

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **035097**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента  
**2020.04.27**

(51) Int. Cl. *A01N 43/42* (2006.01)  
*A01P 15/00* (2006.01)

(21) Номер заявки  
**201891596**

(22) Дата подачи заявки  
**2017.01.12**

---

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


---

(31) **16290010.4**

(32) **2016.01.13**

(33) **EP**

(43) **2019.01.31**

(86) **PCT/EP2017/050585**

(87) **WO 2017/121811 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)**

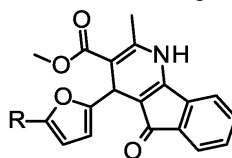
(74) Представитель:  
**Веселицкая И.А., Веселицкий М.Б.,  
Кузенкова Н.В., Каксис Р.А., Белоусов  
Ю.В., Куликов А.В., Кузнецова Е.В.,  
Соколов Р.А., Кузнецова Т.В. (RU)**

(56) Chunhua Zhang ET AL.: "Chemical Biology in Plants: Finding New Connections between Pathways Using the Small Molecule Sortin1" In: "Concepts and Case Studies in Chemical Biology", 13 August 2014 (2014-08-13), Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany, XP055261362, ISBN: 978-3-527-33611-1 pages 285-294, DOI: 10.1002/9783527687503.ch19, paragraph [19.4.3]

ABEL ROSADO ET AL.: "Sortin1-Hypersensitive Mutants Link Vacuolar-Trafficking Defects and Flavonoid Metabolism in Vegetative Tissues", CHEMISTRY AND BIOLOGY, CURRENT BIOLOGY, LONDON, GB, vol. 18, no. 2, 29 November 2010 (2010-11-29), pages 187-197, XP028148786, ISSN: 1074-5521, DOI: 10.1016/J.CHEMBIOL.2010.11.015 [retrieved on 2010-12-24] page 188, left-hand column, paragraph 1; table 1  
WO-A2-2007104669

D. TREUTTER: "Significance of Flavonoids in Plant Resistance and Enhancement of Their Biosynthesis", PLANT BIOLOGY, vol. 7, no. 6, 1 November 2005 (2005-11-01), pages 581-591, XP055261514, GB, DE, NL ISSN: 1435-8603, DOI: 10.1055/S-2005-873009 the whole document

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



(I)

**035097 B1**

**035097 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 пиракlostробин продемонстрировал способность к повышению устойчивости табака к инфицированию вирусом табачной мозаики (TMV) или патогеном рябухи *Pseudomonas syringae* pv *tabaci* (Herns et al., *Plant Physiology* 2002, 130: 120 - 127). Пиракlostробин также был способен повышать устойчивость к TMV в NahG трансгенных растениях табака, не способных к накоплению значительного количества эндогенной салициловой кислоты. Пиракlostробин 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 пиракlostробин 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 миРНК являются гипервосприимчивыми к фитовирусам, и наоборот, у многих вирусов развились супрессоры РНКи 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.

#### Определения

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

Термин "фенилтио" в контексте данного описания касается радикала -S-фенила.

Термин "карбоксы" в контексте данного описания касается радикала -COOH.

Термин "нитро" в контексте данного описания касается радикала -NO<sub>2</sub>.

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

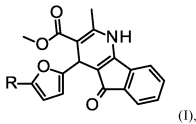
#### Описание чертежа

На чертеже показан проводимый при помощи количественной ПЦР анализ относительного уровня SUL мРНК в растениях SUC-SUL через семь дней после обработки только DMSO или обработки Sortin1, нормализованного по EXP10. "Усы" представляют стандартное отклонение для трех независимых экспериментов.

#### 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)



где R выбран из группы, к которой относятся водород, фенилтио и замещенный фенил, где вышеупомянутый фенил замещен одним или несколькими заместителями, независимо друг от друга выбранными из группы, к которой относятся галоген, предпочтительно хлор, фтор и бром, карбоксы и нитро.

В некоторых вариантах осуществления активным веществом является соединение формулы (I), в котором R представляет собой водород, фенилтио или фенил, замещенный одним или несколькими заместителями, независимо друг от друга выбранными из группы, к которой относятся галоген, предпочтительно хлор, фтор и бром, карбоксы и нитро.

В некоторых предпочтительных вариантах осуществления активным веществом является соединение формулы (I), в котором R выбран из группы, к которой относятся водород, фенилтио, 2-карбоксофенил, 4-карбоксофенил, 3-хлорофенил, 3,4-дихлорофенил, 2,5-дихлорофенил, 3-карбоксо-4-хлорофенил, 2-нитрофенил и 2-бромо-4-нитрофенил.

В некоторых более предпочтительных вариантах осуществления активным веществом является соединение формулы (I), в котором R представляет собой 4-карбоксофенил. Вышеупомянутое соединение известно как Sortin1.

