

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202392245 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.10.06

(51) Int. Cl. A01N 43/16 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2022.02.09

(54) ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ ЗАЩИТЫ РАСТЕНИЙ

(31) 2101803.1

(72) Изобретатель:

(32) 2021.02.10

Альбертини Альберто (IT)

(33) GB

(74) Представитель:

(86) PCT/GB2022/050342

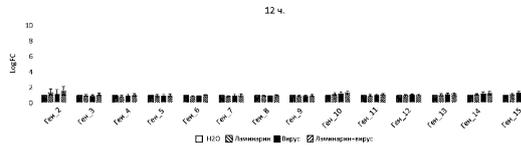
Кузнецова С.А. (RU)

(87) WO 2022/172000 2022.08.18

(71) Заявитель:

ЮПЛ КОРПОРЕЙШН ЛИМИТЕД
(MU); ЮПЛ ЮРОП ЛТД (GB)

(57) Изобретение относится к управлению защитой и устойчивостью растений к переносимым насекомыми и грибами патогенам, таким как вирусы, и управлению резистентностью к болезням путем нанесения ламинарина или композиций, содержащих ламинарин, на растение. Применение ламинарина модулирует экспрессию генов защиты растений в растении-мишени.



202392245

A1

A1

202392245

ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ ЗАЩИТЫ РАСТЕНИЙ

ТЕХНИЧЕСКАЯ ОБЛАСТЬ

Настоящее изобретение относится к защите и устойчивости растений к переносимым насекомыми и грибами патогенам и управлению резистентностью к болезням с применением композиций на основе ламинарина. В частности, изобретение относится к использованию и применению композиции ламинарина для повышения защиты и устойчивости растений к переносимым насекомыми и грибами патогенам, а также резистентности к вредителям/болезням и механизмам защиты растений. Более конкретно, изобретение относится к модуляции генов защиты растений композицией на основе ламинарина.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Вирусы, принадлежащие к родам Orthospovirus, Potyvirus, Caulimovirus, Cucumovirus, Tobamovirus и другим родам, поражают широкий спектр видов растений, включая садовые культуры, воздействуя на сельское хозяйство в тропических и субтропических районах по всему миру. Ежегодные убытки из-за них оцениваются во всем мире более чем в 1 миллиард долларов. Среди этих вирусов вирус пятнистого увядания томата (TSWV), вирус Y картофеля (PVY), вирус мозаики цветной капусты (CaMV), вирус мозаики огурца (CMV), вирус табачной мозаики (TMV) являются одними из наиболее широко распространенных и экономически важных с кругом хозяев, насчитывающим более 1000 видов растений. Культуры, пораженные этими вирусами, включают томаты, фасоль, салат, арахис (земляной орех), перец, картофель, табак, цветную капусту и многочисленные декоративные виды.

Растения реагируют на вирусный патоген, активируя два основных сложных защитных механизма. Симптомы являются макроскопическим и окончательным признаком инфекции. Первым является базальная защита,

основанная на действиях базальной иммунной системы. Эта система может быть активирована так называемыми элиситорами, термин, широко используемый для обозначения разнообразной группы структурно неродственных соединений, которые действуют как сигнальные молекулы для растений, находящихся в опасности. Элиситорами, специфически распознаваемыми растением, являются бактериальные флагеллины, липополисахариды или факторы элонгации, а также грибковый хитин или гептаглюкозиды, вирусные белки. Их называют патоген-ассоциированными молекулярными паттернами (РАМР) или, в последнее время, микробно-ассоциированными молекулярными паттернами (МАМР), поскольку непатогенные микроорганизмы также имеют РАМР. Второй механизм основан на действиях адаптивной иммунной системы, состоящей из генов резистентности (R), способных специфически распознавать белки хозяина. Они кодируются генами Avr патогена и придают растению резистентный фенотип, как постулируется геном для теории генов. Вызванный статус приводит к тому, что растение вызывает сверхэкспрессию набора защитных генов: как только защитные гены активируются, растения становятся менее восприимчивыми.

В связи с чрезмерным использованием пестицидов для растений, химикатов и ущербом, вызванным такими репаративными мерами, стало насущной необходимостью найти превентивные и оздоровительные решения до того, как ущерб будет нанесен. Такая цель привела к обширным исследованиям инновационных способов и новых веществ, которые могут выполнить эту задачу и укрепить растение, защищая его от вредителей и болезней. В результате усиление естественного защитного механизма растений является одной из таких стратегий. Ряд природных веществ составляется и изучается, чтобы понять эффекты, которые они оказывают. Ламинарин, природное вещество, в изобилии присутствующее в морских водорослях, является одним из таких объектов.

Хотя были проведены многочисленные исследования по определению влияния ламинарина на механизмы защиты растений и резистентность к болезням, существует недостаток материала, отражающего механизмы и основные принципы, ведущие к внешним результатам и проявлениям эффекта ламинарина, которые могли бы быть полезным инструментом в оптимизации количества используемого химического вещества и его соответствующего эффекта. Таким образом, настало время найти решения для усиления защиты и устойчивости растений к переносимым насекомыми и грибами патогенам, воздействующим на генетическом уровне.

Таким образом, целью настоящего изобретения было предложить решение для усиления защиты и резистентности растений к переносимым насекомым и грибами патогенам и резистентности к вредителям/болезням на молекулярном и генетическом уровне. Целью настоящего изобретения было предоставить композицию для профилактики повреждений вместо оздоровительного репаративного раствора для растений. Еще одной целью настоящего изобретения была характеристика молекулярных событий, ведущих к защите и устойчивости растений к переносимым насекомыми и грибами патогенам.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Таким образом, в изобретении предложен способ повышения иммунитета растений, защиты и резистентности растений к переносимым насекомыми и грибами патогенам, повышения резистентности растений к болезням или вредителям, защиты растений от болезней или улучшения борьбы с болезнями растений путем модуляции экспрессии генов защитных генов растений, причем указанный способ включает нанесение композиции, содержащей ламинарин, на указанное растение.

Изобретение также относится к применению ламинарина для повышения иммунитета растений, защиты и устойчивости растений к переносимым насекомыми и грибами патогенам, повышения резистентности растений к болезням или вредителям, защиты растений от болезней или улучшения

борьбы с болезнями растений путем модуляции экспрессии генов защитных генов растений с помощью способа по любому из предшествующих пунктов.

В изобретении также предложена композиция, содержащая ламинарин, для повышения иммунитета растений, защиты и устойчивости растений к переносимым насекомыми и грибами патогенам, повышения резистентности растений к болезням или вредителям, защиты растений от болезней или улучшения борьбы с болезнями растений путем модуляции экспрессии генов защитных генов растений.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ РИСУНКОВ

Фиг. 1 – Экспрессия генов по сравнению с обработкой водой через 12 часов после обработки.

Фиг. 2 – Экспрессия генов по сравнению с обработкой водой через 24 часа после обработки

Фиг. 3 – Экспрессия генов по сравнению с обработкой водой через 48 часов после обработки.

Фиг. 4 – Экспрессия генов по сравнению с обработкой водой через 72 часа после обработки

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Вакцинация является установленным методом создания иммунного ответа до того, как болезнь поразит животных и людей. Однако этот метод редко применялся на растениях. Скорее оздоровительные мероприятия больше реализуются на растениях, чем профилактические. При интенсивном использовании агрохимикатов и пестицидов и последующем ущербе для окружающей среды, фитотоксичности растений и резистентности вредителей, может быть более полезным и эффективным в будущем метод, при котором защита и устойчивость растений к переносимым насекомыми и грибами патогенам усиливается средствами, подобными вакцинации. Авторы настоящего изобретения обнаружили неожиданный результат именно на этих

линиях при нанесении ламинарина на растения. К своему удивлению, авторы настоящего изобретения обнаружили, что ламинарин способен эффективно модулировать экспрессию растительных генов, участвующих в защитных механизмах, и в конечном итоге вызывать вакциноподобный ответ. Варианты осуществления этого эффекта описаны в последующих абзацах.

Далее настоящие изобретения будут описаны более полно со ссылкой на прилагаемые чертежи, на которых показаны некоторые, но не все варианты осуществления изобретения. Действительно, эти изобретения могут быть воплощены во многих различных формах, и их не следует рассматривать как ограниченные вариантами осуществления, изложенными в настоящем документе; скорее, эти варианты осуществления предложены для того, чтобы это раскрытие удовлетворяло применимым юридическим требованиям.

Многие модификации и другие варианты осуществления изобретений, изложенные в данном документе, придут на ум специалистам в данной области техники, к которой относятся эти изобретения, с учетом принципов, представленных в предшествующих описаниях и связанных с ними чертежах. Следовательно, следует понимать, что изобретения не должны ограничиваться конкретными раскрытыми вариантами осуществления и что модификации и другие варианты осуществления предназначены для включения в объем прилагаемой формулы изобретения. Хотя в данном документе используются конкретные термины, они используются только в общем и описательном смысле, а не в целях ограничения.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения предложен способ повышения иммунитета растений, защиты и устойчивости растений к переносимым насекомыми и грибами патогенам, повышения резистентности растений к болезням или вредителям, защиты растений от болезней или улучшения борьбы с болезнями растений путем модуляции экспрессии генов защитных генов растений, причем указанный способ включает приведение указанного растения в контакт с ламинарином.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения предложен способ повышения иммунитета растений, защиты и устойчивости растений к

переносимым насекомыми и грибами патогенам, повышения резистентности растений к болезням или вредителям, защиты растений от болезней или улучшения борьбы с болезнями растений путем модуляции экспрессии генов защитных генов растений, причем указанный способ включает нанесение композиции, содержащей ламинарин, на указанное растение. Используемый в данном документе термин «приведение в контакт» включает как непосредственный контакт (нанесение композиции или активного ингредиента ламинарина непосредственно на растение, обычно на листву, стебель или корни растения), так и опосредованный контакт (нанесение композиций или активного ингредиента ламинарина на местонахождение, т.е. среду обитания, место произрастания, растение, семена, почву, область, материал или среду, в которой растение растет или может расти).

В соответствии с вариантом осуществления модулируемые гены связаны с такими функциями, как структура цитоскелета в клетке (контроль), убиквитинирование во время передачи иммунного сигнала растениями, ген резистентности NBS-LRR (передача сигнала HR), регуляция экспрессии генов путями передачи сигнала стресса, ген, связанный с резистентностью, предшественник этилена, путь гена HR, регулируемые защитные ответы на сигналы жасмоновой кислоты, индуцируемый патогеном, регулятор первичного иммунитета, повышенная регуляция в инфицированных вирусом виноградных лозах, белок PR, сайленсинг генов в качестве защиты, гены активной защиты растений (белок PR).

В соответствии с вариантом осуществления модулируемые гены защиты растений выбраны из α -тубулина, убиквитин-протеинлигазы E3 March3, белка резистентности Nbs-Irr, фактора транскрипции, отвечающего за AP2-подобный этилен, быстро вызываемого белка 75 Avr/Cf9, белка, подобного 1-аминокриклопропан-1-карбоксилатоксидазе, белка, способствующего сверхчувствительному ответу, Nac 29-подобного фактора транскрипции, субтилизин-подобного протеазо-подобного, 1g07440-подобного гомолога тропинонредуктазы, связанного с патогенезом белка P4, белка PR, AY093595.1, регулятора сайленсинга генов, Pti6 или их вариантов.

Предполагается, что «варианты» означают по существу сходные последовательности. Для полинуклеотидов/генов вариант включает делецию и/или добавление одного или более нуклеотидов в одном или более внутренних сайтах нативного полинуклеотида/гена и/или замену одного или более нуклеотидов в одном или более сайтах нативного полинуклеотида/гена. Используемый в данном документе термин «нативный» полинуклеотид или полипептид включает встречающуюся в природе нуклеотидную последовательность или аминокислотную последовательность соответственно. Как правило, варианты конкретного полинуклеотида/гена по изобретению будут иметь по меньшей мере приблизительно 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или более идентичность последовательности этому конкретному полинуклеотиду, как определено программами выравнивания последовательностей и параметрами, описанными в другом месте настоящего документа. Варианты конкретного полинуклеотида/гена по изобретению (т.е. эталонного полинуклеотида) также можно оценивать путем сравнения процентной идентичности последовательности между полипептидом, кодируемым вариантным полинуклеотидом/геном, и полипептидом, кодируемым эталонным полинуклеотидом/геном. Процентная идентичность последовательностей между любыми двумя полипептидами может быть рассчитана с использованием программ выравнивания последовательностей и параметров, описанных в данном документе в другом месте. Когда любую данную пару полинуклеотидов по изобретению оценивают путем сравнения процента идентичности последовательностей, общих для двух полипептидов, которые они кодируют, процент идентичности последовательностей между двумя кодируемыми полипептидами составляет по меньшей мере приблизительно 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или более идентичности последовательности.

Предполагается, что «вариант» белка означает белок, полученный из нативного белка путем делеции или добавления одной или более аминокислот в одном или более внутренних участках нативного белка и/или замены одной или более аминокислот в одном или более участках нативного белка. Варианты белков, охватываемые настоящим изобретением, являются биологически активными, то есть они продолжают обладать желаемой биологической активностью нативного белка, то есть регулируют транскрипцию, как описано в данном документе. Такие варианты могут быть результатом, например, генетического полиморфизма или воздействий человека.

Гены защиты растений, модулированные в соответствии с изобретением, могут включать следующее (кроме α -тубулина, который использовали в качестве эталонного гена). Можно модулировать экспрессию любого одного, двух, трех, четырех, пяти, шести, семи, восьми, девяти, десяти или более из этих генов. В одном варианте осуществления гены являются сверхэкспрессированными или активированными. В одном варианте осуществления гены недостаточно экспрессируются или подавляются.

Таблица 1

Номер гена	Описание	Идентификатор гена или инвентарный номер	Функция
1	α -тубулин	Solyc04g077020.2	Строение цитоскелета в клетке (контроль)
2	Убиквитин-протеинлигаза E3 march3	Solyc01g079530.2	Убиквитинирование при передаче иммунных сигналов растениями
3	Белок резистентности Nbs-lrr	Solyc05g009760.1	Ген резистентности NBS-LRR (передача сигнала)

HR)

4	AP2-подобный этилен-чувствительный фактор транскрипции	Solyc11g072600.1	Регуляция экспрессии генов путем трансдукции стрессорного сигнала
5	Avr/Cf9 быстро вызывал белок 75	Solyc11g010250.1	ген, связанный с резистентностью
6	1-аминокриклопропан-1-карбоксилатоксидазоподобный белок	Solyc11g072100.1	Прекурсор этилена
7	Сверхчувствительный ответ вспомогательный белок	Solyc07g006570.2	Путь гена HR
8	Нас 29-подобный фактор транскрипции	Solyc05g007770.2	ответы на регулируемую защиту сигналов жасмоновой кислоты
9	Субтилизин-подобный протеаза-подобный	Solyc01g087800.2	Индуцированный патогеном регулятор первичного иммунитета
10	1g07440-подобный гомолог тропинонредуктазы	Solyc06g083470.2	Повышенная регуляция на зараженных вирусом виноградных лозах
11	Связанный с патогенезом белок P4	M69247.1	белок PR
12	белок PR	M69248.1	белок PR
13	AY093595.1	AY093595.1	белок PR
14	Регулятор сайленсинга генов	AY642285.1	Сайленсинг генов в качестве защиты
15	Pti6	U89257.1	Гены активной защиты растений (белок PR)

Полинуклеотиды/гены по изобретению могут быть изменены различными способами, включая аминокислотные замены, делеции, усечения и вставки. Способы таких воздействий в целом известны в данной области техники. Таким образом, гены и полинуклеотиды по изобретению включают как встречающиеся в природе последовательности, так и мутантные формы. Точно так же белки по изобретению охватывают как встречающиеся в природе белки, так и их вариации и модифицированные формы.

