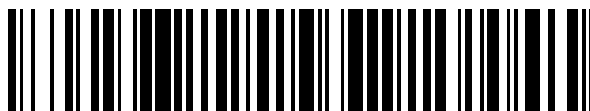


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 729 978**

51 Int. Cl.:

A01N 65/30 (2009.01)

A01N 35/06 (2006.01)

A01N 43/48 (2006.01)

A01N 43/64 (2006.01)

A01N 25/30 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.07.2010 PCT/US2010/043612**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.02.2011 WO11014596**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.07.2010 E 10805012 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.03.2019 EP 2461695**

54 Título: **Combinaciones de inhibidores de patógenos de plantas y procedimientos de uso**

30 Prioridad:

30.07.2009 US 230102 P

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

07.11.2019

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**SU, HAI;
MARRONE, PAMELA G. y
KOIVUNEN, MARJA**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 729 978 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

Combinaciones de inhibidores de patógenos de plantas y procedimientos de uso.

Campo técnico

5 En el presente documento se divulgan composiciones sinérgicas y procedimientos para modular la infección de patógenos de plantas usando un extracto de *Reynoutria sp.* que contiene el derivado de antraquinona fisiona, que induce resistencia a los fitopatógenos de las plantas, y al agente antimicrobiano azoxistrobina.

Antecedentes

Resistencia de las plantas a los patógenos de las plantas.

10 Las plantas han desarrollado mecanismos altamente efectivos para la resistencia a enfermedades causadas por agentes infecciosos, tales como bacterias, hongos y virus. Esta resistencia puede ser causada por varios mecanismos, el mejor conocido de los cuales es la resistencia sistémica adquirida (SAR; Ross, 1961; Durrant and Dong, 2004) y la resistencia sistémica inducida (ISR; van Loon et al., 1998). En el caso más simple, el inductor es el propio patógeno de la planta, en otros casos, el inductor puede ser ya sea un compuesto químico (ácido salicílico, S-metil éster del ácido benzo(1,2,3)iadiazol-7-carbotioico también conocido como BTH) o impacto físico tal como agua o el estrés por calor (Walters et al., 2005). Parece que la resistencia sistémica inducida depende de la expresión gradual y la persistencia de un bajo nivel de perturbación metabólica. A diferencia de los provocadores de la acumulación de fitoalexina, que provocan en el sitio de aplicación y pueden ser responsables de la protección localizada, los inductores de resistencia sistémica sensibilizan a la planta como un todo para responder rápidamente después de las infecciones. Estas respuestas incluyen la acumulación de fitoalexina, la lignificación y las actividades potenciadas de quitinasa y glucanasa.

20 El extracto de nudillo gigante (*Reynoutria sachalinensis*) vendido como MILSANA® y REGALIA® por Marrone Bio Innovations, Inc.) proporciona control del mildiú pulverulento y otras enfermedades de las plantas en cucurbitáceas y otros cultivos, principalmente mediante la inducción de una acumulación de compuestos fenólicos fungitoxicos en la planta (Daayf et al., 1995; Wurms et al. 1999; Schmitt, 2002). Recientemente, el extracto de nudillo gigante formulado también ha demostrado una gran eficacia en la inducción de resistencia en diversos cultivos y patógenos de plantas, incluido el mildiú pulverulento del trigo (Vechet et al., 2009). Además del modo de acción ISR, recientemente se ha demostrado que el extracto de *R. sachalinensis* formulado tiene un efecto fungistático directo contra el mildiú pulverulento del trigo (*Blumeria graminis* f. Sp. Tritici; Randoux et al., 2008).

Resistencia fungicida

30 La resistencia a los fungicidas es un fenómeno común en las plagas, incluidos los patógenos de las plantas. Cuando un fungicida, especialmente aquellos con un modo de acción en un solo sitio, se usa con frecuencia, el patógeno específico puede adaptarse al fungicida debido a la alta presión de selección. Se estima que las plagas pueden desarrollar resistencia a los pesticidas dentro de 5 a 50 generaciones (mayo de 1985). La mayoría de los patógenos de las plantas encajan en este intervalo en una temporada de crecimiento y, por lo tanto, pueden desarrollar resistencia a los fungicidas rápidamente. Por ejemplo, solo tomó un año para que Benomyl perdiera eficacia para el control del mildiú pulverulento de cucurbitáceas después de su primer registro para uso comercial (McGrath, 2001).

40 Los inhibidores externos de quinona (también conocidos como fungicidas QoI o estrobilurinas) se han usado ampliamente para controlar patógenos fúngicos de importancia agrícola desde su introducción en 1996. Las estrobilurinas bloquean la vía respiratoria mediante la inhibición del complejo citocromo bc1 en la mitocondria, bloqueando así el proceso de transferencia de electrones en la cadena de respiración y causando una deficiencia de energía debido a la falta de trifosfato de adenosina (ATP) (Bartlett et al., 2002). Las estrobilurinas y otros fungicidas con un modo de acción en un solo sitio, tal como los inhibidores de la desmetilación (DMI), son propensos al desarrollo de resistencia entre los patógenos de las plantas. Hasta la fecha, varios hongos patógenos de plantas han desarrollado resistencia de campo a las estrobilurinas (Tuttle McGrath, 2003; Fraaije et al., 2003) y fungicidas DMI (Schnabel et al., 2004), y se ha realizado un esfuerzo considerable en todo el mundo para desarrollar estrategias adecuadas de gestión de la resistencia con recomendaciones detalladas sobre cómo combinar fungicidas y otros compuestos antimicóticos en programas y rotaciones para minimizar el riesgo de desarrollo de resistencia (Tuttle McGrath, 2006; Wyenandt et al., 2009).

Procedimientos para controlar la resistencia a los fungicidas.

50 La estrategia más común para controlar la resistencia a los fungicidas es usar fungicidas específicos del sitio que son propensos al desarrollo de la resistencia en una combinación (premezcla o mezcla en tanque). Además e la gestión de la resistencia, las mezclas en tanque también ofrecen un mecanismo compensatorio en caso de falla de un fungicida, así como una forma de reducir la dosis para reducir la presión de selección en patógenos (van den Bosch and Gilligan, 2008). En algunos casos, la combinación de fungicidas simples y multisitio en una mezcla en tanque o en rotación puede proporcionar interacciones aditivas o incluso sinérgicas (Gisi, 1996). Holb and Schnabel (2008) pudieron demostrar un mejor control de la podredumbre parda (*Monilinia fructicola*) en un estudio de campo

con una mezcla en tanque de un fungicida DMI y azufre elemental, y Reuveni (2001) demostró los beneficios de usar estrobilurinas y polioxina B fungicidas en combinación con azufre para controlar el mildiú pulverulento en las nectarinas.

5 Los inductores de defensa vegetal, tal como el extracto de *R. sachalinensis*, se han probado en mezclas en tanque y rotaciones con otros productos SAR/ISR, así como con agentes de control biológico (BCA) (Hafez et al., 1999; Belanger and Benyagoub, 1997; Schmitt et al., 2002; Schmitt and 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 control biológico. Konstatinidou-Doltsinis et al. (2007) probaron el producto de *R. sachalinensis* en rotación con el producto *Pseudozyma flocculosa* contra el mildiú pulverulento en las uvas, y encontraron que la aplicación alternada de ambos productos mejoró la eficacia de *R. sachalinensis*. En el mismo estudio, la alternancia de azufre y *R. sachalinensis* en una rotación no tuvo un efecto beneficioso. Belanger and Benyagoub (1997) encontraron que un hongo similar a la levadura, *Pseudozyma flocculosa*, era compatible con *R. sachalinensis* cuando se usaba contra el mildiú pulverulento de pepino en un invernadero. Del mismo modo, Bokshi et al. (2008) evaluaron el efecto combinado de un activador de resistencia sistémica benzotiadiazol y MILS ANA® contra el mildiú pulverulento del pepino, y encontraron que el uso de MILSANA® en una rotación con benzotiadiazol proporcionó una medida de control eficaz contra el mildiú pulverulento en el campo. Sin embargo, como base en la gravedad de la enfermedad y los datos de rendimiento recopilados, no fue posible determinar si el efecto positivo fue aditivo o sinérgico.

