

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(11) 034908

(13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента  
2020.04.06

(51) Int. Cl. A01N 43/80 (2006.01)  
A01P 15/00 (2006.01)

(21) Номер заявки  
201891595

(22) Дата подачи заявки  
2017.01.12

---

(54) ПРИМЕНЕНИЕ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ ДЛЯ БОРЬБЫ С ВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИЕЙ РАСТЕНИЙ

---

(31) 16290009.6

(56) WO-A1-2013011010  
EP-A1-2902387

(32) 2016.01.13

(33) EP

(43) 2019.01.31

(86) PCT/EP2017/050584

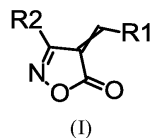
(87) WO 2017/121810 2017.07.20

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:  
БАЙЕР КРОПСАЙЕНС  
АКЦИЕНГЕЗЕЛЬШАФТ (DE)

(72) Изобретатель:  
Бальтц Рахель, Бернье Давид (FR),  
Же-Бриуд Флоранс (CH), Кноблех  
Томас, Витель Максим (FR), Вуанне  
Оливье (CH)

(74) Представитель:  
Веселицкая И.А., Веселицкий М.Б.,  
Кузенкова Н.В., Каксис Р.А., Белоусов  
Ю.В., Куликов А.В., Кузнецова Е.В.,  
Соколов Р.А., Кузнецова Т.В. (RU)

(57) Изобретение касается применения определенных активных веществ формулы (I), отдельно или в комбинации, для борьбы с вирусными инфекциями растений и способа применения вышеупомянутых определенных активных веществ для борьбы с вышеупомянутыми вирусными инфекциями в области защиты растений и защиты материалов.



034908

B1

034908

B1

### Область изобретения

Настоящее изобретение касается применения активных веществ для стимулирования природного защитного механизма растений от вирусов с целью борьбы с вирусными инфекциями растений и способов борьбы с вирусными инфекциями растений. Настоящее изобретение также касается применения активных веществ для активизации основанного на РНК-интерференции природного защитного механизма (также указываемого авторами как основанный на РНК-сайленсинге природный защитный механизм) растений от вирусов.

### Уровень техники

Вирусы растений являются причиной огромных потерь урожая во всем мире. Действительно, некоторые семейства вирусов, такие как Potyviridae, вызывают критичные потери урожая как в развитых, так и в развивающихся странах, на фоне непрерывно растущих потребностей в продовольствии. Для ограничения инфицирования и распространения вирусов меры по защите от болезней главным образом принимаются путем профилактики, поскольку лечебные мероприятия являются неэффективными или малоэффективными.

Было распознано несколько соединений для борьбы с вирусами растений.

В документе WO 2011/030816 предлагается применение определенных производных аскорбиновой кислоты для борьбы с определенными вирусами растений.

В документе WO 2012/016048 предлагается применение модифицированных азидами биомолекул в качестве противовирусных агентов, включая борьбу с вирусами растений.

В документе WO 2014/050894 предлагается применение других связанных с аскорбиновой кислотой соединений для борьбы с вирусами растений.

В процессе эволюции растения научились справляться с угрозами, используя свои имеющиеся в наличии ресурсы и распределяя их между ростом и защитой от биотических и абиотических угроз. РНК-сайленсинг играет главную роль в этом балансе путем динамического связывания программ развития и реакций на воздействие окружающей среды с изменениями в экспрессии генов через транскрипционный сайленсинг генов (TGS) и посттранскрипционный сайленсинг генов (PTGS). Устойчивость растений к болезням обусловлена предварительно сформированными барьерами, токсичными вторичными метаболитами и индуцируемыми защитными механизмами. После распознавания патогена растения часто проявляют гиперчувствительную реакцию, которая приводит к гибели клеток в месте заражения и предотвращает распространение патогена. Кроме того, выявление патогена запускает различные индуцируемые системные способы защиты в частях растений, отдаленных от места первичного заражения. Этот процесс, известный как системное приобретенное сопротивление (SAR), эффективен во многих видах растений. Достигнутая устойчивость является долговременной и эффективной против дальнейших инфекций со стороны широкого круга патогенов, таких, как грибы, бактерии и вирусы.

Стробилуриновый класс фунгицидов включает различные синтетические защищающие растения соединения с широким спектром. В 2002 г. стробилурин пираклостробин продемонстрировал способность к повышению устойчивости табака к инфицированию вирусом табачной мозаики (TMV) или патогеном *Pseudomonas syringae pv tabaci* (Herns et al., *Plant Physiology* 2002, 130: 120-127). Пираклостробин также был способен повышать устойчивость к TMV в NahG трансгенных растениях табака, не способных к накоплению значительного количества эндогенной салициловой кислоты. Пираклостробин повышает устойчивость табака к TMV либо путем действия после салициловой кислоты (SA) в SA-механизме сигнализации, либо путем функционирования независимо от SA. Последнее предположение более вероятно, поскольку в инфильтрированных листьях пираклостробин не вызывал накопления SA-индуцируемых связанных с патогенезом (PR)-1 белков, которые часто используются в качестве традиционных молекулярных маркеров для SA-индуцированной устойчивости к болезням. Описывается применение стробилуринов по отдельности (документ WO 01/82701) или в смеси с метирамом (документ WO 2007/104669).

Среди защитных реакций растений на фитовирусы путь противовирусного РНК-сайленсинга является наиболее широкой системой защиты, воздействующей как на локальное, так и на системное накопление широкого круга вирусов. РНК-сайленсинг представляет собой механизм, прямо защищающий клетки-хозяева растений от экзогенных нуклеиновых кислот, включая вирусы и перемещающиеся элементы. Эта защита запускается двухцепочечной РНК (дцРНК), которая происходит от амплификации инвазивных нуклеиновых кислот, которые обрабатываются клеткой-хозяином в малые интерферирующие РНК (миРНК), состоящие из 20-24 нуклеотидов (nt). Эти миРНК затем используют для направления сайленсинга РНК или ДНК вирусного или перемещающегося элемента через PTGS или TGS соответственно.

