

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 814 476**

51 Int. Cl.:

**A01N 43/42** (2006.01)

**A01P 15/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.01.2017 PCT/EP2017/050585**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.07.2017 WO17121811**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.01.2017 E 17701071 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.05.2020 EP 3402334**

54 Título: **Uso de sustancias activas para controlar la infección por virus en plantas**

30 Prioridad:

**13.01.2016 EP 16290010**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**29.03.2021**

73 Titular/es:

**BAYER CROPSCIENCE AKTIENGESELLSCHAFT  
(100.0%)  
Alfred-Nobel-Strasse 50  
40789 Monheim am Rhein, DE**

72 Inventor/es:

**BALTZ, RACHEL;  
BERNIER, DAVID;  
JAY-BRIOUDES, FLORENCE;  
KNOBLOCH, THOMAS;  
VITEL, MAXIME y  
VOINNET, OLIVIER**

74 Agente/Representante:

**GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo**

**ES 2 814 476 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Uso de sustancias activas para controlar la infección por virus en plantas

**Campo técnico**

5 La presente invención se refiere al uso de sustancias activas para estimular el mecanismo de defensa natural de las plantas contra los virus para controlar infecciones por virus en plantas y a procedimientos para controlar infecciones por virus en plantas. La presente invención también se refiere al uso de sustancias activas para activar el mecanismo de defensa natural basado en el ARN de interferencia (que en el presente documento también se denomina mecanismo de defensa natural basado en el silenciamiento de ARN) de las plantas contra los virus.

**Antecedentes**

10 Los virus de las plantas son responsables de grandes daños a los cultivos a escala mundial. De hecho, algunas familias de virus, como por ejemplo los Potyviridae, causan grandes pérdidas de productividad tanto en países desarrollados como en los emergentes, lo que se contrapone con la demanda de alimentos siempre creciente. Para limitar las infecciones por virus y su dispersión, la gestión de las enfermedades se realiza principalmente mediante la prevención, ya que los tratamientos curativos no son eficaces o son poco eficaces.

15 Se han identificado varios compuestos para intentar controlar a los virus de las plantas. El documento WO2011/030816 enseña el uso de ciertos derivados del ácido ascórbico para controlar ciertos virus de las plantas. El documento WO2012/016048 proporciona el uso de biomoléculas modificadas con azida como agentes antivíricos, incluyendo algunos contra virus de las plantas. El documento WO2014/050894 enseña el uso de otros compuestos relacionados con el ácido ascórbico para controlar a los virus de las plantas.

20 Las plantas han evolucionado para enfrentarse a las amenazas continuas usando sus recursos disponibles y equilibrando su asignación entre el uso para el crecimiento o la defensa contra las amenazas bióticas y abióticas. El silenciamiento inducido por ARN desempeña una parte importante en este equilibrio, conectando dinámicamente programas de desarrollo y las respuestas al estrés ambiental con cambios en la expresión de genes mediante el silenciamiento génico transcripcional (TGS) y el silenciamiento génico post-transcripcional (PTGS). La resistencia a las enfermedades de las plantas se basa en barreras ya formadas, metabolitos secundarios tóxicos y mecanismos de defensa inducibles. Al reconocer a los patógenos, las plantas frecuentemente inician una respuesta hipersensible, que lleva a la muerte celular en el sitio de la infección e impide que el patógeno se difunda. Además, la detección del patógeno dispara diversas defensas sistémicas inducibles, en partes de la planta que están distantes del sitio de la infección primaria. Este proceso, conocido como Resistencia Sistémica Adquirida (SAR), es eficaz en muchas especies de plantas. La resistencia que se obtiene es de duración prolongada y es eficaz contra infecciones posteriores por un amplio rango de patógenos, por ejemplo hongos, bacterias y virus.

35 La clase de fungicidas de la estrobilurina comprende una variedad de compuestos sintéticos protectores de las plantas de amplio espectro. En 2002, se demostró que la estrobilurina Piracloestrobina aumenta la resistencia del tabaco a la infección ya sea por el virus del mosaico del tabaco (TMV) o el patógeno del fuego salvaje, *Pseudomonas syringae pv tabaci* (Herms y col., Plant Physiology 2002, 130: 120–127). La piracloestrobina también fue capaz de aumentar la resistencia al TMV en plantas de tabaco transgénicas NahG que no son capaces de acumular cantidades significativas del ácido salicílico endógeno. La piracloestrobina aumenta la resistencia al TMV en el tabaco ya sea por acción corriente abajo del ácido salicílico (SA) en el mecanismo de señalización del SA o funcionando independientemente del SA. La última suposición es la más probable porque, en las hojas infiltradas, la piracloestrobina no causó la acumulación de proteínas (PR)-1 relacionadas con la patogénesis inducible por el SA que frecuentemente se utilizan como marcadores moleculares convencionales para la resistencia a las enfermedades inducida por el ácido salicílico. La aplicación de las de estrobilurinas se ha descrito ya sea por sí sola (WO 01/82701) o mezcladas con metiram (WO 2007/104669).