20 La sinergia de pesticidas se ha definido como "la acción simultánea de dos o más compuestos en los que la respuesta total de un organismo a la combinación de pesticidas es mayor que la suma de los componentes individuales" (Nash, 1981). Por lo tanto, cuando los fungicidas interactúan de forma sinérgica, se logra un alto nivel de control de la enfermedad con tasas de etiquetado inferiores a cada fungicida individual. Usualmente, el mejor efecto se logra con combinaciones de fungicidas con diferentes modos de acción (MOA), pero también se ha demostrado la sinergia en el uso combinado de productos con un modo de acción similar (De Waard, 1996). La sinergia con fungicidas se ha demostrado principalmente en estudios de laboratorio (Samoucha and Cohen, 1984; Gisi, 1996) pero en algunos casos (Karaoglanis and Karadimos, 2006; Burpee and Latin, 2008) también se ha encontrado sinergia en los estudios de campo. Adicionalmente, se ha demostrado la sinergia de compuestos antifúngicos distintos de los fungicidas (bicarbonatos y destilado de petróleo refinado) contra el mildiú pulverulento y la mancha negra (Horst et al., 1992).

30 **Sumario**

Se divulga y reivindica una composición sinérgica que comprende: (a) un extracto derivado de la planta *Reynoutria sp.* en la que dicho extracto contiene fisiona que induce resistencia de las plantas a los fitopatógenos (también conocidos como "patógenos de las plantas") y (b) azoxistrobina.

35 La composición comprende (a) un extracto derivado de *Reynoutria sp.* (por ejemplo, *Reynoutria sachalinensis*) y (b) un fungicida de un solo sitio y/o un fungicida de múltiples sitios que es la azoxistrobina.

La invención está dirigida a una composición sinérgica que comprende (a) un extracto de *Reynoutria sp.* derivado de una planta, en la que dicha planta contiene el derivado de antraquinona fisiona que induce la resistencia de la planta a los fitopatógenos y (b) un agente antimicrobiano (por ejemplo, un agente antifúngico y/o antibacteriano), que es la azoxistrobina.

40 La invención está dirigida además a un procedimiento para modular la infección fitopatógena en una planta que comprende aplicar a la planta y/o las semillas de la misma y/o al sustrato utilizado para hacer crecer dicha planta una cantidad de las composiciones de la presente invención expuestas anteriormente efectivas para modular dicha infección fitopatógena.

45 En una realización particular, la invención está dirigida a un procedimiento para modular la infección fúngica y/o bacteriana en una planta que comprende aplicar a la planta y/o semillas de la misma y/o al sustrato usado para hacer crecer dicha planta una cantidad de las composiciones de la presente invención efectiva para modular dicha infección fúngica y/o bacteriana.

50 El extracto y dicha azoxistrobina pueden administrarse secuencialmente, concurrentemente o en combinación intermitentemente. Como se define en este documento, "infección fitopatógena" significa infección de una planta por bacterias patógenas de plantas, hongos, insectos, nematodos y/o moluscos.

Descripción detallada de realizaciones específicas

55 Cuando se proporciona un intervalo de valores, se entiende que cada valor intermedio, a la décima parte de la unidad del límite inferior, a menos que el contexto indique claramente otra cosa, entre el límite superior e inferior de ese intervalo y cualquier otro valor declarado o intermedio en el 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 dentro de la invención, sujetos a cualquier límite específicamente excluido

en el intervalo establecido. Cuando el intervalo indicado incluye uno o ambos límites, los intervalos que excluyen ambos límites incluidos también se incluyen en la invención.

A menos que se defina otra cosa, todos los términos técnicos y científicos utilizados en este documento tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto en la técnica a la que pertenece esta invención. Aunque cualquier procedimiento y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento también se pueden usar en la práctica o prueba de la presente invención, ahora se describen los procedimientos y materiales preferidos.

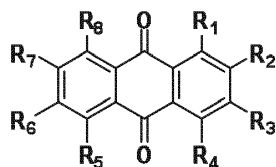
Debe observarse que, tal como se utiliza en el presente documento y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un, uno, una", "y" y "el, la" incluyen referencias plurales a menos que el contexto indique claramente otra cosa. Por ejemplo, "un hongo" también abarca "hongos".

Como se define aquí, el término "modular" se usa para significar que se altera la cantidad de infección fitopatógena o la tasa de diseminación de la infección fitopatógena.

Extractos

Los extractos de plantas utilizados en las combinaciones, composiciones y procedimientos de la presente invención contienen derivados de antraquinona como productos agrícolas bioquímicos para usar contra plagas de plantas, particularmente fitopatógenos de plantas tales como bacterias patógenas de plantas, hongos, insectos, nematodos y/o como un moluscicida. "Contener" también abarca extractos que producen dichos derivados de antraquinona. En una realización particular, los derivados de antraquinona de la presente invención que se usan en composiciones y procedimientos de la presente invención son los principales ingredientes activos o uno de los principales ingredientes activos.

Los derivados de antraquinona incluyen, pero no se limitan a, fisciona, emodina, crisofanol, ventiloquinona, glicósido de emodina, glicósido de crisofanol, glucósido de fisciona, 3, 4-dihidroxi-1-metoxi-antraquinona-2-corboxaldehído, damacantal. Estos derivados comparten una estructura similar a la siguiente:



En la que R1, R2, R3, R4, R5, R6, R7 y R8 son grupos hidrógeno, hidroxilo, hidroxilalquilo, halógeno, carboxilo, alquilo, alcoxilo, alquenilo, alqueniloxilo, alquinilo, alquiniloxilo, heterociclilo, aromático o arilo, azúcares tales como glucosa. La divulgación está dirigida a los derivados de antraquinona que están contenidos en extractos derivados de la familia de plantas Polygonaceae. Estos compuestos pueden ser de cualquier parte de las plantas, tales como hojas, tallos, cortezas, raíces y frutos. Los materiales vegetales pueden ser húmedos y secos, pero preferiblemente materiales vegetales secos. Para cumplir con los productos agrícolas bioquímicos, los disolventes y los procesos que se utilizan en la extracción y purificación deben cumplir con los requisitos del National Organic Program (NOP) [<http://www.ams.usda.gov/AMSV1.0/nop>].

El extracto de la planta se deriva de un miembro de la familia *Polygonaceae*. Como se define en este documento, "derivado de" significa directamente aislado u obtenido de una fuente particular o, alternativamente, que tiene características de identificación de una sustancia u organismo aislado u obtenido de una fuente particular. El extracto en dicha composición contiene como derivado de antraquinona fisciona y opcionalmente emodina. Los miembros de la familia *Polygonaceae* incluyen, pero no se limitan a, *Acetosella*, *Antigonon*, *Aristocapsa*, *Bilderdykia*, *Brunnichia*, *Centrostegia*, *Chorizanthe*, *Coccoloba*, *Coccolobis*, *Coccolobo*, *Corculum*, *Dedeckera*, *Delopyrum*, *Dentoceras*, *Dodecahema*, *Emex*, *Eriogonum*, *Fafopyrum*, *Fagopyrum*, *Fallopia*, *Gilmania*, *Goodmania*, *Harfordia*, *Hollisteria*, *Koenigia*, *Lastarriaea*, *Mucronea*, *Muehlenbeckia*, *Nemacaulis*, *Oxyria*, *Oxytheca*, *Perscarioa*, *Persicaria*, *Pleuropterus*, *Podopterus*, *Polygonella*, *Polygonum*, *Pterostegia*, *Rheum*, *Rumex*, *Ruprechtia*, *Stenogonum*, *Systenotheca*, *Thysanella*, *Tovara*, *Tracaulon*, *Triplaris*. El extracto se deriva de una *Reynoutria* (alternativamente denominada *Fallopia*) sp. En una realización más particular, el extracto se deriva de *Reynoutria sachalinensis*.

Agentes anti-fitopatógenos

El extracto formulado (tal como los productos comercializados con los nombres comerciales REGALIA® y MILSANA®) se puede usar en combinación con otros extractos de plantas de agentes anti-fitopatógenos, bioplaguicidas, protectores inorgánicos de cultivos (tal como el cobre), tensioactivos (tal como los ramnolípidos; Gandhi et al., 2007) o aceites naturales tal como el aceite parafínico y el aceite de árbol del té que poseen propiedades pesticidas o fungicidas químicos o bactericidas ya sea con un modo de acción en un solo sitio, multisitio o desconocido. Como se define aquí, un "agente anti-fitopatógeno" es un agente que modula el crecimiento de un patógeno de la planta en una planta o, alternativamente, previene la infección de una planta por un patógeno de la

planta. Un patógeno de la planta incluye, pero no se limita a, hongos, bacterias, virus, insectos, nematodos y/o moluscos.

