

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 564 417**

51 Int. Cl.:

A01N 41/04	(2006.01) A01N 31/08	(2006.01)
A01N 59/16	(2006.01) A01N 37/06	(2006.01)
A01N 59/20	(2006.01)	
A01N 59/06	(2006.01)	
C09K 17/02	(2006.01)	
A01N 43/90	(2006.01)	
A01N 43/80	(2006.01)	
A01N 43/40	(2006.01)	
A01N 37/10	(2006.01)	
A01N 37/02	(2006.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.01.2004 E 04705419 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.01.2016 EP 1592301**

54 Título: **Composiciones de lignosulfonatos que protegen y mejoran los cultivos**

30 Prioridad:

27.01.2003 WO PCT/EP03/00840

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

22.03.2016

73 Titular/es:

**CERADIS B.V. (100.0%)
Agro Business Park 10
6708 PW Wageningen, NL**

72 Inventor/es:

**VAN DER KRIEKEN, WILHELMUS MARIA;
KOK, CORNELIS JOHANNES y
STEVENS, LUCAS HENRICUS**

74 Agente/Representante:

LAZCANO GAINZA, Jesús

ES 2 564 417 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

Composiciones de lignosulfonatos que protegen y mejoran los cultivos

- 5 La presente invención se refiere a las composiciones para la protección de los cultivos, tales como cereales tipo trigo, maíz, etc., y flores, frutas, etc. contra amenazas externas, particularmente contra patógenos, tales como hongos, para mejorar el rendimiento y/o calidad, en los métodos que usan estas composiciones y para las plantas o partes de las plantas tratadas con la composición.
- 10 Los cultivos agrícolas con frecuencia se someten a diversas amenazas bióticas y abióticas, que puede ser inducidas por patógenos, malas hierbas, la temperatura, la sequía, la luz, etc. Estos factores de tensión pueden afectar el rendimiento y/o la calidad del producto. Adicionalmente, generalmente, se aprecia por los consumidores comprar productos de alta calidad sin síntomas de tensión, tales como el amarillamiento de las hojas, marchitamiento o clorosis.
- 15 Las plantas son amenazadas por diversos microorganismos patógenos como los hongos, los virus y las bacterias. Para superar el problema de las infecciones por estos microorganismos, se aplican grandes cantidades de compuestos antimicrobianos (particularmente, los pesticidas sintéticos, tales como fungicidas y bactericidas). A partir del punto de vista del medio ambiente y la salud, se prefiere disminuir la cantidad de productos químicos que se aplican a las plantas y el suelo.
- 20 Se sabe que ciertos compuestos de origen natural pueden proteger la planta contra los microorganismos patógenos. Los llamados compuestos naturales para la protección de los cultivos (NCP) son sustancias orgánicas derivadas de organismos naturales (por ejemplo, feromonas, extractos de plantas), o compuestos inorgánicos que se encuentran en el medio ambiente natural (por ejemplo, fosfatos, azufre). Así, en comparación con los (NCP), los pesticidas convencionales son productos químicos sintéticos diseñados específicamente para la protección de las plantas. El uso de los compuestos naturales para la protección de los cultivos (NCP) es cada vez más preferido ya que los gobiernos de todo el mundo tienen como objetivo la reducción del uso de compuestos antimicrobianos sintéticos.
- 25 Sin embargo, los NCP tienen una utilidad limitada, debido a que generalmente, exhiben solo una actividad modesta. Cuando se usan en altas concentraciones, frecuentemente tienen efectos fitotóxicos. Adicionalmente, la acción de los NCP parece ser bastante impredecible (dependiendo de la planta y las condiciones ambientales). Esto explica por qué la aplicación de los NCP no se ha generalizado, a pesar de sus propiedades toxicológicas y ambientales muy favorables.
- 30 Por lo tanto, el primer objetivo de la invención es mejorar la utilidad de los NCP.
- JPS5675417 describe fungicidas de plantas de arroz que comprenden kasugamicina y lignosulfonato de calcio.
- 40 En la investigación que condujo la presente invención, sorprendentemente, se encontró que todos los problemas identificados anteriormente se pueden resolver con las composiciones que comprenden uno o más lignosulfonatos y natamicina.
- 45 Los lignosulfonatos son un derivado de la lignina y la forma comercialmente disponible de estos. La lignina es un componente de origen natural de las paredes celulares de plantas (por ejemplo en la madera) y uno de los recursos más abundantes y renovables de la naturaleza. La molécula de lignosulfonato es compleja y puede entrar en muchos tipos de reacciones químicas. Esta versatilidad permite que sea modificada en una familia completa de productos químicos especiales.
- 50 El lignosulfonato (LS) es un subproducto de la fabricación del papel obtenido a partir del licor de la madera agotado del pulpeo de sulfito. Es una mezcla compleja de polímeros con grupos sulfonato unidos a las moléculas y puede contener una cantidad sustancial de azúcares reductores. Particularmente los grupos sulfonato proporcionan LS con propiedades de intercambio catiónico, por ejemplo para los iones de amonio y metal. Debido a que los lignosulfonatos son un producto residual de la industria del papel, generalmente, están disponibles y se pueden usar en la composición a un costo relativamente bajo. Adicionalmente, los lignosulfonatos son biodegradables, ecológicos y seguros para su uso en
- 55 la agricultura.
- De acuerdo con el primer aspecto de la invención se proporciona una composición antimicrobiana que comprende lignosulfonatos (LS) y natamicina.
- 60 Así, la invención se refiere a la aplicación de la natamicina en conjunto con uno o más productos específicos sostenibles que proporcionan un efecto sinérgico o aditivo, y/o protegen a la planta contra la actividad fitotóxica de la NCP. Estos productos sostenibles específicos son biodegradables y ecológicos. El producto sostenible es lignosulfonato (LS) y los productos derivados de este.

5 La composición puede comprender además, compuestos químicos antimicrobianos, particularmente pesticidas químicos, más particularmente fungicidas químicos. La invención proporciona así, la aplicación combinada de cantidades reducidas de natamicina y uno o más productos sostenibles que proporcionan un efecto sinérgico o aditivo, y/o impiden la actividad fitotóxica de la natamicina contra la planta.

En la presente además, el producto sostenible es LS.

10 Así, de acuerdo con la invención se encontró que mediante la combinación del ingrediente activo con LS la eficacia del ingrediente activo puede mejorarse y/o la planta que se trata puede protegerse de la fitotoxicidad del ingrediente activo.

15 Fue particularmente sorprendente encontrar que mediante el uso de ellos en conjunto con LS algunos metales que son en sí tóxicos a los hongos y levaduras que se pueden usar en cantidades mucho más bajas para conseguir un efecto comparable.

20 Los metales que se encontraron que eran particularmente útiles en la invención son el cobre, zinc, aluminio, titanio, plata, cobalto y manganeso. El metal-LS tiene una actividad particularmente buena contra los hongos y las algas.

