutta ne ovat polaarisempia koska ne ovat menettäneet pitkäketjuisen alkoholin makrosyklin asemassa 7. On dokumentoitu että esteröitymisen määrä makrosyklin asemissa 6 ja 7 ei vaikuta tetrapyrrolien elektroniabsorptioon ja fluoresenssiominaisuuksiin (katso esim. Belanger, F.C. ja C.A. Rebeiz, J. Biol. Chem. (1982) 257:1360).

Proto-, Mg-Proto-, PChlide-, Chlide- ja Pheobidimäärät määritettiin spektrofluorimetrisesti annoksista

heksaaniuutetun asetonin polaarista fraktiota menetelmillä Rebeiz, C.A., J.R. Mattheis, B.B. Smith, C.C. Rebeiz ja D.F. Dayton, Arch. Biochem. Biophys. (1975) 171:549 ja Bazzaz, M.B. ja C.A. Rebeiz, Photochem. Photobiol. (1979) 39:709. Tulokset on esitetty taulukossa II:

TAULUKKO II

Pigmenttimäärät ruokavalioissa joilla toukat kasvatettiin

			Pigmenttimäärä nmol / 100 mg proteiinia							
Koe	Ravinto	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	Ravinto + S.J.	0	2,39	5,45	53,28	108,07	0	3,71	31,52	49,54
B	Ravinto - S.J.	0	0	0	0	0	0,15	0,05	0,29	0,74

jossa "Ravinto + S.J." = sinimailasjauhetta sisältävä ravinto ja "Ravinto - S.J." = ravinto josta puuttuu sinimailasjauhe.

MV Pheobidi a:n ja b:n määrät sinimailasjauhetta sisältävässä ravinnossa ilmoitetaan taulukossa II: A. Pieniä määriä Chlide a ja b oli myös läsnä (taulukko II: A). Ravinto josta puuttui sinimailasjauhe sisälsi vain häviäviä määriä klorofyllipigmenttejä (taulukko II: B).

ESIMERKKI II

Viidennellä asteella olevia sinimailasjauhetta sisältävällä tai ei-sisältävällä kasvatettuja T. ni -toukkia homogenoitiin joko huhmareessa tai Brinkman malli PT 10/35 homogenoijassa (Brinkman Instrument Co., Westbury, NY 11590) asetonissa: 0,1 N NH_4OH (9:1 v/v) 6 ml liuotinta kudosgrammaa kohden. Polaariset ja apolaariset pigmentit uutettiin kuten esimerkissä I. Tulokset esitetään taulukossa III:

TAULUKKO III

Pigmenttimäärät T. ni-toukissa

Koe	Ravinto	Proto	Pigmenttimäärä nmol / 100 mg proteiinia 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	T. ni + S.J.	0	0,68	12,31	21,39	45,99	0,12	0,21	0,04	1,56
B	T. ni - S.J.	0,2	0,14	0,25	0,04	1,88	0,27	0,07	0,07	0

jossa "T. ni + S.J." = sinimailasjauhetta sisältävällä ravinnolla kasvatetut toukat ja "T. ni - S.J." = ei sinimailasjauhetta sisältävällä ravinnolla kasvatetut toukat.

Toisin kuin sinimailasjauheravinto joka sisälsi huomattavia määriä MV Pheo a ja b MV Pheobide a:n ja b:n lisäksi, T. ni sisälsi pienempiä määriä Pheoja, joiden määrä näytti vaihtelevan joukosta joukkoon (taulukko III: A; katso myös taulukko IV alla). Toukkien keräämät pigmentit olivat polaarisempia ja koostuivat pääasiassa MV-pheoforbidista a ja MV pheoforbidista b (taulukko I: E; taulukko III: A). Toisaalta sinimailasjauhetta sisältämättömällä ravinnolla kasvatetut toukat sisälsivät vain häviäviä määriä klorofyllipigmenttejä (taulukko III: B).

Pigmentin kertymispaikan määrittämiseksi erotettiin sinimailasjauheella kasvatettujen viidennellä asteella olevien T. ni -toukkien nahka, hemolymfa ja suoli ja analysoitiin pigmenttisisällön suhteen. Hemolymfa kerättiin 9 - 10 toukasta jotka saivat ravintoa ilman sinimailasta ja 9 - 10 toukasta jotka saivat sinimailasta sisältävää ravintoa lävistämällä varovasti sydämen päällä oleva iho yhden toukan takaosan segmentin kohdalta vatsapuolelta. Ulos puristettu hemolymfa kerättiin no. 22 ruiskuun ja ruiskutettiin heti kylmään asetoniin: 0,1 N NH_4OH (9:1 v/v). Hemolymfan keräämisen jälkeen toukat jäädytettiin nestemäisessä typessä ja sitten osittain sulatettiin ennen kuin iho halkaistiin pituussuunnassa terävällä veitsellä. Sulanut iho (eli hyönteisen integumentti) kuorittiin varovasti vielä jäässä olevien suolten päältä. Iho pantiin jääkylmään tislattuun veteen lisäpesua varten ja suolisto pantiin jääkylmään asetoniin: 0,1 N NH_4OH (9:1 v/v). Iho huuhdeltiin kolme kertaa tislatulla vedellä ja pantiin kylmään asetoniin: 0,1 N NH_4OH (9:1 v/v) homogenointia varten. Hemolymfa- suoli- ja integumenttifraktiot homogenoitiin kylmässä asetonissa 0,1 N NH_4OH (9:1 v/v) huhmaressa ja uutettiin esimerkin I menetelmällä. Tulokset esitetään taulukossa IV:

TAULUKKO IV

Pigmenttimäärät sinimailasjauhetta sisältävällä ravinnolla kasvatettujen *T. ni*-toukkien eri kudoksissa

	Pigmenttimäärä nmol / 100 mg proteiinia								
	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
nahka	0	0,05	0,12	0,42	1,03	0,13	0,05	0,07	0,08
suoli	0	0,39	2,61	12,22	18,05	0,38	0,49	9,75	17,32
hemolymfa	0,07	0,25	0,13	0,18	1,19	0,98	0,50	0,18	0

Kuten taulukossa IV esitetään, suurin osa pigmentistä löytyi suolesta. Pieniä määriä pigmenttiä löytyi myö integumentista ja hemolymfasta.

ESIMERKKI III

Pala ruokaa (2,5 x 1,5 x 1 cm) ja 20 - 30 Ti. ni -toukkaa kolmannella asteella pantiin 8 unssin paperiastiaan (halkaisija 9 cm) ja astia ruiskutettiin 0,35 ml:lla 40 mM ALA + 30 mM 2,2'-DP asetoni:etyylialkoholi:Tween 80:vesi (0,45:0,45:0,1:9 v/v/v/v) -liuoksessa, pH säädetty arvoon 3,5. Liuos ruiskutettiin hienona sumuna keskimääräisessä pisarakoossa noin 50 mikronia. Tämä vastasi ruiskutusmäärää 80 litraa hehtaarille. Käsittely toistettiin neljä kertaa. Ruiskutetut astiat peitettiin läpinäkyvällä muovikannella ja käsiteltyjä toukkia inkuboitiin yön yli (17 h, yleensä alkaen tiettynä päivänä klo 16 ja päättyen klo 9 seuraavana päivänä) pimeässä 28°C ennen uuttoa kuten esimerkissä II. Tulokset esitetään taulukossa V:

TAULUKKO V

Vallitsevan T. ni:hin ALA + 2,2'-DP-käsittelyn jälkeen kertyvän pigmentin absorbanssi- ja fluoresenssiominaisuudet

Materiaali	Absorbanssi 298°K 80% asetonissa (nm)	Fluoresenssi 77°C eetterissä (nm)		Pigmentin tunnistus
		Punainen emissio	Soret viritys	
Autenttinen Uro	400,498,531,568,622	618	402	
Autenttinen Copro	405,496,528,565,619	619	400	
Autenttinen Proto	403,503,538,573,629	629	409	
Autenttinen Mg-Proto	417,553,592	591	424	
T. ni-uute	403,503,538,573,629	629	409	DV Proto IX
T. ni-uute Mg-lisäyksen jälkeen		591	424	DV Mg-Proto IX

Vaikka kontrollitoukkien, jotka ruiskutettiin pelkällä liuottimella, pigmenttiprofiili oli samantapainen kuin taulukoissa I: E ja III: A kuvattu, ALA + 2,2'-DP-käsiteltyjen toukkien pigmenttiprofiili oli ratkaisevasti erilainen. MV Pheobidi a:n ja b:n fluoresenssi heksaaniuutetussa vesipitoisessa asetonifraktiossa peittyi täysin fluoresenssiin jonka emissiomaksimi huoneenlämmössä oli 631 nm ja Soret-viritysmaksimi oli 405 nm. Tämä fluoresenssiprofiili oli identtinen autenttisen heksaaniuutettuun vesipitoiseen asetoniin liuotetun DV-Proton kanssa [kuvio 1: (a) kontrollitoukkien heksaaniuutettu asetoniuute; emissiohuippu 674 nm:ssä on MV Pheo a:n; (b) käsiteltyjen toukkien uute; (c) autenttinen DV-Proto heksaaniuutetussa asetonissa]. Kertyneen pigmentin luonteen vahvistus saatiin vertaamalla sen absorptiospektriä 80 % asetonissa uroporfyriinioktametyyliesterin, koproporfyriinin, DV Proton ja DV Mg-Proton (Porfyrin Products, Logan, UT) vastaaviin. Kuten taulukossa V esitetään, T. ni 80 % asetoniuutteella oli huoneenlämmössä absorptiospektri joka oli identtinen autenttisen DV Proton kanssa. Eetteriin siirron jälkeen pigmentissä oli samat fluoresenssiemissio- ja Soret-viritysmaksimit 77°K:ssa (629 ja 409 nm) kuin autenttisella Protolla. Kun pigmenttiin oli lisätty Mg (kuten kuvataan julkaisussa Belanger, F.C. ja C.A. Rebeiz, J. Biol. Chem. (1982) 257:1360) sillä oli samat fluoresenssiemissio- ja viritysmaksimit eetterissä 77°K kuin autenttisella DV Mg-Protolla (taulukko V). Kaikkiaan nämä tulokset osoittivat, että T. ni-toukkien käsittely ALA:lla ja 2,2'-DP:llä johti DV Proton kertymiseen toukkiin.