45 Entre las respuestas de defensa de la planta a los fitovirus, la vía antivírica de silenciamiento inducido por ARN es el sistema de defensa más amplio que afecta a la acumulación tanto local como sistémica de un amplio rango de virus. El silenciamiento inducido por ARN es un mecanismo que defiende directamente a las células de la planta hospedadora contra ácidos nucleicos exógenos, que incluyen virus y elementos transponibles. Esta defensa es suscitada por el ARN de cadena doble (ARNdc), obtenido de la amplificación de ácidos nucleicos invasivos, que es procesado por el huésped para dar ARN de interferencia pequeños (ARNip) con un tamaño de 20–24 nucleótidos (nt). Dichos ARNip se utilizan después para guiar el silenciamiento del ARN o ADN del elemento transponible o vírico por PTGS o TGS, respectivamente.

55 El silenciamiento inducido por ARN es por lo tanto un potente mecanismo antivírico por el cual el ARNip procesado por la enzima Dicer a partir de los intermediarios de la replicación del ARN de cadena doble vírico se carga en proteínas efectoras ARGONAUTE y se retornan para dirigir las hacia el ARN del genoma del invasor para inducir su degradación. Esta respuesta inmunológica innata es notablemente versátil porque, como está programada únicamente por características estructurales y de la secuencia de nucleótidos genómica, puede responder a prácticamente cualquier virus que ataque a las plantas (Shimura y col., 2011, *Biochimica et Biophysica Acta* 1809: 601-612). Una evidencia de la importancia del silenciamiento inducido por ARN en la defensa de las plantas, es que las plantas con una

disminución de la producción o la actividad de ARNi son hipersusceptibles a los fitovirus, y a la inversa han evolucionado muchos virus con supresores de ARNi para conservar su virulencia (Voinnet O. y col., Nature Review Microbiology 2013 Nov;11(11):745-60). ABEL ROSADO Y COL.: "Sortin1-Hypersensitive Mutants Link Vacuolar-Trafficking Defects and Flavonoid Metabolism in Vegetative Tissues", CHEMISTRY AND BIOLOGY, CURRENT BIOLOGY, vol. 18, n.º 2, páginas 187-197 explica el efecto de derivados de sortina sobre el transporte de vacuolas en plantas y resume las propiedades conocidas de los flavonoides en plantas, por ejemplo, en relación con el transporte de auxina y la defensa de las plantas. Este artículo también cita D. TREUTTER: "Significance of Flavonoids in Plant Resistance and Enhancement of Their Biosynthesis", PLANT BIOLOGY., vol. 7, n.º 6, páginas 581-591, que tratan los efectos protectores de los flavonoides contra el estrés en general en plantas.

Por lo tanto, aunque en el pasado se han identificado ciertos compuestos como potenciales inductores de ciertos mecanismos de defensa de las plantas contra los virus, persiste la necesidad de proveer sustancias activas apropiadas para estimular el mecanismo de defensa natural de las plantas contra los virus, en particular para estimular el mecanismo de defensa de amplio espectro no específico de las plantas basado en el silenciamiento de ARN contra los virus para controlar enfermedades víricas en las plantas.

### Definiciones

Según se usa en el presente documento, el término "halógeno" se refiere a un átomo de flúor, cloro, yodo o bromo.

Según se usa en el presente documento, el término "feniltio" se refiere al radical -S-fenilo.

Según se usa en el presente documento, el término "carboxi" se refiere al radical -COOH.

Según se usa en el presente documento, el término "nitro" se refiere al radical -NO<sub>2</sub>.

Según se usa en el presente documento, la expresión "sustancia activa" designa a un compuesto con la fórmula (I) según se ha descrito en el presente documento o a cualquier mezcla de los mismos.

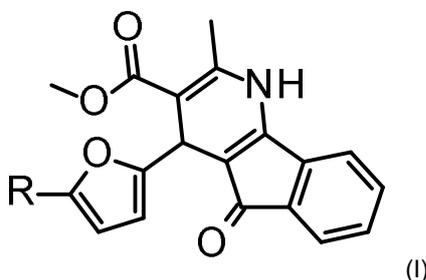
### Figura

La Figura 1 ilustra el análisis por qPCR de los niveles relativos de ARNm de SUL en plantas SUC-SUL siete días después del tratamiento con DMSO solo o Sortin1, normalizados para EXP10. Las barras de error representan la desviación estándar de tres experimentos independientes.

