

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 532 277**

51 Int. Cl.:

A01N 43/54 (2006.01)
A01G 7/06 (2006.01)
A01P 21/00 (2006.01)
C07D 239/84 (2006.01)
C07D 405/12 (2006.01)
C12Q 1/02 (2006.01)
G01N 33/15 (2006.01)
G01N 33/50 (2006.01)
C07K 14/415 (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.11.2007 E 07832825 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.02.2015 EP 2100507**

54 Título: **Derivados de quinazolina capaces de inhibir la señalización de citoquinina**

30 Prioridad:

22.11.2006 JP 2006315308
22.11.2006 JP 2006315309
01.02.2007 JP 2007022849
01.02.2007 JP 2007022850

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
25.03.2015

73 Titular/es:

SUMITOMO CHEMICAL COMPANY, LIMITED
(100.0%)
27-1, SHINKAWA 2-CHOME, CHUO-KU
TOKYO 104-8260, JP

72 Inventor/es:

NAGASAWA, ASAKO;
ARATA, YUTO y
UNEME, HIDEKI

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 532 277 T3

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

DESCRIPCIÓN

Derivados de quinazolina capaces de inhibir la señalización de citoquinina

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a un agente que tiene una actividad de inhibición de señalización intracelular de un receptor de citoquinina derivado de plantas y controla el crecimiento o diferenciación de una planta, y similares.

10 **Técnica antecedente**

La citoquinina es una hormona vegetal implicada en la división celular y diferenciación de plantas superiores, y es una sustancia biológicamente activa importante que se sabe que ejerce acciones tales como inducción de división de células de plantas superiores, diferenciación de callos o médula en follaje, prevención de etiolación de las hojas, caída de hojas y caída de frutos, y fracaso de dominancia apical (Cytokinins: Chemistry, Activity, and Function, CRC Press (1994)). Como método para controlar los fenómenos fisiológicos causados por citoquinina, se ha propuesto un método que comprende dar citoquinina desde el exterior, un método que comprende controlar la biosíntesis de citoquinina en un cuerpo vegetal, un método que comprende controlar el metabolismo de citoquinina en un cuerpo vegetal y similares.

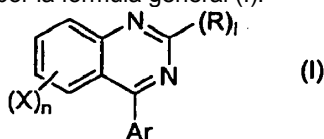
Una sustancia química que sirve como ingrediente activo de un regulador del crecimiento vegetal se ha encontrado convencionalmente por selección aleatoria en que una sustancia química de ensayo se pone en contacto directo con una planta y después se ensaya una actividad biológica de la planta. En este caso, después de haber determinado una sustancia química que tiene una actividad biológica útil, es necesario estudiar intensivamente qué tipo de mecanismo de acción hay para que la sustancia química ejerza su efecto y cuál es la diana de la sustancia química a nivel molecular, para predecir la seguridad y carga en el entorno de la sustancia química.

Descripción de la invención

Un objeto de la presente descripción es proporcionar un agente capaz de controlar el crecimiento y diferenciación de una planta, y un método para buscar una sustancia química que tenga una actividad biológica útil cuya diana haya quedado clara, es decir, un método para seleccionar una sustancia química usando una actividad sobre una diana específica como indicadora para controlar químicamente un sitio diana. Específicamente, un objeto de la presente invención es proporcionar un agente que tenga una actividad de inhibición de la señalización intracelular de un receptor de citoquinina derivado de plantas y que controle el crecimiento o diferenciación de una planta, y un método para buscar una sustancia química que sirva como ingrediente activo del agente.

Por lo tanto, la presente invención proporciona las realizaciones caracterizadas en los siguientes puntos (1) a (14).

1. Uso de un compuesto representado por la fórmula general (I):



donde R y X son iguales o diferentes y

donde R representa un grupo hidrocarburo opcionalmente sustituido, un grupo representado por NR^1R^2 , un grupo representado por OR^3 , un grupo nitro o un átomo de halógeno, y

donde X representa un grupo hidrocarburo opcionalmente sustituido, un grupo representado por NR^1R^2 , un grupo representado por OR^3 , un grupo representado por $\text{S}(\text{O})_m\text{R}^4$, un grupo nitro o un átomo de halógeno.

en la que R^1 representa un átomo de hidrógeno o un grupo hidrocarburo opcionalmente sustituido,

R^2 representa un átomo de hidrógeno, un grupo hidrocarburo opcionalmente sustituido, un grupo representado por NR^5R^6 (en la que R^5 y R^6 son iguales o diferentes y representan un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo

C1-6 opcionalmente sustituido) o un grupo representado por OR^7 (en la que R^7 representa un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo C1-6 opcionalmente sustituido), o R^1 y R^2 se toman junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos para formar un grupo amino cíclico opcionalmente sustituido,

cada uno de R^3 y R^4 representa un grupo hidrocarburo opcionalmente sustituido,

l representa un número entero de 0 a 1,

m representa un número entero de 0 a 2,

n representa un número entero de 0 a 4,

cuando n es 2 o más, cada X es igual o diferente entre sí, y

Ar representa un grupo arilo opcionalmente sustituido o un grupo heteroarilo opcionalmente sustituido; o una sal agrícolamente aceptable de los mismos, como un principio activo para controlar el crecimiento o diferenciación de una planta.

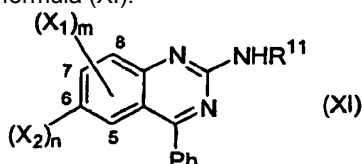
2. El uso de acuerdo con el punto 1, donde l es 1 y R es un grupo representado por NR^1R^2 .

3. El uso de acuerdo con el punto 2, donde R^1 representa un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo C1-3, R^2 representa un átomo de hidrógeno, un grupo amino, un grupo alquilamino C1-3, un grupo dialquilamino C1-3, un grupo amidino, un grupo alcoxi C1-3, un grupo fenilo, un grupo acilo C1-3, un grupo alquilo C1-6, un grupo alquenilo C3-6 o un grupo alquinilo C3-6, en el que el grupo fenilo está opcionalmente sustituido con 1 a 3 grupos alquilo C1-3 iguales o diferente, el grupo fenilo, el grupo acilo, el grupo alquilo, el grupo alquenilo y el grupo alquinilo están opcionalmente sustituidos con 1 a 3 sustituyentes iguales o diferentes seleccionados entre un átomo de halógeno, un grupo hidroxilo, un grupo alcoxi C1-3, un grupo hidroxil alcoxi C1-3, un grupo carboxilo, un grupo alcóxycarbonilo C1-3, un grupo carbamoilo, un grupo amino, un grupo alquilamino C1-3, un grupo dialquilamino C1-3, un grupo mercapto, un acilto C1-3, un grupo ciano, un grupo furilo y un grupo tetrahydrofurilo, o R^1 y R^2 se toman junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos para formar un grupo pirrolidino, un grupo piperidino o un grupo morfolino.

4. El uso de acuerdo con el punto 2, donde R^1 representa un átomo de hidrógeno, R^2 representa un átomo de hidrógeno, un grupo formilo, un grupo alquilo C1-6, un grupo alquenilo C3-6 o un grupo alquinilo C3-6, en el que el grupo alquilo, el grupo alquenilo y el grupo alquinilo están opcionalmente sustituidos con uno o mas sustituyentes seleccionados entre un grupo hidroxilo, un grupo metoxi, un grupo metoxycarbonilo, un grupo etoxycarbonilo, un grupo ciano y un grupo furilo.

5. Un método de regulación del crecimiento vegetal, que comprende aplicar una cantidad eficaz del compuesto que se ha definido en uno cualquiera de los puntos 1 a 4 a una planta o un hábitat de la planta.

6. Un compuesto representado por la fórmula (XI):



donde Ph representa un grupo fenilo, R^{11} representa un átomo de hidrógeno, un grupo formilo, un grupo alquilo C1-6, un grupo alquenilo C3-6 o un grupo alquinilo C3-6, en la que el grupo alquilo, el grupo alquenilo y el grupo alquinilo están opcionalmente sustituidos con al menos un sustituyente seleccionado entre un grupo hidroxilo, un grupo alcoxi C1-3, un grupo alcóxycarbonilo C1-3, un grupo ciano, un grupo 2-furilo y un grupo 2-tetrahydrofurilo, m representa un número entero de 0 a 3, n representa un número entero de 0 a 1, al menos uno de m y n no es 0,

X_1 y X_2 son iguales o diferentes y representan un átomo de cloro, un átomo de bromo, un grupo trifluorometilo, un grupo ciano o un grupo nitro, cuando m es 2 o más, cada X_1 es igual o diferente entre sí; con la condición de que

- a) cuando m es 1, X_1 es un átomo de 5-cloro o un átomo de 7-cloro y R^{11} representa un grupo metilo, n represente un número entero de 1, o
 b) cuando n es 1 y una cualquiera de las condiciones (1) a (3) se satisface, m represente un número entero de 1 a 3:

- (1) X_2 es un átomo de cloro, y R^{11} es un grupo seleccionado entre un átomo de hidrógeno, un grupo metilo, un grupo 2-hidroxietilo, un grupo 3-hidroxipropilo, un grupo 2,2-dimetoxietilo y un grupo cianometilo,
 (2) X_2 es un átomo de bromo, y R^{11} es un grupo seleccionado entre un grupo 2-hidroxietilo, un grupo 3-hidroxipropilo y un grupo 2-metoxietilo, y
 (3) X_2 es un grupo nitro, y R^{11} es un grupo 3-hidroxipropilo; o una sal agrícolamente aceptable de los mismos.

7. El compuesto de acuerdo con el punto 6, donde R^{11} representa un átomo de hidrógeno, un grupo formilo, un grupo metilo, un grupo etilo, un grupo 2-hidroxietilo, un grupo 2-metoxietilo, un grupo furfurilo, un grupo metoxycarbonilmetilo o un grupo etoxycarbonilmetilo, m es 0, n es 1, y X_2 es un átomo de cloro o un grupo nitro, o una sal agrícolamente aceptable de los mismos.

8. El compuesto de acuerdo con el punto 6, donde R^{11} representa un átomo de hidrógeno, un grupo formilo, un grupo metilo, un grupo etilo, un grupo 2-hidroxietilo, un grupo 3-hidroxipropilo, un grupo 2-metoxietilo, un grupo furfurilo, un grupo metoxycarbonilmetilo o un grupo etoxycarbonilmetilo, m es 1, n es 1, X_1 es un átomo de 8-cloro, y X_2 representa un átomo de cloro o un grupo nitro, o una sal agrícolamente aceptable de los mismos.

9. El compuesto de acuerdo con el punto 6, donde m es un número entero de 1 a 3 y n es 0, o una sal agrícolamente aceptable del mismo.

10. Los compuestos de acuerdo con el punto 6, donde R^{11} representa un grupo formilo, un grupo alquilo C4-6, un grupo alquenilo C3-6 o un grupo alquinilo C3-6 en el que el grupo alquilo, el grupo alquenilo y el grupo alquinilo

están opcionalmente sustituidos con uno o más grupos hidroxilo o uno o más grupos alcoxi C1-3, o R¹¹ representa un grupo alcoxycarbonilmetilo C1-3, un grupo alcoxi C1-3-alquilo C1-3 o un grupo furfurilo, m es 0,

n es 1, y

5 X₂ es un átomo de cloro, o una sal agrícolamente aceptable del mismo.

11. El compuesto de acuerdo con el punto 6, donde n es 1, o una sal agrícolamente aceptable del mismo.

10 12. El compuesto de acuerdo con el punto 6, donde m es de 1 a 3 y n es 1, o una sal agrícolamente aceptable del mismo.

13. El compuesto de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 6, 9, 11 y 12, donde R¹¹ es un grupo alcoxycarbonilmetilo C1-3 o un grupo furfurilo, o una sal agrícolamente aceptable de los mismos.

15 14. El compuesto de acuerdo con el punto 6, donde n es 1 y X₂ es un grupo trifluorometilo o un grupo ciano.

Además, se describen los siguientes (1) a (50):

20 (1) un agente capaz de controlar el crecimiento o diferenciación de una planta que tiene una actividad de inhibición de la señalización intracelular de un receptor de citoquinina derivado de plantas de una célula;

(2) el agente de acuerdo con (1) anterior, donde el agente capaz de controlar el crecimiento o diferenciación de una planta es un regulador del crecimiento vegetal;

(3) el agente de acuerdo con (1) anterior, donde el agente capaz de controlar el crecimiento o diferenciación de una planta es un agente capaz de controlar el crecimiento de un cuerpo vegetal;

25 (4) el agente de acuerdo con (1) anterior, donde el agente capaz de controlar el crecimiento o diferenciación de una planta es un agente capaz de controlar la diferenciación de una célula vegetal;

(5) el agente de acuerdo con (3) anterior, donde el agente capaz de controlar el crecimiento o diferenciación de una planta es un agente capaz de controlar el crecimiento de una yema de una planta;

30 (6) el agente de acuerdo con (5) anterior, donde el control del crecimiento de una yema de una planta es inhibición del crecimiento de una yema axilar;

(7) el agente de acuerdo con (5) anterior, donde el control del crecimiento de una yema de una planta es inhibición del crecimiento de una yema floral;

(8) el agente de acuerdo con (3) anterior, donde el agente capaz de controlar el crecimiento de un cuerpo vegetal es un agente capaz de promover el establecimiento de posición de una planta;

35 (9) el agente de acuerdo con (3) anterior, donde el agente capaz de controlar el crecimiento de un cuerpo vegetal es un agente capaz de promover el macollaje de una planta;

(10) el agente de acuerdo con (3) anterior, donde el agente capaz de controlar el crecimiento de un cuerpo vegetal es un agente capaz de promover el crecimiento de una raíz de una planta;

40 (11) el agente de acuerdo con uno cualquiera de (1) a (10) anteriores, donde el receptor de citoquinina derivado de plantas de una célula es un receptor de citoquinina seleccionado entre el siguiente grupo A:

<Grupo A>

45 (a) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 1,

(b) una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 1 en que uno o más aminoácidos están delecionados, añadidos o sustituidos, y que tiene una actividad de funcionamiento como receptor de citoquinina,

50 (c) una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia del 45% o más con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 1, y que tiene una actividad de funcionamiento como un receptor de citoquinina

(d) una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de nucleótidos de la SEC ID N° 2

55 (e) una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos codificada por un polinucleótido que hibrida en condiciones rigurosas con un polinucleótido complementario a un polinucleótido que tiene la secuencia de nucleótidos de la SEC ID N° 2, y que tiene una actividad de funcionamiento como un receptor de citoquinina;

60 (12) el agente de acuerdo con uno cualquiera de (1) a (10) anteriores, donde la actividad de inhibición de la señalización intracelular de un receptor de citoquinina derivado de plantas de una célula es una actividad de inhibición de señalización intracelular de un receptor de citoquinina seleccionado entre el siguiente grupo A en un sistema de contacto de una célula que tiene el receptor de citoquinina con una sustancia que tiene una actividad agonista al receptor de citoquinina;

<Grupo A>

65 (a) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 1,

(b) una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 1 en que uno o más aminoácidos están delecionados, añadidos o sustituidos, y que tiene una actividad de funcionamiento como un receptor de citoquinina,

5 (c) una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia del 45% o más con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 1, y que tiene una actividad de funcionamiento como un receptor de citoquinina

(d) una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de nucleótidos de la SEC ID N° 2

10 (e) una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos codificada por un polinucleótido que hibrida en condiciones rigurosas con un polinucleótido complementario a un polinucleótido que tiene la secuencia de nucleótidos de la SEC ID N° 2, y que tiene una actividad de funcionamiento como un receptor de citoquinina;

15 (13) un regulador del crecimiento vegetal que comprende una sustancia química capaz de inhibir la señalización intracelular de un receptor de citoquinina derivado de plantas de una célula, o una sal agrícolamente aceptable de la misma, como ingrediente activo;

20 (14) el regulador del crecimiento vegetal de acuerdo con (13) anterior, donde la sustancia química tiene una actividad de inhibición de la señalización intracelular de un receptor de citoquinina seleccionado entre el siguiente grupo A en un sistema de contacto que comprende una célula que tiene el receptor de citoquinina, una sustancia que tiene una actividad agonista al receptor de citoquinina, y la sustancia química;

<Grupo A>

25 (a) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 1,

(b) una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 1 en que uno o más aminoácidos están delecionados, añadidos o sustituidos, y que tiene una actividad de funcionamiento como un receptor de citoquinina,

30 (c) una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia del 45% o más con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 1, y que tiene una actividad de funcionamiento como un receptor de citoquinina

(d) una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de nucleótidos de la SEC ID N° 2

35 (e) una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos codificada por un polinucleótido que hibrida en condiciones rigurosas con un polinucleótido complementario a un polinucleótido que tiene la secuencia de nucleótidos de la SEC ID N° 2, y que tiene una actividad de funcionamiento como un receptor de citoquinina;

(15) el regulador del crecimiento vegetal de acuerdo con (14) anterior, donde la sustancia que tiene una actividad agonista al receptor de citoquinina es trans-zeatina;

40 (16) el regulador del crecimiento vegetal de acuerdo con (13) anterior, donde la sustancia química tiene una actividad de disminución de la señalización intracelular de un receptor de citoquinina seleccionado entre el siguiente grupo A en un sistema de contacto que comprende una célula que tiene el receptor de citoquinina, 0,6 ppm de trans-zeatina 2 2 ppm de la sustancia química, en comparación con el caso en el que la sustancia química no está presente en el sistema de contacto;

45

<Grupo A>

(a) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 1,

50 (b) una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 1 en que uno o más aminoácidos están delecionados, añadidos o sustituidos, y que tiene una actividad de funcionamiento como un receptor de citoquinina,

(c) una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia del 45% o más con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 1, y que tiene una actividad de funcionamiento como un receptor de citoquinina

55 (d) una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de nucleótidos de la SEC ID N° 2

(e) una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos codificada por un polinucleótido que hibrida en condiciones rigurosas con un polinucleótido complementario a un polinucleótido que tiene la secuencia de nucleótidos de la SEC ID N° 2, y que tiene una actividad de funcionamiento como un receptor de citoquinina;

60

(17) el regulador del crecimiento vegetal de acuerdo con (13) anterior, donde la sustancia química tiene una actividad de disminución de la señalización intracelular de un receptor de citoquinina seleccionado entre el siguiente grupo A en un 90% o más en un sistema de contacto que comprende una célula que tiene el receptor de citoquinina, 0,6 ppm de trans-zeatina y 2 ppm de la sustancia química, en comparación con el caso en el que la sustancia química no está presente en el sistema de contacto;

65

<Grupo A>

- (a) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 1,
 (b) una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 1 en que uno o más aminoácidos están delecionados, añadidos o sustituidos, y que tiene una actividad de funcionamiento como un receptor de citoquinina,
 (c) una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia del 45% o más con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 1, y que tiene una actividad de funcionamiento como un receptor de citoquinina
 (d) una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de nucleótidos de la SEC ID N° 1
 (e) una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos codificada por un polinucleótido que hibrida en condiciones rigurosas con un polinucleótido complementario a un polinucleótido que tiene la secuencia de nucleótidos de la SEC ID N° 2, y que tiene una actividad de funcionamiento como un receptor de citoquinina;

(18) un método para buscar una sustancia química capaz de promover el crecimiento de una raíz de una planta, que comprende:

- <1> una primera etapa para medir la cantidad de señalización intracelular de un receptor de citoquinina seleccionado entre el siguiente grupo A en un sistema de contacto que comprende una célula que tiene el receptor de citoquinina, una sustancia que tiene una actividad agonista al receptor de citoquinina y una sustancia de ensayo; y
 <2> una segunda etapa para seleccionar una sustancia química capaz de promover el crecimiento de una raíz de una planta en base a una diferencia obtenida por comparación de la cantidad de señalización intracelular medida en la primera etapa con la cantidad de señalización intracelular en ausencia de la sustancia química;

<Grupo A>

- (a) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 1,
 (b) una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 1 en que uno o más aminoácidos están delecionados, añadidos o sustituidos, y que tiene una actividad de funcionamiento como un receptor de citoquinina,
 (c) una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia del 45% o más con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 1, y que tiene una actividad de funcionamiento como un receptor de citoquinina
 (d) una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de nucleótidos de la SEC ID N° 2
 (e) una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos codificada por un polinucleótido que hibrida en condiciones rigurosas con un polinucleótido complementario a un polinucleótido que tiene la secuencia de nucleótidos de la SEC ID N° 2, y que tiene una actividad de funcionamiento como un receptor de citoquinina;

(19) el método de búsqueda de acuerdo con (18) anterior, donde la célula que tiene el receptor de citoquinina es una célula transformada en la cual se introduce un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 1;

(20) el método de búsqueda de acuerdo con (18) anterior, donde la célula que tiene el receptor de citoquinina es una célula de levadura transformada en la cual se introduce un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 1;

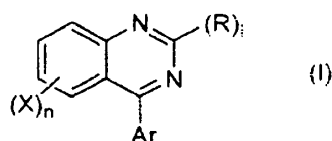
(21) el método de búsqueda de acuerdo con (18), (19) o (20) anteriores, donde la sustancia que tiene una actividad agonista al receptor de citoquinina es trans-zeatina;

(22) un regulador del crecimiento vegetal que comprende una sustancia química seleccionada por el método de búsqueda de acuerdo con (18), (19), (20) o (21), o una sal agrícolamente aceptable de la misma, como ingrediente activo;

(23) un método para regular el crecimiento vegetal, que comprende aplicar una cantidad eficaz del regulador del crecimiento vegetal de acuerdo con (13), (14), (15), (16), (17) o (22) anteriores a una planta o a un hábitat de la planta;

(24) un método para regular el crecimiento vegetal, que comprende determinar una sustancia química capaz de promover el crecimiento de una raíz de una planta mediante el método de búsqueda de acuerdo con (18), (19), (20) o (21), y poner la sustancia química capaz de promover el crecimiento de una raíz de una planta determinada de este modo en contacto con una planta;

(25) un regulador del crecimiento vegetal que comprende un compuesto representado por la fórmula general (I):



donde R y X son iguales o diferentes y representa un grupo hidrocarburo opcionalmente sustituido, un grupo representado por NR^1R^1 , un grupo representado por OR^3 , un grupo representado por SiO_mR^4 , un grupo nitro o un átomo de halógeno, en la que R^1 representa un átomo de hidrógeno o un grupo hidrocarburo opcionalmente sustituido,

R^3 representa un átomo de hidrógeno, un grupo hidrocarburo opcionalmente sustituido, un grupo representado por NR^5R^6 (en la que R^5 y R^6 son iguales o diferentes y representan un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo C1-6 opcionalmente sustituido) o un grupo representado por OR^7 (en la que R^7 representa un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo C1-6 opcionalmente sustituido); o R^1 y R^2 se toman junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos para formar un grupo amino cíclico opcionalmente sustituido,

cada uno de R^3 y R^4 representa un grupo hidrocarburo opcionalmente sustituido,

1 representa un número entero de 0 a 1,

m representa un número entero de 0 a 2,

n representa un número entero de 0 a 4,

cuando n es 2 o más, cada X es igual o diferente entre sí, y

Ar representa un grupo arilo opcionalmente sustituido o un grupo heteroarilo opcionalmente sustituido; o una sal agrícola aceptable de los mismos, como un principio activo;

(26) el regulador del crecimiento vegetal de acuerdo con el punto (25) anterior, donde l es 1 y R es un grupo hidrocarburo opcionalmente sustituido;

(27) el regulador del crecimiento vegetal de acuerdo con el punto (25) anterior, donde l es 1 y R es un grupo alquilo C1-3 que está opcionalmente sustituido con uno o más átomos de halógeno o uno o más grupos oxo;

(28) el regulador del crecimiento vegetal de acuerdo con el punto (26) anterior, donde el grupo hidrocarburo opcionalmente sustituido es un grupo alquilo C1-3 que está opcionalmente sustituido con un o más átomos de halógeno o uno o más grupos oxo;

(29) el regulador del crecimiento vegetal de acuerdo con el punto (25) anterior, donde l es 1 y R es un grupo representado por NR^1R^2 ;

(30) el regulador del crecimiento vegetal de acuerdo con el punto (29) anterior, donde R^1 representa un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo C1-3, R^2 representa un átomo de hidrógeno, un grupo amino, un grupo alquilamino C1-3, un grupo dialquilamino C1-3, un grupo amidino, un grupo alcoxi C1-3, un grupo fenilo, un grupo acilo C1-3, un grupo alquilo C1-6, un grupo alquinilo C3-6 o un grupo alquinilo C3-6, en el que el grupo fenilo está opcionalmente sustituido con 1 a 3 grupos alquilo C1-3 iguales o diferente, el grupo fenilo, el grupo acilo, el grupo alquilo, el grupo alquenilo y el grupo alquinilo están opcionalmente sustituidos con 1 a 3 sustituyentes iguales o diferentes seleccionados entre un átomo de halógeno, un grupo hidroxilo, un grupo alcoxi C1-3, un grupo hidroxilalcoxi C1-3, un grupo carboxilo, un grupo alcoxycarbonilo C1-3, un grupo carbamoilo, un grupo amino, un grupo alquilamino C1-3, un grupo dialquilamino C1-3, un grupo mercapto, un aciltio C1-3, un grupo ciano, un grupo furilo y un grupo tetrahidrofurilo, o R^1 y R^1 se toman junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos para formar un grupo pirrolidino, un grupo piperidino o un grupo morfolino;

(31) el regulador del crecimiento vegetal de acuerdo con el punto (29) anterior, donde R^1 representa un átomo de hidrógeno, R^2 representa un átomo de hidrógeno, un grupo formilo, un grupo alquilo C1-6, un grupo alquenilo C3-6 o un grupo alquinilo C3-6, en el que el grupo alquilo, el grupo alquenilo y el grupo alquinilo están opcionalmente sustituidos con uno o más sustituyentes seleccionados entre un grupo hidroxilo, un grupo metoxi, un grupo metoxycarbonilo, un grupo etoxycarbonilo, un grupo ciano y un grupo furilo;

(32) el regulador del crecimiento vegetal de acuerdo con el punto (25) anterior, donde l es 1 y R es un grupo representado por OR^3 ;

(33) el regulador del crecimiento vegetal de acuerdo con el punto (32) anterior, donde R^3 es un grupo alquilo C1-3 que está opcionalmente sustituido con un grupo amino;

(34) el regulador del crecimiento vegetal de acuerdo con el punto (25) anterior, donde l es 1 y R es un grupo representado por $\text{S(O)}_m\text{R}^4$;

(35) el regulador del crecimiento vegetal de acuerdo con el punto (34) anterior, donde R^4 es un grupo alquilo C1-3 que está opcionalmente sustituido con un grupo amino o un grupo hidroxil, y m es 0;

(36) el regulador del crecimiento vegetal de acuerdo con el punto (25) anterior, donde l es 1 y R es un átomo de halógeno;

(37) el regulador del crecimiento vegetal de acuerdo con el punto (36) anterior, donde el átomo de halógeno es un átomo de cloro;

(38) el regulador del crecimiento vegetal de acuerdo con uno cualquiera de los puntos (25) a (37) anteriores, donde n es de 1 a 2 y X es un grupo alquilo C1-3, un grupo alcoxi C1-3, un grupo haloalquilo C1-3, un grupo ciano, un átomo de halógeno o un grupo nitro;

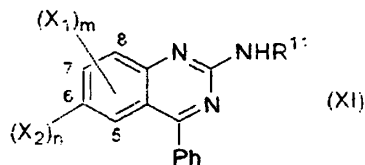
(39) el regulador del crecimiento vegetal de acuerdo con el punto (38) anterior, donde X es un átomo de cloro, un átomo de bromo o un grupo nitro, y X está en la posición 6 y/o la posición 8;

(40) el regulador del crecimiento vegetal de acuerdo con uno cualquiera de los puntos (25) a (37) anteriores, donde Ar es un grupo fenilo que está opcionalmente sustituido con uno o más átomos de halógeno o uno o más grupos alquilo C1-3;

(41) un método de regulación del crecimiento vegetal, que comprende aplicar una cantidad eficaz del regulador del crecimiento vegetal de acuerdo con uno cualquiera de los puntos (25) a (40) anteriores a una planta o un hábitat de la planta;

(42) un compuesto representado por la fórmula (XI):

5



donde Ph representa un grupo fenilo, R¹¹ representa un átomo de hidrógeno, un grupo formilo, un grupo alquilo C1-6, un grupo alquenoilo C3-6 o un grupo alquinilo C3-6, en el que el grupo alquilo, el grupo alquenoilo y el grupo alquinilo están opcionalmente sustituidos con al menos un sustituyente seleccionado entre un grupo hidroxilo, un grupo alcoxi C1-3, un grupo alcocarbonilo C1-3, un grupo ciano, un grupo 2-furilo y un grupo 2-tetrahydrofurilo, m representa un número entero de 0 a 3,

10

n representa un número entero de 0 a 1,

15

al menos uno de m y n no es 0,

X₃ y X₂ son iguales o diferentes y representan un átomo de cloro, un átomo de bromo, un grupo trifluorometilo, un grupo ciano o un grupo nitro,

cuando m es 2 o más, cada X₁ es igual o diferente entre sí; con la condición de que

20

a) cuando m es 1, X₃ es un átomo de 5-cloro o un átomo de 7-cloro y R¹¹ representa un grupo metilo, n represente un número entero de 1, o

b) cuando n es 1 y una cualquiera de las condiciones (1) a (3) se satisface, m represente un número entero de 1 a 3:

25

(1) X₂ es un átomo de cloro, y R¹¹ es un grupo seleccionado entre un átomo de hidrógeno, un grupo metilo, un grupo 2-hidroxietilo, un grupo 3-hidroxipropilo, un grupo 2,2-dimetoxietilo y un grupo cianometilo,

(2) X₂ es un átomo de bromo, y R¹¹ es un grupo seleccionado entre un grupo 2-hidroxietilo, un grupo 3-hidroxipropilo y un grupo 1-metoxietilo, y

30

(3) X₂ es un grupo nitro, y R¹¹ es un grupo 3-hidroxipropilo; o una sal agrícolamente aceptable de los mismos;

35

(43) el compuesto de acuerdo con el punto (42) anterior, donde R¹¹ representa un átomo de hidrógeno, un grupo formilo, un grupo metilo, un grupo etilo, un grupo 2-hidroxietilo, un grupo 2-metoxietilo, un grupo furfurilo, un grupo metoxicarbonilmetilo o un grupo etoxicarbonilmetilo, m es 0, n es 1, y X₂ es un átomo de cloro o un grupo nitro, o una sal agrícolamente aceptable de los mismos;

40

(44) el compuesto de acuerdo con el punto (42) anterior, donde R¹¹ representa un átomo de hidrógeno, un grupo formilo, un grupo metilo, un grupo etilo, un grupo 2-hidroxietilo, un grupo 3-hidroxipropilo, un grupo 2-metoxietilo, un grupo furfurilo, un grupo metoxicarbonilmetilo o un grupo etoxicarbonilmetilo, m es 1, n es 1, X₁ es un átomo de 6-cloro, y X₂ representa un átomo de cloro o un grupo nitro, o una sal agrícolamente aceptable de los mismos;

(45) el compuesto de acuerdo con el punto (42) anterior, donde m es un número entero de 1 a 3 y n es 0, o una sal agrícolamente aceptable del mismo;

45

(46) el compuesto de acuerdo con el punto (42) anterior, donde R¹¹ representa un grupo formilo, un grupo alquilo C4-6, un grupo alquenoilo C3-6 o un grupo alquinilo C3-6 en el que el grupo alquilo, el grupo alquenoilo y el grupo alquinilo están opcionalmente sustituidos con uno o más grupos hidroxilo o uno o más grupos alcoxi C1-3, o R¹¹ representa un grupo alcocarbonilmetilo C1-3, un grupo alcoxi C1-3-alquilo C1-3 o un grupo furfurilo, m es 0,

n es 1, y

X₂ es un átomo de cloro, o una sal agrícolamente aceptable del mismo;

50

(47) el compuesto de acuerdo con el punto (42) anterior, donde n es 1, o una sal agrícolamente aceptable del mismo;

(48) el compuesto de acuerdo con el punto (42) anterior, donde m es de 1 a 3 y n es 1, o una sal agrícolamente aceptable del mismo;

(49) el compuesto de acuerdo con el punto (42), (45), (47) o (48) anteriores, donde R¹¹ es un grupo alcocarbonilmetilo C1-3 o un grupo furfurilo, o una sal agrícolamente aceptable de los mismos; y

55

(50) el compuesto de acuerdo con el punto (42) anterior, donde n es 1 y X₂ es un grupo trifluorometilo o un grupo ciano; y similares.

Breve descripción de los dibujos

60

La Figura 1 muestra los resultados de un ensayo de respuesta a dosis usando una sustancia química capaz de inhibir la señalización intracelular de un receptor de citoquinina derivado de plantas de una célula en el Ejemplo 8.

- En las figuras, las líneas de datos representan curvas de inhibición del crecimiento de respuesta a dosis, en que el eje X representa la concentración de una sustancia química ensayada y el eje Y representa una tasa de crecimiento relativo. Las figuras de la izquierda (tres sub-figuras de una fila vertical izquierda) muestran resultados en sistemas de ensayo usando la célula transformada TM182-CRE1. Las figuras de la derecha (tres sub-figuras en una fila vertical derecha) muestran resultados en sistemas de ensayo usando la célula transformada TM182-p415CYC1. Las figuras superiores, las figuras centrales, y las figuras inferiores representan resultados en sistemas de ensayo usando la sustancia química Ic7-1, la sustancia química Ic3-1, y la sustancia química Ic3-3, respectivamente.
- La Figura 2 muestra resultados de evaluación de la actividad promotora del crecimiento de raíces de una sustancia inhibidora de la señalización de citoquinina usando lechuga en el Ejemplo 10. En la figura, una línea de datos representa una curva de promoción del crecimiento de respuesta a dosis, en que el eje X representa la concentración de una sustancia química ensayada (sustancia química Ic3-1) y el eje Y representa una tasa de crecimiento de raíces (%).
- La Figura 3 muestra resultados de evaluación de la actividad promotora del crecimiento de raíces de una sustancia inhibidora de la señalización de citoquinina usando lechuga en el Ejemplo 10. En la figura, una línea de datos representa una curva de promoción de crecimiento de respuesta a dosis, en que el eje X representa la concentración de una sustancia química ensayada (sustancia química Ic7-1) y el eje Y representa una tasa de crecimiento de raíces (%).
- La Figura 4 muestra resultados de evaluación de la actividad promotora del crecimiento de raíces de una sustancia inhibidora de la señalización de citoquinina usando arroz en el Ejemplo 11. En la figura, una línea de datos representa una curva de promoción de crecimiento de respuesta a dosis, en que el eje X representa la concentración de una sustancia química ensayada (sustancia química Ic3-1) y el eje Y representa una tasa de crecimiento de raíces (%).
- La Figura 5 muestra resultados de evaluación de la actividad promotora del crecimiento de raíces de una sustancia inhibidora de la señalización de citoquinina usando arroz en el Ejemplo 11. En la figura, una línea de datos representa una curva de promoción de crecimiento de respuesta a dosis, en que el eje X representa la concentración de una sustancia química ensayada (sustancia química Ic7-1) y el eje Y representa una tasa de crecimiento de raíces (%).
- La Figura 6 muestra resultados de evaluación de la actividad promotora del crecimiento de raíces de una sustancia inhibidora de la señalización de citoquinina por tratamiento de semillas de arroz en el Ejemplo 12. En las figuras, "UTC" representa un resultado de un ensayo de control en que solamente se usó acetona en el tratamiento de las semillas. "IAA" representa un resultado de un ensayo en que se usó el compuesto auxina IAA.
- La Figura 7 muestra resultados de medición de la actividad de formación de raíces adventicias de una sustancia inhibidora de la señalización de citoquinina usando hipocótilo de *A. thaliana* para evaluar la actividad promotora de la diferenciación vegetal en el Ejemplo 13. En la figura, "sección de control" muestra un resultado de un ensayo de control usando un medio de agar como se describe en el Ejemplo 13.
- La Figura 8 muestra resultados de medición de la actividad promotora del crecimiento de raíces de una sustancia inhibidora de la señalización de citoquinina usando arroz en el Ejemplo 14. En la figura, "UTC" muestra un resultado de un ensayo de control usando solamente acetona en tratamiento de empapado del suelo.
- La Figura 9 muestra resultados de análisis de la actividad promotora del crecimiento de raíces de una sustancia inhibidora de la señalización de citoquinina usando arroz mediante el uso de un aparato de análisis de imágenes para medir la longitud de la raíces en el Ejemplo 14. Respecto a las líneas de datos en la figura, el eje X representa la concentración de una sustancia química ensayada (sustancia química Ic3-3) y el eje Y representa la suma total (longitud total de la raíz) de las longitudes de las raíces de cada uno de los diámetros de la raíz. En la figura, "UTC" muestra un resultado de un ensayo de control usando solamente acetona en el tratamiento de empapado del suelo. El valor de la leyenda (L) representa un diámetro de la raíz (mm).
- La Figura 10 muestra resultados de un ensayo de inhibición de la unión de citoquinina a un receptor de citoquinina mediante una sustancia de ensayo en el Ejemplo 19. En la figura, "DMSC solamente" representa un control en que no se ha añadido una sustancia de ensayo y solamente DMSCO, que se usó como disolvente para una sustancia de ensayo, se añadió en lugar de una solución de DMSO de una sustancia de ensayo. "t-Zeatina" representa la adición de trans-zeatina como sustancia de ensayo, "Ic3-4" representa la adición de Ic3-4 como sustancia de ensayo, y "ABA" representa la adición de ácido abscísico como sustancia de ensayo. La concentración del marcador radiactivo 2IP es 10 nM, y la concentración de cada sustancia de ensayo es 10 µM.
- La Figura 11 muestra resultados de evaluación de la actividad promotora de macollaje de arroz de una sustancia inhibidora de la señalización de citoquinina en un sistema de ensayo en que las semillas tratadas con la sustancia de ensayo se cultivaron por siembra en seco directa en el Ejemplo 21. En la figura, "Ic3-3" muestra la cantidad de macollos por planta en el caso de usar una solución de pasta blanco de la sustancia de ensayo Ic3-3 para el

tratamiento de las semillas, y "tratamiento con pasta blanco" muestra el número de macollos por planta en el caso de usar una solución de pasta blanco para el tratamiento de las semillas en lugar de la solución de Ic3-3.