ESIMERKKI IV

ALA + 2,2'-DP -käsittelyn, pigmentin kertymisen ja hyönteismyrkkyvaikutusten suhteiden määrittämiseksi ruiskutettiin T. ni-toukkia kolmannella kehitysasteella 40 mM ALA:lla + 30 mM 2,2'-DP:llä pH:ssa 3,5 ja inkuboitiin yön yli (17 h) pimeässä 28°C:ssa kuten esimerkissä III. Seu-

raavana aamuna pantiin kolmen kerranteen sarja kasvihuoneeseen 25°C:ssa 14 h valoa, 10 h pimeää -valojaksoon, toukkien kuoleman seuraamiseksi. Neljäs kerranne muodosti kontrollin (ruiskutettu pelkällä liuottimella); kontrolli ja käsitellyt kerranteet uutettiin kvantitatiivisia pigmenttimäärityksiä varten kuten esimerkissä II. Toukkien kuolema mitattiin vertaamalla päivittäin toukkien selviytymistä käsiteltyjen ja kontrollihyönteisten joukossa. Proteiini määritettiin suspensoimalla asetoniin liukenematon jäämä joka saostettiin sentrifugoimalla kudoshomogenaatti tislatussa vedessä kokolasisessa kudosmyllyssä. Kokonaisproteiini määritettiin biureettisesti pienestä annoksesta suspensiota lipidien poiston jälkeen Rebeiz, C.A:n ja P.A. Castelfrancon, Plant Physiol. (1965) 40:281 menetelmän mukaisesti. Useiden kokeiden tulokset kuvataan taulukossa VI:

TAULUKKO VI

ALA + 2,2'-DP:n vaikutus Proton biosynteesiin ja kertymiseen ja toukkakuolemien määrään T. ni:ssä

		Pigmenttimäärä 17 h pimeäinkubaation jälkeen nmol / 100 mg proteiinia								
Koe	Käsittely	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	toukka-kuolema (%)
	Kontrolli	0,1	0,3	0,8	5,5	7,8	1,4	0,5	2,9	4,2	3
A	Käsittely	85,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,4	0,1	0,6	1,7	80
	muutos	84,9	-0,3	-0,8	-5,5	-7,8	-1,0	-0,4	-2,3	-3,5	77
	Kontrolli	0,0	0,2	0,4	3,4	5,7	0,1	0,0	2,5	4,8	1
B	Käsittely	96,7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,5	0,4	1,3	4,4	75
	muutos	96,7	-0,2	-0,0	-3,4	-5,7	-0,5	0,4	-1,2	-0,4	74
	Kontrolli	0,1	0,4	1,1	12,1	29,0	0,3	0,1	2,1	4,1	13
C	Käsittely	12,8	0,3	0,3	5,1	9,5	1,9	1,3	2,0	7,4	47
	muutos	12,7	-0,1	-0,8	-7,0	-19,5	-1,6	-1,2	-0,1	-3,3	34
	Kontrolli	0,1	1,0	2,5	14,4	23,9	1,5	2,3	6,2	2,3	6
D	Käsittely	89,7	0,2	2,4	11,3	23,5	6,6	3,4	3,6	3,4	89
	muutos	89,6	-0,8	-0,1	-3,1	-0,4	5,6	1,1	3,4	1,1	83
Korrelaatio (r) pigmenttisisällön ja toukkakuoleman välillä		0,945	-0,6	-0,13	-0,36	-0,27	0,46	0,31	-0,43	-0,15	
Merkitsevyys-taso		0,1 %	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	

jossa "toukkakuolema" viittaa kuolinprosenttiin neljännen valojakson alussa, eli 3 vuorokauden päästä kasvihuoneessa, ja " muutos viittaa eroon pigmenttisisällössä ALA + 2,2'-DP-käsiteltyjen toukkien ja kontrollitoukkien välillä 17 tunnin ruiskutuksenjälkeisen pimeäinkubaatioajan jälkeen.

ALA + 2,2'-DP -käsittely tuotti suuren Protokertymän ja merkitsevän määrän toukkakuolemia. Toukkakuolemaprosentti korreloi suuresti Protokertymään (taulukko VI). Suurin osa kuolemista tapahtui ensimmäisen valojakson aikana. Minuuttien - muutaman tunnin päästä valolle altistumisesta toukat tulivat kömpelöiksi ja veltoiksi ruumiinnesteiden menetyksestä johtuen; kuolema seurasi voimakasta kuivumista.

Protokertymän paikan määrittämiseksi ALA + 2,2'-DP -käsiteltyjen toukkien, viidennellä kehitysasteella, integumentti, hemolymfa ja suoli erotettiin ja analysoitiin pigmenttisisällön suhteen kuten esimerkissä II. Proteiiniyksikköä kohden laskettuna noin 59 % kertyneestä Protosta havaittiin hemolymfasta, 35 % suolesta ja 6 % integumentista.

ESIMERKKI V

Kokeiden kuluessa huomattiin että ALA + 2,2'-DP -käsittely aiheutti jatkuvasti toukkien kuolemia pimeässä ja valossa. Sen määrittämiseksi, oliko ALA + 2,2'-DP -riippuva toukkien kuolema fotodynaaminen ilmiö, T. ni-toukkia kolmannessa vaiheessaan ruiskutettiin joko pelkällä liuottimella (kontrollit) tai 40 mM ALA + 30 mM 2,2'-DP:llä säädettynä pH 3,5:een kuten esimerkissä III. Ruiskutettujen toukkien annettiin kerätä Protoa yön yli inkuboimalla pimeässä 17 tuntia 28°C:ssa. Seuraavana aamuna jotkin toukista altistettiin 0, 3 tai 6 tunnille valoa kasvihuoneessa ennen pigmentin uuttoa kuten esimerkissä II. Samanlaiset näytteet joille tehtiin sama valokäsittely palautettiin pimeään 48, 45 ja 42 tunniksi ennen kuin kes-

kimääräinen toukkakuolema mitattiin kuten esimerkissä V. Käsittelystä riippuvan tuhon arviointi jäljelle jääneiden toukkien joukossa suoritettiin ruumiinpainon perusteella 3 päivän valojaksokäsittelyn jälkeen kasvihuoneessa. Kahden kokeen tulokset on annettu taulukossa VII:

TAULUKKO VII
Protokertymän vaikutus T. ni toukkakuolemiin ja ruumiinpainon muutoksiin pimeässä ja valossa

Koe	#	Pimeä/valo ruiskutuksen ja 17 h pimeä-inkubaation jälkeen	Protomäärä 17 h pimeäinkubaation ja 0-6 h valon jälkeen (nmol / 100 mg proteiinia	Ruiskutuksen jälkeinen toukkakuolema 17 h pimeä-inkubaation jälkeen (%)	Ruiskutuksen jälkeinen toukkakuolema koko 65 h ajan jälkeen (%)	Käsittelyn jälkeinen ruumiinpaino koko 65 h ajan jälkeen (mg)
A	1	Kontrolli, 2 14h valo + 10 h pimeä -jaksoa	0,2[a]	1	12	45,1
A	2	Käsitelty, 0 h valo + 48 h pimeä	62,0[a]	28	31	44,5
A	3	Käsitelty, 3 h valo + 45 h pimeä	0,4[b]	21	60	43,4
A	4	Käsitelty, 6 h valo + 42 h pimeä	1,1[c]	22	73	26,6
A	5	Käsitelty, 2 14 h valo + 10 h pimeä	62,0[a]	19	80	16,6
B	1	Kontrolli, 2 14 h valo + 10 h pimeä	0,2[a]	0	22	44,1
B	2	Käsitelty, 0 h valo + 48 h pimeä	40,1[a]	19	48	45,7
B	3	Käsitelty, 3 h valo + 45 h pimeä	1,2[b]	20	65	32,1

TAULUKKO VII (jatkuu)
Protokertymän vaikutus T. ni toukkakuolemiin ja ruumiinpainon muutoksiin pimeässä ja valossa

Koe	#	Pimeä/valo ruiskutuksen ja 17 h pimeä-inkubaation jälkeen	Protomäärä 17 h pimeäinkubaation ja 0-6 h valon jälkeen (nmol / 100 mg proteiinia	Ruiskutuksen jälkeinen toukkakuolema 17 h pimeä-inkubaation jälkeen (%)	koko 65 h ajan jälkeen	Käsittelyn jälkeinen ruumiinpaino koko 65 h ajan jälkeen (mg)
B	4	Käsitelty, 6 h valo + 42 h pimeä	0,6[c]	21	77	20,5
B	5	Käsitelty, 2 14 h valo + 10 h pimeä	40,1[a]	22	95	3,6
Korrelaatiokerroin					0,808[d]	-0,851[e]
merkitsevyys					5 %	1 %

[a] Protomäärä ruiskutuksen jälkeisen 17 h pimeäinkubaation jälkeen
[b] Protomäärä ruiskutuksen jälkeisen 17 h pimeäinkubaation ja 3 h valaistuksen jälkeen
[c] Protomäärä ruiskutuksen jälkeisen 17 h pimeäinkubaation ja 6 h valaistuksen jälkeen
[d] Korrelaatio toukkakuolemien ja ruiskutuksen jälkeisen valossa olon välillä. Laskettaessa korrelaatiokerrointa vähennettiin kontrollin toukkakuolemat käsiteltyjen kuolemista
[e] Korrelaatio ruiskutuksen jälkeisen valossa olon ja toukkien keskimääräisen ruumiinpainon välillä. Laskettaessa korrelaatiokerrointa vähennettiin kontrollitoukkien keskimääräinen paino käsiteltyjen toukkien painosta.

