



(12) Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

(19) DD (11) 241 187 A1

4(51) A 01 N 57/12

## AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21) WP A 01 N / 280 933 7

(22) 24.09.85

(44) 03.12.86

(71) Martin-Luther-Universität Halle–Wittenberg, Büro für Neuererbewegung und Schutzrechte, 4020 Halle, Universitätsplatz 10, DD

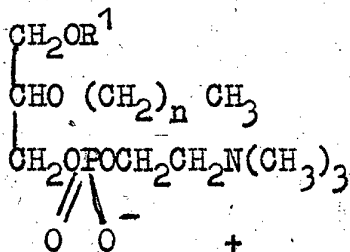
(72) Nuhn, Peter, Prof. Dr.; Kluge, Siegfried, Doz. Dr. Dipl.-Biol.; Schuster, Gottfried, Prof. Dr., DD

(54) Verfahren zur Wirkungsverstärkung antiphytoviraler Pflanzenschutzmittel

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Erhöhung der Wirkung antiphytoviraler Pflanzenschutzmittel. Diese wird erfindungsgemäß dadurch erreicht, daß in 1-Position durch H, Alkyl bzw. Aalkyl substituierte 2-Alkyl-glycero-3-phosphocholine, in denen die Länge der zweiständigen Alkylkette zwischen 7 und 21 C-Atomen schwanken kann, antiphytoviralen Pflanzenschutzmitteln zugesetzt werden. Hierdurch werden deren antiphytovirale Wirkungen synergetisch erhöht. Es kommt zu einer so starken Verminderung der Virusreplikation, daß in praxi Neuinfektionen zu einem hohen Prozentsatz eliminiert werden können, wodurch eine spürbare Verbesserung von Pflanzgut vegetativ vermehrter Pflanzen einschließlich von Regeneraten aus Meristemkulturen erreicht wird. Ebenso können virusbedingte Ertragsdepressionen in stärkerem Umfang als durch die einzelnen Mittel vermindert oder sogar gänzlich vermieden werden. Das Spektrum der beeinflussbaren Viren wird erweitert. Der Ausbildung präparateresistenter Viren wird entgegengewirkt.

**Patentansprüche:**

1. Verfahren zur Wirkungsverstärkung antiphytoviraler Pflanzenschutzmittel, **dadurch gekennzeichnet**, daß 1-substituierte 2-Alkylglycero-3-phosphocholine der allgemeinen Formel



in der R<sup>1</sup>, H, Alkyl sowie Aralkyl und n 7 bis 21 bedeuten, antiphytoviralen Präparaten zugesetzt werden, wobei die Molverhältnisse je nach Virus-Wirtkombination zwischen 10<sup>0</sup>:1 und 10<sup>-3</sup>:1 variieren können.

2. Verfahren nach Anspruch Punkt 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Kombinationspartner in einer Präparation vereinigt sind oder daß getrennt Präparationen vor dem Ausbringen auf die Pflanzen in Tankmischungen vereinigt werden, wobei die jeweiligen Präparationen neben den erfindungsgemäßen Wirkstoffen auch Tenside, Haftmittel und/oder weitere Formulierungsmittel enthalten.

**Anwendungsgebiet der Erfindung**

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Erhöhung der Wirkung antiphytoviraler Verbindungen, die als Pflanzenschutzmittel angewendet werden sollen. Angesichts der großen Ertragsverluste, die durch Viren bei vielen landwirtschaftlichen und gärtnerischen Kulturpflanzen, z. B. bei Kartoffel, Zuckerrübe, Tomate, Tabak und zahlreichen Leguminosen hervorgerufen werden, ist es dringend erforderlich, die sogenannten klassischen, zumeist indirekten Maßnahmen der Virusbekämpfung, zu denen z. B. Selektion erkrankter Pflanzen, Bekämpfung der Virusüberträger und Quarantänemaßnahmen gehören, durch hochwirksame Verfahren der antiphytoviralen Chemotherapie zu ergänzen, um höhere und stabilere Erträge zu erreichen.