Modo para realizar la invención

5 En la presente invención, el término "planta" se usa en un sentido amplio que indica organismos que viven estacionariamente a través de raíces, tales como hierbas y árboles, y también tiene un concepto que incluye un cuerpo vegetal, un tejido vegetal, una célula vegetal y similares. Específicamente, el término "planta" significa organismos tales como plantas superiores en que un órgano mencionado como raíz puede desempeñar tareas importantes tales como fijación de una planta al suelo, y absorción de agua y nutrientes desde el exterior, y ejemplos de la misma incluyen plantas ornamentales tales como plantas de flores y plantas de follaje ornamental, cultivos tales como cultivos de grano, vegetales y árboles frutales, plantas fibrosas, árboles y hierbas. Ejemplos específicos de la misma incluyen cereales tales como arroz y maíz; hierbas tales como agrostis y Zoysia matrella; plantas cucurbitáceas tales como tomate, pimiento verde, pimiento rojo y melón; plantas cucurbitáceas tales como pepino, calabaza, sandía y melón; verduras tales como col, brécol y col China; verduras frescas tales como apio, perejil y lechuga; vegetales para condimentar; Alliums tales como puerro, cebolla y ajo; frijoles tales como soja, judías, guisante y judías dulces; verduras frutales tales como fresas; raíces axiales tales como rábano Japonés, nabo Japonés, zanahoria y bardana; patatas tales como malanga, patata, boniato y ñame; hortalizas blandas tales como espárrago, espinaca y dringi; pétalos tales como Eustoma russellianum, tronco, claveles y crisantemos; cultivos oleosos tales como colza y cacahuete; cultivos de azúcar tales como caña de azúcar y remolacha azucarera; cultivos de fibra tales como algodón y junco; cultivos de pienso tales como trébol y sorgo; árboles frutales de hoja caduca tales como manzano, peral, vides, melocotonero y castaño; árboles cítricos tales como mandarino, naranjo, limonero y pomelo; y plantas leñosas tales como azalea, rododendro y cedro.

25 En la presente invención, el término "crecimiento" de una planta significa un proceso general en que órganos vegetativos ya existentes (raíces, tallos, hojas) se producen de forma nueva y se apilan durante un proceso desde el desarrollo prematuro de una planta empezando en la germinación de la semilla hasta el crecimiento y desarrollo de raíces, tallos y hojas, la formación de flores y después la maduración de las semillas. Ejemplos del crecimiento incluyen germinación, crecimiento de raíces, extensión de yemas, extensión de tallos, formación y extensión de yemas terminales y yemas axilares, desarrollo de ramificaciones y hojas, formación de yemas florales, floración, formación de semillas, y maduración de semillas.

35 En la presente invención, el término "diferenciación" de una planta significa que un tejido vegetal tal como una raíz, un tallo o una hoja se forma desde un cayo que es una población de células vegetales que adquieren totipotencia (re-diferenciación), o significa que un cayo se forma a partir de una célula de un tejido vegetal tal como una raíz, un tallo o una hoja (desdiferenciación).

40 Como se describe en este documento, el "control del crecimiento de una yema" significa la promoción o control del crecimiento de una yema terminal o una yema axilar, y ejemplos del mismo incluyen inicio del crecimiento de la yema axilar que se suprime por dominancia apical, supresión del crecimiento de la yema axilar que se inicia eliminando una yema terminal y supresión del crecimiento habitual de la yema terminal.

45 Como se describe en este documento, el "agente capaz de controlar el crecimiento o diferenciación de una planta" es un agente que puede controlar el crecimiento o diferenciación de una planta tratando la planta con el agente por diversos métodos. El control del crecimiento o diferenciación de una planta es aplicable al control del crecimiento o desarrollo de una planta útil tal como un cultivo agrícola, que hace posible potenciar el crecimiento prematuro, potenciar la calidad, aumentar el rendimiento, estabilizar el rendimiento incluso en condiciones desfavorables, y ahorrar trabajo en la producción. Por tanto, el "agente capaz de controlar el crecimiento o diferenciación de una planta" puede usarse como un "regulador del crecimiento vegetal".

50 Como se describe en este documento, la "raíz" de una planta incluye una raíz principal que se desarrolla desde una radícula existente en un embrión de una semilla, y una raíz lateral que se extiende desde una raíz principal a través de ramificación, en el caso de dicotiledóneas y gimnospermas. En el caso de monocotiledóneas, la "raíz" incluye una radícula (raíz seminal) que existe en el embrión de una semilla, una raíz corona (también llamada raíz fibrosa) que se forma en la parte superior después de la terminación del crecimiento de una raíz seminal, y una raíz lateral que se extiende desde una raíz adventicia a través de ramificación. Además, la "raíz" ocasionalmente significa pelo radicular que se extiende de forma continua hacia el exterior que se forma desde células epidérmicas de una raíz. La raíz de una planta es un órgano que desempeña importantes tareas para una planta, tales como, fijación de una planta al suelo, y absorción de agua y nutrientes desde el exterior. La raíz de una planta también es muy importante como sitio donde se produce hormona vegetal. Desde un punto de vista agrícola, muchos cultivos se propagan a través de sus semillas. Por lo tanto, es un elemento muy importante que conduce a una alta calidad y alto rendimiento que se obtenga un uniforme establecimiento de posición en una fase prematura del crecimiento de una planta. Se espera que la promoción del crecimiento de una raíz de una planta tenga diversos méritos tales como mejora en una tasa de arraigo en el terreno, mejora en la productividad o calidad por mejora en el establecimiento de posición o similares, control de maleza en una fase prematura en el establecimiento de posición, y mejora en la eficacia de una fuente de semillas. Se espera que la promoción de la propagación de raíces conduzca a un aumento

en la resistencia al estrés por sequía o resistencia a plagas, y una disminución en la cantidad de fertilizante mejorando la capacidad de absorción de nutrientes.

5 Como se describe en este documento, el "crecimiento de una raíz" de una planta significa que la longitud de una raíz y la cantidad de raíces aumenta o que la cantidad, grosor y actividad de una raíz aumenta, como resultado de división, crecimiento y un aumento en el peso de las células de la raíz.

10 Como se describe en este documento, la "promoción del crecimiento de una raíz" de una planta significa que el crecimiento de una raíz de una planta está más activado que lo habitual, y por tanto la longitud de una raíz y la cantidad de raíces aumenta, o la cantidad, grosor y actividad de una raíz aumenta en comparación con el caso de ausencia de tratamiento.

15 Como se describe en este documento, el "agente capaz de promover el crecimiento de una raíz de una planta" es un agente que puede promover el crecimiento de una raíz de una planta tratando la planta con la sustancia por diversos métodos. La promoción del crecimiento de una raíz de una planta es aplicable para controlar el crecimiento o desarrollo de una planta útil tal como un cultivo agrícola, que hace posible potenciar el crecimiento prematuro, potenciar la calidad, aumentar el rendimiento, estabilizar el rendimiento incluso en condiciones desfavorables, y ahorrar trabajo en la producción. Por tanto, el "agente capaz de promover el crecimiento de una raíz de una planta" puede usarse como un "regulador del crecimiento vegetal".

20 Como se usa en este documento, la expresión "establecimiento de posición" significa que una semilla sembrada germina y después echa raíces en el suelo en un estado capaz de crecer normalmente como un cuerpo vegetal, o que una plántula trasplantada de una planta establece raíces en el suelo y después crece normalmente. La promoción del establecimiento de posición conduce a mejora en el crecimiento prematuro de una planta, y de este modo es posible que crezca una planta de forma sana. Además, como resultado de un aumento en la cantidad de plantas que han crecido de forma sana, se espera un aumento en el rendimiento final. Por ejemplo, en el caso de siembra directa de arroz, generalmente es difícil asegurar siempre una cantidad dada de plántulas establecidas a causa de la germinación inestable y establecimiento de posición. El agente capaz de promover el establecimiento de posición de la presente invención puede promover el establecimiento de posición para mejorar la eficacia en la siembra directa de arroz. La expresión "tasa de establecimiento de posición" significa la proporción de plantas establecidas en la cantidad total de semillas sembradas o la cantidad total de plántulas trasplantadas de una planta. En el caso de arroz, como se usa en este documento, la "tasa de establecimiento de posición" puede definirse por la siguiente ecuación.

35 **[Tasa de establecimiento de posición (%)] = [Cantidad de plántulas cuyo ápice foliar aparece sobre la superficie del agua] / [Cantidad de semillas sembradas] x 100**

40 El término "macollaje" de una planta significa ramificación durante el crecimiento de una planta, o ramas que surgen como resultado de macollaje. En el caso de plantas gramíneas, por ejemplo, el término "macollaje" significa ramificaciones laterales. La promoción del macollaje incluye macollaje prematuro y un aumento en la cantidad de macollos. Por ejemplo, cuando se usa un regulador del crecimiento vegetal de una planta de la presente invención en condiciones de estrés tales como baja temperatura, alta temperatura y sequía para hacer el macollaje de la planta de forma más prematura y de este modo plántulas sanas puedan fijarse de forma prematura, es posible evitar daños de las plántulas por estrés. Por ejemplo, un macollaje prematuro provoca un periodo de cultivo acortado de una planta. Como la formación de macollos de una planta influye directamente sobre la cantidad de espigas, puede esperarse un aumento del rendimiento dependiendo de las condiciones de cultivo.

50 Una sustancia activa auxina puede mostrar propiedades desfavorables tales como epinastia de las hojas, torsión de tallos, rotura de tallos, e inducción de nudos en raíces, dependiendo del tipo de planta, la concentración de tratamiento con auxina y similares.

55 Se cree que las sustancias activas de citoquinina tienen propiedades tanto supresoras como promotoras del crecimiento de una raíz de una planta [por ejemplo, PNAS 101 (23): 8821-8826 (2004)]. Sin embargo, para utilizar dichas propiedades en la práctica agrícola, pueden acumularse un montón de hallazgos. Como es habitualmente difícil ajustar la cantidad de citoquinina en un cuerpo vegetal (particularmente, para reducir la cantidad de citoquinina endógena), no es fácil incluso para un especialista en la técnica investigar específicamente las tareas de citoquinina en una planta.

60 Se cree que la citoquinina intrínseca de una planta puede controlarse negativamente inhibiendo la transducción de señales de citoquinina para debilitar la sensibilidad a citoquinina. Por ejemplo, la transducción de señales de citoquinina puede inhibirse mutando el propio receptor de citoquinina, y se han aislado mutantes de receptores de citoquinina [The Plant Cell 16:1365-1377 (2004), PNAS 101 (23):8821-8826 (2004)]. Sin embargo, usando los mutantes, es difícil controlar el grado de inhibición por fases. Un mutante único de un receptor de citoquinina muestra el mismo fenotipo que el de tipo silvestre. Por otro lado, un triple mutante de un receptor de citoquinina muestra inhibición de elongación de raíces y crecimiento defectuoso de un cuerpo vegetal.

65

El "receptor de citoquinina derivado de plantas de una células" como se describe en este documento significa un receptor de citoquinina que existe en una planta. El receptor de citoquinina es una proteína que se une específicamente a citoquinina tal como purina citoquinina tal como quinetina o zaetina o urea citoquinina tal como N-fenil-N'-(4-piridil)urea para controlar la proliferación y diferenciación de células de plantas superiores a través del mecanismo de señalización intracelular llamado sistema regulador de dos componentes (o sistema de fosfotransferencia de His a Asp). El receptor de citoquinina usado en el presente contexto es una proteína que pertenece a la familia de histidina quinasa y está compuesto por un dominio extracelular, un dominio transmembrana, un dominio de histidina quinasa (una región que tiene una actividad histidina quinasa en células y que retiene restos His que son un sitio activo) y un dominio receptor (una región que tiene una parte receptora para transferencia de grupo fosfato y que retiene restos Asp que es un sitio activo).

El sistema regulador de dos componentes es un mecanismo de recepción de información y señalización intracelular que se usa ampliamente en eubacterias, bacterias ancestrales, hongos y plantas. En este mecanismo, una histidina quinasa actúa como receptor y la histidina quinasa tiene una región de entrada para recibir una señal en el lado N-terminal y una región referida a la transferencia de grupo fosfato, que se llama dominio transmisor, en el lado C-terminal. Cuando la región de entrada reconoce una señal, un resto His en el dominio transmisor (el dominio histidina quinasa descrito anteriormente de un receptor de citoquinina) se autofosforila. El grupo fosfato se transfiere con fosforilación alternativa de los restos His y Asp específicos conservados, y finalmente fosforila un resto Asp en un dominio receptor de una proteína llamada regulador de respuesta. El grupo fosfato puede transferirse directamente desde la histidina quinasa al regulador de respuesta o puede transferirse al regulador de respuesta a través de algunas fases de transferencia de grupo fosfato. Un sistema regulador simple de dos componentes como el anterior está principalmente presente en procariotas. Por otro lado, se observa una transferencia de fosfato de múltiples etapas principalmente en eucariotas, y un dominio receptor frecuentemente se une a la histidina quinasa de dichos eucariotas. También está implicado un mediador de transferencia de grupo fosfato en la transferencia de grupo fosfato. La fosforilación del regulador de respuesta controla la actividad de una región de salida que se une al regulador de respuesta. La región de salida es frecuentemente un regulador transcripcional.

En el caso de un receptor de citoquinina de una planta, un dominio receptor está presente en la misma molécula. En otras palabras, en el caso de un receptor de citoquinina que se une a citoquinina, se sabe que la autofosforilación de un resto His en la molécula está seguido por la transferencia de grupo fosfato desde el resto His a un resto Asp en la molécula. Después, se encuentra que el grupo fosfato se transfiere a un resto Asp del regulador de respuesta mediante un resto His del mediador de transferencia de fosfato. Por ejemplo, en el caso de *Arabidopsis thaliana*, se encuentra que un grupo fosfato se transfiere desde el receptor de citoquinina CRE1, AHK2 o AHK3 al regulador de respuesta mediante el mediador de grupo fosfato AHF.

Ejemplos de un gen que codifica un receptor de citoquinina que se ha conocido anteriormente ahora incluye secuencias de nucleótidos de genes derivados de *Arabidopsis thaliana* (CRE1 : número de acceso AB049934, AHK2: número de acceso AB046869, AHK3: número de acceso AB046870), *Catharanthus roseus* (número de acceso AY09P025), *Cryza sativa* (número de acceso AY572461), y *Zea mays* (ZmHK1: número de acceso AE042270, ZmHK2: número de acceso AB102956, ZmHK3a: número de acceso AB102957, ZmHK3b: número de acceso AB121445). Dicho gen cuya secuencia de nucleótidos es conocida puede amplificarse por PCR usando el ADN genómico o ADNc de un organismo que tiene el gen deseado como molde y cebadores que se producen en base a una secuencia de nucleótidos correspondiente a las cercanías del extremo amino terminal de una proteína codificada por el gen y una secuencia de nucleótidos correspondiente a las cercanías del extremo carboxilo terminal de la misma, y después aislarse. Un gen que codifica un receptor de citoquinina también puede obtenerse de plantas diferentes a las plantas descritas anteriormente. En primer lugar, se prepara ARNm a partir de la planta deseada, y se sintetiza ADNc usando el ARNm como molde y una transcriptasa inversa. El ADNc se incorpora en un vector fágico tal como ZAPII o un vector plasmídico tal como pUC para producir una biblioteca de ADNc. Después, se realiza PCR usando la biblioteca de ADNc como molde y cebadores que se diseñan y sintetizan en base a las secuencias de nucleótidos bien conservadas entre los genes cuyas secuencias de nucleótidos se conocen como se ha descrito anteriormente, y de ese modo puede amplificarse un fragmento de ADN que contiene al menos una parte de un gen que codifica un receptor de citoquinina. Después, la biblioteca de ADNc se explora usando el fragmento de ADN como sonda para seleccionar un clon positivo. El ADN del clon seleccionado se secuencía, y puede confirmarse que el gen codifica el receptor de citoquinina deseado.

Los tres tipos de receptores de citoquinina (CRE1, AHK2, AHK3) de *Arabidopsis thaliana* son histidina quinasa a las cuales se une el dominio receptor en la misma molécula. La homología de secuencia de aminoácidos es elevada entre estos tres receptores de citoquinina, y particularmente, existe una alta homología de secuencia de aminoácidos entre sus dominios extracelulares que se cree que se unen a citoquinina. Además, en el caso de levadura recombinante como se ha descrito anteriormente en este documento, los tres tipos de receptores de citoquinina inician la señalización intracelular en respuesta a citoquinina, y podría confirmarse que tienen la actividad de un receptor de citoquinina. Los receptores de citoquinina de las otras plantas también son histidina quinasa, y sus secuencias de aminoácidos tienen alta homología con las secuencias de aminoácidos de los receptores de citoquinina de *Arabidopsis thaliana*.

La Tabla 1 muestra la identidad de secuencia de aminoácidos de otros receptores de citoquinina con el receptor de citoquinina CRE1 de *Arabidopsis thaliana*.

- 5 Un ejemplo preferible del "receptor de citoquinina derivado de plantas de una célula" incluye una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia del 45% o más, preferiblemente del 49% o más, más preferiblemente del 53% o más con la secuencia de aminoácidos del receptor de citoquinina CRE1 de *Arabidopsis thaliana* y tiene una actividad de funcionamiento como receptor de citoquinina.

Tabla 1

	Identidad de secuencia de aminoácidos (%) con CRE1
A. thaliana AHK2	53%
A. thaliana AHK3	54%
<i>Catharanthus roseus</i>	52%
<i>Oryza sativa</i>	49%
<i>Zea mays</i> ZmHK1	57%
<i>Zea mays</i> ZmHK2	51%
<i>Zea mays</i> ZmHK3a	52%
<i>Zea mays</i> ZmHK3b	49%

- 10 La "señalización intracelular de un receptor de citoquinina derivado de plantas de una célula" es la transducción de señales descrita anteriormente que se obtiene por transferencia del grupo fosfato que empieza a partir de autofosforilación de un receptor de citoquinina que se une a citoquinina. En una célula vegetal, se transmite una señal de respuesta a citoquinina por autofosforilación de un receptor de citoquinina inducido por la unión de citoquinina, la transferencia de un grupo fosfato desde el receptor de citoquinina autofosforilado a un mediador de transferencia de grupo fosfato, y después transferencia del grupo fosfato desde el mediador de transferencia de grupo fosfato a un regulador de respuesta. Así mismo, en una célula recombinante que tiene un receptor de citoquinina derivado de plantas, la señalización intracelular desde el receptor de citoquinina se obtiene por transferencia de un grupo fosfato. Sin embargo, en este caso, un mediador de transferencia de grupo fosfato y un regulador de respuesta pueden obtenerse de una célula hospedadora. Todos ellos pueden obtenerse de una célula hospedadora o algunos de ellos pueden obtenerse de una célula hospedadora. Además, puede no existir un mediador de transferencia de grupo fosfato. Por ejemplo, en una levadura en crecimiento recombinante que tiene un receptor de citoquinina derivado de plantas, la señalización intracelular desde el receptor de citoquinina se obtiene por transferencia de un grupo fosfato desde el receptor de citoquinina autofosforilado por la unión de citoquinina al regulador de respuesta Ssk1, que es un regulador de respuesta derivado de la célula de levadura en crecimiento hospedadora, mediante el mediador de transferencia de grupo fosfato Ypd1, que es un mediador de transferencia de grupo fosfato derivado de la célula de levadura en crecimiento hospedadora. En una levadura de fisión recombinante que tiene un receptor de citoquinina derivado de plantas, la señalización intracelular a partir del receptor de citoquinina se obtiene por transferencia de un grupo fosfato al regulador de respuesta Msc4 derivado de la levadura de fisión hospedadora, mediante el mediador de transferencia de grupo fosfato Spy1 derivado de la levadura de fisión hospedadora. En una *Escherichia coli* recombinante que tiene un receptor de citoquinina derivado de plantas, la señalización intracelular a partir del receptor de citoquinina se obtiene por transferencia de un grupo fosfato al regulador de respuesta RcsB derivado de la *Escherichia coli* hospedadora mediante el mediador de transferencia de grupo fosfato YcjN derivado de la *Escherichia coli* hospedadora.
- 35 Un ejemplo de un método para determinar la presencia o ausencia o la cantidad de dicha señalización intracelular desde un receptor de citoquinina derivado de plantas incluye un método que comprende determinar la presencia o ausencia o la cantidad de expresión de un gen diana cuya transcripción está controlada por un regulador de respuesta localizado cadena abajo de la señalización intracelular desde el receptor de citoquinina derivado de plantas. Este método incluye un método que comprende determinar directamente la presencia o ausencia o la cantidad de expresión del gen diana, así como un método que comprende transformar una célula hospedadora con un plásmido informador en que un gen informador tal como un gen de una proteína fluorescente o un gen de β -galactosidasa está unido a una región promotora de ese gen diana, y después determinar la presencia o ausencia o la cantidad de expresión del gen informador usando fluorescencia o color desarrollado como indicador, y un método que comprende medir u observar un aumento o disminución de la cantidad de células relacionadas con la expresión del gen diana, un cambio en los caracteres de la célula, o similares. Por ejemplo, en el caso de la levadura en crecimiento recombinante descrita anteriormente, el crecimiento de la levadura en crecimiento recombinante dependiente de citoquinina puede usarse como indicador para determinar la presencia o ausencia o la cantidad de señalización intracelular desde el receptor de citoquinina derivado de plantas. En el caso de la levadura de fisión recombinante, el tamaño de la levadura de fisión recombinante dependiente de citoquinina puede usarse como indicador para determinar la presencia o ausencia o la cantidad de señalización intracelular desde el receptor de citoquinina derivado de plantas. En el caso de la *Escherichia coli* recombinante, el color desarrollado debido a la

expresión de un gen de β -galactosidasa que está unido a una región promotora del gen diana cps puede usarse como indicador para determinar la presencia o ausencia o la cantidad de señalización intracelular desde el receptor de citoquinina derivado de plantas. En el caso de *Arabidopsis thaliana* transformada con un plásmido informador en que un gen informador está unido a una región promotora del regulador de respuesta tipo-A ARR5 o ARR6, puede usarse fluorescencia o color desarrollado dependiente de citoquinina como indicador para determinar la presencia o ausencia o la cantidad de señalización intracelular desde un receptor de citoquinina. Los métodos descritos anteriormente se describen en, por ejemplo, Higuchi et al., *Nature* 409, 1060-1063 (2001); Suzuki et al., *Plant Cell Physiol.* 42, 107-113 (2001); Hwang y Sheen, *Nature* 413, 383-389 (2001), y similares.

Entre diversos métodos para determinar la señalización intracelular desde un receptor de citoquinina derivado de plantas de una célula como se ha descrito anteriormente, un ejemplo preferible como método mecánico, cuantitativo y eficaz es un método que comprende determinar el crecimiento de la levadura en crecimiento recombinante dependiente de citoquinina midiendo la turbidez de un medio líquido con un espectrofotómetro. Un ejemplo específico del mismo incluye el método descrito en el documento JP-A 2003-079393.

La "actividad de inhibición de la señalización intracelular desde un receptor de citoquinina derivado de plantas de una célula" significa la capacidad de reducir la señalización intracelular desde un receptor de citoquinina derivado de plantas de una célula. En otras palabras, esto significa la capacidad de reducir la cantidad de transferencia de grupo fosfato que se inicia por autofosforilación de un receptor de citoquinina y en que un grupo fosfato se transfiere desde el receptor de citoquinina hasta un regulador de respuesta. Ejemplos específicos de la actividad de inhibición de la señalización intracelular desde un receptor de citoquinina derivado de plantas de una célula incluyen la capacidad de inhibir la actividad histidina quinasa de un receptor de citoquinina, la capacidad de inhibir la transferencia de grupo fosfato desde un receptor de citoquinina a un mediador de transferencia de grupo fosfato, la capacidad de inhibir la transferencia de grupo fosfato desde el mediador de transferencia de grupo fosfato hasta un regulador de respuesta, y la capacidad de inhibir el control de la transcripción del regulador de respuesta. Más específicamente, un ejemplo de la capacidad de inhibir la actividad histidina quinasa de un receptor de citoquinina incluye la capacidad de inhibir la señalización intracelular desde un receptor de citoquinina mediante un mecanismo en que se determina la presencia o ausencia de inhibición de la señalización intracelular desde el receptor de citoquinina dependiendo de la presencia o ausencia de inhibición de la unión entre una sustancia que tiene una actividad agonista de citoquinina y el receptor de citoquinina, resultante en la inhibición de la actividad histidina quinasa del receptor de citoquinina. En este caso, como un ejemplo de un método para determinar si una sustancia de ensayo realmente inhibe la unión entre una sustancia que tiene una actividad agonista de citoquinina y un receptor de citoquinina incluye un método que comprende el uso de una sustancia radiomarcada que tiene una actividad agonista de citoquinina y un receptor de citoquinina. Por ejemplo, una sustancia que tiene una actividad agonista de citoquinina que está marcada con un radioisótopo de hidrógeno, tritio para llegar a ser altamente radiactiva, y una proteína de receptor de citoquinina preparada a partir de una levadura recombinante en que hay un gen de receptor de citoquinina introducido se dejan coexistir en un tampón adecuado, y después la proteína de receptor de citoquinina se recoge en un filtro de vidrio para medir la radiactividad. Por tanto puede detectarse la sustancia que tiene una actividad agonista de citoquinina que está marcada con tritio para llegar a ser altamente radiactiva y que se une al receptor de citoquinina. Cuando se permite que una sustancia de ensayo coexista con la sustancia radiomarcada que tiene una actividad agonista de citoquinina y la proteína de receptor de citoquinina en un tampón, puede determinarse si la sustancia de ensayo inhibe la unión entre la sustancia que tiene una actividad agonista de citoquinina y el receptor de citoquinina usando una disminución en el valor de medición de radiactividad como indicador. Entonces, cuando la sustancia de ensayo se añade al sistema de reacción descrito anteriormente para determinar la presencia o ausencia o la cantidad de señalización intracelular desde un receptor de citoquinina derivado de plantas, puede investigarse la influencia de la sustancia de ensayo sobre la señalización intracelular desde el receptor de citoquinina derivado de plantas.

El "agente que tiene una actividad de inhibición de la señalización intracelular desde un receptor de citoquinina derivado de plantas de una célula" significa un agente que comprende, como ingrediente activo, una sustancia que tiene una actividad de inhibición de la señalización intracelular desde un receptor de citoquinina derivado de plantas de una célula.

Como se describe en este documento, el "agente capaz de controlar el crecimiento o diferenciación de una planta que tiene una actividad de inhibición de la señalización intracelular desde un receptor de citoquinina derivado de plantas de una célula" significa un agente cuya capacidad de inhibir la señalización intracelular desde un receptor de citoquinina derivado de plantas de una célula se determina mediante el método descrito anteriormente y que puede controlar el crecimiento o diferenciación de una planta. El agente es deseablemente un agente en que el agente capaz de controlar el crecimiento o diferenciación de una planta es un regulador del crecimiento vegetal.

Como se describe en este documento, el "regulador del crecimiento vegetal" es un agente capaz de controlar el crecimiento o diferenciación de una planta.

Un ejemplo de un método para determinar la capacidad de controlar el crecimiento o diferenciación de una planta incluye un método para determinar una actividad promotora del crecimiento de raíces en una planta así como los métodos descritos en la presente invención. Específicamente, la capacidad de controlar el crecimiento o diferenciación de una planta puede determinarse, por ejemplo, de acuerdo con el siguiente método.

- De acuerdo con la composición descrita a continuación, se prepara un medio convencional Enshi (véase la Tabla 2). Se distribuye una solución de una sustancia química en DMSO en cada 4 μl a tubos de agrupación de modo que la concentración final pueda ser de 0,001 ppm a 10 ppm. Después, se añaden 600 μl del medio convencional Enshi esterilizado a cada tubo de agrupación, seguido de mezcla. En cada tubo, se ponen de 10 a 20 semillas de *Arabidopsis thaliana* y se cultivan a 22°C durante 10 días en un lugar iluminado. Después se mide la longitud promedio de las raíces principales. Se determina un promedio de ocho repeticiones y después se determina una tasa de crecimiento de raíces mediante la siguiente ecuación.

Tabla 2

Composición		Concentración (mg/l)
Nitrato de calcio	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	950
Nitrato de potasio	KNO_3	810
Sulfato de magnesio	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	500
Fosfato de amonio	$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	155
Quelato de hierro	Fe-EDTA	22,62
Ácido bórico	H_3BO_3	2,86
Sulfato de manganeso	$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1,81
Sulfato de zinc	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,22
Sulfato de cobre	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,08
Molibdato de sodio	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,025
Ajustado a pH 5,8		

- 10 **Tasas de crecimiento de raíces (%) = (Longitud promedio de la raíz principal en sección tratada con sustancia química) / (Longitud promedio de la raíz principal en sección de control) x 100**

- 15 Puede decirse que una sustancia de ensayo que muestra una tasa de crecimiento de raíces significativamente elevada tiene una actividad promotora del crecimiento de raíces. Más preferiblemente, puede juzgarse que una sustancia de ensayo que tiene una tasa de crecimiento de raíces del 120% o más tiene una actividad promotora del crecimiento de raíces.

- 20 El regulador del crecimiento vegetal descrito en este documento comprende una sustancia química capaz de inhibir la señalización intracelular desde un receptor de citoquinina derivado de plantas de una célula, o una sal agrícolamente aceptable de la misma como ingrediente activo.

- 25 En la presente invención, la "sal agrícolamente aceptable" significa una sal en la forma que no hace imposible producir un regulador del crecimiento vegetal y aplicar el producto, y puede ser una sal en cualquier forma. Ejemplos específicos de la sal incluyen sales de ácidos minerales tales como clorhidrato, bromhidrato, yodhidrato, sulfato, nitrato y fosfato; sales de ácidos orgánicos tales como formiato, acetato, propionato, oxalato, malonato, succinato, fumarato, maleato, lactato, malato, tartrato, citrato, metanosulfonato y etanosulfonato; sales de adición de ácidos, por ejemplo, sales de aminoácidos ácidos tales como aspartato y glutamato; sales metálicas tales como sales de metales alcalinos (sal de sodio, sal de potasio, etc.), sales de metales alcalino-térreos (sal de magnesio, etc.), y sales de aluminio; sales de adición de bases orgánicas tales como metilamina, etilamina y etanolamina y de aminoácidos básicos tales como lisina y ornitina; y sales de amonio.

- 30 El regulador del crecimiento sencillo se usa habitualmente en forma de una formulación tal como un concentrado emulsionable, un polvo humectable, una suspensión o un polvo soluble en agua que se puede obtener mezclando con un vehículo sólido, un vehículo líquido o similares y, si fuera necesario, añadiendo (a) uno o más tensioactivos y otros auxiliares de formulación al mismo. La formulación contiene habitualmente del 0,5 al 90% en peso, preferiblemente del 1 al 80% en peso de una sustancia capaz de inhibir la señalización de citoquinina.

- 35 Ejemplos del vehículo sólido usado para la formulación incluyen polvos finos y gránulos de arcillas (caolinita, tierra de diatomeas, óxido de silicio hidratado sintético, arcilla Fubasami, bentonita, arcilla ácida, etc.), talco, otros minerales inorgánicos (sericita, polvo de cuarzo, polvo de azufre, carbono activado, carbonato de calcio, etc.) y fertilizantes químicos (sulfato de amonio, fosfato de amonio, nitrato de amonio, cloruro de amonio, urea, etc.). Ejemplos del vehículo líquido incluyen agua, alcoholes (metanol, etanol, etc.), cetonas (acetona, metil etil cetona, ciclohexanona, etc.), hidrocarburos aromáticos (tolueno, xileno, etilbenceno, metilnaftaleno, etc.), hidrocarburos no aromáticos (hexano, ciclohexano, queroseno, etc.), ésteres (acetato de etilo, acetato de butilo, etc.), nitrilos (acetónitrilo, isobutironitrilo, etc.), éteres (dioxano, diisopropil éter, etc.), amidas ácidas (dimetilformamida, dimetilacetamida, etc.) e hidrocarburos halogenados (dicloroetano, tricloroetileno, etc.).

Ejemplos del tensioactivo incluyen sulfatos de alquilo, sulfonatos de alquilo, sulfonatos de alquil arilo, alquil aril éteres y sus compuestos polioxi-etileno, éteres de polietilenglicol, ésteres de alcohol polihídrico, y derivados alcohólicos de azúcar.

- 5 Ejemplos de otros auxiliares de formulación incluyen agentes adherentes y agentes de dispersión tales como caseína, gelatina, polisacáridos, almidón, goma arábica, derivados de celulosa, ácido alginico, etc.), derivados de lignina, bentonita, polímeros solubles en agua sintéticos (alcohol polivinílicos, polivinil pirrolidona, ácido poliacrílico, etc.), y agentes estabilizantes tales como PAP (isopropil fosfato ácido), BHT (2,6-terc-butil-4-metilfenol), BHA (2-/3-terc-butil-4-metoxifenol), aceites vegetales, aceites minerales, ácidos grasos y ésteres de ácidos grasos.

10 Como se describe en este documento, el "regulador del crecimiento vegetal que comprende una sustancia química capaz de inhibir la señalización intracelular desde un receptor de citoquinina derivado de plantas de una célula, o una sal agrícolamente aceptable de la misma, como ingrediente activo" es un agente que puede controlar el crecimiento o diferenciación de una planta conteniendo, como ingrediente activo, una sustancia química cuya capacidad de inhibir la señalización intracelular desde un receptor de citoquinina derivado de plantas de una célula se determina por el método descrito anteriormente o una sal agrícolamente aceptable de la sustancia química. La sustancia química es deseablemente una sustancia química que tiene la capacidad de inhibir la señalización intracelular desde un receptor de citoquinina en un sistema de contacto de la levadura en crecimiento recombinante descrita anteriormente que comprende un receptor de citoquinina y una sustancia que tiene una actividad agonista para el receptor de citoquinina. De forma más deseable, un ejemplo de la sustancia química incluye una sustancia química que tiene la capacidad de inhibir la actividad de un receptor de citoquinina en un sistema de contacto de la levadura en crecimiento recombinante descrita anteriormente que comprende un receptor de citoquinina y una sustancia que tiene una actividad agonista para el receptor de citoquinina, de modo que la actividad del receptor de citoquinina puede reducirse en presencia de 0,6 ppm de trans-zeatina y 2 ppm o más de la sustancia química en comparación con el caso en ausencia de la sustancia química. Aún más deseablemente, un ejemplo de la sustancia química incluye una sustancia química que tiene la capacidad de inhibir la actividad de un receptor de citoquinina en un sistema de contacto de la levadura en crecimiento recombinante descrita anteriormente que comprende un receptor de citoquinina y una sustancia que tiene una actividad agonista para el receptor de citoquinina, de modo que la actividad del receptor de citoquinina puede reducirse en un 90% o más en presencia de 0,6 ppm de trans-zeatina y 2 ppm o más de la sustancia química en comparación con el caso en ausencia de la sustancia química.

Como se describe en este documento, un "método para ensayar la capacidad de una sustancia de ensayo de promover el crecimiento de una raíz de una planta, que comprende:

- 35 (1) una primera etapa para medir una actividad de inhibición de la señalización intracelular desde un receptor de citoquinina seleccionado entre el siguiente grupo A (o la presencia o ausencia o la cantidad de la señalización intracelular) en un sistema de contacto que comprende una célula que tiene el receptor de citoquinina, una sustancia que tiene una actividad agonista para el receptor de citoquinina y la sustancia de ensayo; y
 40 (2) una segunda etapa para evaluar la capacidad de la sustancia de ensayo de promover el crecimiento de una raíz de una planta en base a una diferencia obtenida mediante comparación de la actividad medida en la primera etapa con la actividad en el control" es un método que comprende la primera etapa y la segunda etapa entre diversos métodos para ensayar la capacidad de promover el crecimiento de una raíz de una planta de una sustancia de ensayo.

45 El "Grupo A" representa lo siguiente:

- (a) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 1,
 (b) una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°1 en que uno o más aminoácidos están delecionados, añadidos o sustituidos, y que tiene una actividad de funcionamiento como un receptor de citoquinina,
 50 (c) una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia del 45% o más con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 1, y que tiene una actividad de funcionamiento como un receptor de citoquinina
 (d) una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de nucleótidos de la SEC ID N°2
 55 (e) una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos codificada por un polinucleótido que hibrida en condiciones rigurosas con un polinucleótido complementario a un polinucleótido que tiene la secuencia de nucleótidos de la SEC ID N° 2, y que tiene una actividad de funcionamiento como un receptor de citoquinina.

60 La primera etapa es una etapa de medir una actividad de inhibición de la señalización intracelular desde el receptor de citoquinina (o la presencia o ausencia o la cantidad de la señalización intracelular) en un sistema de contacto que comprende una célula que tiene los diversos receptores de citoquinina descritos anteriormente, una sustancia que tiene una actividad agonista para el receptor de citoquinina y la sustancia de ensayo. La segunda etapa es una etapa de evaluar la capacidad de la sustancia de ensayo de promover el crecimiento de una raíz de una planta en base a una diferencia obtenida por comparación de la actividad medida en la primera etapa con la actividad en el control. Como se usa en este documento, por ejemplo en el caso donde se añade una solución de una sustancia de

65

ensayo en un disolvente a un sistema de reacción, el control significa un ensayo en que se añade solamente el disolvente.

El receptor de citoquinina derivado de plantas de una célula usado en el método para ensayar la capacidad de una sustancia de ensayo de promover el crecimiento de una raíz de una planta que comprende la primera etapa y la segunda etapa es una proteína mostrada en el grupo A descrito anteriormente. Entre las proteínas del grupo A descrito anteriormente, en las secuencias de aminoácidos de proteínas mostradas en (b), (c), (d) y (e), las diferencias de la secuencia de aminoácidos de (a) que pueden encontrarse ocasionalmente se deben a delección, sustitución, adición, y similares de algunos aminoácidos. Las diferencias incluyen delección causada por procesamiento que una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos de (a) experimenta en células. Además, las diferencias incluyen delección, sustitución, adición, y similares de aminoácidos causadas por mutación genética de origen natural debida a diferencia de especie, diferencia individual o similares de organismos de los cuales se obtiene la proteína, o mutación genética introducida artificialmente por mutagénesis dirigida al sitio, mutagénesis aleatoria, tratamiento de mutagénesis o similares.

La cantidad de dicha delección, sustitución, adición o similares de aminoácido puede estar dentro del intervalo en que puede encontrarse la actividad histidina quinasa de un receptor de citoquinina. Ejemplos de la sustitución de aminoácido incluyen sustituciones con aminoácidos que tienen características análogas tales como hidrofobicidad, carga, pK y estructura espacial. Ejemplos específicos de dicha sustitución incluyen sustituciones dentro de los grupos de (1) glicina, alanina; (2) valina, isoleucina, leucina; (3) ácido aspártico, ácido glutámico, asparagina, glutamina; (4) serina, treonina; (5) lisina, arginina; (6) fenilalanina, tirosina; y similares.

Un ejemplo de un método para realizar de forma artificial dicha delección, adición o sustitución de aminoácido (a partir de ahora en este documento, ocasionalmente mencionada como alternancia de aminoácido, en general) incluye un método que comprende someter el ADN que codifica la secuencia de aminoácidos de (a) a mutagénesis específica de sitio y después expresar el ADN por una técnica convencional. Ejemplos del método de mutagénesis específica de sitio incluyen un método que comprende usar mutación ámbar (método de dúplex con huecos, *Nucleic Acids Res.*, 12, 9441-9456 (1984)), y un método que comprende PCR usando cebadores para introducir mutación. Un ejemplo de un método para realizar de forma artificial alternancia de aminoácido incluye un método que comprende someter el ADN que codifica la secuencia de aminoácidos de (a) a mutagénesis aleatoria y después expresar el ADN por un método convencional. Un ejemplo de un método para mutagénesis aleatoria incluye un método que comprende PCR usando ADN que codifica una cualquiera de las secuencias de aminoácidos descritas anteriormente como molde y usando un par de cebadores por el cual puede amplificarse la longitud completa del ADN, en unas condiciones de reacción que la concentración de adición de cada uno de dATP, dTTP, dGTP y dCTP usados como sustratos se cambia de las condiciones usuales o en unas condiciones de reacción que la concentración de Mg^{2+} para promover la reacción de la polimerasa se aumenta de las condiciones generales. Ejemplos de dicha técnica de PCR incluyen un método descrito en *Method in Molecular Biology*, (31), 1994, 97-112, así como un método descrito en el documento WO0009682.