En una realización particular, el agente anti-fitopatógeno es un biopesticida denominado alternativamente como un agente de control biológico. Este agente de control biológico es en una realización más particular un agente de control biológico no *Bacillus*, no *Pseudomonas*, no *Brevibacillus*, no *Lecanicillium*, no *Ampelomyces*, no *Phoma*, no *Pseudozyma*, es un agente derivado de *Streptomyces sp.*, *Burkholderia sp.*, *Trichoderma sp.*, *Gliocladium sp.* Alternativamente, el agente es un aceite natural o producto de aceite que tiene actividad fungicida y/o insecticida (por ejemplo, aceite parafínico, aceite de árbol de té, aceite de limoncillo, aceite de clavo, aceite de canela, aceite de cítricos, aceite de romero).

Como se señaló anteriormente, el agente anti-fitopatógeno es un agente antifúngico de un solo sitio y es la azoxistrobina.

Usos

El dicho extracto de planta o producto formulado se puede usar simultáneamente con el otro componente o componentes en una mezcla en tanque o en un programa (aplicación secuencial llamada rotación) con un orden predeterminado e intervalo de aplicación durante la temporada de crecimiento. Cuando se usa en combinación con los productos pesticidas mencionados anteriormente, a una concentración inferior a la recomendada en la etiqueta del producto, la eficacia combinada de los dos o más productos (uno de los cuales es dicho extracto vegetal) es mayor que el efecto agregado de cada componente individual juntos. Por lo tanto, el efecto pesticida es potenciado por la sinergia entre estos dos (o más) productos, y se reduce el riesgo de desarrollo de resistencia a los pesticidas entre las cepas patógenas de las plantas.

Las plantas objetivo a proteger dentro del alcance de la presente invención comprenden, por ejemplo, las siguientes especies de plantas: cereales (trigo, cebada, centeno, avena, arroz, sorgo y cultivos relacionados), remolacha (remolacha azucarera y remolacha forrajera), pomelos y frutas blandas (manzanas, peras, ciruelas, melocotones, almendras, cerezas, fresas, frambuesas y moras), plantas leguminosas (frijoles, lentejas, guisantes y frijoles de soja), plantas oleaginosas (plantas de colza, mostaza, amapola, oliva, girasol, coco, aceite de ricino, granos de cacao y nueces molidas), cucurbitáceas (pepino, melones, calabazas, berenjenas), plantas de fibra (algodón, lino, cáñamo y yute), cítricos (naranjas, limón, pomelos y mandarinas), hortalizas (espinaca, lechuga, espárragos, coles, zanahorias, cebollas, tomates, patatas y paprika), lauráceas (aguacates, canela y alcanfor) o plantas tales como maíz, tabaco, nueces, café, caña de azúcar, té, viñas, lúpulos, bananas y plantas de caucho natural, así como ornamentales (composites), áreas de pasto o cultivos cobertura en general baja que contrarrestan la erosión o la desecación del suelo y son útiles en cultivos de árboles y plantas perennes (plantaciones frutales, plantaciones de lúpulo, campos de maíz, viñedos, etc.).

El procedimiento preferido para aplicar composiciones en la presente invención es una aplicación foliar (aspersión, atomización, espolvoreo, dispersión o vertido) con o sin un vehículo. El número de aplicaciones y la tasa de aplicación dependen del riesgo de infestación por un patógeno. Por ejemplo, los tratamientos pesticidas foliares con combinaciones y mezclas cubiertas en esta patente se pueden realizar una vez cada 7 a 14 días a tasas de 25 a 10.000 veces más bajas que las recomendadas en la etiqueta del producto. Las mezclas de productos y las composiciones a las que se dirige la presente invención también pueden aplicarse a las semillas impregnando las semillas con una formulación líquida que contiene el ingrediente activo o recubriéndolas con una formulación sólida. En casos especiales, también son posibles otros tipos de aplicación. Estos incluyen empapamiento de suelo o tratamiento selectivo de tallos o brotes de plantas.

Las mezclas de la presente invención y, cuando sea apropiado, un adyuvante sólido o líquido se preparan de manera conocida. Por ejemplo, las mezclas pueden prepararse mezclando y/o moliendo homogéneamente los ingredientes activos con expansores tales como disolventes, vehículos sólidos y, cuando sea apropiado, compuestos con actividad de superficie (tensioactivos). Las composiciones también pueden contener ingredientes adicionales tales como estabilizadores, reguladores de la viscosidad, aglutinantes, adyuvantes, así como fertilizantes u otros ingredientes activos con el fin de obtener efectos especiales.

Ejemplos

Como se expondrá más adelante, en satisfacción de los objetos y ventajas anteriores, ejemplos de procedimientos para aumentar la eficacia de dos o más productos usándolos a tasas que producen efectos sinérgicos. Las composiciones y los procedimientos aquí descritos han demostrado su eficacia en la reducción de la incidencia y la gravedad de la enfermedad en pepinos cultivados en invernadero (*Cucumis sativus*), pero el concepto se puede usar de manera efectiva para otras variedades y especies de plantas. Las composiciones y los procedimientos son particularmente efectivos contra el mildiú pulverulento del pepino, pero pueden aplicarse a otras enfermedades fúngicas, bacterianas y virales, tales como el moho gris, manchas foliares, marchitamiento bacteriano, costra, antracnosis, virus del mosaico del tabaco, etc.

Materiales y procedimientos**Mildiú pulverulento (Ejemplos I-V y X-XI)**

Los estudios se realizaron en un invernadero. El diseño experimental de los estudios para el sinergismo siguió al de Burpee and Latin (2008). El mildiú pulverulento, causado por *Sphaerotheca fuliginea*, se utilizó para investigar la eficacia de los tratamientos.

Semillas de pepino cv. "SMR 58" (Irwin & Sons Ag Supply, Inc. Cheshire, OR) se cultivaron en macetas de plástico de 10,16 centímetros con mezcla de tierra para macetas (Rod McLellan Company, Marysville, OH). Las plantas fueron tratadas en el estado de 2 hojas verdaderas. Los compuestos a diversas tasas se asperjaron con un rociador de niebla de 2 oz a 2 ml por planta en el lado superior y 1 ml en el lado inferior de las hojas. Las plantas tratadas se dejaron durante 3-4 horas bajo luz fluorescente para que se secaran antes de la inoculación.

Se preparó una suspensión de conidios de *Sphaerotheca fuliginea*, el agente causal de la enfermedad del mildiú pulverulento en el pepino, cortando las hojas de las plantas de pepino que sirven para la conservación del inóculo. La suspensión se ajustó a $2,0 \times 10^5$ conidios por ml y se aplicó con un pulverizador de niebla de 2 onzas a 2 ml por planta en el lado superior de las hojas. Las plantas inoculadas se colocaron en un invernadero y los tratamientos se organizaron en bloques completos al azar con 4 a 6 repeticiones de 25 °C a 30 °C.

La gravedad de la enfermedad (porcentaje de área cubierta con colonias) de las primeras hojas se clasificó según James (1971). La gravedad de la enfermedad y el porcentaje de control se analizaron con análisis de varianza (ANOVA) y las medias de los tratamientos se compararon con la diferencia mínima protegida de Fisher (LSD) en un nivel de $p = 0,05$. El efecto sinérgico se calculó y analizó con la fórmula de Limpel (Limpel et al., 1962; Richer, 1987).

Mildiú veloso de la lechuga (Ejemplos VI-VII)

Se probó la sinergia entre MBI-106 y acibenzolar-S-metilo o mefenoxam que controlan una clase específica de patógenos **Oomycetos** con mildiú veloso de la lechuga en conformidad con Su et al, (2004).

Para preparar el inóculo de mildiú veloso, se colocaron semillas de lechuga en placas petri de 5 mm con aproximadamente 20-30 semillas en cada una y se regaron con agua estéril, luego se suministraron con $\frac{1}{2}$ concentración de la solución de Hoagland después de la germinación. Las placas de petri se colocaron en una cámara de crecimiento a 20 °C durante 7-10 días. Las esporas de *Bremia lactucae* se inocularon en cotiledones de lechuga y se cultivaron durante 7-10 días a 15 °C para que se produjera la esporulación. Los cotiledones con esporulación se cortaron y se colocaron en un tubo Falcon con agua estéril. Los cotiledones se agitaron durante 15 segundos tres veces y se filtraron a través de una malla de 100 μm para recolectar esporangios. La solución se ajustó a 0,5 a $1,0 \times 10^5$ esporas/ml por inoculación.

Se sembraron cuatro plantas de prueba en cada maceta de 5,08 centímetros y luego se colocaron a 20 °C durante 7-10 días para hacer crecer los cotiledones. Las plantas estaban listas para la prueba cuando emergía la primera hoja verdadera.