25 En una modalidad particular de la presente invención se usan los lignosulfonatos de titanio (TiLS) y/o plata (AgLS). El uso del titanio y/o la plata mejora más aun el efecto antimicrobiano de la composición. TiLS contiene TiO_2 . El TiO_2 finamente distribuido cataliza en la irradiación UV de la formación de los radicales de oxígeno que tienen actividad biocida. TiO_2 no es tóxico para los seres humanos (por ejemplo, está presente en la pasta de dientes). Los lignosulfonatos de plata liberan iones Ag en un medio acuoso. Los iones Ag son tóxicos para los microorganismos y por lo tanto, contribuyen a la efectividad de la composición.

30 El cobre es conocido por su actividad fungicida. Sin embargo, para ser efectivo se necesitan kilogramos de compuestos de cobre por hectárea tales como el sulfato de cobre o el óxido de cobre. Desde el punto de vista ambiental eso es demasiado y estos compuestos de cobre se prohibieron por lo tanto, como agente de protección de cultivos. A partir de los ejemplos se deduce que cuando se combina con lignosulfonato, la cantidad de cobre puede reducirse a decenas de gramos por hectárea permitiendo así la disponibilidad del cobre otra vez como agente de protección de cultivos.

35 Los compuestos naturales de protección de los cultivos son agentes de origen natural y protegen a las plantas o productos vegetales contra organismos o impiden la actividad del organismo; influyen en los procesos vitales de las plantas sin ser fertilizantes; conservan los productos vegetales, exterminan las plantas no deseadas; o destruyen las partes de la planta o impiden o inhiben el crecimiento no deseado de las plantas. Las listas de los NCP se pueden encontrar en <http://www.gewasbescherming.nl/index10i.html>.

En la invención, el primero de más compuestos naturales de protección de los cultivos es la natamicina.

40 La natamicina es muy sensible a la luz. La combinación con lignosulfonatos permite que la natamicina pueda aplicarse a las hojas, mientras que conserva su actividad.

45 Los lignosulfonatos no sólo reducen la fitotoxicidad de los NCP sino que protegen los compuestos antimicrobianos de la composición contra la degradación permitiendo así, su uso en la agricultura. Además, los lignosulfonatos proporcionan un efecto sinérgico, haciendo las plantas menos susceptibles a los compuestos antimicrobianos y aumentando el efecto de tales compuestos.

50 "Metal-LS" tal como se usa en esta solicitud se refiere a la combinación de cualquier o más metales con LS. El metal puede ser cualquiera unido a LS (por ejemplo como contra-iones) o se pueden utilizar en la misma composición o al mismo tiempo como LS.

El término "ácido-LS" tal como se usa en esta solicitud se refiere a la combinación de cualquier o más ácidos con LS. El ácido puede ser unido al LS o se pueden utilizar en la misma composición o al mismo tiempo que LS.

55 "Al mismo tiempo" en estas definiciones no significa necesariamente que el metal o el ácido y el LS deben estar presentes en el mismo período de tiempo completo, pero su presencia en o sobre la parte de la planta también puede superponerse parcialmente. "En la misma composición" no significa necesariamente que los dos o más ingredientes deben estar presentes en una composición antes de la administración a la planta o parte de planta, pero que en algún momento durante el tratamiento, los dos o más ingredientes están en contacto. Así, además puede significar que un ingrediente se aplica después de otro.

60 Antimicrobiano, particularmente composiciones fungicidas de la invención son aún más eficaces cuando se usan en una formulación que permite que el ingrediente activo permanezca en contacto con la planta o parte de la planta durante un período de tiempo prolongado. Es por ejemplo particularmente útil para administrar la composición de la invención en

una forma que impide que la composición de ondulado de las hojas, etc., para las que se administran. Las composiciones de la invención pueden comprender más aún compuestos que facilitan la extensión, la efectividad, la estabilidad, etc. de las composiciones. Ejemplos de tales compuestos son los detergentes, amortiguadores, agentes quelantes, agentes de extensión, conservantes.

La composición con función antimicrobiana se puede aplicar a las plantas en forma de sólido, pero además se puede aplicar en solución. La solución se puede aplicar sobre las plantas de cultivo utilizando métodos conocidos por una persona con experiencia en la industria, pero se aplica preferentemente por rociado. El rociado permite una distribución uniforme de la composición.

Debido a las excelentes características anti-microbianas de la composición de la presente invención, la composición se puede utilizar para la protección de plantas de cultivo en crecimiento, pero además puede ser utilizado para la descontaminación y la posterior conservación y protección de partes de la planta, tales como semillas y bulbos, contra microorganismos patógenos.

La persona experta es muy capaz de diseñar la formulación más útil para una aplicación particular.

El lignosulfonato está, en general, unido con el Ca^{2+} , pero además puede estar unido con otros cationes orgánicos e inorgánicos.

En una modalidad de la invención, el componente lignosulfonato de la composición comprende al menos en parte lignosulfonato de amonio y/o lignosulfonato potasio. Estos dos cationes son nutrientes valiosos para las plantas de cultivo. Debido a que el lignosulfonato es un material de intercambio de iones se puede utilizar para adicionar estos nutrientes al suelo mediante el intercambio de los iones con iones menos deseables presentes en el suelo o sustrato. De esta manera, los nutrientes se pueden adicionar fácilmente. Ya que el amonio y el potasio son así liberados lentamente de la parte superior de la capa de una formulación de liberación sostenida se proporciona a las plantas de cultivo en crecimiento.

El metal-LS de la invención además tiene propiedades de liberación sostenida cuando el metal está unido al LS. Está dentro del conocimiento general promedio de la persona experta para preparar el complejo del metal-LS.

Debido a que las funciones de la capa superior como una matriz de liberación sostenida además, otros compuestos se pueden adicionar a la formulación los que mejoran el crecimiento de las plantas de cultivo como elementos trazas como el cobre, el molibdeno, el boro, el zinc, el manganeso, el cobalto; nutrientes de las plantas, tales como el nitrógeno, el potasio, el magnesio; agentes antimicrobianos como el carvacrol, la azadiractina, y otros NCP como se ha mencionado en esta solicitud.

La invención se relaciona además con métodos para la protección de las plantas y partes de las plantas contra patógenos en donde las composiciones de la invención se aplican al suelo, el sustrato, la planta o parte de la planta.

El lignosulfonato es típicamente una mezcla de más o menos degradados residuos de lignina de diferentes tamaños. Esta mezcla se puede fraccionar y/o tratar químicamente. Cuando se usa en esta aplicación los términos "lignosulfonato" y "lignosulfonatos" están pretendiendo significar tanto crudo, formas no tratadas de lignosulfonato, así como lignosulfonato más o menos purificado y/o modificado químicamente o fracciones de ellos.