Toukkien käsittely ALA + 2,2'-DP:llä johti Proton kertymiseen. Myös merkitsevä määrä toukkien kuolemia voitiin havaita käsitellyissä toukissa 17 tunnin ruiskutuksen jälkeisen pimeäinkubaatiojakson lopussa ennen toukkien valoon joutumista (taulukko VII: A 2, B 2). Lisäannos pimeäinkubaatiota johti toukkien lisäkuolemisiin. Tätä toukkakuoleman muotoa kutsutaan tästä lähin pimeästä riippuvaksi toukkakuolemaksi. Pimeästä toukkakuolemasta selviytyneet toukat eivät kärsineet havaittavaa ruumiinpainon laskua (taulukot VII: A 1, 2; B 1, 2). Nämä tulokset osoittivat että ALA + 2,2'-DP-riippuvaa Proton kertymistä seurasi toukkien kuolema pimeässä.

Kolme tai 6 tuntia valoa toukille jotka olivat keränneet Protoa 17 tunnin ruiskutuksenjälkeisen pimeäinkubaation aikana johti kertyneen Proton tuhoutumiseen ja häviämiseen (taulukko VII: A 2-4, B 2-4). Käsiteltyjen toukkien, jotka altistettiin 3 tai 6 tunnin valojaksolle ennen takaisin pimeään panemista 45 ja 42 tunniksi, kuolleisuus ylitti pimeässä olleiden toukkien kuolleisuuden (taulukko VII: A 2-4, B 2-4). Tätä toukkakuoleman muotoa kutsutaan tässä valosta riippuvaksi toukkakuolemaksi. Tämä kuolevuuden muoto korreloi merkitsevästi valaistuksen pituuden kanssa (taulukko VII: sarake 6). Lisäksi käsitellyt toukat jotka selviytyivät valokäsittelystä lisäsivät ruumiinpainoaan merkitsevästi vähemmän verrattuna käsittelemättömiin kontrolleihin jotka ruiskutettiin pelkällä liuottimella (taulukko VII, sarake 7). Korrelaatio käsittelyn jälkeisen valoaltistuksen ja ruumiinpainon nousun estymisen välillä oli erittäin merkitsevä (taulukko VII, sarake 7).

Kaiken kaikkiaan nämä tulokset osoittivat että toukkien pimeäkuoleman lisäksi Proton kertyminen johti valosta riippuvaan tai fotodynaamiseen toukkien kuolemiseen. Lisäksi kertynyt Proto katosi valaistuksen aikana, luultavasti valossa tuhoutumisen seurauksena.

ESIMERKKI VI

ALA:n ja 2,2'-DP:n suhteellisia vaikutuksia Proton kertymiseen ja toukkien kuolemiseen kolmannen asteen T. ni:ssä, jotka käsiteltiin kuten esimerkissä III ja määritettiin kuten esimerkissä II, kuvataan taulukossa VIII: A:

TAULUKKO VIII
ALA:n ja 2,2'-DP:n synergistiset vaikutukset Proton kertymiseen ja toukkakuolemiin T. ni:ssä

Koe	#		Proto-määrä (nmol/ 100 mg proteiinia	Toukka-kuolemat 3 vrk päästä kasvi-huoneessa (%)
	1	Kontrolli	0	6
A	2	40 mM ALA	2,5	26
	3	30 mM 2,2'-DP	15,5	41
	4	40 mM ALA + 30 mM 2,2'-DP	80,4	90
	1	Kontrolli	0	2
B	2	30 mM 2,2'-DP	11	61
	3	30 mM 2,2'-DP + 10 mM ALA	75	86
	4	30 mM 2,2'-DP + 20 mM ALA	89	76
	5	30 mM 2,2'-DP + 40 mM ALA	73	92
	1	Kontrolli	0	7
C	2	15 mM 2,2'-DP	1	22
	3	15 mM 2,2'-DP + 10 mM ALA	8	42
	4	15 mM 2,2'-DP + 20 mM ALA	34	40
	5	15 mM 2,2'-DP + 40 mM ALA	27	43
	1	Kontrolli	0,2	5
D	2	40 mM ALA	1,1	7
	3	40 mM ALA + 5 mM 2,2'-DP	3,8	4
	4	40 mM ALA + 10 mM 2,2'-DP	6,7	18
	5	40 mM ALA + 20 mM 2,2'-DP	12,1	34
	6	40 mM ALA + 30 mM 2,2'-DP	15,3	71

Korrelaatio Protosisällön ja toukkakuolemien välillä	0,857
Merkitsevyys	0,1 %

Pelkkä delta-aminolevuliinihappo tuotti pienen määrän Protokertymää ja toukkien kuolemia (taulukko VIII: A 2). 2,2'-dipyridyyli ilman ALA-lisäystä oli tehokkaampaa kuin ALA aiheuttamaan Protokertymää ja toukkien kuolemia (taulukko VIII: A 2, 3); toisin sanoen lisätyn ALA:n puutteessa 2,2'-DP toimi Proton kertymisen indusoijana. Lopuksi osoitettiin ALA:n + 2,2'-DP:n synergistinen vaikutus kun molempia kemikaaleja käytettiin yhdessä käsiteltäessä T. ni-toukkia. Näissä olosuhteissa Proton kertymä (80,4 nmol) ja toukkakuolemat (90 %) ylittivät suuresti yhteenlasketun Proton kertymän (2,5 + 15,5 = 18 nmol) ja toukkakuolemien määrän (26 + 41 = 67 %) jonka aiheuttivat erilliset ALA- ja 2,2'-DP-käsittelyt (taulukko VIII: A 2-4).

ESIMERKKI VII

Sen määrittämiseksi, oliko 2,2'-DP:llä indusoivien ominaisuuksiensa (taulukko VIII: A 3) lisäksi tehostavia ominaisuuksia kuten taulukko VIII: A viittaa, sen vaikutuksia Proton kertymiseen ja toukkien kuolemaan tutkittiin eri lisätyillä ALA-määrillä. Kolmannen kehitysasteen toukkia ruiskutettiin kuten esimerkissä III ja määritettiin kuten esimerkissä II. Korkeana (30 mM) ja keskivahvana (15 mM) konsentraationa 2,2'-DP:llä oli vahvistavia ominaisuuksia sen Protoa indusoivien ominaisuuksien lisäksi. 2,2'-DP:n Protoa indusoivat ominaisuudet näkyivät Proton kertymisen kasvuna ja toukkakuolemina ilman lisättyä ALA (taulukko VIII: B 2, C 2). 2,2'-DP:n vahvistavia ominaisuuksia osoitti dramaattinen nousu Proton kertymisessä ja toukkakuolemissa ALA + 2,2'-DP -käsitellyissä toukissa, joka oli suurempaa kuin niissä jotka oli käsitelty pelkällä 2,2'-DP:llä, tuloksena ulkopuolisen ALA:n suuresti parantuneesta muuntumisesta Protoksi (taulukko VIII: B 3-5, C 3-5). Lopuksi taulukossa VIII: D kuvataan 2,2'-DP:n tehostavia ominaisuuksia suhteessa 2,2'-DP:n konsentraatioon.

Kaikkiaan edellämainitut tulokset viittaavat siihen että vaikka lisätyn ALA:n puutteessa 2,2'-DP toimi Proton kertymän indusoijana, ulkoisen ALA:n läsnäollessa se toimi myös ALAn Protoksi muuttumisen tehostajana. 2,2'-DP on siten esimerkki tetrapyrrolibiosynteesin indusoija-tehostajasta.

ESIMERKKI VIII

Delta-aminolevuliinihappo on switterioni, eli sen nettovaraus on pH:n funktio. Koska sen isoionipiste on pH:ssa 6,47 se saa positiivisen varauksen alle pH 6,47:ssä ja negatiivisen varauksen tuon pH:n yläpuolella. Koska switterionien translokaatioon biologisiin kudoksiin vaikuttaa ionin nettosähkövaraus, tutkittiin tämän parametrin vaikutusta ALA:n ja 2,2'-DP:n translokaatioon käsiteltyihin toukkiin. ALA:n ja 2,2'-DP:n translokaation määrä T. ni -toukkiin johdettiin Proton kertymisen ja toukkakuolemien määrästä.

