

PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

306 009

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.:

A01N 43/828 (2006.01)

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLVÉHO
VLASTNICTVÍ

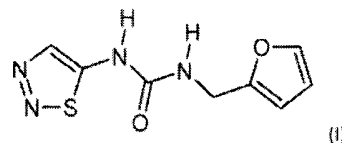
(21) Číslo přihlášky: **2015-230**
(22) Přihlášeno: **02.04.2015**
(40) Zveřejněno: **15.06.2016**
(Věstník č. 24/2016)
(47) Uděleno: **04.05.2016**
(24) Oznámení o udělení ve věstníku: **15.06.2016**
(Věstník č. 24/2016)

(56) Relevantní dokumenty:
Phytochemistry (Elsevier), 21(7) 1982, pp. 1509-11; Mok, M. C. et al.: "Cytokinin activity of N-phenyl-N'-1,2,3-thiadiazol-5-ylurea (Thidiazuron)", DOI: 10.1016/s0031-9422(82)85007-3; Plant Physiology (19860228), 80(2) 1986, pp. 515-19; Yip, Wing Kin Yang, Shang Fa: "Effect of thidiazuron, a cytokinin-active urea derivative, in cytokinin-dependent ethylene production systems", DOI:10.1104/pp.80.2.515; Acta Horticulturae (Proceedings of the VIth International Postharvest Symposium, 2009, Volume 3) (20101130), 877, pp. 1777-1783; Macnish, A. J. et al.: "A Thidiazuron pulse treatment delays leaf and flower senescence in iris"; DOI:10.17660/actahortic.2010.877.244. CZ 305 649 B.

(73) Majitel patentu:
Ústav experimentální botaniky AV ČR, v. v. i.,
Praha 6 - Lysolaje, CZ

(72) Původce:
Mgr. Jaroslav Nisler, Ph.D., Olomouc, CZ
RNDr. Marek Zatloukal, Ph.D., Šumperk, CZ
Ing. Radoslav Koprna, Ph.D., Olomouc, Klášterní
Hradisko, CZ
Mgr. Lukáš Spíchal, Ph.D., Olomouc, CZ
prof. Ing. Miroslav Strnad, CSc., DSc., Olomouc,
CZ
Mgr. Karel Doležal, Dr., Hlubočky, CZ

(74) Zástupce:
INVENTIA s.r.o., RNDr. Kateřina Hartvichová, Na
Bělidle 3, 150 00 Praha 5



(54) Název vynálezu:
**Použití N-furfuryl-N'-1,2,3-thiadiazol-5-yl
močoviny pro inhibici senescence, stresu a
oxidativního poškození**

(57) Anotace:
Řešení poskytuje použití N-furfuryl-N'-1,2,3-thiadiazol-5-yl-močoviny vzorce I pro inhibici senescence, stresu a/nebo oxidativního poškození rostlinných buněk, rostlinných orgánů a/nebo celých rostlin, a/nebo pro zvýšení výnosu rostlin bez vedlejších účinků inhibice růstu kořene. Popsány jsou i přípravky této látky obsahující a způsob ochrany rostlin.

CZ 306009 B6

Použití *N*-furfuryl-*N'*-1,2,3-thiadiazol-5-yl močoviny pro inhibici senescence, stresu a oxidativního poškození

5 Oblast techniky

Vynález se týká použití *N*-furfuryl-*N'*-1,2,3-thiadiazol-5-yl močoviny pro inhibici senescence, stresu a oxidativního poškození rostlinných orgánů, buněk a celých rostlin, a přípravků tento

10

Dosavadní stav techniky

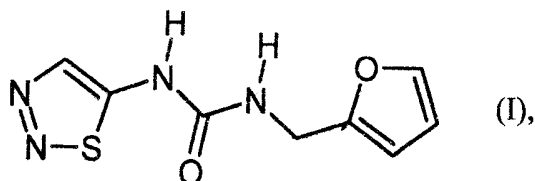
15 Stresem indukovaná senescence je dnes hlavním problémem z agro-ekonomického úhlu pohledu a ohrožuje dostupnost potravin na celém světě. Je známo pouze několik látek, které na hormonální úrovni mají anti-senescenční a/nebo antioxidační vlastnosti, ale řada z nich zároveň vykazuje nežádoucí vedlejší účinky, jako je inhibice růstu kořene. Z tohoto důvodu je potřeba poskytnout nové látky se silnými antistresovými vlastnostmi, které nevykazují nežádoucí vedlejší účinky.

20

Podstata vynálezu

Předmětem předloženého vynálezu je použití *N*-furfuryl-*N'*-1,2,3-thiadiazol-5-yl-močoviny vzorce I

25



30

pro inhibici senescence, stresu a/nebo oxidativního poškození rostlinných buněk, rostlinných orgánů a/nebo celých rostlin, a/nebo pro zvýšení výnosu rostlin bez vedlejších účinků inhibice růstu kořene.

35

Sloučenina vzorce I podle předkládaného vynálezu nevykazuje nežádoucí inhibiční aktivitu na růst kořenů, která je typická pro jiné anti-senescenční sloučeniny podle dosavadního stavu techniky. I při vysokých koncentracích negativní vliv na růst kořenů není přítomen.

40

Sloučenina vzorce I se podle předkládaného vynálezu může aplikovat na celé rostliny, rostlinné orgány, nebo na rostlinné buňky, např. v tkáňových kulturách. Je vhodná zejména pro použití v tkáňových kulturách, protože nevykazuje inhibiční efekt na růst a dělení rostlinných buněk při vysokých koncentracích a vykazuje minimální toxicitu pro tyto buňky ve srovnání s jinými anti-senescenčními sloučeninami známými z dosavadního stavu techniky. To umožňuje jejich použití v širokém koncentračním rozmezí bez negativních účinků.