Los lignosulfonatos pueden ser o bien una mezcla o moléculas de lignosulfonato aisladas. Por lo general, se utiliza una mezcla cruda, pero La invención puede, en algunas aplicaciones, tales como la inmunización, beneficiarse de la utilización de LS puros. Las mezclas de crudo sin embargo contienen de 5 a 10% de azúcares reductores que pueden conducir a pegajosidad de partes de la planta, tales como hojas, cuando una solución del mismo se rocía sobre la planta o se aplican a la planta de cualquier otra forma. Las mezclas crudas sin embargo, son más rentables, ya que no requieren un fraccionamiento posterior para eliminar los azúcares. Los lignosulfonatos utilizados según La invención son por lo general Ca-lignosulfonatos o NH_4 -lignosulfonatos.

Tal como se usa en esta solicitud, el término "ingrediente activo" pretende significar cualquier ingrediente que contribuye a la función de la composición.

La invención se ejemplificará más aun con referencia a las siguientes figuras y ejemplos. Sin embargo debe entenderse que estas figuras y ejemplos no pretenden limitar La invención de cualquier manera posible.

Las figuras muestran:

Figura 1: Efecto del CaLS y la natamicina en el desarrollo de *Botrytis elliptica* en las puntas de las hojas de lirio. A la izquierda: control (sin tratamiento); en el medio: el tratamiento con la formulación; a la derecha: el tratamiento formulado

con natamicina. La formulación contenía 0.5% (V/V) CaLS, 0.08% de EDTA y 0.007% NU-film-17 (un engomado/esparcidor no iónico; Miller).

5 Figura 2: Efecto del TiLS, el CaLS y la natamicina en el desarrollo de *Botrytis elliptica* en las puntas de las hojas de lirio. Panel superior: Efecto del TiLS y el CaLS. Panel inferior: Efecto de (combinaciones de) natamicina y TiLS.

Figura 3: Efecto del titanio-LS en el crecimiento de *Botrytis* en placas de petri con medio de cultivo caldo nutriente.

10 Figura 4: Efecto del plata-LS en el crecimiento de *Botrytis* en placas de petri con medio de cultivo caldo nutriente.

Figura 5: Placas petri que muestran el efecto de diferentes combinaciones de metal -LS y/o conservantes en el crecimiento de *Botrytis cinerea*.

15 Figura 5A: Fila superior muestra los efectos después de 3 días de tratamiento con control de agua y tratamiento con bronopol, fila inferior muestra los efectos después de 3 días de tratamiento con control de agua y tratamiento con ácido sodiometylparabenzoico.

20 Figura 5B: De izquierda a derecha: efectos del agua, 1 g/L de cobre-LS (Cu-LS), 1.5 g/L de cobalto-LS (Co-LS) y la combinación de 1 g/L de Cu-LS y 1.5 g/L de Co-LS después de 3 días.

Figura 5C: De izquierda a derecha: efectos del agua, 5 g/L de cobre-LS (Cu-LS), 5 g/L de zinc-LS (Zn-LS) y la combinación de 5 g/L de Cu-LS y 5 g/L de Zn-LS después de 3 días.

25 Figura 5D: De izquierda a derecha: efectos del agua, 5 g/L de cobre-LS (Cu-LS), 5 g/L de ácido fórmico (Fórmico-LS) y la combinación de 5 g/L de Cu-LS y 0.5 g/L Fórmico-LS después de 3 días.

Figura 5E: De izquierda a derecha: efectos del agua, 5 g/L de zinc-LS (Zn-LS), 0.5 g/L de ácido fórmico (Fórmico-LS) y la combinación de 5 g/L de Cu-LS y 0.5 g/L Fórmico-LS después de 3 días.

30 Figura 5F: El panel superior de izquierda a derecha: efectos del agua, 5 g/L de cobre-LS (Cu-LS), y 5 g/L de zinc-LS (Zn-LS) después de 7 días; fila inferior de izquierda a derecha: efectos de 7.5 g/L de cobalto-LS (Co-LS), la combinación de 5 g/L de Cu-LS y 7.5 g/L Co-LS, y la combinación de 5 g/L Zn -LS y 7.5 g/L de Co-LS después de 7 días.

35 Figura 5G: El panel superior de izquierda a derecha: efectos del agua, 5 g/L de cobre-LS (Cu-LS), y 5 g/L de zinc-LS (Zn-LS) después de 7 días; fila inferior de izquierda a derecha: efectos de 7.5 g/L de aluminio-LS (Al-LS), la combinación de 5 g/L de Cu-LS y 7.5 g/L de Al-LS, y la combinación de 5 g/L Zn-LS y 7.5 g/L de Al-LS después de 7 días.

40 Figura 5H: El panel superior de izquierda a derecha: efectos del agua y 5 g/L de cobre-LS (Cu-LS) después de 7 días; fila inferior de izquierda a derecha: efectos de 0.25 g/L de ácido sodiometylparabenzoico (parabén), y la combinación de 5 g/L de Cu-LS y 0.25 g/L de parabén después de 7 días.

45 Figura 5I: El panel superior de izquierda a derecha: efectos del agua, 5 g/L de cobre-LS (Cu-LS), 5 g/L de zinc-LS (Zn-LS) y la combinación de 5 g/L de Cu-LS y 5 g/L Zn-LS después de 7 días; fila inferior de izquierda a derecha: efectos de 0.5 g/L del ácido fórmico (Fórmico-LS), la combinación de 0.5 g/L de Fórmico-LS y 0.5 g/L de Cu-LS, y la combinación de 5 g/L Zn-LS y 0.5 g/L de Fórmico-LS después de 7 días.

50 Figura 6: Efectos de diferentes tratamientos de *Phytophthora infestans* infección en hojas (expresado como porcentaje de hojas totales) en la papa. Tres días después del rociado con los diferentes compuestos-LS de las plantas de la papa se inocularon con *Phytophthora*. Una semana después de la inoculación se monitorearon los efectos. El panel superior muestra los efectos de diferentes compuestos de metal-LS en comparación con el efecto de una concentración subóptima del fungicida sintético Shirlan®. El panel inferior muestra el efecto de tres concentraciones de cobre-LS (CuLS) en conjunto con tres concentraciones de Shirlan®.

55 Figura 7: Efectos del formulado de natamicina (diversas combinaciones) y el subproducto obstáculo (véase el texto del ejemplo 11) en bulbos de tulipán infectados con *Fusarium* (véase el Ejemplo 10 para el procedimiento de inoculación) en comparación con el efecto del control (sin tratamiento) y de los tratamientos con formaldehído al 0.5%.