Kolmannella kehitysasteella olevia T. ni-toukkia ruiskutettiin 30 mM 2,2'-DP + 40 mM ALA -liuoksella pH:ssa 3,5 ja 5,5 (ALA positiivisesti varautunut) ja pH:ssa 7,5 (ALA negatiivisesti varautunut) esimerkin III menetelmän mukaisesti. Kuten tavallista, kontrollit ruiskutettiin pelkällä liuottimella. 17 tunnin ruiskutuksenjälkeisen inkubaatioajan jälkeen jotkin toukista uutettiin Proton määritystä varten esimerkin II menetelmällä ja rinnakkaisnäytteet altistettiin valolle kasvihuoneessa. Toukkakuolemat määritettiin 3 vuorokauden kuluttua kasvihuoneessa. Tulokset esitetään taulukossa IX:

TAULUKKO IX
pH:n vaikutus ALA + 2,2'-DP -riippuvaan Proton kertymiseen T. ni -toukissa

Koe	#		Proto-määrä (nmol/ 100 mg proteiinia	Toukka-kuolemat 3 vrk päästä kasvi-huoneessa (%)
A	1	Kontrolli	0,1	3
	2	Käsitelty, pH 3,5	85,0	81
	3	Käsitelty, pH 5,5	73,8	85
	4	Käsitelty, pH 7,5	108,5	80
B	1	Kontrolli	0,0	1
	2	Käsitelty, pH 3,5	96,7	75
	3	Käsitelty, pH 5,5	110,4	82
	4	Käsitelty, pH 7,5	73,7	85
Korrelaatiokerroin			0,007[a]	0,540[b]
Merkitsevyys			n.s	n.s

[a] Korrelaation pH:n ja Protomäärän välillä ALA + 2,2'-DP:llä käsitellyissä toukissa
[b] Korrelaation pH:n ja toukkakuolemien välillä ALA + 2,2'-DP:llä käsitellyissä toukissa

Kuten taulukossa IX esitetään, huomattavia määriä Protoa muodostui käsitellyissä toukissa kaikilla pH-arvoilla. Toukkakuolema oli myös merkittävää kaikilla pH-arvoilla. pH-arvojen 3,5 ja 7,5 välillä ei Proton kertyminen eikä toukkakuolema vaikuttanut korreloivan pH:n kanssa. Kaikkiaan nämä tulokset viittaavat siihen että ALA + 2,2'-DP translokoituminen T. ni -toukkiin ja sitten ALA:n muuntuminen Protoksi toukissa ei ollut tiukasti riippuvaista pH:sta alueella 3,5 - 7,5.

ESIMERKKI IX

ALA + 2,2'-DP-käsiteltyjen T. ni toukkakuoleman riippuvuutta käsiteltyjen toukkien iästä tutkittiin. Ensimmäisen, toisen, kolmannen ja neljännen vaiheen T. ni-toukkia käsiteltiin 40 mM ALA + 30 mM 2,2'-DP:llä pH:ssa 3,5 kuten esimerkissä III. 17 h pimeäinkubaatiojakson jäl-

keen käsitellyt ja kontrollitoukat altistettiin valolle kasvihuoneessa. Toukkakuolemat arvioitiin 3 vuorokauden kuluttua kasvihuoneessa. Tulokset esitetään taulukossa X:

TAULUKKO X

T. ni alttiuden ALA + 2,2'-DP -käsittelylle riippuvuus käsiteltyjen toukkien kehitysasteesta

Koe	#	Aste[a]	Toukkakuolemat yli kontrollien 3 vrk kuluttua kasvihuoneessa (%)
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
Korrelaatiokerroin kehitysasteen ja toukkakuolemien välillä			-0,897
Merkitsevyystaso			0,1 %

[a] 1, 2, 3 viittaavat ensimmäiseen, toiseen ja kolmanteen asteeseen.

Taulukko X osoittaa että T. ni alttius ALA + 2,2'-DP-käsittelylle oli kääntäen verrannollinen kehitysasteeseen, nuorten ensimmäisen kehitysasteen toukkien ollessa altteimpia ja vanhempien neljännellä vaiheella ollessa kestävimpiä.

Sen määrittämiseksi, riippuiko alttius ALA + 2,2'-DP-käsittelylle kehitysvaiheesta tietyn asteen sisällä, T. ni -toukkia aikaisessa, keski- ja myöhäisessä kolmannen ja neljännen kehitysasteen osassa käsiteltiin ALA + 2,2'-DP:llä kuten yllä. Tulokset esitetään taulukossa XI:

TAULUKKO X

T. ni alttiuden ALA + 2,2'-DP -käsittelylle riippuvuus iästä tietyn kehitysasteen sisällä

Koe	#	Vaihe	Alttius	Toukkakuolemat yli kontrollien 3 vrk kuluttua kasvihuoneessa ennen normalisointia (%)	jälkeen normalisoinnin (%)
	1	Keski	1	47	52
A	2	Alku	2	60	66
	3	Loppu	3	91	100
	1	Keski	1	47	92
B	2	Alku	2	39	76
	3	Loppu	3	51	100
	1	Keski	1	21	57
C	2	Alku	2	18	49
	3	Loppu	3	27	100
	1	Keski	1	26	54
D	2	Alku	2	35	73
	3	Loppu	3	48	100
Korrelaatiokerroin kehitysvaiheen ja toukkakuolemien välillä					0,739
Merkitsevyystaso					1 %

Tulokset viittaavat siihen, että tietyllä kehitysasteella myöhempi vaihe oli alttein ja sitä seurasi aikainen ja keskivaihe. Tämä vuorostaan viittaa siihen, että mitä lähempänä toukat olivat apolyysiä (kutikulan erottumista epidermistä), sitä alttiimpia ne olivat ALA + 2,2'-DP -käsittelylle. Kunkin kehitysasteen keski-, aikainen ja loppuvaiheelle annettiin numero 1, 2 tai 3, "1":n merkitessä vähiten altista vaihetta ja "3":n merkitessä alteinta vaihetta. Tilastollisten alttiuserojen eliminoimiseksi kolmannen ja neljännen kehitysasteen välillä (katso taulukko X) kaikki prosentuaaliset kuolinmäärät kussakin kokeessa normalisoitiin samaan arvoon. Arvoksi valittiin 100 ja se kuvasi kuolinprosenttia kunkin kehitysasteen

loppuvaiheessa (taulukko XI, viimeinen sarake). Tällä tavoin oli mahdollista testata toukkakuolemien määrän ja kehitysasteen alku-, keski- ja loppuvaiheen suhdetta riippumatta kehitysasteesta. Kuten taulukossa XI esitetään, tämä suhde oli erittäin merkitsevä kehitysasteen alku- ja keskivaiheiden ollessa vähemmän alttiita ALA + 2,2'-DP-käsittelyle kuin kehitysasteen loppuvaihe. Tämä alttein vaihe vastaa aikaa jolloin toukat ovat rauhallisia ja uutta seuraavan kehitysasteen kutikulaa syntetisoidaan voimakkaasti vanhan kutikulan alla.

ESIMERKKI X

Sen määrittämiseksi oliko ALA + 2,2'-DP -riippuva Proton kertyminen ja toukkien kuolema yleisiä, kaikille hyönteistoukille yhteisiä ilmiöitä vai oliko se ominaista vain tietyille hyönteislajeille, tutkittiin eri hyönteistoukkalajien reaktiota ALA + 2,2'-DP -käsittelyyn.

Corn borer Heliothis zea (Boddie) (Lepidoptera: Noctuidae) -yhdyskuntia kasvatettiin munista jotka saatiin Dr. Gilbert Waldbauerilta, Department of Entomology, University of Illinois at Urbana-Champaign. Toukille syötettiin samaa ravintoa kuin yllä T. ni -toukille.

H. zea -toukat ruiskutettiin kuten esimerkissä III; H. zea -toukat, toisin kuin T. ni, ovat kuitenkin kannibaaleja ja niitä oli käsiteltävä toisin. Kaksikymmentäviisi 1 cm pituista toukkaa (toisen ja kolmannen kehitysasteen seos) pantiin yksittäin ravintokuution kanssa erillisiin osastoihin (3 x 5 x 1,5 cm) 25-osaiseen muovikehikkoon (Bioserve, Inc., Frenchtown, NJ 08825). Toukkien pitämiseksi omissa osastoissaan muovikehikko peitettiin lasilevyllä. Lasilevy poistettiin ennen ruiskutusta ja pantiin takaisin heti sen jälkeen. Ruiskutus tehtiin kuten kuvattiin T. ni:lle. Ruiskutetut kehikot peitettiin lasilevyllä ennen kuin ne pantiin pimeään 25°C:ssa 17 tunniksi.

Tulokset esitetään taulukossa XII:

TAULUKKO XII

ALA + 2,2'-DP -riippuvan Proton kertymisen ja toukkakuolemien riippuvuus toukkalajista

Koe	H. zea-käsittely	Protomäärä (nmol/100 mg proteiinia	H. zea-toukkakuolemat 3 vrk kuluttua kasvihuoneessa (%)
	Kontrolli	0	0
A	Käsitelty	2,5	7
	muutos	2,5	7
	Kontrolli	0	0
B	Käsitelty	1,4	33
	muutos	1,4	33

40 mM ALA + 30 mM 2,2'-DP -käsittelyt joista seurasi massiivinen Proton kertyminen ja huomattava toukkien kuoleminen T. ni:ssä (taulukot VI-IX) tuotti vain vähän Proton kertymistä H. zea:ssa. Toukkia kuoli myös vähemmän kuin T. ni:ssä (taulukko XII). Tällä hetkellä ei tiedetä johtuuko alhaisempi Proton kertyminen ja toukkakuolemamäärä ALA + 2,2'-DP -käsitellyissä H. zea:ssa verrattuna T. ni:hin (a) eroista käytettyjen kemikaalien translokaatiossa hyönteisen sisempiin kudoksiin vai (b) jostakin perustavammasta biokemiallisesta erosta porfyriini-hemi-reitin säätelyssä näiden kahden lajin välillä. ALA + 2,2'-DP -käsitellyissä T. ni:ssä suurin osa Protosta kertyi hemolymfaan. Tämä vuorostaan osoitti riittävää ALA:n ja 2,2'-DP:n translokaatiota kohdepaikkoihin. Sitä, kulkeutuvatko nämä kemikaalit yhtä hyvin H. zea:n sisäkudoksiin, ei tiedetä.