### Descripción detallada

Ahora se ha descubierto que los compuestos con la fórmula (I) según se desvelan en el presente documento son apropiados para estimular el mecanismo de defensa natural de las plantas contra los virus, en particular para estimular el mecanismo de defensa de las plantas contra los virus basado en el silenciamiento de ARN. Por lo tanto, los compuestos con la fórmula (I) según se desvelan en el presente documento pueden ser útiles para controlar enfermedades víricas en plantas. Según se usan en el presente documento, los términos "control" o "controlar" designan un control preventivo o curativo.

Por lo tanto, la presente invención se refiere a un procedimiento para controlar enfermedades víricas en plantas, más específicamente a un procedimiento para estimular el mecanismo de defensa natural de las plantas contra los virus, en particular para estimular el mecanismo de defensa de las plantas contra los virus basado en el silenciamiento de ARN. El procedimiento comprende aplicar a las plantas uno o más compuestos con la fórmula (I):



en el que R se selecciona entre el grupo que consiste en: hidrógeno, feniltio y fenilo sustituido, donde dicho fenilo está sustituido con uno o más sustituyentes que se seleccionan independientemente entre el grupo que consiste en: halógeno, preferiblemente cloro, flúor y bromo, carboxi y nitro.

En algunas formas de realización, la sustancia activa es un compuesto con la fórmula (I) donde R es un hidrógeno, un grupo feniltio o un grupo fenilo sustituido con uno o dos sustituyentes que se seleccionan independientemente entre el grupo que consiste en: halógeno, preferiblemente cloro, flúor y bromo, carboxi y nitro.

En algunas formas de realización preferidas, la sustancia activa es un compuesto con la fórmula (I) donde R se selecciona entre el grupo que consiste en: hidrógeno, feniltio, 2-carboxifenilo, 4-carboxifenilo, 3-clorofenilo, 3,4-diclorofenilo, 2,5-diclorofenilo, 3-carboxi-4-clorofenilo, 2-nitrofenilo y 2-bromo-4-nitrofenilo.

En algunas formas de realización más preferidas, la sustancia activa es un compuesto con la fórmula (I) donde R es

4-carboxifenilo. Dicho compuesto se conoce como Sortin1.

Sortin1 pertenece a los inhibidores de la clasificación que estimulan la secreción en levaduras. Se sabe que redirige el destino vacuolar de la carboxipeptidasa Y de plantas (CPY) y otras proteínas en células de *Arabidopsis* en suspensión y hace que dichas proteínas sean secretadas. Un tratamiento similar de las plántulas completas de *Arabidopsis* también dio como resultado el mismo efecto, lo que indica que el fármaco tiene una modalidad de acción similar tanto en células como en plantas intactas (Zouhar y col., PNAS 2004, 101, 25:9497–9501). En *Arabidopsis*, Sortin1 tiene efectos reversibles sobre el direccionamiento vacuolar de CPY, biogénesis de la vacuola, y desarrollo de la raíz. Sortin1 es altamente específica porque afecta el direccionamiento de un marcador del tonoplasto así como la biogénesis de vacuolas pero no al retículo endoplasmático, ni al retículo de Golgi, ni tampoco a los endosomas (Hicks y col., Current Opinion in Plant Biology 2010, 13:706–713).

Algunos compuestos con la fórmula (I) se pueden obtener comercialmente. Algunos otros se pueden preparar apropiadamente por procedimientos que se desvelan en los documentos WO2002085894, US20040082578, "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.

Típicamente se aplica a las plantas una cantidad eficaz de sustancia activa. La cantidad eficaz de sustancia activa que se aplica a las plantas dependerá de diversos factores, como por ejemplo de la naturaleza de la sustancia activa, de la formulación, de las plantas hacia las que se dirija (de la naturaleza de las plantas y de qué parte de las plantas), del procedimiento de aplicación, del propósito del tratamiento (profiláctico o terapéutico) y del virus hacia el que se dirigen. La cantidad que se aplica a las plantas pueden encontrarse apropiadamente dentro del intervalo entre 0,01 y 5 kg/ha, o entre 0,1 y 3 kg/ha, o entre 0,5 y 2 kg/ha.