Убиквитин-протеинлигаза E3 *mach3* представляет собой ген, участвующий в убиквитинировании при передаче иммунных сигналов растениями. Убиквитинирование представляет собой протеолитический механизм, который, как было показано, участвует в нескольких путях, включая те, которые опосредуют ответы на патогены. В процесс убиквитинирования вовлечены многие ферменты, убиквитин-активирующие (E1), конъюгирующие (E2) и лигирующие (E3) ферменты. Убиквитин-протеинлигаза E3 может быть вовлечена в эндосомальный перенос. Убиквитинлигазы E3 принимают убиквитин от убиквитин-конъюгирующего фермента E2 в форме тиоэфира, а затем непосредственно переносят убиквитин на целевые субстраты. Негативные JAZ регуляторы сигнального пути JA являются субстратами лигазных комплексов SCFCO11 E3, которые передают сигнал JA для модуляции защитных реакций растений против бактериальных и биотрофных патогенов. Постулируется, что убиквитин-протеинлигаза E3 *mach3* активируется во время вирусной атаки.

Семейство генов *ACO* кодирует белок, подобный 1-аминокриклопропан-1-карбоксилатоксидазе, который является прямым предшественником гормона этилена. Было показано, что этилен играет важную роль в защите растений от биотических и абиотических стрессовых факторов. Уровень этой молекулы в тканях коррелирует с различными типами стресса, включая охлаждение, жару, лишение питательных веществ, анаэробноз, ранение и патогенную инфекцию. При заражении растений патогенами большая часть повреждений, наносимых растению, связана с автокаталитическим синтезом этилена, а не с прямым

действием патогенов. Кроме того, с годами было собрано все больше данных, которые показывают, что АСО является стадией, ограничивающей скорость производства этилена в некоторых специальных процессах.

Белок PR5 представляет собой класс белков, активируемых путем SA, который стимулирует транскрипцию NPR1 (неэкспрессор гена 1, связанного с патогеном), что, в свою очередь, приводит к активации, а также к локальному накоплению продуктов сигнатурного гена SA (PR1, PR2 и PR5), а также систематически приводит к системной приобретенной резистентности (SAR). Связанные с патогенезом белки (PR) индуцируются системно и накапливаются локально как в очаге инфекции, так и в дистальных частях растений, что приводит к развитию реакции гиперчувствительности (HR) и системной приобретенной резистентности (SAR). Семейство PR5 известно как тауматин-подобные белки (TLP). Белки PR5 высокомолекулярных групп проявляют противогрибковую активность и обнаруживаются в клеточных вакуолях. Меньшие TLP, расположенные во внеклеточном пространстве, также участвуют в защите растений от грибковой инфекции. Гены PR5 были идентифицированы во многих растениях, таких как *Prunus domestica*, *Brassica* *gara*, кукуруза, тополь и т. д., и установлено, что белок PR5, очевидно, может улучшать устойчивость растений к болезням. Сверхэкспрессия генов PR (хитиназы, глюканазы, тауматина, дефензина и тионина) по отдельности или в комбинации значительно повысила уровень защитного ответа растений против широкого спектра патогенов.

Белок, поддерживающий гиперчувствительный ответ, связан с гибелью гиперчувствительных клеток (HCD). Растения используют несколько путей защиты для противодействия вторжению патогенов. Наиболее мощной системой защиты растений от вторжения патогенов является гибель гиперчувствительных клеток (HCD). HCD представляет собой высокосогласованный сложный защитный ответ, который приводит к локальному накоплению белков, связанных с патогенезом (PR), отложению каллозы и лигнина в клеточной стенке вблизи очага инфекции и быстрой

локальной гибели клеток в точке проникновения патогена. НСД, также называемый гиперчувствительной реакцией (HR), связан с резистентностью к болезням. Реакция гиперчувствительности (HR) представляет собой форму запрограммированной гибели клеток (PCD) в месте заражения патогеном, которая, как считается, изолирует биотрофные патогены в месте проникновения патогена и, таким образом, предотвращает распространение наружу в сторону здоровых тканей. Очень часто резистентность, опосредованная R-генами, связана с тем, что они индуцируют HR, что приводит к апоптозу. Большинство R-генов растений кодируют белки NOD-подобных рецепторов (NLR). Архитектура домена белка NLR состоит из домена NB-ARC, который представляет собой нуклеотид-связывающий домен, ответственный за конформационные изменения, связанные с активацией белка NLR. В неактивной форме домен NB-ARC связан с аденозиндифосфатом (АДФ). При обнаружении патогена АДФ заменяется аденозинтрифосфатом (АТФ), и это вызывает конформационные изменения в белке NLR, что приводит к HR. На N-конце NLR имеет либо домен рецептора толл-интерлейкина (TIR) (также обнаруженный в толл-подобных рецепторах млекопитающих), либо мотив спиральной спирали (CC). Оба домена TIR и CC вовлечены в гибель клеток во время HR. С-конец NLR состоит из мотива повтора, богатого лейцином (LRR), который участвует в восприятии факторов вирулентности патогена. HR можно активировать двумя основными способами: непосредственно и опосредованно. Прямое связывание факторов вирулентности с NLR может привести к активации HR. Связь «ген за геном» между растением и патогеном, которая определяет, приведет ли взаимодействие к болезни или резистентности/HR. Каждый доминантный ген резистентности (R-ген) у хозяина соответствовал доминантному гену авирулентности (ген *Avr*) у патогена. Резистентность присваивалась только в том случае, если и R-ген, и соответствующий ген *Avr* присутствовали в одном и том же взаимодействии.

Родственный класс белков, известных как рецепторы распознавания образов (PRR), кодирует связанные с мембраной белки, которые распознают

высококонсервативные микробные молекулы, известные как молекулярные паттерны, ассоциированные с микробами или патогенами (MAMP или PAMP). При распознавании они активируют защитный ответ, известный как иммунитет, запускаемый MAMP/PAMP (MTI/PTI), который качественно подобен тому, который индуцируется NLR, хотя количественно снижен и обычно не включает запрограммированную гибель клеток.

Субтилизиноподобные протеазы (субтилазы) представляют собой сериновые протеазы, характеризующиеся каталитической триадой из трех аминокислот: аспартата, гистидина и серина. У томата к настоящему времени описано 15 генов, кодирующих субтилазы. Субтилазы растений обладают широким спектром биологических функций, участвуя не только во всех аспектах жизненного цикла растений (развитие семян и плодов, модификация клеточных стенок), но и в реакции на биотический и абиотический стресс. Некоторые субтилазы специфически индуцируются после инфицирования патогеном. Во взаимодействиях растений и патогенов первое свидетельство важности растительных субтилизиноподобных белков было зарегистрировано в томате, где экспрессия субтилаз P69B и P69C индуцировалась после атаки патогена и применения салициловой кислоты (СК). Показано, что субтилизиноподобные белки выполняют важные функции в распознавании патогенов и инициации сигнальных каскадов, ведущих к активации генов, связанных с защитой. Субтилазы особенно распространены в растениях: 63 гена известны в *Oryza sativa*, 56 генов в *Arabidopsis thaliana* и не менее 15 в геномах *Lycopersicon esculentum*.

Регулятор белка сайленсинга генов РНК-сайленсинга представляет собой основанную на РНК систему инактивации генов, которая играет важную роль в качестве противовирусного защитного механизма у растений и беспозвоночных. Он активируется путем накопления двухцепочечных РНК (дцРНК), которые расщепляются нуклеазой, подобной РНКазе III, называемой DICER (DCL), на малые интерферирующие РНК (миРНК). миРНК имеют длину 21-25 нуклеотидов и являются ключевыми медиаторами путей,

связанных с РНК-сайленсингом, в растениях и других эукариотических организмах. Одна цепь миРНК включена в РНК-индуцированный комплекс сайленсинга (RISC), чтобы направлять белки Argonaute (AGO) к целевым молекулам РНК последовательно-специфическим образом. Целевые РНК деградируют или ингибируются. У растений сигнал сайленсинга усиливается за счет активности кодируемых хозяином РНК-зависимых РНК-полимераз (RDR), которые действуют для вторичной продукции миРНК. У модельного растения *A. thaliana* есть четыре разных DCL, десять AGO и шесть RDR, которые специализируются на разных путях, связанных с сайленсингом. После открытия защитного механизма РНК-сайленсинга стало известно, что РНК-сайленсинг играет ключевую роль в развитии восстановления растений при вирусных болезнях. Обычно предполагается, что вирус, вызывающий начальные симптомы, активировал сайленсинг вирусной РНК, который подавляет распространение инфекции на верхние листья и делает их специфически невосприимчивыми к вторичному заражению тем же вирусом.

Предполагается, что гены быстро выявляемого белка Avt/Cf9 (ACRE) кодируют регуляторные белки, включая протеинкиназы и факторы транскрипции.

Фактор транскрипции, участвующий в этиленовом пути инвазии вируса коррелирует с более высоким синтезом этилена; это предполагает, что гены АСО участвуют в ответе на атаку патогена. Белки Pti4, Pti5 и Pti6 взаимодействуют с продуктом гена резистентности к болезням Pto, протеинкиназой Ser-Thr. Они принадлежат к семейству факторов транскрипции, уникальных для растений, к фактору ответа на этилен (ERF) и специфически связываются с цис-элементом GCC-box, присутствующим в промоторах многих генов, связанных с патогенезом (PR).

В соответствии с вариантом осуществления эффект модуляции является немедленным и начинается, как только композиция, содержащая ламинарин, применяется к растению.

В соответствии с вариантом осуществления эффект модуляции может начаться после лаг-периода.

В соответствии с другим вариантом осуществления продолжительность модулирующего эффекта ламинарина может варьироваться от краткосрочного до долгосрочного/долговременного. Краткосрочный эффект может варьироваться от одного дня до двух недель, например до одной недели или до двух недель. Долгосрочный эффект может варьироваться от двух недель до многих лет, например до четырех недель, до трех месяцев, до шести месяцев, до одного года, до двух лет, до пяти лет или дольше. В одном варианте осуществления модулирующий эффект ламинарина может быть постоянным для создания пожизненной защиты и устойчивости к переносимым насекомыми и грибами патогенам в растениях.

В соответствии с вариантом осуществления настоящего изобретения предложен способ борьбы с вирусной болезнью или болезнью, вызванной переносимыми насекомыми и грибами патогенами в растении, включающий нанесение композиции, содержащей ламинарин, на указанное растение, где ламинарин модулирует экспрессию генов защитных генов растений в указанном растении.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения предложена композиция, содержащая ламинарин, для повышения иммунитета растений, защиты и устойчивости растений к переносимым насекомыми и грибами патогенам, повышения резистентности растений к болезням или вредителям, защиты растений от болезней или улучшения борьбы с болезнями растений путем модуляции экспрессии генов защитных генов растений.

В одном варианте осуществления композиция по настоящему изобретению может содержать приблизительно от 0,1 % до 99 % ламинарина.

Предпочтительно композиция может содержать приблизительно от 0,1 % до 80 % ламинарина.

В одном варианте осуществления концентрация ламинарина в указанной композиции находится в диапазоне от 10 г/л до 1000 г/л.

В одном варианте осуществления композиции по настоящему изобретению могут дополнительно содержать вспомогательные вещества в составе. Могут быть использованы любые подходящие известные вспомогательные вещества в составе.

Термин «вспомогательное вещество в составе» или «вспомогательные вещества в составе» или «агрохимически подходящий носитель наполнителя» в значении изобретения означает вспомогательные вещества, подходящие для состава пестицидов или биорастворов, таких как дополнительные растворители, и/или носители, и/или поверхностно-активные вещества (ионогенные или неионогенные поверхностно-активные вещества, адъюванты, диспергаторы) и/или консерванты, и/или пеногасители, и/или антифризы.

Агрохимически подходящий носитель наполнителя может представлять собой один или комбинацию адъювантов, соразтворителей, поверхностно-активных веществ, красителей, эмульгаторов, загустителей, агентов, предохраняющих от замерзания, биоцидов, противовспенивающих агентов, стабилизаторов, смачивающих агентов или их смеси, которые необязательно можно добавлять к композициям по настоящему изобретению.

Поверхностно-активные вещества могут быть выбраны из неионогенных, анионогенных или катионогенных поверхностно-активных веществ.

Примеры неионных поверхностно-активных веществ включают простые полиэтоксилорированные полиарилфенольные эфиры, простые полиэтоксилорированные полиалкилфенольные эфиры, полигликольные производные простых эфиров насыщенных жирных кислот, полигликольные производные простых эфиров ненасыщенных жирных кислот,

полигликольные производные простых эфиров алифатических спиртов, полигликольные производные простых эфиров циклоалифатических спиртов, сложные эфиры жирных кислот и полиоксиэтиленсорбитана, алкоксилированные растительные масла, алкоксилированные ацетиленовые диолы, полиалкоксилированные алкилфенолы, алкоксилаты жирных кислот, алкоксилаты сорбитана, сложные эфиры сорбита, полигликозиды C8-C22-алкила или -алкенила, простые полиалкоксилированные стирларильные эфиры, оксиды алкиламина, простые эфиры блок-сополимеров, полиалкоксилированный жирный глицерид, простые эфиры полиалкиленгликоля, линейные алифатические или ароматические сложные полиэфиры, органосилоканы, полиарилфенолы, алкоксилаты сложных эфиров сорбита, блок-сополимеры полиалкиленоксида, акриловые сополимеры и моно- и диэфиры этиленгликоля и их смеси.

Примеры анионных поверхностно-активных веществ включают сульфаты спиртов, сульфаты эфиров спиртов, сульфаты алкиларилэфиров, алкиларилсульфонаты, такие как алкилбензолсульфонаты и алкилнафталинсульфонаты и их соли, алкилсульфонаты, моно- или дифосфатные эфиры полиалкоксилированных алкиловых спиртов или алкилфенолов, моно- или ди-сульфосукцинатные эфиры алканолов C12-C15 или полиалкоксилированные алканолы C12-C15, карбоксилаты эфиров спиртов, карбоксилаты эфиров фенолов, сложные эфиры этоксилированных полиоксиалкиленгликолей многоосновных кислот, состоящие из оксибутилена или остатка тетрагидрофурана,сульфоалкиламидов и их солей, таких как натриевая соль N-метил-N-олеоилтаурата, полиоксиалкиленалкилфенолкарбоксилаты, полиоксиалкиленспирткарбоксилаты, продукты конденсации алкилполигликозида/алкенила янтарного ангидрида, сульфаты алкиловых эфиров, нафталинсульфонаты, конденсаты нафталинформальдегида, алкилсульфонамиды, сульфированные алифатические полиэфиры, сульфатные эфиры стирилфенилалкоксилатов и сульфатные эфиры стирилфенилалкоксилатов и соответствующие их натриевые, калиевые, магниевые, цинковые, аммониевые, алкиламмониевые, диэтаноламмониевые

или триэтаноламмониевые соли, соли лигнинсульфоновой кислоты, такие как натриевые, калиевые, магниевые, кальциевые или аммониевые соли полиалкоксилированные полиарилфенольные сульфатные эфиры и полиалкоксилированные полиарилфенольные фосфатные эфиры и сульфированные алкилфенолэтоксилаты и фосфатированные алкилфенолэтоксилаты.

Катионные поверхностно-активные вещества включают алканоламиды жирных кислот C8-C18 и полиалкоксилаты жирных аминов C8-C18, хлориды алкилдиметилбензиламмония C10-C18, кокосовые алкилдиметиламиноуксусные кислоты и фосфатные эфиры полиалкоксилатов C8-C18-жирных аминов.