**Charakteristik der bekannten technischen Lösungen**

In den letzten Jahren ist eine größere Anzahl von Präparaten aufgefunden bzw. entwickelt worden, die die Vermehrung von Pflanzenviren hemmen. Zu diesen gehören Analoga von Purin- und Pyrimidinbasen bzw. von entsprechenden Nucleosiden und Nucleotiden, Antibiotika aus Mikroorganismen oder höheren Pflanzen, Polyanionen, substituierte Triazine und hydrierte Triazine, Harnstoffe und Carbamate, Thioharnstoffe, Guanidine, bestimmte Verbindungen mit Azinstruktur, Thiadiazole und Oxazole. Eine Übersicht hierüber ist u. a. in der Patentschrift DD-PS 157 662 gegeben. In letzter Zeit sind darüber hinaus antiphytovirale Alkyl- und Arylsulfonate (DD 216 610 A 1 vom 19. 12. 1984),  $\alpha$ -Benzylthiocarbonyliminoverbindungen (DD 221 911 A 1 vom 8. 5. 1985), Alkyl-Lysophospholipide (DD 222 491 A 1 vom 22. 5. 1985), Lipidextrakte und daraus isolierte Fraktionen, die bei der Fermentation von Kohlenwasserstoffen aus Hefebiomassen gewonnen werden (WP A 01 N/0265 0507 vom 16. 3. 1984), durch partielle Hydrolyse entsprechender Phosphatidfraktionen gewonnene antiphytovirale Verbindungen (WPA 01 N/265 0515 vom 9. 7. 84) sowie Rhamnolipide (WP C 07 C/267 1046 vom 7. 9. 84) bekannt geworden. Noch immer bedarf die antiphytovirale Chemotherapie jedoch dringend der Weiterentwicklung.

Einerseits sind noch wirksamere Präparate wünschenswert. Darüber hinaus wirkt jede antiphytovirale Verbindung nur gegen eine begrenzte Anzahl von Viren, wie das ähnlich bei Fungiziden und Insektiziden bezüglich ihrer Wirkung gegen Schadpilze und Schadinsekten seit langem bekannt ist. Bestimmte Problemviren werden noch immer kaum chemotherapeutisch erfaßt. Schließlich ist infolge der starken Mutabilität einer großen Zahl von Pflanzenviren zu befürchten, daß sehr rasch gegenüber den antiviralen Präparaten resistente Virusformen entstehen.

Einen Weg zur Steigerung der Wirksamkeit antiphytoviraler Präparationen sowie zur Erhöhung der Anzahl der erfaßten Viren bei gleichzeitiger Verminderung der Gefahr für die Entstehung von resistenten Viren stellt die Erzeugung eines synergetischen Effekts durch Kombination von zwei und mehr antiphytoviralen Verbindungen dar. Beispiele für synergetische Steigerung antiphytoviraler Aktivitäten durch Kombination verschiedener antiphytoviraler Präparationen mit 2,4-Dioxohexahydro-1,3,5-triazin sind in den Patentschriften DD 153 953 vom 17. 2. 82 und DD 160 762 vom 7. 3. 84 angeführt. Die entsprechenden Möglichkeiten der Wirkungsverstärkung antiphytoviraler Präparationen sind jedoch bei weitem noch nicht ausgeschöpft.

**Ziel der Erfindung**

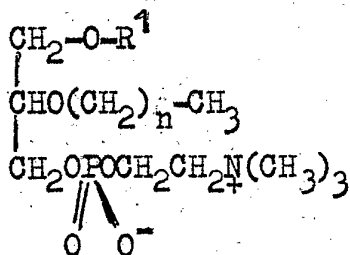
Das Ziel der Erfindung besteht darin, die Wirksamkeit der antiphytoviralen Chemotherapie weiter zu verbessern und gleichzeitig durch Mutation der Viren die mögliche Ausbildung von präparatenresistenten Virusstämmen zu erschweren, ferner die Effektivität von Verfahren zur Gewinnung virusfreien Zuchtmaterials vegetativ vermehrter Pflanzen zu erhöhen, indem geeignete antiphytovirale Präparate in Kombination zur Anwendung kommen, wobei die erzielten Synergismen bezüglich ihres Umfangs die bisher vorgefundenen überschreiten sollen.

### Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, Stoffe aufzufinden, die aufgrund ihrer chemischen Struktur in der Lage sind, die Wirksamkeit hochaktiv antiphytoviraler Präparate, z. B. von Analoga von Kataboliten von Pyrimidinbasen, wie 2,4-Dioxohexahydro-1,3,5-triazin, von Analoga von Anaboliten von Purinbasen, wie 1-β-D-Ribofuranosyl-1,2,4-triazol-3-carboxamid (Ribavirin), oder von Alkansulfonaten wesentlich zu verstärken und hierdurch

- die Effektivität der Virusfreimachung von Zuchtmaterial der Kartoffel im Wege der Meristem-(Sproßspitzen-)kultur weiter zu erhöhen;
- die Zahl der natürlichen Neuinfektionen, z. B. durch virusübertragende Insekten, weiter zu vermindern und hierdurch bei der Kartoffel sowie anderen vegetativ vermehrten Pflanzen die Anzahl virusinfizierter Knollen bzw. anderweitiger Fortpflanzungskörper zu verringern, um auf diese Weise den Gesundheitszustand des Pflanzgutes und damit die Voraussetzungen für gute Ernten im folgenden Jahr wesentlich zu verbessern;
- die Virusvermehrung weiter zu verlangsamen und hierdurch die virusbedingten Ertragsdepressionen des Erntegutes weiter zu verringern;
- die Zahl der mit einer Präparation chemotherapeutisch erfaßbaren Viren und damit die Effektivität der antiphytoviralen Chemotherapie zu erhöhen.

Die Aufgabe wird erfindungsgemäß dadurch gelöst, daß 1-substituierte 2-Alkyl-glycero-3-phosphocholine der allgemeinen Formel



in der R<sup>1</sup> für H, Alkyl, Aralkyl und n für 7 bis 21 stehen, in geeigneter Weise mit antiphytoviralen Präparaten, wie z. B. 2,4-Dioxohexahydro-1,3,5-triazin, 1-β-D-ibofuranosyl-1,2,4-triazol-3-carboxamid (Ribavirin) oder Alkansulfonaten kombiniert in Anwendung gebracht werden, wobei die zu kombinierenden Wirkstoffe mit inerten Verdünnungsmitteln sowie mit geeigneten Formulierungsmitteln versetzt und zu Spritzpulvern, Pasten, Emulsionskonzentraten usw. verarbeitet werden können. Es hat sich als vorteilhaft erwiesen, wenn der Wirkstoffgehalt 10 bis 90% des Kombinationspräparates ausmacht, das kurz vor der Anwendung mit Wasser zu Spritzbrühen bzw. bei gut wasserlöslichen Verbindungen zu Spritzlösungen dispergiert wird. Das molare Verhältnis, in dem die beiden Kombinationspartner zueinander stehen, schwankt je nach der zu behandelnden Virus-Wirt-Kombination zwischen 10<sup>0</sup>:1 und 10<sup>-3</sup>:1.

Die erfindungsgemäßen Synergisten können mit dem jeweiligen antiphytoviralen Pflanzenschutzmittel in einer gemeinsamen Präparation kombiniert sein, die darüber hinaus Tenside, Haftmittel und/oder weitere Formulierungsmittel enthalten kann. Der erfindungsgemäße Synergist kann jedoch ebenso wie das jeweilige antiphytovirale Pflanzenschutzmittel auch getrennt zu Präparationen verarbeitet werden, die jeweils Tenside, Haftmittel und/oder weitere Formulierungsmittel enthalten können. In diesen Fällen können die beiden Präparationen so gestaltet sein, daß sie vor der Ausbringung auf die Pflanzen in Tankmischungen vereinigt und dann rationell gemeinsam ausgebracht werden. Dabei wird bei Herstellung der Tankmischung das therapeutisch erforderliche Molverhältnis (s. o.) eingestellt.

### Ausführungsbeispiele

Die Erfindung soll nachstehend an fünf Ausführungsbeispielen näher erläutert werden.