РНК-сайленсинг в таком случае становится эффективным противовирусным механизмом, при котором малые интерферирующие миРНК, обработанные дэйсер ферментом из посредников репликации вирусной двухцепочечной РНК, загружают в эффекторные белки ARGONAUTE и возвращают на геном РНК вредителя для вызывания его деградации. Эта врожденная иммунная реакция является чрезвычайно изменчивой, поскольку, будучи исключительно запрограммированной обусловленными структурой и нуклеотидной последовательностью геномными особенностями, она может отвечать фактически на любой вирус растений (Shimura et al., 2011, *Biochimica et Biophysica Acta* 1809: 601-612).

В подтверждение важности РНК-сайленсинга для защиты растений растения с нарушенной выработкой или активностью мРНК являются гиперовосприимчивыми к фитовирусам и наоборот, у многих вирусов развились супрессоры РНК с целью сохранения вирулентности (Voinnet O. et al., Nature Review Microbiology 2013 Nov; 11(11): 745-60).

В заключение, хотя некоторые соединения ранее были распознаны в качестве потенциальных индукторов определенных механизмов защиты растений от вирусов, сохраняется потребность в обеспечении активных веществ, подходящих для стимуляции природных механизмов защиты растений от вирусов, в частности для стимуляции широкого, основанного на неспецифическом РНК-сайленсинге механизма защиты растений от вирусов для борьбы с вирусными болезнями растений.

#### Фигуры

Фиг. 1 показывает проводимый при помощи количественной ПЦР анализ относительного уровня SUL мРНК в растениях SUC-SUL через семь дней после обработки только DMSO или обработки изоксазолоном, нормализованного по EXP10. "Усы" представляют стандартное отклонение для трех независимых экспериментов.

Фиг. 2 представляет среднее количество очагов инфекции через пять дней после инфицирования на инокулированных листьях. "Усы" представляют стандартное отклонение для двенадцати растений.

Фиг. 3 поясняет осуществляемые путем количественной ПЦР с обратной транскрипцией анализы накопления мРНК HcPro в системных тканях через шесть дней после инфицирования. "Усы" представляют стандартное отклонение для трех независимых результатов ПЦР.

#### Определения

Термин "(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)алкил" в контексте данного описания касается разветвленной или линейной алкильной группы, содержащей от 1 до 6 атомов углерода. Типичными примерами (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)алкила могут быть метил, этил, н-пропил, i-пропил и различные изомеры бутила, пентила или гексила.

Термин "галоген" в контексте данного описания касается атома фтора, хлора, йода или брома.

Термин "(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)алкокси" в контексте данного описания касается радикала -O-(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)алкила, где термин "(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)алкил" является таким, как определено выше. Типичными примерами C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>алкокси могут быть метокси, этокси, н-пропилокси, изопропилокси и различные изомеры бутилокси, пентилокси или гексилокси.

Термин "(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)алкилтио" в контексте данного описания касается радикала -S-(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)алкила, где термин "(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)алкил" является таким, как определено выше. Типичными примерами (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)алкилтио могут быть метилтио, этилтио, пропилилокси и бутилтио. "(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)алкилтио" в контексте данного описания также называется "(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)алкилсульфанил" (например, метилсульфанил касается радикала Me-S-).

Термин "(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)алкокси(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)алкил" в контексте данного описания касается радикала -(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)алкил-O-(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)алкила, где термины "(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)алкил" являются такими, как определено выше.

Термин "(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)алкилтио(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)алкил" в контексте данного описания касается радикала -(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)алкил-S-(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)алкила, где термины "(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)алкил" являются такими, как определено выше. "(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)алкилтио(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)алкил" в контексте данного описания также называется "(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)алкилсульфанил(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)алкил" (например, метилсульфанилметил касается радикала Me-S-CH<sub>2</sub>-).

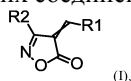
Выражение "может быть замещенным" в контексте данного описания (например, фенил, который может быть замещенным) означает, что замещение является необязательным и, таким образом, включает как незамещенные, так и замещенные атомы или группы (например, незамещенный и замещенный фенил). Когда атом или группа являются замещенными, любой водород на указанном атоме или группе может быть заменен на заместитель (вплоть до того, что каждый водород может быть заменен на заместитель), при условии, что нормальная валентность указанного атома или группы не превышена и в результате замещения образуется устойчивое соединение.

Термин "активное вещество" в контексте данного описания означает соединение формулы (I), как описывается авторами, или любые его смеси.

#### Подробное описание изобретения

Было обнаружено, что соединения формулы (I), описываемые авторами, являются подходящими для стимуляции природного механизма защиты растений от вирусов, в частности для стимуляции основанного на РНК-сайленсинге механизма защиты растений от вирусов. Таким образом, соединения формулы (I), описываемые авторами, могут быть подходящими для борьбы с вирусными болезнями растений. Термин "борьба" в контексте данного описания означает профилактику или лечение.

Соответственно настоящее изобретение касается способа борьбы с вирусными болезнями растений, более конкретно - способа стимуляции природного механизма защиты растений от вирусов, в частности, стимуляции основанного на РНК-сайленсинге механизма защиты растений от вирусов. Способ включает применение для растений одного или нескольких соединений формулы (I):



(I).

где R1 представляет собой тиенил (предпочтительно тиен-2-ил) или фенил, где вышеупомянутые тиенил или фенил могут быть замещены одним или несколькими заместителями, независимо друг от

друга выбранными из группы, к которой относятся галоген, (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)алкил, (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)алкилтио, ((C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)алкокси)(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)алкил, ((C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)алкилтио)(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)алкил и фенил; и

R2 представляет собой фенил, который может быть замещен одним или несколькими заместителями, независимо друг от друга выбранными из группы, к которой относятся галоген, (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)алкил и (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)алкокси.

В некоторых вариантах осуществления активным веществом является соединение формулы (I), в котором

R1 представляет собой тиенил (предпочтительно тиен-2-ил) или фенил, где вышеупомянутые тиенил или фенил могут быть замещены одним, двумя или тремя заместителями, независимо друг от друга выбранными из группы, к которой относятся бром, хлор, метил, этил, метилтио, (метилтио)метил, фенил и метоксиметил; и/или

R2 представляет собой фенил, который может быть замещен одним или двумя заместителями, независимо друг от друга выбранными из группы, к которой относятся хлор, фтор, метил и метокси.