Sortin1 относится к ингибиторам сортировки, которые стимулируют секрецию в дрожжах. Известно, что он перенаправляет вакуолярное назначение растительной карбоксипептидазы Y (CPY) и других белков в суспензионных клетках *Arabidopsis* и вызывает секрецию этих белков. Подобное лечение полных всходов *Arabidopsis* также в результате приводило к такому же эффекту, указывая на то, что этот препарат имеет подобный принцип действия в клетках и интактных растениях (Zouhar et al., PNAS 2004, 101, 25: 9497 - 9501). В растениях *Arabidopsis* Sortin1 имеет обратимое воздействие на вакуолярное нацеливание CPY, биогенез вакуолей и развитие корней. Sortin1 является высокоспецифичным в воздействии на нацеливание маркера тонопласта, а также биогенез вакуолей, но не на эндоплазматический ретикулум, комплекс Гольджи или эндосомы (Hicks et al., Current Opinion in Plant Biology 2010, 13: 706-713).

Некоторые соединения формулы (I) имеются в продаже. Другие соединения могут быть соответственно получены способами, раскрытыми в документах WO 2002085894, US 20040082578, публикации "Multicomponent one-pot solvent-free synthesis of functionalized unsymmetrical dihydro-1H-indeno[1,2-b]pyridines": Samai, Chandra Nandi, Kumar, Singh, Tetrahedron Lett. 2009, 50(50), 7096-7098.

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 косупрессии или технологии 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 6,229,072). 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 генная 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), Brassicaceae 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, Potyvirus, Sequiviridae, Tombusviridae, Rhabdoviridae, Bunyaviridae, Partitiviridae, Rheoviridae, Capillovirus, Carlavirus, Enamovirus, Furovirus, Hordeivirus, Idaeovirus, Luteovirus, Marafivirus, Potexvirus, Sobemovirus, Tenuivirus, Tobamovirus, Tobavirus, Trichovirus, Tymovirus и Umbravirus.

Предпочтительно активное вещество применяют для борьбы с вирусами следующих видов: вирус мозаики 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, антидоты 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.

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 интерферирующие РНК, направляющую неклоточный 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 (EC) (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. Sortin1 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).

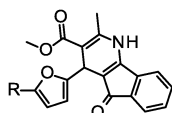


Таблица 1. Оценка Sortin1 (соединение ID № 1) и его аналогов в репортерных растениях SUC-SUL. Уровень хлороза растения, подвергнутого имитированному лечению, достигал 10%

ID	R	Средний % хлороза
1	4-карбоксифенил	34,0
2	2-карбоксифенил	33,2
3	3,4-дихлорофенил	31,0
4	3-карбокси-4-хлорофенил	29,9
5	2-нитрофенил	26,6
6	SPh	23,1
7	3-хлорофенил	21,5
8	2,5-дихлорофенил	21,4
9	H	20,6
10	2-бromo-4-нитрофенил	19,1

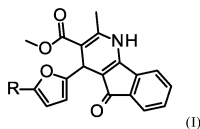
Пример 2. Подтверждение молекулярного эффекта модуляторов сайленсинга.

Усиливающее влияние Sortin1 на механизм РНКи был подтвержден на фенотипическом и молекулярном уровнях. Растения SUC-SUL *Arabidopsis* четырехмесячного возраста на стадии розетки опрыскивали Sortin1 в количестве 200 ч./млн. Через семь дней после лечения было обнаружено, что Sortin1 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 миРНК из трансгенных SUL. Вместе эти данные подтверждают, что Sortin1 вызывает путь РНКи растения.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ борьбы с вирусными болезнями растений, включающий нанесение на растения по меньшей мере одного соединения формулы (I)



где R выбирают из группы, к которой относятся водород, фенилтио и замещенный фенил, где вышеупомянутый фенил замещен одним или несколькими заместителями, которые независимо друг от друга выбирают из группы, к которой относятся галоген, карбокси и нитро.

2. Способ по п.1, отличающийся тем, что R выбирают из группы, к которой относятся водород, фенилтио, 2-карбоксифенил, 4-карбоксифенил, 3-хлорофенил, 3,4-дихлорофенил, 2,5-дихлорофенил, 3-карбокси-4-хлорофенил, 2-нитрофенил и 2-бromo-4-нитрофенил.

3. Способ по п.1, отличающийся тем, что R представляет собой 4-карбоксифенил.

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 Potyviridae, 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 относится вирус мозаики 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.

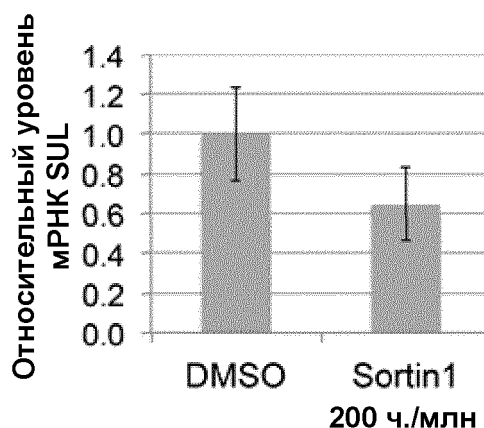
11. Способ по любому из предыдущих пунктов, отличающийся тем, что соединение формулы (I) наносят путем разбрызгивания на растения.

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.



Фиг. 1