Эмульгаторы, которые могут быть преимущественно использованы в данном изобретении, могут быть легко определены специалистами в данной области и включают различные неионные, анионные, катионные и амфотерные эмульгаторы или смесь двух или более эмульгаторов. Примеры неионогенных эмульгаторов, подходящих для получения эмульгируемых концентратов, включают простые эфиры полиалкиленгликоля и продукты конденсации алкил- и арилфенолов, алифатических спиртов, алифатических аминов или жирных кислот с этиленоксидом, пропиленоксиды, такие как этоксилированные алкилфенолы и сложные эфиры карбоновых кислот, солюбилизированные с полиолом или полиоксиалкиленом. Катионные эмульгаторы включают соединения четвертичного аммония и соли жирных аминов. Анионные эмульгаторы включают маслорастворимые соли (например, кальция) алкиларилсульфокилот, маслорастворимые соли или сульфатированные полигликолевые эфиры и соответствующие соли фосфатированного полигликолевого эфира.

В одном варианте осуществления красители могут быть выбраны из оксида железа, оксида титана и берлинской лазури и органических красящих средств, таких как ализариновые красящие средства, азокрасители и металл-фталоцианиновые красящие средства, и микроэлементов, таких как соли железа, марганца, бора, меди, кобальта, молибдена и цинка.

Другой вариант осуществления включает добавление загустителя или связующего вещества, которое может быть выбрано, помимо прочего, из мелассы, сахарного песка, альгинатов, камеди карайи, гуаровой камеди, трагакантовой камеди, полисахаридной камеди, слизи, ксантановой камеди или их комбинации. В другом варианте осуществления связующее может быть выбрано из силикатов, таких как алюмосиликат магния, поливинилацетаты, сополимеры поливинилацетата, поливиниловые спирты, сополимеры поливинилового спирта, целлюлоз, включая этилцеллюлозы и метилцеллюлозы, гидроксиметилцеллюлозы, гидроксипропилцеллюлозы, гидроксиметилпропилцеллюлозы, поливинилпирролидонов, декстринов, мальтодекстринов, полисахаридов, жиров, масел, белков, гуммиарабика, шеллаков, винилиденхлорида, сополимеров винилиденхлорида, лигносульфонатов кальция, акриловых сополимеров, крахмалов, поливинилакрилатов, зеинов, желатина, карбоксиметилцеллюлозы, хитозана, полиэтиленоксида, полимеров и сополимеров акриламида, полигидроксиэтилакрилата, мономеров метилакриламида, альгината, этилцеллюлозы, полихлоропрена и их сиропов или смесей; полимеров и сополимеров винилацетата, метилцеллюлозы, винилиденхлорида, акрила, целлюлозы, поливинилпирролидона и полисахарида; полимеров и сополимеров винилиденхлорида и сополимеров винилацетата и этилена; комбинации поливинилового спирта и сахарозы; пластификаторов, таких как глицерин, пропиленгликоль, полигликоли.

В другом варианте осуществления антифризом(ами), добавляемым(и) в композицию, могут быть спирты, выбранные из группы, включающей, но не ограничиваясь этим, этиленгликоль, 1,2-пропиленгликоль, 1,3-пропиленгликоль, 1,2-бутандиол, 1,3-бутандиол, 1,4-бутандиол, 1,4-пентандиол, 3-метил-1,5-пентандиол, 2,3-диметил-2,3-бутандиол, триметилпропан, маннит, сорбит, глицерин, пентаэритрит, 1,4-циклогександиметанол, ксиленол, бисфенолы, такие как бисфенол А или подобные. Кроме того, эфирные спирты, такие как диэтиленгликоль, триэтиленгликоль, тетраэтиленгликоль, полиоксиэтиленгликоль или полиоксипропиленгликоль с молекулярной массой до приблизительно 4000,

монометиловый эфир диэтиленгликоля, моноэтиловый эфир диэтиленгликоля, монометиловый эфир триэтиленгликоля, бутоксиэтанол, монобутиловый эфир бутиленгликоля, дипентаэритрит, трипентаэритрит, тетрапентаэритрит, диглицерин, триглицерин, тетраглицерин, пентаглицерин, гексаглицерин, гептаглицерин, октаглицерин.

В соответствии с вариантом осуществления биоциды могут быть выбраны из бензотиазолов, 1,2-бензизотиазолин-3-она, дихлор-s-триазинтриона натрия, бензоата натрия, сорбата калия, 1,2-фенилизотиазолин-3-она, интерхлороксиленол бутил-параоксибензоата.

В соответствии с вариантом осуществления пеногаситель может быть выбран из полидиметоксисилоксана, полидиметилсилоксана, алкилполиакрилатов, касторового масла, жирных кислот, сложных эфиров жирных кислот, сульфата жирных кислот, жирного спирта, сложных эфиров жирных спиртов, сульфата жирного спирта, оливкового масла, моно- и диглицерида, парафинового масла, парафинового воска, полипропиленгликоля, силиконового масла, растительных и животных жиров, сульфатов растительных и животных жиров, растительных и животных масел, сульфатов растительных и животных масел, растительных и животных восков, сульфатов растительных и животных восков, агентов на основе кремния или стеарата магния.

Типичными органическими жидкостями, которые можно использовать при получении эмульгируемых концентратов по настоящему изобретению, являются ароматические жидкости, такие как ксилоловые, пропилбензолные фракции или смешанные нафталиновые фракции, минеральные масла, замещенные ароматические органические жидкости, такие как диоктилфталат, керосин, диалкиламида различных жирных кислот, особенно диметиламида жирных гликолей и производные гликоля, такие как n-бутиловый эфир, этиловый эфир или метиловый эфир диэтиленгликоля и метиловый эфир триэтиленгликоля. Смеси двух или более органических жидкостей также часто подходят для получения эмульгируемого концентрата. Составы также могут содержать другие совместимые добавки, например регуляторы роста растений

и другие биологически активные соединения, используемые в сельском хозяйстве.

Добавки, используемые для состава, включают, например, твердый носитель, такой как каолинит, серицит, диатомовая земля, гашеная известь, карбонат кальция, тальк, белая сажа, каолин, бентонит, глина, карбонат натрия, бикарбонат натрия, мирабилит, цеолит или крахмал; растворитель, такой как вода, толуол, ксилол, лигроиновый растворитель, диоксан, диметилсульфоксид, N,N-диметилформаид, диметилацетамид, N-метил-2-пирролидон или спирт; анионное поверхностно-активное вещество, такое как соль жирной кислоты, бензоат, поликарбоксилат, соль эфира алкилсерной кислоты, алкилсульфат, алкиларилсульфат, сульфат алкилдигликолевого эфира, соль сложного эфира спирта и серной кислоты, алкилсульфонат, алкиларилсульфонат, арилсульфонат, лигнинсульфонат, дисульфонат алкилдифенилового эфира, полистиролсульфонат, соль эфира алкилфосфорной кислоты, алкиларилфосфат, стирларилфосфат, соль полиоксиэтиленалкилового эфира серной кислоты, сульфат полиоксиэтиленалкиларилового эфира, соль сложного эфира серной кислоты с полиоксиэтилен-алкильным простым эфиром, фосфат алкилового простого эфира полиоксиэтилена, соль сложного эфира полиоксиэтиленалкиларилфосфорной кислоты, соль сложного эфира полиоксиэтиленарилового эфира фосфорной кислоты, соль сложного эфира акиларилфосфорной кислоты с полиоксиэтиленом или соль продукта конденсации нафталинсульфоната с формалином; неионогенное поверхностно-активное вещество, такое как сложный эфир жирной кислоты с сорбитаном, сложный эфир жирной кислоты с глицерином, полиглицерид жирной кислоты, полигликолевый простой эфир жирнокислотного спирта, ацетиленгликоль, ацетиленовый спирт, оксиалкиленовый блок-полимер, алкиловый простой эфир полиоксиэтилена, алкиларилловый простой эфир полиоксиэтилена, полиоксиэтиленстирларилловый простой эфир, алкиловый простой эфир полиоксиэтиленгликоля, полиэтиленгликоль, сложный эфир полиоксиэтилена и жирной кислоты, сложный эфир полиоксиэтиленсорбитана и жирной кислоты, сложный эфир полиоксиэтиленглицерина и жирной

кислоты, полиоксиэтиленовое гидрогенизированное касторовое масло или сложный эфир полиоксипропиленовой жирной кислоты; и растительное масло или минеральное масло, такое как оливковое масло, капоковое масло, касторовое масло, пальмовое масло, масло камелии, кокосовое масло, кунжутное масло, кукурузное масло, масло из рисовых отрубей, арахисовое масло, хлопковое масло, соевое масло, рапсовое масло, льняное масло, тунговое масло или жидкие парафины. Эти добавки могут быть подходящим образом выбраны для использования по отдельности или в комбинации в виде смеси двух или более из них при условии, что достигается цель настоящего изобретения. Кроме того, добавки, отличные от вышеупомянутых, могут быть подходящим образом выбраны для использования среди тех, которые известны в данной области. Например, обычно используются различные добавки, например, может использоваться наполнитель, загуститель, противоосаждающий агент, антифриз, стабилизатор дисперсии, антидот, агент против плесени, агент для образования пузырьков, дезинтегратор и связующее.

Агрехимический состав может также содержать один или более антиоксидантов. Предпочтительно агдохимический состав содержит антиоксиданты. Антиоксидантами являются, например, аминокислоты (например, глицин, гистидин, тирозин, триптофан) и их производные, имидазол и производные имидазола (например, урокановая кислота), пептиды, такие как, например, D, L-карнозин, D-карнозин, L-карнозин и его производные (например, ансерин), каротиноиды, каротины (например, α -каротин, β -каротин, ликопин) и их производные, липоевая кислота и ее производные (например, дигидролипоевая кислота), ауротиоглюкоза, пропилтиоурацил и другие тиосоединения (например, тиоглицерин, тиосорбит, тиогликолевая кислота, тиоредоксин, глутатион, цистеин, цистин, цистамин и их гликозиловый, N-ацетиловый, метиловый, этиловый, пропиловый, амиловый, бутиловый, лауриловый, пальмитоиловый, олеиловый, γ -линолеиловый, холестериновый и глицериловый эфиры), и их соли, дилаурилтиодипропионат, дистеарилтиодипропионат, тиодипропионовая кислота и их производные (сложные эфиры, простые

эферы, пептиды, липиды, нуклеотиды, нуклеозиды и соли) и сульфоксиминовые соединения (например, бутионинсульфоксимины, гомоцистеинсульфоксимин, бутионинсульфоны, пента-, гекса-, гептатионин сульфоксимин) в очень низких переносимых дозах (например, от пмоль/кг до пмоль/кг), а также хелатирующие агенты металлов (например, α -гидроксижирные кислоты, ЭДТА, ЭГТА, фитиновая кислота, лактоферрин), α -гидроксикислоты (например, лимонная кислота, молочная кислота, яблочная кислота), гуминовые кислоты, желчная кислота, желчные экстракты, сложные эфиры галла (например, пропил, октил и додецилгаллат), флавоноиды, катехины, билирубин, биливердин и их производные, ненасыщенные жирные кислоты и их производные (например, γ -линоленовая кислота, линолевая кислота, арахидоновая кислота, олеиновая кислота), фолиевая кислота и ее производные, гидрохинон и ее производные (например, арбутин), убихинон и убихинол и их производные, витамин С и его производные (например, аскорбилпальмитат, стеарат, дипальмитат, ацетат, аскорбилфосфаты Mg, аскорбат натрия и магния, аскорбилфосфат и сульфат динатрия, аскорбилтокоферилфосфат калия, аскорбат хитозана), изоаскорбиновая кислота и ее производные, токоферолы и их производные (например, токоферилацетат, линолеат, олеат и сукцинат, токоферет-5, токоферет-10, токоферет-12, токоферет-18, токоферет-50, токоферсолан), витамин А и производные (например, пальмитат витамина А), кониферилбензоат бензойной смолы, рутин, рутиновая кислота и ее производные, динатрий рутинилдисульфат, коричная кислота и ее производные (например, феруловая кислота, этилферулят, кофейная кислота), койевая кислота, гликолят и салицилат хитозана, бутилгидрокситолуол, бутилгидроксианизол, нордигидрогваяковая кислота, нордигидрогваяретовая кислота, тригидроксибутирофенон, мочева кислота и ее производные, манноза и ее производные, селен и производные селена (например, селенометионин), стильбены и производные стильбена (например, оксид стильбена, транс-стильбенноксид). Согласно изобретению, могут быть использованы подходящие производные (соли, сложные эфиры, сахара, нуклеотиды, нуклеозиды, пептиды и липиды) и смеси указанных активных ингредиентов

или растительных экстрактов (например, масло чайного дерева, экстракт розмарина и розмариновая кислота), которые содержат эти антиоксиданты. Как правило, возможны смеси вышеупомянутых антиоксидантов.

В соответствии с вариантом осуществления примерами подходящих растворителей являются вода, ароматические растворители (например, продукты Solvesso, ксилол), парафины (например, фракции минерального масла, такие как керосин или дизельное топливо), каменноугольные масла и масла растительного или животного происхождения, алифатические, циклические и ароматические углеводороды, например толуол, ксилол, парафин, тетрагидронафталин, алкилированные нафталины или их производные, спирты (например, метанол, бутанол, пентанол, бензиловый спирт, циклогексанол), кетоны (например, циклогексанон, гамма-бутиролактон), пирролидоны (NMP, NEP, NOP), ацетаты (диацетат гликоля), гликоли, диметиламиды жирных кислот, жирные кислоты и сложные эфиры жирных кислот, изофорон и диметилсульфоксид. В принципе, можно также использовать смеси растворителей.

В соответствии с вариантом осуществления подходящими поверхностно-активными веществами являются соли щелочных металлов, щелочноземельных металлов и аммония лигносульфоновой кислоты, нафталинсульфокислота, фенолсульфокислота, дибутил нафталинсульфокислота, алкиларилсульфонаты, алкилсульфаты, алкилсульфонаты, сульфаты спиртов жирного ряда, жирные кислоты и сульфатированные гликолевые эфиры спиртов жирного ряда, кроме того, конденсаты сульфированного нафталина и производных нафталина с формальдегидом, конденсаты нафталина или нафталинсульфокислоты с фенолом и формальдегидом, эфиры полиоксиэтиленоктилфенола, этоксилированные изооктилфенолы, октилфенолы, нонилфенолы, полигликолевые простые эфиры алкилфенолов, полигликолевые простые эфиры трибутилфенила, полигликолевые простые эфиры тристеарилфенила, алкиларилполиэфирные спирты, конденсаты этиленоксида спирта жирного ряда/окси этилена, этоксилированное касторовое масло, этоксилированный

полиоксиэтиленалкиловый эфир, этоксилированный полиоксипропилен, полигликольэфирный ацетат лауриловых спиртов, сложные эфиры сорбита, лигносульфитные отработанные растворы и метилцеллюлоза.

В соответствии с вариантом осуществления примерами подходящих носителей являются минеральные земли, такие как силикагели, силикаты, тальк, каолин, аттаклей, известняк, известь, мел, каменная крошка, лесс, глина, доломит, диатомовая земля, сульфат кальция, сульфат магния, оксид магния., молотые синтетические материалы, удобрения, такие как, например, сульфат аммония, фосфат аммония, нитрат аммония, мочевины и продукты растительного происхождения, такие как зерновая мука, мука из коры деревьев, мука из древесины и ореховой скорлупы, порошки целлюлозы, поливинилпирролидон и другие твердые носители).

Подходящими консервантами являются, например, 1,2-бензизотиазолин-3-он и/или 2-метил-2Н-изотиазол-3-он, или бензоат натрия, или бензойная кислота.

В соответствии с вариантом осуществления в качестве вспомогательного вещества в составе могут быть использованы зеленые растворители.

