

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 649 043**

51 Int. Cl.:

A01N 65/00 (2009.01)

A01N 65/30 (2009.01)

A01P 3/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.01.2013 PCT/DE2013/000031**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.08.2013 WO13110258**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.01.2013 E 13707264 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.09.2017 EP 2806743**

54 Título: **Formulaciones antifúngicas que contienen un extracto de raíz de Rheum para el tratamiento de enfermedades de plantas**

30 Prioridad:
24.01.2012 DE 102012001867

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
09.01.2018

73 Titular/es:
**HOCHSCHULE ANHALT (100.0%)
Bernburger Straße 55
06366 Köthen, DE**

72 Inventor/es:
**BALTRUSCHAT, HELMUT;
KABROTH, KATHRIN y
SCHELLENBERG, INGO**

74 Agente/Representante:
TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 649 043 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

Formulaciones antifúngicas que contienen un extracto de raíz de Rheum para el tratamiento de enfermedades de plantas

5

[0001] La invención se refiere a la utilización de una formulación antifúngica para el tratamiento de enfermedades de plantas relacionadas con los hongos, que contienen al menos sustancias activas o composiciones de sustancia activa con efecto antifúngico de extractos polifenólicos de las raíces de tipos Rheum y otras plantas de contenido polifenol.

10

[0002] Las plantas cultivadas importantes numerosas frecuentemente sufren lesiones, que se les pueden atribuir a agentes patógenos en referencia a hongos o a estrés abiótico.

Los agentes patógenos en referencia a hongos se combaten con fungicidas sintéticos en general, que por su parte sin embargo pueden producir efectos secundarios no deseados insignificantes.

15

[0003] Las sustancias activas o composiciones de sustancia activa pueden ofrecer la alternativa de que se obtienen sobre base vegetal.

El uso de sustancias activas vegetales puras con buena eficacia contra enfermedades de plantas importantes en la viticultura y en cultivos agrícolas, así como de jardinería puede crear la posibilidad de la producción de nuevos preparados innovativos.

20

Además se puede esperar, que las sustancias activas vegetales presenten un reciente mecanismo de acción contra las enfermedades fúngicas.

A causa de los riesgos altos de la formación de resistencia de enfermedades fúngicas frente a agentes activos fungicidas sintéticos y también en virtud del hecho de que muchas de las sustancias activas fungicidas empleadas tienen el mismo mecanismo de acción frente a enfermedades de plantas determinadas, se necesitan en la práctica preparados urgentes con un nuevo mecanismo de acción.

25

[0004] De la DE-PS 484 489 se conoce un método para el tratamiento de parásitos vegetales.

En esta se describe la eficacia de extractos vegetales para el tratamiento de parásitos en plantas frutales introduciéndolos en el flujo de savia.

30

El ruibarbo aparece ahí en la enumeración de las plantas utilizables.

[0005] La DE 4411 895 A1 describe un método para el tratamiento de hongos en plantas, materiales y semillas por la influencia de una cantidad eficaz fungicida de Rheum rhabarbarum y Solidago canadensis.

35

Por ejemplo, la Plasmodium vitícola se relaciona como agente patógeno en vino, fitoftora infestans como agente patógeno de parásitos de la hierba en patatas, Erysiphe cichoracearum como agente patógeno del oídio de pepinos y Botrytis cinerea como agente patógeno en pimientos.

[0006] En la US 2011/0053771 A1 se describe la utilización de taninos para el entesamiento de las plantas contra la infección por agentes patógenos fúngicos, por ejemplo Blumeria graminis.

40

[0007] En el paso de disertación de Michelle Wilmot con el título en el "Inhibition of Phytopathogenic Fungi on Selected Vegetable Crops by Catechins, Caffeine, Theanine and the Extracts of Camelia sinensis (L.) O. Kuntze", Master Thesis, Faculty of Natural and Agricultural Sciences, University of Pretoria, 1. September 2006, páginas 1 a 132, se divulga, que la epicatequina, epigallocatequina y galato de epigallocatequina actúan de forma inhibitoria contra un número grande de hongos patógenos vegetales.

45

Particularmente, se presentan los resultados de una inhibición in vitro del crecimiento celular de los hongos a través de la epicatequina (EC), epigallocatequina (EGC), galato de epicatequina (Ecg) con una concentración de 2,5 g*L⁻¹.

50

[0008] De la KR 2010 0048351 A se conoce un extracto de Rheum undulatum para controlar enfermedades vegetales causadas por los hongos.

[0009] Como en las aplicaciones descritas arriba se han utilizado hasta ahora en general en su mayoría las partes epigeas de las plantas.

55

Además, para la mayoría de aplicaciones, se han descrito efectos únicamente protectores.

[0010] La tarea de la invención consiste en la puesta a disposición de formulaciones con uno o varios agentes activos sobre base vegetal para una aplicación para el tratamiento de enfermedades vegetales en referencia a hongos.

60

Dichas formulaciones deben ser idealmente eficaces tanto de forma protectora como también curativa.

[0011] La solución de esta tarea de la invención se encuentra en la aplicación de una formulación antifúngica para el tratamiento de enfermedades vegetales fúngicas, donde a los hongos fitopatógenos que se tratan pertenecen uno o varios hongos fitopatógenos y la formulación antifúngica contiene al menos sustancias activas

65

o composiciones de sustancia activa con efecto antifúngico de extractos polifenólicos que contienen ninguna antraquinona y derivados de Antraquinona de las raíces de tipos Rheum, donde estas sustancias activas o composiciones de sustancia activa están disponibles a través de un método, que incluye los siguientes pasos del proceso:

- 5 a) extracción mono o pilifásica efectuada continuamente o de forma discontinua de las raíces purificadas y divididas, donde las raíces no-secadas o secadas, preferiblemente secadas y molidas se utilizan mediante un disolvente alcohólico;
- b) separación cuidadosamente del disolvente alcohólico con presión reducida y a temperaturas hasta como máximo 50 °C añadiendo agua, donde
- 10 • las sustancias complementarias lipófilas o las mismas de la fase formada acuosa se precipitan por el enfriamiento a una temperatura de 2 a 8 °C y se eliminan mediante filtración o centrifugación y otras sustancias complementarias lipófilas se eliminan por agitación posterior de la fase acuosa con éteres de petróleo o
- 15 • las sustancias complementarias lipófilas de la fase formada acuosa se separan mediante el método fluido/fluido cromatográfico;
- c) separación extraíble del b) extracto obtenido acuoso aplicando de disolvente orgánico del grupo del éster, como por ejemplo éster de etilo de ácido acético, en una fase hidrófila y una hidrófoba; y
- d) obtención de extractos de ambas fases de extracto del paso c) del procedimiento.

20 [0012] Según la invención los extractos polifenólicos, que están disponibles en la manera descrita arriba, obtenidos en la etapa del procedimiento d) con las etapas parciales d₁) a d₃), en las que se realiza

d₁) una separación cromatográfica de la columna en Sephadex LH-20 de la fase de extracto hidrófoba o la fase de extracto hidrófila, donde como medio de elución se utilizan seguidos alcoholes diversos, preferidamente metanol, etanol, propanol o butanol, y una mezcla de solventes de la serie-alcanona, preferiblemente propano, butano o pentano, y agua, según lo cual puede resultar un número limitado de

25 fracciones y luego
d₂) las fracciones obtenidas de la fase hidrófoba o la fase hidrófila se pueden resumir con espectro de sustancia de contenido respectivamente igual a las fracciones de sustancia activa, después de lo cual

30 d₃) una selección de fracciones de sustancia activa individuales para la aplicación tras la realización de unas justificaciones de eficacia de las fracciones de sustancia activa en cuanto a su eficacia protectora y/o curativa se da frente a hongos fitopatógenos.

[0013] De este modo se pueden desarrollar sustancias activas sobre base vegetal, que son nuevas respecto a la aplicación descrita.

35 La concepción de la invención consiste en utilizar los polifenoles orgánicos a este respecto con efecto protector así como curativo frente a excitadores fúngicos y proteger el potencial, plantas de cultivo importantes también contra el estrés abiótico mediante el entesamiento del potencial antioxidante, donde estos polifenoles vegetales pueden formar el fundamento para el desarrollo de preparados de protección de vegetales innovativos.

40 Se realiza particularmente un uso del efecto antifúngico y características de captadores de radicales de polifenoles vegetales definidos respectivamente fracciones de polifenol de raíces Rheum de y biomasa de raíz de otras plantas que contienen polifenol de la familia del poligonaceae como por ejemplo Rumex para la producción de sustancias activas efectivas y fracciones de sustancia activa.

45 A diferencia de muchas aplicaciones antiguas del estado de la técnica, usa la presente invención sustancias activas y fracciones de sustancia activa, que se obtienen a través del uso de un método de extracción optimizado solo de raíces de ruibarbo y las raíces de otras plantas que contienen polifenol.

Al contrario que muchos extractos de ruibarbo, que se conocen del estado de la técnica, los extractos aplicados según la invención no contienen ninguna antraquinona y derivados de antraquinona, puesto que estos se eliminan en la fase b) como sustancias complementarias lipófilas.

50 Para las aplicaciones según la invención se podría probar, por ejemplo en la infestación de cebada con Blumeria graminis, también un efecto curativo.

Por consiguiente, se pueden utilizar las formulaciones que se desarrollan sobre la base de los extractos aplicados según la invención, sorprendentemente tanto para el tratamiento protector como también para el curativo de hongos fitopatógenos en las plantas.

55 [0014] La etapa del procedimiento a), es decir la extracción se halla preferiblemente en uno hasta cien niveles. Especialmente, se prefiere además un rango de dos a seis niveles.

60 En una configuración especialmente preferida del procedimiento de extracción se realiza la etapa del procedimiento b), es decir se precipita la eliminación cuidadosa del disolvente alcohólico con presión reducida y a temperaturas hasta como máximo 50 °C añadiendo agua, con las sustancias complementarias lipófilas de fase formada acuosa por el enfriamiento a una temperatura de 2 a 8°C y se elimina mediante filtración o centrifugación y otras sustancias complementarias lipófilas se eliminan por agitación posterior de la fase acuosa con éteres de petróleo usando un gas inerte para la reducción de procesos oxidativos.

Ventajosamente está previsto además un gas químicamente inerte.

Además, se usa nitrógeno como gas inerte preferido.

En caso de la aplicación de métodos fluido/fluido cromatográfico para la separación de sustancias complementarias lipófilas en la fase b) se aplican entre otras las técnicas de separación de fluido/cromatográfico de distribución de fluido, como por ejemplo la llamada cromatografía contracorriente de alta velocidad (HSCCC) y/o las llamadas cromatografía rápida de reparto centrífuga (FCPC).

5 En la etapa del procedimiento c) se realiza entonces la separación extraíble del b) extracto acuoso conseguido aplicando un disolvente orgánico del grupo del éster en una fase hidrófila y una fase hidrófoba.

[0015] Como ya se ha mencionado en la etapa del procedimiento d₁), se utilizan de manera continua cada vez más alcoholes diferentes, es decir al menos dos alcoholes, preferiblemente de diferente polaridad.

10 [0016] Otro aspecto de la invención se refiere a la utilización de las formulaciones antifúngicas según la invención para el tratamiento de enfermedades de plantas causadas fúngicas y/o por los hongos de huevo.

A los hongos o a los hongos de huevo fitopatógenos que se tratan pueden contar uno o varios hongos fitopatógenos u hongos, por ejemplo *Erysiphe spec.*; *Blumeria*, particularmente *Blumeria graminis f. sp. hordei*; enfermedades de roya, particularmente *Puccinia graminis*, *Puccinia triticina*, *Puccinia striiformis*, *Phakopsora spec.*, *Hemileia vastatrix*, *Uromyces dianthi*; *Oidium*; *Septoria*; *fusarium*, particularmente complejo *fusarium solani*, *fusarium oxysporum*, *fusarium de verticillioides*, *fusarium proliferatum*, *fusarium culmorum*, *fusarium graminearum*; *Rhizoctonia*, particularmente complejo *Rhizoctonia de solani*; *Alteraria*; *Helminthosporium*; *bipolaris*, particularmente *bipolaris sorokiniana*; *Thielaviopsis*; *Botrytis*; fitoftora, particularmente *fitoftora capsici*, *fitoftora infestans*; *fusarium*, particularmente *fusarium spec.*; *Venturia*, particularmente *Venturia inaequalis*; *Plasmopora*, particularmente *Plasmopora viticola*; o *Perenospora*.

25 [0017] Debido a su tolerancia vegetal excelente, los polifenoles según la invención se pueden utilizar en todas las plantas de cultivo, en las que no se desea la infección de los hongos y/o hongos controlados a través de los extractos polifenólicos, por ejemplo cereales, maíz, arroz, plantas leguminosas, patatas, tomates, hortalizas, árboles frutales, vid o plantas ornamentales.