45

Jedním provedením tohoto vynálezu je použití sloučeniny vzorce I pro oddálení degradace chlorofylu a senescence rostlinných tkání. Tento pozitivní účinek souvisí s jedinečným efektem této látky na peroxidaci membránových lipidů. Sloučenina vzorce I podle předkládaného vynálezu brání peroxidaci membránových lipidů, což dále zvyšuje její anti-senescenční a anti-stresovou aktivitu.

Dalším provedením tohoto vynálezu je použití sloučeniny vzorce I jako inhibitoru stresu a stresem indukované senescence v produkci rostlin.

S výhodou jsou rostliny vybrány ze skupiny zahrnující zejména obiloviny (pšenice, ječmen, rýže, kukuřice, žito, oves, čirok a příbuzné druhy), řepu (cukrová řepa a krmná řepa); malvice, peckovice a měkké ovoce (jablka, hrušky, švestky, broskve, mandle, třešně, jahody a ostružiny); luštěniny (fazole, čočka, hrách, sójové boby); olejninu (řepka, hořčice, mák, olivy, slunečnice, kokos, ricinus, kakaové boby, podzemnice olejna); okurky (dýně, okurky, melouny); vláknité rostliny (bavlna, len, konopí, juta); citrusové plody (pomeranče, citrony, grapefruity, mandarinky); zeleninu (špenát, skořicovník, kafr) nebo rostliny, jako je tabák, ořechy, lilek, cukrová třtina, čaj, vinná réva, chmel, banány a přírodní kaučuk a léčivé rostliny, stejně jako okrasné rostliny.

Stresem může být zejména stres způsobený suchem, chladem a salinitou (salinní stres).

Vynález se dále týká způsobu inhibice stresu, nežádoucích oxidativních procesů a/nebo senescence v rostlinách, rostlinných orgánech a/nebo v rostlinných buňkách, kdy se na rostlinu, rostlinný orgán a/nebo rostlinnou buňku aplikuje *N*-furfuryl-*N'*-1,2,3-thiadiazol-5-yl-močovina.

N-furfuryl-*N'*-1,2,3-thiadiazol-5-yl-močovina může být připravena známými chemickými způsoby. S výhodou může být připravena způsobem, ve kterém je 1,2,3-thiadiazol-5-yl-isokyanát připraven konvenční metodou (Kurita K. a Iwakura Y., J. Org. Chem. 41, 2070-71 (1976)) z 1,2,3-thiadiazol-5-laminu a difosgenu. 1,2,3-Thiadiazol-5-yl-isokyanát se pak nechá reagovat s furfurylaminem, čímž se získá požadovaný produkt.

Vynález dále zahrnuje anti-senescenční, antioxidační a/nebo anti-stresové přípravky pro rostliny, rostlinné orgány a rostlinné buňky, obsahující sloučeninu vzorce I a alespoň jednu pomocnou látku.

N-furfuryl-*N'*-1,2,3-thiadiazol-5-yl-močovina se používá v nemodifikované formě nebo výhodně společně s pomocnými látkami běžně používanými pro formulaci přípravků. Za tímto účelem jsou přípravky výhodně formulovány jako koncentráty účinné látky, jakož i suspenze a disperze, s výhodou izotonické vodné roztoky, suspenze a disperze, zředěné emulze, rozpustné prášky, poprášky, granuláty, krémy, gely, olejové suspenze a také obalované formulace, např. polymerními látkami. Stejně jako u typu přípravku, způsoby aplikace, jako je postřik, rozprašování, práškování, rozptýl, natírání nebo zalévání, se volí v souladu se zamýšlenými cíli a převažujícími okolnostmi. Přípravky mohou být sterilizovány a/nebo mohou obsahovat další pomocné látky neutrální povahy, jako jsou konzervační činidla, stabilizátory, smáčedla nebo emulgátory, solubilizační činidla, stejně jako hnojiva, donory stopových prvků nebo jiných prostředků k dosažení speciálních efektů.

Přípravky

Přípravky obsahující sloučeninu vzorce I (aktivní složka) a pokud je třeba, jednu nebo více pevných nebo kapalných pomocných látek, jsou připraveny známými způsoby, například smísením nebo mletím účinné látky s pomocnými látkami, jako jsou např. rozpouštědla nebo pevné nosiče. Do přípravků mohou být přidávány povrchově aktivní látky (surfaktanty) a smáčedla.

Příklady vhodných aniontových, neiontových a kationtových smáčedel jsou shrnuty například ve WO 97/34485.

Také vhodné pro přípravu kompozic, které obsahují sloučeninu vzorce I jsou povrchově aktivní látky běžně používané při formulaci prostředků, které jsou popsány např. v „McCutcheon's Detergents and Emulsifiers Annual“ MC Publishing Corp., Ridgewood New Jersey, 1981, Stache, H., „Tensid- Taschenbuch“, Carl Hanser Verlag, MunichNienna, 1981 and M. and J. Ash, „Encyclopedia of Surfactants“, Vol-111, Chemical Publishing Co., New York, 1980-81.

Formulace přípravku obsahuje váhově od 0,1 do 99 % (w/w), zejména pak od 0,1 do 95 % (w/w) aktivní složky *N*-furfuryl-*N'*-1,2,3-thiadiazol-5-yl-močoviny, přičemž obsahuje i od 5 do 99,9 % směsi přísad či farmaceutických nosičů, a to v závislosti na způsobech aplikace, a popřípadě obsahuje i váhově od 0,1 do 25 % smáčedla.

Ačkoliv jsou komerční produkty obvykle připravovány ve formě koncentrátů, konečný uživatel upotřebí naředěný přípravek. Kompozice může proto obsahovat i další přísady, jakými jsou stabilizátory, např. rostlinné oleje nebo epoxidované rostlinné oleje (epoxidovaný palmový olej 0;1, řepkový nebo olivový olej), odpěňovače, např. silikonový olej, konzervační přípravky, stabilizátory, zvlhčovačla anebo emulgátory, viskozitní činidla, pojiva, lepidla, a také hnojiva a další aktivní přísady. S výhodou jsou používány přípravky následujícího složení: (% = hmotnostní procento).