Используемый в данном документе термин «зеленый растворитель» относится к безвредным для окружающей среды растворителям или биорастворителям. Он охватывает растворители, которые являются экологически подходящими, благоприятными или предпочтительными. Зеленый растворитель может быть получен в результате обработки биологического материала, сельскохозяйственного материала или синтетического процесса. Зеленые растворители также называют зеленой химией, и их использование не обязательно ограничивается агрохимикатами.

Зеленые растворители могут быть выбраны из этиллактата, сложных эфиров лактата, амидов карбоновых кислот, таких как амид молочной кислоты, диамидов карбоновых кислот, диметиламидов алкилкарбоновых кислот, таких как диметиламид природной молочной кислоты (диметиламид молочной кислоты).

Используемый в данном документе термин «растение» или «растение-мишень» включает клетки растений, протопласты растений, культуры тканей клеток растений, из которых растения могут быть регенерированы, каллусы растений, скопления растений и клетки растений, которые являются интактными в растениях или частях растений, такие как зародыши, пыльца, семяпочки, семена, листья, цветы, ветки, плоды, зерно, ядра, колосья, початки, шелуха, стебли, корни, кончики корней, пыльники и т.п. Под зерном понимаются зрелые семена, произведенные коммерческими производителями для целей, отличных от выращивания или воспроизводства вида. Потомство, варианты и мутанты регенерированных растений также включены в объем изобретения при условии, что эти части содержат интродуцированные или гетерологичные полинуклеотиды, раскрытые в данном документе.

Настоящее изобретение может быть использовано для модуляции экспрессии генов у любых видов растений, включая, но не ограничиваясь ими, однодольные и двудольные растения. Примеры представляющих интерес видов растений включают, но не ограничиваются ими, кукурузу (*Zea mays*), *Brassica* sp. (например, *B. napus*, *B. rapa*, *B. juncea*), особенно те виды *Brassica*, которые можно использовать в качестве источников масла из семян, люцерну (*Medicago sativa*), рис (*Oryza sativa*), рожь (*Secale зерновые*), сорго (*Sorghum bicolor*, *Sorghum vulgare*), просо (например, просо американское (*Pennisetum glaucum*), просо обыкновенное (*Panicum miliaceum*), просо лисохвост (*Setaria italica*), просо пальчатое (*Eleusine coracana*)), подсолнечник (*Helianthus annuus*), сафлор (*Carthamus tinctorius*), пшеницу (*Triticum aestivum*), соевые бобы (*Glycine max*), табак (*Nicotiana tabacum*), картофель (*Solanum tuberosum*), арахис (*Arachis hypogaea*), хлопок (*Gossypium barbadense*, *Gossypium hirsutum*), сладкий картофель (*Ipomoea batatas*), маниоку (*Manihot esculenta*), кофе (*Coffea* spp.), кокос (*Cocos nucifera*), ананас (*Ananas comosus*), цитрусовые (*Citrus* spp.), какао (*Theobroma cacao*), чай (*Camellia sinensis*), банан (*Musa* spp.), авокадо (*Persea americana*), инжир (*Ficus casica*), гуаву (*Psidium guajava*), манго (*Mangifera indica*), оливу (*Olea europaea*), папайю (*Carica papaya*), кешью (*Anacardium occidentale*), макадамию (*Macadamia*

integrifolia), миндаль (*Prunus amygdalus*), сахарную свеклу (*Beta vulgaris*), сахарный тростник (*Saccharum spp.*), овес, ячмень, овощи, декоративные растения и хвойные деревья.

К овощам относятся томаты (*Lycopersicon esculentum*), салат (например, *Lactuca sativa*), зеленая фасоль (*Phaseolus vulgaris*), лимская фасоль (*Phaseolus Limensis*), горох (*Lathyrus spp.*) и представители рода *Cucumis*, такие как огурцы (*C. sativus*), дыня (*C. cantalupensis*) и мускусная дыня (*C. melo*). К декоративным растениям относятся азалии (виды *Rhododendron*), гортензии (*Macrophylla Hydrangea*), гибискусы (*Hibiscus rosasanensis*), розы (виды *Rosa*), тюльпаны (виды *Tulipa*), нарциссы (виды *Narcissus*), петунии (*Petunia hybrida*), гвоздики (*Dianthus caryophyllus*), пуансеттия (*Euphorbia pulcherrima*) и хризантема.

Хвойные деревья, которые можно использовать при осуществлении настоящего изобретения, включают, например, сосны, такие как сосна обыкновенная (*Pinus taeda*), сосна косая (*Pinus elliotii*), сосна пондероза (*Pinus ponderosa*), скрученная сосна (*Pinus contorta*) и сосна монтерейская (*Pinus contorta*); Дугласова пихта (*Pseudotsuga menziesii*); болиголов западный (*Tsuga canadensis*); ель ситхинская (*Picea glauca*); секвойя вечнозеленая (*Sequoia sempervirens*); настоящие пихты, такие как пихта серебристая (*Abies amabilis*) и пихта бальзамическая (*Abies balsamea*); и кедры, такие как западный красный кедр (*Thuja plicata*) и аляскинский желтый кедр (*Chamaecyparis nootkatensis*). В конкретных вариантах осуществления растениями по настоящему изобретению являются сельскохозяйственные растения (например, кукуруза, люцерна, подсолнечник, капуста, соя, хлопок, сафлор, арахис, сорго, пшеница, просо, табак и т. д.). В других вариантах осуществления оптимальными являются растения кукурузы и сои, а в еще других вариантах осуществления оптимальными являются растения кукурузы.

Другие представляющие интерес растения включают зерновые растения, дающие интересующие семена, масличные растения и бобовые растения.

Представляющие интерес семена включают семена зерновых, таких как кукуруза, пшеница, ячмень, рис, сорго, рожь и т. д. Масличные растения включают хлопок, сою, сафлор, подсолнечник, капусту, кукурузу, люцерну, пальму, кокос и т. д. Бобовые растения включают фасоль и горох. Бобы включают гуар, рожковое дерево, пажитник, соевые бобы, садовые бобы, коровий горох, бобы маш, лимскую фасоль, фасоль, чечевицу, нут и т. д.

«Растение», или «исследуемое растение», или «растение-мишень» представляет собой растение, в котором произошло или должно произойти изменение, такое как модуляция экспрессии гена, или растение, происходящее от растения, измененного таким образом, и которое включает в себя изменение. «Контроль» или «контрольное растение» обеспечивает контрольную точку для измерения изменений фенотипа рассматриваемого растения.

Контрольное растение может включать, например: (а) растение дикого типа, т.е. того же генотипа, что и исходный материал для изменения, которое привело к получению рассматриваемого растения; (б) растение, генетически идентичное рассматриваемому растению или растительной клетке, но не подвергающееся воздействию условий или стимулов, которые могли бы модулировать экспрессию представляющего интерес гена; или (в) само рассматриваемое растение в условиях, в которых не модулируется представляющий интерес ген.

Аспект настоящего изобретения относится к композиции для модуляции экспрессии генов защитных генов растений, причем указанная композиция содержит ламинарин.

В одном варианте осуществления предложен способ характеристики экспрессии генов защитных генов растений, осуществляемый путем нанесения композиции, содержащей ламинарин, на указанное растение, включающий:

- а) выделение генетического материала из рассматриваемого растения;
- б) необязательно, амплификацию указанного генетического материала; и

в) анализ уровней экспрессии указанного генетического материала;

причем повышенный уровень экспрессии предполагаемого гена защиты растения по сравнению с контролем указывает на то, что ламинарин вызывает сверхэкспрессию или активацию указанного гена, или пониженный уровень экспрессии предполагаемого гена защиты растения по сравнению с контролем указывает на то, что ламинарин вызывает недостаточную экспрессию или подавление указанного гена.

Способы амплификации и анализа могут включать любые известные методы, например полимеразную цепную реакцию (ПЦР), гель-электрофорез и методы блоттинга, такие как вестерн-блоттинг, нозерн-блоттинг или саузерн-блоттинг. В одном варианте осуществления указанную амплификацию проводят с использованием набора прямых и обратных праймеров. В одном варианте осуществления указанный метод амплификации представляет собой количественную ПЦР.

В одном варианте осуществления указанный способ включает выделение ДНК и/или РНК из рассматриваемого растения. В варианте осуществления шаг а) дополнительно включает синтез кДНК при условии, что экстрагированный генетический материал представляет собой РНК.

В соответствии с вариантом осуществления настоящие композиции можно наносить на очаг с помощью обычных наземных опрыскивателей, аппликаторов гранул, полива (обливки), капельного орошения, внесения в борозды, опрыскивания, распыления, разбрасывания, опыливания, вспенивания, разбрызгивания, внесения гранул, авиационные методы опрыскивания, аэрометодов внесения, боковой подкормки, точечного внесения, кольцевого внесения, внесения в корневую зону, пралинажа, погружения корней рассады, протравливания семян, инъекции ствола/стебля, подсыпки, протирки, подкормки корней, пропитки почвы, размещения в капсулах, прикормки, фумигации, кольцевания, внекорневой обработки, базальной обработки, обработки помещений, фумигации в закрытых помещениях, способов, использующих применение с использованием

современных технологий, таких как, помимо прочего, дроны, роботы, устройство предварительного дозирования, ранцевый опрыскиватель, спрей бак, опрыскиватель или оросительная система, а также с помощью таких других традиционных средств, известных специалистам в данной области техники.

В одном варианте осуществления количество применяемого ламинарина находится в диапазоне от 20 г а.и./га до 200 г а.и./га.

В соответствии с вариантом осуществления настоящее изобретение способно к модуляции генов защиты растений для обеспечения защиты и устойчивости к вирусам/вредителям, вызывающим вирусные болезни, таким как, но не ограничиваясь ими, вирусы из отряда Bunyavirales, Mononegavirales, Ortervirales, Picornavirales, Serpentovirales, Tymovirales; вирусы из семейств Alphaflexiviridae, Amalgaviridae, Aspiviridae, Benyviridae, Betaflexiviridae, Bromoviridae, Caulimoviridae, Closteroviridae, Endornaviridae, Fimoviridae, Geminiviridae, Genomoviridae, Kitaviridae, Luteoviridae, предполагаемые Nanoviridae, Phenuiviridae, Pospiviroidae, Potyviridae, Potyviridae предполагаемые, Reoviridae, предполагаемые Reoviridae, Rhabdoviridae, Secoviridae, предполагаемые Secoviridae, Solemoviridae, Tombusviridae, Tospoviridae, Totiviridae, Tymoviridae, Virgaviridae; вирусы родов Alfamovirus, Alexivirus, Alphacarmovirus, Alphaendornavirus, Alphanecrovirus, предполагаемый Alphanecrovirus, неклассифицированный Amalgavirus, Ampelovirus, неклассифицированный Ampelovirus, неклассифицированный Ampelovirus, Apscaviroid, Badnavirus, предполагаемый Badnavirus, Begomovirus, неклассифицированный Begomovirus, Benyvirus, Betacarmovirus, предполагаемый Brambyvirus, Bromovirus, Bymovirus, Capillovirus, Carlavirus, неклассифицированный Carlavirus, Caulimovirus, предполагаемый Caulimovirus, Cavemovirus, Cilevirus, предполагаемый Cilevirus, Closterovirus, неклассифицированный Closterovirus, Coleviroid, Comovirus, неклассифицированный Comovirus, Crinivirus, Cucumovirus, предполагаемый Curtovirus, Cytorhabdovirus, неклассифицированный Cytorhabdovirus, Dichorhavirus, неклассифицированный Dichorhavirus, Emaravirus,

предполагаемый Enamovirus, Fijivirus, Foveavirus, Furovirus, Gemycircularvirus, Hordeivirus, Hostuviroid, Ilarivirus, неклассифицированный Ilarivirus, Ipomovirus, Luteovirus, Macluravirus, Maculavirus, Marafivirus, неклассифицированный Marafivirus, Nepovirus, Nucleorhabdovirus, неклассифицированный Nucleorhabdovirus, Ophiovirus, Orthotospovirus, предполагаемый Orthotospovirus, Petuvirus, Polerovirus, предполагаемый Polerovirus, Pospiviroid, Potexvirus, неклассифицированный Potexvirus, Potyvirus, Sobemovirus, предполагаемый Tenuivirus, Tobamovirus, предполагаемый Tobamovirus, Tobravirus, предполагаемый Totivirus, Trichovirus, Tritimovirus, Tymovirus, неклассифицированный Tymovirus, предполагаемый Umbravirus, Varicosavirus, Vitivirus, Waikavirus.

Некоторыми примерами ортотосповирусов, против которых изобретение может обеспечить защиту, являются следующие: ортотосповирус некротической полосы альстромерии, ортотосповирус желтой пятнистости альстромерии, ортотосповирус некротической мозаики фасоли, ортотосповирус хлоротической пятнистости каллы, ортотосповирус хлороза стручкового перца, ортотосповирус некроза стебля хризантемы, ортотосповирус некроза почек арахиса, ортотосповирус хлоротической пятнистости арахиса, ортотосповирус кольцевой пятнистости арахиса, ортотосповирус желтой пятнистости арахиса, ортотосповирус хлоротической кольцевой пятнистости гиппеаструма, ортотосповирус некротической пятнистости недотроги, ортотосповирус желтой пятнистости ириса, ортотосповирус тяжелой мозаики дыни, ортотосповирус желтой пятнистости дыни, ортотосповирус хлоротической пятнистости тутового дерева, ортотосповирус хлоротической пятнистости перца, ортотосповирус кольцевой пятнистости горца, ортотосповирус некроза жилок сои, ортотосповирус хлоротической пятнистости томата, ортотосповирус пятнистого увядания томата, ортотосповирус желтого кольца томата, ортотосповирус зональной пятнистости томата, ортотосповирус некроза бутонов арбуза, ортотосповирус серебристой крапчатости арбуза и ортотосповирус летального хлороза цуккини.

