

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 669 517**

51 Int. Cl.:

A01N 35/06	(2006.01)
A01N 65/30	(2009.01)
A01N 57/12	(2006.01)
A01P 21/00	(2006.01)
A01P 3/00	(2006.01)
A01N 25/00	(2006.01)
A01N 65/00	(2009.01)
A01C 7/00	(2006.01)
A01C 1/06	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.11.2011 PCT/US2011/059197**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **10.05.2012 WO12061622**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.11.2011 E 11838823 (0)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.02.2018 EP 2635119**

54 Título: **Uso de una composición que comprende fisiona como promotor de crecimiento**

30 Prioridad:

04.11.2010 US 410279 P

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

28.05.2018

73 Titular/es:

**MARRONE BIO INNOVATIONS, INC. (100.0%)
1540 Drew Avenue
Davis, CA 95618, US**

72 Inventor/es:

**SU, HAI;
MARRONE, PAMELA y
OSBORNE, JASON, L.**

74 Agente/Representante:

GALLEGO JIMÉNEZ, José Fernando

ES 2 669 517 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

Uso de una composición que comprende fisciona como promotor de crecimiento

5 **Campo técnico**

En el presente documento se desvelan usos de composiciones, particularmente, de extractos de plantas que contienen derivados de antraquinona para modular el crecimiento de las plantas así como el asentamiento de las raíces y la germinación de las semillas de las plantas. También se desvelan usos de extractos de plantas que contienen derivados de antraquinona para modular, en particular, combatir enfermedades de las plantas transmitidas por el suelo.

Antecedentes

15 El extracto de maleza nudosa gigante (*Reynoutria sachalinensis*), comercializado como MILSANA® y REGALIA® por Marrone Bio Innovations, Inc., combate el mildiú pulverulento y otras enfermedades de las plantas en cucurbitáceas y otros cultivos, principalmente induciendo una acumulación de compuestos fenólicos fungitóxicos en la planta (Daayf *et al.*, 1995; Wurms *et al.*, 1999; Schmitt, 2002). Recientemente, el extracto formulado de maleza nudosa gigante también ha demostrado ser muy eficaz en cuanto a la inducción de resistencia en diversos cultivos contra fitopatógenos entre los que se incluye el mildiú pulverulento del trigo (Vechet *et al.* 2009). Además del modo de acción de la resistencia sistémica inducida (RSI), recientemente también se ha demostrado que el extracto formulado de *R. sachalinensis* tiene un efecto fungistático directo contra el mildiú pulverulento del trigo (*Blumeria graminis* f. sp. *tritici*; Randoux *et al.*, 2008).

25 Los inductores de defensa de las plantas, tales como el extracto de *Reynoutria sachalinensis*, han sido analizados en mezclas de tanque y rotaciones con otros productos de RSA/RSI así como con agentes de biocontrol (ABC) (Hafez *et al.*, 1999; Belanger y Benyagoub, 1997; Schmitt *et al.* 2002; Schmitt y Seddon, 2005; Bardin *et al.*, 2008). El propósito de estos estudios ha sido principalmente demostrar la compatibilidad de diferentes tipos de extractos de plantas con agentes de biocontrol. Konstantinidou-Doltsinis *et al.* (2007) analizaron el producto *R. sachalinensis* en una rotación con un producto de *Pseudozyma flocculosa* contra el mildiú pulverulento en la uva y descubrieron que la aplicación alterna de ambos productos mejoraba la eficacia de *R. sachalinensis*. En el mismo estudio, la alternancia de azufre y *R. sachalinensis* en una rotación no tuvo ningún efecto beneficioso. Balenger y Benyagoub (1997) descubrieron que el hongo de tipo levadura, *Pseudozyma flocculosa*, era compatible con *Reynoutria sachalinensis* cuando se usaba contra el mildiú pulverulento del pepino en un invernadero. Asimismo, Bokshi *et al.* (2008) evaluaron el efecto combinado de un activador de resistencia sistémica adquirida, el benzotriazol, y MILSANA® contra el mildiú pulverulento del pepino y descubrieron que MILSANA® utilizado en una rotación con benzotriazol proporcionaba una medida de combate eficaz contra el mildiú pulverulento en el campo. Sin embargo, basándose en la gravedad de la enfermedad y en los datos de rendimiento recopilados, no fue posible determinar si el efecto positivo era aditivo o sinérgico.

40 El documento JP 0 899813H desvela un agente líquido acuoso para la regulación del crecimiento de las plantas. El documento JP 1995 0138 240 describe derivados de benzotriazol y su uso. El documento US 2010/154498 A1 desvela una composición de fertilizador líquido. El documento WO 94/17070 A1 describe derivados de azaantraquinona y azaxantona, herbicidas y reguladores del crecimiento de las plantas que contienen estos productos.

50 GYUNG JA CHOI *ET AL.* desvelan los efectos de crisofanol, parietin y nepodin de *Rumex crispus* en el mildiú pulverulento de cebada y pepino. YOUNG-MI KIM *ET AL.* describen antraquinonas aisladas de la semilla de *Cassia tora* (leguminosa) que muestra una propiedad antifúngica contra hongos fitopatógenos. INOUE *ET AL.* describen aleloquímicos de *Polygonum sachalinense* Fr.Schm. (poligonácea). S. KONSTANTINIDOU-DOLTSINIS *ET AL.* desvelan la eficacia de milsana, un extracto de planta formulado de *Reynoutria sachalinensis*, contra el mildiú pulverulento del tomate (*Leveillula taurica*). NISHIMURA *ET AL.* describen la identificación de aleloquímicos en *Eucalyptus citriodora* y *Polygonum sachalinense*.