Emulgované koncentráty:

aktivní složka:	1 až 90 %, s výhodou 5 až 20 %
smáčedlo:	1 až 30 %, s výhodou 10 až 20 %
kapalný nosič:	5 až 94 %, s výhodou 60 až 85 %

Prášky:

aktivní složka:	0,1 až 10 %, s výhodou 0,1 až 5 %
pevný nosič:	99,9 až 90 %, s výhodou 99,9 až 95 %

Suspenní koncentráty:

aktivní složka:	5 až 75 %, s výhodou 10 až 50 %
voda:	94 až 24 %, s výhodou 88 až 30 %
smáčedlo:	1 až 40 %, s výhodou 2 až 30 %

Smáčivé prášky:

aktivní složka:	0,5 až 90 %, s výhodou 1 až 80 %
smáčedlo:	0,5 až 20 %, s výhodou 1 až 15 %
pevný nosič:	5 až 95 %, s výhodou 15 až 90 %

Granule:

aktivní složka:	0,1 až 30 %, s výhodou 0,1 až 15 %
pevný nosič:	99,9 až 70 %, s výhodou 99,9 až 85 %

Kompozice mohou rovněž obsahovat další příměsi, jakými jsou stabilizátory, například rostlinné oleje nebo epoxidované rostlinné oleje (epoxidovaný kokosový olej, řepkový olej nebo sójový olej), odpěňovače, např. silikonový olej, konzervační látky, regulátory viskozity, pojiva, zahušťovačla, a také hnojiva a další aktivní látky. Pro použití sloučeniny vzorce I nebo kompozic je obsahujících, se používají rozdílné metody a technologie, kterými jsou například následující:

i) Obalování osiva

a) Obalování osiva smáčivou práškovou formulací sloučeniny vzorce I nebo její soli, a to mícháním v nádobě až do stejnorodé distribuce na povrchu semen (suché obalování).

b) Obalování osiva emulzifikovaným koncentrátem sloučeninu vzorce I nebo její soli, v souladu s metodou a) (mokrý obalování).

- 5 c) Obalování osiva cestou máčení semen po dobu 1 až 72 h v tekutině obsahující od 100 do 1000 ppm sloučeninu vzorce I nebo její soli, a s výhodou následného usušení semen (imersní obalování).

10 Obecně je sloučenina vzorce I nebo její soli používány v množství od 1 do 1000 g, s výhodou od 5 do 250 g, na 100 kg semen, avšak v závislosti na metodice, která rovněž umožňuje přidání dalších aktivních látek nebo mikroživin; určené koncentrační limity se mohou pohybovat nahoru nebo dolů (opakované obalování).

ii) Aplikace cisternové směsi

- 15 Kapalná formulace je aplikována v množství od 0,005 do 5,0 kg na hektar. Taková cisternová aplikace se provádí před anebo po setí.

iii) Aplikace do semenné brázdy

- 20 Sloučenina vzorce I nebo její sůl, je zavedena do otevřené brázdy oseté semenem ve formě emulzifikovaného koncentrátu, smáčivého prášku nebo granulí. Jakmile je semenná brázda zaklopena, je růstový regulátor aplikován cestou obvykle používanou při pre-emergentním procesu.

iv) Kontrolované uvolňování aktivních látek

- 25 Sloučenina vzorce I nebo její soli, jsou aplikovány v roztoku k minerálním granulovaným nosičům nebo polymerizovaným granulím (močovina, formaldehyd) a jsou vysušeny.

- 30 V případě, že je to žádoucí, tak se provádí obalování, které umožňuje postupné uvolňování látky v měřitelných množstvích po určitou specifickou periodu (obalované granule).

Objasnění výkresu

- 35 Obrázek 1 ukazuje účinek thiadiazuronu (TDZ) a *N*-furfuryl-*N'*-1,2,3-thiadiazol-5-yl-močoviny (ASES) na průměrnou délku kořene *Arabidopsis* (A) a pšenice seté *Triticum aestivum* (B) v kořenovém testu. V experimentu bylo použito 0,01% DMSO jako kontrola a sloučeniny v koncentraci 100 nM. Chybové úsečky představují Sd (n=50). Hvězdičky označují statisticky významné rozdíly oproti kontrolnímu ošetření (studentův t-test, dvěma hvězdičkami: P = 0,001; jedna hvězdička P = 0,05).
- 40

Příklady uskutečnění vynálezu

- 45 Výchozím materiálem pro *N*-furfuryl-*N'*-1,2,3-thiadiazol-5-yl-močovinu je 1,2,3-thiadiazol-5-yl-amin, který byl získán z TCI Europe. 1,2,3-Thiadiazol-5-ylamin se převede na 5-isokyanato-1,2,3-thiadiazol mícháním 1,2,3-thiadiazol-5-yl-aminu s nadbytečným množstvím difosgenu v tetrahydrofuranu (THF). *N*-furfuryl-*N'*-1,2,3-thiadiazol-5-yl-močovina může být potom připravena mírným zahříváním 5-isokyanato-1,2,3-thiadiazolu a furfurylaminu (komerčně dostupné od Sigma Aldrich) v přítomnosti katalytického množství triethylaminu v THF.
- 50

- Elementární analýzy (C, H a N) byly měřeny na EA1108 CHN analyzátoru (Fissons Instruments). Analytická tenkovrstvá chromatografie (TLC) byla prováděna na destičkách silikagelu 60 WF254 (Merck), v mobilní fázi CHCl₃:MeOH:konc. NH₄OH (8:2:0,2, v/v/v). ES+ hmotová spektra byla naměřena za použití přímého nástřiku na Waters ZMD 2000 hmotovém spektromet-
- 55

ru. Hmotnostní interval při měření byl 10 až 1500 u. Spektra byla měřena za použití cyklických skenů o délce 3,0 sekundy, při napětí na vstupní šterbině 25 V a teplotě vypařovacího bloku 150 °C, desolvatační teplotě 80 °C a průtoku desolvatačního plynu 200 l/hodinu. Získaná data byla zpracována pomocí programu MassLynx data systém. NMR spektra byla měřena na přístroji Jeol 500 SS při teplotě 300 K a frekvenci 500,13 MHz (¹H). Vzorčky byly připraveny rozpuštěním daných látek v DMSO-*d*₆. Tetramethylsilan (TMS) byl použit jako interní standard.