Некоторыми примерами Potyvirus, против которых настоящее изобретение может оказаться эффективным, являются вирус мозаики африканского баклажана, вирус мозаики алжирского арбуза, вирус мозаики альстромерии, вирус легкой мозаики альтернативантеры, вирус крапчатости листьев амаранта, вирус мозаики амазонской лилии, вирус Y дягиля, вирус Y сельдерея, вирус мозаики араужии, вирус крапчатости арракачи, вирус спаржи 1, вирус мозаики прицветников банана, вирус Y барбацены, вирус мозаики базеллы морщинистой, вирус некроза обыкновенной мозаики фасоли, вирус обыкновенной мозаики фасоли, вирус желтой мозаики фасоли, вирус мозаики свеклы, вирус мозаики череды, вирус крапчатости череды, вирус желтой мозаики ежевики, вирус синего морского лука A, вирус мозаики бругмансии, вирус крапчатости бругмансии душистой, вирус цветочной мозаики бабочки, вирус легкой мозаики каланте, латентный вирус калла лилии, вирус крапчатости каллистефуса, вирус желтой полосы канны, вирус крапчатости жилок гвоздики, вирус тонкого листа моркови, морковный вирус Y, вирус мозаики катарантуса, вирус мозаики сельдерея, вирус мозаики цератобиума, вирус кольцевой пятнистости перца чили, вирус прожилковой крапчатости перца чили, вирус мозаики китайского артишока, вирус клитории Y, вирус желтой жилки клевера, вирус полосатости ежи сборной, колумбийский вирус дурмана, вирус мозаики коммелина, вирус мозаики, переносимый тлей вигны, вирус полосатости жилок тыквы, вирус башмачка Y, вирус валлоты прекрасной A, вирус мозаики волчегодника, вирус Y волчегодника, вирус мозаики дашена, вирус стягивания дурмана, вирус хлоротической мозаики дендробиума, вирус мозаики диоскореи, вирус диурис Y, вирус ослиной орхидеи A, вирус искажения восточноазиатской пассифлоры, вирус восточноазиатской пассифлоры, вирус некротической мозаики эндивия, вирус кольцевой пятнистости молочая, вирус мозаики фрезии, вирус рябчика Y, вирус полосатой мозаики глориозы, вирус мозаики гомфокарпуса, вирус мозаики поводника, вирус мозаики гарденбергии, вирус мозаики белены, вирус Y гиббертии, вирус мозаики гиппеаструма, вирус мозаики гиацинта, вирус поломки цветка недотроги, вирус мозаики ириса буро-жёлтого, вирус легкой мозаики ириса, вирус тяжелой мозаики ириса, вирус мозаики японского

ямса, вирус жасмина Т, вирус мозаики джонсонграсса, вирус мозаики каланхоэ, вирус мозаики кеунджоронг, вирус мозаики конняку, вирус желтой полосы лука-порей, вирус некроза итальянского салата, вирус мозаики салата, вирус крапчатости лилии, вирус лилии Y, вирус мозаики люпина, вирус легкой крапчатости ликориса, вирус карликовой мозаики кукурузы, вирус карликовой мозаики мальвы, вирус настурции клубненосной Y, вирус, разрушающий луговой шафран, вирус средиземноморской руды, вирус мозаики марокканского арбуза, вирус дегенерации нарцисса, вирус желтизны позднего сезона нарцисса, вирус желтой полосы нарцисса, вирус желтой полосы нерина, вирус мозаики нотоскордума, вирус желтой карликовости лука, вирус мозаики птицемлечника, вирус птицемлечника 2, вирус птицемлечника 3, вирус женьшеня Y, вирус мозаики искажения листьев папайи, вирус кольцевой пятнистости папайи, вирус некроза парижской мозаики, вирус мозаики пастернака, вирус хлороза пассифлоры, вирус древесности маракуйи, вирус мозаики семян гороха, вирус крапчатости арахиса, вирус, связанный с мозаикой пекан, вирус мозаики пеннисетума, вирус крапчатости перца, вирус тяжелой мозаики перца, вирус прожилковой крапчатости перца, вирус желтой мозаики перца, вирус мозаики помидоров Перу, вирус мозаики пфафии, вирус легкой крапчатости ширококолокольчик крупноцветковый, вирус Y плеIONE, вирус оспы сливы, вирус мозаики лакомства, вирус картофеля А, вирус картофеля V, вирус картофеля Y, вирус желтой пятнистости картофеля, вирус деформации листьев лютика, вирус легкой мозаики лютика, вирус мозаики лютика, вирус Y ропаланта, латентный вирус шафрана, вирус саркохилуса Y, вирус мозаики зеленого лука, вирус желтой полосы шалота, вирус мозаики сорго, вирус мозаики сои, вирус мозаики скрученника 3, вирус мозаики суданского арбуза, вирус мозаики сахарного тростника, вирус хлоротической крапчатости подсолнечника, легкая мозаика подсолнечника вирус, вирус мозаики подсолнечника, вирус кольцевой пятнистости подсолнечника, вирус пернатой крапчатости сладкого картофеля, латентный вирус сладкого картофеля, вирус легкой крапчатости сладкого картофеля, вирус сладкого картофеля 2, вирус сладкого картофеля С, вирус G сладкого картофеля, вирус порока развития листьев тамарилло, вирус мозаики телфарии, вирус мозаики

телосмы, вирус рябчатой мозаики барбариса тунберга, вирус травления табака, вирус табачной мозаики, вирус мозаики табачных жилок, вирус крапчатости табачных жилок, вирус некротического каскада томатов, вирус легкой мозаики традесканции, вирус легкой мозаики туберозы, вирус легкой крапчатости туберозы, вирус разрушения тюльпанов, вирус мозаики тюльпанов, вирус мозаики репы, вирус хлоротической полосатости скрученных стеблей, вирус мозаики циртантуса, вирус мозаики искажения ванили, вербена вирус Y, вирус крапчатости листьев арбуза, вирус мозаики арбуза, вирус кольцевания диких дынь, бессимптомный вирус дикого лука, вирус мозаики дикого картофеля, вирус мозаики дикого томата, вирус мозаики жилок глицинии, вирус легкой мозаики ямса, вирус мозаики батата, вирус мозаики ямбея, вирус легкой мозаики зантедескии, вирус мозаики кукурузы, вирус стягивания кабачков, вирус тигровой мозаики кабачков, вирус желтой пятнистости кабачков и вирус желтой мозаики кабачков.

Некоторыми примерами *Tobamovirus*, против которых настоящее изобретение может проявлять эффективность, являются вирус мозаики болгарского перца (BPeMV), вирус легкой крапчатости бругмансии, вирус легкой крапчатости кактуса (CMMoV), вирус желтой крапчатости клитории, вирус крапчатой мозаики плодов огурца, вирус зеленой крапчатой мозаики огурца (CMMMV), вирус крапчатости огурца, вирус мозаики франжипани (FrMV), латентный вирус гибискуса Форт-Пирса (HLFPV), латентный вирус гибискуса Сингапур (HLSV), вирус зеленой крапчатой мозаики Кьюри, вирус мозаики маракуйи (MarMV), вирус перца Обуда (ObPV), вирус кольцевой пятнистости одонтоглоссума (ORSV), вирус хлоротичной кольцевой пятнистости опунции, вирус мелкой крапчатости паприки, вирус мозаики маракуйи, вирус легкой крапчатости перца (PMMoV), вирус мозаики плюмерии, вирус, ассоциированный с некрозом апорокактуса плетевидного (RCNaV), вирус мозаики рехмании, вирус мозаики подорожника (HRV), вирус опунции Саммона (SOV), вирус разрыва цветков стрептокарпуса, вирус мозаики конопли индийской (SHMV), латентный вирус табака, вирус мягкой зеленой мозаики табака, вирус коричневой морщинистости плодов томата (ToBRFV), вирус мозаики томата (ToMV), вирус табачной мозаики (T2MV) – типовой вид,

вирус крапчатой мозаики томата, вирус мозаики тропических содовых яблок, вирус очищения жилок репы (TVCV), вирус легкой крапчатости улюко, вирус крапчатости васоби (WMoV), вирус легкой крапчатости желтого хвостика, вирус мозаики йоцая (YoMV), также известный как вирус мозаики масличного рапса (ORMV), и вирус зеленой крапчатой мозаики цуккини.

В предпочтительном варианте осуществления настоящее изобретение способно к модуляции генов защиты растений для обеспечения защиты и устойчивости к вирусам/вредителям, вызывающим вирусные болезни, таким как вирус рода Orthotospovirus, вирус рода Cucumovirus, вирус рода Potyvirus, вирус рода Caulimovirus и вирус рода Tobamovirus.

В еще одном предпочтительном варианте осуществления настоящее изобретение способно к модуляции генов защиты растений для обеспечения защиты и устойчивости к вирусам/вредителям, вызывающим вирусные болезни, таким как вирус пятнистого увядания томата (TSWV), вирус мозаики огурца (CMV), вирус Y картофеля (PVY), вирус мозаики цветной капусты (CaMV) или вирус табачной мозаики (TMV).

В соответствии с вариантом осуществления настоящее изобретение способно к модуляции генов защиты растений для обеспечения защиты и устойчивости к бактериям/вредителям, вызывающим бактериальные болезни, таким как, но не ограничиваясь ими, *Erwinia*, *Pectobacterium*, *Pantoea*, *Agrobacterium*, *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Burkholderia*, *Acidovorax*, *Xanthomonas*, *Clavibacter*, *Streptomyces*, *Xylella*, *Spiroplasma* и *Phytoplasma*, галлы и разрастания, увядания, пятнистости листьев, точечности и пятнистости, мягкая гниль, парши и язвы.

В соответствии с вариантом осуществления концентрированные составы могут быть диспергированы в воде или другой жидкости для применения, или составы могут быть пылевидными или гранулированными. Составы получают в соответствии с процедурами, которые являются традиционными в агрохимической области техники, но которые являются новыми и важными из-за присутствия в них композиции. Составы, которые чаще всего применяют, представляют собой водные суспензии или эмульсии. Либо такие

водорастворимые, суспендируемые в воде или эмульгируемые составы представляют собой твердые вещества, обычно известные как смачивающиеся порошки или жидкости, обычно известные как эмульгируемые концентраты, водные суспензии или суспензионные концентраты. В настоящем раскрытии рассматривают все носители, с помощью которых композиции могут быть составлены для доставки и применения в качестве гербицида.

Композиции по настоящему изобретению также могут быть составлены в виде аэрозольного дозатора, капсульной суспензии, концентрата для холодного туманообразования, распыляемого порошка, эмульгируемого концентрата, эмульсии масло в воде, эмульсии вода в масле, инкапсулированной гранулы, тонкой гранулы, текучего концентрата для обработки семян, газа (под давлением), газообразующего продукта, гранулы, концентрата горячего тумана, макрогранулы, микрогранулы, масляного диспергируемого порошка, смешивающегося с маслом текучего концентрата, смешиваемой с маслом жидкости, пасты, растительного стержня, порошка для сухой обработки семян, семян, покрытых пестицидом, растворимого концентрата, растворимого порошка, раствора для обработки семян, суспензионного концентрата (текучего концентрата), сверхмалого объема (ULV) жидкости, сверхмалого объема суспензии (ULV), диспергируемых в воде гранул или таблеток, диспергируемого в воде порошка для обработки суспензии, водорастворимых гранул или таблеток, водорастворимого порошка для обработки семян и смачивающегося порошка. Более конкретно, композиции составляют в виде растворов, эмульсий, суспензий, дутов, порошков, паст, гранул, прессованных капсул и их смесей. Примерами типов композиций являются суспензии (например, SC, OD, FS), эмульгируемые концентраты (например, EC), эмульсии (например, EW, EO, ES, ME), капсулы (например, CS, ZC), пасты, пастилки, смачивающиеся порошки или дуствы. (например, WP, SP, WS, DP, DS), прессовки (например, BR, TB, DT), гранулы (например, WG, SG, GR, FG, GG, MG), инсектицидные изделия (например, LN), а также гелевые составы для обработки материалов для размножения растений, таких как семена (например, GF).

Соединения и смеси согласно изобретению являются подходящими для применения при обработке семян. Растворы для обработки семян (LS), супоэмульсии (SE), концентраты текучие (FS), порошки для сухой обработки (DS), водно-дисперсионные порошки для обработки навозной жижи (WS), водорастворимые порошки (SS), эмульсии (ES), эмульгируемые концентраты (EC) и гели (GF) обычно используются для обработки материалов для размножения растений, особенно семян.

Термин «семена» включает семена и ростки растений всех видов, включая, но не ограничиваясь ими, настоящие семена, кусочки семян, отростки, клубнелуковицы, луковицы, плоды, клубни, зерна, черенки, срезанные побеги и т.п., а в предпочтительном варианте осуществления означает настоящие семена.

Термин «обработка семян» включает все подходящие методы обработки семян, известные в данной области техники, такие как протравливание семян, покрытие семян, опудривание семян, замачивание семян и дражирование семян.

В одном варианте осуществления композиция по настоящему изобретению наносится непосредственно и/или опосредованно на растение и/или на материал для размножения растений путем смачивания почвы, капельного нанесения на почву, инъекций в почву, погружения или обработки семян.

Настоящее изобретение может быть дополнительно объединено с гербицидами, инсектицидами, фунгицидами, удобрениями, питательными микроэлементами, сверхабсорбирующими полимерами или биологическими объектами. Настоящее изобретение может быть дополнительно объединено с синергистами. Настоящее изобретение, включающее дополнительные активные агенты, может применяться в виде премикса или баковой смеси одновременно, параллельно или последовательно. Такие комбинации могут обеспечивать синергетический эффект при модуляции экспрессии генов защиты растений, что приводит к дальнейшему усилению иммунного ответа рассматриваемых растений.

В соответствии с вариантом осуществления настоящего изобретения предложено растение или материал для размножения растений с усиленным иммунным ответом, причем указанное растение или материал для размножения растений обрабатывали композицией, содержащей ламинарин.

В соответствии с вариантом осуществления модулируется экспрессия генов защиты растений указанного растения или материала для размножения растений.

В соответствии с вариантом осуществления указанное растение или материал для размножения растений устойчив к поражению вредителями или болезнями.

В одном варианте осуществления указанная болезнь может быть вирусной болезнью.

Настоящее изобретение проиллюстрировано примерами. Однако настоящее изобретение и приведенные выше варианты осуществления не следует рассматривать как ограничивающие данный пример.

Пример 1.

Растительный материал и инокуляция вирусом

В эксперименте использовали томат экотипа «корбарино», о котором сообщалось, что он восприимчив к инфекции TSWV. Растения выращивали в горшках в климатической камере с фотопериодом 16/8 часов при 25°C.

В эксперименте использовали вирусный штамм (TSWV PV PV-0393). Вирус механически инокулировали и размножали на томате «корбарино». Инокулят получали в охлаждаемой льдом ступке, растирая 1 г инфицированной ткани томата в 10 мл Na-фосфатного буфера 0,01M. Свежеприготовленный инокулят перед использованием хранили во льду. Растения томата на ВВСН16 опыляли карборундом 600 меш, а выбранные листья натирали несколькими каплями инокулята. Через 5 мин. растения опрыскивали стерильной водой для удаления избытка инокулята и сохранения тургора клеток.

Сравнивали четыре обработки: i) фиктивная инокуляция; ii) TSWV; iii) 0,25 % ламинарина; iv) 0,25 % ламинарина + TSWV. При последней обработке вирус инокулировали через 24 часа после применения ламинарина.

Наблюдение за симптомами

За инокулированными растениями ежедневно наблюдали и для оценки репликации вируса проводили ИФА-тесты с коммерческим диагностическим набором TSWV DAS-ELISA (Loewe Biochemica GmbH, Германия) в соответствии с инструкциями производителя.

Выделение РНК и qRT ПЦР

Общую РНК экстрагировали из системно инфицированных листьев томатов с использованием набора Quick-RNA Plant Kit (Zymo Research) в соответствии с инструкциями производителя. Выделения проводили на трех растениях через 12 ч., 24 ч., 48 ч., 72 ч., 7 суток после инокуляции. Листья после срезки мгновенно замораживали в жидком азоте, чтобы избежать порчи образца, а также какой-либо защитной реакции. Концентрацию РНК определяли количественно путем измерения поглощения при 260 нм с использованием Nanodrop 2000 (Thermofisher). Чистоту всех образцов РНК оценивали по коэффициенту поглощения OD_{260/280} и OD_{260/230}, а ее структурную целостность проверяли электрофорезом в агарозном геле. Для последующих стадий использовали только высококачественную РНК с ОП 260/280 и ОП 260/230 > 2. Одноцепочечную кДНК синтезировали из 1 мкг общей РНК с использованием набора для синтеза кДНК iScript™ Select и случайных гексамеров в качестве праймеров (Bio-Rad, Милан, Италия) в соответствии с инструкциями производителя. Три биологических повтора были созданы из 3 листьев, собранных для тестирования 15 генов. В качестве эталонного гена использовали альфа-тубулин.