Como se usa en este documento, la "identidad de secuencia" significa la identidad entre dos secuencias de nucleótidos o dos secuencias de aminoácidos. La "identidad de secuencia" se determina comparando dos secuencias alineadas de forma óptima sobre todas las regiones. La alineación óptima de las secuencias de nucleótidos o las secuencias de aminoácidos puede contener adiciones o delecciones (por ejemplo, hueco). Dicha identidad de secuencia puede calcularse realizando análisis de homología usando programas tales como FASTA [Pearson y Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 4, 2444-2448 (1988)], BLAST [Altschul et al., *Journal of Molecular Biology*, 215, 403-410 (1990)], y CLUSTAL W [Thompson, Higgins y Gibson, *Nucleic Acid Research*, 22, 4673-4680 (1994a)] para construir alineaciones. Los programas descritos anteriormente están generalmente disponibles en la página web (<http://www.dd-bj.nig.ac.jp>) del DNA Data Bank de Japón [banco de datos internacional de ADN dirigido por el Center for Information Biology and DNA Data Bank de Japón; CIB/DDBJ of National Institute of Genetics] o similares. La identidad de secuencia también puede obtenerse usando software de análisis de secuencia disponible en el mercado. Específicamente, por ejemplo, se realiza análisis de homología por el método de Lipman-Pearson [Lipman, D. J. y Pearson, K.R., *Science*, 227, 1435-1441, (1985)] y usando GENETYX-WIN Ver.5 (fabricado por Software Development Co., Ltd.) para construir alineaciones, y de este modo, puede calcularse la identidad de secuencia.

Las "condiciones rigurosas" descritas en (e) incluyen dicha condiciones en que la hibridación se realiza a 45°C en una solución que contiene SSC 6 x (SSC 10 x contiene NaCl 1,5 M y citrato trisódico 0,15 M) seguido de lavado con SSC 2 x a 50°C (*molecular Biology*, John Wiley y Sons, N. Y. (1989), 6.3.1-6.3.6), en hibridación realizada de acuerdo con un método convencional, por ejemplo, como se describe en *Molecular Cloning* 2ª edición escrito por Sambrook J., Frisch E. F., Maniatis T. expedido por Cold Spring Harbor Laboratory Press. La concentración salina en la etapa de lavado puede seleccionarse entre, por ejemplo, el intervalo de SSC 2 x (condiciones de baja rigurosidad) a SSC 0,2 x (condiciones de alta rigurosidad). La temperatura en la etapa de lavado puede seleccionarse entre, por ejemplo, el intervalo de temperatura ambiente (condiciones de baja rigurosidad) a 65°C (condiciones de alta rigurosidad). Tanto la concentración salina como la temperatura pueden cambiarse.

Cada una de estas proteínas es una proteína que tiene una actividad que funciona como un receptor de citoquinina. De forma deseable, se usa la siguiente proteína: una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos donde los restos de aminoácido correspondientes a las posiciones (I) 459 y (II) 973 de la SEC ID N° 1 son respectivamente (I) histidina en la posición 459 y (II) ácido aspártico en la posición 973, cuando la secuencia de aminoácidos de la proteína está alineada con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 1 de modo que pueda obtenerse la máxima identidad de secuencia. Como se usa en este documento, "la secuencia de aminoácidos de la proteína está alineada con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 1 de modo que pueda obtenerse la máxima identidad de secuencia" significa que el análisis de identidad de secuencia de plurales secuencias de aminoácidos de interés incluyendo la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 1 se realiza usando el programa descrito anteriormente tal como FASTA, BLAST, o CLUSTAL W para alinear las secuencias de aminoácidos. Como resultado de la alineación de plurales secuencias por dicho método, es posible determinar las posiciones de restos homólogos de aminoácido en cada una de las secuencias de aminoácidos a pesar de la inserción o delección existente en las secuencias de aminoácidos. Las posiciones homólogas se consideran la misma posición en estructura tridimensional, y pueden estimarse para tener efectos análogos para la función específica de la proteína de interés. Por ejemplo, en el caso de receptores de citoquinina conocidos incluyendo el receptor de citoquinina cuya secuencia se describe en la presente invención, los restos de aminoácido correspondientes a las posiciones (I) 459 y (II) 973 de la SEC ID N° 1 son respectivamente (I) histidina en la posición 459 y (II) ácido aspártico en la posición 973, cuando la secuencia de aminoácidos del receptor de citoquinina está alineada con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 1 de modo que se pueda obtener la máxima identidad de secuencia.

El ingrediente activo del agente capaz de controlar el crecimiento o diferenciación de una planta puede buscarse, por ejemplo, determinando la capacidad de promover el crecimiento de una raíz de la planta.

El método para ensayar la capacidad de promover el crecimiento de una raíz de una planta que comprende usarse un receptor de citoquinina derivado de plantas de una célula como se ha descrito anteriormente también puede usarse para buscar una sustancia que tenga la capacidad de controlar el crecimiento o diferenciación de una planta. Específicamente, cuando la capacidad de una sustancia de ensayo de promover el crecimiento de una raíz de una planta se determina en un cierto valor o más o un cierto valor o menos usando el método para ensayar la capacidad de promover el crecimiento de una raíz de una planta que comprende usarse un receptor de citoquinina derivado de plantas de una célula, se selecciona la sustancia. Por tanto, puede buscarse una sustancia que tenga la capacidad de promover el crecimiento de una raíz de una planta.

Como una sustancia seleccionada por el método de búsqueda tiene la capacidad de controlar el crecimiento o diferenciación de una planta, una composición que contiene la sustancia o una sal agrícolamente aceptable de la misma como ingrediente activo puede ser un regulador del crecimiento vegetal.

Ejemplos específicos de la sustancia capaz de inhibir la señalización de citoquinina incluyen antagonistas de citoquinina, y agonistas de citoquinina.

La sustancia inhibidora de la señalización de citoquinina seleccionada por el método de búsqueda descrito anteriormente puede promover el crecimiento de una raíz de una planta. El crecimiento de una raíz incluye la elongación de la raíz principal, la elongación de una raíz lateral, y la elongación de un pelo radicular.

La actividad promotora del crecimiento de raíces de la sustancia inhibidora de la señalización de citoquinina seleccionada por el método de búsqueda descrito anteriormente puede ensayarse usando, por ejemplo, el siguiente método. Por ejemplo, se preparan soluciones acuosas, medios de cultivo hidropónico o medios de cultivo tisular que contienen la sustancia inhibidora de la señalización de citoquinina a diferente concentración dentro del intervalo de 0,0001 a 100 ppm dependiendo del tipo de planta y método de ensayo. En el caso de un ensayo en placa petri, se impregna un papel de filtro extendido sobre una placa petri con la solución, y se ponen semillas de la planta sobre el mismo. En el caso de un ensayo de bolsa, se impregna un papel grueso con la solución, donde el papel grueso se coloca en una bolsa que permite la observación del crecimiento de raíces tal como una bolsa para el crecimiento de semillas, y se siembra semillas de la planta sobre el mismo. Se prepara un medio sólido añadiendo agarosa, agar o similares a la solución en una placa petri de plástico o un tubo de centrifuga de plástico, y se siembran semillas de la planta en la misma. Después de incubación durante un cierto periodo a 10 a 30°C en luz, se miden las longitudes de la raíz principal y las raíces laterales, la cantidad de raíces laterales, el peso en húmedo de la raíz, el peso seco de la raíz, y similares.

La sustancia inhibidora de la señalización de citoquinina seleccionada por el método de búsqueda descrito anteriormente puede usarse como regulador del crecimiento vegetal.

En los grupos representados por R, X, R¹, R², R³, R⁴, R⁵, R⁶ y R⁷ en el compuesto representado por la fórmula general (I) usada en la presente invención (en lo sucesivo en el presente documento, denominada, a menudo, como el compuesto (I)), los ejemplos del "grupo hidrocarburo" incluyen un grupo hidrocarburo alifático, un grupo hidrocarburo monocíclico saturado y un grupo hidrocarburo aromático, y se hace referencia a un grupo hidrocarburo que tiene de 1 a 16 átomos de carbono. Los ejemplos específicos de los mismos incluyen un grupo alquilo, un grupo alquenilo, un grupo alquinilo, un grupo cicloalquilo, un grupo aralquilo y un grupo arilo.

El "grupo alquilo" es preferiblemente, por ejemplo, un grupo alquilo inferior. Los ejemplos específicos del grupo alquilo incluyen grupos alquilo C3-6 tales como metilo, metilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, sec-butilo y terc-butilo, pentilo y hexilo. El "grupo alquenilo" es preferiblemente, por ejemplo, un grupo alquenilo inferior. Los ejemplos específicos del grupo alquenilo incluyen grupos alquenilo C2-6 tales como vinilo, 1-propenilo, alilo, isopropenilo, butenilo e isobutenilo.

El "grupo alquinilo" es preferiblemente, por ejemplo, un grupo alquinilo inferior. Los ejemplos específicos del grupo alquenilo incluyen grupos alquinilo C2-6 tales como etinilo, propargilo y 1-propinilo.

El "grupo cicloalquilo" es preferiblemente, por ejemplo, un grupo cicloalquilo inferior. Los ejemplos específicos del grupo cicloalquilo incluyen grupos cicloalquilo C3-6 tales como ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo y ciclohexilo. El "grupo aralquilo" es preferiblemente, por ejemplo, un grupo aralquilo C7-11 tal como bencilo o fenetilo. Específicamente, por ejemplo, se usa un grupo bencilo.

El "grupo arilo" es preferiblemente, por ejemplo, un grupo acrilo C6-14 tal como fenilo, 1-naftilo, 2-naftilo, bifenililo o 2-antrilo. Específicamente, por ejemplo, se usa un grupo fenilo.

Los ejemplos de un sustituyente para el "grupo hidrocarburo" y el "grupo alquilo C1-6" del "grupo hidrocarburo opcionalmente sustituido" y el "grupo alquilo C1-6 opcionalmente sustituido" incluyen un átomo de halógeno (por ejemplo, flúor, cloro, bromo, yodo, etc.), un grupo nitro, un grupo ciano, un grupo hidroxilo, un grupo alquilo inferior (por ejemplo, un grupo alquilo C1-6 tal como metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, sec-butilo, terc-butilo, pentilo, isopentilo, neopentilo, o hexilo, etc.), un grupo alcoxi inferior (por ejemplo, un grupo alcoxi C1-6 tal como metoxi, etoxi, propoxi, isopropoxi, butoxi, isobutoxi, pentiloxi o hexiloxi, etc.), un grupo amino, un grupo mono-alquilamino inferior (por ejemplo, un grupo mono-alquilamino C1-6 tal como metilamino o etilamino, etc.), un grupo di-alquilamino inferior (por ejemplo, un grupo di-alquilamino C1-6 tal como dimetilamino o dietilamino, etc.), un grupo imino, un grupo carboxilo, un grupo alquilcarbonilo inferior (por ejemplo, un grupo alquilcarbonilo C1-6 tal como acetilo o propionilo, etc.), un grupo alcoxycarbonilo inferior (por ejemplo, un grupo alcoxycarbonilo C1-6 tal como metoxycarbonilo, etoxycarbonilo, propoxycarbonilo o butoxycarbonilo, etc.), un grupo carbamoilo, un grupo tiocarbamoilo, un grupo mono-alquilcarbamoilo inferior (por ejemplo, un grupo mono-alquilcarbamoilo C1-6 tal como metilcarbamoilo o etilcarbamoilo, etc.), un grupo di-alquilcarbamoilo inferior (por ejemplo, un grupo di-alquilcarbamoilo C1-6 tal como dimetilcarbamoilo o dietilcarbamoilo, etc.), un grupo arilcarbamoilo (por ejemplo, un grupo arilcarbamoilo C6-10 tal como fenilcarbamoilo o naftilcarbamoilo, etc.), un grupo arilo (por ejemplo, un grupo acrilo C6-10 tal como fenilo o naftilo, etc.), un grupo ariloxi (por ejemplo, un grupo ariloxi C6-13 tal como feniloxi o naftiloxi, etc.), un grupo heterocíclico (por ejemplo, 2- o 3-tienilo, 2- o 3-tetrahidrotienilo, 2- o 3-furilo, 2- o 3-tetrahidrofurilo, 1-, 2- o 3-pirrolilo, 1-, 2- o 3-pirrolidinilo, 2-, 4- o 5-oxazolilo, 3-, 4- o 5-isoxazolilo, 2-, 4- o 5-tiazolilo, 3-, 4- o 5-isotiazolilo, 3-, 4- o 5-pirazolilo, 2-, 3- o 4-pirazolidinilo, 2-, 4- o 5-imidazolilo, 4- o 5-1H-1,2,3-triazolilo, 3- o 5-1,2,4-triazolilo, 5-1H- o 5-2H-tetrazolilo, 2-, 3- o 4-piridilo, 2-, 4- o 5-pirimidinilo, 1-, 2- o 3-tiomorfolinilo, 1-, 2- o 3-morfolinilo, 1-, 2-, 3- o 4-piperidino, 2-, 3- o 4-piperidilo, 2-, 3- o 4-tiopiranilo, 2-, 3- o 4-4H-1,4-oxadinilo, 2-, 3- o 4-4H-1,4-tiazinilo, 1,3-tiazinilo, 1- o 2-piperazinilo, 3-, 5- o 6-1,2,4-triazinilo, 2-1,3,5-triazinilo, 3- o 4-piridarínilo, 2-pirazinilo, etc.), un grupo alquilcarbonilamino inferior (por ejemplo, un grupo alquilcarbonilamino C1-6 tal como acetilamino, etc.), un grupo mercapto, un grupo alquiltio C1-6 (por ejemplo, un grupo alquiltio C1-6 tal como metiltio, etc.), un grupo alquilsulfínico (por ejemplo, un grupo alquilsulfínico C1-6 tal como metilsulfínico, etc.), un grupo alquilsulfonilo (por ejemplo, un grupo alquilsulfonilo C1-6 tal como metilsulfonilo, etc.), un grupo ariltio (por ejemplo, un grupo ariltio C6-10 tal como feniltio, etc.), un grupo arilsulfínico (por ejemplo, un grupo arilsulfínico C6-10 tal como fenilsulfínico, etc.), un grupo arilsulfonilo (por ejemplo, un grupo arilsulfonilo C6-10 tal como fenilsulfonilo, etc.), un grupo oxo y un grupo tioxo.

El grupo acilo (por ejemplo, formilo, acetilo, propionilo, pivaloilo, acrilóilo, benzoilo, etc.) es un tipo de un grupo hidrocarburo sustituido con un grupo oxo y se incluye en el "grupo hidrocarburo opcionalmente sustituido" y el "grupo alquilo C1-6 opcionalmente sustituido".

El "grupo hidrocarburo" y el "grupo alquilo C1-6" del "grupo hidrocarburo opcionalmente sustituido" y el grupo alquilo C1-6 opcionalmente sustituido pueden tener 1 o más, preferiblemente de 1 a 3 de los sustituyentes que se han descrito anteriormente en posiciones sustituibles. Cuando el sustituyente es un "átomo de halógeno, el grupo hidrocarburo y el grupo alquilo C1-6 pueden tener el número máximo sustituible de sustituyentes. Cuando tienen 2 o más sustituyentes, los sustituyentes son iguales o diferentes.

Cuando el sustituyente es un grupo alquilo inferior, un grupo alcoxi inferior, un grupo mono-alquilamino inferior, un grupo di-alquilamino inferior, un grupo alquilcarbonilo inferior, un grupo alcoxycarbonilo inferior, un grupo mono-alquilcarbamoilo inferior, un grupo di-alquilcarbamoilo inferior, un grupo arilcarbamoilo, un grupo arilo, un grupo ariloxi, un grupo heterocíclico, un grupo alquilcarbonilamino inferior, un grupo alquiltio, un grupo alquilsulfínico, un grupo alquilsulfonilo, un grupo ariltio, un grupo arilsulfínico, un grupo arilsulfonilo o similares, el sustituyente está opcionalmente sustituido con 1 a 3 sustituyentes seleccionados entre el grupo que consiste en un átomo de halógeno (por ejemplo, flúor, cloro, bromo, yodo, etc.), un grupo nitro, un grupo ciano, un grupo hidroxilo, un grupo alcoxi C1-4 (por ejemplo, metoxi, etoxi, propoxi, isopropiloxi, butoxi, isobutiloxi), un grupo arilo, un grupo oxo y similares. Cuando el sustituyente es un grupo arilcarbamoilo, un grupo arilo, un grupo ariloxi, un grupo heterocíclico,

un grupo ariltio C6-10, un grupo arilsulfino C6-10, un grupo arilsulfonilo C6-10 o similares, el sustituyente está opcionalmente sustituido con uno a tres grupos alquilo C1-4 (por ejemplo, metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, sec-butilo, terc-butilo, etc.).

- 5 Los ejemplos del "grupo alquilo C1-6" incluyen metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, sec-butilo y terc-butilo, pentilo y hexilo.

Los ejemplos del "grupo alquilo C1-3" (incluyendo el grupo alquilo C1-3 contenido en un grupo alquilamino C1-3 y un grupo di alquilamino C1-3) incluyen metilo, etilo, propilo e isopropilo.

10

Los ejemplos del "grupo alqueno C3-6" incluyen 1-propeno, alilo, isopropeno, buteno e isobuteno.

Los ejemplos del "grupo alquino C3-6" incluyen propargilo y 1-propino.

- 15 Los ejemplos del "grupo alcoxi C1-3" (incluyendo el grupo alquilo C1-3 contenido en un grupo hidroxialcoxi C1-3 y un grupo alcocarbonilo C1-3) incluyen metoxi, etoxi, propoxi e isopropoxi.

Los ejemplos del "grupo acilo C1-3" (incluyendo el grupo acilo C1-3 contenido en un grupo aciltio C1-3) incluyen formilo, acetilo y propionilo.

20

Los ejemplos del "grupo haloalquilo C1-3" incluyen clorometilo, trifluorometilo, 2-bromoetilo, 2,2,2-trifluoroetilo y 2,2,3,3,3-pentafluoropropilo.

- 25 Los ejemplos del "grupo amino cíclico" del "R¹ y R² se toman junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos para formar un grupo amino cíclico opcionalmente sustituido" incluyen 1-aziridinilo, pirrolidino, piperidino, morfolino y tiomorfolino. Los ejemplos de un sustituyente para el "grupo amino cíclico" incluyen de 1 a 3 de los sustituyentes que se han descrito anteriormente tal como un grupo alquilo C1-3, un grupo alcoxi C1-3 y un grupo hidroxilo.

- 30 Los ejemplos del "grupo arilo" en los grupos representados por Ar incluyen grupos arilo descritos como ejemplos del "grupo hidrocarburo" representado por R, X, R¹, R², R³, R⁴, R⁵, R⁶ y R⁷.

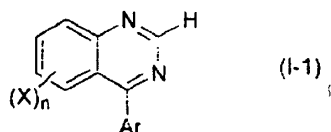
Los ejemplos del "grupo heteroarilo" en los grupos representados por Ar incluyen 2- o 3-tienilo, 2- o 3-furilo, 1-, 2- o 2-pirrolilo, 2-, 4- o 5-oxazolilo, 3-, 4- o 5-isoxazolilo, 2-, 4- o 5-tiazolilo, 3-, 4- o 5-isotiazolilo, 3-, 4- o 5-pirazolilo, 2-, 4- o 5-imidazolilo, 4- o 5-1H-1,2,3-triazolilo, 3- o 5-1,2,4-triazolilo, 5-1H- o 5-2H-tetrazolilo, 2-, 3- o 4-piridilo, 2-, 4- o 5-pirimidinilo, 1- o 2-piperazinilo, 3-, 5- o 6-1,2,4-triazinilo, 2-1,3,5-triazinilo, 3- o 4-piridazinilo y 2-pirazinilo.

35

Los ejemplos de un sustituyente para el "grupo arilo" y el "grupo heteroarilo" incluyen los grupos descritos como ejemplos de un sustituyente para el "grupo hidrocarburo opcionalmente sustituido" y el "grupo alquilo C1-6 opcionalmente sustituido" representado por R, X, R¹, R², R³, R⁴, R⁵, R⁶ y R⁷.

40

El compuesto de fórmula general (I) en la que l es 0 es el compuesto en el que la posición 2 de la estructura de quinazolina está sin sustituir, es decir, un compuesto de la fórmula general (I-1):



45

donde X representa un grupo hidrocarburo opcionalmente sustituido, un grupo representado por NR¹R², un grupo representado por OR³, un grupo representado por S(O)_mR⁴, un grupo nitro o un átomo de halógeno,

en la que R¹ representa un átomo de hidrógeno o un grupo hidrocarburo opcionalmente sustituido,

- 50 R² representa un átomo de hidrógeno, un grupo hidrocarburo opcionalmente sustituido, un grupo representado por NR⁵R⁶ en el que R⁵ y R⁶ son iguales o diferentes y representan un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo C1-6 opcionalmente sustituido) o un grupo representado por OR⁷ (en la que R⁷ representa un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo C1-6 opcionalmente sustituido), o R¹ y R² se toman junto con el átomo de nitrógeno al que están

unidos para formar un grupo amino cíclico opcionalmente sustituido, cada uno de R³ y R⁴ representa un grupo hidrocarburo opcionalmente sustituido,

55

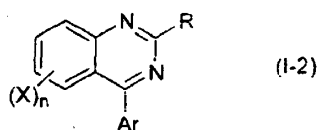
m representa un número entero de 0 a 4,

n representa un número entero de 0 a 4,

cuando n es 2 o más, cada X es igual o diferente entre sí, y

Ar representa un grupo arilo opcionalmente sustituido o un grupo heteroarilo opcionalmente sustituido.

- 60 El compuesto de fórmula general (I) en la que l es 1 es el compuesto en el que la posición 2 de la estructura de quinazolina está sustituida con R, es decir, un compuesto de la fórmula general (I-2):



donde R y X son iguales o diferentes y representan un grupo hidrocarburo opcionalmente sustituido, un grupo representado por NR^1R^2 , un grupo representado por OR^3 , un grupo representado por $\text{S}(\text{O})_m\text{R}^4$, un grupo nitro o un átomo de halógeno, en el que R^1 representa un átomo de hidrógeno o un grupo hidrocarburo opcionalmente sustituido,

R^2 representa un átomo de hidrógeno, un grupo hidrocarburo opcionalmente sustituido, un grupo representado por NR^5R^6 (en la que R^5 y R^6 son iguales o diferentes y representan un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo C1-6 opcionalmente sustituido) o un grupo representado por OR^7 (en la que R^7 representa un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo C1-6 opcionalmente sustituido), o R^1 y R^2 se toman junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos para formar un grupo amino cíclico opcionalmente sustituido,

cada uno de R^3 y R^4 representa un grupo hidrocarburo opcionalmente sustituido,

m representa un número entero de 0 a 2,

n representa un número entero de 0 a 4,

cuando n es 2 o más, cada X es igual o diferente entre sí, y

Ar representa un grupo arilo opcionalmente sustituido o un grupo heteroarilo opcionalmente sustituido.

El compuesto (I) puede estar en forma de la "sal agrícolamente aceptable" que se ha descrito anteriormente.

Cuando el compuesto (I) tiene uno o más centros asimétricos, el compuesto incluye dos o más estereoisómeros (por ejemplo, enantiómero, diastereómero, etc.). El compuesto de la presente invención incluye todos los estereoisómeros y una mezcla de dos o más estereoisómeros.

Cuando el compuesto (I) tiene isomería geométrica basada en un doble enlace y similares, el compuesto (I) incluye dos o más isómeros geométricos (por ejemplo, isómeros E/Z o trans/cis, isómeros S-trans/S-cis, etc.). El compuesto (I) incluye todos los isómeros geométricos y una mezcla de dos o más isómeros geométricos.

Los ejemplos preferibles del compuesto (I) incluyen los siguientes compuestos.

(1) Un compuesto de fórmula general (I), donde 1 es 1 y R es un grupo hidrocarburo opcionalmente sustituido.

(2) Un compuesto de fórmula general (I), donde 1 es 1 y R es un grupo alquilo C1-3 que está opcionalmente sustituido con un o más átomos de halógeno o uno o más grupos oxo.

(3) Un compuesto de fórmula general (I), donde el grupo hidrocarburo opcionalmente sustituido es un grupo alquilo C1-3 que está opcionalmente sustituido con uno o más átomos de halógeno o uno o más grupos oxo.

(4) Un compuesto de fórmula general (I), donde 1 es 1 y R es un grupo representado por NR^1R^2 .

(5) Un compuesto del punto (4) anterior, donde R^3 representa un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo C1-3, R^2 representa un átomo de hidrógeno, un grupo amino, un grupo alquilamino C1-3, un grupo dialquilamino C1-3, un grupo amidino, un grupo alcoxi C1-3, un grupo fenilo, un grupo acilo C1-3, un grupo alquilo C1-6, un grupo alqueno C3-6 o un grupo alquinilo C3-6, en el que el grupo fenilo está opcionalmente sustituido con los mismos o diferentes uno a tres grupos alquilo C1-3, y el grupo fenilo, el grupo acilo, el grupo alquilo, el grupo alqueno y el grupo alquinilo están opcionalmente sustituidos con los mismos o diferentes 1 a 3 sustituyentes seleccionados entre el grupo que consiste en un átomo de halógeno, un grupo hidroxilo, un grupo alcoxi C1-3, un grupo hidroxilo alcoxi C1-3, un grupo carboxilo, un grupo alcocarbonilo C1-3, un grupo carbamoilo, un grupo amino, un grupo alquilamino C1-3, un grupo dialquilamino C1-3, un grupo mercapto, un acilio C1-3, un grupo ciano, un grupo furilo y un grupo tetrahydrofurilo, o R^1 y R^2 se toman junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos para formar un grupo pirrolidino, un grupo piperidino o un grupo morfolino.

(6) Un compuesto del punto (4) anterior, donde R^1 representa un átomo de hidrógeno, R^2 representa un átomo de hidrógeno, un grupo formilo, un grupo alquilo C1-6, un grupo alqueno C3-6 o un grupo alquinilo C3-6, en el que el grupo alquilo, el grupo alqueno y el grupo alquinilo están opcionalmente sustituidos con uno o más sustituyentes seleccionados entre el grupo que consiste en un grupo hidroxilo, un grupo metoxi, un grupo metoxycarbonilo, un grupo etoxycarbonilo, un grupo ciano y un grupo furilo.

(7) Un compuesto de fórmula general (I), donde 1 es 1 y R es un grupo representado por OR^3 .

(8) Un compuesto del punto (7) anterior, donde R^3 es un grupo alquilo C1-3 que está opcionalmente sustituido con un grupo amino.

(9) Un compuesto de fórmula general (I), donde 1 es 1 y R es un grupo representado por $\text{S}(\text{O})_m\text{R}^4$.

(10) Un compuesto del punto (9) anterior, donde R^4 es un grupo alquilo C1-3 que está opcionalmente sustituido con un grupo amino o un grupo hidroxilo, y m es 0.

(11) Un compuesto de fórmula general (I), donde 1 es 1 y R es un átomo de halógeno.

(12) Un compuesto del punto (11) anterior, donde el átomo de halógeno es un átomo de cloro.

(13) Un compuesto de fórmula general (I), donde n es de 1 a 2 y X es un grupo alquilo C1-3, un grupo alcoxi C1-3, un grupo haloalquilo C1-3, un grupo ciano, un átomo de halógeno o un grupo nitro.

(14) Un compuesto del punto (13) anterior, donde X es un átomo de cloro, un átomo de bromo o un grupo nitro, y

X está sustituido en la posición 6 y/o la posición.

(15) Un compuesto de fórmula general (I), donde Ar es un grupo fenilo que está opcionalmente sustituido con uno o más átomos de halógeno o uno o más grupos alquilo C1-3.

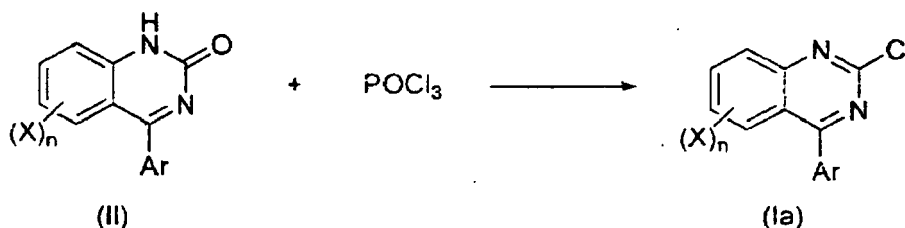
- 5 El compuesto (I) incluye compuestos conocidos y puede prepararse mediante un método conocido o un método análogo al mismo.

Por ejemplo, un compuesto (Ia) en el que 1 es 1 y R es un átomo de cloro puede prepararse calentando un compuesto (II) con oxiclورو de fósforo de acuerdo con el siguiente proceso de producción 1.

10

Documento Ejemplar: JP-A 62-145073

Proceso de producción 1



donde los símbolos son como se han definido anteriormente.

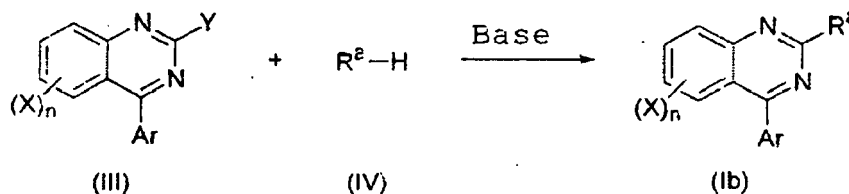
15

La reacción puede realizarse en un disolvente que no afecte de forma adversa a la reacción, y se realiza normalmente en ausencia de un disolvente y usando una cantidad en exceso de oxiclورو de fósforo (5 equivalentes a 30 equivalentes en base al compuesto (II)). La temperatura de reacción es normalmente de 80 °C a 200 °C, preferiblemente de 90 °C a la temperatura de reflujo (105 °C). El tiempo de reacción es normalmente de 0,1 a 96 horas, preferiblemente de 0,5 a 5 horas, más preferiblemente de 0,5 a 2 horas. Cuando la reacción prosigue lentamente incluso a reflujo, la reacción también puede calentarse a aproximadamente 200 °C y se presuriza por ejemplo, a una presión atmosférica de 1,1 a 100) en un recipiente cerrado resistente a la presión.

20

- 25 Un compuesto (Ib) donde 1 es 1 y R es un grupo R⁶ que es distinto de un átomo de halógeno puede prepararse, por ejemplo, haciendo reaccionar un compuesto (III) con un compuesto (IV) de acuerdo con el siguiente proceso de producción 2. Documento Ejemplar: Journal of the Chemical Society of Japan, 1973, pl944; JP-A 58-88369

Proceso de producción 2



- 30 donde Y representa un grupo saliente (por ejemplo, un átomo de halógeno tal como flúor, cloro, bromo o yodo; un grupo alcano- o areno-sulfoniloxi tal como un grupo metanosulfoniloxi, un grupo bencenosulfoniloxi o un grupo p-toluenosulfoniloxi; un grupo alcano-, areno- o arenoalcano-sulfonilo tal como metanosulfonilo, bencenosulfonilo o fenilmetanosulfonilo, etc.); R^a tiene el mismo significado que el de R, con la condición de que R^a no sea un átomo de halógeno; y otros símbolos son como se han definido anteriormente.

35

La reacción puede realizarse con o sin usar un disolvente. Los ejemplos del disolvente incluyen hidrocarburo alifático, tales como pentano, hexano, heptano, éter de petróleo o ciclohexano; éster, tal como acetato de metilo, acetato de metilo, formiato de etilo o propionato de etilo; cetona, tales como acetona, o metil etil cetona; éter, tales como éter dimetilico, metil terc-butil éter, éter diisopropílico, éter dibutílico, tetrahidrofurano o dioxano; alcohol, tales como metanol, etanol o isopropanol; nitruro, tales como acetonitrilo o propionitrilo; amida de ácido, tales como dimetilformamida o dimetilacetamida; amida cíclica, tal como 1-metil-2-pirrolidona; amida fosfórica, tal como hexametilfosforamida; urea cíclica, tal como 1,3-dimetil-2-imidazolidinona; sulfóxido, tal como dimetilsulfóxido; sulfona, tal como sulfolano; hidrocarburo halogenado, tales como diclorometano, cloroformo, 1,2-dicloroetano o tetracloruro de carbono; amina aromática, tales como piridina, picolina, lutidina o quinolina; sus mezclas, agua y mezclas de los disolventes y agua.

45

Cuando se usa una mezcla del disolvente y agua y la reacción no es un sistema de reacción homogéneo, puede usarse un catalizador de transferencia de fase (por ejemplo, una sal de amonio cuaternario, tal como cloruro de

benciltrietilamonio, o bromuro de benciltrietilamonio, éter corona, tal como 18-corona-6, etc.).

Los ejemplos de la base incluyen alcoholato de metal alcalino, tales como etilato sódico, metilato sódico o terc-butóxido potásico; una base orgánica, tal como piridina, picolina, lutidina, quinolina, trietilamina, diisopropilamina, 4-dimetilaminopiridina; o N,N-dimetilanilina; una base inorgánica, tal como carbonato potásico, carbonato sódico, hidróxido sódico, hidróxido potásico, hidrogenocarbonato sódico o carbonato ácido potásico; hidruro metálico, tal como hidruro de litio, hidruro sódico o hidruro potásico; y un reactivo de litio orgánico, tal como butil litio o diisopropilamida de litio.

La cantidad de la base que se va a usar no se limita particularmente, siempre que no afecte de forma adversa a la reacción. También puede usarse una gran cantidad de exceso de la base como un disolvente.

Cuando el compuesto (IV) es una amina, también puede usarse una cantidad en exceso del compuesto (IV) tanto como una base como un disolvente.

La temperatura de reacción es normalmente de $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $200\text{ }^{\circ}\text{C}$, preferiblemente de la temperatura ambiente a $150\text{ }^{\circ}\text{C}$. El tiempo de reacción es normalmente de 0,1 a 96 horas, preferiblemente de 0,1 a 72 horas, más preferiblemente de 0,1 a 24 horas.

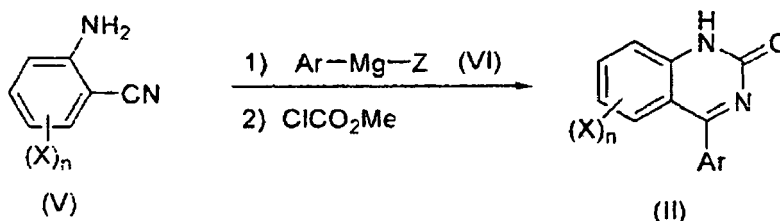
Cuando el compuesto (IV) es un compuesto de bajo punto de ebullición tal como amoniaco, metilamina o etilamina o cuando la reacción prosigue lentamente, la reacción también puede calentarse a una temperatura de aproximadamente $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $150\text{ }^{\circ}\text{C}$ y se presuriza (por ejemplo, a presión atmosférica de 1,1 a 100) en un recipiente cerrado resistente a la presión.

El compuesto (II) incluye un compuesto conocido y puede prepararse mediante un método conocido o un método análogo al mismo.

Por ejemplo, el compuesto (II) puede prepararse haciendo reaccionar un compuesto (V) con un compuesto (VI) y clorocarbonato de metilo de acuerdo con el siguiente proceso de producción de referencia 1.

Documento Ejemplar: Tetrahedron 42, 3697 (1986)

Proceso de Producción de Referencia 1



donde Z representa un átomo de halógeno, tal como cloro, bromo o yodo, y los demás símbolos son como se ha definido anteriormente.

En esta reacción, en primer lugar, el compuesto (V) se hace reaccionar con el compuesto (VI). Normalmente se usa un disolvente. Los ejemplos del disolvente incluyen hidrocarburo alifático, tales como pentano, hexano, heptano, o éter de petróleo; hidrocarburo aromático, tales como benceno, tolueno o xileno; éter, tales como éter dietílico, metil terc-butil éter, éter diisopropílico, éter dibutílico, tetrahidrofurano o dioxano, y una mezcla de dos o más tipos de ellos.

El compuesto (VI) se usa normalmente en una cantidad de 1 a 5 equivalentes, preferiblemente de 2 a 2,5 equivalentes en base al compuesto (V).

En esta fase, la temperatura de reacción es normalmente de $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $100\text{ }^{\circ}\text{C}$, preferiblemente de $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $70\text{ }^{\circ}\text{C}$.

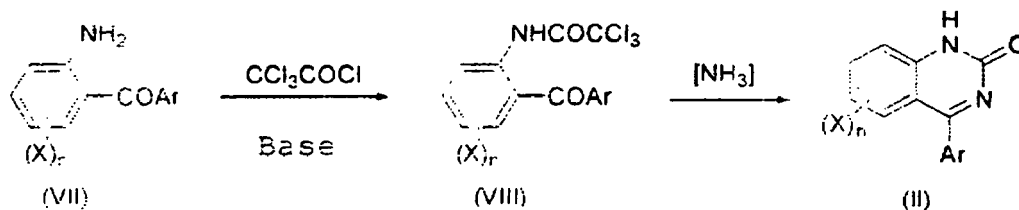
El tiempo de reacción es normalmente de 0,2 a 96 horas, preferiblemente de 0,5 a 24 horas, más preferiblemente de 1 a 3 horas.

Después, al sistema de reacción se le añade clorocarbonato de metilo. Se usa normalmente clorocarbonato de metilo en una cantidad de 1 a 5 equivalentes, preferiblemente de 1 a 2 equivalentes en base al compuesto (V). En esta fase, se prefiere que se añada clorocarbonato de metilo después de la refrigeración a una temperatura de $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ seguido de calentamiento. La temperatura de reacción después del calentamiento es normalmente de $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $200\text{ }^{\circ}\text{C}$, preferiblemente de $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $70\text{ }^{\circ}\text{C}$. El tiempo de reacción total es normalmente de 0,2 a 96 horas, preferiblemente de 0,5 a 10 horas, más preferiblemente de aproximadamente 1 a 3 horas.

El compuesto (II) también puede prepararse haciendo reaccionar un compuesto (VII) con cloruro de tricloroacetilo para dar un compuesto (VIII) y haciendo reaccionar el compuesto (VIII) con amoníaco o una sal de amoníaco con una sustancia ácida débil de acuerdo con el siguiente proceso de producción de referencia 2. Documento Ejemplar: Chem. Pharm. Bull., 26, 1633 (1978)

5

Proceso de Producción de Referencia 2



donde los símbolos son como se han definido anteriormente.

- 10 En la primera reacción, se hace reaccionar cloruro de tricloroacetilo con el compuesto (VII) en presencia de una base. La reacción puede realizarse en ausencia de un disolvente, y normalmente se realiza en presencia de un disolvente. Los ejemplos del disolvente incluyen hidrocarburo alifático, hidrocarburo aromático, éster, cetona, éter, nitrilo, amida de ácido, amida cíclica, amida fosfórica, urea cíclica, sulfóxido, sulfona, hidrocarburo halogenado descrito en el Ejemplo de Producción 2, y sus mezclas. Los ejemplos de la base incluyen las bases descritas en el
- 15 Ejemplo de Producción 2. Entre estas bases, se prefiere una base orgánica o una base inorgánica, y normalmente se usa trietilamina.