Las plantas de lechuga se trataron con los materiales y se dejaron secar o durante la noche. Luego se inocularon las plantas con solución esporangial. Los tratamientos se dispusieron en un diseño de bloques completos al azar con cuatro repeticiones. Las plantas inoculadas se colocaron en la oscuridad en la cámara de crecimiento durante 48 horas y luego se incubaron durante un período de luz de 12 horas a 15 °C. De ocho a diez días después de la inoculación, los cotiledones se clasificaron según la gravedad de la enfermedad (porcentaje de área cubierta con esporangióforos).

Tratamiento de semillas (Ejemplos VIII-IX)

Los experimentos descritos a continuación se realizaron con soja, pero se utilizan procedimientos similares con otros cultivos tales como cereales, maíz, algodón y patatas.

Los experimentos se realizaron en un invernadero en conformidad con el procedimiento desarrollado por Hwang et al. (2006). El aislado de *Rhizoctonia solani* se cultivó en placas de agar con dextrosa de patata y se cultivó durante 5 días para inocular grano de avena o trigo. Se empapó un litro de grano durante la noche a temperatura ambiente (25 °C) y se enjuagó tres veces con agua de grifo. Las bolsas de autoclave de 20,32 x 30,48 centímetros se llenaron con el grano hasta $\frac{1}{3}$ lleno se sometieron a autoclave a 121 °C durante 15 min. Luego se inoculó el grano sometido a autoclave con 5 piezas de 1x1 cm de tapón del cultivo de 5 días de *R. solani* por bolsa y se cultivó durante 5 días a temperatura ambiente (25 °C). Las bolsas se dejaron abiertas en la campana de flujo laminar para dejar que el grano se seque completamente.

La muestra de semilla en bruto de 10 g a recubrir se colocó en un matraz. El agente de recubrimiento SEPIRET® 1171-0 (Becker Underwood Ltd., Ames, IA) se colocó en los matraces junto con el compuesto de interés, y el matraz se agitó vigorosamente de tal manera que la semilla recogiera el compuesto. El procedimiento se repitió con una muestra de semilla fresca de cvs. "White Lion" (Kitazawa Seed Co., Oakland, CA) o "Viking 2265" (Johnny's Selected

Seeds, Winslow, ME) en el mismo matraz para los tratamientos. Después de que las semillas se recubrieron, se dejaron secar al aire antes de plantar.

- 5 Para preparar el suelo, se mezclaron quinientos mililitros de granos secos con inóculo durante 15 segundos tres veces y el polvo se mezcló con arena estéril a 1: 1 (v/v) para diluir el inóculo. La mezcla de arena se usó además para preparar la mezcla de suelo en diversas proporciones 1:350 a 1:800 (inóculo: suelo) para la soja para generar diversos niveles de enfermedad en pruebas repetidas.

Las semillas recubiertas se plantaron en macetas con tierra infestada. Hubo tres réplicas de cada tratamiento que se organizaron en un diseño de bloques al azar completo y se colocaron a una temperatura de 25 a 30 °C en un invernadero.

- 10 Después de 10 a 20 días, dependiendo de la presión de la enfermedad y la temperatura, se evaluó y comparó la emergencia de cada tratamiento. La biomasa se midió pesando la porción sobre el suelo que se midió para cada réplica del material vegetal.

Ejemplo I. (Referencia) Efecto sinérgico entre el extracto formulado de *R. sachalinensis* y miclobutanil (prueba I).

- 15 MBI-106 (extracto de *R. sachalinensis* formulado comercializado como REGALIA® SC por Marrone Bio Innovations, Inc., Davis, CA) diluido a 10 veces más bajo que las tasas de etiquetas de 1500 x y 2000 x y miclobutanil (formulado como RALLY® 40W, Dow AgroSciences LLC, Indianapolis, IN) a concentraciones de 0,25 ug/ml, 0,1 ug/ml y 0,05 ug/ml (450 a 2,250 veces más bajas que las tasas de etiqueta recomendadas) se aplicaron solo o en una mezcla en tanque.

- 20 La gravedad de la enfermedad se redujo significativamente en MBI-106 a 1500 x y 2000 x en combinación con miclobutanil a 0,25 ug/ml que cuando se usaron solos (Tabla 1). Se encontró un aumento significativo en la eficacia del control con la combinación de la mezcla en tanque de MBI-106 2000x con miclobutanil a tasas de 0,25 ug/ml y 0,05 ug/ml (Tabla 2).

Ejemplo II. (Referencia) Efecto sinérgico entre extracto de *R. sachalinensis* y miclobutanil (prueba II).

- 25 En una segunda prueba usando MBI-106 (formulado como REGALIA® SC) y miclobutanil (formulado como RALLY® 40W), se encontró una mayor eficacia cuando MBI-106 a una dilución de 2000x (10 veces más baja que la tasa de la etiqueta) en combinación con miclobutanil a tasas de 0,25, 0,1 y 0,05 ug/ml, y cuando el MBI-106 a 1500x se mezcló en tanque con miclobutanil a 0,05 ug/ml (Tabla 3). Se mostró un efecto sinérgico significativo cuando se combinó el MBI-106 diluido a 1500x y 2000x con miclobutanil a la tasa más baja de 0,05 ug/ml (Tabla 4).

- 30 **Ejemplo III (Referencia) Efecto sinérgico entre extracto de *R. sachalinensis* formulado y quinoxifeno**

- El MBI-106 diluido a 1500x o 2000x se aplicó solo o en combinación con quinoxifeno (formulado como QUINTEC®, Dow AgroSciences LLC, Indianapolis, IN) a 0,05 y 0,01 ug/ml (2.000 a 10.000 veces más bajo que las tasas de etiquetas) ya sea solo o en una mezcla en tanque. Los resultados se muestran en las Tablas 5 y 6. El efecto sinérgico más significativo y el mejor control de la enfermedad se encontraron en la dilución del producto de *R. sachalinensis* de 2000x con quinoxifeno a 0,01 ug/ml. El quinoxifeno tiene un nuevo modo de acción multisitio que afecta a las proteínas G en la señalización celular temprana.
- 35

Ejemplo IV. Efecto sinérgico entre el extracto de *sachalinensis* formulado y la azoxistrobina.

- El MBI-106 diluido a 1500x o 2000x se aplicó solo o en combinación con azoxistrobina (formulado como QUADRIS®, Syngenta Corporation, Wilmington, DE) a una tasa de 0,25, 0,5, 1,0, 5,0 y 10 ug/mL (25 a 1020 veces más bajo que las tasas de etiqueta recomendadas) ya sea solo o en una mezcla en tanque. Los resultados se muestran en las Tablas 7 y 8. De todas las combinaciones probadas, las mezclas con extracto de *R. sachalinensis* a una dilución de 2000x y azoxistrobina ya sea a 5,0 o 0,5 ug/ml proporcionaron la mayor sinergia, y la eficacia fungicida fue significativamente mayor de lo esperado en comparación a los datos de uso de un solo compuesto.
- 40

Ejemplo V. (Referencia) Efecto sinérgico entre el extracto de *R. sachalinensis* formulado y el triflumizol.

- 45 MBI-106 (extracto de *R. sachalinensis* formulado comercializado como REGALIA® SC por Marrone Bio Innovations, Inc., Davis, CA) a una dilución de 2500x (10 veces más baja que la tasa de la etiqueta) y triflumizol (formulado como PROCURE® 480SC, Chemtura Corporation, Middlebury, CT) a concentraciones de 1,0 ug/ml, 0,5 ug/ml y 0,25 ug/ml (150 a 600 veces más bajas que las tasas de etiqueta recomendadas) se aplicaron solos o en mezcla en tanque.

- 50 La gravedad de la enfermedad se redujo significativamente ($P < 0,0001$) en los tratamientos asperjados con MBI-106 a una dilución de 2500x en combinación con triflumizol en comparación con un tratamiento en el que se usó solo MBI-106 (Tabla 9). El efecto sinérgico en la eficacia se encontró en la combinación de mezcla en tanque de MBI-106 2500x con triflumizol a tasas de 1,0 ug/ml, 0,5 ug/ml y 0,25 ug/ml (Tabla 10).

Ejemplo VI. (Referencia) Efecto sinérgico entre el extracto de *R. sachalinensis* y acibenzolar-S-metilo en el control del mildiú veloso de la lechuga.

5 MBI-106 (extracto de *R. sachalinensis* formulado comercializado como REGALIA® SC por Marrone Bio Innovations, Inc., Davis, CA) se usó solo a una dilución de 200x o en combinación con acibenzolar-S-metilo (formulado como ACTIGARD®, cultivo Syngenta Protection, Inc., Greensboro, NC) en concentraciones de 25 ug/ml para controlar el mildiú veloso de la lechuga.