55 **Sumario**

En el presente documento se proporciona el uso de una composición que comprende fisciona derivada de *Reynoutria sachalinensis* que promueve el crecimiento de una planta (por ejemplo, cultivos tales como frutas (por ejemplo, fresa), hortalizas (por ejemplo, tomate, calabaza, pimiento, berenjena), o cultivos de cereales (por ejemplo, soja, trigo, arroz, maíz), árboles, flores, plantas ornamentales, arbustos (por ejemplo, algodón, rosa), plantas bulbosas (por ejemplo, cebolla, ajo) o trepadoras (por ejemplo, vid) y también, en particular, modulan o promueven el asentamiento de las raíces. En un aspecto relacionado, se proporciona un método para promover el crecimiento de una planta que comprende:

65 el tratamiento de dicha planta o semilla de dicha planta con una cantidad de una composición que comprende fisciona derivada de *Reynoutria sachalinensis*, eficaz para promover dicho crecimiento en dicha

planta o semilla; y
trasplantar en el suelo dicha planta o semilla,
en el que la planta se selecciona de una planta de fresa, calabaza, pepino, tomate, rosa, pimiento,
berenjena, trepadoras, algodón, cebolla, ajo, trigo, soja, maíz y arroz.

5 La composición puede ser un extracto de la planta o, en otras palabras, un extracto derivado de *Reynoutria sachalinensis*.

10 El extracto puede aplicarse a las raíces de una planta antes de trasplantarla en el suelo. En particular, se proporciona un método para promover la extensión radicular en una planta que comprende: (a) tratar una o más raíces de una planta con dicho extracto en una cantidad eficaz para promover la extensión radicular cuando se trasplante en el suelo; (b) trasplantar en el suelo la planta tratada del apartado (a).

15 También se describe una composición para su uso en la modulación del crecimiento en una planta que comprende uno o más derivados de antraquinona que modulan el crecimiento en una planta y opcionalmente una segunda sustancia, siendo dicha segunda sustancia un agente que promueve el crecimiento de la planta.

20 También se describe el uso de una composición, que puede ser un extracto que contenga o que comprenda uno o más derivados de antraquinona, que module la germinación de una semilla en una planta, por ejemplo, cultivos tales como frutas (por ejemplo, fresa), hortalizas (por ejemplo, tomate, calabaza, pimiento, berenjena), o cultivos de cereales (por ejemplo, soja, trigo, arroz, maíz), árboles, flores, plantas ornamentales, arbustos (por ejemplo, algodón, rosa), plantas bulbosas (por ejemplo, cebolla, ajo) o trepadoras (por ejemplo, vid) para modular dicha germinación. También se describe un método para modular la germinación de una semilla en una planta tratando dicha planta con una cantidad de una composición que contenga uno o más derivados de antraquinona que modulen
25 la infección transmitida por el suelo en una planta, eficaz para modular dicha germinación de una semilla en una planta. De nuevo la composición puede ser un extracto de planta.

30 También se describe una composición para su uso en la modulación de la germinación de una semilla en una planta que comprende uno o más derivados de antraquinona que modulan la germinación de una semilla en una planta y opcionalmente una segunda sustancia, siendo dicha segunda sustancia un agente de recubrimiento de semilla.

35 También se describe el uso de una composición, que puede ser un extracto que contenga o que comprenda uno o más derivados de antraquinona que modulen y, en particular, modulen enfermedades transmitidas por el suelo, en particular, enfermedades transmitidas por el suelo, que no sean causadas por *Rhizoctonia*, en una planta (por ejemplo, cultivos tales como frutos (por ejemplo, fresa), hortalizas (por ejemplo, tomate, calabaza, pepino, berenjena) o cultivos de cereales (por ejemplo, soja, trigo, arroz, maíz), árboles, flores, plantas ornamentales, arbustos (por ejemplo, algodón, rosa), plantas bulbosas (por ejemplo, cebolla, ajo) o trepadoras (por ejemplo, vid). Se describe un método para modular la infección por una enfermedad transmitida por el suelo en una planta, tratando dicha planta con una cantidad de una composición que contenga uno o más derivados de antraquinona que
40 module una infección por una enfermedad transmitida por el suelo en una planta, eficaz para modular dicha infección por una enfermedad transmitida por el suelo en una planta. De nuevo, la composición puede ser un extracto de planta.

45 También se describe una composición para su uso en la modulación de enfermedades transmitidas por el suelo en una planta, que comprende uno o más derivados de antraquinona que modulan una enfermedad transmitida por el suelo en una planta y opcionalmente una segunda sustancia, siendo dicha segunda sustancia un agente antifitopatógeno de planta.

50 En las composiciones y métodos expuestos anteriormente, la planta puede ser un fruto, una hortaliza, un árbol, un arbusto, una planta bulbosa, trepadoras. El fruto, hortaliza, árbol, flor, planta ornamental, arbusto, planta bulbosa, trepadora puede incluir, pero sin limitación, fresa, calabaza, pepino, tomate, rosa, pimiento, algodón, berenjena, cebolla y ajo, soja, trigo, arroz, maíz y vid.

55 Descripción detallada de la invención

60 Cuando se proporciona un intervalo de valores, se entiende que cada valor intermedio, hasta la décima parte de la unidad del límite inferior, a menos que el contexto indique claramente lo contrario, entre el límite superior e inferior de ese intervalo y cualquier otro valor indicado o intermedio en ese intervalo indicado, está incluido en la invención. Los límites superior e inferior de estos intervalos más pequeños pueden incluirse independientemente en los intervalos más pequeños que también se incluyen en la invención, sujetos a cualquier límite específicamente
excluido en el intervalo indicado. Cuando el intervalo indicado incluye uno o ambos límites, los intervalos que excluyen ambos límites incluidos también se incluyen en la invención.

65 A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente memoria tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto habitual en la técnica a la que pertenece esta invención. Aunque en la práctica o ensayo de la presente invención también puede utilizarse cualquier método y material

similar o equivalente a los descritos en la presente memoria, a continuación se describen los métodos y materiales preferidos.