La temperatura de reacción es normalmente de $-50\text{ }^\circ\text{C}$ a $100\text{ }^\circ\text{C}$, preferiblemente de $0\text{ }^\circ\text{C}$ a $20\text{ }^\circ\text{C}$. El tiempo de reacción es normalmente de aproximadamente 0,1 a 96 horas, preferiblemente de 0,2 a 5 horas, más

20 preferiblemente de 0,5 a 3 horas.

En la segunda reacción, el compuesto (VIII) preparado en la primera reacción se hace reaccionar con amoníaco o un compuesto que genera amoníaco en el sistema. Los ejemplos del compuesto incluyen sales con sustancias ácidas débiles de amoníaco, tales como carbonato amónico, formiato amónico o acetato amónico. En la reacción, se usa

25 normalmente el disolvente como se describe en el Ejemplo de Producción 2. Los ejemplos preferibles del disolvente incluyen amida de ácido, amida cíclica, amida fosfórica, urea cíclica, sulfóxido y sulfona.

La temperatura de reacción es normalmente de $20\text{ }^\circ\text{C}$ a $200\text{ }^\circ\text{C}$, preferiblemente de $50\text{ }^\circ\text{C}$ a $120\text{ }^\circ\text{C}$.

30 El tiempo de reacción es normalmente de 0,2 a 96 horas, preferiblemente de 0,5 a 10 horas, más preferiblemente de 1 a 5 horas.

El compuesto (III) incluye un compuesto conocido y puede prepararse mediante un método conocido o un método análogo al mismo.

35

Por ejemplo, el compuesto (III) donde Y es un átomo de cloro es un compuesto (Ia) incluido en el compuesto (I) y puede prepararse mediante el método que se ha descrito anteriormente.

40 El compuesto (IV), el compuesto (V), el compuesto (VI) y el compuesto (VII) con compuestos conocidos habitualmente, y están disponibles en el mercado o pueden prepararse mediante un proceso de producción conocido. Particularmente, el compuesto (VI) es un compuesto denominado reactivo de Grignard. El compuesto (VI) puede ser un producto disponible en el mercado, o puede prepararse mediante un proceso de producción conocido y después usarse tal cual sin aislamiento ni purificación.

45 Los compuestos preparados por los procesos de producción 1, 2 y los procesos de producción de referencia 1, 2 que se han descrito anteriormente pueden aislarse y purificarse por un medio conocido, por ejemplo, concentración, concentración a presión reducida, extracción, disolución, cristalización, recristalización o cromatografía.

50 Un compuesto representado por la fórmula general (XI) (en lo sucesivo en el presente documento, denominado con frecuencia como el compuesto (XI)) o una sal agrícolamente aceptable del mismo también puede usarse como el principio activo de un regulador del crecimiento vegetal. Se conoce un determinado compuesto de quinazolina que tiene un grupo amino sustituido en la posición (documento WO 2005/042501).

55 Los ejemplos del "grupo alquilo C1-6" representado por R^{11} en un compuesto representado por la fórmula general (XI) de la presente invención (en lo sucesivo en el presente documento puede denominarse como un compuesto (XI)), incluyen metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, sec-butilo, terc-butilo, pentilo, 3-metilbutilo y hexilo.

Los ejemplos del "grupo alqueno C3-6" incluyen aliilo, 2-butenilo, 3-butenilo y 3-etil-2-butenilo. Los ejemplos del "grupo alqueno C3-6" incluyen propargilo, 2-butenilo y 3-pentinilo. Los ejemplos del "grupo alqueno C4-6" incluyen butilo, isobutilo, sec-butilo, terc-butilo, pentilo, 3-metilbutilo y hexilo. Los ejemplos del "grupo alcoxycarbonilmetilo C1-3" incluyen metoxycarbonilmetilo, etoxycarbonilmetilo, propiloxycarbonilmetilo e isopropiloxycarbonilmetilo. Los ejemplos del "grupo alcoxi C1-3-alqueno C1-3" incluyen 2-metoxietilo, 2-metoxipropilo, 3-metoxipropilo, 2-etoxietilo y 3-etoxipropilo.

El "grupo alqueno C1-6", "grupo alqueno C3-6", "grupo alqueno C3-6" y el "grupo alqueno C4-6" que se han descrito anteriormente pueden tener uno o más sustituyentes, preferiblemente de uno a tres sustituyentes seleccionados entre un grupo hidroxilo, un grupo alcoxi C1-3, un grupo alcoxycarbonilo C1-3, un grupo ciano, un grupo 2-furilo y un grupo 2-tetrahidrofurilo en posiciones sustituibles. Cuando el número de sustituyentes es 2 o más, los sustituyentes pueden ser iguales o diferentes.

Los ejemplos del "grupo alcoxi C1-3" que descritos como un ejemplo del sustituyente incluyen metoxi, etoxi, propiloxi e isopropiloxi. Los ejemplos del "grupo alcoxycarbonilo C1-3" incluyen metoxycarbonilo, etoxycarbonilo, propiloxycarbonilo e isopropiloxycarbonilo.

El compuesto (XI) puede formar una sal de adición de ácidos. Los ejemplos de la sal de adición de ácidos incluyen una sal de ácido inorgánico tal como clorhidrato, bromhidrato, yodhidrato, fosfato, sulfato, nitrato o perclorato; y una sal de ácido orgánico tal como formiato, acetato, tartrato, malato, citrato, oxalato, succinato, benzoato, picrato, metanosulfonato o p-toluenosulfonato.

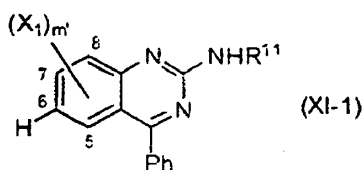
Cuando el compuesto (XI) tiene un grupo ácido tal como un grupo carboxilo, un grupo hidroxilo fenólico o un grupo etileno activo, los ejemplos de la sal que pueden formarse incluyen sales metálicas, tales como sales de metales alcalinos (sal de litio, sal sódica, sal potásica, etc.) y sales de metales alcalinotérreos (sal magnésica, sal cálcica, sal de bario, etc.); sales de amonio; y sales de adición con bases orgánicas (por ejemplo, dimetilamina, trietilamina, piperazina, pirrolidina, piperidina, 2-fenil-etilamina, bencilamina, etanolamina, dietanolamina, piridina, colidina, etc.).

Por lo tanto, el compuesto (XI) puede estar en forma de una sal agrícolamente aceptable como se ha descrito anteriormente.

Cuando el compuesto (XI) tiene uno o más centros asimétricos, el compuesto incluye dos o más estereoisómeros (por ejemplo, enantiómero, diastereómero, etc.). El compuesto de la presente invención incluye todos los estereoisómeros y una mezcla de dos o más estereoisómeros.

Cuando el compuesto (XI) tiene isomería geométrica en base a un doble enlace y similares, el compuesto incluye dos o más isómeros geométricos (por ejemplo, isómero E/Z o trans/cis, isómero S-trans/S-cis, etc.). El compuesto (XI) incluye todos los isómeros geométricos y una mezcla de dos o más isómeros geométricos.

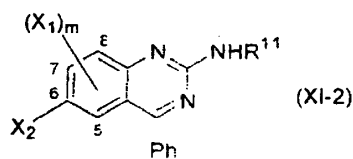
El compuesto de fórmula general (XI) en la que m es un número entero de 1 a 3 y n es 0 es el compuesto en el que la posición 6 de la estructura de quinazolina está sin sustituir, es decir, un compuesto de la fórmula general (XI-1):



donde Ph representa un grupo fenilo, R¹¹ representa un átomo de hidrógeno, un grupo formilo, un grupo alquilo C1-6, un grupo alqueno C3-6 o un grupo alqueno C3-6, y el grupo alquilo, el grupo alqueno y el grupo alqueno están opcionalmente sustituidos con al menos un sustituyente seleccionado entre un grupo hidroxilo, un grupo alcoxi C1-3, un grupo alcoxycarbonilo C1-3, un grupo ciano, un grupo 2-furilo y un grupo 2-tetrahidrofurilo, m' representa un número entero de 1 a 3,

X₁ representa un átomo de cloro, un átomo de bromo, un grupo trifluorometilo, un grupo ciano o un grupo nitro, cuando m' es 2 o más, cada X₁ es igual o diferente entre sí, con la condición de que cuando m' es 1, X₁ es un átomo de cloro y R¹¹ representa un grupo metilo, X₁ sea un átomo de 8-cloro.

El compuesto de fórmula general (XI) en la que n es 1 es el compuesto en el que la posición 6 de la estructura de quinazolina está sustituida con X₂, es decir, un compuesto de la fórmula general (XI-2):



donde Ph representa un grupo fenilo, R¹¹ representa un átomo de hidrógeno, un grupo formilo, un grupo alquilo C1-6, un grupo alqueno C3-6 o un grupo alquino C3-6, y el grupo alquilo, el grupo alqueno y el grupo alquino están opcionalmente sustituidos con al menos un sustituyente seleccionado entre un grupo hidroxilo, un grupo alcoxi C1-3, un grupo alcóxicarbonilo C1-3, un grupo ciano, un grupo 2-furilo y un grupo 2-tetrahidrofurilo,

m representa un número entero de 0 a 3,

X₁ y X₂ pueden ser iguales o diferentes y representan un átomo de cloro, un átomo de bromo, un grupo trifluorometilo, un grupo ciano o un grupo nitro,

cuando m es 2 o más, cada X₁ es igual o diferente entre sí,

con la condición de que cuando una cualquiera de las siguientes condiciones (1) a (3) se satisface, m represente un número entero de 1 a 3:

(1) X₂ es un átomo de cloro, y R¹¹ es un grupo seleccionado entre un átomo de hidrógeno, un grupo metilo, un grupo 2-hidroxietilo, un grupo 3-hidroxipropilo, un grupo 2,2-dimetoxietilo y un grupo cianometilo,

(2) X₁ es un átomo de bromo, y R¹¹ se selecciona entre un grupo 2-hidroxietilo, un grupo 3-hidroxipropilo y un grupo 2-metoxietilo, y

(3) X₂ es un grupo nitro, y R¹¹ es un grupo 3-hidroxipropilo.

Los ejemplos preferibles del compuesto (XI) incluyen los siguientes compuestos.

(1) Un compuesto de fórmula general (XI), donde R¹¹ es un átomo de hidrógeno, un grupo formilo, un grupo metilo, un grupo etilo, un grupo 2-hidroxietilo, un grupo 3-hidroxipropilo, un grupo 2-metoxietilo, un grupo furfurilo, un grupo metoxicarbonilmetilo o un grupo etoxicarbonilmetilo, m es 0, n es 1, y X₂ es un átomo de cloro o un grupo nitro.

(2) Un compuesto de fórmula general (XI), donde R¹¹ es un átomo de hidrógeno, un grupo formilo, un grupo metilo, un grupo etilo, un grupo 2-hidroxietilo, un grupo 2-metoxietilo, un grupo furfurilo, un grupo metoxicarbonilmetilo o un grupo etoxicarbonilmetilo, m es 1, n es 1, X₁ es un átomo de 8-cloro, y X₂ es un átomo de cloro o un grupo nitro.

(3) Un compuesto de fórmula general (XI), donde m es un número entero de 1 a 3, y n es 0.

(4) Un compuesto de fórmula general (XI), donde R¹¹ es un grupo formilo, un grupo alquilo C4-6, un grupo alqueno C3-6 o un grupo alquino C3-6, en la que el grupo alquilo, el grupo alqueno y el grupo alqueno están opcionalmente sustituidos con uno o más grupos hidroxilo o uno o más grupos alcoxi C1-3, o R¹¹ es un grupo alcóxicarbonilmetilo C1-3, un grupo alcoxi C1-3-alquilo C1-3 o un grupo furfurilo, m es 0, n es 1, y X₂ es un átomo de cloro.

(5) Un compuesto de fórmula general (XI), donde n es 1.

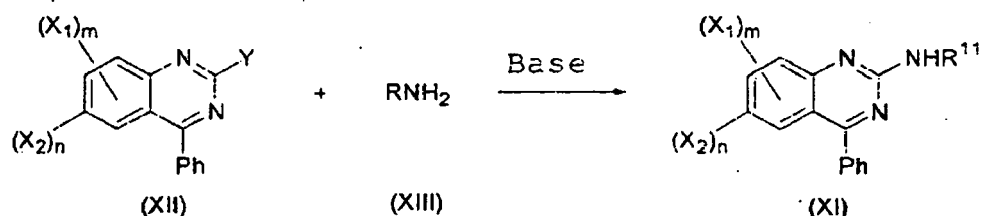
(6) Un compuesto de fórmula general (XI), donde m es 1 a 3, y n es 1.

(7) Un compuesto de fórmula general (XI), donde R¹¹ es un grupo alcóxicarbonilmetilo C1-3 o un grupo furfurilo.

(8) Un compuesto de fórmula general (XI), donde n es 1, y X₂ es un grupo trifluorometilo o un grupo ciano.

El compuesto (XI) es una sustancia novedosa y puede prepararse haciendo reaccionar un compuesto (XII) con un compuesto (XIII) de acuerdo con el siguiente proceso de producción 11.

Proceso de Producción 11



donde Y representa un grupo saliente (por ejemplo, un átomo de halógeno tal como flúor, cloro, bromo o yodo; un grupo alcano- o areno-sulfonilo tal como un grupo metanosulfonilo, un grupo bencenosulfonilo o un grupo p-toluenosulfonilo; o un grupo alcano-, areno- o arenoalcano-sulfonilo tal como metanosulfonilo, bencenosulfonilo o fenilmetanosulfonilo), y los demás símbolos son como se han definido anteriormente.

La reacción puede realizarse con o sin usar un disolvente. Los ejemplos del disolvente incluyen hidrocarburo alifático, tales como pentano, hexano, heptano, éter de petróleo o ciclohexano; éster, tal como acetato de metilo,

acetato de etilo, formiato de etilo o propionato de etilo; cetona, tales como acetona o metil etil cetona; éter, tales como éter dietílico, metil terc-butil éter, éter diisopropílico, éter dibutílico, tetrahidrofurano o dioxano; alcohol, tales como metanol, etanol o isopropanol; nitrilo tal como acetonitrilo o propionitrilo; amida de ácido, tales como dimetilformamida o dimetilacetamida; amida cíclica, tal como 1-metil-2-pirrolidona; amida fosfórica, tal como

5 hexametilfosforamida; urea cíclica, tal como 1,3-dimetil-2-imidazolidinona; sulfóxido, tal como dimetilsulfóxido; sulfona, tal como sulfolano; hidrocarburo halogenado, tales como diclorometano, cloroformo, 1,2-dicloroetano o tetracloruro de carbono; amina aromática, tales como piridina, picolina, lutidina o quinolina; sus mezclas, agua y mezclas de los disolventes y agua.

10 Cuando se usa una mezcla del disolvente con agua y la reacción no es un sistema homogéneo, puede usarse un catalizador de transferencia de fase (por ejemplo, una sal de amonio cuaternario, tal como cloruro de benciltrietilamonio, o bromuro de benciltrietilamonio, éter corona, tal como 18-corona-6, etc.).

15 Los ejemplos de la base incluyen alcoholato de metal alcalino, tales como etilato sódico, metilato sódico o terc-butóxido potásico; una base orgánica, tal como piridina, picolina, lutidina, quinolina, trietilamina, diisopropiletilamina, 4-dimetilaminopiridina, o N,N-dimetilanilina; una base inorgánica, tal como carbonato potásico, carbonato sódico, hidróxido sódico, hidróxido potásico, hidrogenocarbonato sódico o carbonato ácido potásico; hidruro metálico, tal como hidruro de litio, hidruro sódico o hidruro potásico; y un reactivo de litio orgánico, tal como butil litio, o diisopropilamida de litio.

20 La cantidad de la base que se va a usar no se limita particularmente, siempre que no afecte de forma adversa a la reacción. También puede usarse una gran cantidad de exceso de la base como un disolvente.

25 Cuando el compuesto (XIII) es una amina, también puede usarse una cantidad en exceso del compuesto (XIII) tanto como una base como un disolvente.

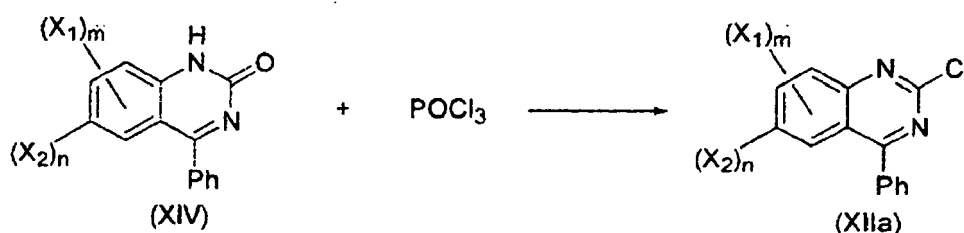
La temperatura de reacción es normalmente de -50 °C a 200 °C, preferiblemente de la temperatura ambiente a 150 °C. El tiempo de reacción es normalmente de 0,1 a 96 horas, preferiblemente de 0,1 a 72 horas, más preferiblemente de 0,1 a 24 horas.

30 Cuando el compuesto (XIII) es un compuesto de bajo punto de ebullición tal como amoniaco, metilamina o etilamina o cuando la reacción prosigue lentamente, la reacción también puede calentarse a una temperatura de aproximadamente 40 °C a 150 °C y se presuriza (por ejemplo, a presión atmosférica de 1,1 a 100) en un recipiente cerrado resistente a la presión.

35 Los compuestos (XII) incluyen un compuesto conocido y pueden prepararse mediante un método conocido o un método análogo al mismo. Por ejemplo, un compuesto (XIIa) en el que Y es un átomo de cloro puede prepararse haciendo reaccionar un compuesto (XIV) con oxicluro de fósforo de acuerdo con el siguiente proceso de producción de referencia 11.

40 Documento Ejemplar: JP-A 62-145073

Proceso de Producción de Referencia 11



45 donde los símbolos son como se han definido anteriormente.

La reacción anterior puede realizarse en un disolvente que no afecte de forma adversa a la reacción, y se realiza normalmente en ausencia de un disolvente usando una cantidad en exceso de oxicluro de fósforo (5 equivalentes a 30 equivalentes en base al compuesto (XIV)).

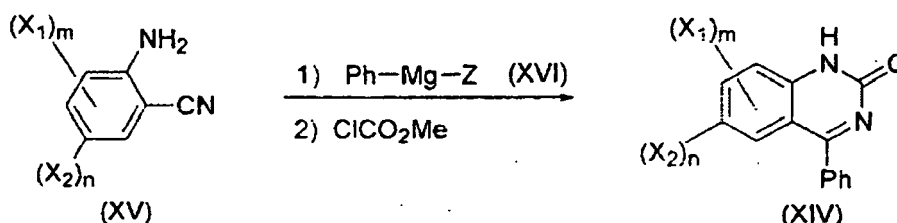
50 La temperatura de reacción es normalmente de 80 °C a 200 °C, preferiblemente de 90 °C a la temperatura de reflujo (105 °C).

55 El tiempo de reacción es normalmente de 0,1 a 96 horas, preferiblemente de 0,5 a 5 horas, más preferiblemente 0,5 a 2 horas. Cuando la reacción prosigue lentamente incluso a reflujo, la reacción también puede calentarse a una temperatura de aproximadamente 200 °C y se presuriza (por ejemplo, a presión atmosférica de 1,1 a 100) en un recipiente cerrado resistente a la presión.

El compuesto (XIV) incluye un compuesto conocido y puede prepararse mediante un método conocido o un método análogo al mismo. Por ejemplo, el compuesto (XIV) puede prepararse haciendo reaccionar un compuesto (XV) con un compuesto (XVI) y clorocarbonato de metilo de acuerdo con el siguiente proceso de producción de referencia 12. Documento Ejemplar: Tetrahedron 42, 3697 (1986)

5

Proceso de Producción de Referencia 12



donde Z representa un átomo de halógeno, tal como cloro, bromo o yodo, y otros símbolos son como se han definido anteriormente.

10

En la reacción, en primer lugar, un compuesto (XV) se hace reaccionar con un compuesto (XVI). Normalmente se usa un disolvente, y los ejemplos del mismo incluyen hidrocarburo alifático, tales como pentano, hexano, heptano o éter de petróleo; hidrocarburo aromático, tales como benceno, tolueno o xileno; éter, tales como éter dietílico, metil terc-butil éter, éter diisopropílico, éter dibutílico, tetrahydrofurano o dioxano, y mezclas de dos o más tipos de ellos.

15

El compuesto (XVI) se usa normalmente en la cantidad de 1 a 5 equivalentes, preferiblemente de 2 a 2,5 equivalentes en base al compuesto (XV).

20

La temperatura de reacción es normalmente de 40 °C a 100 °C, preferiblemente de 50 °C a 70 °C.

El tiempo de reacción es normalmente de 0,2 a 96 horas, preferiblemente de 0,5 a 24 horas, más preferiblemente de 1 a 3 horas.

25

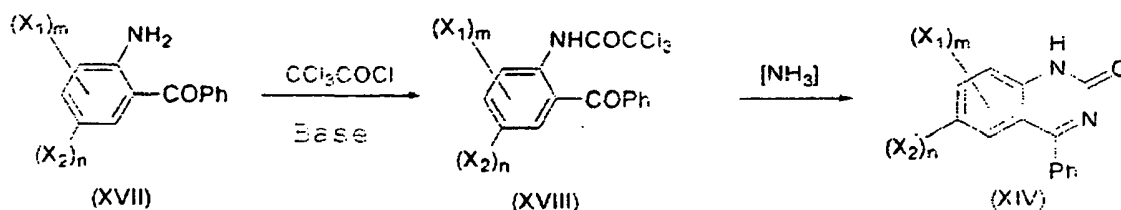
Después, al sistema de reacción se le añade clorocarbonato de metilo. Se usa normalmente clorocarbonato de metilo en una cantidad de 1 a 5 equivalentes, preferiblemente de 1 a 2 equivalentes en base al compuesto (XV). En esta fase, se prefiere que se añada clorocarbonato de metilo después de la refrigeración a una temperatura de 0 °C a 20 °C seguido de calentamiento. La temperatura de reacción después del calentamiento es normalmente de 40 °C a 200 °C, preferiblemente de 50 °C a 70 °C. El tiempo de reacción total es normalmente de 0,2 a 96 horas, preferiblemente de 0,5 a 10 horas, más preferiblemente de aproximadamente 1 a 3 horas.

30

El compuesto (XIV) también puede prepararse haciendo reaccionar un compuesto (XVII) con cloruro de tricloroacetilo para dar un compuesto (XVIII) y haciendo reaccionar el compuesto (XVIII) con amoníaco o una sustancia ácida débil de amoníaco de acuerdo con el siguiente proceso de producción de referencia 13. Documento Ejemplar: Chem. Pharm. Bull., 26, 1633 (1978)

35

Proceso de Producción de Referencia 13



donde los símbolos son como se han definido anteriormente.

40

En la primera reacción, se hace reaccionar cloruro de tricloroacetilo con el compuesto (XVII) en presencia de una base. La reacción puede realizarse en ausencia de un disolvente, y normalmente se realiza en presencia de un disolvente. Los ejemplos del disolvente incluyen hidrocarburo alifático, hidrocarburo aromático, éster, cetona, éter, nitrilo, amida de ácido, amida cíclica, amida fosfórica, urea cíclica, sulfóxido, sulfona, hidrocarburo halogenado descrito en el Ejemplo de Producción 11, y sus mezclas.

45

Los ejemplos de la base incluyen las bases descritas en el Ejemplo de Producción 11. Entre estas bases, se prefiere una base orgánica o una base inorgánica, y normalmente se usa trietilamina.

La temperatura de reacción es normalmente de -50 °C a 100 °C, preferiblemente de 0 °C a 20 °C.

5 El tiempo de reacción es normalmente de aproximadamente 0,1 a 96 horas, preferiblemente de 0,2 a 5 horas, más preferiblemente de 0,5 a 3 horas.

10 En la segunda reacción, el compuesto (XVIII) preparado en la primera reacción se hace reaccionar con amoníaco o un compuesto que genera amoníaco en el sistema. Los ejemplos del compuesto incluyen sales con sustancias ácidas débiles de amoníaco, tales como carbonato amónico, formiato amónico, o acetato amónico. En la reacción, se usa normalmente el disolvente como se describe en el Ejemplo de Producción 11. Los ejemplos preferibles del disolvente incluyen amida de ácido, amida cíclica, amida fosfórica, urea cíclica, sulfóxido y sulfona.

15 La temperatura de reacción es normalmente de 20 °C a 200 °C, preferiblemente de 50 °C a 120 °C.

El tiempo de reacción es normalmente de 0,2 a 96 horas, preferiblemente de 0,5 a 10 horas, más preferiblemente de 1 a 5 horas.

20 El compuesto (XIII), el compuesto (XV), el compuesto (XVI) y el compuesto (XVII) con compuestos conocidos habitualmente, y están disponibles en el mercado o pueden prepararse mediante un proceso de producción conocido.

25 Particularmente, el compuesto (XVI) es un compuesto denominado reactivo de Grignard. El compuesto (XVI) puede ser un producto disponible en el mercado, o puede prepararse mediante un proceso de producción conocido y después usarse tal cual sin aislamiento ni purificación.

30 Los compuestos preparados mediante el proceso de producción 11 y los procesos de producción de referencia 11, 12 y 13 pueden aislarse y purificarse por un medio conocido, por ejemplo, concentración, concentración a presión reducida, extracción, disolución, cristalización, recristalización o cromatografía.

El crecimiento de una planta como se describe en este documento se regula habitualmente aplicando una cantidad eficaz de un regulador del crecimiento vegetal a una planta o hábitat de la planta.

35 Cuando se usa el regulador del crecimiento vegetal descrito en este documento para agricultura y silvicultura, la cantidad de aplicación es habitualmente de 0,01 a 1.000 g/1000m². Cuando el regulador del crecimiento vegetal descrito en este documento está en forma de un concentrado emulsionable, un polvo humectable, una formulación fluida, o una microcápsula, habitualmente se pulveriza después de dilución con agua de modo que tenga una concentración de ingrediente activo de 0,001 a 10.000 ppm. Cuando el regulador del crecimiento vegetal descrito en este documento está en forma de un polvo o gránulo, habitualmente se aplica tal cual.

45 Con el fin de promover el crecimiento de raíces de plantas en el suelo de un campo cultivado, el suelo puede tratarse directamente con el regulador del crecimiento vegetal así formulado como se describe en este documento o con una dilución del regulador del crecimiento vegetal. Además, el regulador del crecimiento vegetal puede formularse en una formulación de resina en forma de una lámina o cordón. La formulación de resina puede aplicarse por enrollamiento alrededor de plantas, estiramiento en las cercanías de las plantas, deposición sobre la superficie del suelo al pie de la planta, o similares. El regulador del crecimiento vegetal de este documento también puede usarse por tratamiento al follaje o tratamiento de las yemas. También pueden tratarse los semilleros antes de plantar o los hoyos de plantación o pies de planta en plantación con el regulador del crecimiento vegetal descrito en este documento. Las plantas diana se tratan con el regulador del crecimiento vegetal una vez o varias veces.

50 Cuando el regulador del crecimiento vegetal descrito en este documento se usa para tratamiento al follaje de un cuerpo de planta o tratamiento del suelo, la cantidad de aplicación puede variar dependiendo del tipo de formulación, la cronología, el método y lugar de aplicación, y la planta diana, y es habitualmente de 0,1 a 10.000 g por hectárea. Cuando el regulador del crecimiento vegetal se usa como dilución con agua, la concentración del regulador del crecimiento vegetal puede variar dependiendo del tipo de formulación, la cronología, el método y lugar de aplicación, y la planta diana, y es habitualmente de 0,001 a 10.000 ppm, preferiblemente de 0,01 a 1.000 ppm.

60 El regulador del crecimiento vegetal descrito en este documento también puede usarse para un tratamiento de una planta antes de su trasplante. Cuando el regulador del crecimiento vegetal descrito en este documento se absorbe directamente en una planta antes de su trasplante, la parte de la raíz o toda la planta puede sumergirse en una solución o suspensión del regulador del crecimiento vegetal con una concentración de 0,001 ppm a 10.000 ppm.

65 Las semillas de la planta diana pueden tratarse directamente con una formulación del regulador del crecimiento vegetal descrito en este documento.

Ejemplos de dicho método de tratamiento incluyen un método que comprende sumergir semillas de una planta en el regulador del crecimiento vegetal descrito en este documento preparado de modo que la concentración de un ingrediente activo pueda ser de 1 a 10.000 ppm, un método que comprende pulverizar o recubrir las semillas de una planta con el regulador del crecimiento vegetal descrito en este documento preparado de modo que la concentración de un ingrediente activo pueda ser de 1 a 10.000 ppm, y un método que comprende recubrir las semillas de una planta con polvo del regulador del crecimiento vegetal descrito en este documento.

El regulador del crecimiento vegetal descrito en este documento puede mezclarse con un medio de cultivo acuoso para cultivo acuoso, o puede usarse como uno de los componentes del medio para cultivo tisular. Cuando el regulador del crecimiento vegetal descrito en este documento se usa para cultivo acuoso, el regulador del crecimiento vegetal puede disolverse o suspenderse en un medio de cultivo acuoso tal como Enshi a una concentración de 0,001 ppm a 10.000 ppm. Cuando el regulador del crecimiento vegetal descrito en este documento se usa para cultivo tisular o cultivo celular, el regulador del crecimiento vegetal puede disolverse o suspenderse en un medio de cultivo tisular vegetal convencionalmente usado, tal como un medio MS a una concentración de 0,001 ppm a 10.000 ppm. En este caso, pueden añadirse convencionalmente sacáridos como fuente de carbono y diversas hormonas vegetales al medio.

El regulador del crecimiento vegetal descrito en este documento también puede usarse en combinación con un fungicida, un insecticida, un acaricida, un nematocida, un herbicida, un regulador del crecimiento vegetal y/o un fertilizante.

Sus cantidades de aplicación y concentraciones de aplicación pueden variar dependiendo del tipo de formulación, la cronología, lugar y método de aplicación, el tipo de planta y el efecto a esperar, y por lo tanto pueden aumentarse o disminuirse sin limitación hasta los intervalos anteriores.

En el método de regulación del crecimiento vegetal descrito anteriormente, puede usarse el regulador del crecimiento vegetal.

También es posible especificar una sustancia que tenga la capacidad de promover el crecimiento de una raíz de una planta evaluada por el método para ensayar la capacidad de una sustancia de ensayo de promover el crecimiento de una raíz de una planta que comprende la primera etapa y la segunda etapa usando un receptor de citoquinina seleccionado entre el grupo A, y después poner la sustancia especificada que tiene la capacidad de promover el crecimiento de una raíz de una planta en contacto con una planta para promover el crecimiento de una raíz de la planta. Un método para poner la sustancia especificada que tiene la capacidad de promover el crecimiento de una raíz de una planta en contacto con una planta incluye el método de formulación y el método de aplicación descritos anteriormente.

El regulador del crecimiento vegetal descrito en este documento puede usarse con el fin de mejorar el establecimiento de plántulas y mejorar la tasa de arraigamiento en el suelo mediante la promoción del crecimiento de las raíces tras cultivo directo de plántulas de arroz. El regulador del crecimiento vegetal descrito en este documento también puede usarse con el fin de promover el crecimiento de raíces después de cultivar plántulas de arroz en un cajón de vivero. El regulador del crecimiento vegetal descrito en este documento también puede usarse con el fin de mejorar el engrosamiento de la raíz y la resistencia al calor y la sequedad del césped de un campo de golf. En el caso de cultivos tales como soja, maíz y trigo, el regulador del crecimiento vegetal descrito en este documento puede usarse con el fin de mejorar el engrosamiento de la raíz, mejorar la productividad por establecimiento de plántulas en una fase prematura o reducir la cantidad de aplicación de herbicidas. En el caso del cultivo de tomate, papel o similares, el regulador del crecimiento vegetal descrito en este documento puede usarse con el fin de mejorar la tasa de arraigamiento en suelo después de trasplante. En el caso de producción de plántulas de verduras, puede esperarse que el uso del regulador del crecimiento vegetal descrito en este documento conduzca a un establecimiento uniforme de plántulas y por lo tanto una mejora en la eficacia del trasplante mecánico.

El regulador del crecimiento vegetal descrito en este documento puede usarse para controlar la dominancia apical de una planta. Por ejemplo, el regulador del crecimiento vegetal descrito en este documento puede usarse para inhibir el crecimiento de yemas axilares de tabaco, rosa y similares. El regulador del crecimiento vegetal descrito en este documento puede controlar la formación de yemas florales de cultivos frutales, plantas de floración y similares, y por lo tanto puede usarse como agente debilitador de flores. El regulador del crecimiento vegetal descrito en este documento también puede aumentar las yemas florales, y de este modo aumentar el rendimiento de cultivos frutales o puede conseguirse mejora de la calidad de plantas de floración. El regulador del crecimiento vegetal descrito en este documento también puede inhibir el crecimiento de ramificaciones de cultivos frutales para disminuir la cantidad de ramificaciones o puede promover el crecimiento de ramificaciones de cultivos frutales para aumentar la cantidad de ramificaciones, y por lo tanto puede utilizarse para controlar el crecimiento de un cuerpo arbóreo.

El regulador del crecimiento vegetal descrito en este documento puede usarse para tecnologías de cultivo tisular tales como desdiferenciación en callos o rediferenciación a partir de callos. Por ejemplo, el regulador del crecimiento vegetal descrito en este documento puede usarse para promover la formación de callos a partir de tejidos vegetales.

El regulador del crecimiento vegetal descrito en este documento también puede usarse para mejorar la eficacia de rediferenciación a partir de un embrión adventicio de soja o similares.

5 El regulador del crecimiento vegetal descrito en este documento puede usarse para controlar el envejecimiento de una planta. Por ejemplo, el regulador del crecimiento vegetal descrito en este documento puede usarse para inhibir el envejecimiento de y mejorar el mantenimiento de flores cortadas de plantas de floración tales como claveles. El regulador del crecimiento vegetal descrito en este documento también puede usarse para inhibir la maduración de frutos. El regulador del crecimiento vegetal descrito en este documento también puede prevenir el envejecimiento de
10 hojas de plántulas de arroz con cáscara, y por tanto puedan cultivarse buenas plántulas. Una planta tal como el algodón puede tratarse con el regulador del crecimiento vegetal descrito en este documento antes de recogerlo para promover el envejecimiento de las hojas.

15 El receptor de citoquinina derivado de plantas que consiste en una secuencia de aminoácidos mostrada en el grupo B anterior puede usarse como herramienta de estudio. Por ejemplo, puede usarse como herramienta de estudio para realizar estudios tales como el ensayo de la capacidad de promover el crecimiento de una raíz de una planta o la búsqueda de una sustancia química que tenga la capacidad de controlar el crecimiento o diferenciación de una planta como se ha descrito anteriormente. El receptor de citoquinina también puede usarse como herramienta de estudio en estudios para analizar un mecanismo de acción de un fármaco que actúa sobre un receptor de citoquinina.
20

También puede usarse un polinucleótido que codifica una secuencia de aminoácidos mostrada en el grupo B y un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos complementaria a la misma, una secuencia de nucleótidos parcial de un polinucleótido que codifica una secuencia de aminoácidos mostrada en el grupo B o un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos complementaria a la secuencia de nucleótidos parcial, y un polipéptido que
25 comprende una secuencia de nucleótidos de la SEC ID N° 3 ó 4 como herramientas de estudio. Por ejemplo, una parte de ellos puede funcionar como un polinucleótido a usar en el proceso de producción de un receptor de citoquinina como se ha descrito anteriormente. También puede usarse una parte de ellos como una importante herramienta de estudio para obtener un polinucleótido mostrado en el polinucleótido del grupo B usando PCR, o para obtener un polinucleótido mostrado en el polinucleótido del grupo B usando hibridación, como se ha descrito
30 anteriormente.

35 Cuando se realiza la selección de un regulador del crecimiento vegetal, puede usarse como herramienta de ensayo en experimentos de selección. Específicamente, pueden usarse como herramienta de ensayo en experimentos para el ensayo de la capacidad de promover el crecimiento de una raíz de una planta y la búsqueda de una sustancia química que tenga la capacidad de controlar el crecimiento o diferenciación de una planta como se ha descrito anteriormente.

También se describe un sistema (a partir de ahora en este documento, a veces mencionado como el sistema descrito en este documento) que comprende un medio para introducir, almacenar y gestionar datos de información sobre una actividad (o la presencia o ausencia de señalización intracelular o la cantidad de la misma) de una sustancia de ensayo para inhibir la señalización intracelular desde un receptor de citoquinina derivado de plantas de una célula (a partir de ahora en este documento, a veces mencionado como el medio a), un medio para consultar y buscar los datos de información basados en condiciones deseadas (a partir de ahora, a veces mencionado como medio b), y un medio para presentar y extraer los datos consultados y buscados (a partir de ahora en este documento, a veces mencionado como el medio c).
45

En primer lugar, se describe el medio a. Como se ha descrito anteriormente, el medio a es un medio que introduce datos de información de una actividad de una sustancia de ensayo para inhibir la señalización intracelular desde un receptor de citoquinina derivado de plantas de una célula, y después almacena y gestiona la información introducida.
50 Dicha información se introduce mediante un medio de entrada 1 y se memoriza habitualmente en un medio de memoria 2. El medio de entrada incluye un medio capaz de introducir la información, tal como un teclado o un ratón. Cuando se ha completado la introducción, almacenamiento y gestión de la información, la información progresa hasta el posterior medio b. En el almacenamiento y gestión de la información, puede almacenarse y gestionarse de forma eficaz un lote de datos introduciendo información que tenga una estructura de datos usando hardware tal como un ordenador y software tal como OS y bases de datos, y almacenando la información en un dispositivo apropiado de almacenamiento, por ejemplo, un medio de grabación legible en ordenador tal como un disco flexible, un disco fotomagnético, un CD-ROM, un DVD-ROM, o un disco duro.
55

Se describe el medio b. Como se ha descrito anteriormente, el medio b es un medio que consulta y busca los datos de información almacenados y gestionados por el medio a basados en condiciones para obtener los resultados deseados. Cuando las condiciones de consulta y búsqueda se introducen por el medio de entrada 1 y se selecciona habitualmente la información correspondiente a las condiciones de la información almacenada en el medio de almacenamiento 2, la información progresa hasta el posterior medio c. Los resultados seleccionados se almacenan habitualmente en el medio de almacenamiento 2 y pueden presentarse por la pantalla y el medio de salida 3.
60
65

Se describe el medio c. Como se ha descrito anteriormente, el medio c es un medio que presenta y extrae los resultados consultados y buscados. El medio de presentación y de salida 3 incluyen una pantalla, y una impresora, y los resultados pueden presentarse en un dispositivo de presentación de un ordenador, o extraerse en un papel por impresión.

5

Ejemplos

En lo sucesivo en el presente documento, la presente invención se describirá en detalle por medio de los Ejemplos, pero la presente invención no se limita a los mismos.

10

El compuesto (I) usado en la presente invención se describirá más específicamente por medio de los Ejemplos de Síntesis y los Ejemplos de Síntesis de Referencia, pero el compuesto (I) no se limita a estos ejemplos.