[0018] Además, los extractos polifenólicos según la invención pueden contener antagonistas biológicos en coformulación, que son adecuados para controlar virus, bacterias, nematodos, hongos, insectos o malas hierbas. Los ejemplos para dichos antagonistas biológicos son: *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus subtilis*, *Verticillium lecanii*, *Autographica californica NPV*, *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *pseudomonas fluorescens*, *Steptomyces griseoviridis*, *Trichoderma harzianum*, *Piriformospora indica* y *Sebacina vermifera*. Como parejas de mezcla se seleccionan preferiblemente dichos antagonistas biológicos, que presentan un efecto integrador a los extractos de *Rheum*, por lo tanto actúan contra las enfermedades, que no detectan los extractos de *Rheum*.

40 [0019] Además las coformulaciones pueden contener al menos una de las sustancias polifenólicas según la invención y un agente químico, que induce la resistencia adquirida sistemática en plantas (resistencia sistemática adquirida = SAR), es decir por lo tanto una sustancia activa, que se caracteriza por la modulación de la vía de biosíntesis de ácido salicílico así como por la inducción de genes (PR) relacionados con la fotosíntesis y por lo tanto contribuye a la resistencia adquirida en plantas (SAR) frente a enfermedades de las plantas, particularmente ácido 2,6-dicloro-isonicotínico (DCINA) o ácido benzo (1,2,3) tiadiazol-carbotiónico S-metiléster (BTH), que actúan como las sustancias activas sintéticas mediante la modulación de la actividad de ácido salicílico.

45 Además, las coformulaciones pueden contener al menos una de las sustancias polifenólicas según la invención respectivamente sustancias activas del extracto polifenólico y agentes químicos o apatógenos, es decir, no patógenos, bacterias *Rhizo* u hongos colonizadores de raíces, particularmente hongos de raíz simbióticos, que producen una resistencia sistémica inducida (ISR = resistencia sistémica inducida) en plantas. Se trata de dichos microorganismos, que mediante la modulación de la biosíntesis de jasmonato contribuye a la resistencia inducida en plantas (ISR) frente a enfermedades de plantas. Preferiblemente, se utiliza como hongos de raíz simbióticos hongos micorrizas arbusculares o tipos de *Sebacina*, particularmente *Piriformospora spec.* (por ejemplo *Piriformospora indica*) o *Sebacina vermifera*.

55 [0020] Además, las coformulaciones pueden contener al menos una de las sustancias polifenólicas según la invención y un Adyuvante o varios adyuvantes para la mejora del efecto y resistencia de lluvia. En este caso, se puede aplicar cualquier adyuvante disponible comercialmente.

60 [0021] Los tipos *Rheum* preferidos para la fabricación de los extractos, que se aplican según la invención son: *Rheum rhaponticum L.*, *Rheum officinale Baill. Sp.*, *Rheum palmatum L.*, *Rheum altaicum LOSINSK.*, *Rheum rhabarberum L.*, *Rheum undulatum L.*, *Rheum alexandrae VEITCH.*, *Rheum wittrockii LUNDSTR.*, *Rheum maximowiczii LOSINSK.*, *Rheum leucorrhizum PALL.*, *Rheum tanguticum Maxim.*, *Rheum nobile Hook et Thomson*, *Rheum alexandrae Batalin*, *Rheum tibeticum* y *Rheum palaestinum*, *Rheum australe*, *Rheum collinianum*, *Rheum compactum*, *Rheum delavayi*, *Rheum franzenbachii*, *Rheum moorcroftianum*, *Rheum nanum*, *Rheum ribes*, *Rheum robertianum*, *Rheum rupestre*, *Rheum songaricum*, *Rheum spiciforme*, *Rheum tataricum*, *Rheum tetragonopos*, *Rheum turcestanicum* y *Rheum webbianum*. En este caso se utiliza para una aplicación preferiblemente un material unitario genético.

[0022] Otros detalles, características y ventajas de la invención resultan de la descripción sucesiva de ejemplos de realización con referencia a los dibujos correspondientes.

Estos muestran:

- 5 Fig. 1: un esquema de extracción para la reelaboración de raíces de ruibarbo secas, molidas,
 Fig. 2: la influencia de extractos de raíz de ruibarbo diferentes (fase hidrófila) sobre la infestación de
 cebada de la especie Hansa con el oídio de cebada *Blumeria graminis f. sp. hordei* con
 aplicación protectora (control: 7 días después de la inoculación),
 10 Fig. 3: la influencia de extractos de raíz de ruibarbo diferentes (fase hidrófoba) sobre la infestación de
 cebada de la especie Hansa con el oídio de cebada *Blumeria graminis f. sp. hordei* con
 aplicación protectora (control: 7 días después de la inoculación),
 Fig. 4: la influencia de extractos de raíz de ruibarbo diferentes (fase hidrófila) sobre la infestación de
 cebada de la especie Hansa con el oídio de cebada *Blumeria graminis f. sp. hordei* con
 aplicación protectora (control: 14 días después de la inoculación),
 15 Fig. 5: la influencia de extractos de raíz de ruibarbo diferentes (fase hidrófoba) sobre la infestación de
 cebada de la especie Hansa con el oídio de cebada *Blumeria graminis f. sp. hordei* con
 aplicación protectora (control: 14 días después de la inoculación),
 Fig. 6: el efecto de extractos de raíz de ruibarbo diferentes (GT2 [GT = genotipo] y GT19; fases
 hidrófobas) en la infestación de cebadas de las especies Hansa con el oídio de cebada
 20 *Blumeria graminis f. sp. hordei* en la dosificación de 250 ppm con aplicación protectora (control:
 7 días después de la inoculación),
 Fig. 7: la influencia de extractos de raíz de ruibarbo diferentes (fase hidrófila) sobre la infestación de
 cebada de la especie Hansa con el oídio de cebada *Blumeria graminis f. sp. hordei* con
 aplicación curativa (control: 7 días después de la inoculación),
 25 Fig. 8: la influencia de extractos de raíz de ruibarbo diferentes (fase hidrófoba) sobre la infestación de
 cebada de la especie Hansa con el oídio de cebada *Blumeria graminis f. sp. hordei* con
 aplicación curativa (control: 7 días después de la inoculación),
 Fig. 9: la influencia de extractos de raíz de ruibarbo diferentes (fase hidrófila) sobre la infestación de
 cebada de la especie Hansa con el oídio de cebada *Blumeria graminis f. sp. hordei* con
 30 aplicación curativa (control: 14 días después de la inoculación),
 Fig. 10: la influencia de extractos de raíz de ruibarbo diferentes (fase hidrófoba) sobre la infestación de
 cebada de la especie Hansa con el oídio de cebada *Blumeria graminis f. sp. hordei* con
 aplicación curativa (control: 14 días después de la inoculación).
 Fig. 11: el efecto de extracto de raíz de ruibarbo diferente (GT2 y GT 19; fase hidrófoba) sobre la
 35 infestación de trigos de la especie Kanzler con roya parda de trigo *Puccinia triticina*,
 Fig. 12: los resultados de un estudio de campo para probar el efecto un extracto de raíz de ruibarbo
 (fase hidrófoba) contra el oídio (*Oidium*) en la vid (infestación de la uva),
 Fig. 13: una grabación de la separación cromatográfica de la fase hidrófoba, obtenida de GT 19
 (*Rheum rhaponticum L.*) con detección-ultravioleta a 280 nm y
 40 Fig. 14: el espectro de masas de Piceatannolglucósido con la masa 390 Da como un ejemplo para la
 identificación cualitativa de las sustancias polifenólicas mediante espectroscopia de masas.

[0023] Los extractos se produjeron en relación al método de extracción divulgado en la DE 10 2006 015 573 A1,
 DE 10 2006 015 574 A1 y DE 10 2006 015 575 A1.

45 [0024] Un esquema de extracción según la invención para la reelaboración de raíces de ruibarbo secas molidas
 se representa en la Fig. 1.

[0025] Para la producción de la fase de salida acuosa se usa un disolvente alcohólico, por ejemplo metanol,
 50 como agente de extracción-primario y además se usan estos extractos alcohólicos.
 Según la reelaboración extraíble polifásica se puede representar como en la d₁) a d₃) (véase arriba), ser realiza
 un fraccionamiento cromatográfico de la columna preparatoria de la fase hidrófila o hidrófoba.

[0026] Para una extracción del material de raíz de ruibarbo se sometió 1 KG de una prueba de raíz secada y
 55 molido de una extracción de vórtice polifásica a aproximadamente 8000 ml de disolvente alcohólico cada 15 min
 en Untra-Turax.

Los extractos recogidos se limitaron entonces al evaporador giratorio mediante vacío a temperaturas hasta como
 máximo 50 °C y después de la adición de 500 ml de agua, el disolvente alcohólico se retiró completamente.

60 Para la pérdida de sustancias lipófilas molestas se conservó el extracto acuoso durante la noche fumigado de
 nitrógeno en el frigorífico a 5 °C.

Las precipitaciones se pueden centrifugar al día siguiente.

Para la separación de otras sustancias complementarias lipófilas, la solución acuosa se agita después otras tres
 veces con cada 500 ml de éter de petróleo.

65 Entonces la fase acuosa limpiada se agitó cuatro veces con cada 750 ml de disolvente orgánico del grupo del
 éster, como por ejemplo éster de etilo de ácido acético, según el cual se utilizan los compuestos poco

oligomerizados aumentados en las fases hidrófobas unidas y en la fase permanentemente hidrófila compuestos con grados de oligomerización más altos.

Tanto la fase hidrófoba así como la hidrófila se delimitaron entonces cuidadosamente con presión reducida y con temperaturas hasta como máximo 50 °C, se iniciaron con poca agua y a continuación se liofilizaron.

5

[0027] Los extractos hidrófobos e hidrófilos liofilizados fueron conservados hasta la otra aplicación bajo atmósfera de nitrógeno a -21 °C.

La separación cromatográfica de la columna (sc) preparatoria de la fase hidrófila así como la hidrófoba se realizó según una forma de realización preferida de la invención, para delimitar el espectro total en compuestos polifenólicos sobre un número limitado de sustancias.

10

Para la separación cromatográfica de la columna (sc) se utilizó Sephadex LH-20.

Como medio de elución sirven alcoholes diversos uno tras otro.

Para la separación de sustancias poliméricas son apropiadas las mezclas de solventes de la serie alcanona con agua.

15

[0028] La fase hidrófoba y/o hidrófila se disolvió en alcoholes de cadena corta respectivamente en mezclas de alcohol/agua, dejadas sobre la columna (longitud 100 cm, diámetro 5 cm) y eluidas una tras otra con alcoholes diferentes así como mezclas de alcanona y agua.

A tal objeto, se utiliza una instalación-MPLC con bomba de tarea de prueba.

20

Tras la comprobación cromatográfica de capa delgada (DC) las fracciones de probeta obtenidas se resumieron para los genotipos Rheum individuales tanto las fracciones de la fase hidrófoba como también las fracciones de la fase hidrófila con el mismo espectro de sustancia de contenido.

[0029] Tras la separación cromatográfica de la columna de la fase hidrófoba resultaron por ejemplo en Rheum palmatum L. 11 fracciones, en Rheum rhaponticum L. 12 fracciones.

25

Aplicación de los extractos

[0030] La aplicación de tales extractos disponibles en la manera descrita arriba para el tratamiento de hongos fitopatógenos en plantas hasta ahora no se conoce.

30

Se realizaron investigaciones con extractos de raíz de ruibarbo en enfermedades de plantas diferentes con el resultado de que los extractos obtenidos por el método de extracción contra un espectro muy ancho enfermedades de plantas importantes comercialmente son eficaces.

En determinadas enfermedades de plantas, como oídio de cebada (*Blumeria graminis* f. sp. *hordei*), estos extractos son eficaces tanto en una aplicación protectora como también curativa.

35

Aplicación protectora contra oídio de cebada

Material y métodos:

40

[0031] Las plantas de cebada (3 plantas/tubo) se cultivaron tres semanas en tierra Fruhstorfer.

Al cabo de 7 horas después de la aplicación de todas las plantas con los productos del experimento se cortaron segmentos de hoja de 7 cm de largo, comenzando por la base de tallo y se colocaron cada 15 hojas de la hoja más joven, así como la segunda más joven sobre Agar de bencimidazol en cápsulas Petri cuadradas (10 X 10 cm).

45

Para ello, se usó 0,5 % agar agar mezclando de 40 ppm bencimidazol después de autoclavar.

El Bencimidazol se añadió al Agar, para evitar un secado prematuro de las hojas.

