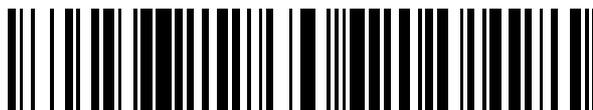


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 770 622**

51 Int. Cl.:

**A01N 55/02** (2006.01)

**C07F 9/94** (2006.01)

**A01P 1/00** (2006.01)

**A01N 55/00** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.10.2015 PCT/FR2015/052932**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.05.2016 WO16066974**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.10.2015 E 15797139 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.11.2019 EP 3211999**

54 Título: **Uso de subsalicilato de bismuto o de uno de sus derivados como agente fitofarmacéutico**

30 Prioridad:

**30.10.2014 FR 1460451**

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

**02.07.2020**

73 Titular/es:

**UNIVERSITÉ DE HAUTE-ALSACE (100.0%)  
2 rue des Frères Lumière  
68093 Mulhouse Cedex, FR**

72 Inventor/es:

**BERTSCH, CHRISTOPHE;  
ALBRECHT, SÉBASTIEN;  
TARNUS, CÉLINE y  
GELLON, MÉLANIE**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

**ES 2 770 622 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 subsalicilato de bismuto o de uno de sus derivados como agente fitofarmacéutico

**Campo de la invención**

5 La invención se refiere al campo fitofarmacéutico o fitosanitario, en particular a la prevención y a la lucha de enfermedades criptogámicas de las plantas, en concreto las que afectan a las vides y árboles frutales.

**Antecedentes tecnológicos**

10 La lucha y la prevención de las enfermedades criptogámicas es un problema importante en agricultura, en particular en el campo vitícola y arborícola. Existen diferentes tipos de enfermedades criptogámicas tales como el oídio, la podredumbre gris, y las enfermedades de la madera que agrupan la yesca, *Botryosphaeria dieback* (es decir, las enfermedades de decaimiento por *Botryosphaeria* tales como Black Dead Arm), eutipiosis, antracnosis o incluso excoriosis.

Las enfermedades de la madera son particularmente perjudiciales para la sostenibilidad del patrimonio vitícola. Los parásitos responsables de estas enfermedades causan en un plazo más o menos largo la muerte de la cepa y pueden necesitar una renovación de las plantas que puede alcanzar más de 10% de un viñedo.

15 Desde hace aproximadamente una decena de años, se constata un avance importante de estas enfermedades que se han convertido en objeto de importantes preocupaciones en el sector vitivinícola. En efecto, afecta a viñedos de todo el mundo. En Francia, todas las regiones vinícolas están afectadas y actualmente aproximadamente 13% del viñedo francés es improductivo, principalmente debido a estas enfermedades de decaimiento. Varias observaciones hacen pensar que la epidemia no es más que el inicio del ciclo: i) la prohibición del arsenito sódico, el único medio eficaz conocido hasta ahora para combatir la yesca y el Black Dead Arm (BDA), a partir de 2001, ii) el aumento anual de la tasa de mortalidad de 4 a 5% a partir del quinto año tras detener el tratamiento por arsenito sódico, y iii) la tasa elevada de cepas asintomáticas contaminadas en el viñedo.

20 En efecto, el desarrollo de esta epidemia se ha favorecido por la prohibición del arsenito sódico en 2001, en todos los países vitícolas, debido a su toxicidad. Esta prohibición inquieta especialmente a los viticultores puesto que hasta la fecha no se ha propuesto ningún método alternativo, eficaz y viable. Esto pone en peligro el mantenimiento del medio de producción y su longevidad y esto a escala mundial. Por consiguiente, los efectos de estas enfermedades de la madera serán numerosos en un plazo medio: producirán una depreciación de la calidad de los vinos después de una renovación de las parcelas, o una pérdida de la tipicidad de un vino de una región vitícola después de no replantar las variedades de uva más sensibles.

30 Las enfermedades de la madera que afectan al viñedo agrupan la eutipiosis, la yesca y ciertas enfermedades de decaimiento por *Botryosphaeria* tales como el Black Dead Arm (BDA). Estas enfermedades están asociadas a la presencia de diferentes hongos capaces de degradar los tejidos leñosos. Las principales especies aisladas asociadas a estas enfermedades son *Phaeomoniella chlamydospora*, *Phaeoacremonium aleophilum*, *Eutypa lata*, *Fomitiporia mediterranea*, *Diplodia seriata*, *Neofusicoccum parvum* y *Botryosphaeria stevensii*. Se están identificando otras especies.