Nämä tulokset osoittavat, että jotkin toukkalajit ovat toisia alttiimpia ALA + 2,2'-DP -käsittelylle. Koska on erittäin toivottavaa tappaa vahingolliset hyönteiset ja silti säästää hyödylliset, eri hyönteislajien erilaista alttiutta porfyriinihyönteismyrkyille voidaan käyttää hyväksi suunniteltaessa lajispesifisiä porfyriinihyönteismyrkkyjä.

ESIMERKKI XI

Toisen kehitysasteen T. ni-toukat ruiskutettiin ALA + 2,2'-DP:llä ja altistettiin 17 tunnin pimeäinkubaatioajalle ennen kuin niitä pidettiin valossa kasvihuoneessa (pimeäruiskutus). Samanlaisia toukkia ruiskutettiin ALA:-lla + 2,2'-DP:llä kasvihuoneessa 14 h valoa - 10 h pimeää käsittävän valorytmin valojakson alussa (valoruiskutus). Neljän kokeen tulokset annetaan taulukossa XIII:

TAULUKKO XIII

ALA + 2,2'-DP valoruiskutusten ja pimeäruiskutusten vertailu T. ni:llä

Koe	Käsittely	toukkakuolemat 3 vrk kuluttua kasvihuoneessa (%)
	PR kontrolli	21
A	PR 20 mM ALA + 15 mM 2,2'-DP	90
	PR muutos	69
	VR kontrolli	25
B	VR 20 mM ALA + 15 mM 2,2'-DP	94
	VR muutos	69
	PR kontrolli	14
C	PR 40 mM ALA + 30 mM 2,2'-DP	93
	PR muutos	79
	VR kontrolli	5
D	VR 20 mM ALA + 15 mM 2,2'-DP	83
	VR muutos	78

jossa "PR" on pimeäruiskutus ja "VR" on valoruiskutus. Valoruiskutukset olivat yhtä tehokkaita toukkakuolemien aiheuttajia kuin pimeäruiskutukset. Nämä tulokset olivat vuorostaan hyvin samantapaisia kuin pimeä- ja valofotodynaamisissa herbisidikäsittelyissä, joita kuvataan USSN 895529:ssä.

ESIMERKKI XII

Sen määrittelemiseksi, onko kemikaaleilla jotka indusoivat tai tehostavat tetrapyrrolien ominaisuuksia kasveissa, samanlaisia ominaisuuksia hyönteisissä, tutkit-

tiin useiden tunnettujen tetrapyrrolin kertymisen tehostajien ja indusoijien vaikutusta tetrapyrrolien kertymiseen T. ni:hin. Kolmannen kehitysasteen T. ni-toukkia ruiskutettiin 40 mM ALA:lla + 30 mM 1,10-PA:lla samoin kuin kuvattiin esimerkissä III ALA + 2,2'-DP:lle. Kontrolli- ja käsitellyt toukat prosessoitiin ja analysoitiin kuten esimerkissä II. Näiden kokeiden tulokset esitetään taulukossa XIV:

TAULUKKO XIV

ALA + 1,10 -PA synergistinen vaikutus ZN-Proton kertymiseen ja toukkakuolemiin T. ni:ssä

Koe	#	Käsittely	nmol/100 mg proteiinia: Proto-määrä	Zn-Proto-määrä	toukkakuolemat 3 vrk kuluttua kasvihuoneessa (%)
A	1	Kontrolli	0,19	0	0
	2	40 mM ALA	3,18	0	16,8
	3	30 mM 1,10-PA	35,26	4,45	69,6
	4	40 mM ALA + 30 mM 1,10-PA	151,92	3,75	93
B	1	Kontrolli	0	0	6,1
	2	40 mM ALA	2,08	0	5,3
	3	30 mM 1,10-PA	18,55	1,08	74,7
	4	40 mM ALA + 30 mM 1,10-PA	227,77	6,15	93,3
Korrelaatiokerroin			0,78[a]	0,862[b]	
Merkitsevyystaso			5 %	1 %	

[a] Korrelaatio toukkakuolemien ja Protokertymän välillä
[b] Korrelaatio toukkakuolemien ja Zn-Protokertymän välillä

Kuten huomattiin 2,2'-DP:llä (taulukko VIII), 1,10-PA:ssa oli hyvin voimakkaita tetrapyrroleja indusoivia ominaisuuksia, kuten osoittaa hyvin voimakas synergismi Proton kertymisessä joka havaittiin kun ALA ja 1,10-PA käytettiin yhdessä.

Massiivisen Proton kertymisen lisäksi käsittely 1,10-PA:lla ilman ALA:a tai sen kanssa tuotti pienempiä

määriä Zn-Proton kertymistä. Korrelaatio Zn-Proton kertymisen ja toukkakuolemien välillä oli erittäin merkitsevä. Tämä vuorostaan viittasi siihen että Zn-Proton muodostuminen oli jollakin tavalla voimakkaasti yhteydessä toukkakuolemiin.

Muitakin kokeita järjestettiin sen määrittämiseksi muodostuiko Zn-Proto todellakin entsymaattisesti. Esimerkiksi 1,10-PA:n lisäys 80 % asetoniin liuotettuun Protoon ei aiheuttanut Zn-Proton kertymistä 17 tunnin inkubaation jälkeen. Toisissa kokeissa käsiteltiin eläviä ja kuolleita T. ni-toukkia 40 mM ALA:lla + 30 mM 1,10-PA:lla täsmälleen kuten kuvattiin taulukossa XIV. Kuolleet toukat tapettiin keittämällä vedessä 100°C:ssa 5 minuuttia ennen ruiskutusta. Tulokset esitetääm taulukossa XV:

TAULUKKO XV

ALA + 1,10 -PA synergistinen vaikutus ZN-Proton ja Proton kertymiseen elävissä ja kuolleissa T. ni-toukissa

Koe	#	Käsittely	nmol/100 mg proteiinia: Proto-määrä	Zn-Proto-määrä	toukkakuolemat 3 vrk kuluttua kasvihuoneessa (%)
A	1	Kontrolli	0	0	0
	2	Kuolleiden toukkien käsittely 40 mM ALA + 30 mM 1,10-PA	0	0	-
	3	Elävien toukkien käsittely 40 mM ALA + 30 mM 1,10-PA	242,7	3,25	93,4
B	1	Kontrolli	0,11	0	0
	2	Kuolleiden toukkien käsittely 40 mM ALA + 30 mM 1,10-PA	0	0	-
	3	Elävien toukkien käsittely 40 mM ALA + 30 mM 1,10-PA	251,23	4,43	100

Kuten taulukosta näkyy, vain elävät hyönteiset, joilla oli aktiivinen metabolia, kykenivät keräämään Protoa ja Zn-Protoa. Kaikkiaan nämä tulokset viittasivat voimakkaasti siihen että Proton ja Zn-Proton muodostuminen käsitellyissä hyönteisissä oli entsyymiaktiivisuuden seurausta.

ESIMERKKI XIII

Tietyissä kenttäoloissa on joskus edullista käyttää hyönteismyrkkyä syöttinä eikä ruiskutteena. Seuraavat kokeet suunniteltiin siksi demonstroimaan porfyriinihyönteismyrkkyjen tehoa syöttikäytössä.

Yhdessä kokeessa ruiskutettiin Waldbauerin ravintoainekuutioita niin että kokonaismäärä oli 1,5 ml / 10 ml kiinteää ravintoa. Kerralla ruiskutettiin kolmasosa tilavuudesta. Ruokakuutioiden annettiin kuivua ja prosessi toistettiin kaksi kertaa. Käsittelemättömiä toukkia pantiin käsitellyn ravinnon kanssa pimeään 17 tunniksi. Vaihtoehtoisesti toukat yhdessä ruokansa kanssa ruiskutettiin kuten esimerkissä III. Tulokset esitetään taulukossa XVI:

TAULUKKO XVI

ALA + 1,10-PA ravintoon lisäyksen vaikutus T. ni-toukkien kuolemaan

#	Käsittely	toukkakuolemat 8 min aikana valossa (%)	toukkakuolemat 3 vrk kuluttua kasvihuoneessa (%)
1	Kontrolli	0	2,2
2	Pelkkä ravinto ruiskutettu 40 mM ALA + 30 mM 1,10-PA	62,5	95,9
3	Ravinto ja hyönteinen ruiskutettu 40 mM ALA + 30 mM 1,10-PA	91,2	95,9

Kuten taulukossa esitetään, kemikaalien käyttö pelkästään ravinnon kautta aiheutti yhtä tehokkaasti toukkakuolemia kuin sekä hyönteisen että sen ravinnon ruiskuttaminen. Lisäksi huomattiin että suurin osa toukkakuolemista hyönteisissä jotka söivät käsiteltyä ravintoa tapahtui ensimmäisen 8 minuutin valossa olon aikana, huomattavan määrän

kuolemista tapahtuessa ensimmäisten 2 minuutin valossaolon aikana.