La inoculación de las hojas se realizó con Konidieno fresco del hongo de oídio de harina de cebada *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* (raza A6) en la torre de oídio a través de distribución de viento (tiempo de incubación: 7 y 14 días).

50

El control tras 14 jornadas sirvió para, opcionalmente poder valorar el efecto de duración de los preparados de experimento empleados, puesto que se conocen fungicidas empleados comercialmente, que tienen el efecto de duración limitado en parte.

[0032] La concentración de los preparados para la aplicación en hoja en todas las plantas se ajustó a 1000 ppm. La evaluación se realizó por la evaluación de las pústulas de oídio por hoja a una longitud en hoja de 5 cm.

55

Resultados:

[0033] Las plantas de control se poblaron intensamente con oídio.

Se observaron 66 % infestación en hoja tras 7 jornadas y 97 % infestación en hoja tras 14 jornadas, como muestran las figuras 2 a 5.

60

[0034] Como se deduce de la Fig. 2 y la Fig. 3 igualmente, todos los extractos de raíz de ruibarbo controlados mostraron tras 7 jornadas un efecto claro contra el oídio de cebada.

65

Entre el extracto de raíz de ruibarbo surgieron sin embargo diferencias considerables.

La fase hidrófila, obtenida del genotipo de ruibarbo GT 11, mostró un efecto del 100% y así fue la mejor fase del estudio.

5 También la fase hidrófila de GT 25 así como las fases hidrófobas respectivas de GT 13, GT 19 y GT 29 fueron muy eficaces, mientras en comparación con estas fracciones los demás preparados de experimento descendieron en el efecto.

La fracción relativamente débil era la fase hidrófoba de GT 42.

10 [0035] Tras 14 jornadas con aplicación de la fase hidrófila de GT 11, se detectó una infestación residual mínima de 6 % (véase Fig. 4).

Las fases hidrófobas del GT 11, GT 19 así como GT 29 convencieron igualmente con una infestación residual baja alrededor del 10 % (véase Fig. 5).

La fase relativamente débil fue nuevamente la fase hidrófoba de GT 42.

15 [0036] A causa del buen efecto protector se realizó otra aplicación protectora contra el oídio de cebada con un preparado del 250 ppm (Fig. 6).

También en la dosificación más baja de 250 ppm se generó un efecto bueno del extracto de raíz de ruibarbo probado, como se pudo probar en el ejemplo de la fase hidrófoba de GT 2 y GT 19 (Fig. 6).

20 Aplicación curativa contra oídio de cebada

Material y métodos:

25 [0037] Plantas de cebada, 3 plantas por tubo, se cultivaron tres semanas en tierra Fruhstorfer.

La aplicación de los preparados de experimento se realizó 2 días después de la inoculación de las hojas.

La inoculación se realizó con Konidieno fresco del hongo de oídio de cebada *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* (raza A6) por la distribución de viento en torre de oídio.

30 Se cortaron para una prueba de segmento de hoja segmentos en hoja de 7 cm de largo, comenzando de la base de tallo y dimensionaron cada 15 hojas de las hojas más jóvenes, así como las segundas más jóvenes sobre Agar de bencimidazol en cápsulas Petri cuadradas (10 X 10 cm).

Para ello se usó 0,5 % agar agar mezclando de 40 ppm de bencimidazol tras el autoclavado.

[0038] La concentración de los preparados para la aplicación en hoja se ajustó en todas las plantas a 1000 ppm.

35 La evaluación del efecto de oídio se realizó tras 7 y 14 jornadas por la evaluación de las pústulas de oídio por hoja a 5 cm longitud en hoja.

Resultados:

40 [0039] Tras 7 jornadas también mostraron con aplicación curativa la mayoría de los extractos de raíz de ruibarbo controlados un efecto claro contra oídio de cebada (véase Fig. 7 y Fig. 8).

La fracción mejor era la fase hidrófoba del genotipo de ruibarbo GT 29 con un efecto del 100 % (véase Fig. 8).

Con excepción de las fases hidrófilas de GT 11, GT 25 así como la fase hidrófoba de GT 42 también en los demás preparados de experimento se pudo observar un buen efecto contra el oídio.

45 Tras 14 jornadas se produjo en todos los extractos de raíz de ruibarbo controlados una cierta infestación residual (véase Fig. 9 y Fig. 10).

No obstante, particularmente convenció aún la fase hidrófoba de GT 29 con solo 7 % de infestación residual (véase Fig. 10).

La fase hidrófila de GT 42, así como las fases hidrófobas de GT 13 y GT 25 fueron igualmente muy eficaces (véase Fig. 9 y Fig. 10).

50 Conclusión después de la aplicación protectora, así como curativa de los estudios:

55 [0040] Los extractos de raíz de ruibarbo controlados mostraron tanto en una aplicación protectora como también curativa un efecto considerable contra el oídio.

[0041] El tratamiento de oídio representa en la protección de las plantas por lo demás un reto permanente, puesto que a causa de los problemas de resistencia considerables se limita en la práctica el número de medios de oídio de alta eficacia.

60 Por lo tanto, generalmente una necesidad de un buen medio de oídio consiste en diversos cultivos, entre otros en vid y cereales.

A este respecto, se permite el aviso de que en el montaje biológico de vid no está a disposición ningún preparado bueno real contra el oídio.

65 Está previsto un efecto correspondientemente bueno, podría ser también interesante la utilización de un extracto de raíz de ruibarbo como preparado biológico con soportes oficiales correspondientemente bajos para el montaje biológico de vid.

Aplicación protectora contra la raya parda de trigo (*Puccinia triticina*)

5 [0042] Las plantas de trigo de la especie Kanzler, 3 plantas por tubo, se cultivaron tres semanas en tierra Fruhstorfer.

Al cabo de 7 horas de aplicación después de las plantas enteras con los productos de experimento se cortaron segmentos de hoja de 7 cm de largo, comenzando por la base de tallo y las hojas se dimensionaron cada 15 hojas de las hojas más jóvenes, así como las segundas más jóvenes sobre Agar de bencimidazol en cápsulas Petri cuadradas (10 X 10 cm).

10 Para ello se han usado 0,5 % de agar agar mezclando 40 ppm de bencimidazol tras el autoclavado. La inoculación de las hojas se realizó por la pulverización de las hojas mediante una bomba a membrana con esporas *Uredo* frescas de las royas pardas de trigo *Puccinia triticina*. La incubación fue de 10 días.

15 [0043] La concentración de los preparados para la aplicación en hoja se ajustó en plantas enteras a 1000 ppm. La evaluación se realizó por la evaluación de las pústulas de roya por hoja a una longitud en hoja de 5 cm.

Resultados:

20 [0044] La Fig. 11 muestra el efecto de los extractos de raíz de ruibarbo GT 2 y GT 19 (fase hidrófoba) sobre la infestación de trigos de la especie Kanzler con roya parda de trigo (*Puccinia triticina*) 10 días después de la inoculación.

Las plantas Kontroll fueron pobladas de forma intensiva con roya parda.

25 Después de 7 jornadas mostraron todos los extracto de raíz de ruibarbo controlados un efecto claro contra roya parda de trigo, como en la Fig. 11.

Entre los extractos de raíz de ruibarbo (GT 2 y GT 19) a causa del efecto muy bueno no surgió ninguna diferencia considerable.

30 Resultado de un estudio de campo abierto para el efecto del extracto de raíz de ruibarbo contra el oídio (*Oidium*) en vid

[0045] La Fig. 12 muestra el efecto del extracto de raíz de ruibarbo GT 2 (fase hidrófoba) contra el oídio (*Oidium*) en vid (infestación de uva) en las cantidades de gasto de base de 375 y 750 g/10.000 m².

35 [0046] La enfermedad fúngica "oídio" (*Oidium*) representa en todo el mundo la enfermedad de vid económicamente mas importante.

El Ascomycet infesta todas las uvas europeas, donde las especies como Chardonnay, Kerner, Scheurebe, Müller-Thurgau, Chenin blanc, Cabernet Franc, St. Laurent, Trollinger y Portugieser son especialmente susceptibles.

40 [0047] La aplicación de los preparados se realizó en un intervalo de tiempo de 10 jornadas, comenzando con el estadio de desarrollo-BBCH 50 y terminando con la pulverización final para el estadio de desarrollo-BBCH 81 de la vid.

La aplicación se realizó con un aparato de aplicación neumático para cultivos espaciales.

45 Se usaron boquillas de pulverización planas para la aplicación Teejet.

La cantidad de gasto base para GT 2 (hidrófobo fase) fue 375 respectivamente 750 g/10,000 m². La extracción se realizó en combinación con el aceite de naranjas frecuentemente utilizado en la viticultura ecológica Prev_B2 como aditivo para la humectación mejor de las hojas.

La solo aplicación de aceite de naranjas Prev_B2 no tiene efecto contra el *Oidium*.

50 Como medio de comparación fue extraído un preparado de azufre mojable en la cantidad de gasto admitida. Esto mostró, que se pudo restringir de forma muy eficaz la infestación de uvas con *Oidium* a través del extracto de raíz de ruibarbo y en efecto estaba posicionado más alto que en el preparado de comparación comercial azufre mojable, que se utiliza contra el *Oidium* en la viticultura ecológica, como se deduce de la Fig. 12.

55 Efecto de extractos de raíz de ruibarbo contra hongos fitopatógenos diferentes en la prueba de difusión de Agar

[0048] Los hongos se cultivaron sobre placas de agar V8 a 25 °C en la incubadora a oscuras.

60 Micelios de hongos se sacaron de la placa cubierta con una perforadora de corcho (5 mm diámetro) al borde en forma de placa de Agar de un cultivo de hongos activamente creciente y con un asa de platino bajo condiciones estériles en el centro se emplazaron sobre placa de agar V8, de los cuales se mezclaron en el vertido en las cápsulas Petri antes de las concentraciones finales de 0, 100, 250,500 y 1000 ppm de extracto de raíz de ruibarbo.

El control del crecimiento celular de hongo se realizó en intervalos de 7 jornadas mediante la medición del crecimiento celular de los hongos sobre las placas de agar.

65

[0049] La tabla 1 muestra el efecto del extracto de raíz de ruibarbo GT 2 (fase hidrófoba) contra hongos fitopatógenos diferentes en la prueba de difusión de Agar.

Tabla 1

PG	Patógeno	Aumento porcentual para el control			
		100 ppm	250 ppm	500 ppm	1000 ppm
1	<i>Thielaviopsis basicola</i> (BK18)	74	43	48	30
2	<i>Fitoftora capsici</i> (V8)	56	17	0	0
3	<i>Fusarium graminearum</i> (WT 1003)	79	53	37	26
4	<i>Bipolar sorokiniana</i> (JB2)	74	43	48	0
5	<i>Rhizoctonia solani</i> 512 (AG 2)	25	25	13	0

5 [0050] De las investigaciones se deduce, que dependiendo de la concentración se dio un efecto muy bueno del extracto de raíz de ruibarbo GT 2 (fase hidrófoba) contra el hongo de mildú fitoftora capsici y además también bipolaris sorokiniana y Rhizoctonia solani (AG 2) se controlaron eficazmente.

10 [0051] Las investigaciones en cebada con extractos de raíz de ruibarbo mostraron además un aumento de la actividad de ascorbatperoxidasa, así como dehidroascorbato-reductasa. Ambas enzimas sirven como proteínas clave del ciclo del ascorbato-glutatión, en el que se detoxificaron especies de oxígeno reactivas.

Los resultados de las investigaciones indican fenoles vegetales potenciales de extractos de raíz de ruibarbo frente a enfermedades de plantas importantes.

15 Particularmente la anchura del espectro de acción muestra tanto frente a hongos de oídio (oídio de cereales, oídio) como también hongos mildú (fitoftora capsici) así como contra hongos roya (*Puccinia triticina*), *Rhizoctonia* y *Bipolaris sorokiniana*, que el extracto de raíz de ruibarbo según la invención registra un número notable de enfermedades de plantas muy importantes.

20 Los hongos fitopatógenos relacionados aquí se cuentan entre las enfermedades de plantas globales más importantes.

El amplio espectro de acción contra las enfermedades de plantas así como gran la ventana de aplicación por aplicación protectora y curativa del extracto de raíz de ruibarbo según la invención se consigue de los métodos relacionados en el estado de la técnica.

25 [0052] En lo sucesivo, se representan a modo de ejemplo resultados para la caracterización de componentes de las en las figuras 6, 9, 10,11 y 12 fases hidrófobas mostradas.

Los extractos polifenólicos aislados se caracterizaron por HPLC con detección de arreglo de diodos respectivamente sobre el acoplamiento HPLC con espectrometría de masa (ionización negativa en el modo de ionización electro-aerosol).