В некоторых предпочтительных вариантах осуществления активным веществом является соединение формулы (I), в котором

R1 выбран из группы, к которой относятся 2-тиенил, фенил, 3-метил-2-тиенил, 5-метил-2-тиенил, 2-метилфенил, 4-метилфенил, 4-фенил-2-тиенил, 5-фенил-2-тиенил, 4-бromo-2-тиенил, 5-бromo-2-тиенил, 5-хлоро-2-тиенил, 4-бromo-5-метил-2-тиенил, 4-бromo-5-этил-2-тиенил, 3-(метилсульфанил)-2-тиенил, 4-бromo-5-[(метилсульфанил)метил]-2-тиенил, 3-(метоксиметил)-2-тиенил, 2,6-диметилфенил, 2,4,5-триметилфенил, 2,4,6-триметилфенил и 2,6-дихлорофенил; и/или

R2 выбран из группы, к которой относятся фенил, 2-хлорофенил, 2-фторофенил, 3-хлорофенил, 4-фторофенил, 2,3-дихлорофенил, 2,4-дихлорофенил, 2,5-дихлорофенил, 3,4-дихлорофенил, 2-хлоро-5-фторофенил, 2-метилфенил, 4-метилфенил, 2-метоксифенил, 3-метоксифенил и 4-метоксифенил.

В некоторых вариантах осуществления активным веществом является соединение формулы (I), в котором R1 и R2 выбраны таким образом, чтобы обеспечивать конкретные соединения, раскрываемые авторами ниже в табл. 1.

Соединения формулы (I) могут быть соответственно получены, как описывается в документе WO 2011/161035 (Bayer CropScience AG).

Эффективное количество активного вещества, как правило, наносят на растения. Эффективное количество активного вещества, которое наносят на растения, зависит от разных факторов, таких как характер активного вещества, рецептура, растения, подвергаемые лечению (природа растений и части растений), способ применения, цель лечения (профилактическое или терапевтическое) и вирус, против которого направлено лечение. Количество, наносимое на растение, может соответственно составлять от 0,01 до 5 кг/га или от 0,1 до 3 кг/га или от 0,5 до 2 кг/га.

Как указано выше, активное вещество наносят на растения. Термин "растения" в контексте данного описания охватывает растения и их части, такие как надземные и/или подземные части растений, а также собранный материал. К подземным частям растений относятся корни, корневища, клубни, боковые побеги, отводки и семена. К надземным частям растений относятся стебли, кора, побеги, листья, цветы, плоды, плодовые тела, цветоножки, хвоя и ветви. Таким образом, активное вещество может эффективно наноситься на корни, корневища, клубни, боковые побеги, отводки, семена, стебли, кора, побеги, листья, цветы, плоды, плодовые тела, цветоножки, хвою, ветви и собранный материал растений. В альтернативных вариантах осуществления способ борьбы с вирусными болезнями растений включает применение описываемого активного вещества в месте произрастания и/или хранения растения.

Активное вещество может эффективно применяться для самых различных растений. Его применяют для сортов растений, выращиваемых или применяемых в коммерческих масштабах. Однако под сортами растений также понимают растения с новыми свойствами, которые выращивались путем традиционной селекции, путем мутагенеза или при помощи технологий рекомбинантных ДНК, и/или растения, полученные с применением традиционных способов селекции и оптимизации или других способов биотехнологии и генной инженерии, или с применением комбинаций этих способов; к ним относятся трансгенные растения и растения, которые могут или не могут быть защищены Правами растениеводов-селекционеров.

Активное вещество также может эффективно применяться для генетически модифицированных организмов (ГМО). Генетически модифицированными растениями являются растения, в которых гетерологичный ген был устойчиво интегрирован в геном. Выражение "гетерологичный ген" по сути означает ген, который был обеспечен или собран за пределами растений и при введении в ядерный, хлоропластный или митохондриальный геном придает новые или улучшенные агрономические или другие свойства трансформированному растению путем экспрессии нужного белка или полипептида или путем понижающей регуляции или сайленсинга другого гена, присутствующего в растении, или других генов, присутствующих в растении (с применением, например, антисмысловой технологии, технологии ко-супрессии или технологии РНКи [РНК-интерференции]). Гетерологичный ген, расположенный в геноме, также называется трансгеном. Трансген, определяемый его конкретным положением в геноме растения, называется событием трансформации или трансгенным объектом.

Все растения, имеющие генетический материал, придающий этим растениям особенно предпочтительные полезные свойства (приобретаемые путем селекции и/или вследствие применения биотехнологий), могут обрабатываться с применением описываемого способа.

Растениями и сортами растений, которые подобным образом поддаются обработке в соответствии с изобретением, являются растения, устойчивые одному или нескольким абиотическим стрессовым факторам. К абиотическим стрессовым условиям относятся, например, засуха, холодные или жаркие условия, осмотический стресс, заболачивание, повышенная засоленность почвы, повышенное воздействие минералов, озонные условия, условия повышенной освещенности, ограниченный доступ к азотным удобрениям, ограниченный доступ к фосфорным удобрениям или лишение тени.

Растениями и сортами растений, которые подобным образом могут подвергаться обработке в соответствии с изобретением, являются растения, характеризующиеся повышенной урожайностью. Повышенная урожайность этих пальмовых растений может быть результатом, например, улучшенной физиологии растений, улучшенного роста растений и улучшенного развития растений, например эффективности использования воды, эффективности удержания воды, улучшенного использования азота, улучшенной ассимиляции углерода, улучшенного фотосинтеза, повышенной эффективности прорастания и модифицированного созревания. Кроме того, на урожай может влиять улучшенная архитектура растений (в стрессовых и нестрессовых условиях), которая включает раннее цветение, контроль над цветением для производства гибридных семян, жизнеспособность всходов, размер растений, количество междоузлий и расстояние между ними, рост корней, размер семян, размер плодов, размер стручков, количество стручков или колосьев, количество семян на стручок или колос, масса семян, повышенный налив зерна, уменьшенный разброс семян, уменьшенное растрескивание стручков и устойчивость к полеганию. К другим свойствам урожая относятся состав семян, например содержание углеводов, содержание белка, содержание и состав масла, питательная ценность, снижение антипитательных соединений, улучшенная технологичность и улучшенная пригодность к хранению.