Příklad 1

Příprava 5-isokyanato-1,2,3-thiadiazolu

Syntéza izokyanátů z aminů byla popsána již dříve (Kurita K. a Iwakura Y., J. Org. Chem. 41, 2070–71 (1976)). Detailně, 1,2,3-thiadiazol-5-yl amin (1,01 g, 10 mmol) byl rozpuštěn v THF (40 mL) a přidáván po kapkách do roztoku difosgenu (2,6 g, 13 mmol) v THF (100 mL). Reakční směs byla míchána po dobu 40 minut při teplotě 0° C; pak se reakční směs krátce zahřeje na teplotu 30 °C. Po zahřátí, se rozpouštědlo a přebytek difosgenu odpaří. Žlutý pevný zbytek byl 5-isokyanato-1,2,3-thiadiazol, který se znovu resuspenduje v diethyletheru a odfiltruje se. Výtěžek: 95%, ¹H NMR (δ, ppm, DMSO-*d*₆): 7,75 (1H, s, CH).

Příklad 2

Příprava *N*-furfuryl-*N'*-1,2,3-thiadiazol-5-yl-močoviny

5-Isokyanato-1,2,3-thiadiazol (1,27 g, 10 mmol) byl rozpuštěn ve 100 mL tetrahydrofuranu (THF). K tomuto roztoku bylo přidáno 100 μL triethylaminu a přikapán furfurylamin (0,97 g, 10 mmol) ve 20 mL THF při teplotě 30 °C. Směs se nechá reagovat 5 hodin, potom byl THF odpařen na vakuové odparce a k surovému produktu bylo přidáno 50 mL dichlormethanu. Sraženina byla re-suspendována a odfiltrována. Výtěžek: 1,2g; 53%, ¹H NMR (δ, ppm, DMSO-*d*₆): 4,32(2H, d, *J*=5,5 Hz, CH₂), 6,24(1H, d, *J*=4,0 Hz, ArH-furfuryl), 6,36(1H, t, *J*=2,0 Hz, ArH-furfuryl), 7,52(1 H, t, *J*=5,5, NH), 7,56(1 H, d, *J*=4,0 Hz, ArH-furfuryl), 8,47(1H, s, CH), 10,76(1H, s(br), NH).

Tabulka 1

Elementární analýza *N*-furfuryl-*N'*-1,2,3-thiadiazol-5-yl-močoviny

<i>N</i> -furfuryl- <i>N'</i> -1,2,3-thiadiazol-5-yl-močovina	Elementární analýza vypočteno/nalezeno			ES MS [M+H] ⁺
	%C	%H	%N	
	42,9/43,2	3,6/3,7	25,0/24,8	225,3

Příklad 3

Anti-senescenční aktivita *N*-furfuryl-*N'*-1,2,3-thiadiazol-5-yl-močoviny v senescenčním testu na listových segmentech pšenice kultivovaných ve tmě

Semena ozimé pšenice *Triticum aestivum* cv. Hereward byla promyta pod tekoucí vodou po 24 hod. a poté vyseta do vermikulitu nasyceného Knopovým živným roztokem. Nádoby se semeny byly umístěny do klimatizované růstové komory s 16/8 hodinovou světelnou periodou (světelná intenzita 50 mmol.m⁻².s⁻¹) a teplotou 15 °C. Po 7 dnech měly semenáčky vyvinutý první prapocový list a druhý list začínal prorůstat. Z prvních listů vždy od 5 rostlin byly odebrány vrcho-

lové sekce dlouhé přibližně 35 mm, které byly zkráceny tak, aby jejich váha byla přesně 100 mg. Bazální konce těchto 5 listových segmentů byly umístěny do jamek mikrotitračních polystyrénových destiček obsahujících 150 mL roztoku testované látky. Destičky byly umístěny do plastového boxu vystlaného filtračním papírem, který byl nasycen vodou za účelem maximální vzdušné vlhkosti. Po 96 hodinách inkubace ve tmě při 25 °C byly listové sekce vyjmuty a chlorofyl extrahován v 5 mL 80% ethanolu zahřátím při 80 °C po dobu 10 min. Objem vzorku byl poté doplněn na 5 mL přidáním 80% ethanolu. Absorbance extraktů byla měřena při 665 nm. Jako kontroly byly měřeny rovněž chlorofylové extrakty z listů a listových vrcholů inkubované v deionizované vodě. Vypočtené hodnoty jsou průměrem z 5 opakování a celý experiment byl zopakován minimálně 2–krát. Testované látky (6-benzylaminopurin, trans-zeatin, thidiazuron a *N*-furfuryl-*N'*-1,2,3-thiadiazol-5-yl-močovina) byly rozpuštěny v dimethylsulfoxidu (DMSO) a zásobní roztok doplněn vodou na 10⁻³ M. Tento zásobní roztok byl dále ředěn testovacím médiem v koncentračním rozsahu 10⁻⁸ až 10⁻⁴ M. Finální koncentrace DMSO v médiu nepřevýšila 0,2 % a v této koncentraci neovlivňovala biologickou aktivitu testu. Hodnoty IC₅₀ byly stanoveny pro všechny testované sloučeniny. *N*-furfuryl-*N'*-1,2,3-thiadiazol-5-yl-močovina vykazuje pozitivní vliv na oddálení senescence v segmentech listů pšenice ve tmě. *N*-furfuryl-*N'*-1,2,3-thiadiazol-5-yl-močovina překročila anti-senescenční aktivitu 6-benzylaminopurinu minimálně 100x, trans-zeatinu a thidiazuronu minimálně 10x. To znamená, že k dosažení stejného antisenescenčního účinku je třeba 10x menší množství *N*-furfuryl-*N'*-1,2,3-thiadiazol-5-yl-močoviny než např. trans-zeatinu nebo thidiazuronu.