15

En los Ejemplos de Síntesis y los Ejemplos de Síntesis de Referencia, "temperatura ambiente" normalmente se refiere a una temperatura de 10 °C a 30 °C. ¹H RMN" se refiere a un espectro de resonancia magnética de protones. Usando tetrametilsilano como un estándar interno, la medición se realizó con un espectrómetro (400 MHz), Modelo JNM-AL400, fabricado por JEOL Ltd. y los desplazamientos químicos (δ) se expresaron como ppm. "P.f." se refiere a punto de fusión y se midió con un medidor del punto de fusión, Modelo Mettler FP61.

20

Las abreviaturas usadas en los siguientes Ejemplos de Síntesis, Ejemplos de Síntesis de Referencia y las Tablas 3 a 7 tienen los siguientes significados. CDCl₃: cloroformo deuterado, DMSO-d₆: dimetilsulfóxido deuterado, s: singlete, d: doblete, t: triplete, c: cuadruplete, dd: doblete de dobletes, m: multiplete, a: ancho, J: constante de acoplamiento, Me: metilo, Et: etilo, Pr: propilo, i-Pr: isopropilo, t-Bu: butilo terciario, Ph: fenilo, Ac: acetilo, THF: tetrahidrofurano, DMF: N,N-dimetilformamida, DMSO: dimetilsulfóxido y MTBE: metil terc-butil éter

25

Ejemplo de Síntesis 1 (Preparación de 2,8-dicloro-4-fenilquinazolina (compuesto N° Ia1-11))

A 1,24 g de 8-cloro-4-fenil-2(1H)-quinazolinona (compuesto N° II-11) se le añadieron 6,65 g de oxiclورو de fósforo seguido de agitación a 95 °C durante 1 hora. La solución de reacción resultante se vertió en 200 ml de hielo-agua y después se añadió bicarbonato sódico, ajustando de este modo el pH a 9. Después, los cristales precipitados se recogieron por filtración. El producto recogido se recrystalizó en etanol para obtener 1,07 g del compuesto del título. P.f. 154,4 °C. ¹H RMN (CDCl₃): 7,52-7,65 (4H, m), 7,76-7,80 (2H, m), 8,02-8,08 (2H, m).

30

Ejemplo de Síntesis 2 (Preparación de 2-amino-6,8-dicloro-4-fenilquinazolina (compuesto N° Ic12-4))

Una mezcla de 300 mg de 2,6,8-tricloro-4-fenilquinazolina (compuesto N° Ia1-12), 30 g de una solución acuosa al 28 % de amoníaco y 6 ml de acetonitrilo se hizo reaccionar a 105 °C durante 1,5 horas en un recipiente de reacción resistente a la presión. La solución de reacción resultante se enfrió y después se vertió en 100 ml de agua. La mezcla se extrajo con 60 ml de acetato de etilo y el extracto resultante se concentró. El residuo resultante se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice (cloroformo) para obtener 230 mg del compuesto del título. P.f. 212,7 °C. ¹H RMN (CDCl₃): 5,56 (2H, s a.), 7,54-7,60 (3H, m), 7,63-7,68 (2H, m), 7,74 (1H, d, J = 2,3 Hz), 7,79 (1H, d, J = 2,3 Hz).

35

40

Ejemplo de Síntesis 3 (Preparación de 6-cloro-2-furfurilamino-4-fenilquinazolina (compuesto N° Ic3-16))

Una mezcla de 275 mg de 2,6-dicloro-4-fenilquinazolina (compuesto N° Ia1-3) y 496 mg de furfurilamina se agitó a 85 °C durante 40 minutos y después se vertió en 30 ml de agua. La mezcla se extrajo con acetato de etilo y el extracto resultante se lavó con agua y después se concentró. El residuo resultante se recrystalizó en etanol para obtener 280 mg del compuesto del título. P.f. 142,0 °C. ¹H RMN (CDCl₃): 4,77 (2H, d, J = 5,6 Hz), 5,70 (1H, t a, J = 5,6 Hz), 6,29-6,32 (2H, m), 7,36 (1H, dd, J = 1,8, 0,9 Hz), 7,53-7,70 (7H, m), 7,76 (1H, d, J = 2,2 Hz).

45

50

Ejemplo de Síntesis 4 (Preparación de 6-cloro-2-etoxicarbonilmetilamino-4-fenilquinazolina (compuesto N° Ic3-33))

A 550 mg de 2,6-dicloro-4-fenilquinazolina (compuesto N° Ia1-3) y 419 mg de clorhidrato de glicina etil éster se les añadieron 3 ml de DMF y 607 mg de trietilamina seguido de agitación a 85 °C durante 5,5 horas. La solución de reacción resultante se vertió en 100 ml de agua y se extrajo con acetato de etilo. El extracto se concentró. El residuo resultante se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice (hexano:acetato de etilo = 6:1 a 3:1 para obtener 503 mg del compuesto del título. P.f. 146,1 °C. ¹H RMN (CDCl₃): 1,30 (3H, t, J = 7,2 Hz), 4,25 (2R, c, J = 7,2 Hz), 4,31 (2H, d, J = 5,2 Hz), 5,97 (1H, s a), 7,54-7,63 (5H, m), 7,67-7,70 (2H, m), 7,79 (1H, s).

55

60

Ejemplo de Síntesis 5 (Preparación de 6-cloro-2-metoxiamino-4-fenilquinazolina (compuesto N° Ic3-22))

A una mezcla de 275 mg de 2,6-dicloro-4-fenilquinazolina (compuesto N° Ia1-3), 10 ml de acetonitrilo y 334 mg de clorhidrato de metoxiamina se le añadieron gota a gota 506 mg de trietilamina a temperatura ambiente para obtener una mezcla. La mezcla se cargó en un recipiente de reacción resistente a la presión hecho de acero inoxidable y la

65

reacción se realizó a 105 °C durante 3,5 horas. Después de un periodo de refrigeración, la solución de reacción se vertió en 100 ml de agua. La mezcla se extrajo con acetato de etilo y el extracto resultante se lavó con agua y después se concentró. El residuo resultante se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice (hexano:acetato de etilo = 3:1) para obtener 156 mg de cristales en bruto. Los cristales en bruto se recrystalizaron en acetato de etilo para obtener 55 mg del compuesto del título. P.f. 173,9 °C. ¹H RMN (CDCl₃): 3,96 (3H, s), 7,47-7,72 (6H, m), 7,87 (1H, d, J = 9,0 Hz), 7,89 (1H, d, J = 2,2 Hz), 8,03 (1H, s a).

Ejemplo de Síntesis 6 (Preparación de 6-cloro-2-(2-hidroxiethyl)-4-fenilquinazolina (compuesto N° le3-1))

A una solución de 86 mg de 2-mercaptoetanol en DMF (7,5 ml) se le añadieron 44 mg de hidruro sódico (60 %) seguido de agitación a temperatura ambiente durante 30 minutos. A la mezcla de reacción se le añadieron 275 mg de 2,6-dicloro-4-fenilquinazolina (compuesto N° la1-3) seguido de agitación a temperatura ambiente durante 2 horas. La solución de reacción se vertió en 100 ml de agua y se extrajo con acetato de etilo. El extracto resultante se concentró.

El residuo resultante se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice (acetato de etilo:hexano = 1:5) para obtener 266 mg del compuesto del título. P.f. 124,4 °C. ¹H RMN (CDCl₃): 3,50 (2H, t, J = 5,5 Hz), 3,64 (1H, t a), 4,07 (2H, tipo c, J = 5,5 Hz), 7,57-7,61 (3H, m), 7,71-7,74 (2H, m), 7,77 (1H, dd, J = 8,9, 2,3 Hz), 7,85 (1H, d, J = 8,9 Hz), 7,97 (1H, d, J = 2,3 Hz).

Ejemplo de Síntesis 7 (Preparación de 6-cloro-2-formamido-4-fenilquinazolina (compuesto N° lc3-35))

A una solución de 54 mg de formamida seca en DMF (5 ml) se le añadieron 48 mg de hidruro sódico (60 %) seguido de agitación a temperatura ambiente durante 30 minutos. A la mezcla de reacción se le añadieron 275 mg de 2,6-dicloro-4-fenilquinazolina (compuesto N° la1-3) seguido de calentamiento a 85 °C y agitación adicional durante 3 horas. La solución de reacción resultante se vertió en 100 ml de agua y se extrajo con acetato de etilo. El extracto se concentró. El residuo resultante se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice (acetato de etilo:hexano = 1:3) para obtener 64 mg del compuesto del título. P.f. 252,1 °C. ¹H RMN: 7,59-7,66 (3H, m), 7,72-7,81 (3H, m), 7,88 (1H, d, J = 8,8 Hz), 8,02 (1H, d, J = 2,0 Hz), 8,37 (1H, d a, J = 10,4 Hz), 9,71 (1H, d, J = 10,4 Hz).

Ejemplo de Síntesis 8 (Preparación de 6-cloro-2-(1-metilhidrazino)-4-fenilquinazolina (compuesto N° lc3-27))

Una mezcla de 275 mg de 2,6-dicloro-4-fenilquinazolina (compuesto N° la1-3) y 461 mg de monometilhidrazina se agitó a 85 °C durante 30 minutos. El producto de reacción resultante se enfrió y al mismo se le añadieron 200 ml de agua. Los cristales precipitados se recogieron por filtración y el producto recogido se purificó por cromatografía en columna (acetato de etilo) para obtener 225 mg del compuesto del título. P.f. 155,9 °C. ¹H RMN (CDCl₃): 3,52 (3H, s), 4,65 (2H, s), 7,54-7,63 (5H, m), 7,70-7,74 (2H, m), 7,80 (1H, d, J = 2,0 Hz).

Ejemplo de Síntesis 9 (Preparación de 2-(2-aminoetoxi)-6-cloro-4-fenilquinazolina (compuesto N° ld3-1))

De la misma manera que en el Ejemplo de Síntesis 6, se hicieron reaccionar 500 mg de 2,6-dicloro-4-fenilquinazolina (compuesto N° la1-3) y 382 mg de N-(2-hidroxiethyl)ftalimida para obtener 380 mg de 6-cloro-4-fenil-2-(2-ftalimidoetoxi)quinazolina. P.f. 154,7 °C. ¹H RMN (CDCl₃): 4,25 (2H, t, J = 5,8 Hz), 4,84 (2H, t, J = 5,8 Hz), 7,53-7,60 (3H, m), 7,67-7,71 (3H, m), 7,72-7,76 (3H, m), 7,78-7,82 (2H, m), 7,97 (1H, d, J = 2,2 Hz).

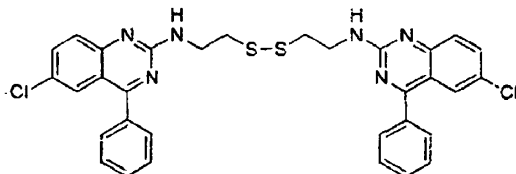
Una mezcla de 380 mg de 6-cloro-4-fenil-2-(2-ftalimidoetoxi)quinazolina, 70 mg de hidrazina hidrato y 6 ml de etanol se calentó a reflujo durante 2 horas. A la solución de reacción resultante se le añadieron 1,2 ml de agua, y después el etanol se retiró por destilación. Al residuo resultante se le añadieron 1,5 ml de ácido clorhídrico concentrado seguido de calentamiento a reflujo durante 1 hora. El producto de reacción resultante se enfrió y se vertió en una solución saturada de bicarbonato sódico en agua y se extrajo con acetato de etilo. El extracto se concentró para obtener 240 mg del compuesto del título. P.f. 134,9 °C. ¹H RMN (CDCl₃): 3,59-3,63 (2H, m), 3,84 (2H, t, J = 4,6 Hz), 6,15 (2H, s a), 7,53-7,59 (5H, m), 7,63-7,67 (2H, m), 7,75 (1H, d, J = 1,2 Hz).

Ejemplo de Síntesis 10 (Preparación de 2-(2-acetiltilioetilamino)-6-cloro-4-fenilquinazolina (compuesto N° lc3-14))

A una solución de 292 mg de trifenilfosfina en THF deshidratado (3 ml) se le añadieron gota a gota 563 mg de una solución al 40 % de diisopropilcarbodiimida en tolueno en refrigeración con hielo seguido de agitación durante 20 minutos. A la suspensión resultante se le añadió gota a gota una solución de 167 mg de 6-cloro-2-(2-hidroxiethylamino)-4-fenilquinazolina (compuesto N° lc3-1) en THF deshidratado (2 ml) en refrigeración con hielo, e inmediatamente se añadieron gota a gota 127 mg de ácido tioacético. La solución transparente de color amarillo resultante se agitó durante 1 hora en refrigeración con hielo, se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora, se vertió en una solución saturada de bicarbonato sódico en agua y después se extrajo con cloroformo. El extracto se concentró. El residuo resultante se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice (cloroformo:acetato de etilo = 10:1) para obtener 170 mg del compuesto del título. P.f. 128,9 °C. ¹H RMN (CDCl₃): 2,34 (3H, s), 3,22 (2H, t, J = 6,5 Hz), 3,73 (2H, c, J = 6,5 Hz), 5,74 (1H, t a, J = 6,5 Hz), 7,53-7,62 (5H, m), 7,65-7,70 (2H, m), 7,77 (1H, s).

Ejemplo de Síntesis 11 (6-cloro-2-(2-mercaptoetilamino)-4-fenilquinazolina (compuesto N° Ic3-13) y disulfuro de bis[2-(6-cloro-4-fenil-2-quinazolinil)aminoetilo] (compuesto N° Ic3-15))

Una mezcla de 108 mg de 2-(2-acetiltioetilamino)-6-cloro-4-fenilquinazolina (compuesto N° Ic3-14), 2 ml de etanol y 362 mg de una solución acuosa al 10 % de hidróxido sódico se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas y se agitó en calentamiento a reflujo durante 30 minutos. Después, las sustancias insolubles se recogieron por filtración de la solución de reacción. El producto recogido (sólido) se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice (cloroformo:acetato de etilo = 10:1) para obtener 50 mg de 6-cloro-2-(2-mercaptoetilamino)-4-fenilquinazolina, en primer lugar. P.f. 165,9 °C. ¹H RMN (CDCl₃): 1,46 (1H, t, J = 8,5 Hz), 2,84 (2H, tipo c, J = 7,2 Hz), 3,66 (2H, tipo c, J = 6,4 Hz), 5,79 (1H, t a, J = 5,4 Hz), 7,55-7,57 (3H, m), 7,60 (2H, s), 7,66-7,69 (2H, m), 7,77-7,78 (1H, m). Después, se obtuvieron 28 mg de disulfuro de bis[2-(6-cloro-4-fenil-2-quinazolinil)aminoetilo] (compuesto representado por la siguiente fórmula).



P.f. 159,2 °C. ¹H RMN (CDCl₃): 3,02 (4H, t, J = 6,4 Hz), 3,89 (4H, c, J = 6,4 Hz), 5,81 (2H, t a, J = 6,4 Hz), 7,51-7,61 (10H, m), 7,63-7,68 (4H, m), 7,75 (2H, d, J = 2,2 Hz).

Se muestran ejemplos de compuestos que pueden prepararse de la misma manera que en los Ejemplos de Síntesis que se han descrito anteriormente y compuestos disponibles en el mercado en la Tabla 3, Tabla 4, Tabla 5 y la Tabla 6 (incluyendo también los compuestos preparados en los Ejemplos de Síntesis que se han descrito anteriormente).

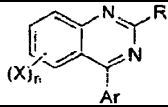
Ha de apreciarse que "a)", "b)", "c)" y "d)" en la Tabla 4 y la Tabla 5 son como se indica a continuación.

25

Tabla 3

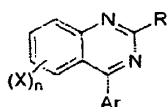
Compuesto N°	R	Ar	(X) _n	Punto de fusión (°C)
la1-1	Cl	Ph	5-Cl	125,7
la1-2	Cl	Ph	6-F	131,9
la1-3	Cl	Ph	6-Cl	166,2
la1-4	Cl	Ph	6-Br	185,1 (descomposición)
la1-5	Cl	Ph	6-Me	137,6
la1-6	Cl	Ph	6-CF ₃	117,5 (descomposición)
la1-7	Cl	Ph	6-NO ₂	242,5 (descomposición)
la1-8	Cl	Ph	6-OMe	148,6
la1-9	Cl	Ph	6-ON	206,8 (descomposición)
la1-10	Cl	Ph	7-Cl	115,4
la1-11	Cl	Ph	8-Cl	154,4
la1-12	Cl	Ph	6,8-Cl ₂	160,3
la1-13	Cl	p-Cl-Ph	6-Cl	205,6
la1-14	Cl	m-Cl-Ph	6-Cl	161,3
lb4-1	CHO	o-Cl-Ph	6-Br	
lc0-1	NH(CH ₂) ₂ OH	Ph	(n = 0)	
lc1-1	NH(CH ₂) ₃ OH	Ph	5-Cl	175,7
lc2-1	NH(CH ₂) ₂ OH	Ph	6-F	99,3
lc3-1	NH(CH ₂) ₂ OH	Ph	6-Cl	137,9
lc3-2	pirrolidino	Ph	6-Cl	
lc3-3	NH(CH ₂) ₂ OH	Ph	6-Cl	135,9
lc3-4	NH(CH ₂)OH	Ph	6-Cl	115,6
lc3-5	NH(CH ₂) ₅ OH	Ph	6-Cl	117,2
lc3-6	NMe(CH ₂) ₂ OH	Ph	6-Cl	128,5
lc3-7	NH(CH ₂) ₂ OMe	Ph	6-Cl	89,7
lc3-8	NHn-Pr	Ph	6-Cl	158,3
lc3-9	NMe(CH ₂) ₂ OMe	Ph	6-Cl	88,5

Tabla 4



Compuesto N°	R	Ar	(X) _n	Punto de fusión (°C)
lc3-10	NH(CH ₂) ₂ CHMe ₂	Ph	6-Cl	90,1
lc3-11	NH(CH ₂) ₆ OH	Ph	6-Cl	107,9
lc3-12	NH(CH ₂) ₂ CH(Me)CH ₂ OH	Ph	6-Cl	112,7
lc3-13	NH(CH ₂) ₂ SH	Ph	6-Cl	165,9
lc3-14	NH(CH ₂) ₂ SAc	Ph	6-Cl	128,9
lc3-15	a)			159,2
lc3-16	Nhfurfurilo	Ph	6-Cl	142,0
lc3-17	NHCH ₂ CH=CMe ₂	Ph	6-Cl	95,9
lc3-18	NHCH ₂ CH=C(Me)CH ₂ OH	Ph	6-Cl	154,8
lc3-19	NH ₂	Ph	6-Cl	157,8
lc3-20	NHNH ₂	Ph	6-Cl	175,0
lc3-21	NH(CH ₂) ₂ NMe ₂	Ph	6-Cl	102,1
lc3-22	NH(CH ₂) ₄ NH ₂	Ph	6-Cl	118,0
lc3-23	NHMe	Ph	6-Cl	186,9
lc3-24	NHEt	Ph	6-Cl	156,7
lc3-25	NMe ₂	Ph	6-Cl	141,8
lc3-26	NHCH ₂ CN	Ph	6-Cl	208,6 (descomposición)
lc3-27	NMeNH ₂	Ph	6-Cl	155,9
lc3-28	NHi-Pr	Ph	6-Cl	112,5
lc3-29	NHCH ₂ CH=CH ₂	Ph	6-Cl	147,3
lc3-30	NHCH ₂ C≡CH	Ph	6-Cl	168,4
lc3-31	NHCH ₂ CONH ₂	Ph	6-Cl	140,3
lc3-32	NHOMe	Ph	6-Cl	173,9
lc3-33	NHCH ₂ CO ₂ Et	Ph	6-Cl	146,1
lc3-34	NHCH ₂ CH ₂ CN	Ph	6-Cl	198,7
lc3-35	NHCHO	Ph	6-Cl	252,1
lc3-36	guanidina	Ph	6-Cl	253,4 (descomposición)

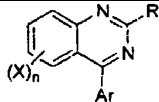
Tabla 5



Compuesto N°	R	Ar	(X) _n	Punto de fusión (°C)
lc3-37	NHtetrahydrofurfurilo	Ph	6-Cl	jarabe, a)
lc3-38	NH(CH ₂) ₃ OMe	Ph	6-Cl	89,1
lc3-39	NHCH ₂ CH(OH)CH ₃	Ph	6-Cl	154,2
lc3-40	NH(CH ₂) ₂ O(CH ₂) ₂ OH	Ph	6-Cl	117,4
lc3-41	NHCH ₂ CH(OH)CH ₂ OH	Ph	6-Cl	147,0
lc3-42	NHCH ₂ CO ₂ Me	Ph	6-Cl	190,5
lc3-43	NHCH ₂ CH ₂ CO ₂ Me	Ph	6-Cl	117,1
lc3-44	NHCH(Me)CH ₂ OH	Ph	6-Cl	52,8
lc3-45	NHCH ₂ CH ₂ OEt	Ph	6-Cl	jarabe, c)
lc3-46	NH(CH ₂) ₂ OEt	Ph	6-Cl	jarabe, d)
lc4-1	NH(CH ₂) ₂ OH	Ph	6-Br	
lc4-2	NH(CH ₂) ₂ OH	Ph	6-Br	140,9
lc4-3	NHCH ₂ CO ₂ Me	Ph	6-Br	183,1
				(descomposición)
lc5-1	NH-p-Cl-Ph	Ph	6-Me	
lc5-2	NHCH ₂ CONH ₂	Ph	6-Me	
lc5-3	NHCH ₂ CO ₂ Et	Ph	6-Me	
lc5-4	NH ₂	Ph	6-Me	151,8
lc5-5	NH(CH ₂) ₃ OH	Ph	6-Me	121,1
lc6-1	NH ₂	Ph	6-CF ₂	160,4
lc6-2	NH(CH ₂) ₃ OH	Ph	6-CF ₃	135,1
lc7-1	NH(CH ₂) ₃ OH NH(₃ OH	Ph	6-NO ₂	177,4
lc8-1	CH ₂) NH(CH ₂) ₂ OH	Ph	6-OMe	115,9

Compuesto N°	R	Ar	(X) _n	Punto de fusión (°C)
lc9-1	NH(CH ₂) ₃ OH	Ph	6-CN	173,3 (descomposición)
lc10-1	NH(CH ₂) ₃ OH	Ph	7-Cl	129,7

Tabla 6

				
Compuesto N°	R	Ar	(X) n	Punto de fusión (°C)
lc11-1	NH(CH ₂) ₂ OH	Ph	8-Cl	115,5
lc12-1	NH(CH ₂) ₃ OH	Ph	6,8-Cl ₂	146,2
lc12-2	NHCH ₂ CH ₂ OH	Ph	6,8-Cl ₂	168,8
lc12-3	NHfurfurilo	Ph	6,8-Cl ₂	158,6
lc12-4	NH ₂	Ph	6,8-Cl ₂	212,7
lc12-5	NHCH ₂ CN	Ph	6,8-Cl ₂	204,7
lc12-6	NHCH ₂ CO ₂ Me	Ph	6,8-Cl ₂	201,4
ld3-1	O(CH ₂) ₂ NH ₂	Ph	6-Cl	134,9
le3-1	S(CH ₂) ₂ OH	Ph	6-Cl	124,4
le3-2	S(CH ₂) ₂ NH ₂	Ph	6-Cl	88,3

a) La estructura se describió en el Ejemplo de Síntesis 11.
b) ¹H RMN (CDCl₃): 1,66-1,75 (1H, m), 1,86-2,08 (3H, m), 3,57-3,64 (1H, m), 3,75-3,83 (2H, m), 3,89-3,59 (1H, m), 4,13-4,20 (1H, m), 5,70 (1H, s a), 7,52-7,60 (5H, m), 7,64-7,69 (2H, m), 7,75-7,76 (1H, m).
c) ¹H RMN (CDCl₃): 1,22 (3H, t, J = 7,0 Hz), 3,55 (2H, c, J = 7,0 Hz), 3,68 (2H, t, J = 5,2 Hz), 3,78 (2H, tipo c, J = 5,2 Hz), 5,75 (1H, t a), 7,53-7,60 (5H, m), 7,65-7,69 (2H, m), 7,75-7,77 (1H, m).
d) ¹H RMN (CDCl₃): 1,22 (3H, t, J = 7,0 Hz), 1,96 (2H, quintuplete, J = 6,3 Hz), 3,50 (2H, c, J = 7,0 Hz), 3,58 (2H, t, J = 6,3 Hz), 3,67 (2H, tipo c, J = 6,3 Hz), 5,65 (1H, t a), 7,53-7,60 (5H, m), 7,65-7,69 (2H, m), 7,74-7,76 (1H, m).

5 Ejemplo de Síntesis de Referencia 1 (Preparación de 8-cloro-4-fenil-2(1H)-quinazolinona (compuesto N° II-11))

A 7,10 g de bromuro de fenilmagnesio (solución al 32 % en THF) se le añadió gota a gota una solución de 953 mg de 2-amino-3-clorobenzonitrilo en THF (7 ml) a temperatura ambiente seguido de calentamiento a reflujo durante 30 minutos. Al producto de reacción resultante se le añadieron gota a gota 885 mg de clorocarbonato de metilo en refrigeración con hielo seguido de calentamiento a reflujo durante 40 minutos. La solución de reacción resultante se enfrió y se vertió en 40 ml de ácido clorhídrico 2 N, y a la misma se le añadieron 8 g de bicarbonato sódico y 20 ml de MTBE seguido de agitación. Los cristales precipitados se recogieron por filtración para obtener 1,30 g del compuesto del título. ¹H RMN (DMSO-d₆): 7,24 (1H, t, J = 8,0 Hz), 7,57-7,70 (6H, m), 7,90-7,93 (1H, m), 11,45 (s a).

Ejemplo de Síntesis de Referencia 2 (4-fenil-6-trifluorometil-2(1H)-quinazolinona (compuesto N° II-6))

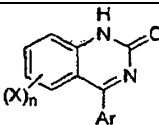
A una solución de 762 mg de 2-amino-5-trifluorometilbenzofenona en 10 ml de cloroformo se le añadieron gota a gota 349 mg de trietilamina, y después se añadieron gota a gota 627 mg de cloruro de tricloroacetilo en refrigeración con hielo. Después de agitar a la misma temperatura durante 30 minutos, se añadieron 50 ml de agua, separando de este modo la solución. La capa orgánica se recogió y después se concentró. El residuo resultante se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice (hexano:acetato de etilo = 5:1) para obtener 1,08 g de 2'-benzoil-2,2,2-tricloro-4'-trifluorometilacetanilida. ¹H RMN (CDCl₃): 7,53-7,58 (2H, m), 7,66-7,75 (3H, m), 7,90-7,95 (2H, m), 8,81 (1H, d, J = 8,6 Hz), 12,38 (1H, s a).

Una mezcla de 1,08 g de 2'-benzoil-2,2,2-tricloro-9'-trifluorometilacetanilida, 10 ml de DMSO y 1,18 g de acetato amónico se agitó a 75 °C durante 1 hora. Después de un periodo de refrigeración, se añadieron 100 ml de agua y los cristales precipitados se recogieron por filtración. La sustancia recogida resultante se disolvió en una mezcla de hexano:acetato de etilo = 1:1, se deshidrató usando sulfato de magnesio anhidro y después se concentró para obtener 765 mg del compuesto del título. ¹H RMN (CDCl₃): 7,58-7,68 (3H, m), 7,75 (1H, d, J = 8,8 Hz), 7,79-7,83 (2H, m), 7,53 (1H, dd, J = 8,6, 1,7 Hz), 8,17 (1H, s a), 13,37 (1H, s a).

Se muestran ejemplos de compuestos que pueden prepararse de la misma manera que en los Ejemplos de Síntesis de Referencia que se han descrito anteriormente en la Tabla 7 (incluyendo también los compuestos preparados en los Ejemplos de Síntesis de Referencia que se han descrito anteriormente).

Ha de apreciarse que "a)" a "i)" en la Tabla 7 son como se indica a continuación.

Tabla 7

			
Compuesto N°	Ar	(X) _n	Punto de fusión (°C)
II-1	Ph	5-Cl	a)
II-2	Ph	6-F	b)
II-3	Ph	6-Cl	>300
II-4	Ph	6-Br	c)
II-5	Ph	6-Me	291,9
II-6	Ph	6-CF ₃	d)
II-7	Ph	6-NO ₂	280 (descomposición)
II-8	Ph	6-OMe	e)
II-9	Ph	6-CN	f)
II-10	Ph	7-Cl	g)
II-11	Ph	8-Cl	h)
II-12	Ph	6,8-Cl ₂	i)
II-13	p-Cl-Ph	6-Cl	269,6(descomposición)
II-14	m-Cl-Ph	6-Cl	295(descomposición)

a) ¹H RMN (DMSO-d₆): 7,27 (1H, dd, J = 7,7, 1,0 Hz), 7,38 (1H, dd, J = 8,3, 1,1 Hz), 7,43-7,55 (5H, m), 7,69 (1H, t, J = 8,1 Hz), 12,18 (1H, s a).

b) ¹H RMN (DMSO-d₆): 7,35 (1H, dd, J = 9,2, 2,7 Hz), 7,43 (1H, dd, J = 9,2, 4,8 Hz), 7,58-7,74 (6H, m), 12,05 (1H, s a).

c) ¹H RMN (DMSO-d₆): 7,35 (1H, d, J = 9,2 Hz), 7,59-7,71 (6H, m), 7,91 (1H, dd, J = 9,2, 2,2 Hz), 12,08 (1H, s a).

d) ¹H RMN descrita en el Ejemplo de Síntesis de Referencia 2

e) ¹H RMN (CDCl₃): 3,78 (3H, s), 7,25-7,27 (1H, m), 7,36-7,40 (1H, m), 7,54-7,62 (4H, m), 7,81-7,85 (2H, m), 13,37 (1H, s a).

f) ¹H RMN (DMSO-d₆): 7,48 (1H, d, J = 8,4 Hz), 7,60-7,68 (3H, m), 7,71-7,74 (2H, m), 8,05 (1H, s), 8,08-8,12 (1H, m), 12,36 (1H, s a).

g) (sin aislar ni purificar)

h) ¹H RMN descrita en el Ejemplo de Síntesis de Referencia 1

i) ¹H RMN (DMSO-d₆): 7,52-7,72 (6H, m), 8,10-8,12 (1H, m), 11,69 (1H, s a).

Ejemplo 1 (Construcción de biblioteca de fagos de ADNc de Arabidopsis thaliana para clonación de CER1)

5 Se estilizaron semillas de Arabidopsis thaliana, línea Wassilewskija con alcohol etílico al 70% durante un minuto y después con hipoclorito sódico al 1,5% durante 10 minutos. Las semillas se lavaron bien con agua estéril y después se cultivaron en un medio GM (mezcla salina basal de Murashige y Skoog 4,3, sacarosa al 1%, 10 ml de MES-KOH al 5% (pH 5,7), Phytigel™ (SIGMA) al 0,3%) durante 2 semanas para obtener 5 g de una planta. La planta se

10 congeló en nitrógeno líquido y después se molió físicamente con un mortero. Al producto molido obtenido se añadió una mezcla de 10 mg de tampón de extracción (Tris-HCl 200 mM (pH 8,5), NaCl 100 mM, EDTA 10 mM, SDS al 0,5%, β-mercaptoetanol 14 mM) y 10 g de fenol. La mezcla se agitó mediante una mezcladora Voltex. Después, se

15 añadieron 10 ml de cloroformo a la mezcla, seguido de agitación minuciosa. Después, la mezcla obtenida se centrifugó a 10.000 rpm durante 20 minutos, y se recogió una capa acuosa. A la capa acuosa recogida se añadió LiCl a una concentración final de 2 M, seguido de reposo a -80°C durante 3 horas. El producto congelado obtenido se descongeló y después se centrifugó a 10.000 rpm durante 20 minutos. Se recogió un precipitado. El precipitado

20 recogido se disolvió en 2 ml de TE (Tris-HCl 10 mM (pH 8,0), EDTA 1 mM). Después de añadir 0,2 ml de acetato sódico 3 M (pH 5,2) y 5 ml de etanol a la solución, la mezcla se centrifugó para recoger un precipitado de ADN. Después, se extrajo ARN que contenía poliA del precipitado recogido (ARN) con Oligotex™ dT30super (fabricado por Roche Japan Co., Ltd.).

Se construyó una biblioteca de ADNc en fagos a partir del ARN extraído que contenía poliA usando el kit ZAP-cDNASynthesis (fabricado por Stratagene Co., Ltd.) de acuerdo con las instrucciones del kit. El título de la biblioteca de ADNc en fagos construida fue 500.000 PFU.

Ejemplo 2 (Preparación de sonda de ADN para CRE1)

Se realizó reacción de PCR usando un líquido de fagos (aproximadamente 1.000.000 PFU) de la biblioteca de ADNc en fagos preparada en el Ejemplo 1 como molde y un ADN de la SEC ID N° 3 y un ADN de la SEC ID N° 4 como cebadores, usando el kit TAKARA LA Tag™ (fabricado por Takara Shuzo Co., Ltd.) para amplificar un ADN. Los

30 detalles se describen a continuación.

El líquido de reacción de PCR se preparó añadiendo composiciones de reacción tales como dNTP a 1.000.000 PFU del fago y cada uno de los ADN cebadores 0,2 mM de acuerdo con las instrucciones del kit. La PCR se realizó en condiciones que después de mantenimiento en calor a 94°C durante 2 minutos, se ejecutaron 40 ciclos a 94°C durante 30 segundos, a 55°C durante 30 segundos y a 68°C durante 5 minutos, para amplificar el fragmento deseado de ADN. Después, se preparó una sonda marcada con ³²P usando el fragmento amplificado de ADN como molde y usando el kit Megaprime DNA-labelling system (fabricado por Amersham Pharmacia). Aquí, se preparó un líquido de reacción (25 µl) añadiendo 32PdCTP 2,0 MBq a 25 ng del fragmento amplificado de ADN y después añadiendo composiciones de reacción especificadas por el kit al mismo. La reacción de marcaje se realizó a 37°C durante 10 minutos.

Ejemplo 3 (Obtención de clon de ADNc en fago que porta el gen CRE1)

El gen DRE1 deseado se clonó por hibridación de placas usando la sonda de ADN preparada en el Ejemplo 2. A continuación se describen los detalles.

Se formaron placas usando la biblioteca de ADNc en fagos preparada en el Ejemplo 1 de acuerdo con las instrucciones del kit ZAP-cDNARSynthesis. Los ADN se adsorbieron en un filtro de nitrocelulosa desde las placas formadas, y después se fijaron en el filtro mediante tratamiento ultravioleta. El filtro así preparado se mantuvo a 65°C en presencia de SSC 6 x (NaCl 0,9 M, citrato sódico 0,09 M), solución de Denhart 5 x (0,1% (p/v), Ficoll 400, polivinil pirrolidona al 0,1% (p/v), BSA al 0,1%), SDS al 0,5% (p/v), y 100 µg/ml de ADN de esperma de salmón desnaturalizado o en una solución DIG EASY Hyb (Boehringer Mannheim Co., Ltd.) que contenía 100 µg/ml de ADN de esperma de salmón desnaturalizado, mantenido dos veces a temperatura ambiente durante 15 minutos en presencia de SSC 1 x (NaCl 0,15 M, citrato sódico 0,015 M) y SDS al 0,5%, y después mantenido a 68°C durante 30 minutos en presencia de SSC 0,1 x (NaCl 0,015 M, citrato sódico 0,0015 M) y SDS al 0,5% para obtener un clon de ADNc en fago hibridado.

Ejemplo 4 (Clonación del ADNc de CRE1)

Se realizó reacción de PCR usando ADNc del clon de ADNc en fago obtenido en el Ejemplo 3 como molde y usando un ADN de la SEC ID N° 5 y un ADN de la SEC ID N° 6 como cebadores para amplificar un ADN que tiene la secuencia de nucleótidos de la SEC ID N° 5. A continuación se describen los detalles.

La reacción de PCR se realizó usando ADN polimerasa potenciada Herculase (fabricada por TOYOBO Co., Ltd.) en condiciones de amplificación que después de mantenimiento en calor a 94°C durante 1 minuto, se ejecutaron 25 ciclos a 94°C durante 30 segundos, a 55°C durante 30 segundos y a 72°C durante 4 minutos. Aquí, se preparó un líquido de reacción de PCR (50 µl) añadiendo composiciones de reacción tales como dNTP a 500 ng de ADNc del clon de ADNc en fago y 100 ng de cada ADN cebador de primer de acuerdo con las instrucciones del kit.

Como se ha descrito anteriormente, se amplificó el fragmento deseado de ADN.

Ejemplo 5 (Construcción de plásmido de expresión de CRE1)

Se digirió un vector de expresión de levadura, p415CYC (Munberg et al. Gene: 156 119-122 (1995), disponible en la biblioteca ATCC (N° 87382)) con la enzima de restricción Sma I. Después, el fragmento de ADN obtenido en el Ejemplo 4 (un ADN que tiene la secuencia de nucleótidos de la SEC ID N° 2) se conectó a una secuencia promotora CYC1 del vector de expresión p415CYC1 usando ADN ligasa T4, y de este modo se incorporó de modo que la proteína deseada podría expresarse en levadura. Se confirmó que la secuencia de nucleótidos del fragmento de ADN estaba insertada en la dirección correcta y era una secuencia de nucleótidos de la SEC ID N° 2 usando un secuenciador. Por tanto, se obtuvo el plásmido de expresión p415CYC-CRE1.

Ejemplo 6 (Producción de la célula transformada TM182-CRE1 y la célula transformada TM182-p415CYC1)

Cada uno del plásmido de expresión p415CYC-CRE1 obtenido en el Ejemplo 5 y el vector de expresión de levadura p425CYC se usó para transformar una cepa deficiente en el gen Sln1, TM182 (sln1Δ) (Maeda T et al. Nature: 369 242-245 (1994)). La transformación se realizó usando un método de transformación mediado por polietilenglicol/acetato de litio (PEG/LiAc) de acuerdo con VII. Library Transformation & Screening Protocols descritos en CLONTECH Co., Ltd.: MATCHMAKER Two-Hybrid System 3 User Manual, página 22. Como desaparece la necesidad nutricional de leucina en la célula transformada obtenida, se seleccionaron levaduras transformadas capaces de crecer en un medio DOLU + Gal para obtener la célula transformada TM182-CRE1 y la célula transformada TM182-p415CYC1.

Ejemplo 7 (Método para buscar sustancia química capaz de inhibir la señalización intracelular desde receptor de citoquinina derivado de plantas de una célula)

La célula transformada TM182-CRE1 y la célula transformada TM182-p415CYC1 obtenidas en el Ejemplo 6 se inocularon cada una en 10 ml de un medio DOLU + Gal, y se preincubaron a 30°C durante 18 horas para obtener un

líquido de preincubación para cada una de las células transformadas. El líquido de preincubación se diluyó con un medio DOLU + Glu para la célula transformada TM182-CRE1 o con un medio DOLU + Gal para la célula transformada TM182-p415CYC1 hasta que se alcanzó DO600 = 0,1, para obtener una dilución de preincubación para cada una de las células transformadas.

5 A cada pocillo de una placa de 96 pocillos se añadió 1 µl de una solución de 200 ppm de una sustancia de ensayo en dimetilsulfóxido (DMSO) para preparar una placa de ensayo. Al mismo tiempo, como controles, se añadió solamente 1 µl de DMSO a una parte de los pocillos. Se preparó una placa de ensayo para la célula transformada TM182-CRE1 y una placa de ensayo para la célula transformada TM182-p415CYC1.