La gravedad de la enfermedad se redujo significativamente ($p = 0,0004$) en MBI-106 a una dilución de 200x en combinación con acibenzolar-S-metilo en comparación con los tratamientos en los que se utilizaron solos (Tabla 11). Existe un efecto sinérgico en la eficacia en la mezcla en tanque de MBI-106 200x y acibenzolar-S-metilo (Tabla 12).

10 **Ejemplo VII. (Referencia) Efecto sinérgico entre el extracto de *R. sachalinensis* y el mefenoxam en el control del mildiú veloso de la lechuga.**

15 Para investigar el efecto sinérgico de Reynoutria y MBI-106, el producto REGALIA® ME formulado por Marrone Bio Innovations, Inc., Davis, CA se usó a una tasa de dilución de 400x en combinación con mefenoxam (formulado como RIDOMIL GOLD®, Syngenta Crop Protection, Inc., Greensboro, NC) a concentraciones de 37,5 µg/ml, 75,0 µg/ml y 150 µg/ml para controlar el mildiú veloso de la lechuga.

La gravedad de la enfermedad se redujo significativamente ($p < 0,0001$) en MBI-106 a una dilución de 400x en combinación con mefenoxam en comparación con los tratamientos en los que se utilizaron solos en cada concentración (Tabla 13). El efecto sinérgico en la eficacia de la mezcla en tanque de MBI-106 200x y mefenoxam se encontró en combinaciones de MBI-106 y cada concentración de mefenoxam (Tabla 14).

20 **Ejemplo VIII. Extracto de *R. sachalinensis* como agente de tratamiento de semillas y su sinergia con azoxistrobin en el control de *Rhizoctonia solani*.**

Reynoutria sachalinensis se extrajo con etanol al 5 % (p/p) y se usó para el recubrimiento de semillas a 0,2117 g/kg de semillas, ya sea solo o en combinación con azoxistrobina (QUADRIS®, Syngenta Crop Protection, Inc., Greensboro, NC) a 0,0298 Semilla de g/kg para controlar *Rhizoctonia solanion* en la soja.

25 La tasa de emergencia fue mayor en las semillas inoculadas tratadas con MBI-106 en comparación con el control no tratado inoculado, y cuando se usó en combinación con azoxistrobina, la tasa de emergencia fue mayor que cuando se usó cualquier producto solo (Tabla 15). Se encontró un efecto sinérgico cuando ambos materiales se utilizaron en combinación (Tabla 16).

30 **Ejemplo IX. (Referencia) Extracto de *R. sachalinensis* como agente de tratamiento de semillas y sinergia con fludioxonil en el control de *Rhizoctonia solani*.**

35 El extracto de etanol de *R. sachalinensis* también se usó a una tasa de 0,03175 g/kg de semilla y 0,635 g/kg de semilla para el recubrimiento de semillas, ya sea solo o en combinación con fludioxonil (formulado como Scholar® por Syngenta Crop Protection, Inc., Greensboro, NC) para controlar *Rhizoctonia solani* en soja. Las tasas de emergencia y la biomasa fueron más altas en las semillas tratadas con MBI-106 en comparación con el control no tratado inoculado y también más altas cuando se usaron en combinación con fludioxonil a una tasa de 0,0596 g/kg de semilla (Tabla 17). El efecto sinérgico se encontró en las dos tasas de MBI-106 cuando se usó en combinación con fludioxonil (Tabla 18).

Ejemplo X. (Referencia) Efecto sinérgico entre el extracto de *R. sachalinensis* formulado y propiconazol en el control del mildiú pulverulento del pepino.

40 MBI-106 (extracto de *R. sachalinensis* formulado comercializado como PEGALIA® ME por Marrone Bio Innovations, Inc., Davis, CA) a dilución 2500x y propiconazol (formulado como PROPIMAX® EC, Dow AgroSciences LLC, Indianapolis, IN) a concentraciones de 1,0 ug/ml se aplicaron solos o en mezcla en tanque.

45 La gravedad de la enfermedad se redujo significativamente ($P < 0,0001$) en los tratamientos asperjados con MBI-106 a una dilución de 2500x en combinación con propiconazol (Tabla 19). Existe un efecto sinérgico en la eficacia del control en la combinación de mezcla en tanque de MBI-106 2500x con propiconazol (Tabla 20).

Ejemplo XI. (Referencia) Efecto sinérgico entre el extracto de *R. sachalinensis* y el quinoxifeno (Prueba II) para controlar el mildiú pulverulento del pepino.

50 MBI-106 (extracto de *R. sachalinensis* formulado comercializado como REGALIA® SC por Marrone Bio Innovations, Inc., Davis, CA) se usó solo a una dilución de 2000x o en combinación con azoxistrobina en tres concentraciones 0,5, 0,25 y 0,1ug/ml para controlar el mildiú pulverulento del pepino.

La eficacia del control en MBI-106 a una dilución de 2000x en combinación con tratamientos con azoxistrobina es mayor que en el uso solo (Tabla 21). El efecto sinérgico en la eficacia de control de la mezcla en tanque de MBI-106 2000x existe en combinaciones de MBI-106 y cada concentración de azoxistrobina (Tabla 22).

ES 2 729 978 T3

Tablas

Tabla 1. Gravedad de la enfermedad y control de porcentaje de MBI-106 y miclobutanil (RALLY® 40W) cuando se usa solo o en mezcla en tanque.¹(Referencia)

Tratamiento	Dilución/Tasa	Gravedad (%) ^z		Control (%)	
Control no tratado	N/A	98,3	a	0,0	e
miclobutanil	0,25 ug/ml	16,7	cd	83,1	bc
miclobutanil	0,1 ug/ml	95,0	a	3,2	e
miclobutanil	0,05 ug/ml	95,8	a	2,5	e
Extracto de Reynoutria	1500x	15,8	cd	84,0	bc
Extracto de Reynoutria	2000x	35,8	b	63,5	d
Extracto de Reynoutria + miclobutanil	1500x 0,25 ug/ml	1,2	e	98,8	a
Extracto de Reynoutria + miclobutanil	2000x 0,25 ug/ml	0,2	e	99,8	a
Extracto de Reynoutria + miclobutanil	1500x 0,1 ug/ml	11,8	de	87,9	ab
Extracto de Reynoutria + miclobutanil	2000x 0,1 ug/ml	27,5	bc	72,2	dc
Extracto de Reynoutria + miclobutanil	1500x 0,05 ug/ml	17,5	cd	82,4	bc
Extracto de Reynoutria + miclobutanil	2000x 0,05 ug/ml	20,8	cd	79,0	bc
		P<0,0001		P<0,0001	
1 Los datos en la columna 3 (Gravedad (%)) son medias de seis repeticiones. Las medias con la misma letra en una columna no son significativamente diferentes de acuerdo con la Diferencia Menos Significativa Protegida (LSD) de Fisher a un nivel P = 0,05.					

5 Tabla 2. Eficacia esperada (Ee)² de cada combinación de productos, y la significación estadística de la sinergia detectada entre MBI-106 (REGALIA®SC) y miclobutanil (RALLY® 40W) (Referencia)

Tratamiento	Dilución/Tasa	Control (%)	Ee ³	T-test
Extracto de Reynoutria + miclobutanil	1500x 0,25 ug/ml	98,8	97,3	n.s.
Extracto de Reynoutria + miclobutanil	2000x 0,25 ug/ml	99,8	93,8	***
Extracto de Reynoutria + miclobutanil	1500x 0,1 ug/ml	87,9	84,5	n.s.
Extracto de Reynoutria +miclobutanil	2000x 0,1 ug/ml	72,2	64,7	n.s. ⁴
Extracto de Reynoutria + miclobutanil	1500x 0,05 ug/ml	82,4	84,4	n.s.

ES 2 729 978 T3

(continuación)

Tratamiento	Dilución/Tasa	Control (%)	E _e ³	T-test
Extracto de Reynoutria + miclobutanil	2000x 0,05 ug/ml	79,0	64,4	* ⁵
² E _e es la Eficacia esperada y se determina con la fórmula de Limpel $E_e = X + Y - (XY)/100$ (Limpel et al., 1962; Richer, 1987). ³ Los datos son medias de seis réplicas. Las medias con la misma letra en una columna no son significativamente diferentes de acuerdo con la Diferencia Menos Significativa Protegida (LSD) de Fisher a un nivel P = 0,05. ⁴ n.s.: No significativo ⁵ * y ***: Significativo en P <0,05 y 0,001 respectivamente.				