Ejemplos

60 **EJEMPLO 1** (ejemplo comparativo, que no forma parte de la invención)

Protección de *Solanum niger* las plantas a partir de la tensión inducida por dosis bajas de herbicidas

En un experimento *Solanum niger* las plantas se cultivaron durante 6 semanas después de la siembra. Las plantas se rociaron después con un nivel subóptimo del herbicida (ya sea con el 6% de la dosificación recomendada de resumen, que contiene el compuesto activo glifosato, o con el 10% de la dosificación recomendada en la etiqueta de 2,4 P, respectivamente). Los grupos de plantas se pulverizaron con una mezcla de la baja dosificación del herbicida y diferentes concentraciones y tipos de LS (ver Tabla).

Los resultados a partir de la Tabla 1 muestran que el LS induce la tolerancia a la tensión a las dosificaciones bajas de herbicidas.

Tabla 1

Tratamiento	Resumen (glifosato)	2,4-D	Incremento porcentual en peso seco en comparación con la aplicación baja de herbicidas	
	Peso seco (g) 6 semanas después del tratamiento		Resumen	2,4-D
control sin tratamiento	2.4 g	2.4 g		
dosificación normal del herbicida	plantas muertas	plantas muertas		
dosificación baja del herbicida	1.15 g	1.05 g		
dosificación baja del herbicida + 2g/L calcio-LS	1.9 g	1.85 g	65%	76%
dosificación baja del herbicida + 10g/L calcio-LS	1.6	1.3	39%	24%
dosificación baja del herbicida + 25g/L calcio-LS	2.35	1.1	104%	5%
dosificación baja del herbicida + 10 g/L hierro-LS	2.05	1.25	78%	19%

EJEMPLO 2 (ejemplo comparativo, que no forma parte de la invención)

Efecto del NH₄-LS y un NCP, carvacrol, sobre la infección (lesiones) de *Botrytis elliptica* en las puntas de las hojas de lirio

En todas las incubaciones la cantidad de NH₄-LS fue de 5 g/L (la cantidad de carvacrol se brinda en la tabla).

En un sistema de prueba, se usaron las puntas de las hojas de lirio. Para la infección con patógenos, las puntas de las hojas se colocaron en bandejas de plástico cuadradas especiales (10 cm x 10 cm x 2 cm) que se dividieron en 25 secciones pequeñas de 2 x 2 cm (ver la Figura 1). En el inicio de los experimentos, las bandejas se llenaron con agua (4 mL por sección pequeña). Después las puntas de las hojas se colocaron en las bandejas y, finalmente, las puntas de las hojas se rociaron con las diferentes combinaciones de LS-NCP. En la tabla se brinda la combinación de LS con carvacrol en una formulación de di-1-P-menteno y EDTA.

Veinticuatro horas después del tratamiento las puntas de las hojas en las bandejas se infectaron con 2 ?L de la suspensión de esporas de *Botrytis elliptica* (aproximadamente 500 esporas /?L, ver más abajo).

Posteriormente, las bandejas de plástico se pusieron en un envase transparente con alta humedad. Este envase se colocó en un invernadero con temperatura y humedad controladas (12 horas de luz, 20°C, y 400-600 ppm de CO₂). Cada bandeja contenía 15 puntas de las hojas y todos los experimentos se realizaron por triplicado.

Para la producción de esporas de *Botrytis*, el hongo se cultivó en 25 ml de medio sólido estéril que contiene caldo de

cultivo líquido. Las esporas se aplicaron a las hojas en medio Gamborg B5 (Gamborg 3.16 g/L, Na-fosfato de Na 10 mM, pH=6.5, sacarosa 10 Mm. Después de 3, 5 y 7 días de incubación el tamaño (mm) de las lesiones de *Botrytis* se midió.

La Tabla 2 muestra los resultados.

Tabla 2

Tratamiento	Tamaño de las lesiones (mm) después de 3 días	Tamaño de las lesiones (mm) después de 5 días	Tamaño de las lesiones (mm) después de 7 días
Control sin tratamiento	6.8	8.6	14.2
formulación del control	5.3	7.5	12.5
5 g/L NH ₄ -LS/ 0.2% carvacrol	0.9	1.8	2.7
5 g/L NH ₄ -LS/ 0.8% carvacrol	0.2	0.3	0.3
5 g/L NH ₄ -LS/ 1.6% carvacrol	0.1	0.5	1.2

EJEMPLO 3

Efecto de LS y natamicina en el desarrollo de *Botrytis* en las puntas de las hojas de lirio.

El mismo método se usó como en el Ejemplo 2. Las puntas de las hojas en la bandeja izquierda se trataron con agua, las puntas de las hojas en el medio se trataron con la formulación LS sin natamicina y las puntas de las hojas en la incubadora se trataron con la combinación LS-natamicina.

La Figura 1 muestra que la natamicina formulada con LS protege muy bien contra *Botrytis*. La natamicina-LS además protege contra otros hongos. El tratamiento con natamicina sola proporcionó una protección adecuada, pero además produjo algunos daños en las hojas. La combinación con LS es por lo tanto mejor.

EJEMPLO 4

El efecto del Titanium-LS en el crecimiento de *Botrytis* en las puntas de lirio

El experimento se realizó como se describió en el Ejemplo 2 con la natamicina (2 g/L) y el titanio-LS (0.2 g/L y 1 g/L). Los resultados se muestran en la Figura 2. La combinación de la natamicina y el titanio-LS en una cantidad de 1 g/L conduce a una ausencia completa de las lesiones.

EJEMPLO 5 (ejemplo comparativo, que no forma parte de la invención)

Efecto del titanio-LS en el crecimiento de *Botrytis* en placas de Petri con medio de cultivo de caldo nutriente

Las esporas de *Botrytis* se incubaron en medio de cultivo esterilizado que contiene diferentes concentraciones de Ti-LS. Las esporas se colocaron en el medio de la placa de Petri y se midió el tamaño de la infección (diámetro de la colonia de *Botrytis*) después de 5 días. La Figura 3 muestra los resultados.

El resultado del experimento fue que a una concentración inferior a 1.6 g/L de Ti-LS el desarrollo de *Botrytis* ya estuvo completamente bloqueado.

EJEMPLO 6 (ejemplo comparativo, que no forma parte de la invención)

Efecto de la plata-LS en el crecimiento de *Botrytis* en placas de Petri con medio de cultivo caldo nutriente

Las esporas de *Botrytis* se incubaron en el medio de cultivo esterilizado que contiene diferentes concentraciones de Ag-LS. Las esporas se colocaron en el medio de la placa de Petri y se midió el tamaño de la infección (diámetro de la colonia de *Botrytis*) después de 5 días.

La Figura 4 muestra que a una concentración inferior a 1 g/L de Ag-LS el desarrollo de *Botrytis* se bloqueó completamente.