10 Una solución de 10.000 ppm de trans-zeatina (citoquinina) en DMSO se diluyó 50 veces con un medio DOLU + Gul hasta 200 ppm. La solución de 200 ppm de trans-zeatina se añadió en una cantidad de 3/1.000 de volumen a cada dilución de preincubación descrita anteriormente para preparar cada dilución de preincubación que contiene trans-zeatina a 0,6 ppm. La dilución de preincubación de 0,6 ppm se añadió en una cantidad de 100 µl a cada uno de los pocillos de la placa de ensayo para cada célula transformada. Las placas se incubaron a 30°C durante 24 horas. Después, se midió la turbidez (DO 600) de cada pocillo usando un lector de placa. La actividad de la sustancia de ensayo para inhibir la señalización intracelular desde un receptor de citoquinina derivado de plantas de una célula se ensayó comparando la turbidez medida con la turbidez del pocillo de control. Los resultados se muestran en las Tablas 8 y 9.

20 Para la célula transformada TM182-CRE1, se seleccionó una sustancia de ensayo que tenía una turbidez inferior que la turbidez del pocillo de control como sustancia química capaz de inhibir la señalización intracelular desde un receptor de citoquinina derivado de plantas de una célula. Para la célula transformada TM182-p415CYC1, sin embargo, una sustancia de ensayo que tenía una turbidez inferior que la turbidez del pocillo de control en que el grado de disminución es equivalente a o mayor que en el caso de la célula transformada TM182-CRE1 era tóxica para la levadura, y por lo tanto no se seleccionó como sustancia química capaz de inhibir la señalización intracelular desde un receptor de citoquinina derivado de plantas de una célula.

30 **(Tasa de crecimiento relativo en la sección de ensayo respecto a la sección de control) [%] = [(Turbidez en la sección de ensayo) - (Turbidez en el blanco)] / [(Turbidez en la sección de control) - (Turbidez en el blanco)] x 100**

35 **(Actividad de inhibición de la señalización intracelular desde receptor de citoquinina derivado de plantas de una célula) [%] = 100 - (Tasa de crecimiento relativo en la sección de ensayo respecto a la sección de control)**

Tabla 8

Sustancia química (compuesto N°)	Tasa de crecimiento relativo (%) en la sección de ensayo de sustancia de ensayo respecto a la sección de control		Actividad (%) de sustancia de ensayo para inhibir la señalización intracelular desde receptor de citoquinina derivado de plantas de una célula
	Célula transformada TM182-CRE1	Célula transformada TM182-p415CYC1	
la1-3	5,5	113,9	94,5
la1-7	1,2	78,8	98,8
lb4-1	8,7	110,9	91,3
lc11-1	2,2	114,5	97,8
lc12-1	2,8	106,3	97,2
lc2-1	2,8	124,6	97,2
lc3-1	5,4	114,1	94,6
lc3-3	1,4	108,6	98,6
lc3-4	1,4	106,4	98,6
lc3-5	3,5	115,4	96,5
lc3-6	2,8	114,6	97,2
lc3-7	2,8	104,1	97,2
lc3-9	1,5	122,0	98,5
lc3-11	3,9	84,6	96,1
lc3-12	5,6	90,9	94,4
lc3-16	3,2	97,0	96,8
lc3-18	4,0	105,3	96,0
lc3-19	2,4	102,7	97,6
lc3-20	5,0	86,5	95,0
lc3-21	5,0	121,6	95,0
lc3-22	4,9	110,6	95,1
lc3-23	4,1	108,1	95,9

Sustancia química (compuesto N°)	Tasa de crecimiento relativo (%) en la sección de ensayo de sustancia de ensayo respecto a la sección de control		Actividad (%) de sustancia de ensayo para inhibir la señalización intracelular desde receptor de citoquinina derivado de plantas de una célula
	Célula transformada	Célula transformada	
lc3-24	2,1	112,5	97,9
lc3-25	6,0	122,0	94,0
lc3-26	5,3	110,7	94,7
lc3-27	2,3	107,4	97,7
lc3-29	1,6	92,7	98,4

En todos los casos, la concentración existente de trans-zeatina se ajustó a 0,6 ppm y la concentración existente de una sustancia química se ajustó a 2 ppm.

Tabla 9

Sustancia química (compuesto N°)	Tasa de crecimiento relativo (%) en la sección de ensayo de sustancia de ensayo respecto a la sección de control		Actividad (%) de sustancia de ensayo para inhibir la señalización intracelular desde receptor de citoquinina derivado de plantas de una célula
	Célula transformada TM182-CRE1	Célula transformada TM182-p415CYC1	
lnc3-30	2,2	108,9	97,8
lc3-32	4,5	89,2	95,5
lc3-33	1,0	114,6	99,0
lc3-34	0,2	118,5	99,8
lc3-37	3,5	114,2	96,5
lc3-38	1,2	99,4	98,8
lc3-39	-1,3	108,1	101,3
lc3-40	0,7	123,4	99,3
lc3-41	8,8	123,3	91,2
lc3-42	-0,7	111,5	100,7
lc3-43	0,8	122,0	99,2
lc3-44	7,0	101,4	93,0
lc3-45	0,8	98,7	99,2
lc3-46	1,3	92,2	98,7
lc4-1	4,6	95,0	95,4
lc4-2	0,9	109,3	99,1
lc5-4	8,9	116,6	91,1
lc5-5	7,2	126,3	92,8
lc7-1	6,7	115,8	93,3
ld3-1	2,1	112,5	97,9
le3-1	2,3	110,7	97,7

5 En todos los casos, la concentración existente de trans-zeatina se ajustó a 0,6 ppm y la concentración existente de una sustancia química se ajustó a 2 ppm.

10 **Ejemplo 8 (Método para ensayar la respuesta a dosis de sustancia química capaz de inhibir la señalización intracelular desde receptor de citoquinina derivado de plantas de una célula)**

15 Las sustancias químicas (que inhiben la señalización intracelular desde un receptor de citoquinina derivado de plantas de una célula) seleccionados en el Ejemplo 7 se ensayaron a variables concentraciones de ensayo del mismo modo que en el Ejemplo 7. La célula transformada TM182-CRE1 y la célula transformada TM182-p415CYC1
 20 obtenidas en el Ejemplo 6 se incubaron en las mismas condiciones que en el Ejemplo 7 excepto que las concentraciones de ensayo de las sustancias químicas (que inhiben la señalización intracelular desde un receptor de citoquinina derivado de plantas de una célula) seleccionadas en el Ejemplo 7 se variaron dentro del intervalo de 0,06 ppm a 6 ppm. La concentración de la sustancia química ensayada se ajustó con DMSO. Después de completar la incubación, se examinó la respuesta a dosis para la actividad de inhibición de la señalización intracelular desde un receptor de citoquinina derivado de plantas de una célula a partir de la concentración de ensayo mínima a la que no se observó estado proliferativo de la célula transformada TM182-CRE1, o a partir de una curva de inhibición de crecimiento de respuesta a dosis obtenida por un método como se describe a continuación.

25 Para hacer una curva de inhibición de crecimiento de respuesta a dosis, primero se calculó una tasa de crecimiento relativo del siguiente modo.

(Tasa de crecimiento relativo) [%] = (B) / (A) x 100

(A) = [(Turbidez en la sección de ensayo de 0,06 ppm) - (Turbidez en el blanco)] / [(Turbidez en la sección de control) - (Turbidez en el blanco)]

(B) = [(Turbidez en cada sección de ensayo) - (Turbidez en el blanco)] / [(Turbidez en la sección de control) - (Turbidez en el blanco)]

Entonces, se hizo un gráfico en que el eje X mostraba la concentración de una sustancia química de ensayo y el eje Y mostraba una tasa de crecimiento relativo (véase la Fig. 1, figuras de la izquierda: célula transformada TM182-CRE1, figuras de la derecha: célula transformada TM182-p415CYC1) para obtener una curva de inhibición del crecimiento de respuesta a dosis.

Ejemplo 9 (Ensayo de actividad promotora del crecimiento de raíces)

Se preparó medio convencional Enshi que tenía la siguiente composición (véase la Tabla 10). Se distribuyeron en tubos de agrupación en cada uno 4 µl de una solución de una sustancia química en DMSO hasta una concentración final de 0,001 ppm a 10 ppm, y después, se distribuyeron en cada uno 600 µl del medio convencional Enshi esterilizado. Después se mezcló bien la solución resultante. En cada uno de los tubos de agrupación, se sembraron 10-20 semillas de Arabidopsis thaliana, y se cultivaron a 22°C durante 10 días en luz. Después, se midió la longitud de las raíces principales (raíces principales promedio) generadas a partir de las semillas de Arabidopsis thaliana. Se determinó un promedio de ocho repeticiones, y se determinó una tasa de crecimiento de raíces de acuerdo con la siguiente ecuación. Como resultado, pudo juzgarse que una sustancia química que mostraba una tasa significativa de crecimiento de raíces (por ejemplo, una tasa de crecimiento de raíces del 120% o más) tenía una actividad promotora del crecimiento de raíces.

Como resultados detallados, se mostraron concentraciones finales que mostraban las tasas de crecimiento de raíces más altas en la Tabla 11 y la Tabla 12.

Tasa de crecimiento de raíces (%) = (Longitud primerio de raíz principal en la sección tratada con sustancia química) / (Longitud promedio de raíz principal en la sección de control) x 100

Tabla 10

Composición		Concentración (mg/l)
Nitrato de calcio	Ca (NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	950
Nitrato de potasio	KNO ₃	810
Sulfato de magnesio	MgSO ₄ ·7H ₂ O	500
Fosfato de amonio	NH ₄ H ₂ PO ₄	155
Quelato de hierro	Fe-EDTA	22,62
Ácido bórico	H ₃ BO ₃	2,86
Sulfato de manganeso	MnSO ₄ ·4H ₂ O	1,81
Sulfato de zinc	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,22
Sulfato de cobre	CuSO ₄ ·5H ₂ C	0,08
Molibdato de sodio	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,025
Ajustado a pH 5,8		

Tabla 11

Compuesto N°	Concentración final de ensayo (ppm)	Actividad promotora del crecimiento de raíces
lc3-3	5	163,4
lc3-4	0,625	129,5
lc3-5	0,625	134,0
lc3-6	0,625	122,4
lc3-7	1,25	142,5
lnc3-8	1,25	136,4
la1-3	5	137,5
le3-1	5	120,9
le3-2	10	147,6
lc3-10	10	120,6
lc3-11	1,25	128,2
lc3-12	1,25	128,9
lc3-13	10	140,5
lc3-14	2,5	126,2

Compuesto N°	Concentración final de ensayo (ppm)	Actividad promotora del crecimiento de raíces
lc3-15	5	131,0
lc3-16	5	155,3
lc3-17	10	121,3
lc3-18	2,5	139,5
lc3-19	1,25	155,6
lc3-20	10	137,8
lc3-21	2,5	131,7
lc3-22	0,156	129,3
lc3-23	10	150,0
lc3-24	1,25	122,6
lc3-25	10	140,0
lc3-26	5	136,4
lc3-27	2,5	127,8
lc5-4	2,5	136,6
lc5-5	2,5	157,8
lc3-28	10	120,4
lc3-29	10	122,4
lc3-31	10	142,2
lc3-32	5	123,4
lc3-33	5	123,9

Tabla 12

Compuesto N°	Concentración final de ensayo (ppm)	Actividad promotora del crecimiento de raíces
lc3-35	10	144,4
lc3-36	2,5	123,1
la1-1	5	133,3
la1-2	10	139,7
lc2-1	2,5	127,4
lc9-1	10	141,5
lc1-1	2,5	150,9
lc10-1	10	163,6
lc11-1	5	143,9
lc12-1	2,5	184,6
lc6-2	2,5	155,9
la1-6	0,625	126,9
lc8-1	10	162,1
lc3-37	5	138,5
lc3-38	5	141,9
lc3-39	10	169,0
lc3-40	0,625	125,8
lc3-41	5	134,5
lc3-42	0,625	128,6
lc3-43	2,5	137,9
lc3-44	1,25	126,5
lc3-46	2,5	121,6
lc12-3	2,5	138,8
la1-14	0,156	129,3
II-5	10	124,4
II-7	5	124,4
II-14	2,5	126,1

Ejemplo 10 (Evaluación usando lechuga de la actividad promotora del crecimiento de raíces de la sustancia capaz de inhibir la señalización de citoquinina)

- 5 Con respecto a la sustancia química lc3-1 y la sustancia química lc7-1 (que inhiben la señalización intracelular desde un receptor de citoquinina derivado de plantas de una célula) seleccionadas en el Ejemplo 7, se evaluó una actividad promotora del crecimiento de la raíz principal usando lechuga (*Lactuca sativa* Red wave). Se prepararon soluciones acuosas de la sustancia química que tenían diferentes concentraciones (0,6 ppm, 1,2 ppm, 2,5 ppm, 5 ppm, 10 ppm, 20 ppm, conteniendo cada una DMSO al 0,1%), y se añadieron en una cantidad de 1 ml en un papel de filtro que tenía un diámetro de 50 mm en una placa petri de plástico de 60 φ. Después, se sembraron 30 semillas de lechuga en la placa petri de plástico. Después de cultivar en luz a 22°C durante 4 días, se midió la longitud de
- 10

una raíz principal. Se determinó un promedio de 3 repeticiones y se determinó una tasa de crecimiento de raíces por la siguiente ecuación.

$$5 \quad \text{Tasa de crecimiento de raíces (\%)} = (\text{Longitud promedio de raíz principal en la sección tratada con sustancia química}) / (\text{Longitud promedio de raíz principal en la sección de control}) \times 100 - 100$$

Los resultados se muestran en la Fig. 2 y Fig. 3. En el caso de la sustancia química Ic3-1, el crecimiento de raíz principal a 0,6 ppm hasta 2,5 ppm se aumentó en un 15 a 17% respecto a la sección de control (véase la Fig. 2). En el caso de la sustancia química Ic7-1, la extensión de raíz principal a 10 ppm hasta 20 ppm se aumentó en un 10 a 17% respecto a la sección de control (véase la Fig. 3). Los resultados del ensayo de Dunnett mostraron que hubo diferencia significativa a un nivel significativo del 5% en todas las secciones de tratamiento, y por lo tanto, hubo efecto remarcable promotor del crecimiento de raíces.

15 **Ejemplo 11 (Evaluación usando arroz de la actividad promotora del crecimiento de raíces de sustancia capaz de inhibir la señalización de citoquinina)**

Con respecto a la sustancia química Ic3-1 y la sustancia química Ic7-1 (que inhiben la señalización intracelular desde un receptor de citoquinina derivado de plantas de una célula) seleccionadas en el Ejemplo 7, se evaluó una actividad promotor del crecimiento de raíz principal usando arroz (*Oriza sativa* L. japonica). Se prepararon soluciones acuosas de la sustancia química que tenían diferentes concentraciones (10 ppm, 25 ppm, conteniendo cada una DMSO al 0,1%). Se impregnó un papel absorbente con 17 ml de la solución química, donde el papel grueso se colocó en una bolsa de crecimiento de semillas para la observación del crecimiento de raíces (177 mm x 163 mm, fabricada por Daiki Rika Kogyo Co., Ltd.), y se sembraron 3 semillas de arroz sobre el papel absorbente. La bolsa se puso en un recipiente de plástico, y después se precintó. Después de cultivo en luz a 25°C durante 7 días, se midió la longitud de la raíz principal. Se determinó un promedio de 3 repeticiones y se determinó una tasa de crecimiento de raíces mediante la siguiente ecuación.

$$30 \quad \text{Tasa de crecimiento de raíces} = (\text{Longitud promedio de raíz principal en la sección tratada con sustancia química}) / (\text{Longitud promedio de raíz principal en la sección de control}) \times 100 - 100$$

Los resultados se muestran en la Fig. 4 y la Fig. 5. En el caso de la sustancia química Ic3-1, el crecimiento de raíz principal a 10 ppm se aumentó en un 17% y el crecimiento de raíz principal a 25 ppm se aumentó en un 20%, respecto a la sección de control (véase la Fig. 4). En el caso de la sustancia química Ic7-1, el crecimiento de raíz principal a 10 ppm se aumentó en un 17% y el crecimiento de raíz principal a 25 ppm se aumentó en un 19%, respecto a la sección de control (véase la Fig. 5). Los resultados del ensayo de Dunnett mostraron que hubo diferencia significativa a un nivel significativo del 5% en todas las secciones de tratamiento, y por lo tanto, hubo efecto remarcable promotor del crecimiento de raíces.

40 **Ejemplo 12 (Evaluación de la actividad promotora del crecimiento de raíces de sustancia capaz de inhibir la señalización de citoquinina por tratamiento de semillas de arroz)**

Con respecto a la sustancia química Ic3-1 y la sustancia química Ic7-1 (que inhiben la señalización intracelular desde un receptor de citoquinina derivado de plantas de una célula) seleccionadas en el Ejemplo 7, se evaluó una actividad promotora del crecimiento de raíz principal inducida por el tratamiento de semillas usando arroz (*Oriza sativa* L. japonica). La sustancia química se disolvió en acetona para preparar una solución de 10.000 ppm. La solución de sustancia química en acetona (300 ul) preparada de este modo se puso en un tubo eppendorf. Después, se pusieron 15 semillas en el tubo eppendorf. La mezcla resultante se mezcló durante aproximadamente 30 segundos. Las semillas tratadas químicamente de este modo se extendieron y se secaron en un papel de filtro.

Se pusieron aproximadamente 820 ml de suelo de cultivo en un recipiente de plástico (120 mm de longitud, 97 mm de altura) con un orificio en el fondo. Las semillas tratadas químicamente se sembraron en el recipiente de plástico (15 semillas por recipiente de plástico). Las semillas se cultivaron en un lugar oscuro a 30°C durante 4 días y después se cultivaron en un invernadero durante 35 días. Las raíces de la planta cultivada de este modo se retiraron y el suelo adherido a la planta se retiró por lavado, seguido de secado por congelación. Después, se midió el peso de las raíces después de secado por congelación. Se repitió un ensayo 3 veces para cada sección de tratamiento, y se determinó un promedio. Los resultados se muestran en la Fig. 6.

En el caso del compuesto Ic3-1, el peso seco de las raíces por planta aumentó hasta el 119% de la sección de control. En el caso del compuesto Ic7-1, el peso seco de las raíces por planta aumentó hasta el 126% de la sección de control. En ambos casos, se encontró un efecto remarcable promotor del crecimiento de raíces. En el caso de un compuesto de auxina IAA, el peso de las raíces se suprimió hasta el 87% de la sección de control, y por tanto, se encontró un efecto inhibidor del crecimiento de raíces.

Ejemplo 13 (Evaluación de la actividad promotora de la diferenciación de plantas de sustancia capaz de inhibir la señalización de citoquinina, usando hipocótilo de *Arabidopsis thaliana*)

Con respecto a la sustancia química Ic3-1 y la sustancia química Ic7-1 (que inhiben la señalización intracelular desde un receptor de citoquinina derivado de plantas de una célula) seleccionadas en el Ejemplo 7, se evaluó una actividad promotora de la diferenciación de plantas examinando una actividad de formación de raíces adventicias usando un hipocótilo de *Arabidopsis thaliana* Columbia.

Primero, se preparó un medio de agar para sembrar *Arabidopsis thaliana*. El medio de agar contiene, como componentes por 1 litro de una solución acuosa, 1 parcela de sales mixtas para medio vegetal Murashige-Scoog (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) para 1 litro, 10 g de sacarosa, 10 ml de una solución acuosa de MES al 5% (ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico) ajustada a pH 5,7 con hidróxido potásico, 100 mg de inositol, 1 ml de solución madre de vitaminas (10 g de clorhidrato de tiamina, 1 g de clorhidrato de piridoxina, y 1 g de ácido nicotínico por 1 litro de una solución acuosa) y 8 g de agar. Después, el medio de agar se sometió a autoclave a 12°C durante 20 minutos, se distribuyó en placas petri circulares, y después se solidificó.

Se pusieron semillas de *Arabidopsis thaliana* (aproximadamente 25 µl) en un tubo de 1,5 ml. Al mismo se añadió 1 ml de una solución diluida 10 veces de una solución de hipoclorito sódico (Nacalai Tesque) con agua destilada esterilizada. Las semillas se esterilizaron con agitación durante aproximadamente 1 minuto con una mezcladora de tubos (TOMY, MT-360, MIXING SPEED10). Después de sedimentarse las semillas por una centrifuga portátil de pequeño tamaño, se retiró la solución diluida de la solución de hipoclorito sódico del tubo. Después de añadir nuevamente 1 ml de agua destilada esterilizada al tubo, las semillas se lavaron por agitación con la mezcladora de tubos durante aproximadamente 1 minuto. Las semillas se sedimentaron por una centrifuga portátil de pequeño tamaño, y después se retiró el agua después del lavado del tubo. La operación de lavado se repitió 3 veces. Después de completarse el lavado, las semillas se sembraron en el medio de agar en la placa petri circular, y se germinaron y cultivaron en un lugar oscuro a 22°C.

Por separado, la sustancia química se disolvió en DMSO para preparar una solución de 10.000 ppm. Además, la solución se diluyó con DMSO para preparar soluciones de 6.000 ppm, 2.000 ppm, 600 ppm y 200 ppm. En cada pocillo de una placa de 12 pocillos (SUMITOMO BAKELITE Co., Ltd.), se distribuyeron 2 µl de la solución de DMSO que contenía un tipo de la sustancia química a una concentración. En un pocillo como control, se distribuyeron 2 µl de DMSO en lugar de la sustancia química en solución de DMSO. Después, se disolvió trans-zeatina en DMSO para preparar una solución de 10.000 ppm. La solución se diluyó con agua destilada esterilizada para preparar una solución de 10 ppm. Se preparó un medio de agar que tenía la composición anterior, se sometió a autoclave y después se enfrió hasta aproximadamente 50°C. A este medio de agar se añadió la solución de trans-zeatina de 10 ppm hasta una concentración final de 0,01 ppm, seguido de mezcla. El medio de agar que contiene trans-zeatina (2 ml cada uno) se distribuyó en cada pocillo de la placa de 12 pocillos en que se había distribuido la sustancia química en solución de DMSO o DMSO, y después se solidificó.

Se cortó una plántula de *Arabidopsis thaliana* después de germinación y cultivo en un sitio oscuro a 22°C en la parte de hipocótilo, y el hipocótilo en el lado con cotiledones se usó para la medición de una actividad de formación de raíces adventicias como se describe a continuación. El hipocótilo en el lado con raíces se descartó. Específicamente, el hipocótilo con cotiledones se insertó en el medio de agar en cada pocillo de la placa de 12 pocillos hasta aproximadamente 5 mm desde la parte cortada. La placa multipocillo se dejó en reposo en luz a 22°C durante 16 horas (en oscuridad durante 8 horas). Como resultado, se formaron raíces adventicias a partir de la parte de hipocótilo insertada en el medio de agar que contenía la sustancia química Ic3-1 (en todas las secciones de ensayo que tienen, cada una, una concentración final de 6 ppm, 2 ppm, 0,6 ppm o 0,2 ppm) y la parte de hipocótilo insertada en el medio de agar que contenía la sustancia química Ic7-1 (en secciones de ensayo que tenían, cada una, una concentración final de 6 ppm o 2 ppm). En la sección de control en que se añadió DMSO en lugar de la sustancia química en solución de DMSO, no pudo encontrarse formación de raíces adventicias a partir de la parte de hipocótilo. Los resultados de ensayo en el caso del eje embrionario insertado en el medio de agar que contenía la sustancia química Ic3-1 que tiene una concentración final de 0,6 ppm, el hipocótilo insertado en el medio de agar que contenía la sustancia química Ic7-1 que tiene una concentración final de 2 ppm, y el hipocótilo insertado en el medio de agar de la sección de control se muestran en la Fig. 7.

Ejemplo 14 (Medición usando arroz de la actividad promotora del crecimiento de raíces de sustancia capaz de inhibir la señalización de citoquinina)

Con respecto a la sustancia química Ic3-3, se midió una actividad promotora del crecimiento de raíces usando arroz (*Oriza sativa japonica* Nipponbare).

Primero, se preparó una solución de acetona que contenía una concentración predeterminada de la sustancia química y después se diluyó 100 veces con agua destilada hasta 10 ppm (que contenía acetona al 1%) para obtener una solución de sustancia química. Las semillas se sumergieron en agua durante 2 días para estimular la germinación. Las semillas se sembraron en una placa de siembra de 288 pocillos (3 semillas por pocillo), y después se empapó el suelo con la anterior solución de sustancia química en una cantidad de 500 µl por pocillo. Después de

cubrir con tierra, la placa de siembra se puso en una bolsa de plástico y después se colocó en una habitación de aire acondicionado (sitio oscuro a 30°C) durante 3 días. Después de retirar la bolsa de plástico de la placa de siembra, la placa de siembra se puso en condiciones luminosas de luz/oscuridad = 16 h/8 h durante 4 días mientras el fondo se irrigaba todo el tiempo. Por tanto, se cultivaron semillas de arroz para obtener arroz crecido. Las raíces resultantes de arroz se lavaron y se analizó la longitud total de la raíz usando un analizador de imágenes para la medición de la longitud de la raíz WinRHIZO (fabricado por Regent Instruments). En la sección tratada con sustancia química Ic3-3, se promovía de forma remarcable el crecimiento de la raíz, en comparación con la sección de control (UTC) en que solamente se usó acetona en el tratamiento por empapamiento del suelo. Se muestra una fotografía en la Fig. 8. Los resultados analíticos obtenidos por el analizador de imágenes para la medición de la longitud de la raíz mostraron un aumento de la longitud total de la raíz en la sección tratada con sustancia química Ic3-3. Los resultados se muestran en la Fig. 9.

Ejemplo 15 (Clonación de ADNc de CRE1, N° 2)

Se realizó reacción de PCR usando el plásmido de expresión p415CYC-CRE1 obtenido en el Ejemplo 5 como molde y usando un ADN de la SEC ID N° 7 y un ADN de la SEC ID N° 8 como cebadores para amplificar un ADN que tiene la secuencia de nucleótidos de la SEC ID N° 2. A continuación se describen los detalles.

La reacción de PCR se realizó usando ADN polimerasa KOD Plus (fabricada por TOYOBO Co., Ltd.) en condiciones de amplificación que después de mantenimiento en calor a 94°C durante 1 minuto, se ejecutaron 30 ciclos a 94°C durante 15 segundos, a 58°C durante 30 segundos y a 68°C durante 3 minutos y 3C segundos. Aquí, se preparó un líquido de reacción de PCR (50 µl) añadiendo composiciones de reacción tales como dNTP a 500 ng del plásmido p415CYC-CRE1 y 100 ng de cada ADN cebador de acuerdo con las instrucciones del kit.

El fragmento de ADN deseado así amplificado se clonó en un vector pCR-Blunt II-TOPO (Invitrogen Corporation) de acuerdo con las instrucciones adjuntas al kit. En este caso, el fragmento de ADN deseado se insertó en el vector pCR-Blunt II-TOPO en la dirección que posibilita que la secuencia de nucleótidos de la SEC ID N° 7 esté cerca de un promotor T7 y la secuencia de nucleótidos de la SEC ID N° 8 esté cerca de un promotor Sp6. Se confirmó que la secuencia de nucleótidos del fragmento de ADN se insertó en la dirección correcta y era una secuencia de nucleótidos de la SEC ID N° 2 usando un secuenciador.

Ejemplo 16 (Construcción de plásmido de expresión de CRE1)

Se digirió un vector de expresión de levadura, p425GPD (Munberg et al. Gene: 156 119-122 (1995), disponible en la biblioteca ATCC (N° 87359)) con la enzima de restricción BamHI. Después, el fragmento de ADN obtenido en el Ejemplo 15 (un ADN que tiene la secuencia de nucleótidos de la SEC ID N° 2) se conectó a una secuencia promotora GPD del vector de expresión p425GPD usando ADN ligasa T4, y se incorporó de este modo de manera que la proteína pudiera expresarse en levadura. Se confirmó que la secuencia de nucleótidos del fragmento de ADN estaba insertada en la dirección correcta y era una secuencia de nucleótidos de la SEC ID N° 2 usando un secuenciador. Por tanto, se obtuvo el plásmido de expresión p425GPD-CRE1.

Ejemplo 17 (Producción de célula transformada TM182-p425GPD-CRE1)

El plásmido de expresión obtenido en el Ejemplo 16 se usó para transformar una cepa deficiente en el gen S1n1, TM182 (s1n1Δ) (Maeda T et al. Nature: 369 242-245 (1994)). La transformación se realizó usando S. cerevisiae Direct Transformation Kit Wako (fabricado por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) de acuerdo con el manual adjunto. Como desaparece el requisito nutricional de leucina en la célula transformada obtenida, se seleccionó una levadura transformada capaz de crecer en un medio DOLU + Gal para obtener la célula transformada TM182-p425GPD-CRE1.

Del mismo modo, la célula transformada TM182-p425GPD se obtuvo usando el vector de expresión de levadura p425GPD.

Ejemplo 18 (Preparación de fracción de proteína de membrana que contiene CRE1)

La célula transformada TM182-p425GPD-CRE1 obtenida en el Ejemplo 17 se rompió con perlas de vidrio y después se supercentrifugó para preparar una fracción de proteína de membrana que contenía CRE1. A continuación se describen los detalles.

La célula transformada TM182-p425GPD-CRE1 obtenida en el Ejemplo 17 se sembró en 100 ml de un medio DOLU + Gal y después se incubó a 30°C durante 16 horas para obtener un líquido de incubación que tenía DO600 = aproximadamente 1,4. El líquido de incubación se distribuyó en un tubo de centrifuga de 50 ml y después se centrifugó a 4°C y 7.400xg durante 5 minutos para recoger células de la célula transformada TM182-p425GPD-CRE1. Las células resultantes se suspendieron de nuevo en un tampón fosfato (preparado mezclando una solución acuosa de dihidrogenofosfato sódico 50 mM con una solución acuosa de hidrogenofosfato disódico 50 mM en una proporción de mezcla de 4:6 y ajustando a pH 7,0) enfriado hasta 4°C, se distribuyeron en un tubo de 2 ml y después

- se centrifugaron a 4°C y 1.000xg durante 5 minutos para recoger células de la célula transformada TM 182-p425GPD-CRE1. Las células resultantes se suspendieron de nuevo en el tampón fosfato enfriado hasta 4°C y después se centrifugaron a 4°C y 1.000xg durante 5 minutos para recoger células de la célula transformada TM182-p425GPD-CRE1. Las células resultantes se suspendieron de nuevo en un tampón fosfato que contenía DTT (ditiotreitól) y PMSF (fluoruro de fenilmetilsulfonilo) (preparado añadiendo DTT 5 mM y PMSF 0,5 mM al tampón fosfato descrito anteriormente) en una cantidad de 3 veces (basada en células). Después, se distribuyeron 200 µl de la suspensión en un tubo de 1,5 ml que contenía 250 µl de perlas de vidrio (0,25 a 0,5 mm de diámetro) previamente enfriadas a 4°C. El tubo de 1,5 ml se agitó con una mezcladora de microtubos (MT-360 fabricada por TOMY) a la potencia máxima durante 30 segundos y después se enfrió en hielo durante 1 minuto, y esta operación se repitió una vez más. Además, el tubo de 1,5 ml se agitó con un impactador de múltiples perlas (MB-200, Yasui Kikai Corporation) a una potencia (MEDIDOR DE VELOCIDAD) de 2.000 durante 30 segundos y después se enfrió en hielo durante 1 minuto, y esta operación se repitió dos veces adicionales. Después, el tubo de 1,5 ml se centrifugó a 4°C y 1.500xg durante 10 minutos para recoger el sobrenadante. El sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo de 1,5 ml y se centrifugó a 4°C y 10.000xg durante 3 minutos para recoger el sobrenadante. El sobrenadante se centrifugó a 4°C y 100.000xg durante 1 hora usando una supercentrífuga para recoger el precipitado. El precipitado resultante se disolvió en un tampón fosfato que contenía monocrato de sacarosa al 1% (preparado añadiendo monocrato de sacarosa al 1% al tampón fosfato descrito anteriormente) para obtener una fracción de proteína de membrana de la célula transformada TN182-p425GPD-CRE1.
- Del mismo modo, se preparó una fracción de proteína de membrana de la célula transformada TM182-p425GPD.

Ejemplo 19 (Método para examinar la inhibición de la unión de citoquinina al receptor de citoquinina por sustancia química)

- La fracción de proteína de membrana de la célula transformada TM182-p425GPP-CRE1 obtenida en el Ejemplo 18 y citoquinina que estaba marcada con un radioisótopo of hidrógeno, tritio de modo que llegara ser altamente radioactiva se usaron para examinar que una sustancia de ensayo inhibía la unión de citoquinina a un receptor de citoquinina. A continuación se describen los detalles.
- Como citoquinina marcada con un radioisótopo of hidrógeno, tritio de modo que llegara a ser altamente radiactiva, se usó [3H]N-6-(isopent-2-enil)adenina fabricada por Amersham Biosciences (a partir de ahora en este documento, mencionada como radiomarcador 2IP). Tenía una radiactividad específica de 74,0 GBq/mmol y una concentración de radiactividad de 37,0 MBq/ml.
- Primero, se mezclaron 100 µg de la fracción de proteína de membrana de la célula transformada TM182-p415CYC1, una dilución de radiomarcador 2IP a una concentración predeterminada con un tampón fosfato y 1 µl de una dilución de sustancia de ensayo a una concentración predeterminada con DMSO, en un tampón fosfato para preparar 100 µl de un líquido de reacción. Después, el líquido de reacción se dejó en reposo en hielo durante 1 hora y después se filtró con un filtro de vidrio GF/B (fabricado por Whatman) para recoger una fracción de proteína de membrana de la célula transformada TM182-p425GPD-CRE1. El filtro de vidrio se sumergió en un cóctel de centelleo líquido Ultima Gold (fabricado por PerkinElmer Co., Ltd.), y se midió la radiactividad mediante un contador de centello líquido. Para el control, se realizó el mismo ensayo usando una fracción de proteína de membrana de la célula transformada TM182-p425GPD. Para eliminar la influencia de la radiactividad debida a unión no específica del radiomarcador 2IP, se sustrajo un valor de radiactividad obtenido en el ensayo usando la fracción de proteína de membrana de la célula transformada TM182-p425GPD de un valor de radiactividad obtenido en el ensayo usando la fracción de proteína de membrana de la célula transformada TM182-p425GPD-CRE1. Los resultados de ensayo se muestran en la Fig. 10.

En el caso donde la sustancia de ensayo era trans-zeatina o Ic3-4, la radiactividad estaba disminuida en comparación con el caso donde la sustancia de ensayo no se añadía (solamente DMSO que se usó como disolvente de una sustancia de ensayo) o la sustancia de ensayo era ácido abscísico.

Ejemplo 20 (Evaluación de la actividad promotora del establecimiento de posición de arroz de sustancia capaz de inhibir la señalización de citoquinina mediante tratamiento de semillas en un ensayo directo de siembra sobre campo inundado)

- Se trataron semillas de arroz (*Oryza sativa japonica* Nipponbare) con la sustancia química Ic3-1 (que inhibe la señalización intracelular desde un receptor de citoquinina derivado de plantas de una célula) seleccionada en el Ejemplo 7, y se cultivaron en condiciones de siembra directa. Después, se examinó una tasa de establecimiento de posición, y por tanto se evaluó una actividad promotora del establecimiento de posición de arroz de la sustancia química.

Primero, se preparó una solución de plasta blanco que contenía Color Coat Red al 5% (v/v) (fabricado por BECKER UNDERWOOD), CF-Clear al 5% (v/v) (fabricado por BECKER UNDERWOOD) y Maxim-XL al 0,42% (v/v) (fabricado por Syngenta). En 1,3 ml de la solución de plasta blanco, se disolvieron 6,25 mg, 12,5 mg, 25 mg o 50 mg de la sustancia química Ic3-3. Las semillas se trataron con la solución en una cantidad de 1,3 ml por 50 g de semillas

(cada una correspondiendo a 0,125 mg, 0,25 mg, 0,5 mg y 1 mg/g de semilla) usando un dispositivo de tratamiento de semillas Hegell (fabricado por Hans-Ulrich Hege).

Después, se inundó una maceta de cemento (50 cm x 50 cm) colocada en el exterior a una profundidad de inundación de 5 cm, y se sembraron 50 semillas por maceta. En el día 23 después de la siembra, se examinó la cantidad de plántulas cuyo ápice foliar aparecía sobre la superficie del agua. Como resultado, la tasa de establecimiento de posición estaba aumentada a una concentración de tratamiento de semillas de 0,125 a 1 mg/g de semilla, en comparación con la sección tratada con pasta blanco. Los resultados de ensayo (promedio) de cada sección de tratamiento (cuatro repeticiones) se muestran en la Tabla 13.

[Tasa de establecimiento de posición (%)] - [Cantidad de plántulas cuyo ápice foliar aparece sobre la superficie del agua] / [Cantidad de semillas sembradas] x 100

Tabla 13

Sustancia química	Cantidad de sustancia (mg/g de semilla)	Tasa de establecimiento de posición (%) en el día 23 después de la siembra
pasta blanco		76,7
Ic3-3	0,125	87,3
	0,25	82,7
	0,5	79,3
	1	84,0

Ejemplo 21 (Evaluación de la actividad promotora de macollaje del arroz de sustancia capaz de inhibir la señalización de citoquinina por tratamiento de semillas en un ensayo directo de siembra en campo seco)

Se trataron semillas de arroz (*Oryza sativa japonica* Nipponbare) con la sustancia química Ic3-1 (que inhibe la señalización intracelular desde un receptor de citoquinina derivado de plantas de una célula) seleccionada en el Ejemplo 7, y se cultivaron en condiciones de siembra directa en campo seco. Después, se examinó la cantidad de macollos, y por tanto se evaluó una actividad promotora de macollaje de la sustancia química.

Primero, se preparó una solución de pasta blanco que contenía Color Coat Red al 5% (v/v) (fabricado por BECKER UNDERWOOD), CF-Clear al 5% (v/v) (fabricado por BECKER UNDERWOOD) y Maxim-XL al 0,42% (v/v) (fabricado por Syngenta). En 1,3 ml de la solución de pasta blanco, se disolvieron 12,5 mg de la sustancia química Ic3-3. Las semillas se trataron con la solución en una cantidad de 1,3 ml por 50 g de semillas (correspondiente a 0,25 mg/g de semilla) usando un dispositivo de tratamiento de semillas Hegell (fabricado por Hans-Ulrich Hege).

Se sembraron 20 semillas por maceta de las semillas tratadas en una maceta 1/5000a Wagner a una profundidad de 1 cm y después se cultivaron en un invernadero. En el día 10 después de la siembra, se cargó agua a una profundidad de inundación de 5 cm y se continuó el cultivo. En el día 30 después de la siembra, se examinó la cantidad de macollos. Como resultado, se aumentó la cantidad de macollos por tronco, en comparación con la sección tratada con pasta blanco. Los resultados de ensayo (promedio) de cada sección de tratamiento (tres repeticiones) se muestran en la Tabla 11.

En lo sucesivo en el presente documento, el compuesto (XI) usado en la presente invención se describirá más específicamente por medio de los Ejemplos de Síntesis y los Ejemplos de Síntesis de Referencia, pero el compuesto (XI) no se limita a estos ejemplos.