35 Estas enfermedades se expresan en la madera por la formación de necrosis sectorial y/o central, por la presencia de bandas marrones o chancros en el tronco y los brazos y en la hoja por decoloración y desecamiento, que pueden ser letales.

40 Las enfermedades de la madera pueden producir también retraso de crecimiento de las ramas y síntomas en la fruta tales como retraso en la maduración, marchitamiento o la presencia de manchas de color negro-violáceo en la superficie de los frutos. La eutipiosis, cuyo principal agente patógeno es *E. lata*, afecta no solamente a las viñas sino también a los árboles frutales tales como los ciruelos, perales, manzanos, albaricoqueros o incluso los cerezos y algunos árboles forestales

45 Desde la prohibición del arsenito de sodio debido a su fuerte toxicidad, se han iniciado investigaciones en varios países del mundo con el fin de identificar soluciones alternativas a su uso. Así, se ha propuesto el uso combinado de ciproconazol y de carbendazima para prevenir las infecciones por *Eutypa lata*. Esta combinación comercializada con el nombre Atemicep® en Francia se ha retirado del mercado debido a su fitotoxicidad. Otro producto fitosanitario que asocia el flusilazol y la carbendazima y homologado para la yesca, también se retiró del mercado debido a su toxicidad en 2007. Se describen otros tratamientos químicos en Bertsch et al., *Plant Pathology*, 2013,62, 243-265.

50 Actualmente las investigaciones se centran en descubrir soluciones alternativas al uso de agentes químicos. Así pues, se acaba de homologar el biofungicida ESQUIVE®WP, comercializado por Bayer, contra la yesca, el Black Dead Arm y la eutipiosis de la vid. Este producto fitofarmacéutico se basa en el uso de un hongo, en concreto la cepa I-1237 de *Trichoderma atroviride*. Este hongo presenta una actividad antagonista y de hiperparasitismo que prevendría el desarrollo de los principales fitopatógenos implicados en estas enfermedades. Este biofungicida se debe aplicar en el momento de la poda, solo a modo profiláctico, por impregnación o pulverización. Puesto que la eficacia de ESQUIVE®

WP es parcial y la demostración en el campo no está totalmente establecida, se recomienda acompañar su uso de medidas de cultivo profilácticas.

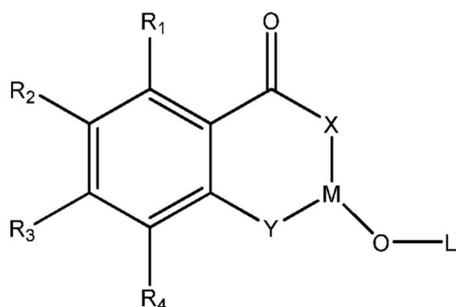
5 Se han desarrollado también nuevas prácticas para evitar la propagación de las enfermedades de la madera durante la producción de plántulas en viveros. Algunos viveristas tratan el material de propagación con agua caliente o en baños de benomilo, captan o cloruro de didecilmetilamonio. Estos tratamientos permitirían reducir la incidencia de determinados patógenos implicados en las enfermedades de la madera. La eficacia de estos métodos frente a la protección de plantones de vid sigue siendo controvertida.

10 Las enfermedades criptogámicas afectan también a otras especies vegetales de interés agrícola, en particular los cultivos de cereales, crucíferas, frutales y leguminosas, así como los productos procedentes de estos cultivos. Dana et al. (*Plant Disease Reporter*, 1950, vol.34, 8-14) describen la evaluación de diferentes compuestos, en concreto el subsalicilato de bismuto, en el tratamiento del moho blanco de la judía producido por *Sclerotinia sclerotiorum*.

Hoy en día todavía son necesarios nuevos agentes fitofarmacéuticos, respetuosos con el medio ambiente, para la prevención y el tratamiento de enfermedades criptogámicas en las plantas.