Toisessa kokeessa ALA ja 1,10-PA pantiin ravintoon 16 ja 12 mM. Ravinto sekoitettiin ALA:n ja 1,10-PA:n kanssa sekoittimessa 37°C:ssa 5 minuutin ajan. Toukat pantiin käsitellyn ruuan päälle 17 tunniksi pimeään ennen valolle altistusta. Tulokset esitetään taulukossa VII:

TAULUKKO XVII

ALA + 1,10-PA ravintoon lisäyksen vaikutus T. ni-toukkien kuolemaan

#	Käsittely	toukkakuolemat 8 min aikana valossa (%)	toukkakuolemat 3 vrk kuluttua kasvihuoneessa (%)
1	Kontrolli	0	4
2	16 mM ALA + 12 mM 1,10-PA sisältävä ravinto	91,9	100

Toisessa kokeessa ravinto kuumennettiin konvektiouunissa ja ALA ja 1,10-PA lisättiin kuumennettuun ravintoon 57°C:ssa. Seosta sekoitettiin sitten 45 sekuntia Sorval Omnimixerissä (Omni Co. International, CT 06706). Tulokset esitetään taulukossa XVIII:

TAULUKKO XVIII

ALA + 1,10-PA ravintoon lisäyksen vaikutus T. ni-toukkien kuolemaan

#	Käsittely	toukkakuolemat 8 min aikana valossa (%)	toukkakuolemat 3 vrk kuluttua kasvihuoneessa (%)
1	Kontrolli	0	14,5
2	16 mM ALA sisältävä ravinto	0	5,2
3	12 mM 1,10-PA sisältävä ravinto	0	40,4
2	16 mM ALA + 12mM 1,10-PA sisältävä ravinto	94,9	94,4

Kuten taulukosta VII(2) ja VIII(4) näkyy, kemikaalien lisääminen ravintoon aiheutti erinomaisen määrän toukka-

kuolemia. Huomattiin sama synergismi ALA:n ja 1,10-PA:n välillä kuin silloin kun näitä kemikaaleja käytettiin ruiskutteena (taulukko XV vs. taulukko VIII).

Vaikka nämä tulokset viittaavat siihen että porfyriinihyönteismyrkyt voivat olla tehokkaita joko ruiskutteina tai syötteinä.

ESIMERKKI XIV

Waldbauerin ravintoa kuumennettiin konvektiouunissa 57-65°C:seen ja yhdistettiin 4 mM ALA:an ja 3 mM:n eri testiyhdisteitä. Seosta sekoitettiin 2 minuuttia Sorval Omnimixerissä.

T. ni-toukkia pantiin käsitellyn ravinnon kanssa pimeään 17 tunniksi kuten yllä. Toukkakuolemat määritettiin pimeäjakson lopussa (ennen valolle altistusta) ja kolmen vuorokauden kuluttua kasvihuoneessa.

Kullekin testiyhdisteelle ajettiin kontrolli joka koostui puhtaasta (käsittelemättömästä) ravinnosta.

Tulokset esitetään taulukossa XIX:

TAULUKKO XIX
ALA:n + eri indusoijien ja/tai tehostimien vaikutus ravinnossa T. ni-toukkakuolemiin

	Kontrolli	Toukkakuolemat pimeäjakson lopussa (%)	Toukkakuolemat 3 vrk kuluttua kasvihuoneessa (%)
1,10-fenantroliini	0	0	100
4,7-dimetyyli-1,10-fenantroliini	0	0	100
4-metyyli-1,10-fenantroliini	0	0	99
5-nitro-1,10-fenantroliini	0	0	99
5-metyyli-1,10-fenantroliini	0	0	97
5,6-dimetyyli-1,10-fenantroliini	0	0	97
4,7-difenyyli-1,10-fenantroliini	0	0	97
5-kloori-1,10-fenantroliini	0	0	96
3,4,7,8-tetrametyyli-1,10-fenantroliini	0	0	85
2,2'-ditiobis(pyridiini-N-oksidi)	0	0	73
4,4'-dimetyyli-2,2'-dipyridyyli	0	0	71
fenyyli-2-pyridyyliketoksiimi	0	0	71
2,2':6',2"-terpyridiini	0	0	70
4,7-dihydroksi-1,10-fenantroliini	0	0	49
2,9-dimetyyli-4,7-difenyyli-1,10-fenantroliini	0	0	39
nifluumihappo	0	0	35
N-bentsyyli-N-nikotinoyylinikotiiniamidi	0	0	34
dimidiumbromidimonohydraatti	0	0	24
nikotiinihappo	0	0	22
etidiumbromidi	0	0	16
fenantreeni	0	0	13
etyylinikotinaatti	0	0	9

TAULUKKO XIX (jatkoa)

	Kontrolli	Toukkakuolemat pimeäjakson lopussa (%)	Toukkakuolemat 3 vrk kuluttua kasvihuoneessa (%)
3-hydroksipikoliinihappo	0	0	9
batokuproinedisulfonihappo	0	0	8
2-hydroksinikotiinihappo	0	0	8
3-hydroksi-7-metyyli-1,8-naftyridiini-3-karboksyylihappo	0	0	8
1-isokinoliinikarboksyylihappo	0	0	6
pikoliinihappo	0	0	5
2-hydroksi-6-metyylipyridiini-3-karboksyylihappo	0	0	4
N-metyylinikotiiniamidi	0	0	4
bentsyyliviologeenidikloridimonohydraatti	0	0	0
1,1-diheptyyli-4,4'-bipyridiniumdibromidi	0	0	0
4-hydroksi-7-trifluorimetyyli-3-kinoliini-karboksyylihappo	0	3	16
dietyyli-3,4-pyridiinidikarboksylaatti	0	3	11
metyylinikotinaatti	0	1	9

Uusintakokeet 4 mM:lla ALA tuottivat jatkuvasti 0 ja 5 % välillä olevia toukkakuolemia kolmen vuorokauden kuluttua kasvihuoneessa. Niinpä ylläolevat tulokset osoittavat selvästi, että 1,10-fenantroliini; 4,7-dimetyyli-1,10-fenantroliini; 4-metyyli-1,10-fenantroliini; 5-nitro-1,10-fenantroliini; 5-metyyli-1,10-fenantroliini; 5,6-dimetyyli-1,10-fenantroliini; 4,7-difenyyli-1,10-fenantroliini; 5-kloori-1,10-fenantroliini; 3,4,7,8-tetrametyyli-1,10-fenantroliini; 2,2'-ditiobis(pyridiini-N-oksidi); 4,4'-dimetyyli-2,2'-dipyridyyli; fenyyli-2-pyridyyliketoksiimi; ja 2,2':6',2"-terpyridiini toimivat ALA:n indusoijina ja/tai tehostajina ja ovat vaikuttavia valoaktiivisia insektisidejä.

ESIMERKKI XV

Syödyn ALA:a ja 1,10-fenantroliinia sisältävän hyönteismyrkyn tehoa kokeiltiin Mamestra brassicaen, tärkeän ristikukkaisten vihannesten tuholaisen, toukkiin.

Ravinto valmistettiin ruostumattomasta teräksestä valmistetussa astiassa käyttäen Kenwood keittiösekoitinta seuraavasti:

1. 1530 ml demineralisoitua vettä, 504 g jauhettua maissia (maksimihiukkaskoko 1 mm), 135 g panimohiivaa ja 135 g vehnänalkioita yhdistettiin huoneenlämmössä.

2. 5,4 g parahydroksimetyylibentsoaattia liuotettiin 12 ml:aan etanolia 90°C:ssa ja koko 12 ml lisättiin ylläolevan vaiheen (1) seokseen.

3. 1530 ml vettä yhdistettiin 72 g:aan agaria ja 6 g:aan bentsoehappoa ja seos kuumennettiin kiehuvaksi. Seoksen annettiin jäähtyä 70°C:seen ja se lisättiin ylläolevasta vaiheesta (2) syntyneeseen seokseen.

4. Ylläolevasta vaiheesta (4) syntyneen seoksen annettiin jäähtyä 40°C:seen ja siihen lisättiin 18 g askorbiinihappoa hapettumisenestoaineeksi.

5. Syntyvä seos homogenoitiin ja varastoitiin standardiravinnoksi.

Käsitelty ravinto valmisteltiin liuottamalla sopiva määrä aktiivisia aineita etanoliin ja lisäämällä 1 ml tätä liuosta 9 ml:aan demineralisoitua vettä. Kaikki syntyvä etanoli:vesiliuos (1:9 v/v) joka sisälsi asianmukaiset määrät aktiivisia aineita lisättiin ylläolevassa vaiheessa (3) syntyneeseen seokseen ennen askorbiinihappolisäystä.

M. brassicae-yhdyskuntia massakasvatettiin standardi- (käsittelemättömällä) ravinnolla. Kun toukat lähenivät kolmatta kehitysastettaan, 20 toukan ryhmiä vaihdettiin standardiruokavaliolta eri testiruokavalioille jotka sisälsivät aktiivisia aineita. Astiat käärittiin alumiinifolioon ja toukkien annettiin syödä testiruokaa ad libitum 16 tunnin pimeän jakson aikana. Sen jälkeen folio poistettiin ja toukat valaistiin keinovalolla (400 watin elohopealamppu 50 cm päästä). Kontrolleille syötettiin käsittelemätöntä ravintoa. Tulokset esitetään taulukossa XX:

TAULUKKO XX
ALA:n ja 1,10-fenantroliinin vaikutus M. brassicae-toukkiin

	Kuolleisuus-%	
	Ennen valaisua	2 minuutin valaisun jälkeen
16 mM ALA + 12 mM 1,10-fenantroliinia	0	100
2 mM ALA + 1,5 mM 1,10-fenantroliinia	0	100
Kontrolli	0	0

Valon vaikutus on dramaattinen: heti valoon jouduttuaan käsitellyt hyönteiset alkoivat kiemurrella ja kuolla. 100 % käsitellyistä hyönteisistä oli kuollut kahden minuutin sisällä. Tämä koe toistettiin kolme kertaa identtisin tuloksin.

ESIMERKKI XVI

ALA ja 6-aminonikotiiniamidia sisältävän syödyn hyönteismyrkyn vaikutusta testattiin kotituholaiseen Blatella germanica (torakka).

Standardiruokavalio sisälsi jauhettua viljaa (maissia, vehnää, riisiä ja vehnänlesettä), ruokosokeria, soijaproteiinia, munia, fenkoliuutetta, laboratoriohiirten täysravintoa ja demineralisoitua vettä.