Tabulka 2

Vliv *N*-furfuryl-*N'*-1,2,3-thiadiazol-5-yl-močoviny na oddálení senescence v dekapitovaných segmentech listů *Triticum aestivum* cv. Hereward ve tmě.

Látka	Senescenční biotest (IC ₅₀ , μM)/s.d.	
6-benzylaminopurin (BAP)	155	(±22)
trans-zeatin	30	(±4,5)
thidiazuron	13	(±3,0)
<i>N</i>-furfuryl-<i>N'</i>-1,2,3-thiadiazol-5-yl-močovina	1,2	(±0,3)

30

Příklad 4

Anti-senescenční aktivita *N*-furfuryl-*N'*-1,2,3-thiadiazol-5-yl-močoviny v senescenčním testu na listových segmentech pšenice při působení světla

35

Schopnost *N*-furfuryl-*N'*-1,2,3-thiadiazol-5-yl-močoviny zpomalit degradaci chlorofylu v listech pšenice byla testována také ve světelných podmínkách. Experiment byl proveden, jak je popsáno v příkladu 7 s modifikacemi takto – inkubace listů se sloučeninami byla provedena při periodě osvětlení 8/16 (tma/světlo – mol.m⁻².s⁻¹) při 22 °C po dobu 7 dnů. Jak je ukázáno v tabulce 3, *N*-furfuryl-*N'*-1,2,3-thiadiazol-5-yl-močovina má mnohem silnější pozitivní účinky na oddálení senescence v segmentech listů pšenice ve světelných podmínkách ve srovnání s 6-benzylaminopurinem, trans-zeatinem i thidiazuronem. IC₅₀ *N*-furfuryl-*N'*-1,2,3-thiadiazol-5-yl-močoviny je 40 nmol.

45

Tabulka 3

5 Vliv *N*-furfuryl-*N'*-1,2,3-thiadiazol-5-yl-močoviny na oddálení senescence v dekapitovaných segmentech listů *Triticum aestivum* cv. Hereward na světle.

Látka	Senescenční biotest (IC ₅₀ , μM)/s.d.	
6-benzylaminopurin (BAP)	12,5	(±22)
<i>trans</i> -zeatin	2,2	(±4,5)
thidiazuron	0,5	(±3,0)
<i>N</i>-furfuryl-<i>N'</i>-1,2,3-thiadiazol-5-yl-močovina	0,03	(±0,3)

10 Příklad 5

Ochrana před peroxidací membránových lipidů v pšenici

15 Typickým projevem provázejícím senescenci je zvýšení hladiny reaktivních kyslíkových derivátů a následná peroxidace membránových lipidů. Proto byly stanoveny hladiny malonyldialdehydu (MDA), oxidativního markeru poškození membránových lipidů, v oddělených listech pšenice vystavených působení *N*-furfuryl-*N'*-1,2,3-thiadiazol-5-yl-močoviny a thidiazuronu po dobu čtyř dnů v temnu, jak bylo popsáno v příkladu 7. Hladiny MDA byly stanoveny pomocí kyseliny thiobarbiturové (TBA). 100 mg čerstvého rostlinného materiálu bylo homogenizováno pomocí oscilačního mlýna (MM301, Retsch, Germany), s 1 mL 80% metanolu. Surový extrakt byl centri-
20 fugován při 10,000xg po dobu 5 minut, 100 μL alikvot supernatantu byl protřepán se 100 μL 0.5% (w/v) TBA obsahujícími 0.1% (w/v) trichloroctovou kyselinu, a výsledný roztok byl inkubován 30 minut při 95 °C. Vzorky byly rychle ochlazeny na ledu a centrifugovány 5 minut při 1000xg. Absorbance supernatantu byla změřena při 532 nm s korekcí při 600 nm a množství
25 vzniklého komplexu MDA-TBA bylo vypočítáno z extinkčního koeficientu 155 mM⁻¹ cm⁻¹.

N-furfuryl-*N'*-1,2,3-thiadiazol-5-yl-močoviny výrazně snižuje peroxidaci membránových lipidů ve srovnání s neošetřenou kontrolou a vzorky ošetřené thidiazuronem (Tabulka 5 – hodnoty vyjadřují obsah MDA, což je produkt rozkladu membránových lipidů). *N*-furfuryl-*N'*-1,2,3-
30 thiadiazol-5-yl-močoviny snižuje úroveň membránové lipidové peroxidace ve stárnoucích oddělených listech pšenice o 41 %, zatímco thidiazuron pouze o 27 %.

N-furfuryl-*N'*-1,2,3-thiadiazol-5-yl-močoviny má ochrannou funkci před negativním působením reaktivních forem kyslíku, které se hromadí v tkáních během senescence listu.

35

Tabulka 4

5 Efekt *N*-furfuryl-*N'*-1,2,3-thiadiazol-5-yl-močoviny a thidiazuronu na peroxidaci membránových lipidů v průběhu senescence extirpovaných listů *Triticum aestivum* cv. Hereward v temnu.