Como se indicó anteriormente, la sustancia activa se aplica a las plantas. Según se usa en el presente documento, el término "plantas" incluye a las plantas y las partes de las mismas, como por ejemplo a las partes aéreas y/o subterráneas de las plantas así como el material cosechado. Las partes subterráneas de las plantas incluyen a la raíz, los rizomas, tubérculos, retoños, gajos, semillas y simientes. Las partes aéreas de las plantas incluyen tallos, corteza, brotes, hojas, flores, frutos, cuerpos fructificantes, cañas, agujas y ramas. Por lo tanto, la sustancia activa se puede aplicar eficientemente a la raíz, los rizomas, tubérculos, retoños, gajos, semillas, simientes, tallos, corteza, brotes, hojas, flores, frutos, cuerpos fructificantes, cañas, agujas, ramas, y material cosechado de las plantas. En ciertas formas de realización alternativas, el procedimiento para controlar enfermedades víricas en plantas comprende aplicar la sustancia activa que se divulga al hábitat de las plantas y/o a las plantas almacenadas.

La sustancia activa se puede aplicar eficazmente a una gran variedad de plantas. La misma se puede aplicar a plantas de las variedades que se pueden obtener comercialmente o están en uso. Sin embargo, también se entiende que "variedades de plantas" se refiere a plantas con rasgos nuevos que se han cultivado ya sea por cultivo tradicional, por mutagénesis o con ayuda de técnicas de ADN recombinante y/o a plantas que se pueden obtener por procedimientos de cultivo tradicional y optimización o bien por procedimientos biotecnológicos y de ingeniería genética o por combinaciones de dichos procedimientos; esto incluye a las plantas transgénicas y a las plantas que pueden ser protegidas por el Derecho de Obtentor de variedades vegetales o no.

La sustancia activa también se puede aplicar eficazmente a organismos modificados genéticamente (GMO, por las siglas en inglés de *Genetically Modified Organisms*). Las plantas modificadas genéticamente son plantas en las cuales un gen heterólogo se ha integrado al genoma de manera estable. La expresión "gen heterólogo" se refiere esencialmente a un gen que se ha provisto o armado en el exterior de las plantas y, cuando se introduce en el genoma nuclear, cloroplástico o mitocondrial, confiere propiedades agronómicas o de otro tipo nuevas o mejoradas a la planta transformada por expresión de una proteína o polipéptido de interés o disminuyendo la expresión o silenciando otro gen que esté presente en la planta, u otros genes que están presentes en la planta (usando, por ejemplo, tecnología antisentido, tecnología de cosupresión o tecnología de ARNi [ARN de interferencia]). Un gen heterólogo que está situado en el genoma se denomina también un transgén. Un transgén que está definido por su lugar en particular en el genoma de la planta se conoce como un evento de transformación, o evento transgénico.

Todas las plantas que tienen material genético que les confiere rasgos útiles especialmente ventajosos (ya sea que se obtengan por cría y/o por biotecnología) se pueden tratar con el procedimiento que se desvela.

Las plantas y variedades de plantas que se pueden tratar de manera similar de manera acorde a la invención son aquellas plantas que son resistentes a uno o más factores de estrés abióticos. Las condiciones de estrés abiótico pueden incluir, por ejemplo, condiciones de sequía, frío y calor, estrés osmótico, anegamiento, alto contenido de sal en el suelo, alta exposición a minerales, condiciones de presencia de ozono, condiciones de luz intensa, disponibilidad limitada de nutrientes nitrogenados, disponibilidad limitada de nutrientes con fósforo o la ausencia de sombra.

Las plantas y variedades de plantas que se pueden tratar de manera similar de acuerdo con la invención son aquellas plantas que se caracterizan por sus características de productividad mejoradas. La mejor productividad en dichas plantas de palma puede ser el resultado, por ejemplo, de una fisiología mejorada de la planta, un crecimiento mejorado de la planta y un desarrollo mejorado de la planta, como por ejemplo eficiencia en el uso del agua, eficiencia en la retención de agua, uso mejorado del nitrógeno, asimilación de carbono mejorada, fotosíntesis mejorada, mayor

eficiencia de germinación y maduración modificada. Una arquitectura mejorada de la planta puede influir más sobre el rendimiento (en condiciones de estrés y en condiciones que no son de estrés), entre cuyos factores se pueden citar el florecimiento temprano, control del florecimiento para la producción de semilla híbrida, vigor de las plántulas, tamaño de la planta, número de nodos y distancia internodal, crecimiento de la raíz, tamaño de la semilla, tamaño de la fruta, tamaño de la vaina, número de vainas o mazorcas, número de semillas por vaina o mazorca, masa de las semillas, mejor llenado de la semilla, menor dispersión de la semilla, menor dehiscencia de la vaina, y resistencia al vuelco. Otros rasgos relacionados con la productividad incluyen composición de la semilla, como por ejemplo contenido de carbohidratos, contenido de proteínas, contenido de aceite y composición del aceite, valor nutricional, reducción del contenido de compuestos antinutricionales, procesabilidad mejorada y aptitud para el almacenamiento mejorada.