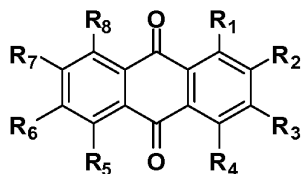
5 Debe observarse que como se usa en el presente documento y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular “un”, “uno(a)”, “el” y “la” incluyen referencias en plural a menos que el contexto indique claramente otra cosa. Por ejemplo, un “un hongo” también incluye “hongos”.

10 Como se define en el presente documento, el término “modular” se utiliza para indicar que se altera la cantidad de crecimiento y preferentemente aumenta la cantidad o la tasa de crecimiento o germinación de una semilla de una planta o que se altera y preferentemente disminuye la carga de infección, causada por una enfermedad transmitida por el suelo, que hay en una fruta u hortaliza o la tasa de propagación de una infección, causada por una enfermedad transmitida por el suelo, en una planta.

15 Composiciones

Las composiciones descritas contienen derivados de antraquinona como productos agrícolas bioquímicos para su uso en la modulación y promoción del crecimiento de las plantas, y/o modulación y promoción de la germinación de semillas y/o modulación y preferentemente inhibición de una infección por enfermedad transmitida por el suelo en las plantas. En particular la composición puede ser un extracto de planta. Por tanto, “contiene” también incluye extractos 20 que producen dichos derivados de antraquinona. En particular, el/los derivado(s) de antraquinona utilizado(s) es/son el/los principal(es) ingrediente(s) activo(s) o uno de los principales ingredientes activos.

25 Los derivados de antraquinona incluyen, pero sin limitación, fisiona, emodina, crisofanol, ventiloquinona, glicósido de emodina, glicósido de crisofanol, glicósido de fisiona, 3,4-dihidroxi-1-metoxi antraquinona-2-carboxaldehído, damnacantal. Estos derivados comparten una estructura similar a la siguiente:



30 en la que R1, R2, R3, R4, R5, R6, R7 y R8 son hidrógeno, un grupo hidroxilo, hidroxialquilo, halógeno, carboxilo, alquilo, alquiloxilo, alquenilo, alqueniloxilo, alquinilo, alquiniloxilo, heterocíclico, aromático o arilo y azúcares tal como glucosa.

35 En particular, los derivados de antraquinona pueden estar contenidos en, o derivar de, extractos derivados de familias de plantas que incluyen, pero sin limitación, *Polygonaceae*, *Rhamnaceae*, *Fabaceae*, *Asphodelaceae* y *Rubiaceae*, y etc. En particular, estos compuestos pueden derivar de cualquier parte de las plantas, tales como la hoja, tallo, corteza, raíz y fruto. Los materiales de plantas pueden ser húmedos y secos, pero son preferentemente materiales secos. Como se define en el presente documento, “derivado de” significa directamente aislado u obtenido de una fuente particular o, como alternativa, que tiene características identificativas de una sustancia u organismo 40 aislado u obtenido de una fuente particular. Para ajustarse a los productos agrícolas bioquímicos, los disolventes y procesos que se utilizan en la extracción y purificación deben cumplir los requisitos del National Organic Program (NOP) [<http://www.ams.usda.gov/AMSV1.0/nop>, citado el 20 de julio de 2009].

45 En particular, el extracto de planta deriva de un miembro de la familia *Polygonaceae*. En una realización particular, en dicha combinación el extracto contiene los derivados de antraquinona fisiona y opcionalmente emodina. Los miembros de la familia *Polygonaceae* incluyen, pero sin limitación, *Acetosella*, *Aristocapsa*, *Bilerdykia*, *Brunnichia*, *Centrostegia*, *Chorizanthe*, *Coccoloba*, *Coccolobis*, *Coccolobo*, *Corculum*, *Dedeckera*, *Delopyrum*, *Dentoceras*, *Harfordia*, *Hollisteria*, *Koenigia*, *Lastarriaea*, *Mucronea*, *Muehlenbeckia*, *Nemacaulis*, *Oxyria*, *Oxytheca*, *Perscarioa*, *Persicaria*, *Pleuropterus*, *Padopterus*, *Polygonella*, *Polygonum*, *Pterostegia*, *Rheum*, *Rumex*, *Ruprechtia*, *Stenogonum*, *Systemothecha*, *Thysanella*, *Tovara*, *Tracaulon*, *Triplaris*, y más en particular, el extracto puede derivar 50 de una planta de *Reynoutria* (denominada de manera alternativa *Fallopia*) sp o de una especie del género *Rheum*. De acuerdo con el método de la invención, el extracto deriva de *Reynoutria sachalinensis*.

Agentes que promueven el crecimiento de las plantas

55 Las composiciones indicadas anteriormente, que pueden estar en forma de un extracto (tal como productos comercializados con los nombres comerciales REGALIA® y MILSANA®) pueden utilizarse en combinación con otros agentes que promueven el crecimiento tales como fertilizantes sintéticos u orgánicos (por ejemplo, fosfato diamónico en forma líquida o granular), té de compost, extractos de alga, hormonas del crecimiento de las plantas tales como AIA (ácido indolacético) utilizado en un tratamiento hormonal de enraizamiento para trasplantes bien en solitario o en 60 combinación con reguladores del crecimiento de las plantas tales como AIB (ácido indolbutírico) y ANA (ácido

naftalenacético) y microbios que promueven el crecimiento, tales como *Bacillus* spp., *Pseudomonas*, *Rhizobia*, *Trichoderma*.

Agente de recubrimiento de semillas

5 Las composiciones expuestas anteriormente pueden estar en forma de un extracto en forma sólida/en polvo o líquida (tales como los productos comercializados con los nombres comerciales REGALIA® y MILSANA®) y también pueden utilizarse en combinación con agentes de recubrimiento de semillas. Dichos agentes de recubrimiento de semillas incluyen, pero sin limitación, etilenglicol, polietilenglicol, quitosano, carboximetil quitosano, turba, resinas y ceras o fungicidas o bactericidas químicos con un modo de acción unisitio, multisitio o desconocido.