### Resumen de la invención

15 La invención tiene por objeto un compuesto de fórmula (I)



en la que

- R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> y R<sub>4</sub> se seleccionan independientemente entre el grupo constituido por un hidrógeno, un halógeno, preferiblemente -Cl, -Br o -F, -OH, -O(CO)-CH<sub>3</sub>, un alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, un alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, -NH<sub>2</sub>, y -CN,

- X e Y son independientemente entre sí, O, S o NR<sub>5</sub>,

20 - M es Bi,

- L es H, o un motivo de vectorización que comprende de 1 a 40 átomos de carbono y

- Cada grupo R<sub>5</sub> es independientemente H o un alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>,

25 o una de sus sales aceptables, como agente fitofarmacéutico para prevenir o tratar una enfermedad criptogámica que se desarrolla en la madera de una planta, estando asociada o siendo causada dicha enfermedad criptogámica por uno o varios hongos fitopatógenos seleccionados entre basidiomicetos parásitos y ascomicetos parásitos.

En algunas realizaciones, el compuesto de fórmula (I) se caracteriza por que:

- R<sub>1</sub> y R<sub>3</sub> son -H,

- R<sub>2</sub> y R<sub>4</sub> se seleccionan independientemente entre -H, -Cl y -F

- X e Y son O

30 -M es Bi, y

- L es H, un hidroxi-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, o -(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)<sub>n</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-OH donde n es un número entero que va de 1 a 19, preferiblemente de 1 a 10.

Un compuesto preferido es el subsalicilato de bismuto.

La planta puede ser de cualquier tipo. Se puede tratar de una planta leñosa como se define en la reivindicación 4.

35 En ciertas realizaciones, la enfermedad es una enfermedad criptogámica de la madera asociada a uno o varios patógenos seleccionados de los patógenos que pertenecen a la familia de *Botryosphaeriaceae*, al género *Eutypa*, por ejemplo *Eutypa lata*, al género *Phaeoconiella*, al género *Phaeoacremonium*, al género *Formitoporia*, al género *Verticillium*, al género *Stereum* o al género *Phomopsis*. A modo de ejemplo, la enfermedad de la madera puede estar

asociada a un patógeno seleccionado entre *Phaeoconiella chlamydospora*, *Phaeoacremonium aleophilum*, *Eutypa lata*, *Fomitiporia mediterranea*, *Fomitiporia punctata*, *Botryosphaeria stevensii*, *Diplodia seriata*, *Neofusicoccum parvum*, *Stereum hirsutum* y *Verticillium longisporum*

5 En una realización preferida, el compuesto según la invención se usa en el tratamiento o prevención de una enfermedad criptogámica de la vid seleccionada del grupo constituido por yesca, eutipiosis, *Botryosphaeria* Dieback, en concreto el Black Dead Arm, la podredumbre negra (Black rot), excoriosis y antracnosis.

En ciertas realizaciones, el compuesto según la invención se puede usar:

- para prevenir o tratar las infecciones de heridas de poda, en concreto de árboles frutales y vides, o

10 - para la desinfección del material de propagación o multiplicación, en concreto durante la preparación de los plantones, preferiblemente de plantones de vid, en el vivero.

Finalmente, la invención tiene también por objeto un método para tratar o prevenir una enfermedad criptogámica que se desarrolla en la madera de una planta y asociada o causada por uno o varios hongos fitopatógenos seleccionados entre los basidiomicetos parásitos y ascomicetos parásitos, comprendiendo dicho método la aplicación del compuesto de fórmula (I) sobre al menos una parte de dicha planta.

## 15 Figuras

La figura 1 muestra el crecimiento micelial de *N. parvum* en placas de Petri que contienen medio PDA complementado con óxido de bismuto, subsalicilato de bismuto, citrato de bismuto, óxido de cobre u óxido de antimonio en dosis comprendidas entre 0,01 y 40 mM.

20 Los resultados corresponden a las tasas de crecimiento del micelio con respecto a las condiciones testigo donde el hongo se ha cultivado en medio PDA blanco (crecimiento de 100%).

La figura 2 muestra el crecimiento micelial de *B. cinerea* en placas de Petri que contienen medio PDA complementado con óxido de bismuto, subsalicilato de bismuto, citrato de bismuto, óxido de cobre u óxido de antimonio en dosis comprendidas entre 0,01 y 40 mM.

25 Los resultados corresponden a las tasas de crecimiento del micelio con respecto a las condiciones testigo donde el hongo se ha cultivado en medio PDA blanco (crecimiento micelial de 100%).