Testovaná látka	MDA (nmol/g FW)
Neošetřená kontrola	21,5 (±2,8)
thidiazuron	15,7 (±1,7)
<i>N</i>-furfuryl-<i>N'</i>-1,2,3-thiadiazol-5-yl-močovina	12,7 (±1,1)

10 Příklad 6

N-furfuryl-*N'*-1,2,3-thiadiazol-5-yl-močovina oddaluje senescenci rostlin pšenice stresovaných suchem

15 Sucho je jedním z hlavních problémů, který omezuje růst a produkci rostlin. Sucho vede ke stresem-vyvolané senescenci rostlinných orgánů, a může mít za následek smrt rostlin. Oddálením suchem indukované senescence se zvyšuje délka života stresovaných rostlin i jejich produktivita.

20 Pro zkoumání účinku *N*-furfuryl-*N'*-1,2,3-thiadiazol-5-yl-močoviny na suchem-vyvolanou senescenci, semena ozimé pšenice, *Triticum aestivum* cv. Hereward, byly promyty pod tekoucí vodou po dobu 24 hodin a pak vysety do táčů (30 x 40cm) na perlit nasáklý vodou, nebo 100 nM vodným roztokem *N*-furfuryl-*N'*-1,2,3-thiadiazol-5-yl-močoviny. Tácy byly umístěny v růstové komoře při 25 °C s 16/8 h světlo/tma při intenzitě 100 mol.m⁻².s⁻¹. 30 dnů po výsadbě bylo spočítáno kolik % rostlin přežilo na jednotlivých tácech.

25 Výsledkem bylo, že použití *N*-furfuryl-*N'*-1,2,3-thiadiazol-5-yl-močoviny zpomaluje senescenci pšeničných rostlin, které jsou pěstovány ve stresových podmínkách. Rostliny ošetřené *N*-furfuryl-*N'*-1,2,3-thiadiazol-5-yl-močovinou jsou zelenější (obsahují více chlorofylu), a také jich přežívá více (71 % rostlin) proti neošetřeným rostlinám (přežívá jen 37 % rostlin).

30 Tento *in vivo* experiment je důkazem toho, že *N*-furfuryl-*N'*-1,2,3-thiadiazol-5-yl-močovina prodlužuje fotosyntetickou životnost rostlin pšenice, které byly vystaveny stresu životního prostředí.

35 Příklad 7

N-furfuryl-*N'*-1,2,3-thiadiazol-5-yl-močovina neinhibuje růst primárních kořenů *Arabidopsis thaliana* ani pšenice seté *Triticum aestivum*

40 Anti-senescenční látky jsou známy jako negativní regulátory prodlužování kořenů a tvorby laterálních kořenů (Werner, T. et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 98, 10487–92, 2001) a jejich exogenní aplikace v koncentraci vyšší než 1 μM často způsobují úplnou inhibici růstu kořene. Abychom prozkoumali *in vivo* účinek *N*-furfuryl-*N'*-1,2,3-thiadiazol-5-yl-močoviny na růst a vývoj kořene, semena *Arabidopsis thaliana* (wild-type Col-0) byla sterilizována a zasetá na vertikální desky na 1/2 Murashige-Skoog médium (obohacené o 0,1% sacharózu a 6 g/L phytigel) obsahující-

cím 100 nM thidiazuron nebo *N*-furfuryl-*N'*-1,2,3-thiadiazol-5-yl-močovinu, nebo 0,01% DMSO (kontrola rozpouštědla). Po vernalizaci (4 dny ve tmě, 4 °C), desky byly převedeny do růstové komory (22 °C, 8/16 světlo/tma). Dva týdny po přenosu, semenáčky byly vyfotografovány a prodloužení kořene a tvorba laterálních kořenů byla hodnocena pomocí Scion image software (Scion Corp., Frederick, MD, USA). Nejméně 40 rostlin bylo měřeno pro každé ošetření.

Zatímco kořeny rostlin, které rostly v přítomnosti thidiazuronu (obr. 1), byly vážně a významně retardované, kořeny rostlin, které rostly v přítomnosti *N*-furfuryl-*N'*-1,2,3-thiadiazol-5-yl-močoviny se vyvinuly normálně (obr. 1) a délka primárního kořene nebyla zkrácena. To znamená, že *N*-furfuryl-*N'*-1,2,3-thiadiazol-5-yl-močovina nemá negativní vliv na růst a vývoj kořene ve 100 nanomolární koncentraci na rozdíl od vážného inhibičního účinku thidiazuronu. *N*-furfuryl-*N'*-1,2,3-thiadiazol-5-yl-močovina může být s výhodou použita na semena, sazenice a mladé rostliny v širším rozsahu koncentrací, než thidiazuron a bez nežádoucích inhibičních účinků.

Příklad 8

N-furfuryl-*N'*-1,2,3-thiadiazol-5-yl-močovina není cytotoxická vůči lidským kožním fibroblastům (buněčná linie BJ)

Cytotoxicita *N*-furfuryl-*N'*-1,2,3-thiadiazol-5-yl-močoviny vůči lidským kožním fibroblastům (buněčná linie BJ) byla stanovena ve standardním Calceinovém AM testu. Buňky byly udržovány v plastických lahvích pro tkáňové kultury a pěstovány v Dulbecco modifikovaném Eagle médiu pro buněčné kultury (DMEM) při teplotě 37 °C v atmosféře 5% CO₂ a 100% vlhkosti. Buňky byly vysety do 96-jamkových mikrotitračních destiček (Nunc, Dánsko) a po 12 hodinách preinkubace, byla přidána testovaná látka, aby konečná koncentrace byla v rozmezí od 0 do 100 mM. Buňky byly inkubovány po dobu 72 hodin. Na konci inkubační doby byl přidán Calcein AM v PBS v konečné koncentraci 1 µg / ml. Po další 1 hodině inkubace byla měřena fluorescence při 485/538 nm (ex/em) pomocí Fluoroskan Ascent (Labsystems, Finsko). Hodnoty IC₅₀, (tj. koncentrace způsobující snížení konverze kalceinu AM na 50%) byly spočítány ze získaných křivek. Všechny experimenty byly opakovány čtyřikrát s maximální odchylkou 15%. Vzhledem k omezené rozpustnosti látek ve vodě, všechny testované sloučeniny byly rozpuštěny v DMSO a zředěny vodou na konečnou koncentraci DMSO 0,6%.