Agentes antifitopatógenos

15 Por tanto, las composiciones expuestas anteriormente que pueden estar en forma de un extracto (tales como los productos comercializados con los nombres comerciales REGALIA® y MILSANA®) pueden utilizarse en combinación con otros agentes antifitopatógenos, tales como extractos de plantas, biopesticidas, protectores de cultivos inorgánicos (tales como cobre), tensioactivos (tales como ramnolípidos, Gandhi *et al.*, 2007) o aceites naturales tales como aceite parafínico y aceite de árbol de té, que poseen propiedades pesticidas o fungicidas o bactericidas químicos con un modo de acción en un solo sitio, multisitio o desconocido. Como se define en el presente documento, un “agente antifitopatógeno” es un agente que modula el crecimiento de un fitopatógeno, particularmente un patógeno causante de una enfermedad transmitida por el suelo en una planta, o como alternativa, impide la infección de una planta por un fitopatógeno. Un fitopatógeno incluye, pero sin limitación, un hongo, una bacteria, un actinomiceto o un virus.

25 Como se ha indicado anteriormente, el agente antifitopatógeno puede ser un agente antifúngico de acción unisitio que puede incluir, pero sin limitación, benzimidazol, un inhibidor de desmetilación (IDM) (por ejemplo, imidazol, piperazina, pirimidina, triazol), morfolina, hidroxipirimidina, anilino pirimidina, fosforotioato, inhibidor exterior de quinona, quinolina, dicarboximida, carboximida, fenilamida, anilino pirimidina, fenilpirrol, hidrocarburo aromático, ácido cinámico, hidroxianilida, antibiótico, polioxina, acilamina, ftalimida, benzenoide (xililalanina). Más en particular, el agente antifúngico es un inhibidor de desmetilación seleccionado del grupo que consiste en imidazol, piperazina, pirimidina y triazol (por ejemplo, bitertanol, miclobutanilo, penconazol, propiconazol, triadimenfón, bromuconazol, ciproconazol, diniconazol, fenbuconazol, hexaconazol, tebuconazol, tetraconazol). Más en particular, el agente antifúngico es miclobutanilo. En otra realización particular adicional, el agente antifúngico es un inhibidor externo de quinona (por ejemplo, estrobilurina). La estrobilurina puede incluir, pero sin limitación, azoxistrobina, kresoxim-metilo o trifloxistrobina. En particular, el agente antifúngico es quinona, por ejemplo, quinoxifeno (5,7-dicloro-4-quinolil 4-fluorofenil éter).

40 El fungicida puede ser un fungicida químico inorgánico de acción multisitio, seleccionado del grupo que consiste en cloronitrilo, quinoxalina, sulfamida, fosfonato, fosfito, ditiocarbamato, cloralquitos, fenilpiridin-amina, oxima cianoacetamida.

El agente antifitopatógeno puede ser estreptomycinina, tetraciclina, oxitetraciclina, cobre, kasugamicina.

Usos

45 Las composiciones mencionadas, en particular, los extractos de plantas o los compuestos indicados anteriormente, pueden utilizarse para modular o promover el crecimiento de las plantas, por ejemplo, de cultivos tales como de frutas (por ejemplo, fresa), hortalizas (por ejemplo, tomate, calabaza, pimiento, berenjena) o cereales (por ejemplo, soja, trigo, arroz, maíz), árboles, flores, plantas ornamentales, arbustos (por ejemplo, algodón, rosas), plantas bulbares (por ejemplo cebolla, ajo) o trepadoras (por ejemplo, vid) y particularmente, promover el asentamiento temprano de las raíces de dichas plantas. Las composiciones pueden utilizarse para modular la germinación de una o más semillas en una o más plantas. Como alternativa, dichas composiciones pueden utilizarse para modular la carga de infección por una enfermedad transmitida por el suelo en las plantas y, en particular, impedir o inhibir dicha infección por una enfermedad transmitida por el suelo y/o reducir la tasa y/o el grado de propagación de dicha infección por una enfermedad transmitida por el suelo en dichas plantas. De nuevo, las plantas incluyen, pero sin limitación, cultivos de frutas (por ejemplo, fresa), hortalizas (por ejemplo, tomate, calabaza, pimiento, berenjena) o cereales (por ejemplo, soja, trigo, arroz, maíz), árboles, flores, plantas ornamentales, arbustos (por ejemplo, algodón, rosas), plantas bulbares (por ejemplo cebolla, ajo) o trepadoras (por ejemplo, vid). Las enfermedades transmitidas por el suelo incluyen, pero sin limitación, las causadas por infección por enfermedades transmitidas por el suelo no causadas por *Rhizoctonia*, tales como las causadas por *Pythium*, *Phytophthora*, *Verticillium*, *Sclerotium*, *Colletotrichum* y *Fusarium*.

65 Dicha composición (por ejemplo, extracto de planta) o producto formulado, puede utilizarse en solitario o en simultáneo con el otro componente o componentes indicados anteriormente, tales como agentes que promueven el crecimiento y/o agentes antifitopatógenos en una mezcla de tanque o en un programa (aplicación secuencial denominada rotación) con un orden y una aplicación predeterminados durante la temporada de cultivo. Cuando se

utiliza en una combinación con los productos anteriormente mencionados, a una concentración más baja que la recomendada en la marca del producto, la eficacia combinada de los dos o más productos (uno de los cuales es el extracto d) es, en una realización preferida, mayor que la de cada uno de los efectos de los componentes individuales añadidos a la vez. Por tanto, el efecto se potencia por sinergismo entre estos dos (o más) productos, y el riesgo de desarrollar resistencia a pesticidas entre las cepas fitopatógenas se reduce.

La composición (por ejemplo, extracto de planta) puede aplicarse mediante inmersión de la raíz en el trasplante, específicamente tratando un fruto u hortaliza vegetal con el extracto de planta sumergiendo las raíces del fruto u hortaliza en una suspensión de dicho extracto (de aproximadamente 0,25 a aproximadamente 1,5 % y más particularmente de aproximadamente 0,5 % a aproximadamente 1,0 % en volumen por volumen) antes de trasplantar en el suelo el fruto o la hortaliza.