30

Condiciones cromatográficas:

Columna de separación: SYNERGI RP-polar 80A; 250*2,0 mm; 4 µ
 Fase móvil: A: 0,1 % agua/ácido fórmico
 B: 100 % metanol
 Gradiente: Tiempo (min) % B
 0 0
 10 10
 40 50
 41 0
 55 0
 Índice de flujo: 0,3 ml/min
 Volumen de inyección: 10 µl prueba
 Detector: DAD, 190 hasta 500 nm y MS en el Full Scan modo
 Tiempo de análisis: 58 Min.

35 [0053] En la Fig. 13 se muestra a modo de ejemplo para el GT 19 una dicha separación cromatográfica de la fase hidrófoba.

[0054] La tabla 2 muestra las sustancias polifenólicas halladas ordenadas según clases de material a modo de ejemplo para las fases hidrófobas del GT 2, GT 19 y GT 25.

40

Tabla 2

Clase de sustancia	GT 2	GT 19	GT 25
Flavan-3-ole	Catequina	Catequina	Catequina
		Epicatequina	Epicatequina

	Galato de epicatequina	Galato de epicatequina	Galato de epicatequina
		ProcianidinaB1	
	ProcianidinaB2	ProcianidinaB2	ProcianidinaB2
Oligómeros proantocianidias	Dímero Procianidina, galoilado		
Grados anteriores de taninos hidrolizables	Glucosa Monogaloil	Glucosa Monogaloil	Glucosa Monogaloil
	Glucosa Digaloil		Glucosa Digaloil
Estibenos	raponticina	Raponticina	raponticina
	raponticina, galoilada	raponticina, galoilada	rapontigenina
	Desoxiraponticina	Desoxiraponticina	raponticina, galoilada
	glucósido de piceatanol	Glucósido de Piceatanol	Desoxiraponticina
	glucósido de Piceatanol, galoilada	glucósido de piceatanol, galoilada	xilopiranosido de piceatanol
	glucósido hidroxistilbeno trisustituido, galoilado	glucósido de Resveratrol	glucósido de Piceatanol
		glucósido Hidroxiestilbeno trisustituido, galoilado	glucósido Piceatanol, galoilado
			glucósido de Resveratrol
		Resveratrol	

[0055] Fig. 14 muestra el espectro de masas de glucósido de Piceatanol con la masa 390 Da respectivamente U (U = unidad de masa unificada atómica; 1u corresponde a 1/12 de la masa del 12C isótopo) como un ejemplo para la identificación cualitativa de las sustancias polifenólicas mediante espectroscopia de masas.

REIVINDICACIONES

1. Uso de una formulación antifúngica para el tratamiento de enfermedades fúngicas de plantas, donde a los hongos fitopatógenos que se combaten pertenecen uno o varios hongos fitopatógenos y la formulación antifúngica contiene al menos sustancias activas o composiciones de sustancia activa de extractos polifenólicos de raíces de tipo-Rheum, sin ninguna antraquinona o derivados de antraquinona, donde estas sustancias activas o composiciones de sustancia activa están disponibles a través de un método, que incluye los siguientes pasos:
- extracción continua o discontinua efectuada de forma mono o polifásica de las raíces purificadas y divididas, donde se utilizan las raíces no-secadas o secadas, mediante un disolvente alcohólico;
 - eliminación cuidadosa del disolvente alcohólico con presión reducida y con temperaturas hasta como máximo 50 °C añadiendo agua, donde sustancias complementarias lipófilas se precipitan de la fase acuosa formada por enfriamiento a una temperatura de 2 a 8 °C y se eliminan mediante filtración o centrifugación y otras sustancias complementarias lipófilas se eliminan por agitación posterior de la fase acuosa con éteres de petróleo o se separan las sustancias complementarias lipófilas de la fase acuosa mediante método fluido/fluido cromatográfico;
 - separación extraíble del b) extracto obtenido aplicando un disolvente orgánico del grupo de los ésteres en una fase hidrófila y una hidrófoba; y
 - obtención de extractos de ambas fases de extracto del paso del procedimiento c) en las etapas parciales siguientes:
 - se realiza una separación cromatográfica de columna en Sephadex LH-20 de la fase de extracto hidrófoba o la fase de extracto hidrófila, donde como medio de elución se utilizan alcoholes diversos uno tras otro y una mezcla de solventes de la serie alcanona y agua, y luego
 - las fracciones obtenidas de la fase hidrófoba o la fase hidrófila con el mismo espectro de componentes respectivamente corresponden con fracciones de sustancia activa, a lo cual
 - se hace una selección de fracciones de sustancia activa individuales para la aplicación después de la realización de una justificación de eficacia de las fracciones de sustancia activa en cuanto a su eficacia protectora y/o curativa frente a hongos fitopatógenos.
2. Uso de una formulación antifúngica según la reivindicación 1, **caracterizado por el hecho de que** en la etapa del procedimiento a) las raíces se utilizaron secadas y molidas.
3. Uso de una formulación antifúngica según la reivindicación 1 o 2, **caracterizado por el hecho de que** en la etapa del procedimiento a) se realiza la extracción en una a cien etapas.
4. Uso de una formulación antifúngica según la reivindicación 3, **caracterizado por el hecho de que** en la etapa del procedimiento a) la extracción se realiza en dos a seis etapas.
5. Uso de una formulación antifúngica según una de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado por el hecho de que** se realiza la etapa del procedimiento b) usando un gas inerte para la reducción de procesos oxidativos.
6. Uso de una formulación antifúngica según la reivindicación 5, **caracterizado por el hecho de que** se usa un gas inerte químicamente, preferiblemente nitrógeno.
7. Uso de una formulación antifúngica según una de las reivindicaciones 1 a 6, **caracterizado por el hecho de que** como disolvente orgánico del grupo del éster en la etapa del procedimiento c) se utiliza éster de etilo de ácido acético.
8. Uso de una formulación antifúngica según una de las reivindicaciones 1 a 7, **caracterizado por el hecho de que** en la etapa del procedimiento d1) se utilizan como alcoholes metanol, etanol, propanol o butanol y como disolvente de la serie alcanona propano, butano, pentano.
9. Uso de una formulación antifúngica según una de las reivindicaciones 1 a 8, **caracterizado por el hecho de que** se pueden utilizar los siguientes tipos Rheum: Rheum rhaponticum L., Rheum officinale Baill.sp de bahía., Rheum palmatum L., Rheum altaicum LOSINSK., Rheum rhabarberum L., Rheum undulatum L., Rheum alexandrae VEITCH., Rheum wittrockii LUNDSTR, Rheum maximowiczii LOSINSK., Rheum leucorrhizum PALL., Rheum tanguticum Maxim., Rheum nobile Hook et. Thomson, Rheum alexandrae Batalin, Rheum tibeticum, Rheum palaestinum, Rheum australe, Rheum collinianum, Rheum compactum, Rheum delavayi, Rheum franzenbachii, Rheum moorcroftianum, Rheum nanum, Rheum ribes, Rheum robertianum, Rheum rupestre, Rheum songaricum, Rheum spiciforme, Rheum tataricum, Rheum tetragonopos, Rheum turcestanicum y Rheum webbianum.
10. Uso de una formulación antifúngica según una de las reivindicaciones 1 a 9, **caracterizado por el hecho de que** se usa material unitario genético.
11. Uso de una formulación antifúngica según una de las reivindicaciones 1 a 10, que contiene respectivamente como coformulación al menos una sustancia activa del extracto polifenólico así como uno o varios antagonistas biológicos para controlar virus, bacterias, nematodos, hongos, insectos o malas hierbas.

- 5 12. Uso de una formulación antifúngica según la reivindicación 11, **caracterizado por el hecho de que** uno o varios antagonistas biológicos del grupo *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus subtilis*, *Verticillium lecanii*, *Autographa californica* NPV, *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Pseudomonas fluorescens* y *Steptomyces griseoviridis*, *Trichoderma harzianum* están presentes.
- 10 13. Uso de una formulación antifúngica según una de las reivindicaciones 1 a 12, que contiene respectivamente como coformulación al menos una sustancia activa del extracto polifenólico y un agente químico, que induce sistemáticamente la resistencia adquirida en plantas, es decir, por lo tanto una sustancia activa, que **se caracteriza por** la modulación de la biosíntesis de ácido salicílico, así como por la inducción de genes (PR) relacionados con patogénesis y por lo tanto contribuye a la resistencia adquirida sistemática en plantas (SAR) frente a enfermedades de plantas, particularmente ácido 2,6-dicloro-isonicotínico (DCINA) o ácido benzo (1,2,3) tiadiazol-carbotiónico S-metiléster (BTH).
- 15 14. Uso de una formulación antifúngica según una de las reivindicaciones 1 a 12, que contienen respectivamente como coformulación al menos una sustancia activa del extracto polifenólico y bacterias *Rhizo* no patógenas u hongos radicales simbióticos, que inducen resistencia sistémica en plantas (resistencia sistémica inducida = ISR), es decir contienen dichos microorganismos, que mediante la modulación de la biosíntesis de jasmonato contribuyen a la resistencia inducida en plantas frente a enfermedades de plantas.
- 20 15. Uso de una formulación antifúngica según una de las reivindicaciones 1 a 14, que contienen respectivamente como coformulación al menos una sustancia activa del extracto polifenólico y un adyuvante o varios adyuvantes para la mejora del efecto y resistencia a la lluvia.
- 25 16. Uso de una formulación antifúngica según una de las reivindicaciones 1 a 15, **caracterizada por el hecho de que** los uno o varios hongos fitopatógenos incluyen *Blumeria graminis* f. sp. *hordei*; *Erysiphe spec.*; enfermedades de roya, particularmente *Puccinia graminis*, *Puccinia triticina*, *Puccinia striiformis*, *Phakopsora spec.*, *Hemileia vastatrix*, *Uromyces dianthi*; *Oidium*; *Septoria*; *fusarium*, particularmente complejo *fusarium solani*, *fusarium oxisporum*, *fusarium verticillioides*, *fusarium proliferatum*, *fusarium culmorum*, *fusarium graminearum*; *Rhizoctonia*, particularmente complejo *Rhizoctonia solani*; *Alternaria*; *Helminthosporium*; *bipolaris*, particularmente *bipolaris sorokiniana*; *Thielaviopsis*; *Botrytis*; fitoftora, particularmente fitoftora *capsici*, fitoftora *infestans*; *fusarium*, particularmente *fusarium spec.*; *Venturia*, particularmente *Venturia inaequalis*; *Plasmopora*, particularmente *Plasmopora viticola*; o *Perenospora*.0
- 30