En los Ejemplos de Síntesis y los Ejemplos de Síntesis de Referencia, "temperatura ambiente" se refiere normalmente a una temperatura de 10 °C a 30 °C. ¹H RMN" se refiere a un espectro de resonancia magnética de protón. Usando tetrametilsilano como un estándar interno, la medición se realizó con un espectrómetro (400 MHz), Modelo JNM-AL400, fabricado por JFOL Ltd. y los desplazamientos químicos (δ) se expresaron como ppm. "P.f." se refiere a punto de fusión y se midió con un medidor del punto de fusión, Modelo Mettler FP61.

Las abreviaturas usadas en los siguientes Ejemplos de Síntesis, Ejemplos de Síntesis de Referencia y las Tablas 2, 3, 4 y 5 tienen los siguientes significados. CDCl₃: cloroformo deuterado, DMSO-d₆: dimetilsulfóxido deuterado, s: singlete, d: doblete, t: triplete, c: cuadruplete, dd: doblete de dobletes, m: multiplete, a: ancho, J: constante de acoplamiento, Me: metilo, Et: etilo, Pr: propilo, i-Pr: isopropilo, t-Bu: butilo terciario, Ph: fenilo, Ac: acetilo, THF: tetrahydrofurano, DMF: N,N-dimetilformamida, DMSO: dimetilsulfóxido y MTBE: metil terc-butil éter

Ejemplo de Síntesis 12 (Preparación de 2-amino-6,8-dicloro-4-fenilquinazolina (compuesto N° Ie-4))

Una mezcla de 300 mg de 2,6,8-tricloro-4-fenilquinazolina (compuesto N° II-5), 30 g de una solución acuosa al 28 % de amoníaco y 6 ml de acetonitrilo se hizo reaccionar en un recipiente de reacción resistente a la presión a 105 °C durante 1,5 horas. La solución de reacción resultante se enfrió y después se vertió en 100 ml de agua. La mezcla se extrajo con 60 ml de acetato de etilo y el extracto resultante se concentró. El residuo resultante se purificó por

cromatografía en columna sobre gel de sílice (cloroformo) para obtener 230 mg del compuesto del título. P.f. 212,7 °C. ¹H RMN (CDCl₃): 5,56 (2H, s a), 7,54-7,60 (3H, m), 7,63-7,68 (2H, m), 7,74 (1H, d, J = 2,3 Hz), 7,79 (1H, d, J = 2,3 Hz).

5 Ejemplo de Síntesis 13 (Preparación de 6-cloro-2-furfurilamino-4-fenilquinazolina (compuesto N° Ib-8))

Una mezcla de 275 mg de 2,6-dicloro-4-fenilquinazolina (compuesto N° II-2) y 486 mg de furfurilamina se agitó a 85 °C durante 40 minutos y después se vertió en 50 ml de agua. La mezcla se extrajo con acetato de etilo, y el extracto resultante se lavó con agua y después se concentró. El residuo resultante se recrystalizó en etanol para obtener 280 mg del compuesto del título. P.f. 142,0 °C. ¹H RMN (CDCl₃): 4,77 (2H, d, J = 5,6 Hz), 5,70 (1H, t a, J = 5,6 Hz), 6,29-6,32 (2H, m), 7,36 (1H, dd, J = 1,8, 0,9 Hz), 7,53-7,70 (7H, m), 7,78 (1H, d, J = 2,2 Hz).

15 Ejemplo de Síntesis 14 (Preparación de 6-cloro-2-etoxicarbonilmetilamino-4-fenilquinazolina (compuesto N° Ib-15))

A 550 mg de 2,6-dicloro-4-fenilquinazolina (compuesto N° II-2) y 419 mg de clorhidrato de glicina etil éster se les añadieron 3 ml de DMF y 607 mg de trietilamina seguido de agitación a 85 °C durante 5,5 horas. La solución de reacción resultante se vertió en 100 ml de agua y se extrajo con acetato de etilo, y después el extracto se concentró. El residuo resultante se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice (hexano:acetato de etilo = 6:1 a 3:1) para obtener 503 mg del compuesto del título. P.f. 146,1 °C. ¹H RMN (CDCl₃): 1,30 (3H, t, J = 7,2 Hz), 4,25 (2H, c, J = 7,2 Hz), 4,31 (2H, d, J = 5,2 Hz), 5,97 (1H, a, s), 7,54-7,63 (5H, m), 7,67-7,70 (2H, m), 7,79 (1H, s).

20 Ejemplo de Síntesis 15 (Preparación de 6-cloro-2-formamido-4-fenilquinazolina (compuesto N° Ib-17))

A una solución de 54 mg de formamida seca en DMF (5 ml) se le añadieron 48 mg de hidruro sódico (60 %) seguido de agitación a temperatura ambiente durante 30 minutos. A la mezcla de reacción se le añadieron 275 mg de 2,6-dicloro-4-fenilquinazolina (compuesto N° II-2) seguido de calentamiento a 85 °C y agitación adicional durante 3 horas. La solución de reacción resultante se vertió en 100 ml de agua, se extrajo con acetato de etilo, y después el extracto se concentró. El residuo resultante se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice (acetato de etilo:hexano = 1:3) para obtener 64 mg del compuesto del título. P.f. 252,1 °C. ¹H RMN: 7,59-7,66 (3H, m), 7,72-7,81 (3H, m), 7,88 (1H, d, J = 8,8 Hz), 8-02 (1H, d, J = 2,0 Hz), 8,37 (1H, d a, J = 10,4 Hz), 9,71 (1H, d, J = 10,4 Hz).

Se muestran ejemplos de compuestos que pueden prepararse de la misma manera que en los Ejemplos de Síntesis que se han descrito anteriormente en la Tabla 14 y la Tabla 15 (incluyendo también los compuestos preparados en los Ejemplos de Síntesis que se han descrito anteriormente). Ha de apreciarse que "a)", "b)" y "c)" en la Tabla 14 y la Tabla 15 son como se indica a continuación.

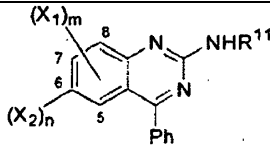
a) ¹H RMN (CDCl₃): 1,66-1,75 (1H, m), 1,86-2,08 (3H, m), 3,57-3,64 (1H, m), 3,75-3,83 (2H, m), 3,89-3,59 (1H, m), 4,13-4,20 (1H, m), 5,70 (1H, s a), 7,52-7,60 (5H, m), 7,64-7,69 (2H, m), 7,75-7,76 (1H, m).

b) ¹H RMN (CDCl₃): 1,22 (3H, t, J = 7,0 Hz), 3,55 (2H, c, J = 7,0 Hz), 3,68 (2H, t, J = 5,2 Hz), 3,78 (2H, tipo c, J = 5,2 Hz), 5,75 (1H, t a), 7,53-7,60 (5H, m), 7,65-7,69 (2H, m), 7,75-7,77 (1H, m).

c) ¹H RMN (CDCl₃): 1,22 (3H, t, J = 7,0 Hz), 1,96 (2H, quintuplete, J = 6,3 Hz), 3,50 (2H, c, J = 7,0 Hz), 3,58 (2H, t, J = 6,3 Hz), 3,67 (2H, tipo c, J = 6,3 Hz), 5,65 (1H, t a), 7,53-7,60 (5H, m), 7,65-7,69 (2H, m), 7,74-7,76 (1H, m).

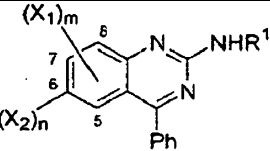
45 Tabla 14

Compuesto N°	R ¹¹	m	X ₁	n	X ₂	Punto de fusión (°C)
Ia-1	(CH ₂) ₃ OH	1	5-Cl	0	-	175,7
Ib-1	(CH ₂) ₄ OH	0	-	1	Cl	115,6
Ib-2	(CH ₂) ₅ OH	0	-	1	Cl	117,2
Ib-3	(CH ₃) ₂ OMe	0	-	1	Cl	89,7
Ib-4	n-Pr	0	-	1	Cl	158,3
Ib-5	(CH ₂) ₂ CHMe ₂	0	-	1	Cl	90,1
Ib-6	(CH ₂) ₆ OH	0	-	1	Cl	107,9
Ib-7	(CH ₂) ₂ CH(Me)CH ₂ OH	0	-	1	Cl	112,7
Ib-8	furfurilo	0	-	1	Cl	142,0
Ib-9	CH ₂ CH=CMe ₂	0	-	1	Cl	95,9
Ib-10	CH ₂ CH=C(Me)CH ₃ OH	0	-	1	Cl	154,8
Ib-11	Et	0	-	1	Cl	156,7
Ib-12	i-Pr	0	-	1	Cl	112,5



Compuesto N°	R ¹¹	m	X ₁	n	X ₂	Punto de fusión (°C)
lb-13	CH ₂ CH=CH ₂	0	-	1	Cl	147,3
lb-14	CH ₂ C≡CH	0	-	1	Cl	168,4
lb-15	CH ₂ CO ₂ Et	0	-	1	Cl	146,1
lb-16	CH ₂ CH ₂ CN	0	-	1	Cl	198,7
lb-17	CHO	0	-	1	Cl	252,1
lb-18	tetrahidrofurfurilo	0	-	1	Cl	jarabe, a)
lb-19	(CH ₂) ₃ OMe	0	-	1	Cl	89,1
lb-20	CH ₂ CH(OH)CH ₃	0	-	1	Cl	154,2
lb-21	(CH ₂) ₂ (CH ₂) ₂ OH	0	-	1	Cl	117,4
lb-22	C ₂ CH(OH)CH ₂ OH	0	-	1	Cl	197,0
lb-23	CH ₂ CO ₂ Me	0	-	1	Cl	190,5
lb-24	CH ₂ CH ₂ CO ₂ Me	0	-	1	Cl	117-1
lb-25	CH(Me)CH ₂ OH	0	-	1	Cl	52,8
lb-26	CH ₂ CH ₂ OEt	0	-	1	Cl	jarabe, a)
lb-27	(CH ₂) ₃ CEt	0	-	1	Cl	jarabe, c)

Tabla 15



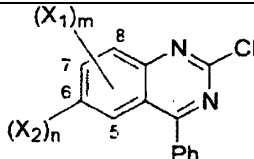
Compuesto N°	R ¹¹	m	X ₁	n	X ₂	Punto de fusión (°C)
lc-1	(CH ₂) ₃ OH	1	7-Cl	0	-	129,7
ld-1	(CH ₂) ₃ OH	1	8-Cl	0	-	115,5
le-1	(CH ₂) ₃ OH	1	8-Cl	1	Cl	146,2
le-2	CH ₂ CH ₂ OH	1	8-Cl	1	Cl	168,8
le-3	furfurilo	1	8-Cl	1	Cl	158,6
le-4	H	1	8-Cl	1	Cl	212,7
le-5	CH ₂ CN	1	8-Cl	1	Cl	204,7
le-6	CH ₂ CO ₂ Me	1	8-Cl	1	Cl	201,4
lf-1	(CH ₂) ₃ OH	0	-	1	Br	140,9
lf-2	CH ₂ CO ₂ Me	0	-	1	Br	183,1 (descomposición)
lg-1	H	0	-	1	CF ₃	160,4
lg-2	(CH ₂) ₃ OH	0	-	1	CF ₃	135,1
lh-1	(CH ₂) ₃ OH	0	-	1	CN	173,3 (descomposición)

Ejemplo de Síntesis de Referencia 3 (Preparación de 2,8-dicloro-4-fenilquinazolina (compuesto N° II-4))

5 A 1,24 g de 8-cloro-4-fenil-2(1H)-quinazolinona (compuesto N° IV-4) se le añadieron 6,65 g de oxicluro de fósforo seguido de agitación a 95 °C durante 1 hora. La solución de reacción resultante se vertió en 200 ml de hielo-agua y a la misma se le añadió bicarbonato sódico, ajustando de este modo el pH a 9. Después, los cristales precipitados se
 10 recogieron por filtración y se recrystalizaron en etanol para obtener 1,07 g del compuesto del título. P.f. 154,4 °C. ¹H RMN CDCl₃: 7,52-7,65 (4H, m), 7,76-7,80 (2H, m), 8,02-8,08 (2H, m).

Se muestran ejemplos de compuestos que pueden prepararse de la misma manera que en el Ejemplo de Síntesis de Referencia 3 que se ha descrito anteriormente en la Tabla 16 (incluyendo también los compuestos preparados en el
 15 Ejemplo de Síntesis de Referencia 3).

Tabla 16



Compuesto Nº	m	X ₁	n	X ₂	Punto de fusión (°C)
II-1	1	5-Cl	0	-	125,7
II-2	0	-	1	Cl	166,2
II-3	1	7-Cl	0	-	115,4
II-4	1	8-Cl	0	-	159,4
II-5	1	8-Cl	1	Cl	100,3
II-6	0	-	1	Br	185,1 (descomposición)
II-7	0	-	1	CF ₃	117,5 (descomposición)
II-9	0	-	1	CN	206,8 (descomposición)

Ejemplo de Síntesis de Referencia 4 (preparación de 8-cloro-4-fenil-2(1H)-quinazolinona (compuesto Nº IV-4))

5 A 7,10 g de bromuro de fenilmagnesio (solución al 32 % en THF) se le añadieron gota a gota una solución o 953 mg de 2-amino-3-clorobenzonitrilo en THF (7 ml) a temperatura ambiente seguido de calentamiento a reflujo durante 30 minutos. Al producto de reacción resultante se le añadieron gota a gota 685 mg de clorocarbonato de metilo en refrigeración con hielo seguido de calentamiento a reflujo durante 40 minutos. La solución de reacción resultante se enfrió y se vertió en 40 ml de ácido clorhídrico 2 N, a la misma se le añadieron 8 g de bicarbonato sódico y 20 ml de MTBE seguido de agitación. Después, los cristales precipitados se recogieron por filtración para obtener 1,30 g del compuesto del título. ¹H RMN (DMSO-d₆): 7,24(1H, t, J = 8,0 Hz), 7,57-7,70 (6H, m), 7,90-7,93 (1H, m), 11,45 (1H, s a).

Ejemplo de Síntesis de Referencia 5 (Preparación de 4-fenil-6-trifluorometil-2(1H)-quinazolinona (compuesto Nº IV-7))

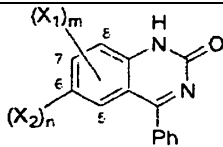
15 A una solución de 762 mg de 2-amino-5-trifluorometilbenzofenona en 10 ml de cloroformo se le añadieron gota a gota 349 mg de trietilamina, y después se añadieron gota a gota 627 mg de cloruro de tricloroacetilo en refrigeración con hielo. Después de agitar a la misma temperatura durante 30 minutos, se añadieron 50 ml de agua, separando de este modo las capas. La capa orgánica se recogió y se concentró. El residuo resultante se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice (hexano:acetato de etilo = 5:1; para obtener 1,08 g de 2'-benzoil-2,2,2-tricloro-4'-trifluorometilacetanilida. ¹H RMN (CDCl₃): 7,53-7,58 (2H, m), 7,66-7,75 (3H, m), 7,90-7,95 (2H, m), 8,81 (1H, d, J = 8,6 Hz), 12,38 (1H, s a).

25 Una mezcla de 1,08 g de 2'-benzoil-2,2,2-tricloro-4'-trifluorometilacetanilida, 10 ml de DMSO y 1,18 g de acetato amónico se agitó a 75 °C durante 1 hora. Después de un periodo de refrigeración, a la mezcla se le añadieron 100 ml de agua. Los cristales precipitados se recogieron por filtración. La sustancia recogida se disolvió en una mezcla de hexano:acetato de etilo = 1:1, se deshidrató usando sulfato de magnesio anhidro y después se concentró para obtener 765 mg del compuesto del título. ¹H RMN (CDCl₃): 7,58-7,68 (3H, m), 7,75 (1H, d, J = 8, 8 Hz), 7,79-7,83 (2H, m), 7,93 (1H, dd, J = 8,8, 1,7 Hz), 8,17 (1H, s a), 13,37 (1H, s a).

35 Se muestran ejemplos de compuestos que pueden prepararse de la misma manera que en el Ejemplo de Síntesis de Referencia 4 que se ha descrito anteriormente en la Tabla 17 (incluyendo también los compuestos preparados en el Ejemplo de Síntesis de Referencia 4 que se ha descrito anteriormente). Ha de apreciarse que "a)" a "g)" en la Tabla 17 son como se indica a continuación.

- 40 a) ¹H RMN (DMSO-d₆): 7,27 (1H, dd, J = 7,7, 1,0 Hz), 7,38 (1H, dd, J = 8,3, 1,1 Hz), 7,43-7,55 (5H, m), 7,69 (1H, t, J = 8,1 Hz), 12,18 (1H, s a).
 b) (sin aislar ni purificar)
 c) ¹H RMN descrita en el Ejemplo de Síntesis de Referencia 4
 d) ¹H RMN (DMSO-d₆): 7,52-7,72 (6H, m), 8,10-8,12 (1H, m), 11,69 (1H, s a).
 e) ¹H RMN (DMSO-d₆): 7,35 (1H, d, J = 9,2 Hz), 7,59-7,71 (6H, m), 7,91 (1H, dd, J = 9,2, 2,2 Hz), 12,08 (1H, s a).
 f) ¹H RMN descrita en el Ejemplo de Síntesis de Referencia 5
 45 g) ¹H RMN (DMSO-d₆): 7,48 (1H, d, J = 8,4 Hz), 7,60-7,68 (3H, m), 7,71-7,74 (2H, m), 8,05 (1H, s), 8,08-8,12 (1H, m), 12,36 (1H, s a).

Tabla 17



Compuesto N°	m	X ₁	n	X ₂	Punto de fusión (°C)
IV-1	1	5-Cl	0	-	a)
IV-2	0	-	1	Cl	>300
IV-3	1	7-Cl	0	-	b)
IV-4	1	8-Cl	0	-	c)
IV-5	1	6-Cl	1	Cl	d)
IV-6	0	-	1	Br	e)
IV-7	0	-	1	CF ₃	f)
IV-8	0	-	1	CN	g)

Ejemplo 22 (Ensayo de actividad promotora del crecimiento de raíces)

- 5 Se preparó medio convencional Enshi que tenía la siguiente composición (véase la Tabla 18). En tubos de agrupación se distribuyeron 4 ml a cada uno de una solución de una sustancia química en DMSO hasta concentraciones final de 0,001 ppm a 10 ppm, y después, se distribuyeron en cada uno 600 ul del medio convencional Enshi esterilizado. Después la solución resultante se mezcló bien. En cada uno de los tubos de agrupación, se sembraron 10-20 semillas de Arabidopsis thaliana, y se cultivaron a 22°C durante 10 días en luz.
- 10 Después, se midió la longitud de las raíces principales (promedio de raíces principales) generadas a partir de las semillas de Arabidopsis thaliana. Se determinó un promedio de ocho repeticiones, y se determinó una tasa de crecimiento de raíces de acuerdo con la siguiente ecuación. Como resultado, pudo juzgarse que una sustancia química que mostraba una tasa significativa de crecimiento de raíces (por ejemplo, una tasa de crecimiento de raíces del 120% o más) tenía una actividad promotora del crecimiento de raíces.

15 Como resultados detallados, se mostraron las concentraciones finales que mostraban las mayores tasas de crecimiento de raíces en la Tabla 19.

20 **Tasa de crecimiento de raíces (%) = (Longitud promedio de raíz principal en la sección tratada con sustancia química) / (Longitud promedio de raíz principal en la sección de control) x 100**

- 25 Se preparó medio convencional Enshi determinado que tenía la siguiente composición (Tabla 18). Se distribuyó una solución en DMSO de una sustancia química por 4 µl a tubos de agrupación hasta una concentración final de 0,001 ppm a 10 ppm y se distribuyó el medio convencional Enshi esterilizado por 600 µl y después la solución resultante se mezcló bien. Se sembraron 10-20 semillas de A. thaliana por tubo de agrupación en los tubos de agrupación. Después de cultivo a 22°C durante 10 días en luz brillante, se midió la longitud de las raíces principales (promedio de raíces principales) surgidas de semillas de A. thaliana. Se determinó un promedio de ocho repeticiones y se determinó la tasa de crecimiento de raíces. Como resultado, pudo considerarse que una sustancia química que mostró tasa significativa de crecimiento de raíces (por ejemplo, la tasa de crecimiento de raíces es del 120% o más)
- 30 era una sustancia química con actividad promotora del crecimiento de raíces.

Como resultados detallados, se mostró un valor que presentó la mayor tasa de crecimiento de raíces en la anterior concentración final en la Tabla 19.

35 **Tasa de crecimiento de raíces (%) = (Longitud promedio de raíz principal de la sección tratada con sustancia química) / (Longitud promedio de raíz principal de la sección de control) x 100**

Tabla 18

Composición	Concentración (mg/l)	
Nitrato de calcio	Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	950
Nitrato de potasio	KNO ₃	810
Sulfato de magnesio	MgSO ₄ ·7H ₂ O	500
Fosfato de amonio	NH ₄ H ₂ PO ₄	155
Quelato de hierro	Fe-EDTA	22,62
Ácido bórico	H ₃ BO ₃	2,86
Sulfato de manganeso	MnSO ₄ ·4H ₂ O	1,81
Sulfato de zinc	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,22
Sulfato de cobre	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,08
Molibdato de sodio	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,025
Ajustado a pH 5,8		

Tabla 19

Compuesto N°	Concentración final de ensayo (ppm)	Actividad promotora del crecimiento de raíces
la-1	2,5	150,9
lb-1	0,625	129,5
lb-2	0,625	139,0
lb-3	11,25	142,5
lb-4	1,25	136,4
lb-5	10	120,6
lb-6	1,25	128,2
lb-7	1,25	128,9
lb-8	5	155,3
lb-9	10	121,3
lb-10	2,5	139,5
lb-11	1,25	122,8
lb-12	10	120,4
lb-13	10	122,4
lb-15	10	140,4
lb-17	2,5	134,0
lb-18	5	138,5
lb-19	5	141,9
lb-20	10	169,0
lb-21	0,625	125,8
lb-22	1,5	134,5
lb-23	0,625	128,6
lb-24	2,5	137,9
lb-25	1,25	126,5
lb-27	2,5	121,6
lc-1	10	163,6
ld-1	5	143,9
le-1	2,5	184,6
le-3	2,5	138,8
lg-2	2,5	155,9
lh-1	10	141,5

A continuación se describen formulaciones de medios usados en la presente invención.

- (a) medio DOLU + Go
- 5 Base de nitrógeno Eacto-yeast sin aminoácidos 6,7 g
- Glucosa 20 g
- SC-HIS-LEU-URA (Q-BIOgene) 1,66 g
- Histidina 0,076 g
- Agua destilada 1000 ml
- 10 (b) medio DOLU + Gal
- Base de nitrógeno Bacto-yeast sin aminoácidos 6,7 g
- Glucosa 20 g
- SC-HIS-LEU-URA (Q-BIOgene) 1,66 g
- Histidina 0,076 g
- 15 Agua destilada 1000 ml

Aplicabilidad industrial

- 20 De acuerdo con la presente invención, es posible proporcionar un agente capaz de controlar el crecimiento o diferenciación de na planta, y un método para buscar una sustancia química que tenga una actividad biológica útil cuya diana haya quedado clara, es decir, un método para seleccionar una sustancia química usando una actividad sobre una diana específica como indicador para controlar químicamente un sitio diana.
- Lista de secuencias texto libre
- SEC ID N° 3
- 25 Cebador oligonucleotídico diseñado para PCR
- SEC ID N° 4
- Cebador oligonucleotídico diseñado para PCR
- SEC ID N° 5
- Cebador oligonucleotídico diseñado para PCR
- 30 SEC ID N° 6

Cebador oligonucleotídico diseñado para PCR
SEC ID N° 7

Cebador oligonucleotídico diseñado para PCR
SEC ID N° 8

5 Cebador oligonucleotídico diseñado para PCR

LISTADO DE SECUENCIAS

- 10 <110> SUMITOMO CHEMICAL COMPANY, LIMITED
- <120> Agente para inhibir la señalización de citoquinina
- <130> R1884 EP S3
- 15 <140> EP 07 83 2825.9
<141> 22-11-2007
- <150> JP2006-315308
<151> 22-11-2006
- 20 <150> JP2006-315309
<151> 22-11-2006
- <150> JP2007-022849
25 <151> 01-02-2007
- <150> JP2007-022850
<151> 01-02-2007
- 30 <160> 8
- <210> 1
<211> 1057
<212> PRT
- 35 <213> *Arabidopsis thaliana*
- <400> 1

ES 2 532 277 T3

Met	Asn	Trp	Ala	Leu	Asn	Asn	His	Gln	Glu	Glu	Glu	Glu	Glu	Pro	Arg
1				5					10					15	
Arg	Ile	Glu	Ile	Ser	Asp	Ser	Glu	Ser	Leu	Glu	Asn	Leu	Lys	Ser	Ser
			20					25					30		
Asp	Phe	Tyr	Gln	Leu	Gly	Gly	Gly	Gly	Ala	Leu	Asn	Ser	Ser	Glu	Lys
		35					40					45			
Pro	Arg	Lys	Ile	Asp	Phe	Trp	Arg	Ser	Gly	Leu	Met	Gly	Phe	Ala	Lys
	50					55					60				
Met	Gln	Gln	Gln	Gln	Gln	Leu	Gln	His	Ser	Val	Ala	Val	Lys	Met	Asn
65					70					75					80
Asn	Asn	Asn	Asn	Asn	Asp	Leu	Met	Gly	Asn	Lys	Lys	Gly	Ser	Thr	Phe
				85					90					95	
Ile	Gln	Glu	His	Arg	Ala	Leu	Leu	Pro	Lys	Ala	Leu	Ile	Leu	Trp	Ile
			100					105					110		
Ile	Ile	Val	Gly	Phe	Ile	Ser	Ser	Gly	Ile	Tyr	Gln	Trp	Met	Asp	Asp
		115					120					125			
Ala	Asn	Lys	Ile	Arg	Arg	Glu	Glu	Val	Leu	Val	Ser	Met	Cys	Asp	Gln
	130					135					140				
Arg	Ala	Arg	Met	Leu	Gln	Asp	Gln	Phe	Ser	Val	Ser	Val	Asn	His	Val
145					150					155					160
His	Ala	Leu	Ala	Ile	Leu	Val	Ser	Thr	Phe	His	Tyr	His	Lys	Asn	Pro
				165					170					175	
Ser	Ala	Ile	Asp	Gln	Glu	Thr	Phe	Ala	Glu	Tyr	Thr	Ala	Arg	Thr	Ala
			180					185					190		
Phe	Glu	Arg	Pro	Leu	Leu	Ser	Gly	Val	Ala	Tyr	Ala	Glu	Lys	Val	Val
		195					200					205			
Asn	Phe	Glu	Arg	Glu	Met	Phe	Glu	Arg	Gln	His	Asn	Trp	Val	Ile	Lys
	210					215					220				
Thr	Met	Asp	Arg	Gly	Glu	Pro	Ser	Pro	Val	Arg	Asp	Glu	Tyr	Ala	Pro

ES 2 532 277 T3

225					230					235				240	
Val	Ile	Phe	Ser	Gln	Asp	Ser	Val	Ser	Tyr	Leu	Glu	Ser	Leu	Asp	Met
				245					250					255	
Met	Ser	Gly	Glu	Glu	Asp	Arg	Glu	Asn	Ile	Leu	Arg	Ala	Arg	Glu	Thr
			260					265					270		
Gly	Lys	Ala	Val	Leu	Thr	Ser	Pro	Phe	Arg	Leu	Leu	Glu	Thr	His	His
		275					280					285			
Leu	Gly	Val	Val	Leu	Thr	Phe	Pro	Val	Tyr	Lys	Ser	Ser	Leu	Pro	Glu
	290					295					300				
Asn	Pro	Thr	Val	Glu	Glu	Arg	Ile	Ala	Ala	Thr	Ala	Gly	Tyr	Leu	Gly
305				310						315					320
Gly	Ala	Phe	Asp	Val	Glu	Ser	Leu	Val	Glu	Asn	Leu	Leu	Gly	Gln	Leu
			325						330					335	
Ala	Gly	Asn	Gln	Ala	Ile	Val	Val	His	Val	Tyr	Asp	Ile	Thr	Asn	Ala
			340					345					350		
Ser	Asp	Pro	Leu	Val	Met	Tyr	Gly	Asn	Gln	Asp	Glu	Glu	Ala	Asp	Arg
		355					360					365			
Ser	Leu	Ser	His	Glu	Ser	Lys	Leu	Asp	Phe	Gly	Asp	Pro	Phe	Arg	Lys
	370					375					380				
His	Lys	Met	Ile	Cys	Arg	Tyr	His	Gln	Lys	Ala	Pro	Ile	Pro	Leu	Asn
385				390						395					400
Val	Leu	Thr	Thr	Val	Pro	Leu	Phe	Phe	Ala	Ile	Gly	Phe	Leu	Val	Gly
			405						410					415	
Tyr	Ile	Leu	Tyr	Gly	Ala	Ala	Met	His	Ile	Val	Lys	Val	Glu	Asp	Asp
			420					425					430		
Phe	His	Glu	Met	Gln	Glu	Leu	Lys	Val	Arg	Ala	Glu	Ala	Ala	Asp	Val
		435					440					445			
Ala	Lys	Ser	Gln	Phe	Leu	Ala	Thr	Val	Ser	His	Glu	Ile	Arg	Thr	Pro
	450				455						460				
Met	Asn	Gly	Ile	Leu	Gly	Met	Leu	Ala	Met	Leu	Leu	Asp	Thr	Glu	Leu
465				470					475						480
Ser	Ser	Thr	Gln	Arg	Asp	Tyr	Ala	Gln	Thr	Ala	Gln	Val	Cys	Gly	Lys
			485						490					495	
Ala	Leu	Ile	Ala	Leu	Ile	Asn	Glu	Val	Leu	Asp	Arg	Ala	Lys	Ile	Glu
			500					505					510		
Ala	Gly	Lys	Leu	Glu	Leu	Glu	Ser	Val	Pro	Phe	Asp	Ile	Arg	Ser	Ile
		515					520					525			
Leu	Asp	Asp	Val	Leu	Ser	Leu	Phe	Ser	Glu	Glu	Ser	Arg	Asn	Lys	Gly
	530					535					540				
Ile	Glu	Leu	Ala	Val	Phe	Val	Ser	Asp	Lys	Val	Pro	Glu	Ile	Val	Lys
545				550						555					560
Gly	Asp	Ser	Gly	Arg	Phe	Arg	Gln	Ile	Ile	Ile	Asn	Leu	Val	Gly	Asn
			565						570					575	
Ser	Val	Lys	Phe	Thr	Glu	Lys	Gly	His	Ile	Phe	Val	Lys	Val	His	Leu
			580					585					590		
Ala	Glu	Gln	Ser	Lys	Asp	Glu	Ser	Glu	Pro	Lys	Asn	Ala	Leu	Asn	Gly
		595					600					605			
Gly	Val	Ser	Glu	Glu	Met	Ile	Val	Val	Ser	Lys	Gln	Ser	Ser	Tyr	Asn
	610					615					620				
Thr	Leu	Ser	Gly	Tyr	Glu	Ala	Ala	Asp	Gly	Arg	Asn	Ser	Trp	Asp	Ser
625				630						635					640
Phe	Lys	His	Leu	Val	Ser	Glu	Glu	Gln	Ser	Leu	Ser	Glu	Phe	Asp	Ile
			645						650					655	
Ser	Ser	Asn	Val	Arg	Leu	Met	Val	Ser	Ile	Glu	Asp	Thr	Gly	Ile	Gly
			660					665					670		
Ile	Pro	Leu	Val	Ala	Gln	Gly	Arg	Val	Phe	Met	Pro	Phe	Met	Gln	Ala
		675				680						685			
Asp	Ser	Ser	Thr	Ser	Arg	Asn	Tyr	Gly	Gly	Thr	Gly	Ile	Gly	Leu	Ser
	690					695					700				
Ile	Ser	Lys	Cys	Leu	Val	Glu	Leu	Met	Arg	Gly	Gln	Ile	Asn	Phe	Ile

ES 2 532 277 T3

```

705          710          715          720
Ser Arg Pro His Ile Gly Ser Thr Phe Trp Phe Thr Ala Val Leu Glu
          725          730          735
Lys Cys Asp Lys Cys Ser Ala Ile Asn His Met Lys Lys Pro Asn Val
          740          745          750
Glu His Leu Pro Ser Thr Phe Lys Gly Met Lys Ala Ile Val Val Asp
          755          760          765
Ala Lys Pro Val Arg Ala Ala Val Thr Arg Tyr His Met Lys Arg Leu
          770          775          780
Gly Ile Asn Val Asp Val Val Thr Ser Leu Lys Thr Ala Val Val Ala
785          790          795          800
Ala Ala Ala Phe Glu Arg Asn Gly Ser Pro Leu Pro Thr Lys Pro Gln
          805          810          815
Leu Asp Met Ile Leu Val Glu Lys Asp Ser Trp Ile Ser Thr Glu Asp
          820          825          830
Asn Asp Ser Glu Ile Arg Leu Leu Asn Ser Arg Thr Asn Gly Asn Val
          835          840          845
His His Lys Ser Pro Lys Leu Ala Leu Phe Ala Thr Asn Ile Thr Asn
          850          855          860
Ser Glu Phe Asp Arg Ala Lys Ser Ala Gly Phe Ala Asp Thr Val Ile
865          870          875          880
Met Lys Pro Leu Arg Ala Ser Met Ile Gly Ala Cys Leu Gln Gln Val
          885          890          895
Leu Glu Leu Arg Lys Thr Arg Gln Gln His Pro Glu Gly Ser Ser Pro
          900          905          910
Ala Thr Leu Lys Ser Leu Leu Thr Gly Lys Lys Ile Leu Val Val Asp
          915          920          925
Asp Asn Ile Val Asn Arg Arg Val Ala Ala Gly Ala Leu Lys Lys Phe
          930          935          940
Gly Ala Glu Val Val Cys Ala Glu Ser Gly Gln Val Ala Leu Gly Leu
945          950          955          960
Leu Gln Ile Pro His Thr Phe Asp Ala Cys Phe Met Asp Ile Gln Met
          965          970          975
Pro Gln Met Asp Gly Phe Glu Ala Thr Arg Gln Ile Arg Met Met Glu
          980          985          990
Lys Glu Ala Lys Glu Lys Thr Asn Leu Glu Trp His Leu Pro Ile Leu
          995          1000          1005
Ala Met Thr Ala Asp Val Ile His Ala Thr Tyr Glu Glu Cys Leu Lys
1010          1015          1020
Ser Gly Met Asp Gly Tyr Val Ser Lys Pro Phe Glu Glu Glu Asn Leu
1025          1030          1035          1040
Tyr Lys Ser Val Ala Lys Ser Phe Lys Pro Asn Pro Ile Ser Pro Ser
          1045          1050          1055
Ser

```

<210> 2
 <211> 3174
 <212> ADN
 <213> *Arabidopsis thaliana*

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(3174)

<400> 2

```

atg aac tgg gca ctg aac aat cat caa gaa gaa gaa gaa gag cca cga 48
Met Asn Trp Ala Leu Asn Asn His Gln Glu Glu Glu Glu Glu Pro Arg
  1          5          10          15

```


ES 2 532 277 T3

aga att gaa att tct gat tcc gag tca cta gaa aac ttg aaa agc agc	96
Arg Ile Glu Ile Ser Asp Ser Glu Ser Leu Glu Asn Leu Lys Ser Ser	
20 25 30	
gat ttt tat caa ctg ggt ggt ggt ggt gct ctg aat tct tca gaa aag	144
Asp Phe Tyr Gln Leu Gly Gly Gly Gly Ala Leu Asn Ser Ser Glu Lys	
35 40 45	
ccg aga aag atc gat ttt tgg cgt tct ggg ttg atg ggt ttt gcg aag	192
Pro Arg Lys Ile Asp Phe Trp Arg Ser Gly Leu Met Gly Phe Ala Lys	
50 55 60	
atg cag cag cag caa cag ctt cag cat tca gtg gcg gtg aag atg aac	240
Met Gln Gln Gln Gln Gln Leu Gln His Ser Val Ala Val Lys Met Asn	
65 70 75 80	
aat aat aat aat aac gat cta atg ggt aat aaa aaa ggg tca act ttc	288
Asn Asn Asn Asn Asn Asp Leu Met Gly Asn Lys Lys Gly Ser Thr Phe	
85 90 95	
ata caa gaa cat cga gca ttg tta cca aaa gct ttg att ctg tgg atc	336
Ile Gln Glu His Arg Ala Leu Leu Pro Lys Ala Leu Ile Leu Trp Ile	
100 105 110	
atc att gtt ggg ttt ata agc agt ggg att tat cag tgg atg gat gat	384
Ile Ile Val Gly Phe Ile Ser Ser Gly Ile Tyr Gln Trp Met Asp Asp	
115 120 125	
gct aat aag att aga agg gaa gag gtt ttg gtc agc atg tgt gat caa	432
Ala Asn Lys Ile Arg Arg Glu Glu Val Leu Val Ser Met Cys Asp Gln	
130 135 140	
aga gct aga atg ttg cag gat caa ttt agt gtt agt gtt aat cat gtt	480
Arg Ala Arg Met Leu Gln Asp Gln Phe Ser Val Ser Val Asn His Val	
145 150 155 160	
cat gct ttg gct att ctg gtc tcc act ttt cat tac cac aag aac cct	528
His Ala Leu Ala Ile Leu Val Ser Thr Phe His Tyr His Lys Asn Pro	
165 170 175	
tct gca att gat cag gag aca ttt gcg gag tac acg gca aga aca gca	576
Ser Ala Ile Asp Gln Glu Thr Phe Ala Glu Tyr Thr Ala Arg Thr Ala	
180 185 190	
ttt gag aga ccg ttg cta agt gga gtg gct tat gct gaa aaa gtt gtg	624
Phe Glu Arg Pro Leu Leu Ser Gly Val Ala Tyr Ala Glu Lys Val Val	
195 200 205	
aat ttt gag agg gag atg ttt gag cgg cag cac aat tgg gtt ata aag	672
Asn Phe Glu Arg Glu Met Phe Glu Arg Gln His Asn Trp Val Ile Lys	
210 215 220	
aca atg gat aga gga gag cct tca ccg gtt agg gat gag tat gct cct	720
Thr Met Asp Arg Gly Glu Pro Ser Pro Val Arg Asp Glu Tyr Ala Pro	
225 230 235 240	
gtt ata ttc tct caa gat agt gtc tct tac ctt gag tca ctg gat atg	768
Val Ile Phe Ser Gln Asp Ser Val Ser Tyr Leu Glu Ser Leu Asp Met	
245 250 255	