Las plantas que se pueden tratar de manera similar de manera acorde a la invención son plantas híbridas que ya expresan las características de heterosis, o vigor híbrido, que generalmente dan como resultado mayor productividad, mayor vigor, mejor salud y mejor resistencia a factores de estrés bióticos y abióticos. Dichas plantas típicamente se generan cruzando una línea parental masculina estéril endogámica (el progenitor femenino) con otra línea parental masculina fértil endogámica (el progenitor masculino). La semilla híbrida típicamente se cosecha de las plantas masculinas estériles y se venden a los cultivadores. A veces, (por ejemplo en el maíz) las plantas masculinas estériles se pueden generar por despanojado (es decir la eliminación mecánica de los órganos reproductores masculinos o las flores masculinas); sin embargo, más típicamente, la esterilidad masculina es el resultado de determinantes genéticos en el genoma de la planta. En este caso, en particular cuando la semilla es el producto que se desea cosechar de las plantas híbridas, típicamente es útil asegurar que se restituya por completo la fertilidad masculina en las plantas híbridas que contienen los determinantes genéticos responsables de la esterilidad masculina. Esto se puede realizar asegurando que los progenitores masculinos tengan genes apropiados que sean capaces de restaurar la fertilidad masculina en las plantas híbridas que contienen los determinantes genéticos responsables de la esterilidad masculina. Los determinantes genéticos de esterilidad masculina pueden estar localizados en el citoplasma. Se han descrito algunos ejemplos de esterilidad masculina citoplasmática (CMS por las siglas en inglés de *Cytoplasmic Male Sterility*) por ejemplo para especies de Brassica (WO 1992/005251, WO 1995/009910, WO 1998/27806, WO 2005/002324, WO 2006/021972 y US 6.229.072). Sin embargo, los determinantes genéticos de esterilidad masculina también pueden estar localizados en el genoma nuclear. También se pueden obtener plantas masculinas estériles por procedimientos de biotecnología vegetal, como por ejemplo por ingeniería genética. Un medio particularmente ventajoso para generar plantas masculinas estériles se ha descrito en WO 89/10396, en el cual, por ejemplo, se expresa selectivamente una ribonucleasa tal como una barnasa en las células del tapete de los estambres. Por lo tanto, la fertilidad se puede restaurar por expresión en las células del tapete de un inhibidor de ribonucleasa tal como barstar (por ejemplo WO 1991/002069).

La sustancia activa es particularmente apropiada para controlar enfermedades víricas en las siguientes plantas: algodón, lino, vid, frutas, verduras, como por ejemplo *Rosaceae sp.* (por ejemplo frutos pomos tales como manzanas y peras, pero también frutos de carozo tales como damascos, cerezas, almendras y duraznos, y bayas tales como las frutillas), *Ribesioideae sp.*, *Juglandaceae sp.*, *Betulaceae sp.*, *Anacardiaceae sp.*, *Fagaceae sp.*, *Moraceae sp.*, *Oleaceae sp.*, *Actinidaceae sp.*, *Lauraceae sp.*, *Musaceae sp.* (por ejemplo bananeros y plantaciones de bananas), *Rubiaceae sp.* (por ejemplo café), *Theaceae sp.*, *Sterculiaceae sp.*, *Rutaceae sp.* (por ejemplo limones, naranjas y pomelo); *Solanaceae sp.* (por ejemplo tomates), *Liliaceae sp.*, *Asteraceae sp.* (por ejemplo lechuga), *Umbelliferae sp.*, *Cruciferae sp.*, *Chenopodiaceae sp.*, *Cucurbitaceae sp.* (por ejemplo pepinos), *Alliaceae sp.* (por ejemplo puerro, cebolla), *Papilionaceae sp.* (por ejemplo arvejas); plantas de los principales cultivos, como por ejemplo *Graminae sp.* (por ejemplo maíz, césped, cereales tales como trigo, centeno, arroz, cebada, avena, mijo y trigo tritical), *Asteraceae sp.* (por ejemplo girasol), *Brassicaceae sp.* (por ejemplo repollo blanco, repollo colorado, brócoli, coliflor, repollitos de Bruselas, pak choi, colirrábano, rabanitos, y colza oleaginosa, mostaza, rábano picante y berro), *Fabaceae sp.* (por ejemplo porotos, maníes), *Papilionaceae sp.* (por ejemplo poroto de soja), *Solanaceae sp.* (por ejemplo patatas), *Chenopodiaceae sp.* (por ejemplo remolacha azucarera, remolacha forrajera, acelga suiza, remolacha); plantas útiles y plantas ornamentales para jardines y áreas dedicadas a la silvicultura; y variedades modificadas genéticamente de cada una de dichas plantas.