Como alternativa, la composición (por ejemplo, extracto de planta) puede aplicarse por goteo u otro sistema de irrigación. Específicamente, el extracto de planta puede inyectarse en un sistema de irrigación por goteo. En una realización particular, el extracto puede aplicarse a una tasa de aproximadamente 11 a aproximadamente 4 cuartos por acre.

La composición puede añadirse como una aplicación en surco.

Específicamente, la composición puede añadirse al sembrar como en una pulverización en surco utilizando boquillas de calibre 30 para suministrar una salida total de 2-6 galones/acre. Las boquillas se colocan en el abresurcos de la sembradora de tal manera que la aplicación del pesticida y de la semilla, que caen dentro del surco, es simultánea. Las mezclas indicadas anteriormente y, cuando sea apropiado, un adyuvante sólido o líquido, se preparan de una manera conocida. Por ejemplo, las mezclas pueden prepararse mezclando y/o moliendo homogéneamente los ingredientes activos con extendedores tales como disolventes, transportadores sólidos y, cuando sea apropiado, compuestos activos en la superficie (tensoactivos). Las composiciones también pueden contener otros ingredientes tales como estabilizantes, reguladores de viscosidad, aglutinantes, adyuvantes, así como fertilizantes u otros ingredientes activos, para obtener efectos especiales.

30 Ejemplos

Ejemplo 1: Efecto de *Reynoutria sachalinensis* sobre el crecimiento de fresas

Una parcela de 16 acres de plantas de fresa se trató con una solución de extracto de *Reynoutria sachalinensis* (comercializado con el nombre comercial de REGALIA®) a una concentración de 0,25 %, 0,5 % y 1,0 % (v/v) solo o *Streptomyces lydicus* comercializado como ACTINOVATE® (Natural Industries, Inc.) sumergiendo las plantas en el REGALIA® en un alimentador de 250 galones durante aproximadamente 3 minutos. Después de nueve días, todas las plantas tratadas con REGALIA® eran muy saludables y crecían activamente mientras que las plantas tratadas con ACTINOVATE® tenían rebrotes en las hileras donde las plantas parecían estar muertas. Las plantas tratadas con REGALIA® tenían raíces fibrosas en proliferación mientras que las tratadas con ACTINOVATE® podían tener tres o cuatro raíces en crecimiento.

Ejemplo 2: Efecto de *Reynoutria sachalinensis* sobre la germinación de semillas de soja

Extracto seco de *Reynoutria sachalinensis* se disolvió al 5 % en etanol 95 % (p/v) y se sometió a ultrasonidos durante 10 minutos. La solución se utilizó para recubrir semillas de soja a diversas tasas.

Recubrimiento de las semillas: La superficie de las semillas de soja (*Glycine max*) se esterilizó sumergiendo la semilla en hipoclorito sódico al 0,5 % durante 3 minutos y se lavó tres veces con agua estéril. Se utilizó el siguiente tratamiento:

1. Sin recubrimiento.
2. Agente de recubrimiento (por ejemplo, SEPIRET® 1171-O (Becker Underwood, Inc.) a 12 g/kg semilla)
3. Agente de recubrimiento más etanol al 95 % 2 ml
- 55 4. Agente de recubrimiento más extracto de *Reynoutria sachalinensis* a 10 g/kg semilla
5. Agente de recubrimiento más *Reynoutria sachalinensis* a 2 g/kg semilla
6. Agente de recubrimiento más *Reynoutria sachalinensis* a 0,2 g/kg semilla
7. Agente de recubrimiento más *Reynoutria sachalinensis* a 0,05 g/kg semilla
8. Agente de recubrimiento más *Reynoutria sachalinensis* a 0,025 g/kg semilla
- 60 9. Agente de recubrimiento más *Reynoutria sachalinensis* a 0,0125 g/kg semilla

Evaluación de la germinación: Las semillas de los tratamientos anteriormente mencionados se colocaron en placas de Petri de 10 cm con 10 ml de agua estéril y se dejaron a oscuras a temperatura ambiente (25 °C). Después de 5 días más se añadieron 10 ml de agua estéril a cada placa de Petri y las semillas se dejaron al descubierto para que reaccionaran con la luz durante tres días. Se comparó y documentó la germinación y el color de las semillas en los diferentes tratamientos.

Resultados y conclusiones: Las semillas tratadas recubiertas con *Reynoutria sachalinensis* tenían raíces más largas y cotiledones más verdes. Las semillas recubiertas con de 0,025 a 2 g/kg semilla, mostraron el mejor efecto de tratamiento.

5 **Ejemplos 3: Efecto de *Reynoutria sachalinensis* (formulada como REGALIA®ME) sobre el crecimiento de trasplantes de fresa**

Inmersión de las plantas: En este estudio se utilizaron plantas con raíz desnuda/trasplantes cv. Albión. Las plantas se sumergieron en cada una de las soluciones de tratamiento durante 5 minutos antes del trasplante.

10 Tratamientos:

1. Plantas de control no tratadas (agua);
2. REGALIA® ME a 0,50 % v/v (1:200) utilizado como una inmersión de planta completa;
- 15 3. REGALIA® ME a 1,00 % v/v (1:100) utilizado como una inmersión de planta completa;
4. REGALIA® ME a 1:200 + Aliette WDB a 2,5 lb/100 galones (3,0 g/l) utilizado como una inmersión de planta completa; las plantas se sumergieron durante 15 minutos siguiendo la marca del producto;
5. ALIETTE® WDG (Bayer CropScience, que contiene aluminio tris (O-etil fosfonato como ingrediente activo) 2,5 g/100 gal; las plantas se sumergieron durante 15 minutos siguiendo la marca del producto.

20 Había 5 plantas por cada repetición y se realizaron cuatro repeticiones por tratamiento. Los tratamientos se organizaron en un diseño de bloques completos al azar.