Tabla 3. Gravedad de la enfermedad y control de porcentaje de MBI-106 (REGALIA® SC) y miclobutanil (RALLY® 40W) cuando se usa solo o en mezcla en tanque en una prueba repetida. (Referencia)

Tratamiento	Dilución/Tasa	Gravedad (%) ⁶	Control (%)
Control no tratado	N/A	91,3 a	0,0 e
miclobutanil	0,25 ug/ml	53,8 bcd	41,3 dc
miclobutanil	0,1 ug/ml	80,0 ab	12,2 de
miclobutanil	0,05 ug/ml	93,8 a	-2,8 e
Extracto de Reynoutria	1500x	20,0 ef	77,9 ab
Extracto de Reynoutria	2000x	63,8 abc	29,8 cde
Extracto de Reynoutria + miclobutanil	1500x 0,25 ug/ml	46,3 cde	48,8 bc
Extracto de Reynoutria + miclobutanil	2000x 0,25 ug/ml	33,8 cdef	62,7 bc
Extracto de Reynoutria + miclobutanil	1500x 0,1 ug/ml	33,8 cdef	62,6 bc
Extracto de Reynoutria + miclobutanil	2000x 0,1 ug/ml	38,8 cde	57,3 bc
Extracto de Reynoutria + miclobutanil	1500x 0,05 ug/ml	1,8 f	98,1 a
Extracto de Reynoutria + miclobutanil	2000x 0,05 ug/ml	21,3 def	77,0 ab
		P<0,0001	P<0,0001
⁶ Los datos son medias de cuatro repeticiones. Las medias con la misma letra en una columna no son significativamente diferentes de acuerdo con la Diferencia Menos Significativa Protegida (LSD) de Fisher a un nivel P = 0,05.			

Tabla 4. Efecto sinérgico entre MBI-106 (REGALIA® SC) y miclobutanil (RALLY® 40W) en una prueba repetida. (Referencia)

Tratamiento	Dilución/Tasa	Control (%)	E _e ^z	T test
Extracto de Reynoutria + miclobutanil	1500× 0,25 ug/ml	48,8	87,0	n.s.
Extracto de Reynoutria + miclobutanil	2000× 0,25 ug/ml	62,7	58,8	n.s.
Extracto de Reynoutria + miclobutanil	1500× 0,1 ug/ml	62,6	80,6	n.s.
Extracto de Reynoutria + miclobutanil	2000× 0,1 ug/ml	57,3	38,3	n.s.
Extracto de Reynoutria + miclobutanil	1500× 0,05 ug/ml	98,1	77,3	***
Extracto de Reynoutria + miclobutanil	2000× 0,05 ug/ml	77,0	27,8	**

^zE_e es la Eficacia esperada y se determina con la fórmula de Limpel $E_e = X + Y - (XY)/100$ (Limpel et al., 1962; Richer, 1987).

** y ***: Significativo en P <0,01 y 0,001 respectivamente.

n.s. : No significativo

5

Tabla 5. Gravedad de la enfermedad y control de porcentaje de MBI-106 (extracto de *R. sachalinensis* formulado) y quinoxifeno (QUINTEC®) cuando se usa solo o en una mezcla en tanque (Referencia)

Tratamiento	Dilución/Tasa	Gravedad (%)	Control (%)
Control no tratado	N/A	91,3 a	0
Extracto de Reynoutria	1500×	20,0 c	77,93
Extracto de Reynoutria	2000×	63,8 b	29,75
quinoxifeno	0,05 ug/ml	30,0 c	66,95
quinoxifeno	0,01 ug/ml	90,0 a	1,33
Extracto de Reynoutria + quinoxifeno	1500× 0,05 ug/ml	25,0 c	72,65
Extracto de Reynoutria + quinoxifeno	2000× 0,05 ug/ml	12,5 c	86,25
Extracto de Reynoutria + quinoxifeno	1500× 0,01 ug/ml	22,5 c	75,28
Extracto de Reynoutria + quinoxifeno	2000× 0,01 ug/ml	13,8 c	85,1
n=4, LSD		P<0,0001	P<0,0001

Los datos son medias de cuatro repeticiones. Las medias con la misma letra en una columna no son significativamente diferentes de acuerdo con la Diferencia Menos Significativa Protegida (LSD) de Fisher a un nivel P = 0,05.

Tabla 6. Efecto sinérgico entre MBI-106 (extracto de Reynoutria, REGALIA® SC) y quinoxifeno (QUINTEC®) (Referencia)

Tratamiento	Dilución/Tasa	Control (%)	E _e	T- test
Extracto de Reynoutria + quinoxifeno	1500x 0,05 ug/ml	72,65	92,7	*
Extracto de Reynoutria + quinoxifeno	2000x 0,05 ug/ml	86,25	76,8	n.s.
Extracto de Reynoutria+ quinoxifeno	1500x 0,01 ug/ml	75,28	78,2	n.s.
Extracto de Reynoutria + quinoxifeno	2000x 0,01 ug/ml	85,1	30,7	**

²E_e es la eficacia esperada y se determina con la fórmula de Limpel $E_e = X + Y - (XY)/100$ (Limpel et al., 1962; Richer, 1987).

* y **: Significativo en P <0,05 y 0,01 respectivamente.

n.s. : No significativo.

5

Tabla 7. Gravedad de la enfermedad y control del porcentaje de mildiu pulverulento utilizando MBI-106 (extracto de *R. sachalinensis*, REGALIA® SC) y azoxistrobin (QUADRIS®).

Tratamiento	Dilución/Tasa	Gravedad (%)	Control (%)
Control no tratado	N/A	92,5 a	0,0 h
azoxistrobin	10,0 ug/ml	11,3 efg	87,6 abc
azoxistrobin	5,0 ug/ml	5,3 fg	94,3 ab
azoxistrobin	1,0 ug/ml	30,0 cdef	68,1 bcdef
azoxistrobin	0,5 ug/ml	48,8 bc	48,0 fg
azoxistrobin	0,25 ug/ml	45,0 bcd	51,8 efg
Extracto de Reynoutria	1500x	11,3 efg	88,0 abc
Extracto de Reynoutria	2000x	61,3 b	34,3 g
Extracto de Reynoutria	2500x	48,8 bc	47,0 fg
Extracto de Reynoutria + azoxistrobin	1500x 10,0 ug/ml	3,0 fg	96,8 ab
Extracto de Reynoutria + azoxistrobin	2000x 10,0 ug/ml	4,0 fg	95,6 ab
Extracto de Reynoutria + azoxistrobin	2500x 10,0 ug/ml	1,8 fg	98,1 ab
Extracto de Reynoutria + azoxistrobin	1500x 5,0 ug/ml	1,0 g	98,9 ab
Extracto de Reynoutria + azoxistrobin	2000x 5,0 ug/ml	0,8 g	99,2 a
Extracto de Reynoutria + azoxistrobin	2500x 5,0 ug/ml	2,0 fg	97,9 ab

Tratamiento	Dilución/Tasa	Gravedad (%)		Control (%)	
Extracto de Reynoutria + azoxistrobin	1500x 1,0 ug/ml	11,3	efg	87,6	abc
Extracto de Reynoutria + azoxistrobin	2000x 1,0 ug/ml	12,5	efg	86,3	abcd
Extracto de Reynoutria + azoxistrobin	2500x 1,0 ug/ml	25,0	cdefg	73,4	abcdef
Extracto de Reynoutria + azoxistrobin	1500x 0,5 ug/ml	16,3	defg	82,2	abcde
Extracto de Reynoutria + azoxistrobin	2000x 0,5 ug/ml	11,3	efg	87,7	abc
Extracto de Reynoutria + azoxistrobin	2500x 0,5 ug/ml	43,8	bcd	52,1	efg
Extracto de Reynoutria + azoxistrobin	1500x 0,25 ug/ml	40,0	bcde	56,4	defg
Extracto de Reynoutria + azoxistrobin	2000x 0,25 ug/ml	25,0	cdefg	73,0	abcdef
Extracto de Reynoutria + azoxistrobin	2500x 0,25 ug/ml	36,3	bcde	60,5	cdefg
N=4		P<0,0001		P<0,0001	

Tabla 8. Efecto sinérgico entre MBI-106 y azoxistrobina. Sólo se incluyen los tratamientos con efecto sinérgico estadísticamente significativo.