Más específicamente, la sustancia activa es apropiada para controlar enfermedades víricas en plantas.

La sustancia activa es particularmente apropiada para controlar virus de las siguientes familias o géneros: *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* y *Umbravirus*.

Preferentemente, la sustancia activa se utiliza para controlar virus de las siguientes especies: virus del mosaico del nabo, virus del arrugamiento del nabo (TBV), virus del moteado de la vaina de poroto (BPMV), virus del mosaico del coliflor, virus del mosaico del tabaco, virus del enanismo arbustivo del tomate, virus del raquitismo andrajoso del arroz (RRSV), virus del mosaico del pepino, virus del enanismo amarillo de la cebada, virus del amarillo de la remolacha, virus del amarillo de la lechuga, virus del mosaico del maíz, virus del enanismo del maní y virus del mosaico severo de la patata (PVY).

La sustancia activa se puede aplicar a las plantas en cualquier forma que sea apropiada. Por ejemplo, la sustancia activa se puede aplicar en la forma de una suspensión, por ejemplo una suspensión a base de agua o aceite, emulsión,

solución, polvo tal como polvo humectable, espuma, pasta, gránulos, micropartículas, aerosoles o microencapsulados. Las formulaciones apropiadas se pueden preparar de las maneras convencionales. Las formulaciones que comprenden la sustancia activa pueden ser composiciones listas para el uso, es decir composiciones que se pueden aplicar directamente a las plantas mediante un dispositivo apropiado, o pueden estar en la forma de concentrados comerciales que se deben diluir antes de usar.

Las formulaciones pueden comprender la sustancia activa sola o en combinación con otras sustancias activas tales como insecticidas, atractores, esterilizantes, bactericidas, acaricidas, nematocidas, otros fungicidas adicionales, sustancias reguladoras del crecimiento, herbicidas, protectores y/o fertilizantes.

La sustancia activa o las formulaciones que las comprenden se pueden aplicar a las plantas de cualquiera de las maneras de costumbre, por ejemplo al regar, por rociado, espolvoreo, o atomización. La sustancia activa se puede aplicar directa o indirectamente a las plantas, al medio ambiente, al hábitat y/o al lugar de almacenamiento. Por ejemplo, la sustancia activa se puede inyectar en la corteza o por debajo de la misma, se puede verter o rociar alrededor de la planta sobre el suelo (tierra, tierra arenosa, tierra con gravilla, suelo rocoso, suelo legamoso o suelo mixto). Un tipo adicional de aplicación es por rociado sobre la planta y las partes de dicha planta. En forma seca, la composición de la sustancia activa se puede mezclar con el material del suelo (tierra, tierra arenosa, tierra con gravilla, suelo rocoso, suelo legamoso o suelo mixto) y/o las semillas. La sustancia activa se puede aplicar al sistema de irrigación, ya sea en forma seca o bien líquida. Preferentemente, la sustancia activa se aplica a las plantas por rociado.

La presente invención también se refiere al uso de compuestos con la fórmula (I) según se desvelan en el presente documento para controlar enfermedades víricas en plantas, más específicamente para estimular el mecanismo de defensa natural de las plantas contra los virus, en particular para estimular el mecanismo de defensa de las plantas contra los virus basado en el silenciamiento de ARN. Las plantas y/o virus se han expuesto anteriormente.

Los compuestos con la fórmula (I) estimulan el mecanismo de defensa de las plantas basado en el silenciamiento de ARN mediante un aumento en la producción de ARN pequeño. De manera ventajosa, la capacidad de los compuestos con la fórmula (I) de aumentar la producción de ARN pequeño también se puede utilizar en plantas modificadas genéticamente transformadas con una construcción de ARNi diseñada para mejorar rasgos agronómicos y/o para proveer resistencia contra los patógenos (por ejemplo bacterias, hongos), resistencia contra insectos/plagas y/o tolerancia al estrés. Por lo tanto, la presente invención también se refiere al uso de uno o más compuestos con la fórmula (I) para mejorar rasgos agronómicos y/o para proveer resistencia contra los patógenos, resistencia contra insectos/plagas y/o tolerancia al estrés en plantas modificadas genéticamente transformadas con una construcción de ARNi por aumento de la producción de ARN pequeño.