Растения, которые подобным образом могут подвергаться лечению в соответствии с изобретением, являются гибридными растениями, которые уже экспрессируют характеристики гетерозиса или гибридной силы, которая в целом в результате обеспечивает повышение урожая, повышение жизнеспособности, улучшение здоровья и улучшение устойчивости к биотическим и абиотическим стрессовым факторам. Такие растения, как правило, получают путем скрещивания инбредной родительской линии с мужской стерильностью (женского родительского растения) с другой инбредной родительской линией с мужской фертильностью (мужским родительским растением). Гибридные семена, как правило, собирают из растений с мужской стерильностью и продают производителям. Растения с мужской стерильностью (например, кукуруза) иногда могут быть получены путем удаления метелки (т. е., путем механического удаления репродуктивных органов или мужских цветков); однако чаще мужская стерильность является результатом генетических детерминант в геноме растений. В этом случае, в частности, если семена являются желательным продуктом, который должен быть собран с гибридных растений, ее обычно используют для того, чтобы убедиться в том, что мужская фертильность в гибридных растениях, содержащих генетические детерминанты, отвечающие за мужскую стерильность, полностью восстановлена. Этого достигают, убедившись в том, что мужские растения имеют соответствующие гены-восстановители фертильности, способные восстанавливать мужскую фертильность в гибридных растениях, содержащих генетические детерминанты, отвечающие за мужскую стерильность. Генетические детерминанты для мужской стерильности могут находиться в цитоплазме. Примеры цитоплазматической мужской стерильности (CMS) описывались, например, для видов Brassica (документы WO 1992/005251, WO 1995/009910, WO 1998/27806, WO 2005/002324, WO 2006/021972 и US 6229072). Однако генетические детерминанты для мужской стерильности также могут находиться и в ядерном геноме. Растения с мужской стерильностью также могут быть получены с применением способов биотехнологии растений, таких, как геновая инженерия. Особенно предпочтительный способ получения растений с мужской стерильностью описывается в документе WO 89/10396, в котором, например, рибонуклеаза, такая, как барназа, выборочно экспрессируется в клетках тапетума тычинок. Фертильность затем может быть восстановлена путем экспрессии в клетках тапетума ингибитора рибонуклеазы, такого, как барстар (см., например, документ WO 1991/002069).

Активное вещество является особенно подходящим для борьбы с вирусными болезнями следующих растений: хлопок, лен, виноград, плодовые растения, овощи, такие виды, как Rosaceae sp. (например, семечковые плоды, такие, как яблоки и груши, а также косточковые плоды, такие как абрикосы, вишни, миндаль и персики, и сочные плоды, такие, как клубника), Ribesioideae sp., Juglandaceae sp., Betulaceae sp., Anacardiaceae sp., Fagaceae sp., Moraceae sp., Oleaceae sp., Actinidaceae sp., Lauraceae sp., Musaceae sp. (например, банановые деревья и плантации), Rubiaceae sp. (например, кофе), Theaceae sp., Sterculiaceae sp., Rutaceae sp. (например, лимоны, апельсины и грейпфруты); Solanaceae sp. (например, томаты), Liliaceae sp., Asteraceae sp. (например, салат), Umbelliferae sp., Cruciferae sp., Chenopodiaceae sp., Cucurbitaceae sp. (например, огурцы), Alliaceae sp. (например, порей, лук), Papilionaceae sp. (например, горох); основные культурные растения, такие как Gramineae sp. (например, кукуруза, дерновые травы, злаки, такие как пшеница, рожь, рис, ячмень, овес, просо и тритикале), Asteraceae sp. (например, подсолнечник), Brassica-

сеae sp. (например, капуста белокачанная, капуста краснокочанная, брокколи, цветная капуста, капуста брюссельская, пекинская капуста, кольраби, редис и масличный рапс, горчица, хрен и кресс), Fabaceae sp. (например, фасоль, арахис), Papilionaceae sp. (например, соя), Solanaceae sp. (например, картофель), Chenopodiaceae sp. (например, сахарная свекла, кормовая свекла, листовая свекла, столовая свекла); полезные растения и декоративные растения для садов и лесных массивов; и генетически модифицированные сорта каждого из этих растений.

Более конкретно, активное вещество является подходящим для борьбы с вирусными болезнями овощных растений.

Активное вещество является особенно подходящим для борьбы с вирусами следующих семейств или родов: Caulimoviridae, Geminiviridae, Bromoviridae, Closteroviridae, Comoviridae, Potyviridae, Sequiviridae, Tombusviridae, Rhabdoviridae, Bunyaviridae, Partitiviridae, Rheoviridae, Capillovirus, Carlavirus, Enamovirus, Furovirus, Hordeivirus, Idaeovirus, Luteovirus, Marafivirus, Potexvirus, Sobemovirus, Tenuivirus, Tobamovirus, Tobravirus, Trichovirus, Tymovirus и Umbravirus.

Предпочтительно активное вещество применяют для борьбы с вирусами следующих видов: вирус мозаики турнепса, вирус складчатости турнепса, вирус пятнистости бобовых стручков, вирус мозаики цветной капусты, вирус табачной мозаики, вирус кустистой карликовости томата, вирус лохматой карликовости риса, вирус мозаики огурца, вирус желтой карликовости ячменя, вирус желтухи свеклы, вирус желтухи салата, вирус мозаики кукурузы, вирус карликовости арахиса и Y-вирус картофеля.

Активное вещество наносят на растения в любых подходящих формах. Например, активное вещество может наноситься в форме суспензии, например суспензии на водной или масляной основе, эмульсии, раствора, порошка, такого, как смачиваемый порошок, пены, пасты, гранул, микрочастиц, аэрозолей или микрокапсул. Подходящие композиции приготавливают традиционными способами. Композиции, включающие активное вещество, могут быть готовыми к применению композициями, т. е., композициями, которые могут непосредственно наноситься на растения при помощи соответствующего устройства, или могут серийно выпускаться в форме концентратов, подлежащих разбавлению перед применением.