Tratamiento	Tasa/Dilution	Control (%)	E _e	Prueba T
Extracto de Reynoutria + azoxistrobin	2000x 10,0 ug/ml	95,6	91,9	*
Extracto de Reynoutria + azoxistrobin	2500x 10,0 ug/ml	98,1	93,4	*
Extracto de Reynoutria + azoxistrobin	2000x 5,0 ug/ml	99,2	96,3	**
Extracto de Reynoutria + azoxistrobin	2000x 0,5 ug/ml	87,7	65,8	**

5 Tabla 9. Gravedad de la enfermedad y control de porcentaje de *R. sachalinensis* y triflumizol (PROCURE® 480SC) cuando se usa solo o en una mezcla en tanque. (Referencia)

Tratamiento	Dilución/Tasa	Gravedad (%)		Control (%)
Control no tratado	N/A	97,5	a	0,0
Extracto de Reynoutria	2500x	23,8	b	75,6
triflumizol	1,0 ug/ml	77,5	a	20,5
triflumizol	0,5 ug/ml	86,3	a	11,5
triflumizol	0,25 ug/ml	95,0	a	2,6
Extracto de Reynoutria + triflumizol	2500x 1,0 ug/ml	6,3	b	93,6

(continuación)

Tratamiento	Dilución/Tasa	Gravedad (%)	Control (%)	Tratamiento
Extracto de Reynoutria + triflumizol	2500x 0,5 ug/ml	15,0	b	84,6
Extracto de Reynoutria + triflumizol	2500x 0,25 ug/ml	11,5	b	88,2

Los datos en la columna 3 (Gravedad (%)) son medias de cuatro repeticiones. Las medias con la misma letra en una columna no son significativamente diferentes de acuerdo con la Diferencia Menos Significativa Protegida (LSD) de Fisher a un nivel P = 0,05.

Tabla 10. La eficacia esperada (E_e) de cada combinación de producto, la eficacia de control (E) y el efecto sinérgico (E/E_e > 1,0) entre MBI-106 (REGALIA® SC) y triflumizol (PROCURE® 480SC). (Referencia)

Mezcla en tanque	Dilución/Tasa	Control (%)	E _e	E/E _e
Extracto de Reynoutria + triflumizol	2500x 1,0 ug/ml	93,6	80,6	1,2
Extracto de Reynoutria + triflumizol	2500x 0,5 ug/ml	84,6	78,4	1,1
Extracto de Reynoutria + triflumizol	2500x 0,25ug/ml	88,2	76,2	1,2

E_e es la Eficacia esperada y se determina con la fórmula de Limpel $E_e = X + Y - (XY)/100$ (Limpel et al., 1962; Richer, 1987).

5

Tabla 11. Gravedad de la enfermedad y porcentaje de control de MBI-106 (REGALIA® SC) y

Tratamiento	Dilución/Tasa	Gravedad (%)	Control (%)
Control no tratado	N/A	90,0	a
acibenzolar-S-metilo	25 ug/ml	68,9	ab
Extracto de Reynoutria	200x	57,0	b
Extracto de Reynoutria + acibenzolar-S-metilo	200x 25 ug/ml	14,2	c

acibenzolar-S-metilo (ACTIGARD®) cuando se usa solo o en una mezcla en tanque. (Referencia)

Tabla 12. La eficacia esperada (E_e) de cada combinación de producto, la eficacia de control (E) y el efecto sinérgico (E/E_e > 1,0) entre MBI-106 (REGALIA® SC) y acibenzolar-S-metilo (ACTIGARD®). (Referencia)

Mezcla en tanque	Control (%)	E _e	E/E _e
Extracto de Reynoutria + acibenzolar-S-metilo	84,2	51,5	1,6

10

Tabla 13. Gravedad de la enfermedad y control de porcentaje de MBI-106 (REGALIA® ME) y mefenoxam (RIDOMIL GOLD® SL) (Referencia)

Tratamiento	Dilución/Tasa	Gravedad (%)	Control (%)
Control no tratado	N/A	87,0 ab	0,0
mefenoxam	150 ug/ml	44,8 de	48,5
mefenoxam	75 ug/ml	54,2cd	37,7
mefenoxam	37,5 ug/ml	89,3a	-2,6
Extracto de Reynoutria	400x	68,0bc	21,8
Extracto de Reynoutria + mefenoxam	400x 150 ug/ml	14,5 f	83,3
Extracto de Reynoutria + mefenoxam	400x 75 ug/ml	28,6ef	67,1
Extracto de Reynoutria + mefenoxam	400x 37,5 ug/ml	59,2cd	32,0

5

Tabla 14. La eficacia esperada (E_e) de cada combinación de producto, la eficacia del control real (E) y la sinergia detectado ($E/E_e > 1,0$) entre MBI-106 (REGALIA® ME) y mefenoxam (RIDOMIL GOLD® (Referencia)

Mezcla en tanque	Dilución/Tasa	Control (%)	E_e	E/E_e
Extracto de Reynoutria + mefenoxam	400x 150 ug/ml	83,3	59,7	1,4
Extracto de Reynoutria + mefenoxam	400x 75 ug/ml	67,1	51,3	1,3
Extracto de Reynoutria + mefenoxam	400x 37,5 ug/ml	32,0	19,7	1,6

Tabla 15. Emergencia de plántulas de soja y control de la caída del almácigo por MBI-106 (extracto de etanol) y azoxistrobina (QUADRIS®).

Tratamiento	Tasa	Emergencia (%)	Control (%)
Control no inoculado	N/A	90,1 a	N/A
Control inoculado	N/A	4,9 c	0,0
Extracto de Reynoutria inoculado	0,02117 g/kg	11,1 c	6,2
Extracto de Reynoutria inoculado + azoxistrobin	0,02117 g/kg 0,0298 g/kg	92,6 a	87,7
azoxistrobin inoculado	0,0298 g/kg	86,4 a	81,5

Tabla 16. La eficacia esperada (E_e) de cada combinación de producto, la eficacia del control real (E) y la sinergia detectada ($E/E_e > 1,0$) entre MBI-106 (extracto de etanol) y azoxistrobina (QUADRIS®).

Mezcla en tanque	Tasa	Control (%)	E_e	E/E_e
Extracto de Reynoutria + azoxistrobin	0,02117 g/kg 0,0298 g/kg	87,7	82,6	1,1

5

Tabla 17. Emergencia de plántulas de soja y control de la caída del almácigo por MBI-106 (extracto de etanol Reynoutria) y fludioxonil (SCHOLAR®) (Referencia)

Tratamiento	Tasa	Emergencia (%)		Biomasa (g)		Control (%)
Control inoculado	N/A	7,4	c	0,8	c	0,0
Extracto de Reynoutria inoculado	0,635 g/kg	9,9	c	1,4	c	2,5
Extracto de Reynoutria inoculado	0,03175 g/kg	16,0	c	2,9	c	8,6
Extracto de Reynoutria inoculado + fludioxonil	0,635 g/kg 0,0596g ai/kg	61,8	a	17,0	a	54,4
Extracto de Reynoutria inoculado + fludioxonil	0,03175 g/kg 0,0596g ai/kg	50,6	a	12,5	b	43,2
Inoculated fludioxonil	0,0596g ai/kg	35,8	b	8,7	b	28,4

Tabla 18. La eficacia esperada (E_e) de cada combinación de producto, la eficacia del control real (E) y la sinergia detectada ($E/E_e > 1,0$) entre MBI-106 (extracto de etanol) y fludioxonil (SCHOLAR®). (Referencia)

Mezcla en tanque	Tasa	Control (%)	E_e	E/E_e
Extracto de Reynoutria inoculado + fludioxonil	0,635 g/kg 0,0596g ai/kg	54,4	30,2	1,8
Extracto de Reynoutria inoculado + fludioxonil	0,03175 g/kg 0,0596g ai/kg	43,2	34,6	1,2

10

Tabla 19. Gravedad de la enfermedad y control de porcentaje de *R. sachalinensis* y propiconazol (PROPIMAX®) cuando se usa solo o en una mezcla en tanque para controlar el mildiú pulverulento del pepino. (Referencia)

Tratamiento	Dilución/Tasa	Gravedad (%)		Control (%)
Control no tratado	N/A	98,8	a	0,0
propiconazol	1,0 ug/ml	97,5	a	1,3
Extracto de Reynoutria	2500x	61,3	b	38,0
Reynoutria + propiconazol	2500x 1,0 ug/ml	51,3	c	48,1

Tabla 20. La eficacia esperada (E_e) de cada combinación de producto, la eficacia de control (E) y el efecto sinérgico (E/E_e> 1,0) entre MBI-106 (REGALIA® ME) y propiconazol (PROPIMAX®). (Referencia)

Mezcla en tanque	Dilución/Tasa	control (%)	E ^e	E/e _e
Extracto de Reynoutria + propiconazol	2500x 1,0 ug/ml	48,1	38,8	1,2

5 Tabla 21. Gravedad de la enfermedad y control de porcentaje de *R. sachalinensis* y azoxistrobin (QUADRIS®) cuando se usa solo o en una mezcla en tanque para controlar el mildiú pulverulento del pepino

Tratamiento	Dilución/Tasa	Gravedad %	Control (%)
Control no tratado	N/A	80,0 a	13,5
azoxistrobin	0,5 ug/ml	35,0 cd	62,2
azoxistrobin	0,25 ug/ml	80,0 a	13,5
azoxistrobin	0,1 ug/ml	72,5 abc	21,6
Extracto de Reynoutria	2000x	75,0 ab	18,9
Extracto de Reynoutria + azoxistrobin	2000x 0,5 ug/ml	11,3 d	87,8
Extracto de Reynoutria + azoxistrobin	2000x 0,25 ug/ml	41,3 abcd	55,4
Extracto de Reynoutria + azoxistrobin	2000x 0,1 ug/ml	36,5 bcd	60,5

Tabla 22. La eficacia esperada (E_e) de cada combinación de producto, la eficacia de control (E) y el efecto sinérgico (E/E_e> 1,0) entre MBI-106 (Regalia® SC) y azoxistrobin (Quadris®) (Prueba II).