ES 2 532 277 T3

atg tca ggc gag gag gat cgt gag aat att ttg cga gct aga gaa acc	816
Met Ser Gly Glu Glu Asp Arg Glu Asn Ile Leu Arg Ala Arg Glu Thr	
260 265 270	
gga aaa gct gtc ttg act agc cct ttt agg ttg ttg gaa act cac cat	864
Gly Lys Ala Val Leu Thr Ser Pro Phe Arg Leu Leu Glu Thr His His	
275 280 285	
ctc gga gtt gtg ttg aca ttc cct gtc tac aag tct tct ctt cct gaa	912
Leu Gly Val Val Leu Thr Phe Pro Val Tyr Lys Ser Ser Leu Pro Glu	
290 295 300	
aat ccg act gtc gaa gag cgt att gca gcc act gca ggg tac ctt ggt	960
Asn Pro Thr Val Glu Glu Arg Ile Ala Ala Thr Ala Gly Tyr Leu Gly	
305 310 315 320	
ggt gcg ttt gat gtg gag tct cta gtc gag aat tta ctt ggt cag ctt	1008
Gly Ala Phe Asp Val Glu Ser Leu Val Glu Asn Leu Leu Gly Gln Leu	
325 330 335	
gct ggt aac caa gca ata gtt gtg cat gtg tat gat atc acc aat gca	1056
Ala Gly Asn Gln Ala Ile Val Val His Val Tyr Asp Ile Thr Asn Ala	
340 345 350	
tca gat cca ctt gtc atg tat ggt aat caa gat gaa gaa gcc gac aga	1104
Ser Asp Pro Leu Val Met Tyr Gly Asn Gln Asp Glu Glu Ala Asp Arg	
355 360 365	
tct ctc tct cat gag agc aag ctc gat ttt gga gac ccc ttc agg aaa	1152
Ser Leu Ser His Glu Ser Lys Leu Asp Phe Gly Asp Pro Phe Arg Lys	
370 375 380	
cat aag atg ata tgc agg tac cac caa aag gca cca ata cca ttg aet	1200
His Lys Met Ile Cys Arg Tyr His Gln Lys Ala Pro Ile Pro Leu Asn	
385 390 395 400	
gtg ctc aca act gtg cca ttg ttc ttt gcg att ggt ttc ttg gtg ggt	1248
Val Leu Thr Thr Val Pro Leu Phe Phe Ala Ile Gly Phe Leu Val Gly	
405 410 415	
tat ata ctg tat ggt gca gct atg cac ata gta aaa gtc gaa gat gat	1296
Tyr Ile Leu Tyr Gly Ala Ala Met His Ile Val Lys Val Glu Asp Asp	
420 425 430	
ttc cat gaa atg caa gag ctt aaa gtg cga gca gaa gct gct gat gtc	1344
Phe His Glu Met Gln Glu Leu Lys Val Arg Ala Glu Ala Ala Asp Val	
435 440 445	
gct aaa tcg cag ttt ctt gct acc gtg tct cac gag atc agg aca cca	1392
Ala Lys Ser Gln Phe Leu Ala Thr Val Ser His Glu Ile Arg Thr Pro	
450 455 460	
atg aat ggc att ctc gga atg ctt gct atg ctc cta gat aca gaa cta	1440
Met Asn Gly Ile Leu Gly Met Leu Ala Met Leu Leu Asp Thr Glu Leu	
465 470 475 480	
agc tcg aca cag aga gat tac gct caa acc gct caa gta tgt ggt aaa	1488
Ser Ser Thr Gln Arg Asp Tyr Ala Gln Thr Ala Gln Val Cys Gly Lys	
485 490 495	

ES 2 532 277 T3

gct ttg att gca ttg ata aat gag gtt ctt gat cgc gcc aag att gaa	1536
Ala Leu Ile Ala Leu Ile Asn Glu Val Leu Asp Arg Ala Lys Ile Glu	
500 505 510	
gct gga aag ctg gag ttg gaa tca gta cca ttt gat atc cgt tca ata	1584
Ala Gly Lys Leu Glu Leu Glu Ser Val Pro Phe Asp Ile Arg Ser Ile	
515 520 525	
ttg gat gat gtc ctt tct cta ttc tct gag gag tca agg aac aaa ggc	1632
Leu Asp Asp Val Leu Ser Leu Phe Ser Glu Glu Ser Arg Asn Lys Gly	
530 535 540	
att gag ctc gcg gtt ttc gtt tca gac aaa gta cca gag ata gtc aaa	1680
Ile Glu Leu Ala Val Phe Val Ser Asp Lys Val Pro Glu Ile Val Lys	
545 550 555 560	
gga gat tca ggg aga ttt aga cag ata atc ata aac ctt gtt gga aat	1728
Gly Asp Ser Gly Arg Phe Arg Gln Ile Ile Ile Asn Leu Val Gly Asn	
565 570 575	
tcg gtt aaa ttc aca gag aaa gga cat atc ttt gtt aaa gtc cat ctt	1776
Ser Val Lys Phe Thr Glu Lys Gly His Ile Phe Val Lys Val His Leu	
580 585 590	
gcg gaa caa tca aaa gat gaa tct gaa ccg aaa aat gca ttg aat ggt	1824
Ala Glu Gln Ser Lys Asp Glu Ser Glu Pro Lys Asn Ala Leu Asn Gly	
595 600 605	
gga gtg tot gaa gaa atg atc gtt gtt tcc aaa cag tca agt tac aac	1872
Gly Val Ser Glu Glu Met Ile Val Val Ser Lys Gln Ser Ser Tyr Asn	
610 615 620	
aca ttg agc ggt tac gaa gct gct gat ggt cgg aat agc tgg gat tca	1920
Thr Leu Ser Gly Tyr Glu Ala Ala Asp Gly Arg Asn Ser Trp Asp Ser	
625 630 635 640	
ttc aag cat ttg gtc tct gag gag cag tca tta tcg gag ttt gat att	1968
Phe Lys His Leu Val Ser Glu Glu Gln Ser Leu Ser Glu Phe Asp Ile	
645 650 655	
tct agc aat gtt agg ctt atg gtt tca atc gaa gac acg ggt att gga	2016
Ser Ser Asn Val Arg Leu Met Val Ser Ile Glu Asp Thr Gly Ile Gly	
660 665 670	
atc cct tta gtt gca caa ggc cgt gtg ttt atg ccg ttt atg caa gca	2064
Ile Pro Leu Val Ala Gln Gly Arg Val Phe Met Pro Phe Met Gln Ala	
675 680 685	
gat agc tcg act tca aga aac tat gga ggt act ggt att ggt ttg agt	2112
Asp Ser Ser Thr Ser Arg Asn Tyr Gly Gly Thr Gly Ile Gly Leu Ser	
690 695 700	
ata agc aag tgt ctt gtt gaa ctt atg cgt ggt cag ata aat ttc ata	2160
Ile Ser Lys Cys Leu Val Glu Leu Met Arg Gly Gln Ile Asn Phe Ile	
705 710 715 720	
agc cgg cct cat att gga agc acg ttc tgg ttc acg gct gtt tta gag	2208
Ser Arg Pro His Ile Gly Ser Thr Phe Trp Phe Thr Ala Val Leu Glu	
725 730 735	

ES 2 532 277 T3

aaa tgc gat	aaa tgc agt	gcg att aac	cat atg aag	aaa cct aat	gtg	2256
Lys Cys Asp	Lys Cys Ser	Ala Ile Asn	His Met Lys	Lys Lys Pro	Asn Val	
	740		745		750	
gaa cao ttg	cct tet act	ttt aaa gga	atg aaa gct	ata gtt gtt	gat	2304
Glu His Leu	Pro Ser Thr	Phe Lys Gly	Met Lys Ala	Ile Val Val	Val Asp	
	755		760		765	
gct aag cct	gtt aga gct	gct gtg act	aga tac cat	atg aaa aga	ctc	2352
Ala Lys Pro	Val Arg Ala	Ala Val Thr	Arg Tyr His	Met Lys Arg	Leu	
	770		775		780	
gga atc aat	gtt gat gtc	gtg aca agt	ctc aaa acc	gct gtt gtt	gca	2400
Gly Ile Asn	Val Asp Val	Val Thr Ser	Leu Lys Thr	Ala Val Val	Ala	
	785		790		800	
gct gct gcg	ttt gaa aga	aac ggt tet	cct ctc cca	aca aaa ccg	caa	2448
Ala Ala Ala	Phe Glu Arg	Asn Gly Ser	Pro Leu Pro	Thr Lys Pro	Gln	
	805		810		815	
ctt gat atg	atc tta gta	gag aaa gat	tca tgg att	tca act gaa	gat	2496
Leu Asp Met	Ile Leu Val	Glu Lys Asp	Ser Trp Ile	Ser Thr Glu	Asp	
	820		825		830	
aat gac tca	gag att cgt	tta ttg aat	tca aga acc	aac gga aac	gtt	2544
Asn Asp Ser	Glu Ile Arg	Leu Leu Asn	Ser Arg Thr	Asn Gly Asn	Val	
	835		840		845	
cat cac aag	tct ccg aaa	cta gct cta	ttc gca aca	aac atc aca	aat	2592
His His Lys	Ser Pro Lys	Leu Ala Leu	Phe Ala Thr	Asn Ile Thr	Asn	
	850		855		860	
tcg gag ttc	gac aga gct	aaa tcc gca	gga ttt gca	gat acg gta	ata	2640
Ser Glu Phe	Asp Arg Ala	Lys Ser Ala	Gly Phe Ala	Asp Thr Val	Ile	
	865		870		880	
atg aaa ccg	tta aqa gca	agc atg att	ggg gcg tgt	ctg caa caa	gtt	2688
Met Lys Pro	Leu Arg Ala	Ser Met Ile	Gly Ala Cys	Leu Gln Gln	Val	
	885		890		895	
ctc gag ctg	aga aaa aca	aga caa caa	cat cca gaa	gga tca tca	ccc	2736
Leu Glu Leu	Arg Lys Thr	Arg Gln Gln	His Pro Glu	Gly Ser Ser	Pro	
	900		905		910	
gca act ctc	aag agc ttg	ctt aca ggg	aag aag att	ctt gtg gtt	gat	2784
Ala Thr Leu	Lys Ser Leu	Leu Leu Thr	Gly Lys Lys	Ile Leu Val	Val Asp	
	915		920		925	
gat aat ata	gtt aac agc	aga gta gct	gca gga gct	ctc aag aaa	ttt	2832
Asp Asn Ile	Val Asn Arg	Arg Val Ala	Ala Ala Gly	Ala Leu Lys	Lys Phe	
	930		935		940	
gga gca gaa	gtg gtt tgt	gca gag agt	ggt caa gtt	gct ttg ggt	ttg	2880
Gly Ala Glu	Val Val Cys	Ala Glu Ser	Gly Gln Val	Ala Leu Gly	Leu	
	945		950		960	
ctt cag att	cca cac act	ttc gat gct	tgc ttc atg	gat att caa	atg	2928
Leu Gln Ile	Pro His Thr	Phe Asp Ala	Cys Phe Met	Asp Ile Gln	Met	
	965		970		975	

ES 2 532 277 T3

```

cca cag atg gac gga ttt gaa gca act cgt cag ata aga atg atg gag 2976
Pro Gln Met Asp Gly Phe Glu Ala Thr Arg Gln Ile Arg Met Met Glu
          980                      985                      990

aag gaa gct aaa gag aag acg aat ctc gaa tgg cat tta cag att cta 3024
Lys Glu Ala Lys Glu Lys Thr Asn Leu Glu Trp His Leu Pro Ile Leu
          995                      1000                      1005

gcg atg act gcg gat gtg ata cac gcg acc tac gag gaa tgt ctg aaa 3072
Ala Met Thr Ala Asp Val Ile His Ala Thr Tyr Glu Glu Cys Leu Lys
          1010                      1015                      1020

agt ggg atg gat ggt tac gtc tcc aaa cct ttt gaa gaa gag aat ctc 3120
Ser Gly Met Asp Gly Tyr Val Ser Lys Pro Phe Glu Glu Glu Asn Leu
          1025                      1030                      1035                      1040

tat aaa tcc gtt gcc aaa tca ttc aaa cct aat cct atc tca cct tcg 3168
Tyr Lys Ser Val Ala Lys Ser Phe Lys Pro Asn Pro Ile Ser Pro Ser
          1045                      1050                      1055

tcg taa 3174
Ser

```

```

5 <210> 3
  <211> 24
  <212> ADN
  <213> Artificial
  <220>
  <221> fuente
10 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: Cebador oligonucleotídico diseñado para PCR"

  <400> 3
  tcagatatga actgggcact caac 24

15 <210> 4
  <211> 24
  <212> ADN
  <213> Artificial
  <220>
  <221> fuente
20 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: Cebador oligonucleotídico diseñado para PCR"

  <400> 4
  ctcaatgctt ttgtccttg actc 24

25 <210> 5
  <211> 31
  <212> ADN
  <213> Artificial

30 <220>
  <221> fuente
  <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: Cebador oligonucleotídico diseñado para PCR"

35 <400> 5
  accatgaact gggcactcaa caatcatcaa g 31

40 <210> 6
  <211> 30
  <212> ADN
  <213> Artificial

  <220>
  <221> fuente

```

ES 2 532 277 T3

<223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: Cebador oligonucleotídico diseñado para PCR"

5 <400> 6
ggattacgac gaagtgaga taggattagg 30

<210> 7
<211> 33
<212> ADN
<213> Artificial

10 <220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: Cebador oligonucleotídico diseñado para PCR"

15 <400> 7
cgggatccat gaactgggca ctcaacaatc atc 33

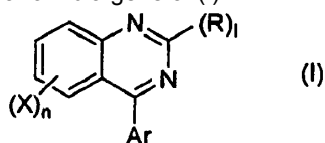
20 <210> 8
<211> 34
<212> ADN
<213> Artificial

25 <220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: Cebador oligonucleotídico diseñado para PCR"

<400> 8
gctctagatt acgacgaagg tgagatagga ttag 34

REIVINDICACIONES

1. Uso de un compuesto representado por la fórmula general (I):



5 donde R y X son iguales o diferentes y
 donde R representa un grupo hidrocarburo opcionalmente sustituido, un grupo representado por NR^1 , R^2 , un grupo representado por OR^3 , un grupo nitro o un átomo de halógeno, y
 donde X representa un grupo hidrocarburo opcionalmente sustituido, un grupo representado por NR^1R^2 , un grupo representado por OR^3 , un grupo representado por $\text{S}(\text{O})_m\text{R}^4$, un grupo nitro o un átomo de halógeno,
 10 en la que R^1 representa un átomo de hidrógeno o un grupo hidrocarburo opcionalmente sustituido, R^2 representa un átomo de hidrógeno, un grupo hidrocarburo opcionalmente sustituido, un grupo representado por NR^5 , R^6 (en la que R^5 y R^6 son iguales o diferentes y representan un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo C1-6 opcionalmente sustituido) o un grupo representado por OR^7 (en la que R^7 representa un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo C1-6 opcionalmente sustituido), o R^1 y R^2 se toman junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos para formar un grupo amino cíclico opcionalmente sustituido,
 15 cada uno de R^3 y R^4 representa un grupo hidrocarburo opcionalmente sustituido, l representa un número entero de 0 a 1, m representa un número entero de 0 a 2, n representa un número entero de 0 a 4,
 20 cuando n es 2 o más, cada X es igual o diferente entre sí, y Ar representa un grupo arilo opcionalmente sustituido o un grupo heteroarilo opcionalmente sustituido; o una sal agrícolamente aceptable de los mismos, como un principio activo para controlar el crecimiento o diferenciación de una planta.

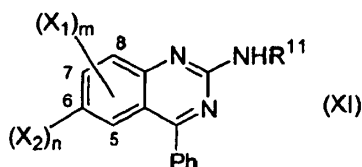
25 2. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, donde l es 1 y R es un grupo representado por NR^1R^2 .

3. El uso de acuerdo con la reivindicación 2, donde R^1 representa un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo C1-3, R^2 representa un átomo de hidrógeno, un grupo amino, un grupo alquilamino C1-3, un grupo dialquilamino C1-3, un grupo amidino, un grupo alcoxi C1-3, un grupo fenilo, un grupo acilo C1-3, un grupo alquilo C1-6, un grupo alquenilo C3-6 o un grupo alquinilo C3-6, en el que el grupo fenilo está opcionalmente sustituido con 1 a 3 grupos alquilo C1-3 iguales o diferente, el grupo fenilo, el grupo acilo, el grupo alquilo, el grupo alquenilo y el grupo alquinilo están opcionalmente sustituidos con 1 a 3 sustituyentes iguales o diferentes seleccionados entre un átomo de halógeno, un grupo hidroxilo, un grupo alcoxi C1-3, un grupo hidroxilo alcoxi C1-3, un grupo carboxilo, un grupo alcoxycarbonilo C1-3, un grupo carbamoilo, un grupo amino, un grupo alquilamino C1-3, un grupo dialquilamino C1-3, un grupo mercapto, un aciltio C1-3, un grupo ciano, un grupo furilo y un grupo tetrahydrofurilo, o R^1 y R^2 se toman junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos para formar un grupo pirrolidino, un grupo piperidino o un grupo morfolino.

4. El uso de acuerdo con la reivindicación 2, donde R^1 representa un átomo de hidrógeno, R^2 representa un átomo de hidrógeno, un grupo formilo, un grupo alquilo C1-6, un grupo alquenilo C3-6 o un grupo alquinilo C3-6, en el que el grupo alquilo, el grupo alquenilo y el grupo alquinilo están opcionalmente sustituidos con uno o mas sustituyentes seleccionados entre un grupo hidroxilo, un grupo metoxi, un grupo metoxycarbonilo, un grupo etoxycarbonilo, un grupo ciano y un grupo furilo.

5. Un método de regulación del crecimiento vegetal, que comprende aplicar una cantidad eficaz del compuesto como se ha definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 a una planta o un hábitat de la planta.

6. Un compuesto representado por la fórmula (XI):



50 donde Ph representa un grupo fenilo, R^{11} representa un átomo de hidrógeno, un grupo formilo, un grupo alquilo C1-6, un grupo alquenilo C3-6 o un grupo alquinilo C3-6, en la que el grupo alquilo, el grupo alquenilo y el grupo alquinilo están opcionalmente sustituidos con al menos un sustituyente seleccionado entre un grupo hidroxilo, un grupo alcoxi C1-3, un grupo alcoxycarbonilo C1-3, un grupo ciano, un grupo 2-furilo y un grupo 2-tetrahydrofurilo,
 55 m representa un número entero de 0 a 3, n representa un número entero de 0 a 1,

al menos uno de m y n no es 0,

X_1 y X_2 son iguales o diferentes y representan un átomo de cloro, un átomo de bromo, un grupo trifluorometilo, un grupo ciano o un grupo nitro,

cuando m es 2 o más, cada X_1 es igual o diferente entre sí; con la condición de que

- 5 a) cuando m es 1, X_1 es un átomo de 5-cloro o un átomo de 7-cloro y R^{11} representa un grupo metilo, n represente un número entero de 1, o
 b) cuando n es 1 y una cualquiera de las condiciones (1) a (3) se satisface, m represente un número entero de 1 a 3:

- 10 (1) X_2 es un átomo de cloro, y R^{11} es un grupo seleccionado entre un átomo de hidrógeno, un grupo metilo, un grupo 2-hidroxietilo, un grupo 3-hidroxipropilo, un grupo 2,2-dimetoxietilo y un grupo cianometilo,
 (2) X_2 es un átomo de bromo, y R^{11} es un grupo seleccionado entre un grupo 2-hidroxietilo, un grupo 3-hidroxipropilo y un grupo 2-metoxietilo, y
 15 (3) X_2 es un grupo nitro, y R^{11} es un grupo 3-hidroxipropilo; o una sal agrícolamente aceptable de los mismos.

7. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 6, donde R^{11} representa un átomo de hidrógeno, un grupo formilo, un grupo metilo, un grupo etilo, un grupo 2-hidroxietilo, un grupo 2-metoxietilo, un grupo furfurilo, un grupo metoxicarbonilmetilo o un grupo etoxicarbonilmetilo, m es 0, n es 1, y X_2 es un átomo de cloro o un grupo nitro, o una sal farmacéuticamente de los mismos.
 20

8. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 6, donde R^{11} representa un átomo de hidrógeno, un grupo formilo, un grupo metilo, un grupo etilo, un grupo 2-hidroxietilo, un grupo 3-hidroxipropilo, un grupo 2-metoxietilo, un grupo furfurilo, un grupo metoxicarbonilmetilo o un grupo etoxicarbonilmetilo, m es 1, n es 1, X_1 es un átomo de 8-cloro, y
 25 X_2 representa un átomo de cloro o un grupo nitro, o una sal agrícolamente aceptable de los mismos.

9. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 6, donde m es un número entero de 1 a 3 y n es 0, o una sal agrícolamente aceptable del mismo.

30 10. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 6, donde R^{11} representa un grupo formilo, un grupo alquilo C4-6, un grupo alqueno C3-6 o un grupo alquino C3-6 en el que el grupo alquilo, el grupo alqueno y el grupo alquino están opcionalmente sustituidos con uno o más grupos hidroxilo o uno o más grupos alcoxi C1-3, o R^{11} representa un grupo alcocarbonilmetilo C1-3, un grupo alcoxi C1-3-alquilo C1-3 o un grupo furfurilo,
 35 m es 0,
 n es 1, y
 X_2 es un átomo de cloro, o una sal agrícolamente aceptable del mismo.

11. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 6, donde n es 1, o una sal agrícolamente aceptable del mismo.

40 12. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 6, donde m es de 1 a 3 y n es 1, o una sal agrícolamente aceptable del mismo.

13. El compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6, 9, 11 y 12, donde R^1 es un grupo alcocarbonilmetilo C1-3 o un grupo furfurilo, o una sal agrícolamente aceptable de los mismos.
 45

14. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 6, donde n es 1 y X_2 es un grupo trifluorometilo o un grupo ciano.

Fig. 1

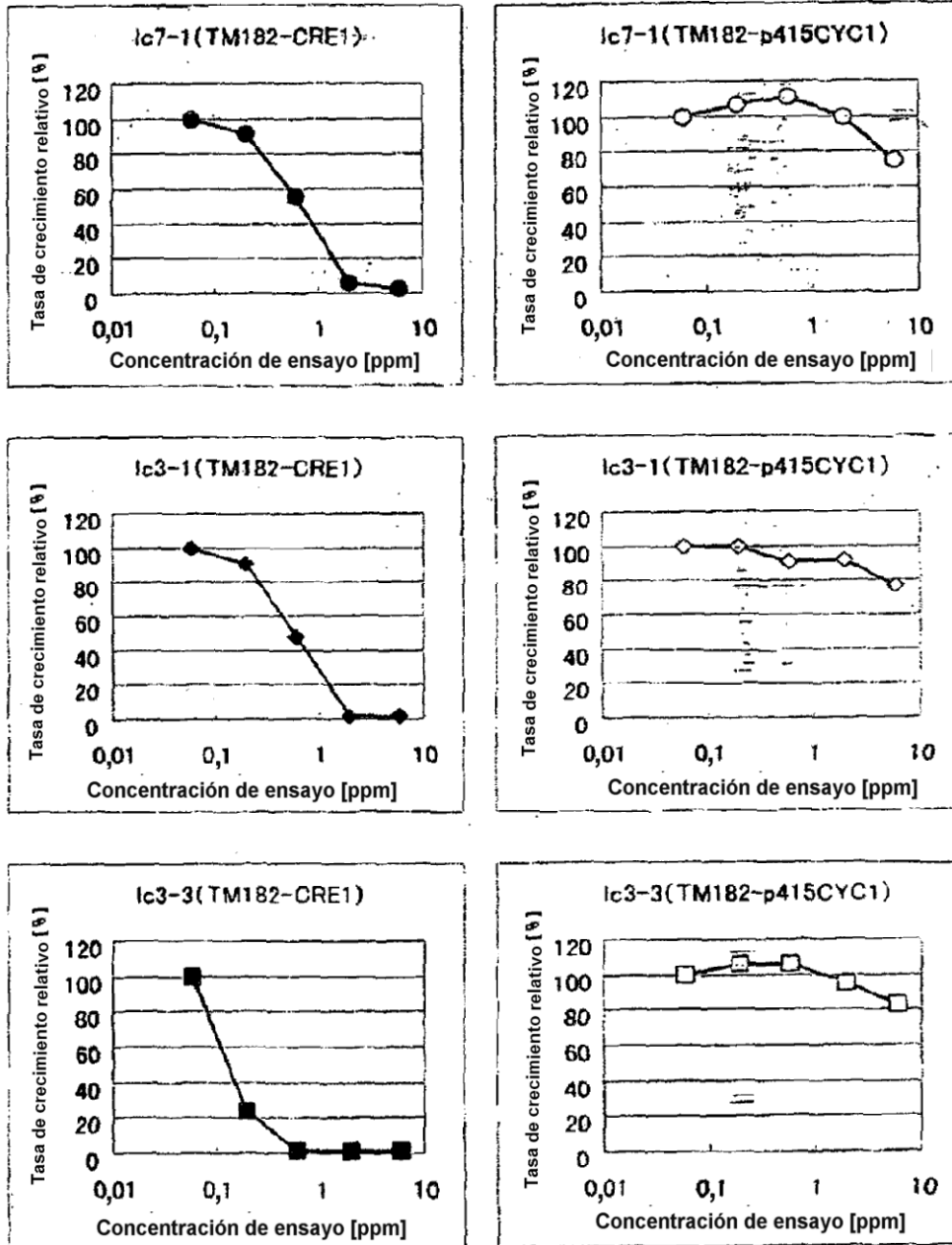


Fig.2

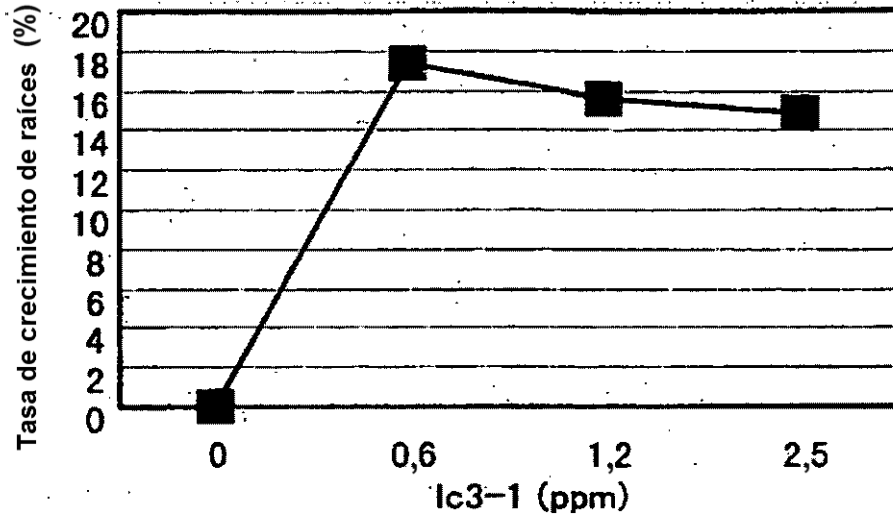


Fig.3

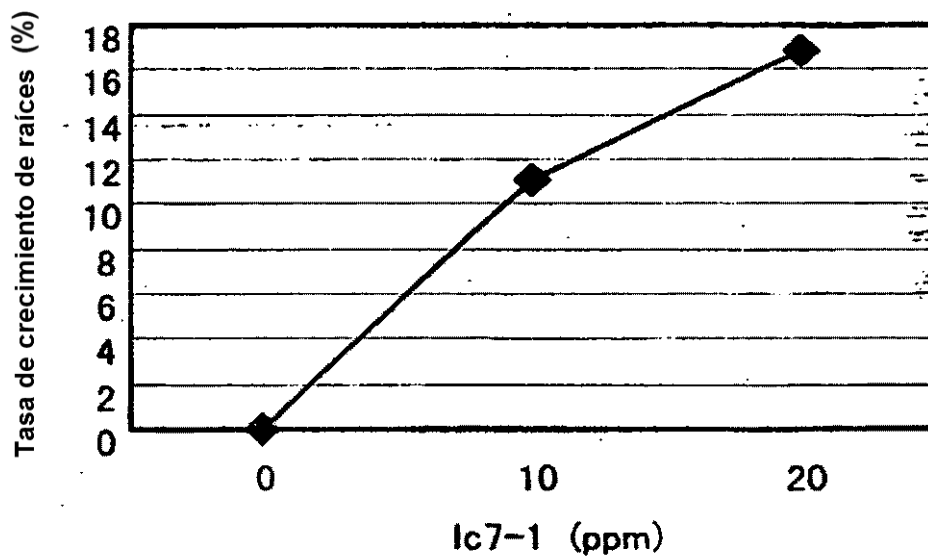


Fig.4

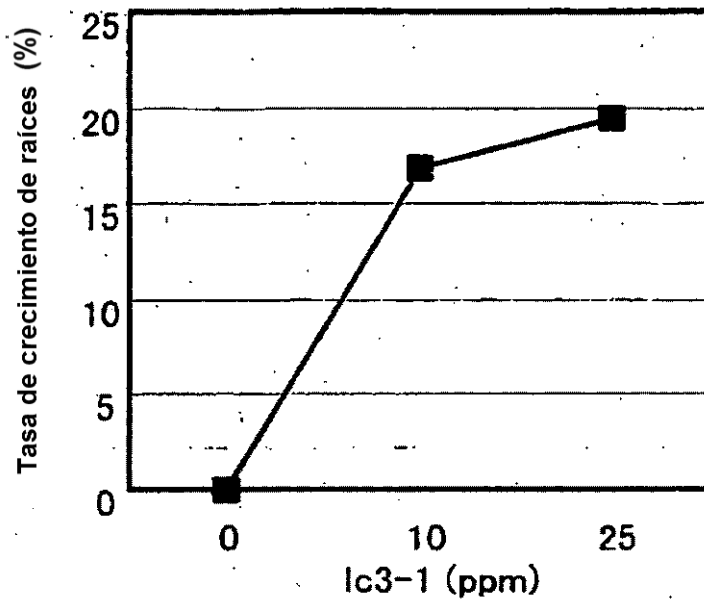


Fig.5

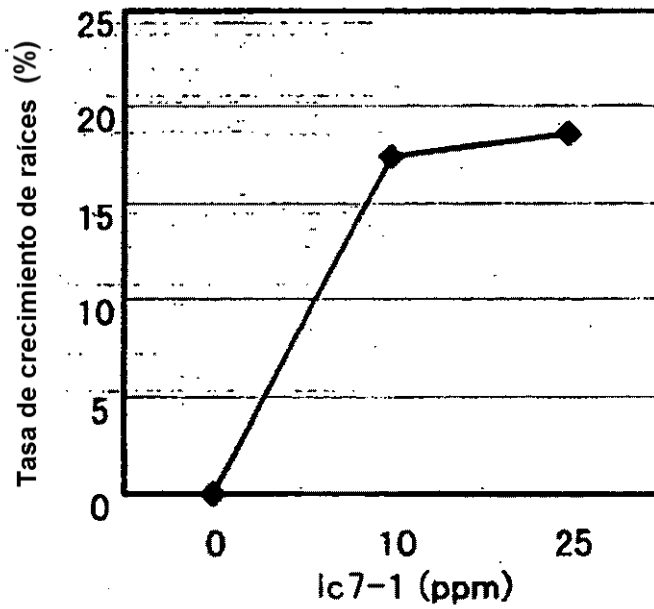


Fig. 6

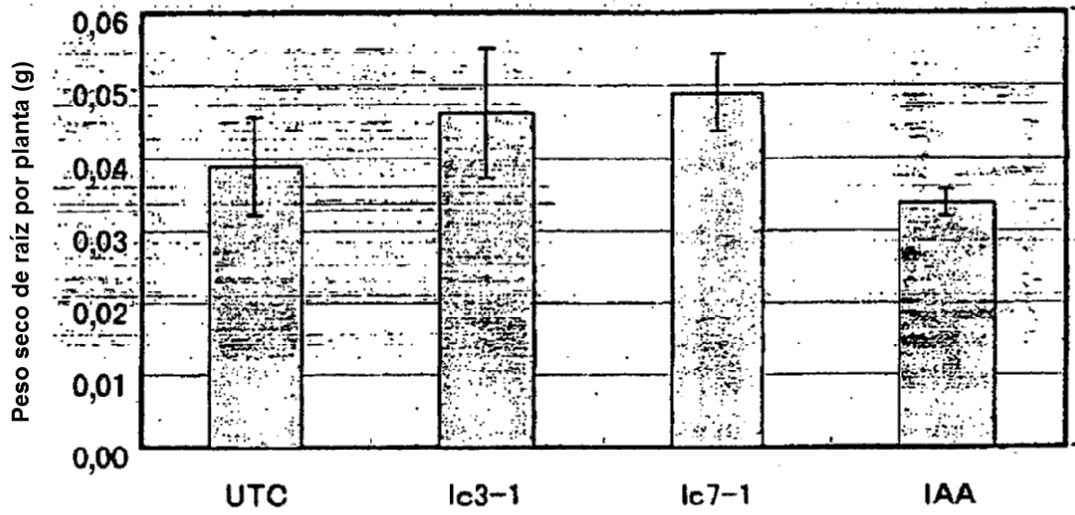


Fig. 7

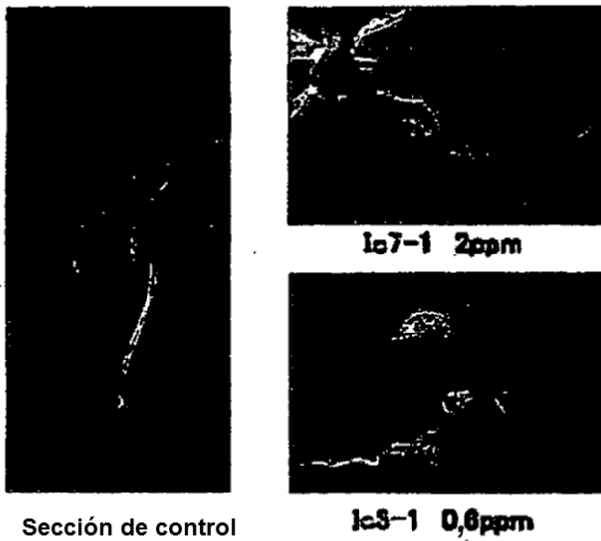


Fig. 8

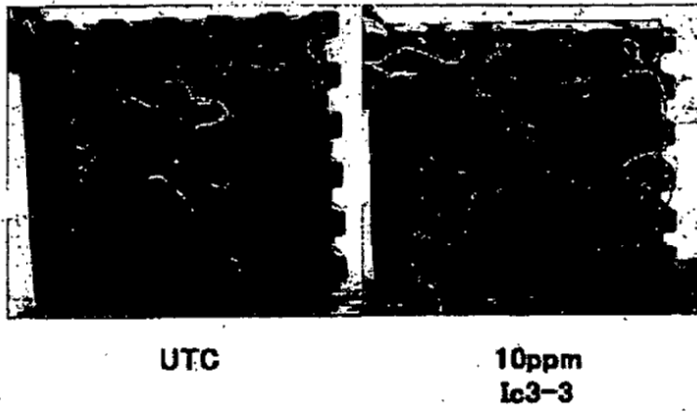


Fig. 9

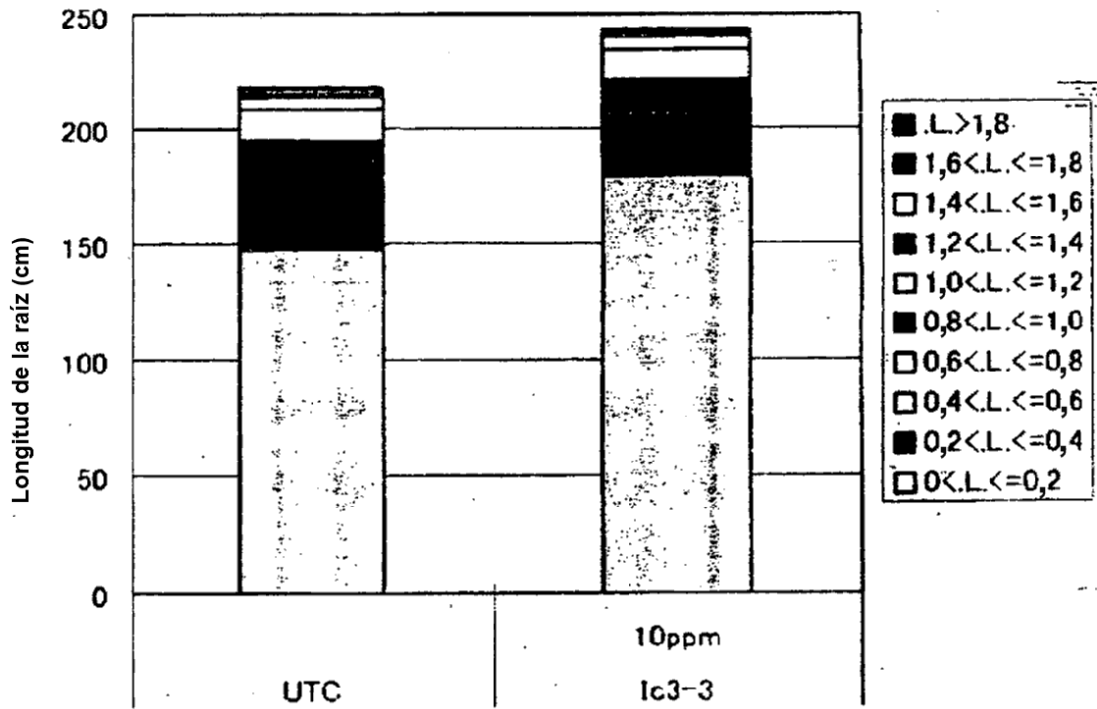


Fig.10

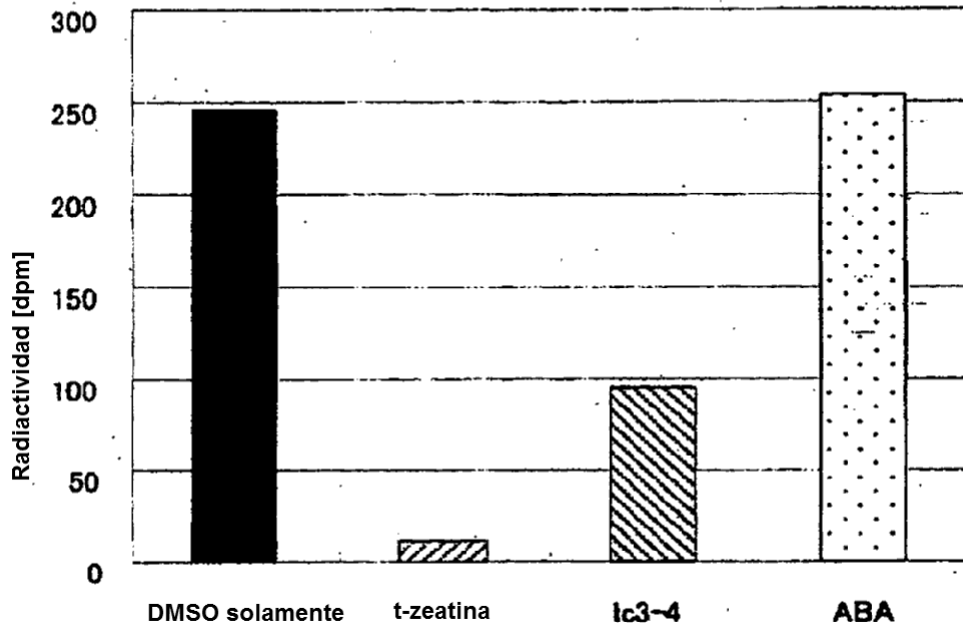


Fig.11