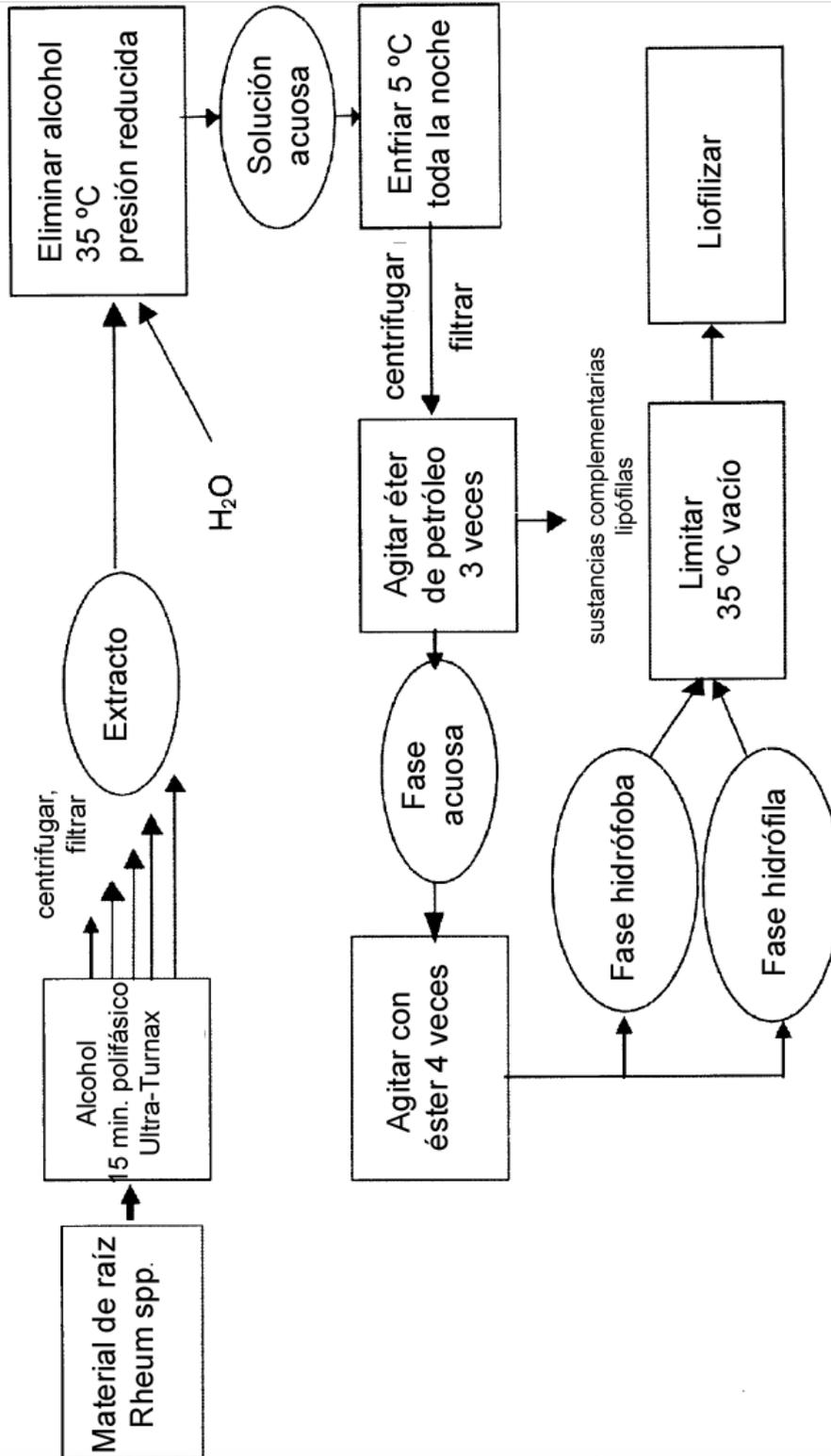


Fig. 1

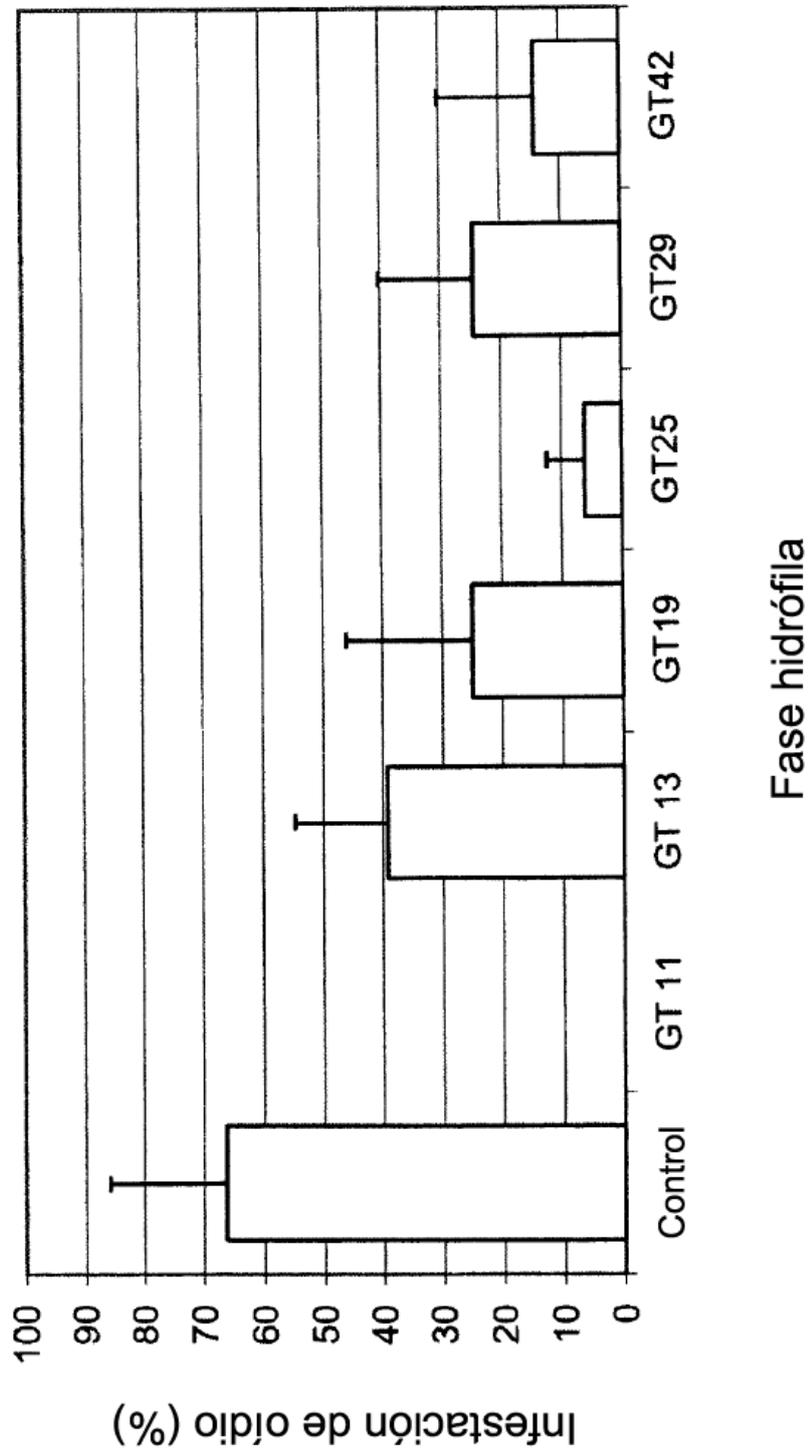


Fig. 2

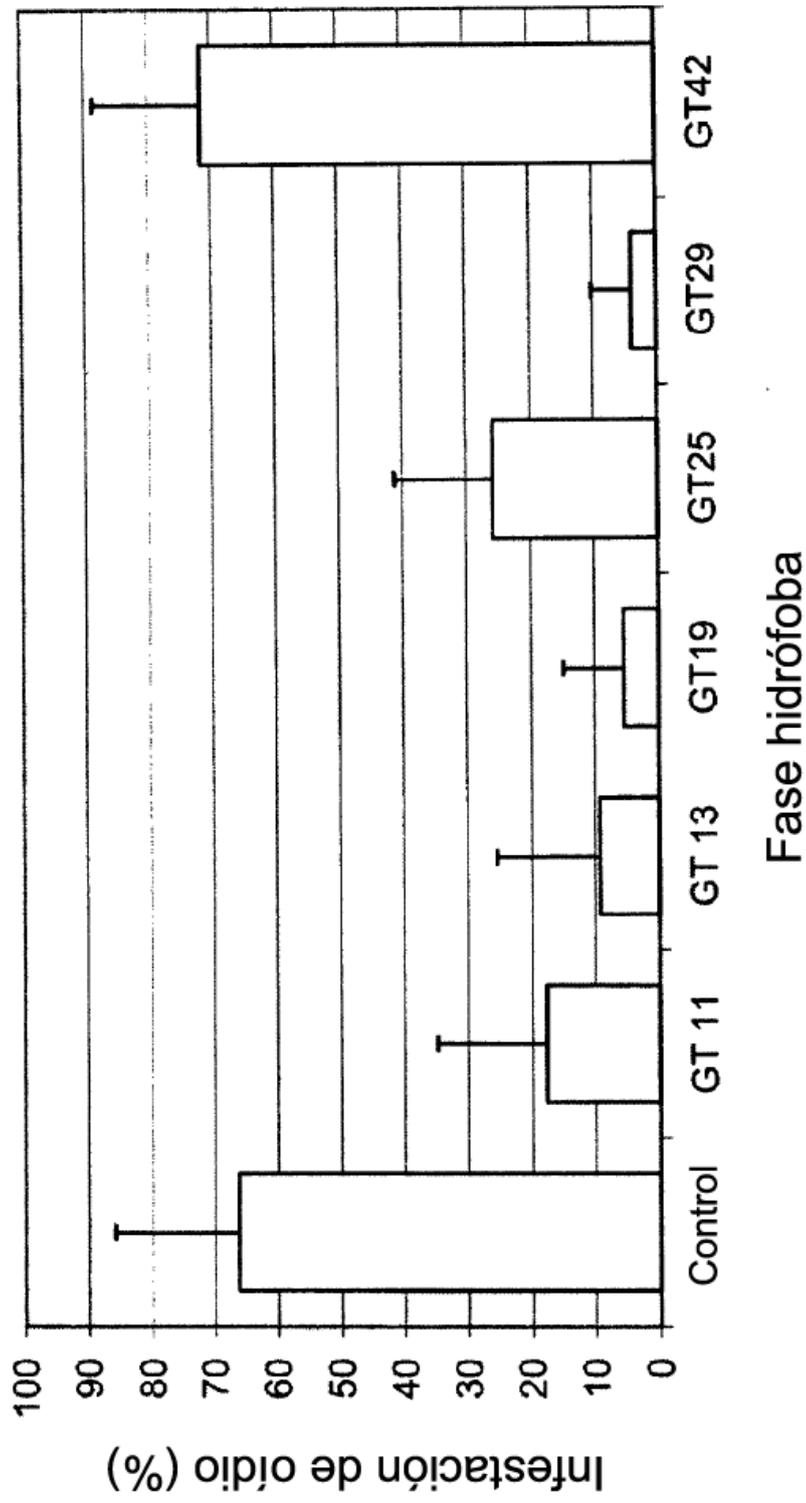


Fig. 3

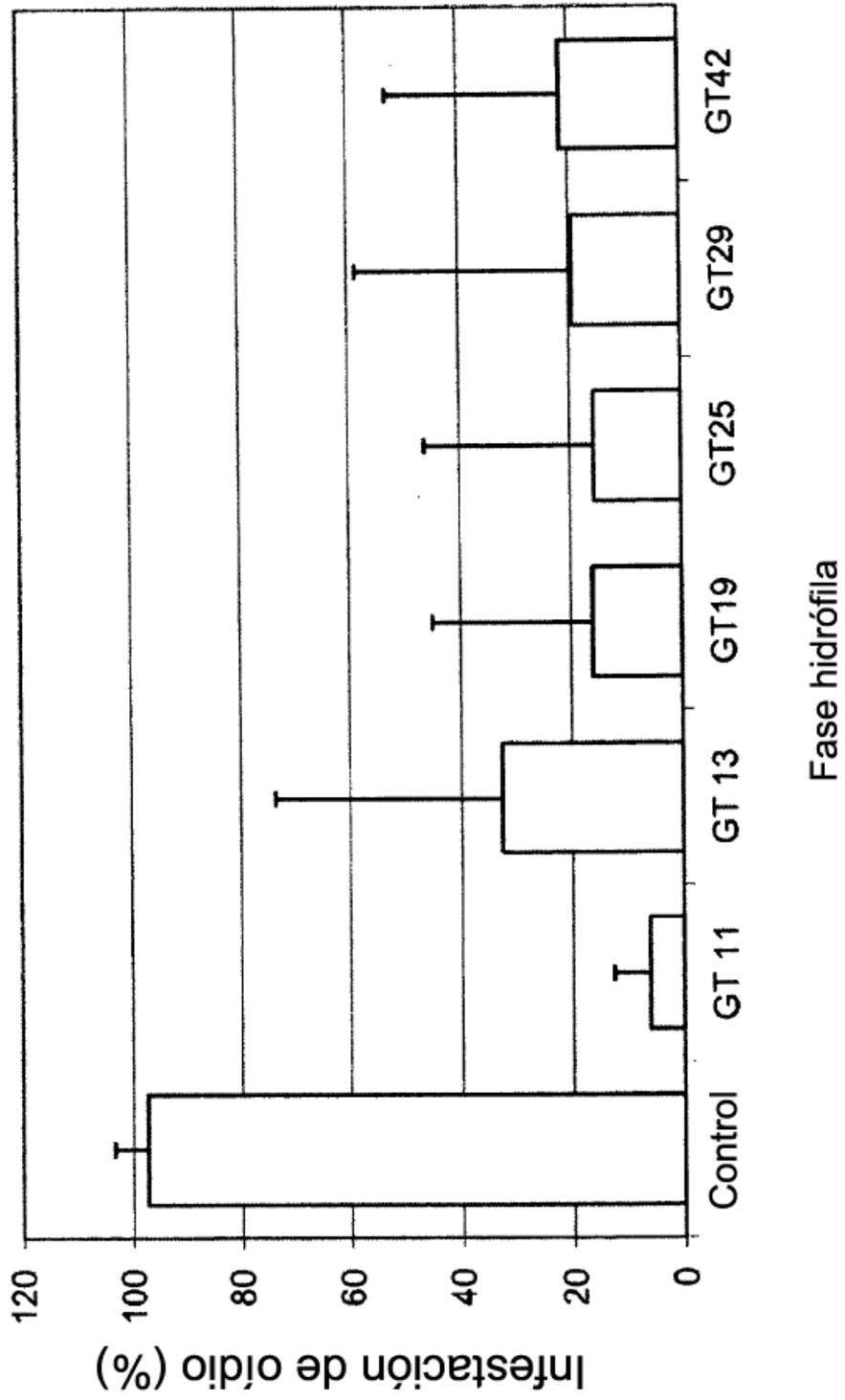