Реакции количественной ПЦР проводили с помощью BioRad (Applied Biosystems, Фостер-Сити, Калифорния, США) с использованием SYBR R Green. Каждую реакцию проводили в 20 мкл, содержащих 10 мкл 2 X Power SYBR Green PCR Master Mix (Life Technologies), 0,2–0,3 мкМ праймеров и

образцы кДНК, разведенные 1:20. Каждую реакцию количественной ПЦР проводили в трех повторностях. Реакции проводили с использованием описанного ранее параметра циклирования (Reid et al., 2006), а данные количественной ПЦР анализировали методом Ct (Pfaffl, 2001). Для анализа данных количественной ПЦР ген α -тубулина использовали в качестве «домашнего хозяйства» для определения относительного уровня экспрессии других генов, проанализированных в этой работе. Для определения эффективности количественной ПЦР каждой пары праймеров была построена стандартная кривая с использованием следующих разведений кДНК: 1:4, 1:16, 1:64; 1:256 и 1:1024. Каждое измерение проводили в трех повторностях. Соответствующие значения эффективности количественной ПЦР (E) рассчитывали для каждой пары праймеров с помощью программного обеспечения 7300 System SDS (Applied Biosystems, Фостер-Сити, Калифорния, США) в соответствии с уравнением $E = (10^{-1/\text{наклон}} - 1) \times 100$ (Rutledge and Stewart, 2008).

Статистический анализ

Значимость различий между уровнями экспрессии генов сравнивали с помощью однофакторного дисперсионного анализа ($p=0,01$), а средние значения разделяли с помощью апостериорного теста Тьюки с использованием SPSS ver.26 (SAS Institute Inc., 2004, Cary, Северная Каролина, США).

Таблица 2

Номер гена	Описание	Праймеры
1	α -тубулин	1/2
2	Убиквитин-протеинлигаза E3 March3	3/4
3	Белок резистентности Nbs-Irr	5/6
4	AP2-подобный этилен-чувствительный фактор транскрипции	7/8
5	Avr/Cf9 быстро вызывал белок 75	9/10

6	1-аминокриклопропан-1-карбоксилатоксидазоподобный белок	11/12
7	Белок, способствующий сверхчувствительному ответу	13/14
8	Нас 29-подобный фактор транскрипции	15/16
9	Субтилизин-подобный протеаза-подобный	17/18
10	1g07440-подобный гомолог тропинонредуктазы	19/20
11	Связанный с патогенезом белок P4	21/22
12	Белок PR	23/24
13	AУ093595.1	25/26
14	Регулятор сайленсинга генов	27/28
15	Pti6	29/30

Наблюдения

В целом вирус не вызывал видимых изменений в первые дни после инокуляции. Фактически инокуляции TSWV индуцировали появление симптомов через 11 дней после инокуляции (dpi) у всех групп растений. Как правило, TSWV вызывает локальные симптомы на тестовом растении (*Petunia hybrida*, *Datura metel*) через 2-4 дня. Местных симптомов не наблюдалось, в то время как системные проявлялись бронзовостью листьев и легкой задержкой роста; в очень редких случаях отмечался некроз кончика. Процедуру инокуляции повторяли дважды для закрепления результатов. Обнаружение вируса с помощью ИФА-теста дало положительный результат на всех инокулированных растениях через 7 дней, что указывает на медленное прогрессирование инфекции.

12 и 24 часа. На фиг. 1 показана экспрессия генов по сравнению с обработкой водой через 12 часов после обработки. На фиг. 2 показана экспрессия генов по сравнению с обработкой водой через 24 часа после обработки.

Данные экспрессии генов (на фиг. 1 и 2) указывают, что через 12 и 24 часа после инокуляции наблюдается несколько статистически значимых сверхэкспрессий в некоторых протестированных генах (2, 6 и 13). Для генов 2 и 13 отмечено увеличение экспрессии от первого ко второму моменту времени, тогда как для гена 6 наблюдается снижение. Через 24 часа зарегистрированная экспрессия выбранных генов почти плоская, а небольшая сверхэкспрессия прокомментированных также может быть связана с механическим натиранием карборунда, которое растение воспринимает как стимул, на который оно реагирует.

48 часов. На фиг. 3 показана экспрессия генов по сравнению с обработкой водой через 48 часов после обработки.

Через 48 часов после обработки увеличение экспрессии гена было подтверждено для гена 2 и гена 13, хотя во втором гене нет существенных различий с контролем. В глобальном масштабе этот момент времени указывает на то, что ламинарин сам по себе и в сочетании с вирусом активирует набор защитных генов на более высоком уровне по сравнению с TSWV. Только для гена 7, гена 9 и гена 14 этот сценарий инвертирован.

В первом случае обработка 2 и 4 индуцирует подавление, а во втором случае обработка 3 вызывает активацию.

Ген 7, по-видимому, активируется вирусной инфекцией на более высоком уровне по сравнению с другими видами обработки. Ген 9 активируется на растениях томатов, инокулированных TSWV.

Хотя это и не имело значения, ген 12 сильно сверхэкспрессировался через 48 часов после обработки. Логарифмическое изменение имеет значение, даже если стандартное отклонение данных не делает данные значимыми. Этот ген кодирует белок PR1: повышенная экспрессия генов PR1 и PR2 обычно используется в качестве молекулярного маркера SAR. Сверхэкспрессия гена 12 немного снижается через 72 часа, но в этот момент времени имеется

статистическая значимость, подтверждающая идею о том, что ламинарин активирует SAR в томате.

72 часа. На фиг. 4 показана экспрессия генов по сравнению с обработкой водой через 72 часа после обработки.

Через 72 часа экспрессия тестируемых генов ясно свидетельствует об эффектах ламинарина. Для некоторых генов (ген 9 и ген 14) нет явной сверхэкспрессии, что предполагает отсутствие роли после обработки ламинарином. Ген 7 является единственным тестируемым геном, в котором сверхэкспрессия, индуцированная TSWV, выше по сравнению с другими видами обработки. В гене 14 сценарий аналогичен, но из-за подавления, индуцируемого одним ламинарином и TSWV.

Таблица 3

Статистический анализ значений RQ после применения — средние значения с одной и той же буквой статистически не различаются ($p = 0,01$).

Ген	Врем я	Обработк а	RQ1	RQ2	RQ3	Среднее	Стандартно	Стандартна я ошибка	
						значени е	отклонение		
Ген_2	12 ч.	H2O	10,00 0	10,00 0	10,00 0	10,000	0,0000	0,0000	a
Ген_2	12 ч.	Ламинари н	13,14 0	19,58 6	10,70 6	14,477	0,4588	0,2649	a
Ген_2	12 ч.	Вирус	0,884 5	19,05 5	0,763 9	11,847	0,6272	0,3621	a
Ген_2	12 ч.	Ламинари н + вирус	13,05 6	23,40 3	12,07 9	16,179	0,6275	0,3623	a
Ген_2	24 ч.	H2O	10,00 0	10,00 0	10,00 0	10,000	0,0000	0,0000	a
Ген_2	24 ч.	Ламинари н	13,15 2	13,32 9	14,03 3	13,505	0,0466	0,0269	б

Ген_	24 ч.	Вирус	11,49	13,65	11,20				а
2			0	8	8	12,119	0,1340	0,0774	б
Ген_	24 ч.	Ламинари	11,70	13,59	12,34				а
2		н + вирус	0	6	1	12,546	0,0964	0,0557	б
Ген_	48 ч.	H2O	10,00	10,00	10,00				а
2			0	0	0	10,000	0,0000	0,0000	
Ген_	48 ч.	Ламинари	27,46	17,32	23,29				а
2		н	7	1	8	22,695	0,5100	0,2944	
Ген_	48 ч.	Вирус	10,79	10,74	10,89				б
2			8	6	6	10,813	0,0076	0,0044	
Ген_	48 ч.	Ламинари	24,08	18,51	21,35				б
2		н + вирус	3	9	2	21,318	0,2782	0,1606	
Ген_	72 ч.	H2O	10,00	10,00	10,00				а
2			0	0	0	10,000	0,0000	0,0000	
Ген_	72 ч.	Ламинари	29,44	23,00	53,00				а
2		н	7	0	7	35,151	15,796	0,9120	
Ген_	72 ч.	Вирус	13,25	14,21	17,83				а
2			2	5	2	15,100	0,2415	0,1394	
Ген_	72 ч.	Ламинари	28,72	29,55	37,33				а
2		н + вирус	6	8	6	31,873	0,4749	0,2742	

Ген	Врем я	Обработк а	RQ1	RQ2	RQ3	Среднее значени е	Стандартно отклонение	Стандартна я ошибка	
Ген_	12 ч.	H2O	10,00	10,00	10,00				а
3			0	0	0	10,000	0,0000	0,0000	
Ген_	12 ч.	Ламинари	10,54	10,49	0,832				а
3		н	5	8	9	0,9791	0,1266	0,0731	
Ген_	12 ч.	Вирус	0,917	0,937	0,884				а
3			7	6	4	0,9132	0,0269	0,0155	
Ген_	12 ч.	Ламинари	11,93	12,28	0,948				а
3		н + вирус	5	6	7	11,236	0,1525	0,0881	

Ген_3	24 ч.	Н2О	10,00 0	10,00 0	10,00 0	10,000	0,0000	0,0000	a
Ген_3	24 ч.	Ламинари н	12,22 9	13,97 6	11,51 4	12,573	0,1266	0,0731	a
Ген_3	24 ч.	Вирус	0,994 8	13,86 7	12,08 6	11,967	0,1962	0,1133	a
Ген_3	24 ч.	Ламинари н + вирус	11,16 7	10,50 9	13,93 6	11,871	0,1819	0,1050	a
Ген_3	48 ч.	Н2О	10,00 0	10,00 0	10,00 0	10,000	0,0000	0,0000	a
Ген_3	48 ч.	Ламинари н	27,41 9	26,25 5	14,09 8	22,591	0,7378	0,4260	a
Ген_3	48 ч.	Вирус	10,07 1	12,01 6	11,72 2	11,269	0,1049	0,0605	a
Ген_3	48 ч.	Ламинари н + вирус	12,97 6	26,96 0	15,20 8	18,381	0,7513	0,4337	a
Ген_3	72 ч.	Н2О	10,00 0	10,00 0	10,00 0	10,000	0,0000	0,0000	a
Ген_3	72 ч.	Ламинари н	19,72 5	58,61 5	21,69 9	33,346	21,905	12,647	a
Ген_3	72 ч.	Вирус	11,73 0	28,42 8	12,77 8	17,645	0,9353	0,5400	a
Ген_3	72 ч.	Ламинари н + вирус	47,74 7	48,77 6	16,86 0	37,794	18,137	10,471	a

Ген	Врем я	Обработк а	RQ1	RQ2	RQ3	Среднее значени е	Стандартно отклонение	Стандартна я ошибка	
Ген_4	12 ч.	Н2О	10,00 0	10,00 0	10,00 0	10,000	0,0000	0,0000	a
Ген_4	12 ч.	Ламинари н	0,993 1	0,909 0	0,765 4	0,8892	0,1151	0,0665	a
Ген_4	12 ч.	Вирус	10,44 2	0,927 1	0,972 5	0,9813	0,0591	0,0341	a

Ген_4	12 ч.	Ламинари н + вирус	12,52 3	0,910 4	10,29 9	10,642	0,1735	0,1002	а
Ген_4	24 ч.	Н2О	1,000	1,000	1,000	1,000	0,000	0,000	а
Ген_4	24 ч.	Ламинари н	1,744	1,728	1,516	1,662	0,127	0,073	а
Ген_4	24 ч.	Вирус	1,227	1,409	1,713	1,449	0,246	0,142	а
Ген_4	24 ч.	Ламинари н + вирус	1,250	1,754	1,545	1,516	0,253	0,146	а
Ген_4	48 ч.	Н2О	10,00 0	10,00 0	10,00 0	10,000	0,0000	0,0000	а
Ген_4	48 ч.	Ламинари н	15,23 1	15,78 4	37,70 9	22,908	12,821	0,7402	а
Ген_4	48 ч.	Вирус	12,07 0	0,981 3	12,35 7	11,413	0,1393	0,0804	а
Ген_4	48 ч.	Ламинари н + вирус	13,80 2	15,31 3	21,90 4	17,006	0,4308	0,2487	а
Ген_4	72 ч.	Н2О	10,00 0	10,00 0	10,00 0	10,000	0,0000	0,0000	а
Ген_4	72 ч.	Ламинари н	25,80 7	30,14 8	26,31 1	27,422	0,2374	0,1371	б
Ген_4	72 ч.	Вирус	11,24 3	0,784 9	10,89 3	0,9995	0,1867	0,1078	а
Ген_4	72 ч.	Ламинари н + вирус	35,42 4	26,18 0	29,29 7	30,301	0,4703	0,2715	б

Ген	Врем я	Обработк а	RQ1	RQ2	RQ3	Среднее значени е	Стандартно отклонение	Стандартна я ошибка	
Ген_5	12 ч.	Н2О	10,00 0	10,00 0	10,00 0	10,000	0,0000	0,0000	а

Ген_5	12 ч.	Ламинари н	0,790 1	11,28 5	0,940 8	0,9531	0,1695	0,0979	а
Ген_5	12 ч.	Вирус	10,68 0	0,957 4	0,866 0	0,9638	0,1012	0,0584	а
Ген_5	12 ч.	Ламинари н + вирус	0,804 6	10,61 2	11,53 7	10,065	0,1809	0,1044	а
Ген_5	24 ч.	Н2О	10,00 0	10,00 0	10,00 0	10,000	0,0000	0,0000	а
Ген_5	24 ч.	Ламинари н	11,13 5	12,18 9	0,999 4	11,106	0,1098	0,0634	а
Ген_5	24 ч.	Вирус	11,48 3	0,925 1	0,863 3	0,9789	0,1499	0,0866	а
Ген_5	24 ч.	Ламинари н + вирус	10,60 1	12,02 3	0,970 0	10,775	0,1171	0,0676	а
Ген_5	48 ч.	Н2О	10,00 0	10,00 0	10,00 0	10,000	0,0000	0,0000	а
Ген_5	48 ч.	Ламинари н	0,920 4	12,32 1	10,53 1	10,685	0,1564	0,0903	а
Ген_5	48 ч.	Вирус	0,699 3	15,31 6	0,789 2	10,067	0,4568	0,2637	а
Ген_5	48 ч.	Ламинари н + вирус	0,861 0	13,58 6	10,40 5	10,867	0,2520	0,1455	а
Ген_5	72 ч.	Н2О	10,00 0	10,00 0	10,00 0	10,000	0,0000	0,0000	а
Ген_5	72 ч.	Ламинари н	22,19 6	23,86 7	23,47 3	23,179	0,0874	0,0504	б в
Ген_5	72 ч.	Вирус	12,71 1	11,10 2	10,91 9	11,577	0,0986	0,0569	а б
Ген_5	72 ч.	Ламинари н + вирус	17,40 1	30,62 4	25,09 5	24,373	0,6641	0,3834	в

Ген	Врем я	Обработк а	RQ1	RQ2	RQ3	Среднее Стандартн		Стандартн ая ошибка	
						значени е	ое отклонение		
Ген_6	12 ч.	Н2О	1,0000 0	1,0000 0	1,0000 0	1,00000	0,00000	0,00000	а б
Ген_6	12 ч.	Ламинари н	0,9087 6	0,9709 7	0,8924 2	0,92405	0,04145	0,02393	а
Ген_6	12 ч.	Вирус	0,9600 4	0,9913 0	0,9218 5	0,95773	0,03479	0,02008	а
Ген_6	12 ч.	Ламинари н + вирус	1,0490 9	1,1018 8	1,0812 2	1,07740	0,02660	0,01536	б
Ген_6	24 ч.	Н2О	10,000	10,000	10,000	10,000	0,0000	0,0000	а
Ген_6	24 ч.	Ламинари н	16,709	18,603	0,8182	14,498	0,5551	0,3205	а
Ген_6	24 ч.	Вирус	11,578	17,583	15,780	14,981	0,3081	0,1779	а
Ген_6	24 ч.	Ламинари н + вирус	13,422	17,528	12,610	14,520	0,2636	0,1522	а
Ген_6	48 ч.	Н2О	10,000	10,000	10,000	10,000	0,0000	0,0000	а
Ген_6	48 ч.	Ламинари н	16,033	16,927	10,675	14,545	0,3381	0,1952	а
Ген_6	48 ч.	Вирус	0,3212	14,698	0,7899	0,8603	0,5776	0,3335	а
Ген_6	48 ч.	Ламинари н + вирус	14,823	17,395	0,9742	13,987	0,3895	0,2249	а
Ген_6	72 ч.	Н2О	10,000	10,000	10,000	10,000	0,0000	0,0000	а
Ген_6	72 ч.	Ламинари н	27,013	20,615	19,604	22,410	0,4017	0,2320	б
Ген_6	72 ч.	Вирус	0,6374	10,823	10,134	0,9110	0,2395	0,1383	а