Käsitelty ravinto valmistettiin liuottamalla sopiva määrä aktiivisia aineita etanoliin, yhdistämällä 1 osa tätä etanoliliuosta 19 osaan vettä ja lisäämällä 1 ml syntyvää liuosta 5 g:aan ravintoa. Ruoan annettiin kuivua ennen käyttöä.

B. germanica-yhdyskuntia massakasvatettiin standardi- (käsittelemättömällä) ravinnolla aikuisiksi asti. Aikaisena marraskuun iltapäivänä Marseilles:ssa, Ranskassa pantiin kymmenen täysikasvuista koirasta kuhunkin kolmesta petrimaljasta, kukin yhdessä 5 g kanssa yhtä testiravintoa. Maljojen annettiin olla työpöydällä tavallisessa huonevalossa (loisteputki ja päivänvalo) lopun päivää (noin 3,5 tuntia). Maljojen annettiin lisäksi seistä tavallisissa huoneoloissa (ympäristön valaistus ja lämpö) neljä vuorokautta tavallisten kotiolojen simuloimiseksi. Ne joutuivat luonnolliseen pimeyteen kunakin yönä noin 13 tunniksi ja ympäröivään valoon noin 11 tunniksi kunakin päivänä. Neljännelle kontrollimaljalle syötettiin standardi- (käsittelemätöntä) ravintoa. Kuolleisuusluvut laskettiin kunakin iltapäivänä. Tulokset esitetään taulukossa XXI:

TAULUKKO XXI

ALA:n ja 6-aminonikotinaatin vaikutus täysikasvuiseen B. germanicaan

Aktiivinen aine	Konsentraatio (mg/g ruokaa)	Kuolleisuus-% käsittely vrk 1	2	3	4
Kontrolli	0	0	0	0	0
ALA	1	0	0	0	0
6-aminonikotinaatti	1	0	0	0	0
ALA + 6-aminonikotinaatti	1 + 1	50	70	90	100

Nämä tulokset osoittavat selvästi että 6-aminonikotinaatti on tehokas ALA:n indusoija ja/tai tehostin ja että tämän keksinnön hyönteismyrkkyvalmisteet voivat olla tehokkaita hyönteisiä vastaan tavallisissa sisätiloissa ympäristön valo- ja pimeäoloissa.

Hyönteistoukkien kemiallinen induktio keräämään Protoa ja Zn-Protoa jotka saavat aikaan toukkien kuolemista pimeässä ja valossa tarjoaa uusia hyönteismyrkkyvalmisteita ja -menetelmiä. Ehdotamme termiä "porfyriinipohjainen hyönteismyrkky" tälle ilmiölle. Kertynyt Proto ja Zn-Proto katoavat valossa hyönteisen kudoksista muutamissa tunneissa. Tämä lähestymistapa on samantapainen kuin fotodynaamisissa herbisideissä jotka esitetään USSN 895529:ssä. Mainituilla herbisideillä käsiteltyihin kasveihin aiheutui kuitenkin tuhoa vain päivänvalossa ja se oli luonteeltaan täysin fotodynaamista. Lisäksi eniten vahingoittavia tetrapyrroleja olivat Mg-tetrapyrrolit jotka kuuluivat Chl biosynteettiseen polkuun.

Uskotaan että Chl-biosynteesiin johtava tetrapyrrolin biosynteettisen polun Mg-haara ei toimi hyönteisissä. Tämän seurauksena Chl-biosynteettisen polun Mg-sisältäviä välituotteita ei voida havaita ALA:lla tai ALA + 2,2'-DP:llä käsitellyissä T. ni:ssä. Siksi klorofyllipigmentit jotka aiheuttavat toukille niiden kellanvihreän värin ovat luultavimmin peräisin ravinnon klorofyllipigmenteistä

(taulukot II, III, IV). Kaikki hyönteiset sisältävät kuitenkin sytokromeja jotka toimivat elektroninsiirtäjinä oksidatiivisessa fosforylaatiossa. Tällä hetkellä uskotaan, että sytokromien hemiosa muodostuu Protosta joka vuorostaan syntetisoituu ALA:sta porfyriinibiosynteettisen polun kautta [vuokaavio A yllä]. Proton ja Zn-Proton ALA-riippuva kertyminen T. ni:hin sopii täysin tähän hypoteesiin.

Toisin kuin kasveilla havaittiin, Proton kertyminen T. ni:hin aiheuttaa toukkien kuolemista pimeässä (taulukko VII). Valossa ei Proton massiivinen kertyminen kuitenkaan näytä olevan välttämätöntä fotodynaamisen vahingon aiheuttamiseksi (taulukot VII, XIII). Tämä johtopäätös perustuu kahteen havaintoon: (a) Valossa massiivista Proton kertymistä ei havaita, luultavasti sen seurauksena että biosynteetisoitua Protoa hajoaa valossa tasaiseen tahtiin (taulukko VII) ja (b) valoruiskutukset (joihin ei kuulu ruiskutuksenjälkeistä pimeäinkubaatiojaksoa jona Protoa voisi kertyä) olivat yhtä tehokkaita toukkakuolemien aiheuttajia kuin pimeäruiskutukset joihin ei kuulunut sellaista ruiskutuksenjälkeistä inkubaatioaikaa ennen päivänvalolle altistusta (taulukko XIII). Kaikkiaan nämä tulokset viittaavat siihen, että se mitä tarvitaan fotodynaamisen tuhon esiintymiseen käsitellyissä hyönteisissä on tasainen pienien juuri riittävien Protomäärien kertyminen aiheuttamaan tuhoisia vapaaradikaaliketjureaktioita.

Yksi suurimmista insektisiditeollisuuden kohtaamista ongelmista on hälyttävä vauhti jolla hyönteiset kehittävät resistenssiä hyönteismyrkkyjä vastaan. Tämä on yleensä seurausta mutaatioista jotka voivat tehostaa hyönteisten myrkynpoistomekanismeja tai muutta toksiinin lipofiilisiä ominaisuuksia vähentäen membraanien läpäisevyyttä. Tämä vuorostaan lyhentää merkitsevästi uusien hyönteismyrkkyjen käyttöikää ja vähentää niiden taloudellista arvoa. Uskotaan, että koska tämän keksinnön mukainen por-

fyriini-hemi-reitin kemiallinen muuntaminen näyttää sisältävän useampia kuin yhden metabolisen vaiheen, voi olla hyönteisille vaikeampaa kehittää resistenssiä porfyriinipohjaisille hyönteismyrkyille. Vaikka jotkin hyönteiset onnistuvatkin kehittämään vastustuskykyä tetrapyrrolin kertymistä vastaan kehittämällä keinoja nopeasti tuhota kertyneet tetrapyrrolit, tämä ei luultavasti suojele hyönteisiä fotodynaamiselta tuholta valossa. Kuten taulukot VII ja XIII osoittavat, valossa Proto luultavimmin tuhoutuu melkein yhtä nopeasti kuin sitä muodostuukin; kuitenkin tämä minimaalinen kertyminen riittää aiheuttamaan suurta fotodynaamista tuhoa toukille. Lisäksi mutaatio joka estäisi Proton ja sytokromin synteesin kokonaan olisi luultavimmin tappava.

Lisäesimerkit valmisteista ja käyttökohteista tämän keksinnön hengen ja alan puitteissa ovat ilmeisiä tätä alaa taitaville pitäen mielessä edellä mainitun, ja sen seurauksena sille pitäisi asettaa vain niitä rajoituksia jotka mainitaan seuraavissa patenttivaatimuksissa.

Patenttivaatimukset

1. Hyönteismyrkkyvalmiste, t u n n e t t u siitä, että se sisältää vaikuttavan määrän yhtä tai useampaa yhdistettä jotka sisältävät delta-aminolevuliinihappoa, delta-aminolevuliinihapon indusoijia tai delta-aminolevuliinihapon tetrapyrroleiksi muuttumisen tehostimia.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen valmiste, t u n n e t t u siitä, että se sisältää delta-aminolevuliinihappoa.

3. Patenttivaatimuksen 2 mukainen valmiste, t u n n e t t u siitä, että se sisältää yhtä tai useampaa delta-aminolevuliinihapon indusoijaa.

4. Patenttivaatimuksen 1,2, tai 3 mukainen valmiste, t u n n e t t u siitä, että se sisältää yhtä tai useampaa delta-aminolevuliinihapon tetrapyrroleiksi muuttumisen tehostinta.

5. Minkä tahansa edellisen patenttivaatimuksen mukainen yhdiste, t u n n e t t u siitä, että siinä mainittujen yhdisteiden määrä riittää tuottamaan 0,5 - 1 kg delta-aminolevuliinihappoa hehtaarille ja/tai noin 0,2 - 3,0 kg indusoijaa tai tehostinta hehtaarille.

6. Minkä tahansa edellisen patenttivaatimuksen mukainen yhdiste, t u n n e t t u siitä, että se sisältää yhtä tai useampaa seuraavista: kantajia, liuottimia, puskureita, kostutusaineita, dispergointiaineita, vaahtoamisenestoaineita, emetiinejä, hajuaineita, läpäisyaineita, pinta-aktiivisia aineita, emulgointiaineita, herbisidejä ja yhtä tai useampaa muuta insektisidiä.

7. Patenttivaatimuksen 6 mukainen yhdiste, t u n n e t t u siitä, että mainitut yhdisteet ovat liuoksessa jonka konsentraatio on suunnilleen 2 - 50 mM delta-aminolevuliinihappoa ja/tai suunnilleen 0,1 - 50 mM indusoijaa tai tehostinta.