5 **EJEMPLO 7** (ejemplo comparativo, que no forma parte de la invención)

Efecto de metal-lignosulfonatos sobre el crecimiento de *Botrytis* en placas de Petri

10 Se probó el efecto de diferentes compuestos de lignosulfonatos sobre el desarrollo de las esporas de *Botrytis cinerea* y *Botrytis elliptica* incubadas en medio de cultivo que contiene extracto de malta *in vitro*. El extracto de malta fue de la compañía Oxoid B.V. (Haarlem, Países Bajos) y el método usado estuvo de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

15 Las placas de Petri se incubaron a 20°C durante 3 días en la oscuridad. Por placa Petri 700 esporas de *Botrytis cinerea* y 600 esporas de *Botrytis elliptica* se incubaron. El diámetro de la colonia del hongo en la placa de Petri se da en la tabla 3.

Tabla 3

Compuesto	Diámetro (mm)	
	<i>B. cinerea</i>	<i>B. elliptica</i>
agua (referencia)	21	13
CaCl₂* (g/L) (referencia)		
0.006	21	14
0.028	20	13
0.138	21	12
0.686	21	12
1.375	21	12
Cu-LS (g/L)		
0.04	22	14
0.2	20	15
1	18	12
5	13	7
10	4	0
Co-LS (g/L)		
0.04	20	13
0.2	20	13
1	13	10
5	0	2
10	0	1
Al-LS (g/L)		
0.04	22	13
0.2	20	13
1	19	12
5	16	10
10	0	1

	Ácido fórmico/ácido propiónico-LS(g/L)		
5	0.04	20	13
	0.2	17	12
	1	0	0
10	5	0	0
	10	0	0
	Na-metil-parabén (g/L) (referencia)		
15	1	0	0
	5	0	0
	25	0	0
20	Bronopol (mg/L) (referencia)		
	2	20	12
	10	20	12
25	50	14	10
30	*La concentración de Ca en CaCl ₂ es igual a la concentración de Ca en Ca-LS: la proporción de calcio en Ca-LS fue aproximadamente 5%. Ca-LS = lignosulfonato de calcio; CaCl ₂ = cloruro cálcico; Zn-LS = lignosulfonato de zinc; Cu-LS = lignosulfonato de cobre; Co-LS = lignosulfonato de cobalto; Al-LS = lignosulfonato de aluminio; ácido fórmico/ácido propiónico LS = 34% ácido fórmico + 7% ácido propiónico + 30% lignosulfonato + 29% agua; Na-metilparabén = ácido metilparabenzoico de sodio; Bronopol = 2-bromo-2-nitro-1,3-propanodiol.		

Los resultados muestran que los compuestos de metal-LS inhiben el crecimiento tanto de *Botrytis cinerea* como de *Botrytis elliptica*.

EJEMPLO 8 (ejemplo comparativo, que no forma parte de la invención)

Efecto de las combinaciones de metal-lignosulfonatos sobre el crecimiento de *Botrytis* en placas de Petri

El mismo experimento como se describió en el Ejemplo 7 se llevó a cabo con combinaciones de metales u ácido-lignosulfonatos entre sí o con fungicidas conocidos. La Figura 5 muestra los resultados después de 3 días (Figuras 5A-E) y 7 días (Figuras 5F- I).

Se deduce a partir de esta figura que las combinaciones de dos metal-LS o un metal-LS con un fungicida conocido o con un ácido-LS puede abolir completamente el crecimiento de *Botrytis cinerea in vitro*.

EJEMPLO 9 (ejemplo comparativo, que no forma parte de la invención)

Lignosulfonato metálico para controlar *Phytophthora infestans* en la papa

Cinco plantas de papa se trataron con las siguientes soluciones de lignosulfonato en agua:

- 1) 1 g/L lignosulfonato de calcio (CaLS) (referencia);
- 2) 1 g/L lignosulfonato de aluminio (AILS) ;
- 3) 1 g/L lignosulfonato de cobre (CuLS);
- 3a) 2.5 g/L lignosulfonato de cobre (CuLS);
- 4) 1 g/L lignosulfonato de titanio (TiLS);

Tres días después del tratamiento, las 5-10 hojas de cada planta se inocularon en cinco lugares con *Phytophthora infestans*. Una semana después se evaluaron las plantas. Los resultados se presentan en la Tabla 4.

Tabls 4

núm.	metal-LS (g/L)	% de infección
Control	-	98.8
1 (referencia)	CaLS (1)	98.8
2	AILS (1)	81.3
3	CuLS (1)	12.5
3a	CuLS (2.5)	5.6
4	TiLS (1)	100

Se deduce que CuLS solo reduce significativamente la infección y así, es activo por sí mismo como fungicida.

El efecto de estos lignosulfonatos sobre la actividad del fungicida comercial Shirlan® (además conocido como fluazinam o 2,6-dinitroanilina, o 3-cloro-N- [3-cloro-2,6-dinitro-4-(trifluorometil)fenil]-5-(trifluorometil)-2-piridinamina; obtenido a partir de Syngenta) se probó también. El experimento se realizó como se describió anteriormente con los mismos lignosulfonatos metálicos, en la misma concentración y adicionalmente 0.0032 L/ha o 0.016 L/ha de Shirlan®. Los resultados se muestran en la tabla 5 y la Figura 6.

Tabla 5

núm.	metal-LS (g/L)	% de infección		
		0 L/ha Shirlan®	0.0032 L/ha Shirlan®	0.016 L/ha Shirlan®
Control	-	98.1	93.1	64.5
1 (referencia)	CaLS (1)	98.8	98.8	62.9
2	AILS (1)	81.3	66.3	32.5
3	CuLS (1)	12.5	13.8	3.8
3a	CuLS (2.5)	5.6	6.3	2.5
4	TiLS	100.0	85.0	40.0

Se deduce de la Tabla 5 y la Figura 6 que el metal-LS mejora significativamente la actividad fungicida de Shirlan®, que es un claro efecto sinérgico.

EJEMPLO 10 (ejemplo comparativo, que no forma parte de la invención)

Uso del ácido-LS en la protección contra *Fusarium* en bulbos de tulipán

La composición contiene 30% de ácido fórmico, 6% de ácido propiónico, 20% de LS y 44% de agua para el tratamiento de los bulbos de tulipán infectados con *Fusarium*.

Cinco macetas se llenaron con tierra de maceta y 10 bulbos de tulipán cultivar Prominence, tamaño 12/13. Los bulbos se inocularon con *Fusarium* sumergiéndolos 15 minutos en una solución altamente infectada con *Fusarium*.

Los resultados de la prueba se resumen en la Tabla 6.

Tabla 6

Composición	infección	estado de la planta después de 1 mes*	% efloramiento después de 6 semanas	% <i>Fusarium</i> en el bulbo		
				infección pesada	infección ligera	Total
sin tratamiento	no infestado	7.2	78	30	54	84**
sin tratamiento	infestado	3.4	0	100	0	100
0.5% formaldehído (referencia)	infestado	10	100	0	22	22
1% composición de la invención	infestado	9.4	96	8	42	50

* el estado de la planta varía a partir de 0 (mal) a 10 (bien)
 La infección con ***Fusarium* puede ser de origen natural o inducida sumergiendo el bulbo en la solución de *Fusarium*

No se encontraron síntomas fitotóxicos durante el cultivo. La composición de la invención es muy eficaz en el tratamiento del *Fusarium*.