Ген_7 6	72 ч.	Ламинари н + вирус	26,404	20,406	19,154	21,988	0,3875	0,2237	б
------------	-------	-----------------------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	---

<i>Ген</i>	<i>Врем я</i>	<i>Обработк а</i>	<i>RQ1</i>	<i>RQ2</i>	<i>RQ3</i>	<i>Среднее значени е</i>	<i>Стандартно е отклонение</i>	<i>Стандартна я ошибка</i>	
Ген_7	12 ч.	H2O	10,00 0	10,00 0	10,00 0	10,000	0,0000	0,0000	а
Ген_7	12 ч.	Ламинари н	0,974 9	0,844 6	0,874 7	0,8981	0,0682	0,0394	а
Ген_7	12 ч.	Вирус	0,982 4	0,936 7	0,943 6	0,9543	0,0246	0,0142	а
Ген_7	12 ч.	Ламинари н + вирус	12,10 6	0,829 5	10,42 1	10,274	0,1910	0,1103	а
Ген_7	24 ч.	H2O	10,00 0	10,00 0	10,00 0	10,000	0,0000	0,0000	а
Ген_7	24 ч.	Ламинари н	11,62 3	12,44 6	12,08 5	12,051	0,0413	0,0238	а
Ген_7	24 ч.	Вирус	12,94 7	11,16 1	12,80 0	12,303	0,0991	0,0572	а
Ген_7	24 ч.	Ламинари н + вирус	13,38 0	12,89 7	10,44 9	12,242	0,1571	0,0907	а
Ген_7	48 ч.	H2O	10,00 0	10,00 0	10,00 0	10,000	0,0000	0,0000	а б
Ген_7	48 ч.	Ламинари н	0,710 3	0,713 0	0,635 1	0,6861	0,0442	0,0255	а
Ген_7	48 ч.	Вирус	11,54 9	10,68 2	13,52 8	11,920	0,1459	0,0842	б
Ген_7	48 ч.	Ламинари н + вирус	0,715 9	0,533 4	0,816 7	0,6886	0,1436	0,0829	а
Ген_7	72 ч.	H2O	10,00 0	10,00 0	10,00 0	10,000	0,0000	0,0000	а

Ген_7	72 ч.	Ламинари н	10,54 9	0,467 7	11,92 7	0,9051	0,3850	0,2223	а
Ген_7	72 ч.	Вирус	38,58 4	45,92 0	25,73 3	36,746	10,218	0,5900	б
Ген_7	72 ч.	Ламинари н + вирус	19,00 8	20,41 6	14,53 5	17,986	0,3070	0,1773	а б

<i>Ген</i>	<i>Врем я</i>	<i>Обработк а</i>	<i>RQ1</i>	<i>RQ2</i>	<i>RQ3</i>	<i>Среднее значени е</i>	<i>Стандартно отклонение</i>	<i>Стандартна я ошибка</i>	
Ген_8	12 ч.	Н2О	10,00 0	10,00 0	10,00 0	10,000	0,0000	0,0000	а
Ген_8	12 ч.	Ламинари н	0,869 5	0,916 6	10,04 2	0,9301	0,0684	0,0395	а
Ген_8	12 ч.	Вирус	0,919 2	0,958 2	0,976 6	0,9513	0,0293	0,0169	а
Ген_8	12 ч.	Ламинари н + вирус	0,989 2	10,37 5	10,13 2	10,133	0,0242	0,0139	а
Ген_8	24 ч.	Н2О	10,00 0	10,00 0	10,00 0	10,000	0,0000	0,0000	а
Ген_8	24 ч.	Ламинари н	12,57 1	13,29 9	11,58 4	12,485	0,0861	0,0497	а
Ген_8	24 ч.	Вирус	0,832 0	0,980 1	11,01 4	0,9711	0,1349	0,0779	а
Ген_8	24 ч.	Ламинари н + вирус	11,33 5	11,61 7	0,936 1	10,771	0,1229	0,0710	а
Ген_8	48 ч.	Н2О	10,00 0	10,00 0	10,00 0	10,000	0,0000	0,0000	а
Ген_8	48 ч.	Ламинари н	12,25 8	0,969 0	15,95 8	12,635	0,3151	0,1819	а
Ген_8	48 ч.	Вирус	10,71 2	10,79 8	13,81 3	11,774	0,1766	0,1020	а

Ген_8	48 ч.	Ламинари н + вирус	13,15 7	0,758 8	11,27 4	10,673	0,2833	0,1636	a
Ген_8	72 ч.	H ₂ O	10,00 0	10,00 0	10,00 0	10,000	0,0000	0,0000	a
Ген_8	72 ч.	Ламинари н	24,38 7	43,67 1	32,79 7	33,618	0,9668	0,5582	a
Ген_8	72 ч.	Вирус	16,30 0	16,35 6	15,68 0	16,112	0,0375	0,0217	a
Ген_8	72 ч.	Ламинари н + вирус	48,22 0	49,68 7	22,01 8	39,975	15,569	0,8989	a

Ген	Врем я	Обработк а	RQ1	RQ2	RQ3	Среднее значени е	Стандартно отклонение	Стандартна я ошибка	
Ген_9	12 ч.	H ₂ O	10,00 0	10,00 0	10,00 0	10,000	0,0000	0,0000	a
Ген_9	12 ч.	Ламинари н	0,852 7	0,839 8	10,24 0	0,9055	0,1028	0,0594	a
Ген_9	12 ч.	Вирус	0,854 8	0,813 3	10,43 7	0,9039	0,1228	0,0709	a
Ген_9	12 ч.	Ламинари н + вирус	0,983 8	0,855 6	10,79 7	0,9730	0,1124	0,0649	a
Ген_9	24 ч.	H ₂ O	10,00 0	10,00 0	10,00 0	10,000	0,0000	0,0000	a
Ген_9	24 ч.	Ламинари н	13,86 7	0,930 3	10,46 6	11,212	0,2372	0,1369	a
Ген_9	24 ч.	Вирус	0,958 0	13,84 9	0,918 4	10,871	0,2587	0,1493	a
Ген_9	24 ч.	Ламинари н + вирус	0,839 4	10,09 8	11,56 5	10,019	0,1587	0,0916	a
Ген_9	48 ч.	H ₂ O	10,00 0	10,00 0	10,00 0	10,000	0,0000	0,0000	a

Ген_9	48 ч.	Ламинари н	16,48 1	15,43 6	13,84 7	15,255	0,1326	0,0766	а б
Ген_9	48 ч.	Вирус	15,02 7	16,39 2	21,26 0	17,560	0,3277	0,1892	б
Ген_9	48 ч.	Ламинари н + вирус	15,08 8	17,63 7	13,47 4	15,400	0,2099	0,1212	а б
Ген_9	72 ч.	Н2О	10,00 0	10,00 0	10,00 0	10,000	0,0000	0,0000	а
Ген_9	72 ч.	Ламинари н	16,20 4	0,792 3	18,35 4	14,160	0,5508	0,3180	а
Ген_9	72 ч.	Вирус	10,25 5	10,09 9	0,975 2	10,035	0,0258	0,0149	а
Ген_9	72 ч.	Ламинари н + вирус	0,999 8	10,12 7	0,957 8	0,9901	0,0287	0,0166	а

<i>Ген</i>	<i>Врем я</i>	<i>Обработк а</i>	<i>RQ1</i>	<i>RQ2</i>	<i>RQ3</i>	<i>Среднее значени е</i>	<i>Стандартно отклонение</i>	<i>Стандартна я ошибка</i>	
Ген_10	12 ч.	Н2О	10,00 0	10,00 0	10,00 0	10,000	0,0000	0,0000	а
Ген_10	12 ч.	Ламинари н	10,13 4	11,71 6	14,04 6	11,966	0,1968	0,1136	а
Ген_10	12 ч.	Вирус	12,76 5	13,54 7	11,54 8	12,620	0,1007	0,0582	а
Ген_10	12 ч.	Ламинари н + вирус	11,31 4	15,11 1	14,57 1	13,665	0,2054	0,1186	а
Ген_10	24 ч.	Н2О	10,00 0	10,00 0	10,00 0	10,000	0,0000	0,0000	а
Ген_10	24 ч.	Ламинари н	13,67 3	15,46 2	14,02 6	14,387	0,0948	0,0547	а
Ген_10	24 ч.	Вирус	10,54 9	13,12 0	13,67 9	12,450	0,1669	0,0964	а

Ген_1 0	24 ч.	Ламинари н + вирус	12,82 7	10,65 3	14,30 8	12,596	0,1839	0,1062	a
Ген_1 0	48 ч.	H2O	10,00 0	10,00 0	10,00 0	10,000	0,0000	0,0000	a
Ген_1 0	48 ч.	Ламинари н	14,55 0	13,40 2	19,69 2	15,882	0,3349	0,1934	a
Ген_1 0	48 ч.	Вирус	0,841 8	10,06 0	13,62 9	10,702	0,2664	0,1538	a
Ген_1 0	48 ч.	Ламинари н + вирус	10,39 3	11,43 9	11,56 8	11,133	0,0644	0,0372	a
Ген_1 0	72 ч.	H2O	10,00 0	10,00 0	10,00 0	10,000	0,0000	0,0000	a
Ген_1 0	72 ч.	Ламинари н	28,09 2	16,70 8	22,30 7	22,369	0,5692	0,3286	a
Ген_1 0	72 ч.	Вирус	15,57 9	22,08 8	17,46 7	18,378	0,3348	0,1933	a
Ген_1 0	72 ч.	Ламинари н + вирус	10,99 4	19,94 1	16,52 9	15,821	0,4515	0,2607	a

<i>Ген</i>	<i>Врем я</i>	<i>Обработк а</i>	<i>RQ1</i>	<i>RQ2</i>	<i>RQ3</i>	<i>Среднее значени е</i>	<i>Стандартно отклонение</i>	<i>Стандартна я ошибка</i>	
Ген_1 1	12 ч.	H2O	10,00 0	10,00 0	10,00 0	10,000	0,0000	0,0000	a
Ген_1 1	12 ч.	Ламинари н	0,944 1	0,892 5	11,30 2	0,9889	0,1250	0,0722	a
Ген_1 1	12 ч.	Вирус	10,54 8	0,988 6	10,99 9	10,478	0,0560	0,0323	a
Ген_1 1	12 ч.	Ламинари н + вирус	12,10 1	11,43 1	10,20 6	11,246	0,0961	0,0555	a
Ген_1 1	24 ч.	H2O	10,00 0	10,00 0	10,00 0	10,000	0,0000	0,0000	a

Ген_1 1	24 ч.	Ламинари н	17,18 3	12,59 5	13,07 5	14,284	0,2522	0,1456	а
Ген_1 1	24 ч.	Вирус	12,19 4	11,23 5	10,51 2	11,314	0,0844	0,0487	а
Ген_1 1	24 ч.	Ламинари н + вирус	13,86 2	11,42 4	11,23 6	12,174	0,1465	0,0846	а
Ген_1 1	48 ч.	Н2О	10,00 0	10,00 0	10,00 0	10,000	0,0000	0,0000	а
Ген_1 1	48 ч.	Ламинари н	34,92 6	33,90 5	24,21 8	31,016	0,5909	0,3412	в
Ген_1 1	48 ч.	Вирус	12,59 0	13,87 7	10,82 9	12,432	0,1530	0,0883	а б
Ген_1 1	48 ч.	Ламинари н + вирус	28,05 8	20,25 4	34,81 2	27,708	0,7286	0,4206	б в
Ген_1 1	72 ч.	Н2О	10,00 0	10,00 0	10,00 0	10,000	0,0000	0,0000	а
Ген_1 1	72 ч.	Ламинари н	47,95 8	51,51 8	48,36 5	49,280	0,1948	0,1125	б
Ген_1 1	72 ч.	Вирус	12,07 5	13,41 4	13,31 9	12,936	0,0747	0,0431	а
Ген_1 1	72 ч.	Ламинари н + вирус	80,67 2	76,02 5	53,34 6	70,014	14,621	0,8442	б

Ген	Врем я	Обработк а	RQ1	RQ2	RQ3	Среднее значени е	Стандартн ое отклонение	Стандартна я ошибка	
Ген_1 2	12 ч.	Н2О	10,00 0	10,000	10,00 0	10,000	0,0000	0,0000	а
Ген_1 2	12 ч.	Ламинари н	0,961 6	11,039	10,69 3	10,449	0,0742	0,0428	а
Ген_1 2	12 ч.	Вирус	11,21 2	11,895	0,947 7	10,861	0,1247	0,0720	а

Ген_1 2	12 ч.	Ламинари н + вирус	10,09 7	0,9948	11,72 2	10,589	0,0984	0,0568	а
Ген_1 2	24 ч.	Н2О	10,00 0	10,000	10,00 0	10,000	0,0000	0,0000	а
Ген_1 2	24 ч.	Ламинари н	11,67 8	11,217	10,55 5	11,150	0,0564	0,0326	а
Ген_1 2	24 ч.	Вирус	10,14 3	12,364	10,63 5	11,047	0,1167	0,0674	а
Ген_1 2	24 ч.	Ламинари н + вирус	0,932 1	11,344	11,19 1	10,619	0,1127	0,0650	а
Ген_1 2	48 ч.	Н2О	10,00 0	10,000	10,00 0	10,000	0,0000	0,0000	а
Ген_1 2	48 ч.	Ламинари н	46,75 3	1,0408 6	31,17 1	60,670	38,398	22,169	а
Ген_1 2	48 ч.	Вирус	0,559 5	22,242	13,76 1	13,866	0,8324	0,4806	а
Ген_1 2	48 ч.	Ламинари н + вирус	42,75 1	56,022	37,91 8	45,564	0,9374	0,5412	а
Ген_1 2	72 ч.	Н2О	10,00 0	10,000	10,00 0	10,000	0,0000	0,0000	а
Ген_1 2	72 ч.	Ламинари н	44,54 3	23,924	31,67 5	33,381	10,415	0,6013	б
Ген_1 2	72 ч.	Вирус	11,05 2	11,953	0,790 4	10,303	0,2125	0,1227	а б
Ген_1 2	72 ч.	Ламинари н + вирус	36,33 3	29,356	21,58 4	29,091	0,7378	0,4260	а б

Ген	Врем я	Обработк а	RQ1	RQ2	RQ3	Среднее Стандартно		Стандартна я ошибка	
						значени е	отклонение		
Ген_1 3	12 ч.	Н2О	10,00 0	10,00 0	10,00 0	10,000	0,0000	0,0000	а