Zur Kennzeichnung der erfindungsgemäßen Wirkungsverstärkung antiphytoviraler Pflanzenschutzmittel wurden vor allem Ganzpflanzentests an Solanaceen bzw. Leguminosen, besonders an *Nicotiana tabacum* L. ‚Samsun‘ (Tabak) und *Pisum sativum* convar. *speciosum* (Dierb.) ‚Alef, Nadja‘ (Erbse) herangezogen. Als Testviren fanden häufig und stark schädigende Pflanzenviren Verwendung, und zwar das Kartoffel-X-Virus (= potato virus X = PVX), das Kartoffel-Y-Virus (= potato virus Y = PVY), das Tabakmosaikvirus (= tobacco mosaic virus = TMV) und das multikomponente Rotkleescheckungsvirus (= red clover mottle virus = RCMV), dessen Genom auf mehreren Viruspartikeln verteilt ist, wodurch sich Erschwernisse bei der antiphytoviralen Chemotherapie ergeben können. Die Viren wurden unter Verwendung eines Abrasivums (Karbonpuder, Korngröße 500) in untere Blätter inokuliert. Jeweils 2 Tage vor und 2 Tage nach der Inokulation wurden die einzelnen Präparate oder Synergisten bzw. die Kombinationen von Präparat und Synergist unter Zusatz von 0,2% Fekama-Haftmittel 3× bis zur Tropfnässe besprüht. Bei *Pisum sativum* erfolgte die Behandlung 1 Tag vor und 1 Tag nach der Inokulation. Die aus den Ausführungsbeispielen ersichtlichen Konzentrationen sind in Vorversuchen ermittelt worden. Die Kontrollen wurden mit Wasser unter Zusatz von 0,2% Fekama-Haftmittel besprüht. 5 bis 7 Tage nach der Inokulation wurde die Viruskonzentration im obersten inokulierten Blatt und 12 bis 20 Tage nach der Inokulation in höher inserierten Blättern, die vom obersten inokulierten Blatt durch mindestens 2 Blätter getrennt waren, serologisch im Präzipitationstropfentest unter Anwendung der Verdünnungsendpunktbestimmung (Beispiele 1,

3 und 5; Beschreibung aller Testmanipulationen bei G. SCHUSTER, Archiv Phytopath. u. Pflanzenschutz **13**, 1977, 231-241), bzw. mittels Rocket-Immunelektrophorese (Beispiel 2; Testbeschreibung bei J. KRÖLL, Zbl. Mikrobiol. II, **140**, 1985, 225-230) ermittelt. Im Falle RCMV-infizierter Erbsenpflanzen wurden die ganzen Pflanzen 11 Tage nach der Inokulation geerntet und der Virusgehalt mit dem serologischen Ringtest (Beispiel 4; Testbeschreibung bei S. KLUGE u. K. MARCINKA, Acta virol. **23**, 1979, 148-152) bestimmt. Jedes Versuchsglied umfaßte mindestens 10 Einzelpflanzen, bei denen die Viruskonzentration jeweils getrennt ermittelt wurde. Aus den Einzelergebnissen wurde für jedes Versuchsglied der Mittelwert gebildet. Diese mittleren Viruskonzentrationen sind in den Beispielen relativ zur Kontrolle angegeben. Die Signifikanz der zwischen Kontrolle bzw. anderweitigem Bezugswert und Versuchsgliedern vorgefundenen, in Relativwerten zum Ausdruck gebrachten Differenzen wurde im t-Test geprüft. Das Prüfergebnis wurde neben den in Prozentsätzen zum Ausdruck gebrachten Differenzen in den bekannten Symbolen angegeben:

- :  $p > 5\%$
- + :  $5\% \geq p > 1\%$
- ++ :  $1\% \geq p > 0,1\%$
- +++ :  $0,1\% \geq p$

p = Überschreitungswahrscheinlichkeit.

**Beispiel 1** zeigt, daß durch erfindungsgemäße Synergisten die Wirkung sehr geringer Mengen von DHT (2,4-Dioxohexahydro-1,3,5-triazin) sowohl im inokulierten als auch im sekundär infizierten Blatt beträchtlich verstärkt wird.

**Beispiel 2** läßt erkennen, daß die erfindungsgemäßen Synergisten auch die Wirkung des DHT gegenüber dem schwierig zu bekämpfenden Kartoffel-Y-Virus beträchtlich verstärken, was infolge der starken Verbreitung des Virus und der großen, durch dieses Virus verursachten Schäden von besonderer Bedeutung ist und einen erheblichen Fortschritt zum bisherigen Stand erbringt.

**Beispiel 3** macht deutlich, daß auch die Wirkung des DHT gegen das gegenüber antiphytoviralen Präparaten und anderweitigen Chemikalien sehr widerstandsfähige Tabakmosaik-Virus durch Zusatz der erfindungsgemäßen Synergisten gesteigert wird.