Pomocí tohoto testu bylo zjištěno, že *N*-furfuryl-*N'*-1,2,3-thiadiazol-5-yl-močovina nebyla toxická pro lidské kožní fibroblasty a to až do nejvyšší testované koncentrace 100 mM. Předpokládá se, že *N*-furfuryl-*N'*-1,2,3-thiadiazol-5-yl-močovina, bude mít praktické využití v zemědělství a tudíž s touto látkou budou lidé moci manipulovat. Je tedy vysoce žádoucí, aby tato látka nebyla toxická.

Příklad 9

Aplikace *N*-furfuryl-*N'*-1,2,3-thiadiazol-5-yl-močoviny zvýšila výnos ozimé řepky a jarního ječmene v polních pokusech

Všechny polní pokusy byly provedeny v souladu s kritérii pro řádnou experimentální praxi (Good Experimental Practices). Šest stejných ploch (každá 10 m²), bylo použito na jednu variantu. Polní pokusy nebyly ošetřeny žádnými regulátory růstu ani fungicidy, ale pouze použitou látkou. *N*-furfuryl-*N'*-1,2,3-thiadiazol-5-yl-močovina byla aplikována jednou v přesném čase (prodlužovací růst, BBCH 50), listovým postřikem v koncentraci 25 mM. K získání parametrů morfologie bylo použito alespoň 50 rostlin pro každou variantu. Statistické vyhodnocení bylo provedeno v statistický program PAST v. 2.17c.

Aplikace *N*-furfuryl-*N'*-1,2,3-thiadiazol-5-yl-močoviny vedla ke zvýšení výnosu semen ozimé řepky na 120,9% proti neošetřené kontrole (tab. 5). Zvýšila se také hmotnost tisíce zrn (HTZ), a to na 110% oproti kontrole (tab. 5).

- 5 Aplikace *N*-furfuryl-*N'*-1,2,3-thiadiazol-5-yl-močoviny vedla ke zvýšení výnosu semen ječmene jarního na 104,8% oproti kontrole. HTZ zůstala stejná, zvýšil se ovšem počet zrn v klasu a to na 104,6% oproti kontrole (tab. 6).

10 Tabulka 5

Vliv aplikace *N*-furfuryl-*N'*-1,2,3-thiadiazol-5-yl-močoviny (ASES) na výnos ozimé řepky

Aplikace	výnos semen (t/ha)	%	HTZ (g)	%
Kontrola	4,994	100	4,35	100
ASES	6,038	120,9	4,8	110,3

15

Tabulka 6

Vliv aplikace *N*-furfuryl-*N'*-1,2,3-thiadiazol-5-yl-močoviny (ASES) na výnos ozimé řepky

20

Aplikace	výnos semen (t/ha)	%	HTZ (g)	%	počet zrn v klasu	%
Kontrola	7,65	100	45,85	100	23,5	100
ASES	8,02	104,8	45,88	100,06	24,6	104,6

Příklad 10 Přípravky

25

Aktivní složkou v přípravcích se myslí *N*-furfuryl-*N'*-1,2,3-thiadiazol-5-yl-močovina

A1. Emulgovatelné koncentráty	a)	b)	c)	d)
Aktivní složka	5%	10%	25%	50%
dodecylbenzensulfonan vápenatý	6%	8%	6%	8%
polyoxyetylovaný ricinový olej				
(polyglykolether ricinového oleje)	4%	—	4%	4%
(36 mol ethylenoxid)				
oktylfenolpolyglykolether	—	2 %	—	2 %
(7 až 8 mol ethylenoxid)				
cyklohexanon	—	—	10 %	20 %
směs aromatických uhlovodíků	83 %	82 %	53 %	18 %
C ₉ –C ₁₂				

- 40 Emulze o vyžadované finální koncentraci mohou být získány z takového koncentrátu zředěním vodou.

	A2. Roztoky	a)	b)	c)	d)
	Aktivní složka	5 %	10 %	50%	90%
	polyethylenglykol MW 400	20%	10 %	–	–
5	N-methyl-2-pyrrolidon	–	–	30%	10%
	směs aromatických uhlovodíků C ₉ –C ₁₂	75 %	60 %	–	–

Roztoky jsou vhodné k aplikaci ve formě mikrokapelek.

10	A3. Smáčivé prášky	a)	b)	c)	d)
	Aktivní složka	5 %	25 %	50 %	80 %
	ligninsulfonan sodný	4 %	–	3 %	–
	laurylsulfát sodný	2 %	3 %	–	4 %
15	diisobutyl-naftalensulfonát sodný	–	6 %	5 %	6 %
	oktylfenol polyglykol ether (7 až 8 mol ethylenoxid)	–	1 %	2 %	–
	vysoce disperzní kyselina křemičitá	1 %	3 %	5 %	10 %
20	kaolin	87 %	61 %	37 %	–

Aktivní složka je důkladně promísena s pomocnými látkami a směs je důkladně rozemleta ve vhodném mlýnu. Suspenzi libovolné koncentrace je možné získat smísením vzniklého prachu s vodou.

25	A4. Potahované granule	a)	b)	c)
	Aktivní složka	0,1 %	5%	15%
	vysoce disperzní kyselina křemičitá	0,9 %	2 %	2 %
	anorganický nosič	99,0 %	93 %	83 %
30	(0,1 až 1 mm)			
	např. CaCO ₃ nebo SiO ₂			

Aktivní složka je rozpuštěna v methylenchloridu a nasprejována na nosič. Rozpouštědlo je odpařeno ve vakuu.