La figura 3 muestra el desarrollo de necrosis después de inoculación de *N. parvum* de Borgoña en entrenudos verdes de *V. vinifera* cv Chardonnay que se ha sometido previamente a un baño de óxido de bismuto, ácido salicílico, subsalicilato de bismuto 15 mM o agua (testigo) durante 10 minutos. Los resultados se han calculado en función de las zonas de necrosis observadas en las condiciones testigo (=100%).

30 La figura 4 muestra la expresión de los genes de defensa *VvPR1* y *VvEDS1* (que codifican enzimas de la ruta del ácido salicílico) en los callos de *V. vinifera* cv Chardonnay cultivados en medio MPM1 complementado con ácido salicílico o subsalicilato de bismuto 10 mM. La expresión de los genes se ha evaluado por RT-qPCR después de 4 días de cultivo.

35 Los resultados representan la expresión relativa de los genes en los callos cultivados en medio complementado con respecto a lo que se observa en los callos cultivados en medio MPM1 no complementado (testigo).

## Descripción detallada de la invención

Se describen nuevos métodos de prevención y tratamiento de enfermedades criptogámicas en las plantas. Estos métodos se basan en el uso de subsalicilato de bismuto o uno de sus derivados.

40 El subsalicilato de bismuto se usa en medicina humana para el tratamiento y prevención de problemas gastrointestinales. Se trata del principio activo de las especialidades Pepto-bismol® y Kaopectate® comercializadas entre otros, para el tratamiento de náuseas, diarreas ligeras e indigestiones. Su posología máxima de absorción es 500 mg/día en el hombre en caso de problemas digestivos.

45 Estudios antiguos y aislados que datan de los años 40, han mencionado el uso del subsalicilato de bismuto para el tratamiento del mildiú del tabaco (*blue mold disease of tobacco* en inglés) (compendio de Clayton et al., *Journal of Agricultural Research*, 1943, 66, 261, compendio). Los mildiús son causados por microorganismos filamentosos que no son hongo, sino oomicetos. Los oomicetos pertenece al filo de los heterocontos y, desde un punto de vista filogenético, están próximos a organismos fotosintéticos tales como las algas marrones y las diatomeas. No tienen ningún antepasado común con los eumicetos.

50 Según el conocimiento de los autores de la invención, el uso del subsalicilato de bismuto como agente fitofarmacéutico o fitosanitario para el tratamiento o prevención de una enfermedad criptogámica de la madera, en particular causada por un hongo parásito que pertenece a los basidiomicetos o los ascomicetos, no se ha descrito nunca hasta la fecha.

De forma sorprendente, los autores de la invención han mostrado que el subsalicilato de bismuto es capaz de inhibir significativamente el crecimiento micelial de varios fitopatógenos, en particular *Neofusicoccum parvum*, implicados en el decaimiento por *Botryosphaeria* (*Botryosphaeria dieback*) y *Botrytis cinerea*, implicado en la podredumbre gris de los frutos (llamado también "moho o podredumbre gris"). Los autores de la invención han mostrado también que el óxido de bismuto y el subcitrate de bismuto presentan, por su parte, una actividad muy débil de inhibición frente a estos fitopatógenos.

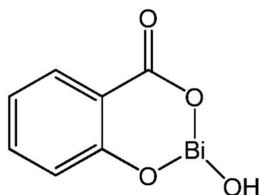
Los resultados obtenidos in vitro se han confirmado in vivo en un modelo de necrosis en entrenudos de madera de la cepa de Chardonnay. La inmersión previa de un entrenudo de madera inoculado con micelio de *N. parvum* en una disolución subsalicilato de bismuto 15 mM durante 10 min ha permitido limitar de forma muy significativa ( $\approx 50\%$ ) la formación y propagación de necrosis y por lo tanto el desarrollo micelial. Dicho resultado no se ha observado mediante una inmersión previa en un baño de ácido salicílico 15 mM o en un baño de óxido de bismuto 15 mM. Los autores de la invención han mostrado también que el subsalicilato de bismuto es capaz de inducir ciertos genes de defensa y de resistencia de la planta a los fitopatógenos. Ensayos complementarios han mostrado que el subsalicilato de bismuto también puede inhibir in vitro el crecimiento micelial de varios hongos fitopatógenos modelo implicados en diversas patologías vegetales tales como alternariosis, fusariosis, septoriosis de la hoja del trigo, moho o podredumbre de frutos, en especial cítricos, pirculariosis, moniliosis o incluso verticilosis. De forma notable, el efecto biocida del subsalicilato de bismuto frente a los hongos fitopatógenos es muy superior al que han podido observar los autores de la invención frente a dos modelos de oomicetos. Dicho resultado muestra que el efecto biocida del subsalicilato de bismuto es específico de los hongos fitopatógenos, en especial de los basidiomicetos y ascomicetos parásitos, y que no se podía prever por los estudios antiguos relativos al mildiú del tabaco.