Ген_1 3	12 ч.	Ламинари н	0,902 5	11,02 1	12,32 3	10,790	0,1661	0,0959	а
Ген_1 3	12 ч.	Вирус	11,78 8	12,23 0	10,11 6	11,378	0,1115	0,0644	а
Ген_1 3	12 ч.	Ламинари н + вирус	13,33 9	10,93 4	11,01 3	11,762	0,1366	0,0789	а
Ген_1 3	24 ч.	Н2О	10,00 0	10,00 0	10,00 0	10,000	0,0000	0,0000	а
Ген_1 3	24 ч.	Ламинари н	13,75 0	14,76 3	13,30 0	13,938	0,0750	0,0433	б
Ген_1 3	24 ч.	Вирус	11,85 1	12,77 4	10,56 9	11,731	0,1107	0,0639	а б
Ген_1 3	24 ч.	Ламинари н + вирус	13,08 5	11,43 8	12,39 5	12,306	0,0827	0,0477	а б
Ген_1 3	48 ч.	Н2О	10,00 0	10,00 0	10,00 0	10,000	0,0000	0,0000	а
Ген_1 3	48 ч.	Ламинари н	31,99 9	13,49 8	29,83 9	25,112	10,116	0,5841	а
Ген_1 3	48 ч.	Вирус	14,88 5	0,382 5	0,853 6	0,9082	0,5551	0,3205	а
Ген_1 3	48 ч.	Ламинари н + вирус	25,29 1	0,897 0	28,99 3	21,085	10,654	0,6151	а
Ген_1 3	72 ч.	Н2О	10,00 0	10,00 0	10,00 0	10,000	0,0000	0,0000	а
Ген_1 3	72 ч.	Ламинари н	45,83 8	96,75 7	93,37 0	78,655	28,471	16,438	б
Ген_1 3	72 ч.	Вирус	10,30 2	20,32 6	0,999 9	13,542	0,5877	0,3393	а
Ген_1 3	72 ч.	Ламинари н + вирус	53,67 4	42,55 6	49,90 1	48,710	0,5654	0,3264	а б

Ген	Врем я	Обработк а	Среднее			Стандартно		Стандартна я ошибка	
			RQ1	RQ2	RQ3	значени е	отклонение		
Ген_1 4	12 ч.	Н2О	10,00 0	10,00 0	10,00 0	10,000	0,0000	0,0000	а
Ген_1 4	12 ч.	Ламинари н	12,33 7	10,84 5	11,39 0	11,524	0,0755	0,0436	а
Ген_1 4	12 ч.	Вирус	0,997 5	14,93 2	12,05 1	12,319	0,2489	0,1437	а
Ген_1 4	12 ч.	Ламинари н + вирус	14,80 0	14,76 9	10,30 4	13,291	0,2587	0,1494	а
Ген_1 4	24 ч.	Н2О	10,00 0	10,00 0	10,00 0	10,000	0,0000	0,0000	а
Ген_1 4	24 ч.	Ламинари н	15,74 1	11,64 0	12,03 2	13,138	0,2263	0,1307	а
Ген_1 4	24 ч.	Вирус	0,946 0	14,91 8	14,48 8	12,956	0,3035	0,1752	а
Ген_1 4	24 ч.	Ламинари н + вирус	10,99 5	12,08 0	12,19 7	11,758	0,0663	0,0383	а
Ген_1 4	48 ч.	Н2О	10,00 0	10,00 0	10,00 0	10,000	0,0000	0,0000	а
Ген_1 4	48 ч.	Ламинари н	0,302 8	0,717 7	0,535 3	0,5186	0,2080	0,1201	а
Ген_1 4	48 ч.	Вирус	0,652 8	12,41 6	0,937 2	0,9439	0,2944	0,1700	а
Ген_1 4	48 ч.	Ламинари н + вирус	0,597 9	0,338 4	0,490 2	0,4755	0,1304	0,0753	а
Ген_1 4	72 ч.	Н2О	10,00 0	10,00 0	10,00 0	10,000	0,0000	0,0000	б в
Ген_1 4	72 ч.	Ламинари н	0,280 5	0,370 6	0,306 4	0,3192	0,0464	0,0268	а
Ген_1 4	72 ч.	Вирус	15,46 2	12,52 5	0,992 5	12,637	0,2770	0,1599	в

Ген_1 4	72 ч.	Ламинари н + вирус	0,585 7	0,507 2	0,269 2	0,4540	0,1648	0,0952	а б
------------	-------	-----------------------	------------	------------	------------	--------	--------	--------	--------

Ген	Врем я	Обработк а	RQ1	RQ2	RQ3	Среднее Стандартно		Стандартна я ошибка	
						значени е	отклонение		
Ген_1 5	12 ч.	Н2О	10,00 0	10,00 0	10,00 0	10,000	0,0000	0,0000	а
Ген_1 5	12 ч.	Ламинари н	10,06 0	10,25 4	12,87 9	11,065	0,1575	0,0909	а
Ген_1 5	12 ч.	Вирус	13,36 2	16,19 9	11,92 3	13,828	0,2176	0,1256	а
Ген_1 5	12 ч.	Ламинари н + вирус	12,00 2	16,13 1	13,76 4	13,966	0,2072	0,1196	а
Ген_1 5	24 ч.	Н2О	10,00 0	10,00 0	10,00 0	10,000	0,0000	0,0000	а
Ген_1 5	24 ч.	Ламинари н	13,12 9	21,36 3	13,38 8	15,960	0,4681	0,2703	а
Ген_1 5	24 ч.	Вирус	11,64 7	13,93 1	10,64 1	12,073	0,1686	0,0973	а
Ген_1 5	24 ч.	Ламинари н + вирус	15,39 2	14,81 2	12,19 5	14,133	0,1703	0,0983	а
Ген_1 5	48 ч.	Н2О	10,00 0	10,00 0	10,00 0	10,000	0,0000	0,0000	а
Ген_1 5	48 ч.	Ламинари н	32,42 1	0,860 2	19,06 6	20,030	11,939	0,6893	а
Ген_1 5	48 ч.	Вирус	11,06 6	0,797 2	11,64 5	10,228	0,1975	0,1140	а
Ген_1 5	48 ч.	Ламинари н + вирус	16,30 4	17,93 4	18,95 9	17,732	0,1339	0,0773	а
Ген_1 5	72 ч.	Н2О	10,00 0	10,00 0	10,00 0	10,000	0,0000	0,0000	а
Ген_1 5	72 ч.	Ламинари н	49,28 1	36,25 5	43,02 5	42,853	0,6515	0,3761	б

Ген_1			0,828	13,31	10,02				
5	72 ч.	Вирус	7	8	2	10,542	0,2555	0,1475	а
Ген_1		Ламинари	22,66	30,70	44,82				а
5	72 ч.	н + вирус	0	3	1	32,728	11,218	0,6477	б

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ повышения иммунитета растений, защиты и устойчивости растений к переносимым насекомыми и грибами патогенам, повышения резистентности растений к болезням или вредителям, защиты растений от болезней или улучшения борьбы с болезнями растений путем модуляции экспрессии генов защитных генов растений, причем указанный способ включает нанесение композиции, содержащей ламинарин, на указанное растение.
2. Способ по п. 1, в котором указанный патоген представляет собой вирус, вызывающий указанную болезнь.
3. Способ по п. 2, в котором указанный вирус выбран из группы, состоящей из вируса рода Orthospovirus, вируса рода Cucumovirus, вируса рода Potyvirus, вируса рода Caulimovirus и вируса рода Tobamovirus.
4. Способ по п. 3, в котором указанный вирус представляет собой вирус пятнистого увядания томата (TSWV), вирус мозаики огурца (CMV), вирус Y картофеля (PVY), вирус мозаики цветной капусты (CaMV) или вирус табачной мозаики (TMV).
5. Способ по любому из предшествующих пунктов, включающий нанесение ламинарина на местонахождение указанного растения.
6. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором модулируют по меньшей мере один ген защиты растений.
7. Способ по п. 6, в котором указанный по меньшей мере один ген защиты растений включен, сверхэкспрессирован или активирован.
8. Способ по п. 6, в котором указанный по меньшей мере один ген защиты растений выключен, недостаточно экспрессирован или подавляется.

9. Способ по любому из предыдущих пунктов, в котором модулируется экспрессия одного или более, двух или более, трех или более, четырех или более, пяти или более, шести или более, семи или более, восьми или более, девяти или более или десяти или более из следующих генов: убиквитин-протеинлигазы E3 March3, белка резистентности Nbs-1rr, фактора транскрипции, отвечающего за AP2-подобный этилен, быстро вызываемого белка 75 Avr/Cf9, белка, подобного 1-аминокриклопропан-1-карбоксилатоксидазе, белка, способствующего сверхчувствительному ответу, Nac 29-подобного фактора транскрипции, субтилизин-подобного протеаза-подобного, 1g07440-подобного гомолога тропинонредуктазы, связанного с патогенезом белка P4, белка PR, AY093595.1, регулятора сайленсинга генов и Pti6 (гены 1-15 в табл. 1).

10. Способ по любому из предыдущих пунктов, в котором один или более, два или более, три или более, четыре или более, пять или более, шесть или более, семь или более, восемь или более, девять или более или десять или более из следующих генов по п. 9 сверхэкспрессированы или активированы. убиквитин-протеинлигазы E3 March3, белка резистентности Nbs-1rr, фактора транскрипции, отвечающего за AP2-подобный этилен, быстро вызываемого белка 75 Avr/Cf9, белка, подобного 1-аминокриклопропан-1-карбоксилатоксидазе, белка, способствующего сверхчувствительному ответу, Nac 29-подобного фактора транскрипции, 1g07440-подобного гомолога тропинонредуктазы, связанного с патогенезом белка P4, белка PR, AY093595.1 и Pti6 (гены 1-13 и 15 в табл. 1).

11. Способ по любому из предыдущих пунктов, в котором следующий ген по п. 9 недостаточно экспрессирован или подавляется: регулятор сайленсинга генов (ген 14 табл. 1).

12. Способ борьбы с вирусной болезнью или болезнью, вызванной переносимыми насекомыми и грибами патогенами в растении, включающий нанесение композиции, содержащей ламинарин, на указанное растение,

причем ламинарин модулирует экспрессию генов защитных генов растений в указанном растении.

13. Применение ламинарина для повышения иммунитета растений, защиты и устойчивости растений к переносимым насекомыми и грибами патогенам, повышения резистентности растений к болезням или вредителям, защиты растений от болезней или улучшения борьбы с болезнями растений путем модуляции экспрессии генов защитных генов растений с помощью способа по любому из предшествующих пунктов.

14. Композиция, содержащая ламинарин, для повышения иммунитета растений, защиты и устойчивости растений к переносимым насекомыми и грибами патогенам, повышения резистентности растений к болезням или вредителям, защиты растений от болезней или улучшения борьбы с болезнями растений путем модуляции экспрессии генов защитных генов растений.

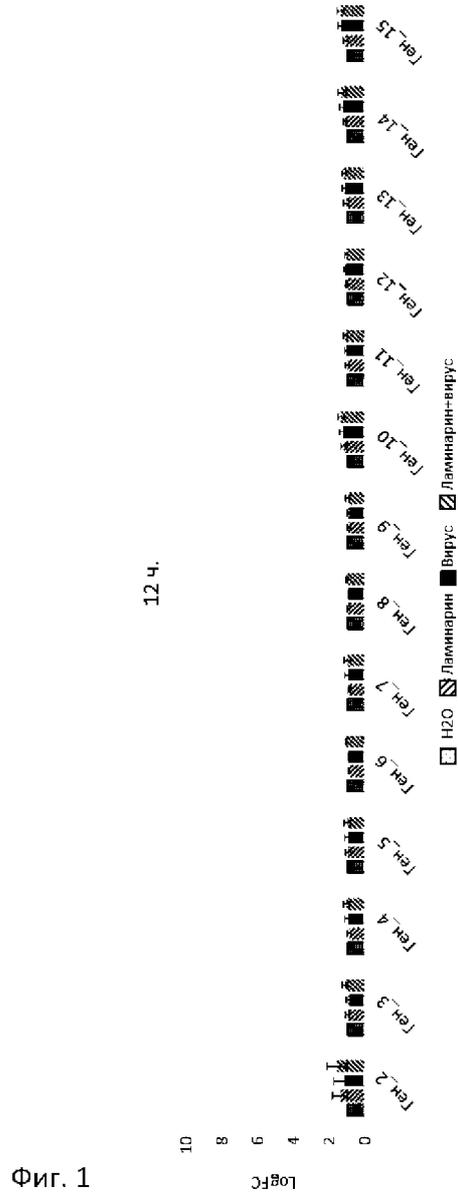
15. Композиция по п. 14, причем указанная композиция дополнительно содержит одно или более вспомогательных веществ в составе.

16. Способ характеристики экспрессии генов защитных генов растений, осуществляемый путем нанесения композиции, содержащей ламинарин, на указанное растение, включающий:

- а) выделение генетического материала из рассматриваемого растения;
- б) необязательно, амплификацию указанного генетического материала; и
- в) анализ уровней экспрессии указанного генетического материала;

причем повышенный уровень экспрессии предполагаемого гена защиты растения по сравнению с контролем указывает на то, что ламинарин вызывает сверхэкспрессию или активацию указанного гена, или пониженный уровень

экспрессии предполагаемого гена защиты растения по сравнению с контролем указывает на то, что ламинарин вызывает недостаточную экспрессию или подавление указанного гена.

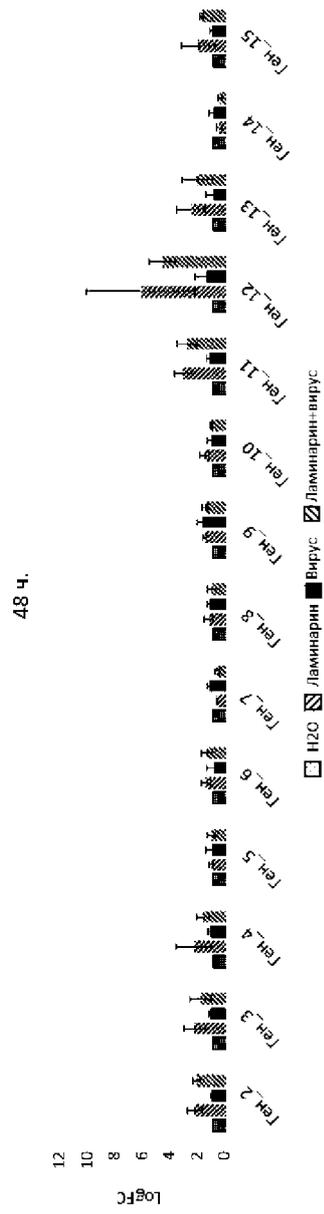


Фиг. 1

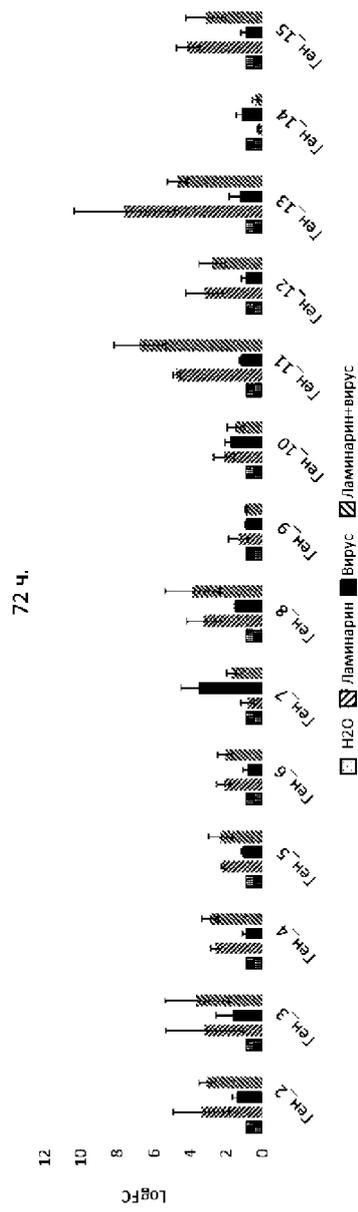
Фиг. 2

24 ч.





Фиг. 3



Фиг. 4