Ejemplo 11

Uso de Cu-LS en conjunto con natamicina en la protección contra *Fusarium* en bulbos de tulipanes

El experimento se realizó como se describió en el Ejemplo 10 pero con diferentes tratamientos que se resumen en la tabla 7.

Tabla 7

Número	Tratamiento
1 (control)	Agua
2 (referencia)	55 ppm natamicina en la formulación
3 (referencia)	110 ppm natamicina en la formulación
4 (referencia)	220 ppm natamicina en la formulación
6	55 ppm natamicina en la formulación + 50% obstáculo*
7	110 ppm natamicina en la formulación + 50% obstáculo*
8	220 ppm natamicina en la formulación + 50% obstáculo*
11	110 ppm natamicina en la formulación + 100% obstáculo*
15	

*100% obstáculo = Cu-LS (5g LS + 0.25 g de Cu por litro) + 15 µl/L 5-cloro-2-metil-4-isotiazolin-3-ona/2-metil-4-isotiazolin-3-ona (CIT/MIT en una relación 3:1) + 50 mg/L de bronosol.

Los resultados se muestran en la Figura 7. Los tulipanes que se trataron solo con natamicina muestran algunas manchas amarillas en las hojas y a lo largo de los bordes de las hojas, lo que indica que los bulbos están infectados. Las hojas de tulipanes tratadas con natamicina y Cu-LS no mostraron tales manchas.

REIVINDICACIONES

- 5
- 10
- 15
- 20
1. Composición para la protección de un cultivo agrícola contra la tensión biótica causada por los microorganismos, particularmente hongos, cuya composición que comprende uno o más lignosulfonatos y natamicina.
 2. Composición de acuerdo con la reivindicación 1, en donde uno o más lignosulfonatos son lignosulfonatos metálicos.
 3. Composición de acuerdo con la reivindicación 2, en donde los lignosulfonatos metálicos se seleccionan del grupo que consiste de lignosulfonatos de titanio, lignosulfonatos de cobre, lignosulfonatos de cobalto, lignosulfonatos de zinc, lignosulfonatos de aluminio, lignosulfonatos de manganeso y lignosulfonatos de plata.
 4. Composición de acuerdo con las reivindicaciones 2 a 3, en donde los lignosulfonatos metálicos son lignosulfonato de cobre.
 5. Composición de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde la composición está en una forma sólida, particularmente en polvo, hojuelas, gránulos, partículas, polvo humectante.
 6. Método para proteger las plantas o partes de las plantas contra tensión biótica que comprende aplicar la composición de acuerdo con las reivindicaciones 1-5 para las plantas o partes de la planta.

Figura 1

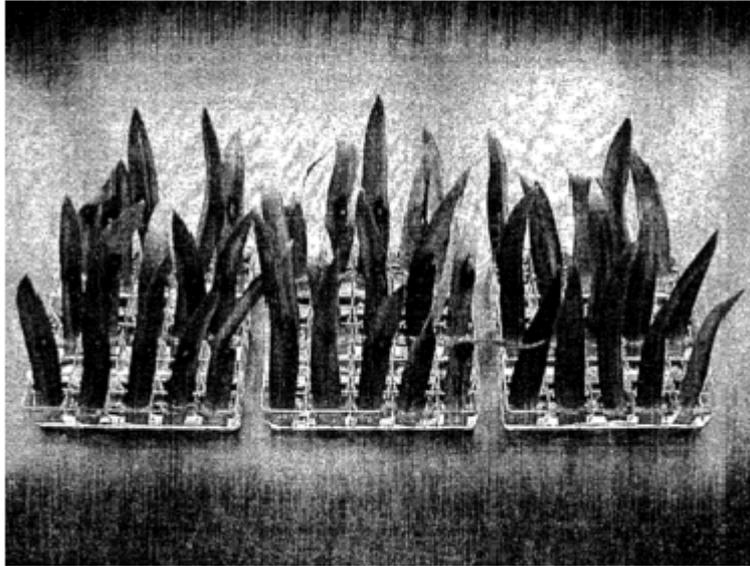


Figura 2

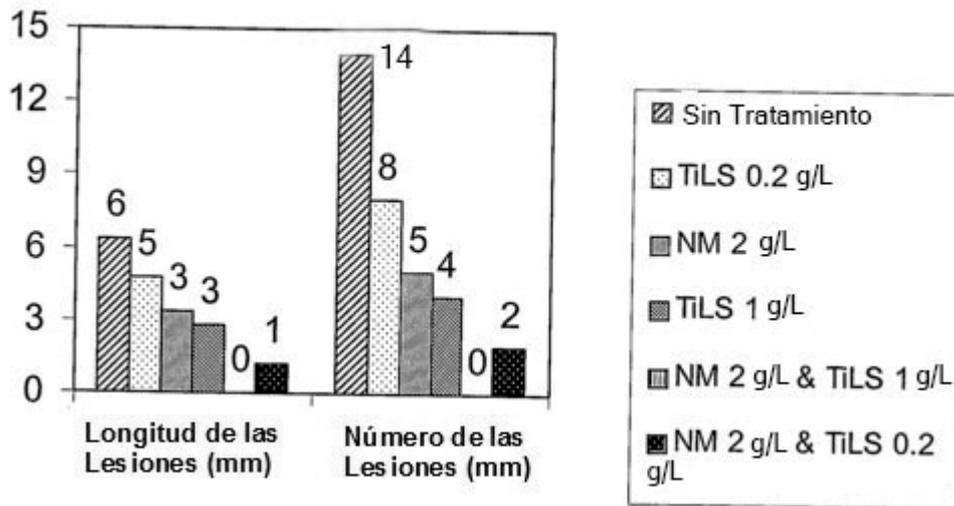
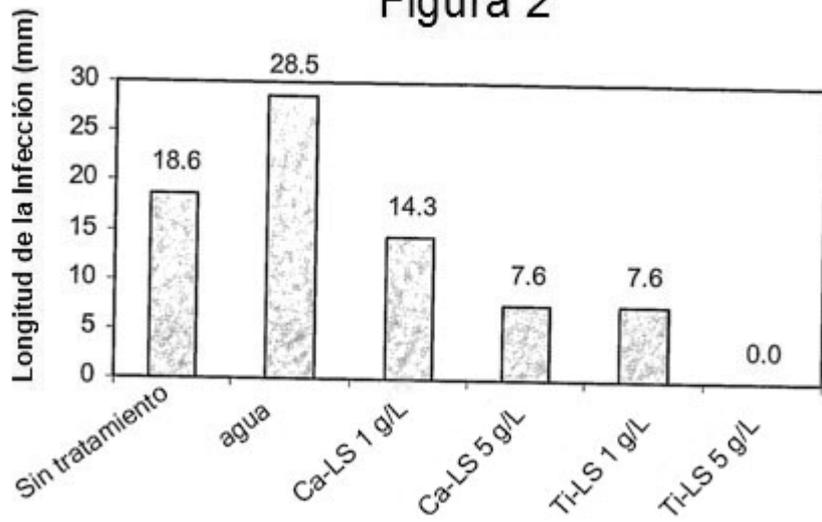