Los resultados experimentales descritos en la presente solicitud ilustran las propiedades fitofarmacéuticas del subsalicilato de bismuto frente a infecciones criptogámicas y su capacidad para penetrar la madera. El subsalicilato de bismuto presenta además la ventaja de ser particularmente poco tóxico para el hombre. Presenta también una toxicidad pequeña frente al entorno, como lo demuestran los autores de la invención mediante los experimentos de ecotoxicidad.

Por lo tanto, el subsalicilato de bismuto está particularmente adaptado a un uso como agente fitofarmacéutico para el tratamiento y la prevención de enfermedades criptogámicas de las plantas, en particular de interés agrícola.

Por lo tanto, se describe el uso del subsalicilato de bismuto o uno de sus derivados como agente fitofarmacéutico en el tratamiento o prevención de una enfermedad criptogámica en una planta.

Se entiende por "subsalicilato de bismuto" o "sub-salicilato de bismuto" el compuesto de la siguiente fórmula:



En el sentido de la invención, se entiende por "enfermedad criptogámica" una enfermedad causada por, o asociada a uno o varios hongos fitopatógenos. En el sentido de la invención, la expresión "enfermedad criptogámica" engloba también las enfermedades favorecidas por la colonización de la planta por uno o varios hongos saprófitos.

En cambio, la expresión "enfermedad criptogámica" no engloba patologías causadas por microorganismos fitopatógenos que no son hongos. En especial, la expresión "enfermedad criptogámica" no engloba las patologías causadas o asociadas a uno o varios fitopatógenos que pertenecen a los oomicetos tales como *Peronospora tabacina*, *Plasmopora viticola* o *Phytophthora infestans*. En otras palabras, las enfermedades de tipo mildiú (downy mildew en inglés) tales como el mildiú del tabaco, mildiú de la vid o mildiú de la patata, no están comprendidas en la expresión "enfermedad criptogámica" según la invención.

Las enfermedades criptogámicas abarcan, sin estar limitadas, la yesca, eutipiosis, decaimientos por *Botryosphaeria*, black rot (podredumbre negra), podredumbre gris, antracnosis, excoriosis, alternariosis, fusariosis, septoriosis, mohos o podredumbres de los frutos, en especial de cítricos, pirculariosis, moniliosis o incluso verticilosis.

En el marco de la invención, la enfermedad criptogámica está asociada o es causada por uno o varios hongos fitopatógenos, en particular un hongo fitopatógeno microscópico, seleccionado entre los basidiomicetos parásitos y los ascomicetos parásitos. Los basidiomicetos parásitos abarcan, sin estar limitados, hongos fitopatógenos del género *Fomitiporia*, *Stereum* y del orden Pucciniales, en especial del género *Hemileia*.

Los ascomicetos parásitos abarcan, sin estar limitados, hongos fitopatógenos que pertenecen a los géneros *Verticillium*, *Alternaria*, *Fusarium*, *Magnaporthe*, *Monilia*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Botrytis*, *Eutypa*, *Phaeoconiella*, *Phaeoacremonium*, *Phomopsis*, *Cercospora*, *Mycosphaerella*, *Bipolaris* o incluso a la familia de *Botryosphaeriaceae*

en especial a los géneros *Spencermatinsia*, *Neofusicoccum*, *Botryosphaeria*, *Diplodia* y *Lasiodiplodia*. Los ascomicetos abarcan también los hongos fitopatógenos responsables del oídio. Estos hongos fitopatógenos pertenecen a la familia de las erisifáceas, en especial a los géneros *Erysiphe*, *Podosphaera*, *Sphaerotheca*, y *Uncinula*, por ejemplo, *Erysiphe necator*.

- 5 A modo de ejemplo, el o los hongos que pertenecen a los ascomicetos parásitos o a los basidiomicetos parásitos se puede/pueden seleccionar entre los géneros *Iternaria*, *Fusarium*, *Septoria*, *Verticillium*, *Magnaporthe*, *Monilia*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Septoria*, *Botrytis* y *Neofusicoccum*.