Mezcla en tanque	Dilución/Tasa	Control (%)	E _e	E/E _e
Extracto de Reynoutria + azoxistrobin	2000x 0,5 ug/ml	87,8	69,3	1,3
Extracto de Reynoutria + azoxistrobin	2000x 0,25ug/ml	55,4	29,9	1,9
Extracto de Reynoutria + azoxistrobin	2000x 0,1 ug/ml	60,5	36,4	1,7

10 **Literatura citada:**

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.

Bartlett, D. W., J. M. Clough, et al. (2002). "649-662." *Pest Management Science* 58: 649-662.

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

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.

20 Braun, U., T. A. Cook, et al. (2002). *The taxonomy of the powdery mildew fungi. The powdery mildews: a comprehensive treatise.* R. R. Belanger, W. R. Bushnell, A. J. Dik and T. L. W. Carver. St. Paul, MN, APS Press: 13-55.

- Burpee, L. y R. Latin (2008). "Reassessment of fungicide synergism for control of dollar spot." *Plant Disease* 92: 601-606.
- 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.
- 5 De Waard, M. A. (1996). "Synergism and antagonism in fungicide mixtures containing sterol demethylation inhibitors." *Phytopathology* 86: 1280-1283.
- Durrant, W. E. y X. Dong (2004). "Systemic acquired resistance." *Annual Review in Phytopathology* 42: 185-209.
- 10 Fraaije, B., J. A. Lucas, et al. (2003). QoI resistance development in populations of cereal pathogens in the UK. BCPC International Congress - Crop Science and Technology, Alton, Hants, UK, pp. 689-694.
- Gandhi, N. R., V. P. Skebba, et al. (2007). Antimycotic rhamnolipid compositions and related methods of use, US patent application number 20070191292. USPTO. USA: 27 p.
- Gisi, U. (1996). "Synergistic interactions of fungicides in mixtures " *Phytopathology* 86: 1273-1279.
- 15 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.
- Holb, I. J. and G. Schnabel (2008). "The benefits of combining elemental sulfur with a DMI fungicide to control *Monilinia fructicola* isolates resistant to propiconazol." *Pest Management Science* 64: 156-164.
- 20 Horst, R. K., S. O. Kawamoto, et al. (1992). "Effect of sodium bicarbonate and oils on the control of powdery mildew and black spot on roses." *Plant Disease* 76: 247-251.
- Hwang, S.F., H. Wang, et al. (2006). "Effect of seed treatment and root pathogens on seedling establishment and yield of alfalfa, birdfoot trefoil and sweetclover." *Plant Pathology Journal* 5:322-328.
- James, W. C. (1971). A manual assessment keys for plant diseases. St. Paul, MN, American Phytopathological Society.
- 25 Karaoglanidis, G. S. y D. A. Karadimos (2006). "Efficacy of strobilurins and mixtures with DM fungicides in controlling powdery mildew in field-grown sugar beet." *Crop Protection* 25: 977-983.
- 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.
- Limpel, L. E., P. H. Schuldt, et al. (1962). N.E. Weed Control Conference.
- 30 May, R. M. (1985). "Evolution of pesticide resistance." *Nature* 315: 12-13.
- McGrath, M. T. (2001). "Fungicide resistance in cucurbit powdery mildew: Experiences and challenges." *Plant Disease* 85: 236-245.
- 35 Reuveni, M. (2001). "Improved control of powdery mildew (*Sphaerotheca pannosa*) of nectarines in Israel using strobilurin and polyoxin B fungicides; mixtures with sulfur; and early bloom applications." *Crop Protection* 20: 663-668.
- Richer, D. (1987). "Synergism - a patent view." *Pesticide Science* 19: 309-315.
- Ross, A. F. (1961). "Systemic acquired resistance induced by localized virus infections in plants " *Virology* 14: 340-358.
- 40 Samoucha, Y. y Y. Cohen (1984). "Synergy between metalaxyl and macozeb in controlling downy mildew in cucumbers." *Phytopathology* 74: 1434-1437.
- Schmitt, A. (2002). "Induced responses by plant extracts from *Reynoutria sachalinensis*: a case study." *Bull. IOBC/WPRS* 25: 83-89.
- 45 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 für Wein- und Obstbau (LWVO) 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, Germany, pp. 146-151.

- Schmitt, A. y 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, pp. 205-225.
- 5 Schnabel, G., B. K. Bryson, et al. (2004). "Reduced sensitivity in *Monilinia fructicola* to propiconazol in Georgia and implications for disease management" Plant Disease 88: 1000-1004.
- Su, H., A. H. C. van Bruggen, et al. (2004). "Sporulation of *Bremia lactucae* affected by temperature, relative humidity, and wind in controlled conditions". Phytopathology 94:396-401
- 10 Tuttle McGrath, M. (2003). "Occurrence of strobilurin resistance and impact on managing powdery mildew on cucurbits." Cornell University; Vegetable MD Online Retrieved July 19, 2009,2009, from <http://vegetablemdonline.ppath.cornell.edu/NewsArticles/Cuc Strob.htm>.
- Tuttle McGrath, M. (2006). "Guidelines for managing cucurbit powdery mildew in 2006." Cornell University, Vegetable MD Online Retrieved July 19, 2009, 2009, from <http://vegetablemdonline.ppath.cornell.edu/NewsArticles/Cuc PM 2006.html>.
- 15 Van den Bosch, F. y C. A. Gilligan (2008). "Models of fungicide resistance dynamics." Annual Review in Phytopathology 46: 123-147.
- Vechet, L., L. Burketova, et al. (2009). "A comparative study of the efficiency of several sources of induced resistance to powdery mildew (*Blumeria graminis* f. sp. tritici) in wheat under field conditions." Crop Protection 28: 151-154.
- 20 Walters, D., D. Walsh, et al. (2005). "Induced resistance for plant disease control: maximizing the efficacy of resistance elicitors." Phytopathology 85: 1368-1373.
- Wurms, K., C. Labbe, et al. (1999). "Effects of Milsana and Benzothiadiazole on the ultrastructure of powdery mildew haustoria in cucumber." Phytopathology 89: 728-736.
- 25 Wyenandt, C. A., M. T. McGrath, et al. (2009). "Fungicide resistance management guidelines for cucurbit downy and powdery mildew control in the mid-Atlantic and Northeast regions of the US." Phytopathology 99 (2009 APS Annual Meeting Abstracts of Presentations): S144-S144.

REIVINDICACIONES

1. Una composición sinérgica que comprende: (a) un extracto de *Reynoutria sp.*, en la que dicho extracto contiene fisiona y (b) azoxistrobina.
- 5 2. La composición sinérgica de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la sinergia de dicha composición sinérgica se mide por la determinación de E/E_e y E/E_e es mayor que 1,3.
3. La composición sinérgica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en la que *Reynoutria sp.* es *Reynoutria sachalinensis*.
4. La composición sinérgica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en la que el extracto comprende además emodina.
- 10 5. Un procedimiento para modular la infección fitopatógica en una planta que comprende aplicar a la planta y/o las semillas de la misma y/o al sustrato usado para cultivar dicha planta una cantidad de la composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, efectiva para modular dicha infección fitopatógica.
6. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 5, en el que la infección fitopatógica es una infección fúngica.
- 15 7. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 6, en el que la infección fúngica es una infección por mildiú pulverulento.
8. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 6, en el que la infección fúngica es una infección por *Rhizoctonia solani*.