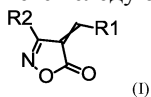
Композиции могут включать активное вещество, отдельно или в комбинации с другими активными веществами, такими как инсектициды, аттрактанты, стерилизаторы, бактерициды, акарициды, нематоциды, а также фунгициды, вещества, регулирующие рост, гербициды, антитоксины и/или удобрения.

Активное вещество или композиции, которые его включают, применяют для растений традиционными способами, например путем полива, разбрызгивания, распыления, мелкодисперсного распыления. Активное вещество может прямо или опосредованно наноситься на растения, среду, место произрастания и/или место хранения. Например, активное вещество может впрыскиваться в кору или под кору, выливаться или разбрызгиваться вокруг растения на грунт (почву, песчаную почву, гравийную почву, каменистую почву, глинистую почву или смешанную почву). Другим типом применения является разбрызгивание на растение и его части. В сухой форме композиция активного вещества может быть смешана с материалом грунта (почвой, песчаной почвой, гравийной почвой, каменистой почвой, глинистой почвой или смешанной почвой) и/или на семена. Активное вещество может применяться в ирригационной системе, в сухой или в жидкой форме. Активное вещество предпочтительно наносят на растения путем разбрызгивания.

Настоящее изобретение также касается применения описываемых авторами соединений формулы (I), борьбы с вирусными болезнями растений, более конкретно - стимулирования природных механизмов защиты растений от вирусов, в частности стимулирования основанного на РНК-сайленсинге механизма защиты растений от вирусов. Растения и/или вирусы являются такими, как описывается выше.

Соединения формулы (I) стимулируют основанный на РНК-сайленсинге механизм защиты растений через увеличение продуцирования малой РНК. Предпочтительно способность соединений формулы (I) для увеличения продуцирования малой РНК также может использоваться в генетически модифицированных растениях, трансформированных последовательностью РНКи, предназначенной для улучшения агрономических свойств и/или обеспечения устойчивости к патогенам (например, бактериям, грибам), устойчивости к насекомым/вредителям и/или устойчивости к стрессу. Таким образом, настоящее изобретение также касается применения одного или нескольких соединений формулы (I) для улучшения агрономических свойств и/или обеспечения устойчивости к патогенам, устойчивости к насекомым / вредителям и/или устойчивости к стрессу в генетически модифицированных растениях с трансформацией последовательности РНКи путем повышения продуцирования малой РНК.

Настоящее изобретение также касается соединения формулы (I) и/или композиции, которая его включает, причем соединение формулы (I) является следующим:



где

R1 выбран из группы, к которой относятся 2-метилфенил, 4-метилфенил, 2,6-диметилфенил, 2,4,5-триметилфенил, 2,4,6-триметилфенил и 2,6-дихлорофенил; и

R2 представляет собой 2-хлорофенил.

Композиция согласно настоящему изобретению обычно включает помимо соединения формулы (I) один или несколько приемлемых носителей, в частности один или несколько приемлемых для сельского хозяйства носителей.

Носитель является природным или синтетическим, органическим или неорганическим веществом, с которым активные ингредиенты смешивают или комбинируют для улучшения применимости, в частности, для улучшения нанесения на растения, части растений или семена. Носитель, который может быть твердым или жидким, как правило, является инертным.

Примерами подходящих твердых носителей помимо прочих являются, аммониевые соли, разновидности природной горной муки, такие как каолины, глины, тальк, мел, кварц, аттапульгит, монтмориллонит или диатомит, и разновидности синтетической горной муки, такие как мелкодисперсный кремнезем, глинозем и силикаты. Примерами типичных применимых твердых носителей для приготовления гранул помимо прочих являются измельченные или фракционированные горные породы, такие как кальцит, мрамор, пемза, сепиолит и доломит, синтетические гранулы неорганических и органических порошков и гранулы органического материала, такого как бумага, опилки, кокосовая скорлупа, кукурузные початки и черешки табачных листьев.

Примерами подходящих жидких носителей помимо прочих являются вода, полярные и неполярные органические химические жидкости, например, из класса ароматических и неароматических углеводородов (таких, как циклогексан, парафины, алкилбензолы, ксилол, толуол, алкилнафталины, хлорные соединения ароматических или алифатических углеводородов, такие как хлоробензолы, хлорэтилены или метилхлорид), спирты и полиолы (которые необязательно также могут быть замещенными, этерифицированными и/или эстерифицированными, например, бутанол или гликоль), кетоны (такие, как ацетон, метилэтилкетон, метилизобутилкетон, циклогексанон), сложные эфиры (включая жиры и масла) и (поли)эфиры, незамещенные и замещенные амины, амиды (такие, как диметилформамид), лактамы (такие, как N-алкилпирролидоны) и лактоны, сульфоны и сульфоксиды (такие, как диметилсульфоксид). Носитель также может быть сжиженным газообразным расширителем, т.е., жидкостью, которая является газообразной при стандартной температуре и при стандартном давлении, например аэрозольные пропелленты, такие как галоуглеводороды, бутан, пропан, азот и диоксид углерода.

Композиция также может включать один или несколько приемлемых вспомогательных веществ, традиционно применяемых для рецептирования композиций (например, агрохимических композиций), таких как одна или несколько поверхностно-активных веществ.

Примерами подходящих поверхностно-активных веществ могут быть эмульгаторы и/или пенообразователи, диспергаторы или смачивающие вещества, обладающие ионными и неионными свойствами, или их смеси. Их примерами могут быть соли полиакриловой кислоты, соли лигносульфоновой кислоты, соли фенолсульфоновой кислоты или нафталинсульфоновой кислоты, поликонденсаты этилен- и/или пропиленоксида с жирными спиртами, жирными кислотами или жирными аминами (полиоксиэтиленовые эфиры жирных кислот, полиоксиэтиленовые эфиры жирных спиртов, например, алкиларилполигликолевые эфиры), замещенные фенолы (предпочтительно алкилфенолы или арилфенолы), соли эфиров сульфоянтарной кислоты, производные таурина (предпочтительно алкилтаураты), фосфорные эфиры полиэтоксигированных спиртов или фенолов, жирные сложные эфиры полиолов и тауриновые производные соединений, содержащих сульфаты, сульфонаты и фосфаты, например, алкиларилполигликолевые эфиры, алкилсульфонаты, алкилсульфаты, арилсульфонаты, белковые гидролизаты, лигносульфитные отработанные щелоки и метилцеллюлоза. Поверхностно-активное вещество, как правило, применяют в случае, когда активный ингредиент и/или носитель является нерастворимым в воде, а нанесение осуществляют с водой. В таких случаях количество поверхностно-активных веществ, как правило, составляет от 5 до 40 мас.% композиции.