8. Patenttivaatimuksen 6 mukainen yhdiste, t u n n e t t u siitä, että mainitut yhdisteet sisältyvät valmisteeseen jota hyönteiset syövät ja mainittujen yhdisteiden määrä on riittävä tuottamaan suunnilleen 10 ng - 5 ng delta-aminolevuliinihappoa hyönteisen ruumiinpainon mg:aa kohden ja/tai suunnilleen 1 ng - 5 mikrogrammaa indusoijaa tai tehostinta hyönteisen ruumiinpainon ng:aa kohden.

9. Minkä tahansa edellisen patenttivaatimuksen mukainen yhdiste, t u n n e t t u siitä, että se sisältää yhtä tai useampaa seuraavista delta-aminolevuliinihappoa sisältävistä yhdisteistä: 2,2'-dipyridyyli; 1,10-4-metyyli-1,10-fenantroliini; 5-nitro-1,10-fenantroliini; 5-metyyli-1,10-fenantroliini; 5,6-dimetyyli-1,10-fenantroliini; 4,7-difenyyli-1,10-fenantroliini; 5-kloori-1,10-fenantroliini; 3,4,7,8-tetrametyyli-1,10-fenantroliini; 2,2'-ditiobis(pyridiini-N-oksidi); 4,4'-dimetyyli-2,2'-dipyridyyli; fenyyli-2-pyridyyliketoksiimi; ja 2,2':6',2'-terpyridiini.

10. Menetelmä hyönteismyrkkyvalmisteen tuottamiseksi, tunnettu siitä, että siinä muodostetaan mainittu valmiste sisältämään insektisidisesti vaikuttava määrä yhtä tai useampaa yhdistettä, jotka sisältävät delta-aminolevuliinihappoa, delta-aminolevuliinihapon indusoijia tai delta-aminolevuliinihapon tetrapyrroleiksi muuttumisen tehostimia.

11. Patenttivaatimuksen 10 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että se käsittää delta-aminolevuliinihapon käytön.

12. Patenttivaatimuksen 10 tai 11 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että se käsittää yhden tai useamman delta-aminolevuliinihapon indusoijan käytön.

13. Patenttivaatimuksen 10, 11 tai 12 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että se käsittää yhden

tai useamman delta-aminolevuliinin tetrapyrroleiksi muuttumisen tehostimen käytön.

14. Minkä tahansa edellisen patenttivaatimuksen 10 - 13 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että siinä mainittujen yhdisteiden määrä riittää tuottamaan 0,5 - 1 kg delta-aminolevuliinihappoa hehtaarille ja/tai noin 0,2 - 3,0 kg indusoijaa tai tehostinta hehtaarille.

15. Minkä tahansa edellisen patenttivaatimuksen 10 - 14 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että se sisältää yhtä tai useampaa seuraavista: kantajia, liuottimia, puskureita, kostutusaineita, dispergointiaineita, vaahtoamisenestoaineita, emetiinejä, hajuaineita, läpäisyaineita, pinta-aktiivisia aineita, emulgointiaineita, herbisidejä ja yhtä tai useampaa muuta insektisidiä.

16. Patenttivaatimuksen 15 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että mainitut yhdisteet ovat liuoksessa jonka konsentraatio on suunnilleen 2 - 50 mM delta-aminolevuliinihappoa ja/tai suunnilleen 0,1 - 50 mM indusoijaa tai tehostinta.

17. Patenttivaatimuksen 15 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että mainitut yhdisteet sisältyvät valmisteeseen jota hyönteiset syövät ja mainittujen yhdisteiden määrä on riittävä tuottamaan suunnilleen 10 ng - 5 ng delta-aminolevuliinihappoa hyönteisen ruumiinpainon mg:aa kohden ja/tai suunnilleen 1 ng - 5 mikrogrammaa indusoijaa tai tehostinta hyönteisen ruumiinpainon ng:aa kohden.

18. Menetelmä tetrapyrrolien kertymisen indusoimiseksi elävissä hyönteisissä, t u n n e t t u siitä, että siinä saatetaan mainitut hyönteiset kosketuksiin minkä tahansa patenttivaatimuksen 1 - 9 mukaisen valmisteen kanssa.

19. Menetelmä hyönteisten tappamiseksi, t u n n e t t u siitä, että siinä saatetaan mainitut

hyönteiset kosketuksiin minkä tahansa patenttivaatimuksen 1 - 9 mukaisen valmisteen kanssa.

20. Patenttivaatimuksen 19 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että mainitut käsitellyt hyönteiset pidetään pimeässä noin 1 - 8 tuntia ja saatetaan sitten valoon.

21. Patenttivaatimuksen 20 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että mainittu valo on luonnollista päivänvaloa.

22. Patenttivaatimuksen 19 tai 20 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että mainittu valolle altistuminen kestää suunnilleen 1 - 14 vuorokautta.

23. Patenttivaatimuksen 10, 18 tai 19 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että siinä käytetään yhtä tai useampaa yhdistettä joka sisältää delta-aminolevuliinihappoa; 2,2'-dipyridyyliä; 1,10-fenantroliinia; 4,7-difenyyli-1,10-fenantroliinia; 4-metyyli-1,0-fenantroliinia; 5-nitro-1,10-fenantroliinia; 5-metyyli-1,10-fenantroliinia; 5,6-dimetyyli-1,10-fenantroliinia; 4,7-difenyyli-1,10-fenantroliinia; 5-kloori-1,10-fenantroliinia; 3,4,7,8-tetrametyyli-1,10-fenantroliinia; 2,2'-ditiobis-(pyridiini N-oksidi)a; 4,4-dimetyyli-2,2'-dipyridyyliä; fenyyli-2-pyridyyliketoksiimia; ja 2,2':6',2"-terpyridiiniä.

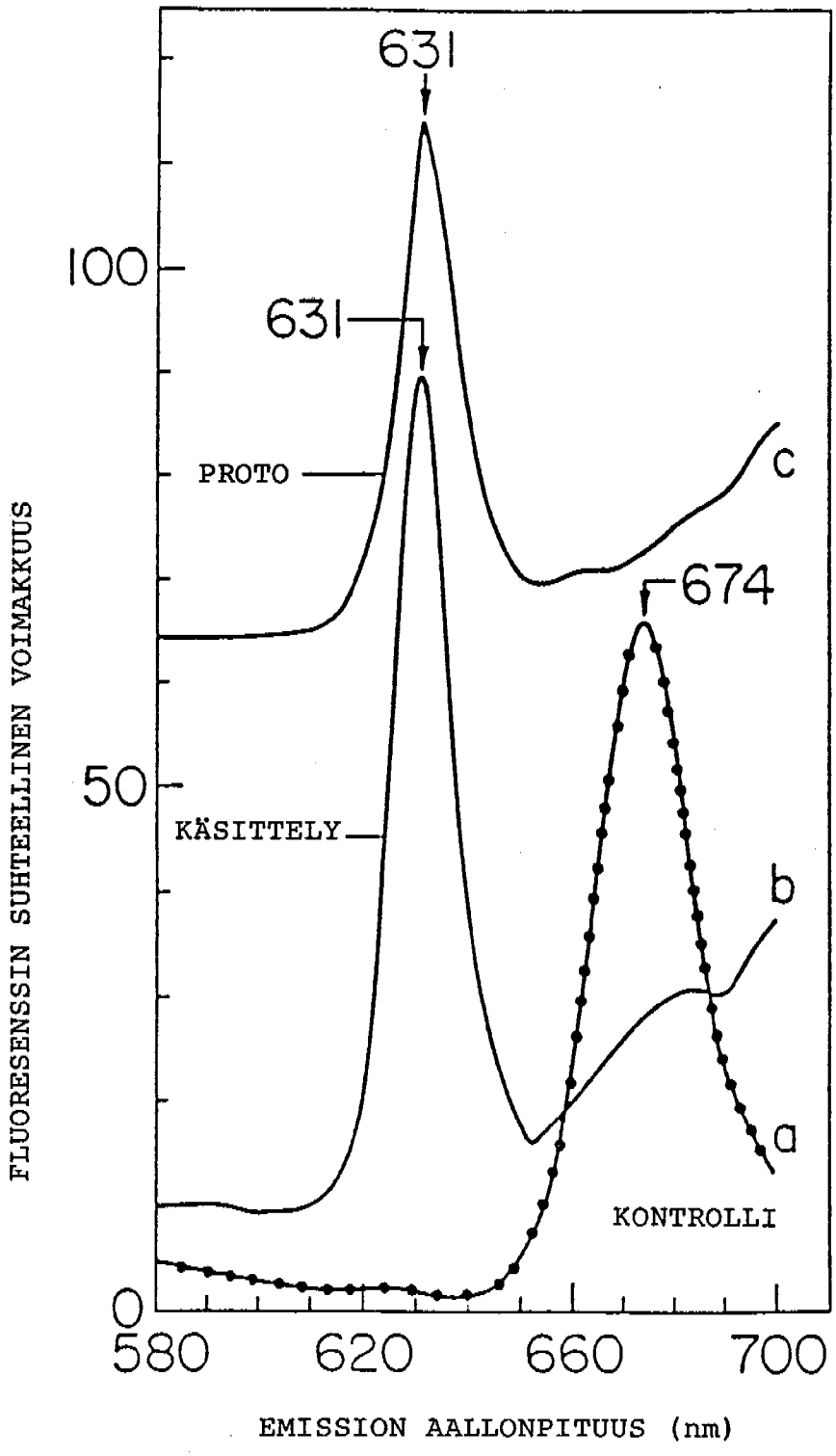

631
100
631
PROTO
c
674
50
KÄSITTELY
b
a
KONTROLLI
0
580
620
660
700
FLUORESENSSIN SUHTEELLINEN VOIMAKKUUS
EMISSION AALLONPITUUS (nm)

FIG. 1