Fig. 4

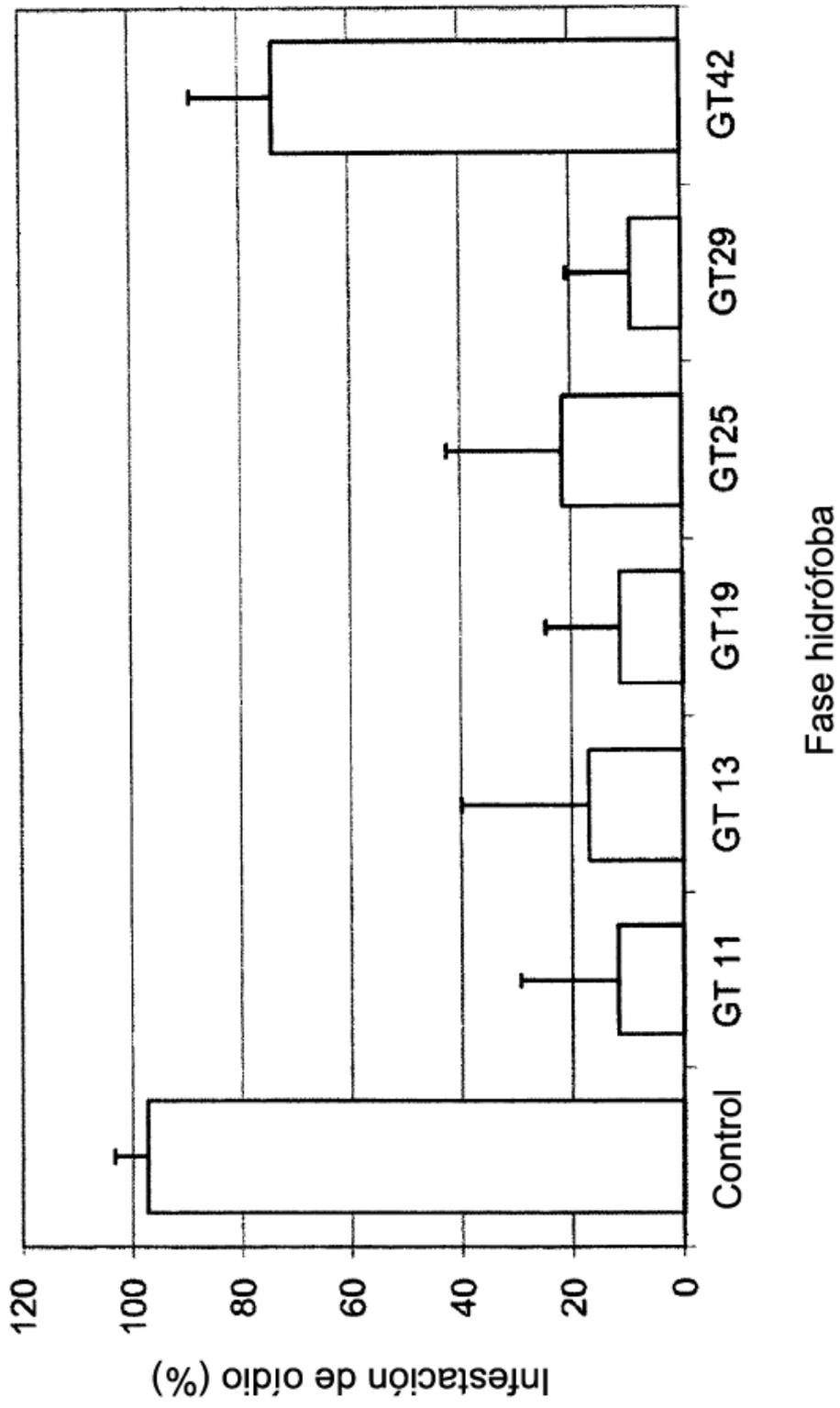


Fig. 5

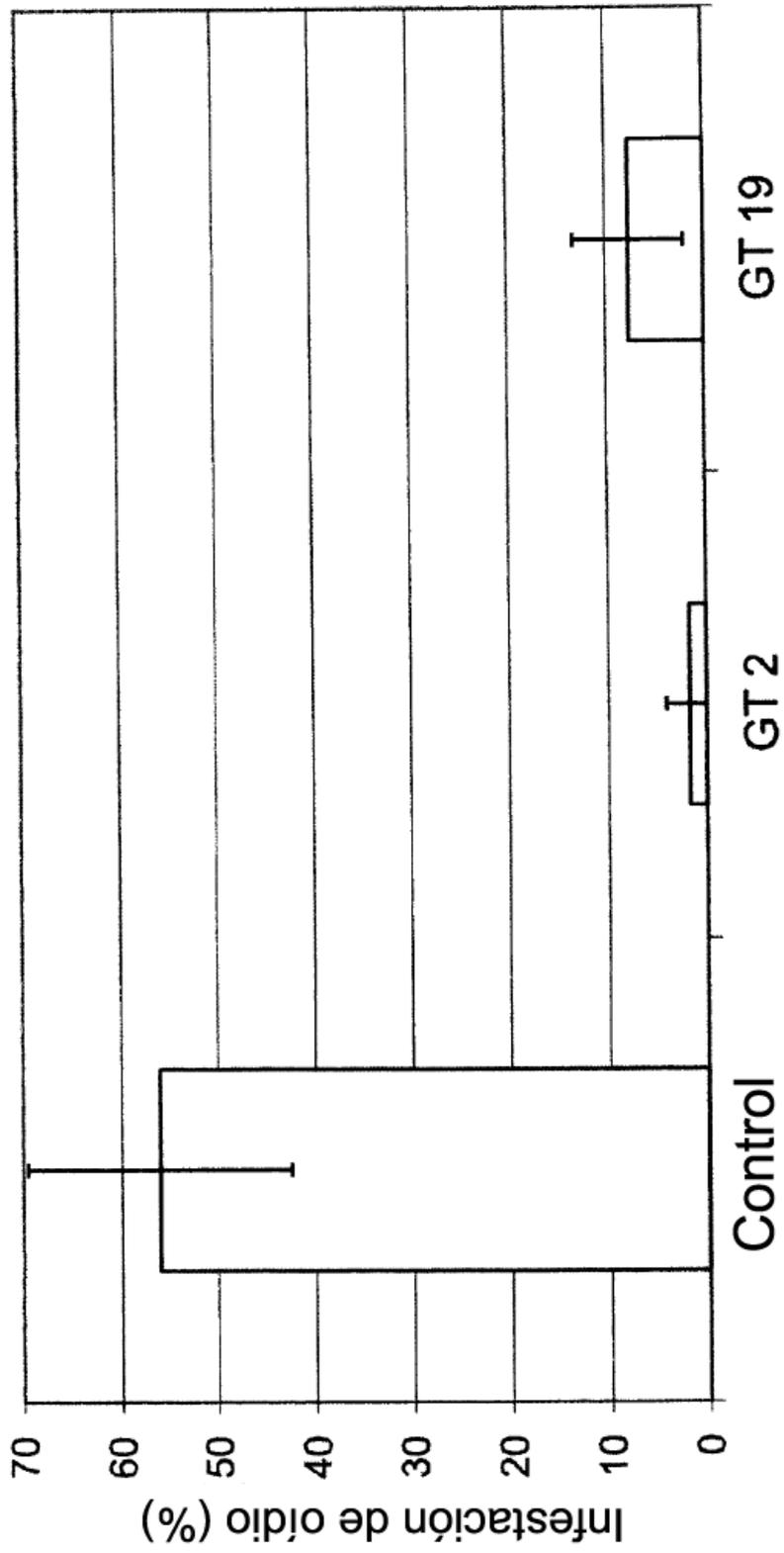


Fig. 6

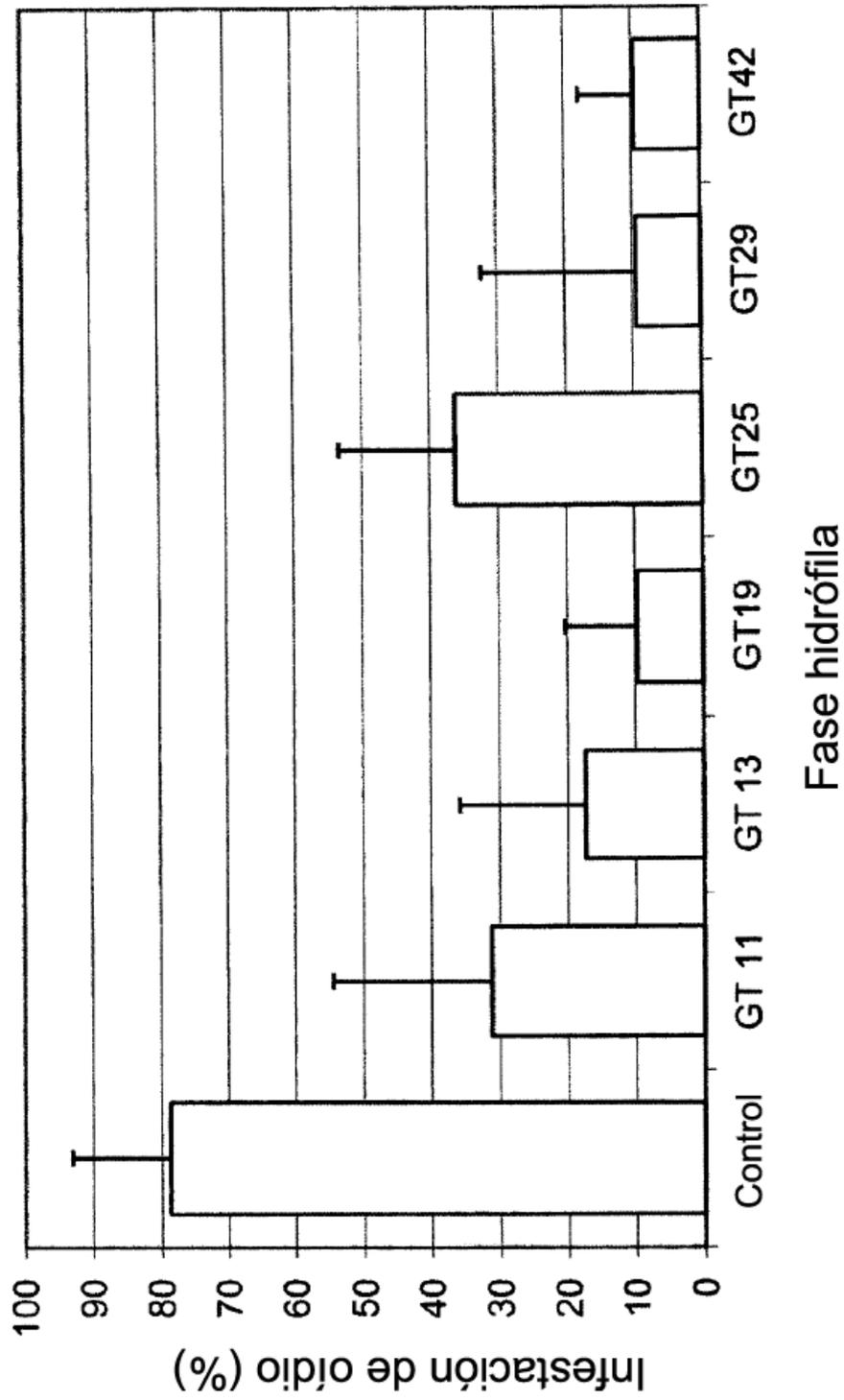


Fig. 7