Другими примерами вспомогательных веществ, которые являются традиционными для рецептирования агрохимических композиций, могут быть водоотталкивающие добавки, сиккативы, связующие вещества (адгезив, агент, придающий липкость, фиксирующий агент, такой как карбоксиметилцеллюлоза, природные и синтетические полимеры в форме порошков, гранул или латексов, такие как гуммиарабик, поливиниловый спирт и поливинилацетат, природные фосфолипиды, такие как цефалины и лецитины, и синтетические фосфолипиды, поливинилпирролидон, поливинилацетат, поливиниловый спирт и тилоза), загустители, стабилизаторы (например, холодные стабилизаторы, консерванты, антиоксиданты, светостабилизаторы или другие агенты, улучшающие химическую и/или физическую устойчивость), красители или пигменты (такие, как неорганические пигменты, например, оксид железа, оксид титана и берлинская лазурь; органические красители, например, ализарин, азо и металлофталоцианиновые красители), противопенители (например, силиконовые противопенители и стеарат магния), консерванты (например, дихлорофен и полуформаль бензилового спирта), вторичные загустители (производные целлюлозы, производные акриловой кислоты, ксантан, модифицированные глины и мелкодисперсный кремнезем), клейкие вещества, гиббереллины и технологические добавки, минеральные и растительные масла, отдушки, воски и питательные вещества (включая микроэлементы, такие как соли железа, марганца, бора, меди, кобальта, молибдена и цинка), защитные коллоиды, тиксотропные вещества, пенетранты, секвестранты и комплексообразователи. Выбор носителей и/или вспомогательных веществ зави-

сит от предусмотренного режима применения композиции и/или от физических свойств активного(ых) ингредиента(ов).

Как было упомянуто выше, известно, что растения используют путь РНК-сайленсинга для защиты от вторжения вирусов. У млекопитающих, до недавнего открытия, описанного Y. Li et al. и P. V. Maillard et al. (Y. Li et al., Science, 342: 231-234, 2013; P. V. Maillard et al., Science, 342: 235-238, 2013), ученые могли подтвердить лишь генно-регуляторную роль РНКи. Теперь Y. Li et al. и P. V. Maillard et al. подтвердили, что РНКи также действует как противовирусный ответ у млекопитающих.

Настоящее изобретение подробнее поясняется при помощи представленных ниже примеров.

### Примеры

Пример 1. Распознавание модуляторов механизма сайленсинга растений - использование репортерных растений SUC-SUL

Путь РНК-сайленсинга растения можно легко отследить с использованием искусственно созданных репортерных растений, называемых "репортерными растениями SUC-SUL Arabidopsis" (Dunoyer et al., Nat. Genet. 37, 1356-1360, 2005).

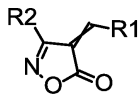
Репортерные растения SUC-SUL Arabidopsis являются трансгенными растениями, экспрессирующими двухцепочечную РНК с инвертированным повтором (IR), предназначенную для нацеливания на транскрипт SULPHUR (SUL) в сосудистой системе под контролем промотора SUC2 (Truernit et al., Planta 196(3), 564-570, 1995). Будучи экспрессированной, дцРНК преобразуется в малые interfering РНК, направляющую неклеточный автономный посттранскрипционный сайленсинг генов транскрипта SULPHUR, в свою очередь, вызывая хлороз вен. Поскольку наблюдаемый хлороз является результатом сайленсинга транскрипта SULPHUR, распространение хлороза, наблюдаемое непосредственно на растениях, коррелирует с интенсификацией пути РНК-сайленсинга на молекулярном уровне.

Сеянцы *A. thaliana* через пять дней после прорастания опрыскивали разными растворами, содержащими 300 ч./млн активной молекулы в соответствии с изобретением, с диметилсульфоксидом (DMSO) 5% и предварительно смешанной композицией стандартного эмульгируемого концентрата (ЕС) (6 сеянцев/испытание). Для каждой молекулы выполняли четыре повтора. Контрольные растения обрабатывали только DMSO (имитированное лечение растений). Эффект от лечения репортерных растений SUC-SUL оценивали через 14 дней после лечения под трансиллюминацией и записывали в цифровом формате при помощи стереомикроскопа путем измерения поверхности и интенсивности хлоротической зоны (процента хлороза). Проводили два независимых эксперимента с целью оценки среднего процента хлороза для каждой молекулы.

Результаты показаны ниже в табл. 1. Лечение с применением 300 ч./млн изоксазолон и его аналогов приводило к значительному повышению процента хлороза, что подтверждало активность активного вещества в качестве предполагаемых мощных усилителей РНК-сайленсинга.

С целью отсеивания молекул, действующих прямо на промотор, а не на механизм РНК-сайленсинга, активные вещества, распознанные как способные увеличивать поверхность и интенсивность хлоротической зоны, затем испытывали на втором этапе на некоторых репортерных растениях *At-SUC2-GFP*, которые специфически дают информацию об активности промотора SUC2 (Wright et al., Plant Physiol. 131, 1555-1565, 2003).

Таблица 1. Оценка изоксазолон (соединение ID № 4) и его аналогов в репортерных растениях SUC-SUL. Уровень хлороза растения, подвергнутого имитированному лечению, достигал 10%.