25 **Evaluación:** Todas las plantas se evaluaron con respecto al porcentaje de raíces blancas en relación con la totalidad del área de las raíces y con respecto al porcentaje de las raíces alimentadoras en relación con el volumen de masa radicular completa después de 14 días de tratamiento (Tabla 1).

30 **Resultados y conclusiones:** En comparación con las plantas de control tratadas con agua, hubo un aumento del 42 % en el área de raíces blancas nuevas a una dilución de 1:200 (v/v) y un aumento del 123 % a una dilución de 1:100 (v/v). La masa de raíces alimentadoras también aumentó un 14,9 % a una dilución de 1:200 y hubo un 43 % de aumento a una dilución de 1:100 (Tabla 1).

35 **Tabla 1.** Porcentaje de área de crecimiento de raíces blancas y raíces alimentadoras después de tratarse con REGALIA® (*Los datos con la misma letra en una columna no son significativamente diferentes a un nivel LSD (siglas de *Least Significant Difference*, mínima diferencia significativa) de P=0,05).

Tratamiento	Raíces blancas (% área)	Raíces alimentadoras (% masa vol)
Agua	14,7 a*	11,4 a
REGALIA® ME 1:200 (v/v)	21,0 a	13,1 a
REGALIA® ME 1:100 (v/v)	32,8 a	16,3 a
REGALIA® ME 1:200+ALIETTE®	30,8 a	16,3 a
ALIETTE® 2,5 g/100 gal	24,0 a	14,3 a

40 **Ejemplo 4: Aplicaciones de *Reynoutria sachalinensis* (Formulada como REGALIA® ME) para mejorar el asentamiento de plantas de fresa**

Inmersión de la planta: Este estudio consistía en 7 tratamientos aplicados los Días 0 y 14 para evaluar la eficacia de REGALIA®ME para combatir enfermedades transmitidas por el suelo y potenciar el asentamiento y desarrollo de plantas de fresa a lo largo de la costa central de California. El ensayo se realizó en Guadalupe, CA, USA. Plantas de fresa con raíz desnuda cv. Albión, se sembraron en parterres elevados de 3,33 pies x 15 pies. Se aplicaron los siguientes tratamientos.

45 **Tratamientos:**

50 Había cuatro repeticiones por cada tratamiento, que se organizaron en un diseño de bloques completos al azar.

1. Plantas de control no tratadas;
2. REGALIA® ME a 0,25 % (v/v) utilizado como una inmersión de planta completa antes del trasplante;
3. REGALIA® ME a 0,5 % (v/v) utilizado como una inmersión de planta completa antes del trasplante;
4. REGALIA® ME a 0,1 % (v/v) utilizado como una inmersión de planta completa antes del trasplante;
- 55 5. REGALIA® ME a 2 ct/acre aplicado mediante riego por goteo inmediatamente después de la siembra y a las dos semanas;
6. REGALIA® ME a 4 ct/acre aplicado mediante riego por goteo inmediatamente después de la siembra y a las dos semanas;

7. ALIETTE WDG a 2,5 lb/acre aplicado mediante riego por goteo inmediatamente después de la siembra y a las dos semanas;

Evaluación: Las evaluaciones consistieron en evaluar cinco plantas por parcela para medir las plantas y contar las que estaban erguidas el Día 7, Día 11, Día 15, Día 20, Día 25 y Día 30.

Resultados y conclusiones: Hubo un aumento significativo en el peso de las plantas después de sumergirse en, o regarse por goteo con, REGALIA®ME (Tabla 2) en comparación con las plantas de control no tratadas. El aumento en el peso de la planta varió de 39,6 % a 71,7 %.

Tabla 2. Peso total promedio (g) de la planta de fresa por parcela repetida, indicado a fecha de evaluación por tratamiento (*Los datos con la misma letra en una columna no son significativamente diferentes a un nivel LSD de P=0,05).

Trt. n.º	Tratamiento	Tasa	Día 7	Día 11	Día 15	Día 20	Día 25	Día 30
1	Plantas de control no tratadas	N/A	16,0 a	19,0 ab	15,0 a	14,5 a	13,5 b	13,3 c
2	Goteo REGALIA® ME	0,25 %	14,1 a	22,8 ab	16,3 a	16,5 a	21,5 a	18,5 b
3	Goteo REGALIA® ME	0,5 %	15,0 a	11,8 c	16,3 a	13,1 a	24,3 a	19,3 ab
4	Goteo REGALIA® ME	1,0 %	15,0 a	10,5 c	17,8 a	17,5 a	22,0 a	22,8 a
5	Goteo REGALIA® ME	2 ct/a	15,3 a	13,8 bc	17,0 a	15,5 a	21,8 a	22,0 ab
6	Goteo REGALIA® ME	4 ct/a	14,3 a	14,3 bc	18,3 a	16,0 a	21,0 a	22,8 a

El peso de la raíz en las plantas tratadas con REGALIA®ME también aumentó significativamente de 52,8 % a 88,9 % (Tabla 3).

Tabla 3. Peso promedio de raíz (g) de raíces fresa por parcela repetida, indicado a fecha de evaluación por tratamiento (*Los datos con la misma letra en una columna no son significativamente diferentes a un nivel LSD de P=0,05).