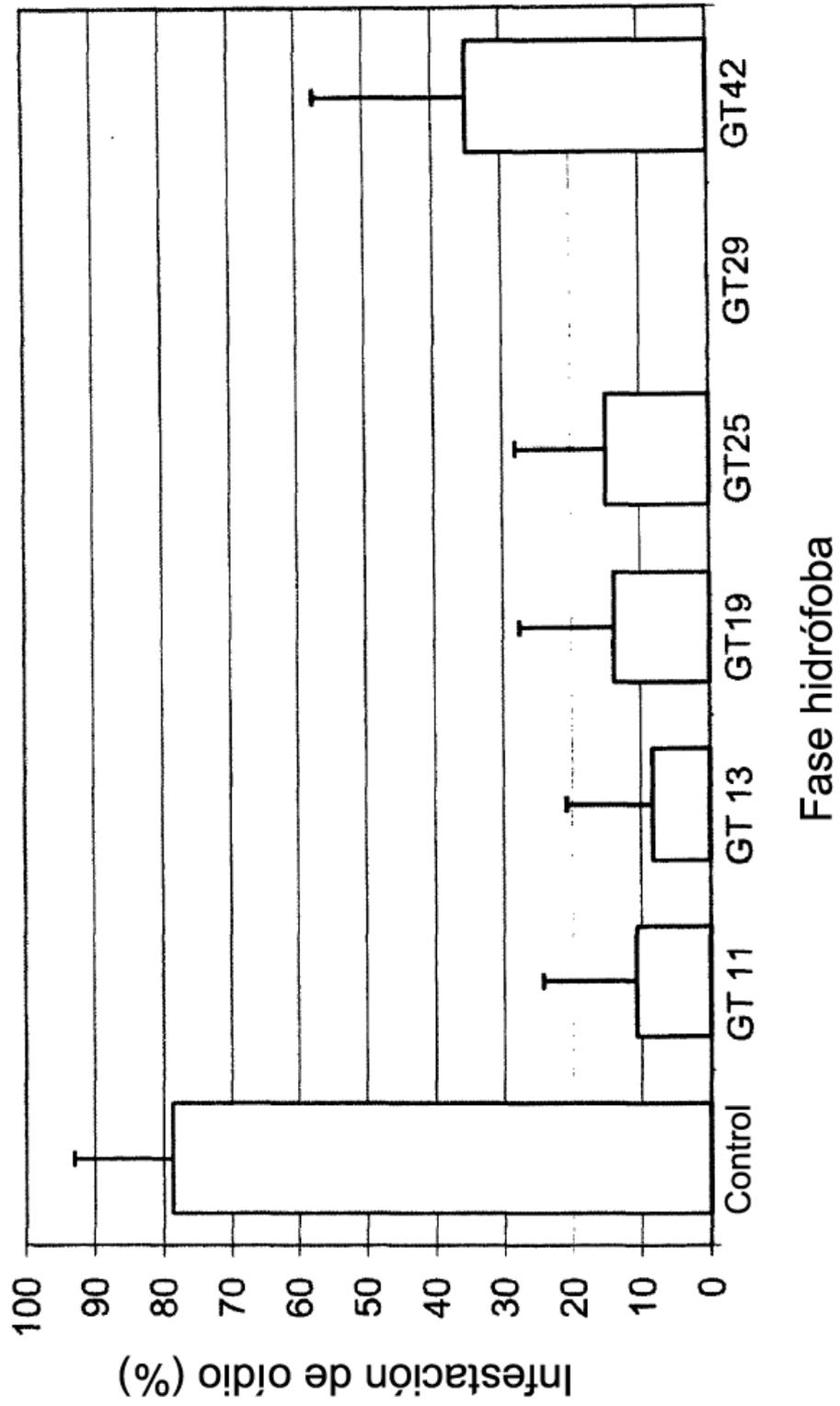


Fig. 8

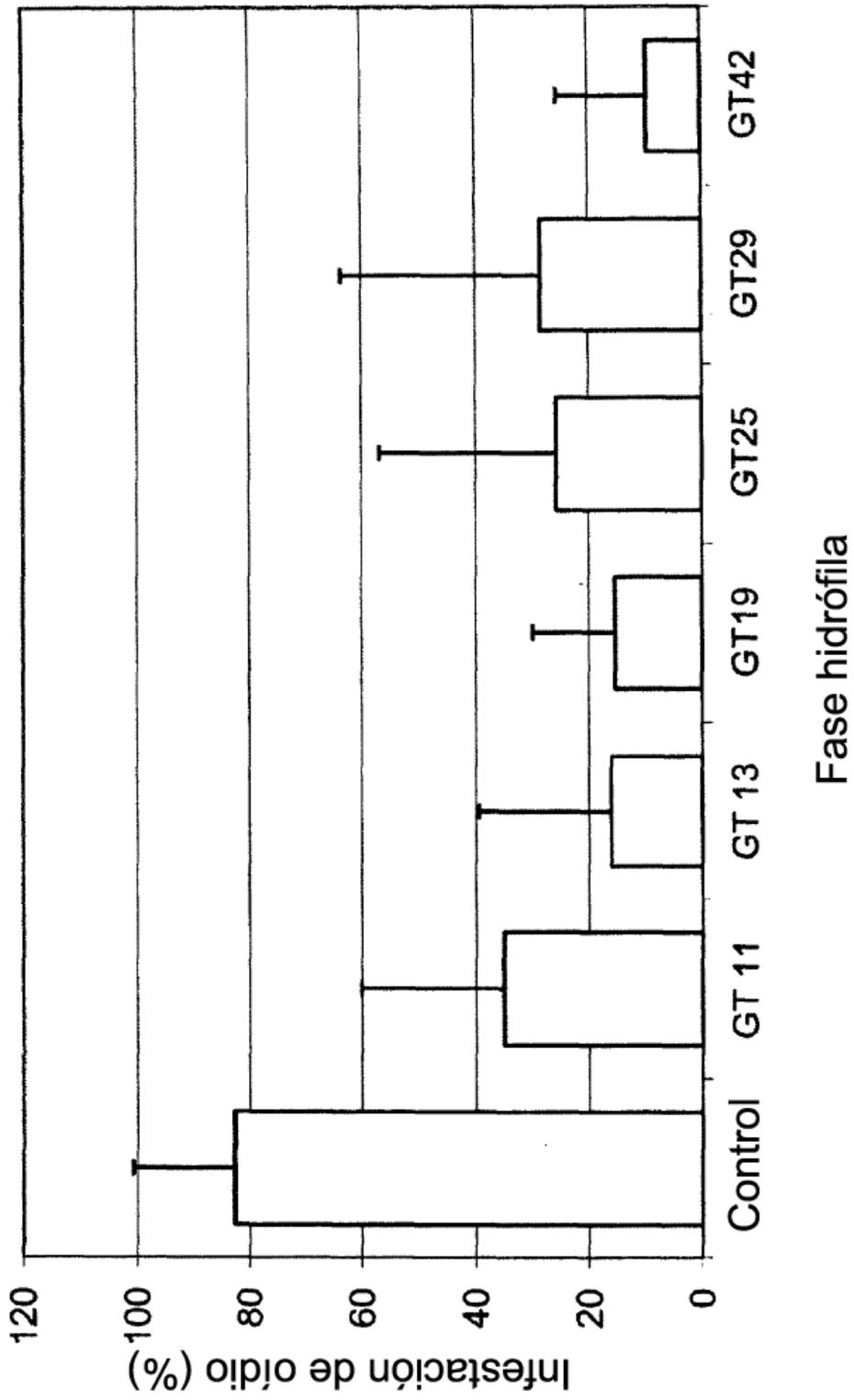


Fig. 9

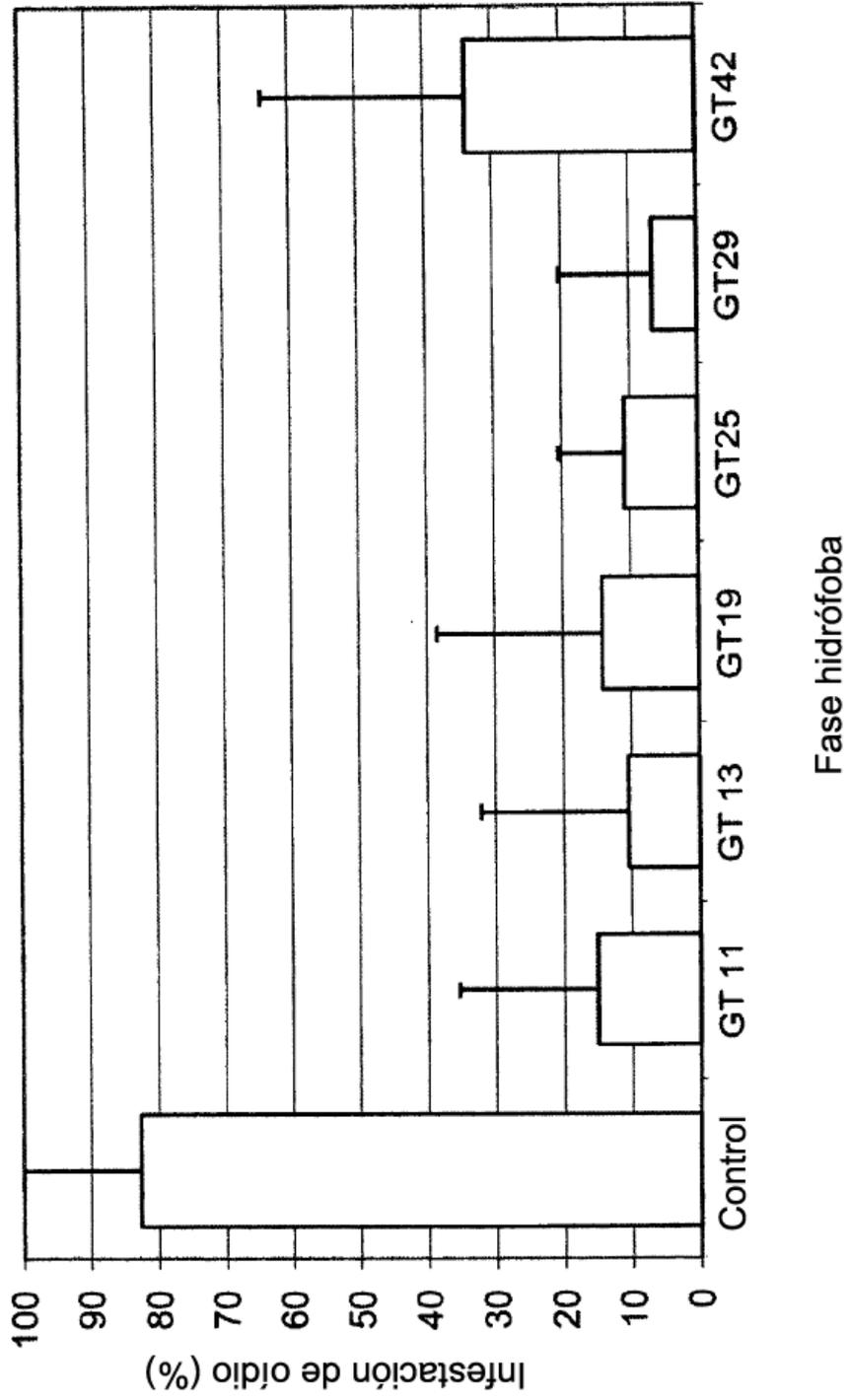


Fig. 10

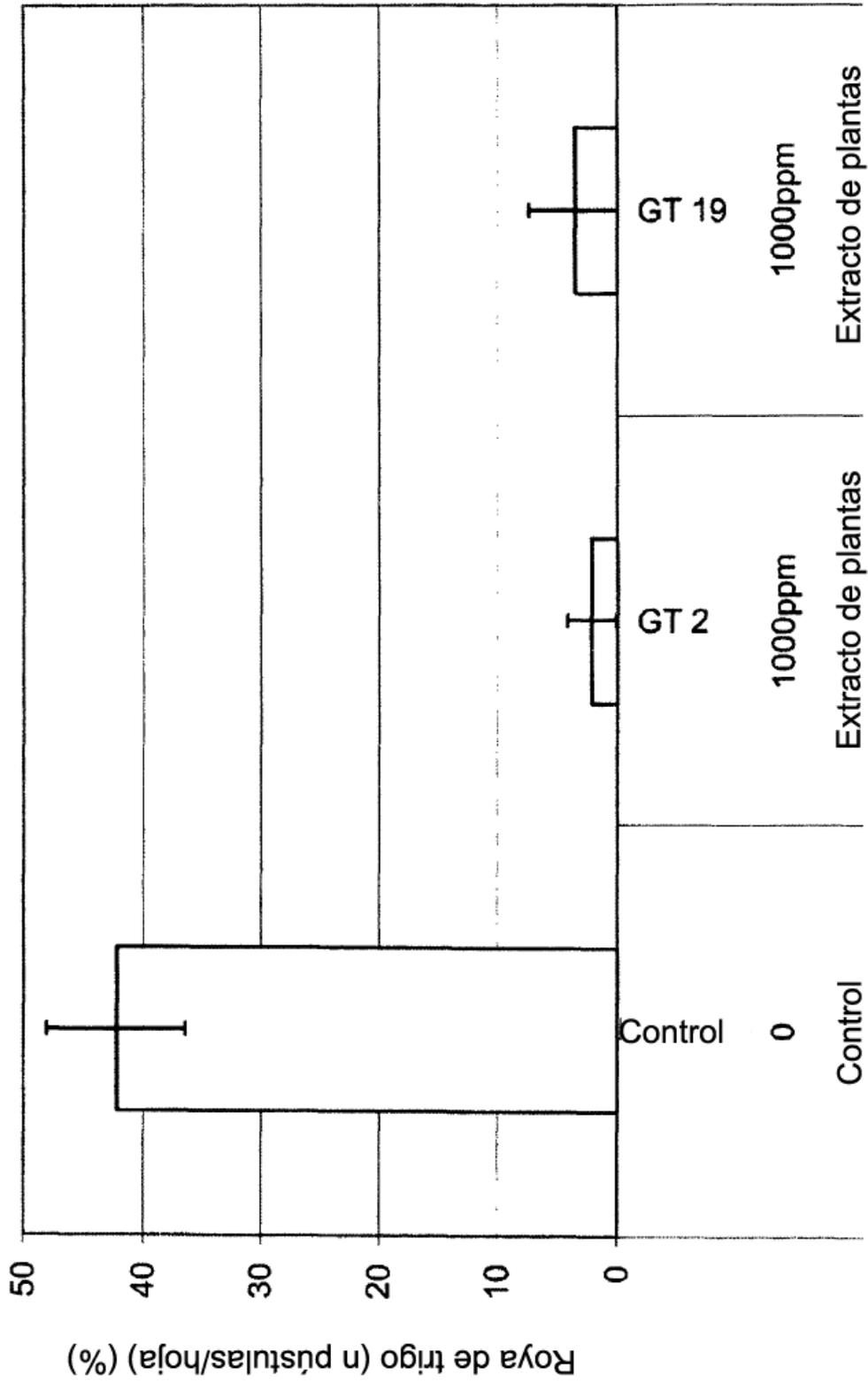