La presente invención se explica de manera más detallada con ayuda de los siguientes ejemplos.

### Ejemplos

#### **Ejemplo 1: Identificación de moduladores de la maquinaria del silenciamiento de las plantas – uso de plantas reporteras de SUC-SUL**

La vía del silenciamiento inducido por ARN de las plantas se puede monitorear fácilmente con las plantas reporteras creadas artificialmente que se denominan "plantas reporteras de SUC-SUL de *Arabidopsis*" (Dunoyer y col., Nat. Genet. 37, 1356-1360, 2005).

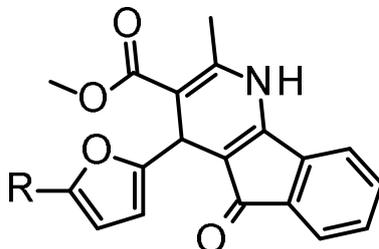
Las plantas reporteras de SUC-SUL de *Arabidopsis* son plantas transgénicas que expresan un ARN de cadena doble con repetición invertida (IR) diseñado para dirigirse hacia el transcrito SULPHUR (SUL) de la vasculatura bajo el control del promotor SUC2 (Truernit y col., Plant 196(3), 564-570, 1995). Una vez expresado, el ARNd<sub>h</sub> es procesado para dar ARN de interferencia pequeños que dirigen el silenciamiento post-transcripcional de genes autónomo no celular del transcrito SULPHUR, causando a su vez una clorosis entre las venas de las hojas. Como la clorosis que se observa es el resultado del silenciamiento del transcrito SULPHUR, una expansión de la clorosis, observable directamente en las plantas, se correlaciona con una intensificación de la vía del silenciamiento inducido por ARN al nivel molecular.

Cinco días después de la germinación se rociaron plántulas de *A. thaliana* (n= 6) con diferentes soluciones que contienen 300 ppm de una molécula activa de acuerdo con la invención, con dimetilsulfóxido (DMSO) al 5 % y una formulación en forma de premezcla concentrada emulsionable estándar (EC) (6 plántulas/prueba). Se llevaron a cabo cuatro repeticiones para cada molécula. Las plantas de control se trataron con DMSO solo (plantas sometidas a tratamiento simulado). Los efectos de los tratamientos sobre las plantas reporteras de SUC-SUL se evaluaron 14 días después del tratamiento bajo trans-iluminación y se registraron digitalmente con un microscopio estereoscópico midiendo la superficie y la intensidad de la zona clorótica (porcentaje de clorosis). Se llevaron a cabo dos experimentos independientes para estimar el promedio del porcentaje de clorosis para cada molécula.

A continuación, en la tabla 1 se muestran los resultados. El tratamiento con 300 ppm de Sortin1 y análogos de la misma permitió obtener un significativo incremento en el porcentaje de clorosis confirmando la actividad de la sustancia activa como supuestos intensificadores robustos del silenciamiento inducido por ARN.

Para descartar la acción directa de las moléculas sobre el promotor y no sobre la maquinaria del silenciamiento

inducido por ARN, luego se probaron las sustancias activas que se identificaron por su capacidad de aumentar la superficie y la intensidad de la zona clorótica, en una segunda etapa, en algunas plantas reporteras de AtSUC2-GFP, que indican específicamente la actividad del promotor SUC2 (Wright y col., Plant Physiol. 131, 1555-1565, 2003).



ID	R	Promedio del % de clorosis
1	4-carboxifenilo	34,0
2	2-carboxifenilo	33,2
3	3,4-diclorofenilo	31,0
4	3-carboxi-4-clorofenilo	29,9
5	2-nitrofenilo	26,6
6	SPh	23,1
7	3-clorofenilo	21,5
8	2,5-diclorofenilo	21,4
9	H	20,6
10	2-bromo-4-nitrofenilo	19,1

5 Tabla 1: Evaluación de Sortin1 (ID del compuesto N.º 1) y análogos de la misma en plantas reporteras de SUC-SUL. El nivel de clorosis de las plantas sometidas al tratamiento simulado alcanzó el 10%.