Trt. n.º	Tratamiento	Tasa	Día 7	Día 11	Día 15	Día 20	Día 25	Día 30
1	Plantas de control no tratadas	N/A	12,0 a*	13,5 a	10,0 a	10,8 a	9,3 b	9,0 c
2	Goteo REGALIA® ME	0,25 %	11,1 a	16,5 a	11,0 a	12,0 a	17,0 a	13,8 b
3	Goteo REGALIA® ME	0,5 %	11,5 a	7,3 b	10,5 a	9,9 a	19,8 a	15,0 ab
4	Goteo REGALIA® ME	1,0 %	12,5 a	7,5 b	11,8 a	13,0 a	18,3 a	17,0 a
5	Goteo REGALIA® ME	2 ct/a	11,5 a	8,8 b	11,0 a	11,8 a	16,8 a	16,3 ab
6	Goteo REGALIA® ME	4 ct/a	10,5 a	9,3 b	11,8 a	10,8 a	17,3 a	16,3 ab
7	Goteo ALIETTE® ME	2,5 lb/a	10,5 a	8,8 b	14,3 a	7,5 a	16,5 a	16,3 ab

Ejemplo 5. Aplicación de *Reynoutria sachalinensis* (formulada como Regalia® ME) para potenciar el crecimiento y el rendimiento de plantas de fresa

Inmersión de la planta: El ensayo se realizó en Dover, Florida, USA. Plantas de fresas con raíz desnuda cv. Festival se sembraron en parterres de dos hileras con 30 plantas por parcela a una distancia de 5 ft entre las hileras y a una distancia entre las plantas de 14 in. Este estudio consistió en 7 tratamientos, dándose a la planta de los tratamientos 2, 3, 4 y 7, una aplicación de inmersión previa el Día 0 y dándose a la planta de los tratamientos 5 y 6, un empapamiento adicional del suelo un día después de la siembra (Día 1) y dándose aplicaciones de inyección por goteo los días 14, 27, 47, 59 y 78.

Tratamientos:

1. Plantas de control no tratadas
2. REGALIA® ME a 0,25 % (v/v) inmersión previa a la siembra;
3. REGALIA® ME a 0,5 % (v/v) inmersión previa a la siembra;
4. REGALIA® ME a 0,1 % (v/v) inmersión previa a la siembra;
5. REGALIA® ME a 2,0 ct/a empapamiento de suelo (goteo);
6. REGALIA® ME a 4,0 ct/a empapamiento de suelo (goteo);
7. ALIETTE® ME 2,5 lb/acre inmersión previa a la siembra.

Había cuatro repeticiones por tratamiento, que se organizaron en un diseño de bloques completos al azar. Se añadió agua a tanques de agua de plástico con 25 galones de agua y se añadió Regalia para preparar las soluciones apropiadas para los tratamientos 2, 3, 4 y 7. Las plantas de fresa Festival con raíz desnuda se sumergieron en los tanques y se dejaron durante 10 minutos (tratamientos 2-4) y durante 15 minutos (tratamiento 7).

Los tratamientos 5 y 6 se aplicaron empapando el suelo con 50 ml suministrados a cada orificio de la planta con una taza de medir pequeña un día después de la siembra. Las aplicaciones posteriores se suministraron a través de la

cinta de goteo mediante bombas de inyección “Chem-Feed” y colectores especializados para parcelas pequeñas y 0,175 acre pulgadas de agua durante un periodo de aproximadamente una hora.

5 **Evaluaciones:** El día 63, el vigor de la planta se clasificó en una escala de 0-10 (0-vigor malo, 10-vigor excelente) y se registró. Los días 7, 14 y 21, se contaron las raíces nuevas. Después del día 21, el día 31 así como el día 39 y el día 46, las raíces recibieron una puntuación de 0-10 (0-mala, 10-excelente). El rendimiento total del fruto (en gramos) se tomó el día 120.

10 **Resultados y conclusiones:** REGALIA® ME aplicada por goteo a 4 ct/a aumentó significativamente el vigor de las plantas (Tabla 4).

Tabla 4. Vigor promedio de la planta (0-malo, 10-excelente) a fecha de tratamiento (*Los datos con la misma letra en una columna no son significativamente diferentes a un nivel LSD de P=0,05).

Trt. n.º	Tratamiento	Tasa	Día 63
1	Plantas de control no tratadas	N/A	7,90 c*
2	Goteo REGALIA® ME	0,25 % (v/v)	8,15 bc
3	Goteo REGALIA® ME	0,5 % (v/v)	8,45 bc
4	Goteo REGALIA® ME	1,0 % (v/v)	8,68 b
5	Goteo REGALIA® ME	2,0 ct/a	8,75 b
6	Goteo REGALIA® ME	4,0 ct/a	9,40 a
7	Goteo ALIETTE® ME	2,5 lb/a	7,78 c

15 También aumentó el vigor de las plantas tratadas con REGALIA® ME a otras tasas, pero no alcanzó un nivel significativo. REGALIA® ME aumentó o aumentó significativamente la cantidad de raíces nuevas (Tabla 5). El rendimiento del fruto aumentó un 6,9 % y 9,6 % después de sumergirla en REGALIA® ME al 0,5 % y 0,25 % respectivamente (Tabla 6). También hubo un aumento del rendimiento de un 7,3 % cuando se sumergió en REGALIA® ME a 4 ct/a.

20 **Tabla 5.** Recuento promedio de raíces nuevas a fecha de tratamiento (*Los datos con la misma letra en una columna no son significativamente diferentes a un nivel LSD de P=0,05).

Trt. n.º	Tratamiento	Tasa	Día 7	Día 14	Día 21
1	Plantas de control no tratadas	N/A	8,55 a*	14,80 cd	23,95 a
2	Goteo REGALIA® ME	0,25 % v/v	12,40 a	16,50 cd	37,10 bc
3	Goteo REGALIA® ME	0,5 % v/v	9,75 a	20,80 bcd	46,75 abc
4	Goteo REGALIA® ME	1 % v/v	10,85 a	29,70 ab	50,70 ab
5	Goteo REGALIA® ME	2 ct/a	9,65 a	24,00 abc	40,40 bc
6	Goteo REGALIA® ME	4 ct/a	13,50 a	33,50 a	64,35 a
7	Goteo ALIETTE®	2,5 lb/a	11,80 a	11,90 d	30,30 bc

25 **Tabla 6.** Rendimiento total del fruto en gramos por tratamiento (*Los datos con la misma letra en una columna no son significativamente diferentes a un nivel LSD de P=0,05).