**Beispiel 4** zeigt, daß die Wirkung von DHT gegen das multikomponente Rotkleescheckungsvirus durch die erfindungsgemäßen Synergisten beträchtlich gesteigert wird. Hierdurch ergibt sich ein beachtenswerter Ansatz zur Chemotherapie der weitverbreiteten, häufig multikomponenten Leguminosenviren, die die Erträge der eiweißreichen Nahrungs- und Futterpflanzen zur Zeit beträchtlich schmälern.

**Beispielsreihe 5** zeigt, daß die erfindungsgemäßen Synergisten nicht nur die antiphytovirale Wirkung von DHT, sondern auch diejenige verschiedener anderer bedeutsamer antiphytoviraler Verbindungen, wie z. B. 1-β-D-Ribofuranosyl-1,2,4-triazol-3-carboxamid (= Ribavirin) sowie von Alkanmonosulfonaten (Alkankettenlängen C9 bis C16) vor allem in sekundär infizierten Blättern beträchtlich verstärken. Dabei ist besonders bedeutsam, daß die Wirkung des sehr teuren Ribavirin in einem Maße verstärkt wird, daß zur Behandlung eines Hektars landwirtschaftlicher Kulturfläche nunmehr 15g Ribavirin ausreichen.

**Beispiel 1:**

Konzentration des Kartoffel-X-Virus (PVX) in primär infizierten (inokulierten) und sekundär infizierten Blättern des systemischen Wirtes *Nicotiana tabacum* L. 'Samsun' in Relativwerten (Viruskonzentration der unbehandelten Kontrolle = 100%) nach Behandlung mit DHT (I:0,5; II:0,25 m mol), einem erfindungsgemäßen Synergisten (2-Hexadecyl-glycero-3-phosphocholin, I:1; II:0,7 m mol) und einer Kombination von DHT und Synergisten; Virusgehaltsbestimmung serologisch im Präzipitationstropfentest durch Endpunktbestimmung; Verdünnung jeweils 1:1 mit physiologischer Kochsalzlösung

	relative Viruskonzentration (Kontrolle = 100%)			
	primär inf. Blätter		sekundär inf. Blätter	
	I	II	I	II
unbehandelte Kontrolle (K)	100	100	100	100
DHT gegenüber K	28 <sup>+++</sup>	66 <sup>+</sup>	6 <sup>+++</sup>	18 <sup>+++</sup>
erf. gem. Synergist gegenüber K	44 <sup>++</sup>	100 <sup>·</sup>	23 <sup>++</sup>	140
Kombination gegenüber K	18 <sup>+++</sup>	54 <sup>++</sup>	2 <sup>+++</sup>	8 <sup>+++</sup>
Kombination gegenüber DHT	64 <sup>+</sup>	82 <sup>·</sup>	33 <sup>++</sup>	42 <sup>+</sup>
Kombination gegenüber erf. gem. Synergist	41 <sup>++</sup>	54 <sup>+</sup>	9 <sup>+++</sup>	5 <sup>+++</sup>

**Beispiel 2:**

Konzentration des Kartoffel-Y-Virus (PVY) in primär infizierten (inokulierten) und sekundär infizierten Blättern des systemischen Wirtes *Nicotiana tabacum* L. 'Samsun' in Relativwerten (Viruskonzentration der Kontrolle = 100%) nach Behandlung mit DHT (10 m mol), einem erfindungsgemäßen Synergisten (2-Hexadecyl-glycero-3-phosphocholin, 1 m mol) und einer Kombination von DHT und Synergisten; Virusgehaltsbestimmung mittels der Rocket-Immunelektrophorese

	relative Viruskonzentration (Kontrolle = 100 %)	
	primär inf. Blätter	sekundär inf. Blätter
unbehandelte Kontrolle (K)	100	100
DHT gegenüber K	62 <sup>+</sup>	46 <sup>++</sup>
erf. gem. Synergist gegenüber K	73 <sup>+</sup>	71 <sup>+</sup>
Kombination gegenüber K	48 <sup>+++</sup>	31 <sup>+++</sup>
Kombination gegenüber DHT	77 <sup>+</sup>	67 <sup>+</sup>
Kombination gegenüber erf. gem. Synergist	66 <sup>++</sup>	44 <sup>++</sup>