ID	Изомер	R1	R2	Средний % хлороза
1	4Z	4-бromo-5-этил-2-тиенил	2-хлорофенил	67,9
2	4Z	3-(метилсульфанил)-2-тиенил	2-хлорофенил	62,0



3	4Z	4-бromo-5-[(метилсульфанил)метил]-2-тиенил	2-хлорофенил	59,7
4	4Z	2-Тиенил	2-хлорофенил	57,0
5	4Z	3-(метоксиметил)-2-тиенил	2-хлорофенил	57,0
6	4Z	2-Тиенил	3-хлорофенил	52,9
7	4Z	2-Тиенил	2-метоксифенил	50,9
8	4Z	2-Тиенил	2-Фторофенил	50,9
9	4E	5-метил-2-тиенил	2-хлорофенил	49,9
10	4Z	2-Тиенил	4-метилфенил	48,0
11	4Z	2-Тиенил	Фенил	46,8
12	4Z	2-Тиенил	4-Фторофенил	44,6
13	4E	4-метилфенил	2-хлорофенил	44,5
14	4E	2-Тиенил	4-метоксифенил	44,3
15	4E	2-Тиенил	Фенил	43,7
16	4Z	2-метилфенил	2-хлорофенил	43,5
17	4Z	5-бromo-2-тиенил	Фенил	43,0
18	4Z	2-Тиенил	2,4-дихлорофенил	42,7
19	4Z	2-Тиенил	2,3-дихлорофенил	42,5
20	4Z	5-фенил-2-тиенил	2-хлорофенил	42,0
21	4Z	4-бromo-5-метил-2-тиенил	2-хлорофенил	41,8
22	4Z	5-хлоро-2-тиенил	2-хлорофенил	40,8
23	4E	2-Тиенил	3-метоксифенил	38,6
25	4E	5-метил-2-тиенил	Фенил	38,2
26	4Z	2-Тиенил	2,5-дихлорофенил	37,9
27	4Z	3-метил-2-тиенил	2-хлорофенил	37,9
28	4Z	2-Тиенил	4-метоксифенил	36,6
29	4Z	4-фенил-2-тиенил	2-хлорофенил	35,8
30	4Z	Ph	2-хлорофенил	35,6
31	4Z	2-Тиенил	2-хлоро-5-фторофенил	34,8
32	4Z	5-метил-2-тиенил	4-метоксифенил	34,4
33	4Z	2-Тиенил	2-метилфенил	32,9
34	4E	2,6-дихлорофенил	2-хлорофенил	32,7
35	4E	2,4,6-триметилфенил	2-хлорофенил	32,5
36	4E	2,6-диметилфенил	2-хлорофенил	29,4
37	4Z	2-Тиенил	3,4-дихлорофенил	29,1
38	4Z	4-бromo-2-тиенил	Фенил	27,5
39	4Z	3-метил-2-тиенил	4-метилфенил	27,5
40	4Z	2,4,5-триметилфенил	2-хлорофенил	26,4
41	4Z	5-метил-2-тиенил	2-хлорофенил	26,1

#### Пример 2. Подтверждение молекулярного эффекта модуляторов сайленсинга

Усиливающее влияние изоксазолон на механизм РНКи было подтверждено на фенотипическом и молекулярном уровнях. Растения *SUC-SUL Arabidopsis* четырехмесячного возраста на стадии розетки опрыскивали изоксазолоном в количестве 200 ч./млн. Через семь дней после лечения было обнаружено, что изоксазолон вызывает явное распространение РНКи-зависимого хлоротического фенотипа в жилках, который не наблюдался при применении только DMSO (имитационный контроль).

Надземные ткани растений собирали и анализировали на молекулярном уровне с применением методологий существующего уровня техники. Визуальное распространение хлороза коррелировало со снижением уровней транскрипта *SUL* согласно анализу с применением количественной ПЦР в реальном времени (фиг. 1), а также снижением уровня белка *SUL*, который количественно определялся при вестерн-блоттинге. Кроме того, эти эффекты были связаны с перенакоплением 21-нуклеотидной и 24-нуклеотидной мРНК *SUL* из трансгенных *SUL*. Вместе эти данные подтверждают, что изоксазолон вызывает путь РНКи растения.

#### Пример 3. Антивирусная эффективность модуляторов сайленсинга в растении *Arabidopsis*

Вирус мозаики турнепса (*TuMV*) относится к *Potyviridae*, наибольшему семейству из известных вирусов растений. Этот вирус инфицирует широкий круг растений, в частности *Brassicaceae*. Геном *TuMV* состоит из молекулы положительно-полярной одноцепочечной РНК (+ оцРНК). Антивирусную эффективность изоксазолон испытывали при помощи флуоресцентно меченного потивируса (*TuMV-GFP*) для точного определения конкретного времени и места возникновения воздействия молекул во время первичного инфицирования вирусом, а также его местного или системного распространения.

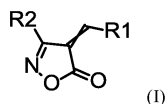
Растения *Arabidopsis* опрыскивали, применяя 100 или 200 ч./млн изоксазолон за 3 дня до инфицирования растений вирусом *TuMV-GFP*. Титры вируса измеряли путем количественной ПЦР и/или накопления вирусного белка при вестерн-блоттинге и путем подсчета количества очагов первичного инфицирования в ультрафиолетовом свете в случае *TuMV-GFP*.

Изоксазолон приводит к явному снижению накопления титров вируса через пять дней после инфицирования на растениях *Arabidopsis*. Сильное снижение накопления вируса последовательно наблюдалось при *TuMV-GFP* как на инокулированных листьях (фиг. 2), так и на системных тканях после лечения изоксазолоном, согласно измеренному снижению накопления *TuMV*-производной *HC-Pro* мРНК (фиг. 3).

### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ борьбы с вирусными болезнями растений, включающий нанесение на растения по мень-

шей мере одного соединения формулы (I)



где R1 представляет собой тиенил или фенил, где вышеупомянутые тиенил или фенил могут быть замещены одним или несколькими заместителями, которые независимо друг от друга выбирают из группы, к которой относятся галоген, (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)алкил, (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)алкилтио, ((C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)алкокси)(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)алкил, ((C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)алкилтио)(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)алкил и фенил; и

R2 представляет собой фенил, который может быть замещен одним или несколькими заместителями, которые независимо друг от друга выбирают из группы, к которой относятся галоген, (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)алкил и (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)алкокси.

2. Способ по п.1, отличающийся тем, что R1 выбирают из группы, к которой относятся 2-тиенил, фенил, 3-метил-2-тиенил, 5-метил-2-тиенил, 2-метилфенил, 4-метилфенил, 4-фенил-2-тиенил, 5-фенил-2-тиенил, 4-бromo-2-тиенил, 5-бromo-2-тиенил, 5-хлоро-2-тиенил, 4-бromo-5-метил-2-тиенил, 4-бromo-5-этил-2-тиенил, 3-(метилсульфанил)-2-тиенил, 4-бromo-5-[(метилсульфанил)метил]-2-тиенил, 3-(метоксиметил)-2-тиенил, 2,6-диметилфенил, 2,4,5-триметилфенил, 2,4,6-триметилфенил и 2,6-дихлорофенил.