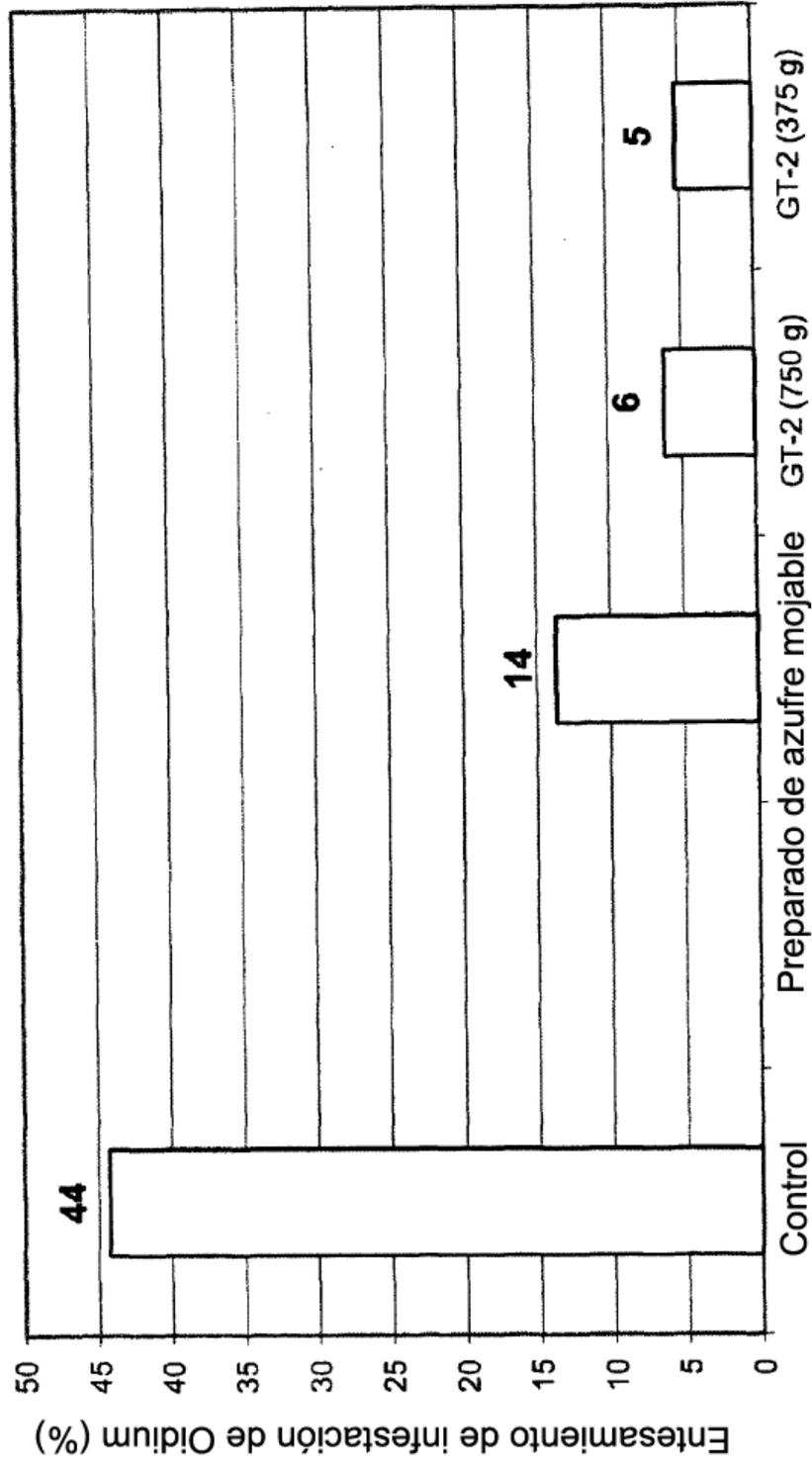


Fig. 11



Uvas (23.08.2011)

Fig. 12

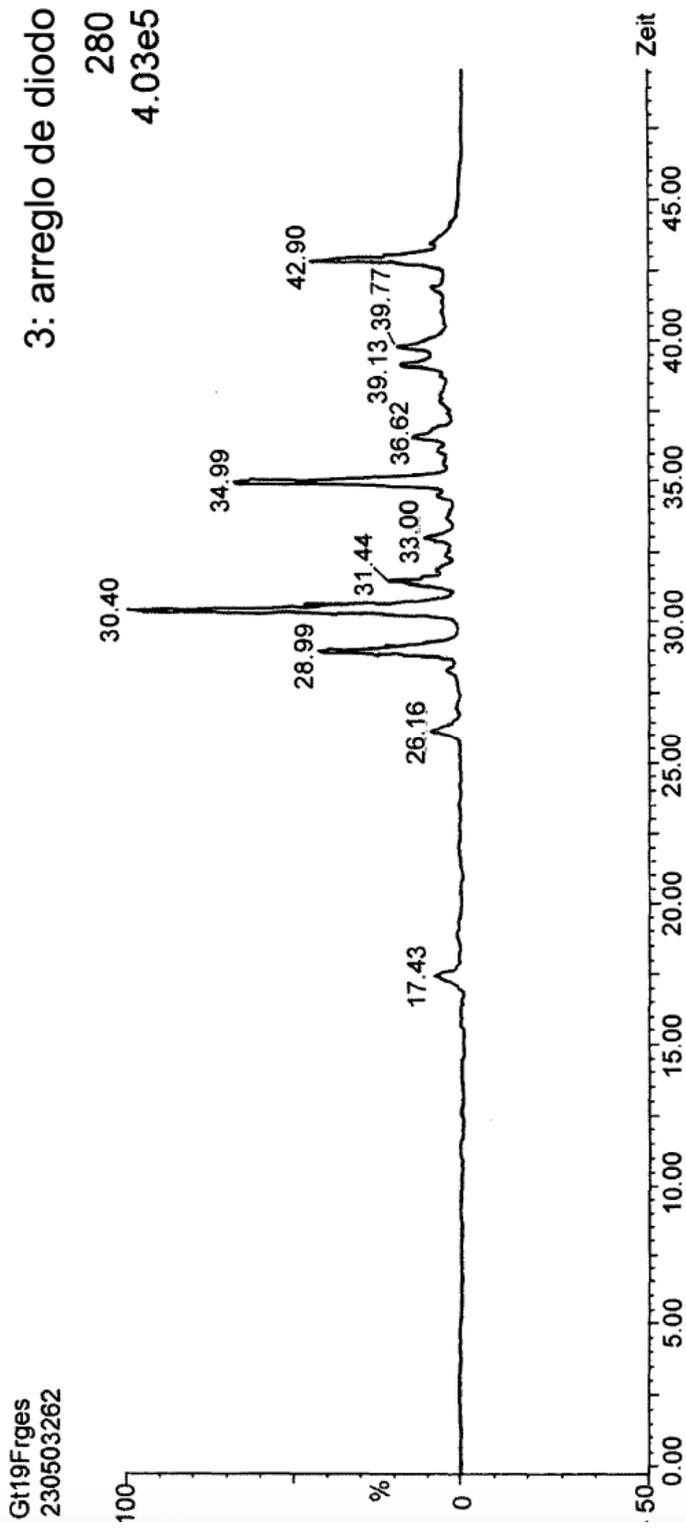


Fig. 13

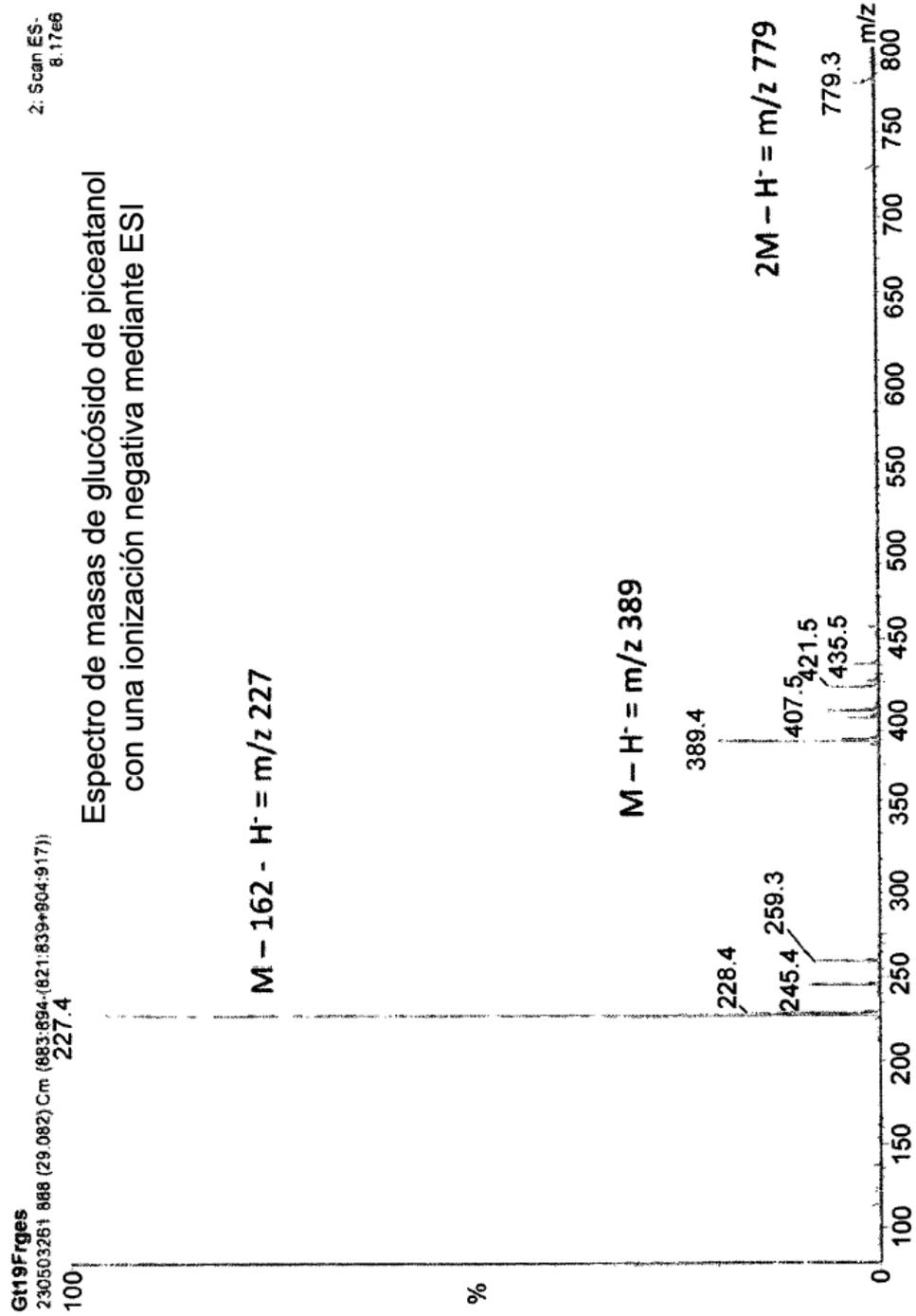


Fig. 14