Figura 3

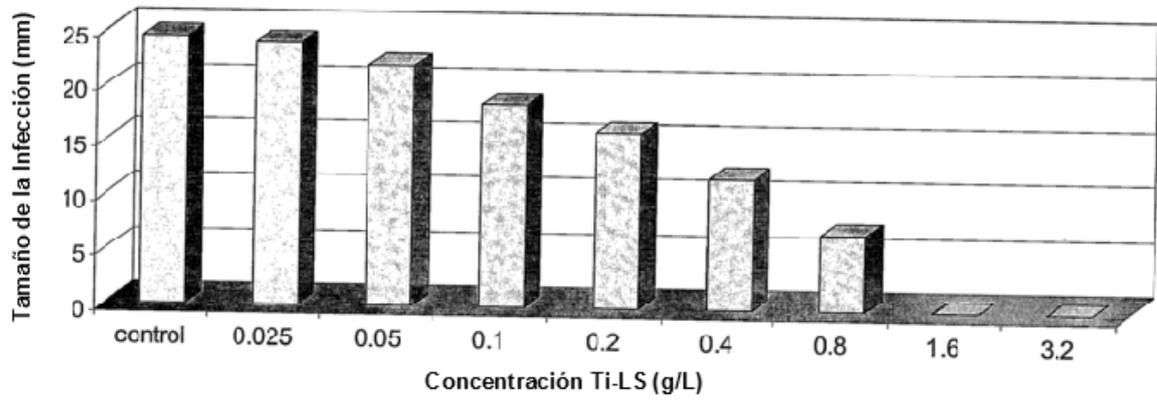


Figura 4

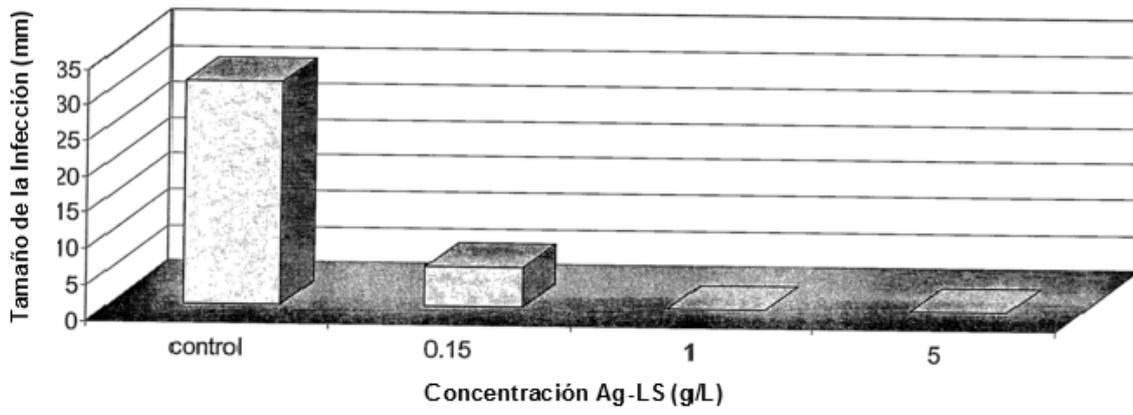


Figura 5A

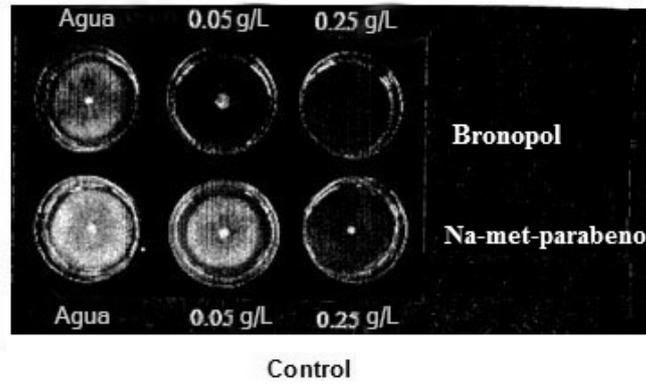


Figura 5B

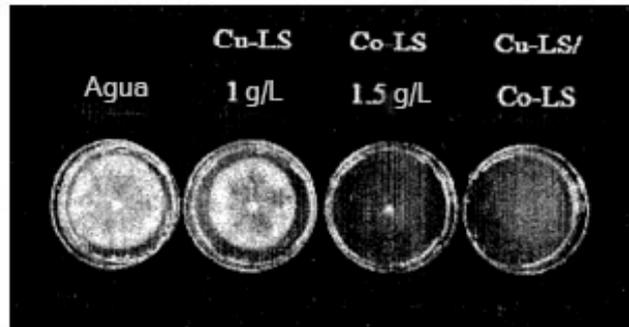


Figura 5C

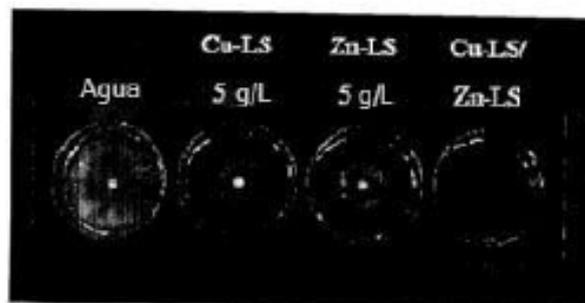


Figura 5D

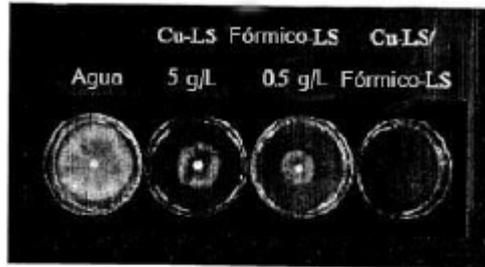


Figura 5E

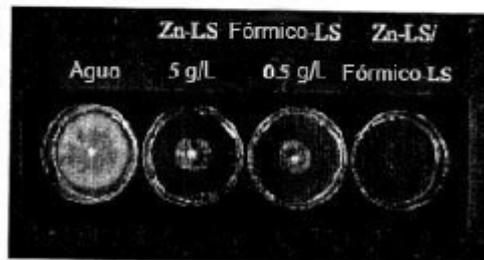


Figura 5F

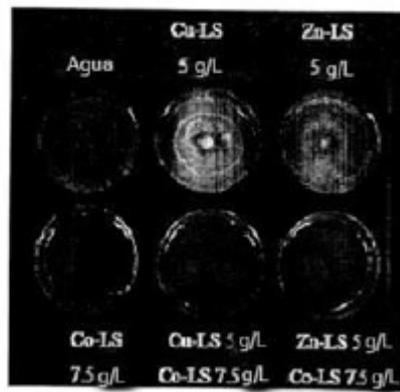


Figura 5G

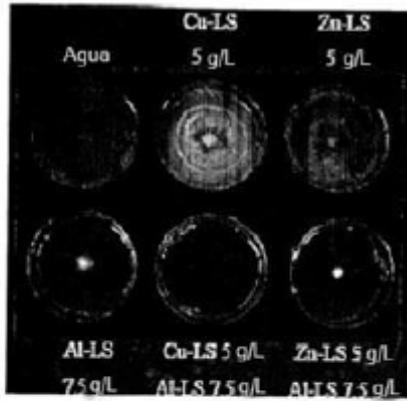


Figura 5H