3. Способ по п.1, отличающийся тем, что R2 выбирают из группы, к которой относятся фенил, 2-хлорофенил, 2-фторофенил, 3-хлорофенил, 4-фторофенил, 2,3-дихлорофенил, 2,4-дихлорофенил, 2,5-дихлорофенил, 3,4-дихлорофенил, 2-хлоро-5-фторофенил, 2-метилфенил, 4-метилфенил, 2-метоксифенил, 3-метоксифенил и 4-метоксифенил.

4. Способ по любому из пп.1-3, отличающийся тем, что борьба основана на стимулировании природного защитного механизма растений от вирусов.

5. Способ по п.4, отличающийся тем, что природный защитный механизм растений от вирусов представляет собой основанный на РНК-сайленсинге механизм защиты растений.

6. Способ по любому из предыдущих пунктов, отличающийся тем, что вышеупомянутый способ представляет собой профилактический способ.

7. Способ по любому из предыдущих пунктов, отличающийся тем, что вышеупомянутые растения выбирают из группы, к которой относятся хлопок, лен, виноград, плодовые растения, овощи, культурные растения, декоративные растения для садов и лесных массивов и генетически модифицированные сорта каждого из этих растений.

8. Способ по любому из предыдущих пунктов, отличающийся тем, что вышеупомянутые растения выбирают из группы, к которой относятся *Ribesioideae* sp., *Juglandaceae* sp., *Betulaceae* sp., *Anacardiaceae* sp., *Fagaceae* sp., *Moraceae* sp., *Oleaceae* sp., *Actinidaceae* sp., *Lauraceae* sp., *Musaceae* sp., *Rubiaceae* sp., *Theaceae* sp., *Sterculiaceae* sp., *Rutaceae* sp.; *Solanaceae* sp., *Liliaceae* sp., *Asteraceae* sp., *Umbelliferae* sp., *Cruciferae* sp., *Chenopodiaceae* sp., *Cucurbitaceae* sp., *Alliaceae* sp., *Papilionaceae* sp., *Brassicaceae* sp. и *Fabaceae* sp.

9. Способ по любому из предыдущих пунктов, отличающийся тем, что вышеупомянутые вирусы выбирают из группы, к которой относятся следующие семейства или роды: *Caulimoviridae*, *Geminiviridae*, *Bromoviridae*, *Closteroviridae*, *Comoviridae*, *Potyvirus*, *Sequiviridae*, *Tombusviridae*, *Rhabdoviridae*, *Bunyaviridae*, *Partitiviridae*, *Rheoviridae*, *Capillovirus*, *Carlavirus*, *Enamovirus*, *Furovirus*, *Hordeivirus*, *Idaeovirus*, *Luteovirus*, *Marafivirus*, *Potexvirus*, *Sobemovirus*, *Tenuivirus*, *Tobamovirus*, *Tobravirus*, *Trichovirus*, *Tymovirus* и *Umbravirus*.

10. Способ по любому из предыдущих пунктов, отличающийся тем, что вышеупомянутые вирусы выбирают из группы, к которой относятся вирус мозаики турнепса, вирус складчатости турнепса, вирус пятнистости бобовых стручков, вирус мозаики цветной капусты, вирус табачной мозаики, вирус кустистой карликовости томата, вирус лохматой карликовости риса, вирус мозаики огурца, вирус желтой карликовости ячменя, вирус желтухи свеклы, вирус желтухи салата, вирус мозаики кукурузы, вирус карликовости арахиса и Y-вирус картофеля.

11. Способ по любому из предыдущих пунктов, отличающийся тем, что соединение формулы (I) наносят путем разбрызгивания на растения.

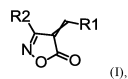
12. Способ по любому из предыдущих пунктов, отличающийся тем, что соединение формулы (I) наносят на растения в количестве, составляющем от 0,01 до 5 кг/га.

13. Применение соединения формулы (I), как определено в пп.1, 2 или 3, для стимулирования природного защитного механизма растений от вирусов.

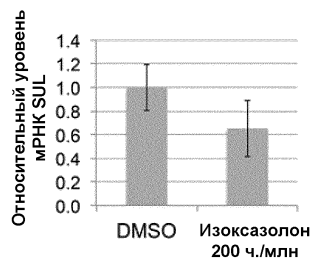
14. Применение по п.13 для стимулирования основанного на РНК-сайленсинге механизма защиты растений.

15. Применение соединения формулы (I), как определено в пп.1, 2 или 3, для улучшения агрономических свойств в генетически модифицированных растениях с трансформацией последовательности РНКи.

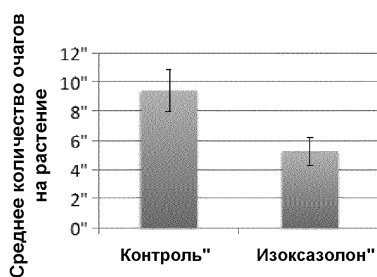
16. Соединение формулы (I)



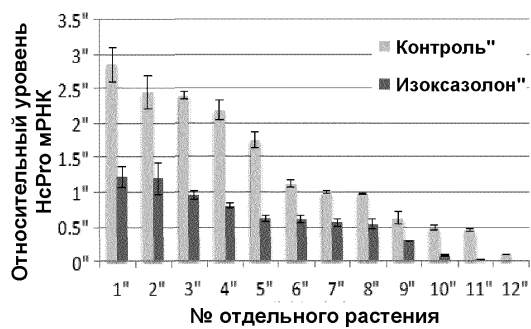
где R1 выбран из группы, к которой относятся 2-метилфенил, 4-метилфенил, 2,6-диметилфенил, 2,4,5-триметилфенил, 2,4,6-триметилфенил и 2,6-дихлорофенил; и R2 представляет собой 2-хлорофенил.



Фиг. 1



Фиг. 2



Фиг. 3