**Beispiel 3:**

Konzentration des Tabakmosaik-Virus (TMV) in primär infizierten (inokulierten) und sekundär infizierten Blättern des systemischen Wirtes *Nicotiana tabacum* L. ‚Samsun‘ in Relativwerten (Viruskonzentration der Kontrolle = 100%) nach Behandlung mit DHT (10 m mol), einem erfindungsgemäßen Synergisten (2-Hexadecyl-glycero-3-phosphocholin, 1 m mol) und einer Kombination von DHT und Synergisten. Virusgehaltsbestimmung serologisch im Präzipitationstropfentest durch Endpunktbestimmung; Verdünnung jeweils 1:1 mit physiologischer Kochsalzlösung

	relative Viruskonzentration (Kontrolle = 100 %)	
	primär inf. Blätter	sekundär inf. Blätter
unbehandelte Kontrolle (K)	100	100
DHT gegenüber K	64	87
erf. gem. Synergist gegenüber K	64	100
Kombination gegenüber K	50 <sup>+</sup>	81
Kombination gegenüber DHT	78	93
Kombination gegenüber erf. gem Synergist	78	81

**Beispiel 4:**

Konzentration des Rotkleescheckungs-Virus (RCMV) in Blättern des systemisch infizierten Wirtes *Pisum sativum* convar. *speciosum* (Dierb.) Alef ‚Nadja‘ in Relativwerten (Viruskonzentration der Kontrolle = 100%) nach Behandlung mit DHT (10 m mol), einem erfindungsgemäßen Synergisten (2-Hexadecyl-glycero-3-phosphocholin; 1 m mol) und einer Kombination von DHT und Synergisten. Virusgehaltsbestimmung serologisch mittels des Ringtestes durch Endpunktbestimmung; Verdünnung jeweils 1:1 mit physiologischer Kochsalzlösung

	relative Viruskonzentration (Kontrolle = 100 %)	
	primär inf. Blätter	sekundär inf. Blätter
unbehandelte Kontrolle (K)	100	100
DHT gegenüber K	62 <sup>+</sup>	46 <sup>++</sup>
erf. gem. Synergist gegenüber K	50 <sup>++</sup>	71 <sup>+</sup>
Kombination gegenüber K	28 <sup>+++</sup>	31 <sup>+++</sup>
Kombination gegenüber DHT	45 <sup>+</sup>	67 <sup>+</sup>
Kombination gegenüber erf. gem. Synergist	56 <sup>+</sup>	44 <sup>++</sup>

**Beispiel 5**

Verstärkung der antiphytoviralen Wirkung des Ribavirin (1-β-D-Ribofuranosyl-1,2,4-triazol-3-carboxamid und von Alkanmonosulfonaten (Alkankettenlängen C9 bis C 16) gegenüber dem Kartoffel-X-Virus durch 2-Hexadecylglycero-3-phosphocholin in primär infizierten (inokulierten) und sekundär infizierten Blättern des systematischen Viruswirtes *Nicotiana tabacum* ‚Samsun‘. Virusgehaltsbestimmung serologisch im Präzipitationstropfentest (vgl. Beispiele 1 und 3).

	Verminderung des Virusgehaltes auf % (Kontr. = 100)						
	Ribavirin		Alkanmonosulfonate				
	inok. Bl.	sek. infiz. Bl.	2 × 10 <sup>-4</sup> mol	10 <sup>-4</sup> mol	(0,5%) <sup>x</sup>	inok. Bl.	sek. infiz. Bl.
Kontrolle (K)	100	100	100	100	100	100	100
Präparat allein gegenüber K	100	103	22 <sup>+++</sup>	62 <sup>+++</sup>	97	111	111
Lysocleithin 1 mmol allein gegenüber K	90	90	82 <sup>+</sup>	82 <sup>+</sup>	90	114	114
Kombination gegenüber K	90	87	13 <sup>+++</sup>	44 <sup>+++</sup>	103	86 <sup>+</sup>	86 <sup>+</sup>
Kombination gegenüber Präparat	90	87	59	71	105	75 <sup>+++</sup>	75 <sup>+++</sup>
Kombination gegenüber Lysocleithin	100	97	16 <sup>+++</sup>	54 <sup>++</sup>	114	77 <sup>+++</sup>	77 <sup>+++</sup>

\* molare Angaben nicht möglich, da Substanzgemisch