10 Se entiende por hongo fitopatógeno "asociado a, que implica o causa una enfermedad" un hongo fitopatógeno capaz por sí mismo de inducir la enfermedad y/o de favorecer el desarrollo de la enfermedad y/o de uno de sus síntomas en la planta considerada. Preferiblemente, el hongo fitopatógeno no es un patógeno para el reino animal, en particular frente a mamíferos, incluido para el hombre.

A modo de ejemplo, la enfermedad criptogámica puede estar asociada, o ser causada por uno o varios microorganismos que pertenecen a la familia de *Botryosphaeriaceae*

15 En ciertas realizaciones, la enfermedad criptogámica está asociada o es causada por uno o varios patógenos que pertenecen a la familia de *Botryosphaeriaceae*. En el sentido de la invención, dichas enfermedades abarcan las enfermedades de decaimiento por *Botryosphaeria* y patologías que afectan a las partes aéreas de las plantas y que implican uno o varios fitopatógenos de la familia *Botryosphaeriaceae*, en especial la podredumbre negra (conocida comúnmente con el nombre de Black rot) y *Macrophoma* rot (podredumbre blanca).

20 En el sentido de la invención, la expresión "decaimiento por *Botryosphaeria*" o "*Botryosphaeria* dieback" indica las enfermedades criptogámicas que implican uno o varios fitopatógenos que pertenecen a la familia de los *Botryosphaeriaceae* y que pueden afectar a las partes leñosas de la planta. Las enfermedades de decaimiento por *Botryosphaeria* abarcan enfermedades de la madera tales como el Black Dead Arm, decaimiento por *Diplodia* (*Diplodia*-cane dieback) y el chancro por *Botryosphaeria* (*Botryosphaeria* canker).

25 Las enfermedades criptogámicas que implican un fitopatógeno que pertenece a la familia de *Botryosphaeriaceae* y que afectan a las viñas se describen en especial en Urbez-Torres, *Phytopathol. Mediterr.*, 2011, 50 (Supplement), S5-S45, cuyo contenido se incorpora en la presente memoria por referencia.

30 En el sentido de la invención, se entiende por "tratamiento de una enfermedad" el hecho de curar, atenuar, ralentizar, detener el avance de una enfermedad o de uno de sus síntomas en una planta. De forma más precisa, se entiende por "tratamiento" el hecho de detener, ralentizar, disminuir, controlar o suprimir la infección de la planta por un hongo fitopatógeno.

35 Se entiende por "prevención de una enfermedad" el hecho de impedir o retrasar la aparición de una enfermedad o de uno de sus síntomas en una planta, el hecho de ralentizar, disminuir o prevenir la propagación de una enfermedad en un cultivo dado, el hecho de erradicar o disminuir la presencia de fitopatógenos en estado latente en una planta o en un cultivo, o incluso el hecho de disminuir la incidencia de una enfermedad o el riesgo de contaminación por esta enfermedad en un cultivo dado.

40 En el sentido de la invención, se entiende por "agente fitofarmacéutico o fitosanitario" un compuesto dirigido a proteger a las plantas y los productos de cultivo contra organismos nocivos, en particular microorganismos, o a prevenir su acción, asegurar la conservación de los productos vegetales y/o ejercer una acción sobre los procesos vitales de los vegetales (en la medida en que no se trata de sustancias nutritivas), por ejemplo, favoreciendo el crecimiento vegetal y estimulando las defensas de la planta.

45 En el sentido de la invención, se entiende, preferiblemente, por "agente fitofarmacéutico o fitosanitario" un compuesto adaptado a un uso en agricultura para tratar o prevenir una enfermedad, preferiblemente causada por un microorganismo parasitario, en un organismo vegetal. Dicho agente fitofarmacéutico puede tener un efecto directo sobre el desarrollo y la viabilidad del o de los microorganismos implicados o asociados a la enfermedad y/o inducir o estimular los mecanismos de defensa o de resistencia de la planta contra dicho o dichos microorganismos.

Preferiblemente, en el sentido de la invención, los compuestos de fórmula (I) como se definen a continuación, presentan una actividad seleccionada entre una actividad fungistática, una actividad fungicida, una actividad de estimulación de las defensas de la planta y sus combinaciones. Preferiblemente, los compuestos de fórmula (I) presentan a la vez una actividad fungistática y una actividad de estimulación de las defensas de la planta.