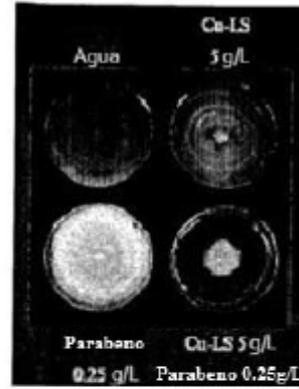


Figura 5I

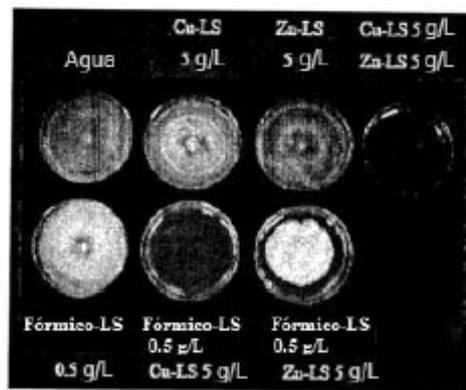


Figura 6

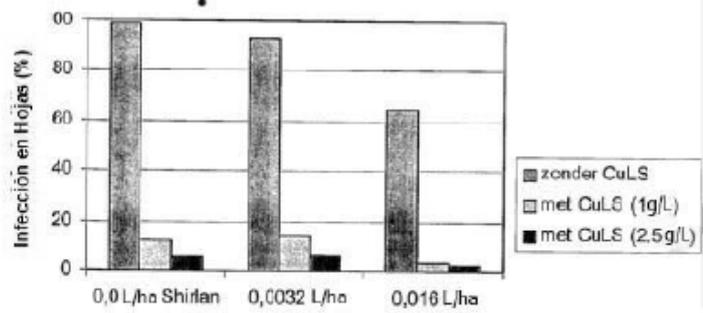
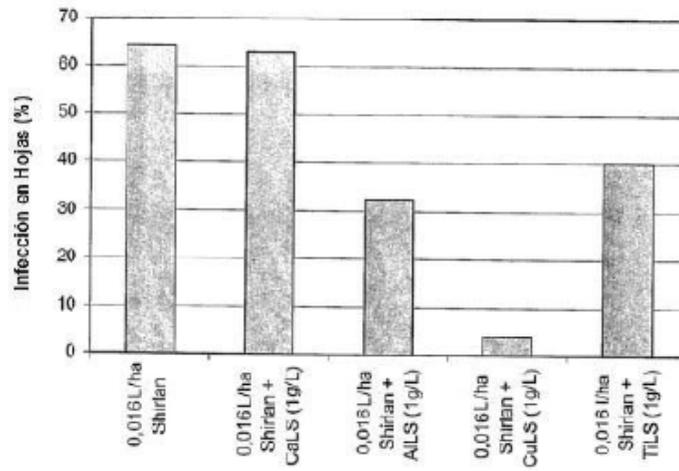


Figura 7-1

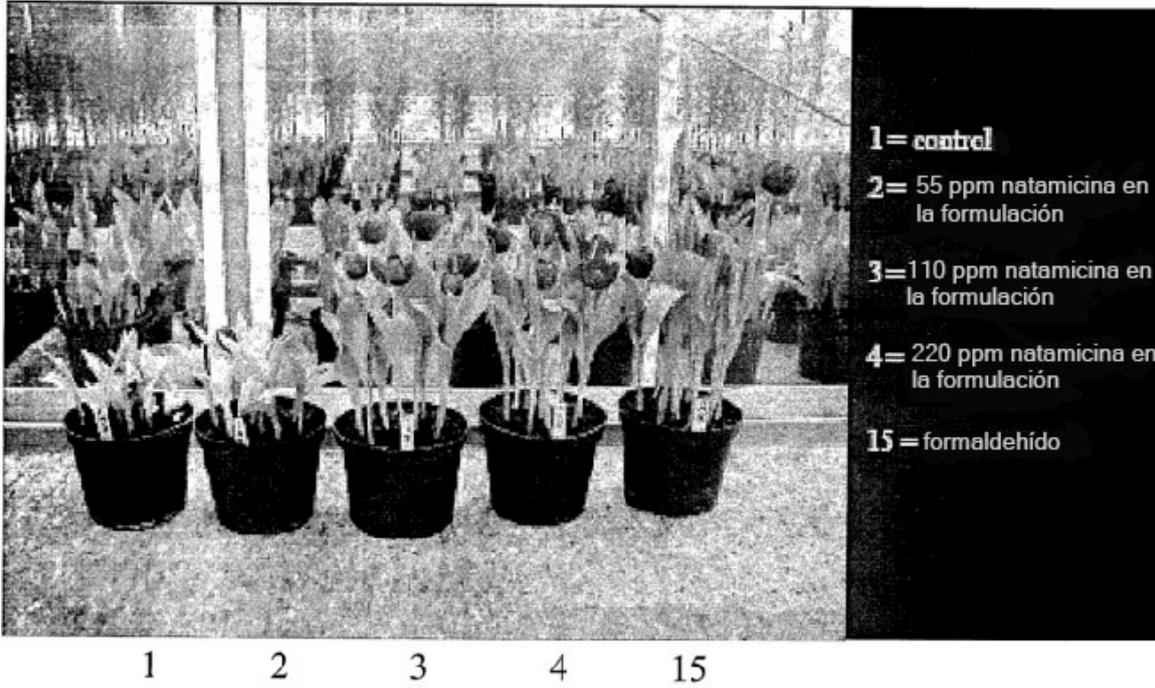


Figura 7-2



1 = control

6 = 55 ppm natamicina en la formulación + 50% obstáculo

7 = 110 ppm natamicina en la formulación + 50% obstáculo

8 = 220 ppm natamicina en la formulación + 50% obstáculo

15 = formaldehído

1

6

7

8

15

Figura 7-3