Trt. n.º	Tratamiento	Tasa	Día 120
1	Plantas de control no tratadas	N/A	4910,25 a*
2	Goteo REGALIA® ME	0,25 % v/v	5382,25 a
3	Goteo REGALIA® ME	0,5 % v/v	5249,50 a
4	Goteo REGALIA® ME	1 % v/v	4690,50 a
5	Goteo REGALIA® ME	2 ct/a	4386,25 a
6	Goteo REGALIA® ME	4 ct/a	5270,25 a
7	Goteo ALIETTE®	2,5 lb/a	5185,50 a

30 **Ejemplo 6. Efecto de *Reynoutria sachalinensis* (Formulada como REGALIA® ME) sobre el crecimiento de trasplantes de tomate**

Inmersión de las plantas. Trasplantes de tomate para procesado cv. Heinz 5003, se sumergieron en cada uno de los tratamientos durante 30 min antes de sembrarse.

35 **Tratamientos:**

1. Plantas de control tratadas con agua;
2. REGALIA®ME a 0,5 % (v/v);
3. REGALIA®ME a 1,0 % (v/v).

40

Los tratamientos se organizaron en un diseño de bloques completos al azar con cuatro repeticiones por tratamiento. Había 12 plantas por repetición.

5 **Evaluación:** Los tratamientos se muestrearon al cabo de 2 y 4 semanas; para evaluar el peso de los brotes y de las raíces se tomaron tres plantas de cada parcela.

Resultados y conclusiones: Los trasplantes tratados con REGALIA®ME al 0,5 % tenían significativamente mayor peso fresco promedio de brotes y raíces después de dos y cuatro semanas de tratamiento (Tabla 7).

10 **Tabla 7.** Peso fresco promedio (g) de brotes y de raíces de trasplantes de tomate después de sumergirlos en REGALIA® ME (*Los datos con la misma letra en una columna no son significativamente diferentes a un nivel LSD de P=0,05).

Tratamiento	Peso fresco promedio (g) (2 semanas)		Peso fresco promedio (g) (4 semanas)	
	Brotes	Raíces	Brotes	Raíces
Plantas de control no tratadas	3,76 a*	1,25 c	38,1 a	4,2 c
REGALIA® ME al 0,5 %	5,47 a	1,74 a	40,3 a	5,3 ab
REGALIA® ME al 1,0 %	3,06 a	1,70 a	16,5 c	2,3 b

15 **Referencias citadas**

Bardin, M., J. Fargues, *et al.* (2008). "Compatibility between biopesticides used to control grey mold, powdery mildew and whitefly on tomato". *Biological Control* **46**: 476-483.

20 Belanger, R. R. and M. Benyagoub (1997). "Challenges and prospects for integrated control of powdery mildews in the greenhouse". *Canadian Journal of Plant Pathology* **19**: 310-314.

25 Bokshi, A. I., J. Jobling, *et al.* (2008). "A single application of Milsana followed by Bion assists in the control of powdery mildew in cucumber and helps overcome yield losses". *Journal of Horticultural Science and Biotechnology* **83**: 701-706.

Daayf, F., A. Schmitt, *et al.* (1995). "The effects of plant extracts of *Reynoutria sachalinensis* on powdery mildew development and leaf physiology of long English cucumber". *Plant Disease* **79**: 577-580.

30 Hafez, M. B., A. Schmitt, *et al.* (1999). "The side-effects of plant extracts and metabolites of *Reynoutria sachalinensis* (F. Schmidt) Nakai and conventional fungicides on the beneficial organism *Trichogramma cacoeciae* Marchal (Hym., Trichogrammatidae)". *Journal of Applied Entomology* **123**: 363-368.

35 Konstantinidou-Doltsinis, S., E. Markellou *et al.* (2007). "Control of powdery mildew of grape in Greece using Sporodex L and Milsana". *Journal of Plant Diseases and Protection* **114**: 256-262.

Schmitt, A. (2002). "Induced responses by plant extracts from *Reynoutria sachalinensis*: a case study". *Bull. IOBC/WPRS* **25**: 83-89.

40 Schmitt, A., S. Kunz, *et al.* (2002). Use of *Reynoutria sachalinensis* plant extracts, clay preparations and *Brevibacillus brevis* against fungal diseases of grape berries. Fordergemeinschaft Okologischer Obstbau e.V.(FOKO) and der Staatlichen Lehr – und Versuchsanstalt fur Wein- und Obstbau (LWO) Weinsberg. 10th International conference on cultivation technique and phytopathological problems in organic fruit-growing and viticulture; presentations at the meeting from 04-07.02.2002 Weinsberg, Alemania. Págs. 146-151.

45 Schmitt, A. and B. Seddon (2005). Biocontrol of plant pathogens with microbial BCAs and plant extracts – advantages and disadvantages of single and combined use. Modern fungicides and antifungal compounds IV. Proceedings of the 14th International Reinhardsbrunn Symposium 2004, BCPC, Atlon, UK, págs. 205.255.

REIVINDICACIONES

1. Un método para promover el crecimiento de una planta que comprende:

5 el tratamiento de dicha planta o semilla de dicha planta con una cantidad de una composición que comprende
fisciona derivada de *Reynoutria sachalinensis*, eficaz para promover dicho crecimiento en dicha planta o semilla;
y

10 trasplantar en el suelo dicha planta o semilla,

en el que la planta se selecciona de fresa, calabaza, pepino, tomate, rosa, pimiento, berenjena, vid, algodón,
cebolla, ajo, trigo, soja, maíz y arroz.

15 2. El método de la reivindicación 1, en el que dicha promoción del crecimiento es mediante la promoción de la
germinación de la semilla.

3. El método de la reivindicación 1, en el que la planta se trata sumergiendo la raíz de la planta en la composición.

20 4. El método de las reivindicaciones 1 o 3, en el que dicha promoción del crecimiento es mediante la promoción de la
iniciación de la raíz o de la extensión de la raíz.