35	A5. Potahové granule	a)	b)	c)
	Aktivní složka	0,1 %	5 %	15 %
	polyethylenglykol MW 200	1,0 %	2 %	3 %
	vysoce disperzní kyselina křemičitá	0,9 %	1 %	2 %
40	anorganický nosič	98,0 %	92 %	80 %
	(AE 0,1 až 1 mm)			
	např. CaCO ₃ nebo SiO ₂			

Jemně rozemletá aktivní složka je v mixéru stejnoměrně nanášena na nosič zvlhčený polyethylenglykolem. Takto jsou získány neprašné granule.

	A6. Extrudované granule	a)	b)	c)	d)
	Aktivní složka	0,1 %	3 %	5 %	15 %
	ligninsulfonan sodný	1,5 %	2 %	3 %	4 %
5	karboxymethylcelulóza	1,4 %	2 %	2 %	2 %
	kaolin	97,0 %	93 %	90 %	79 %

Aktivní složka je smísena a rozemleta s pomocnými látkami a složka je zvlhčena vodou.

- 10 Směs je extrudována a usušena v proudu vzduchu.

	A7. Prachy	a)	b)	c)
	Aktivní složka	0,1 %	1 %	5 %
	talek	39,9 %	49 %	35 %
15	kaolin	60,0 %	50 %	60 %

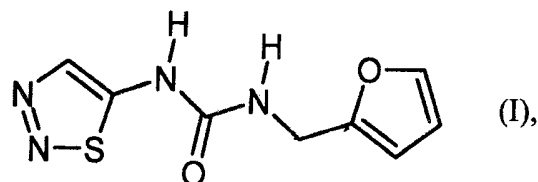
Prachy k přímému použití jsou získány rozemletím aktivní složky s nosičem ve vhodném mlýnu.

	A8. Suspenzní koncentrát	a)	b)	c)	d)
20	Aktivní složka	3%	10%	25%	50%
	ethylenglykol	5 %	5 %	5 %	5%
	nonylfenolpolyglykolether (15 mol ethylenoxid)	–	1 %	2 %	–
	lignosulfonát sodný	3 %	3 %	4 %	5 %
25	karboxymethylcelulóza	1 %	1 %	1 %	1%
	37% vodný roztok formaldehydu	0,2 %	0,2 %	0,2 %	0,2%
	emulze silikonového oleje	0,8 %	0,8 %	0,8 %	0,8%
	voda	86 %	78 %	64 %	38%

- 30 Jemně rozemletá aktivní složka je smíchána s pomocnými látkami. Vzniklý suspenzní koncentrát umožňuje přípravu suspenze o požadované koncentraci zředěním vodou.

PATENTOVÉ NÁROKY

- 5 1. Použití *N*-furfuryl-*N'*-1,2,3-thiadiazol-5-yl-močoviny vzorce I



10 pro inhibici senescence, stresu a/nebo oxidativního poškození rostlinných buněk, rostlinných orgánů a/nebo celých rostlin, a/nebo pro zvýšení výnosu rostlin bez vedlejších účinků inhibice růstu kořene.

15 2. Použití podle nároku 1, kde inhibice senescence zahrnuje oddálení degradace chlorofylu a senescence rostlinných pletiv a orgánů.

3. Použití podle nároku 1, kde rostliny zahrnují obiloviny, cukrovou řepu, malvice, peckovice a ovoce, luštěniny, olejninu, okurky, citrusové ovoce, zeleninu, tabák, ořechy, lilek, cukrovou třtinu, čaj, vinné hrozny, chmel, banány, přírodní kaučuk, léčivé rostliny, okrasné rostliny.

20 4. Použití podle nároku 1, kde stresem je stres způsobený suchem, chladem nebo salinitou.

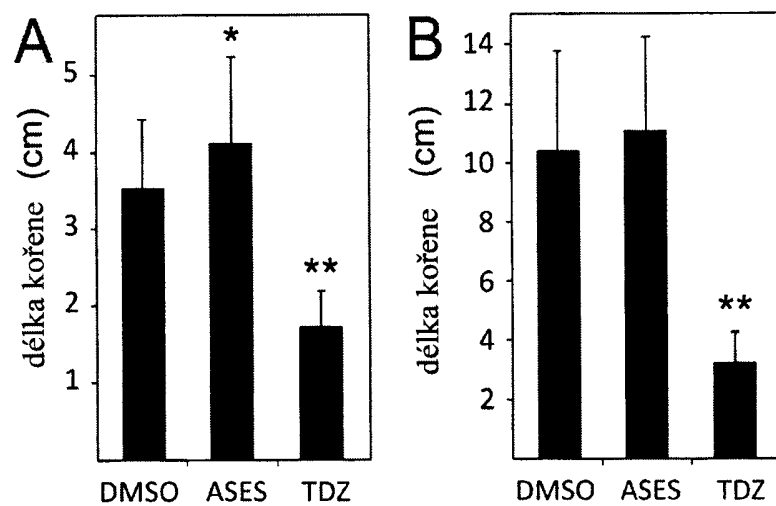
5. Anti-senescenční, antioxidační a/nebo antistresové přípravky pro ošetření rostlin, rostlinných orgánů a/nebo rostlinných buněk, **v y z n a ě n ý t í m**, že obsahují *N*-furfuryl-*N'*-1,2,3-thiadiazol-5-yl-močovinu a alespoň jednu pomocnou látku.

25 6. Způsob inhibice senescence, oxidativního poškození a/nebo stresu v rostlinách, v rostlinných orgánech a/nebo v rostlinných buňkách, **v y z n a ě n ý t í m**, že se na rostlinu, rostlinný orgán a/nebo rostlinnou buňku aplikuje *N*-furfuryl-*N'*-1,2,3-thiadiazol-5-yl-močovina.

30

1 výkres

Obrázek 1



Konec dokumentu