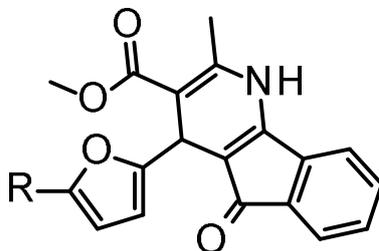
### Ejemplo 2: Confirmación del efecto molecular de los moduladores del silenciamiento

10 El efecto intensificador de Sortin1 sobre la maquinaria del ARNi se ha validado a los niveles fenotípico y molecular. Se rociaron plantas de *Arabidopsis* SUC-SUL de cuatro semanas de vida en la etapa de roseta con 200 ppm de Sortin1. Siete días después del tratamiento, se vio que Sortin1 indujo una evidente expansión del fenotipo clorótico centrado en las venas de las hojas dependiente del ARNi, que no se observó con el DMSO solo (control de tratamiento simulado).

15 Se recolectaron los tejidos aéreos de las plantas y se analizaron molecularmente usando metodologías del estado actual de la tecnología. Hubo una correlación entre la expansión visual de la clorosis y las reducciones de los niveles del transcrito *SUL*, analizados por qRT-PCR en tiempo real (Figura 1), así como con reducciones de los niveles de proteína *SUL* cuantificables por análisis de transferencia de Western. Además, dichos efectos estuvieron asociados con una excesiva acumulación de ARNi largo tanto de 21-nt como de 24-nt derivado del transgénico *SUL*. En conjunto, dichos datos dan sustento a la inducción de la vía del ARNi de la planta por Sortin1.

## REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para controlar enfermedades víricas en plantas, que comprende aplicar a las plantas por lo menos un compuesto de fórmula (I):



- 5 (I)
- en el que R se selecciona entre el grupo que consiste en: hidrógeno, feniltio y fenilo sustituido, en el que dicho grupo fenilo está sustituido con uno o más sustituyentes que se seleccionan independientemente del grupo que consiste en: halógeno, carboxi y nitro.
- 10 2. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que R se selecciona del grupo que consiste en: hidrógeno, feniltio, 2-carboxifenilo, 4-carboxifenilo, 3-clorofenilo, 3,4-diclorofenilo, 2,5-diclorofenilo, 3-carboxi-4-clorofenilo, 2-nitrofenilo y 2-bromo-4-nitrofenilo.
3. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que R es 4-carboxifenilo.
4. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el control se basa en la estimulación del mecanismo de defensa natural de las plantas contra los virus.
- 15 5. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 4, en el que el mecanismo de defensa natural de las plantas contra los virus es un mecanismo de defensa de la planta basado en el silenciamiento de ARN.
6. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicho procedimiento es un procedimiento preventivo.
- 20 7. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dichas plantas se seleccionan entre el grupo que consiste en: algodón, lino, vid, fruta, verduras, plantas de cultivo, plantas ornamentales para jardines y zonas boscosas y variedades modificadas genéticamente de cada una de estas plantas.
8. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dichas plantas se seleccionan entre el grupo que consiste en: *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.*, *Asteraceae sp.*, *Brassicaceae sp.*, *Fabaceae sp.*, *Papilionaceae sp.*, *Solanaceae sp.* y *Chenopodiaceae sp.*.
- 25 9. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dichos virus se seleccionan entre el grupo que consiste en las siguientes familias o géneros: *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* y *Umbravirus*.
- 30 10. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dichos virus se seleccionan entre el grupo que consiste en: virus del mosaico del nabo, virus del arrugamiento del nabo, virus del moteado de la vaina de poroto, virus del mosaico del coliflor, virus del mosaico del tabaco, virus del enanismo arbustivo del tomate, virus del raquitismo andrajoso del arroz, virus del mosaico del pepino, virus del enanismo amarillo de la cebada, virus del amarillo de la remolacha, virus del amarillo de la lechuga, virus del mosaico del maíz, virus del enanismo del maní y virus del mosaico severo de la patata.
- 35 11. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el compuesto de fórmula (I) se aplica rociando las plantas.
- 40 12. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el compuesto de fórmula (I) se aplica a las plantas en una cantidad dentro del intervalo de 0,01 a 5 kg/ha.
13. El uso de un compuesto de fórmula (I) según se define en la reivindicación 1, 2 o 3 para estimular el mecanismo de defensa natural de las plantas contra los virus.

14. El uso de acuerdo con la reivindicación 13 para estimular el mecanismo de defensa de las plantas basado en el silenciamiento de ARN.

5 15. El uso de un compuesto con la fórmula (I) según se define en la reivindicación 1, 2 o 3 para mejorar rasgos agronómicos y/o para proporcionar resistencia contra los patógenos, insectos, plagas y/o para proporcionar tolerancia al estrés en plantas modificadas genéticamente transformadas con una construcción de ARNi.

Figura 1/1