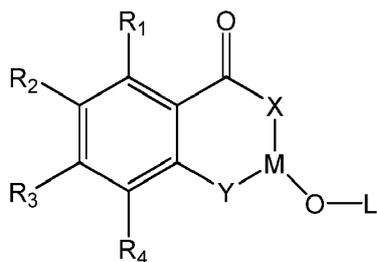
50 En el sentido de la invención, se entiende por "agente fungistático" un compuesto capaz de prevenir, ralentizar o detener el desarrollo y/o la reproducción de un hongo fitopatógeno.

55 En el sentido de la invención, se entiende por "planta" un organismo vegetal pluricelular de cualquier tipo. Preferiblemente, la planta es una planta vascular, es decir una planta que pertenece a las traqueofitas. Las plantas vasculares abarcan las plantas leñosas y las plantas herbáceas. Preferiblemente, la planta es de interés agrícola. Se puede tratar, por ejemplo, de un cultivo hortícola, frutales, cereales o vitícola.

En ciertas realizaciones, la planta es una planta leñosa. A modo de ejemplo de plantas leñosas, se pueden citar los árboles frutales tales como el banano, albaricoquero, mango, ciruelo, melocotonero, manzano, peral, cerezo, membrillero, nogal, higuera, y los cítricos, árboles forestales, árboles y arbustos ornamentales u hortícolas como los rosales, algodón, café y las vides.

- 5 Se describe también una planta herbácea. A modo de ejemplo de plantas herbáceas, se pueden citar las plantas de la familia de las solanáceas como el tomate y la patata, las plantas de la familia de las apiáceas como la zanahoria o el nabo, crucíferas (o la familia *Brassicaceae*) como la colza, gramíneas como la caña de azúcar y cereales como el maíz, arroz, trigo, cebada, avena y centeno.

Se describe el uso de un compuesto de fórmula (I)



10 en la que

- R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> y R<sub>4</sub> se seleccionan independientemente entre el grupo constituido por un hidrógeno, un halógeno, -OH, -O(CO)-CH<sub>3</sub>, un alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, tal como -OCH<sub>3</sub>, un alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, -NH<sub>2</sub>, -CF<sub>3</sub> y -CN,

- X e Y son independientemente entre sí, O, S o NR<sub>5</sub>,

- M es Bi, Cu o Sb,

- 15 - L es H, o un motivo de vectorización que comprende de 1 a 40 átomos de carbono, y

- Cada grupo R<sub>5</sub> es independientemente H o un alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>,

o una de sus sales aceptables a nivel fitofarmacéutico

20 como un agente fitofarmacéutico, para el tratamiento o la prevención de una enfermedad criptogámica en una planta, estando asociada o siendo causada dicha enfermedad criptogámica por uno o varios hongos fitopatógenos seleccionados entre los basidiomicetos parásitos y los ascomicetos parásitos. Un alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> abarca, sin estar limitado, los grupos metilo, etilo, propilo, butilo, pentilo, hexilo, isopropilo, terc-butilo, iso-butilo, sec-butilo, ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo y ciclohexilo. Los grupos alquilo preferidos según la invención son los grupos C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>, en particular los grupos metilo, etilo, propilo e isopropilo.

25 Un grupo hidroxialquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, se refiere a un grupo alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, preferiblemente C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>, sustituido con al menos un hidroxilo.

Un grupo alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> se refiere a un grupo R-O- donde R es un grupo alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, preferiblemente C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>. Los átomos de halógeno abarcan -F, -Br, -Cl y -I. Los átomos de halógeno preferidos según la invención son -F y -Cl.

30 Se entiende por "motivo de vectorización" un grupo químico que favorece las propiedades del compuesto, en especial la solubilidad del compuesto en agua y/o su capacidad para penetrar en la madera. El motivo de vectorización puede comprender, entre otros, un radical glicosilo y/o una cadena hidrocarbonada que comprende de 1 a 40 átomos de carbono. Esta cadena hidrocarbonada puede estar interrumpida por uno o varios heteroátomos, preferiblemente -O- o -S-, y/o por uno o varios grupos de tipo -SO<sub>2</sub>-, -SO-, -NHC(O)-, -OC(O)-, -NH y -NH-CO-NH-. De forma adicional o alternativa, dicha cadena hidrocarbonada puede estar sustituida con uno o varios grupos, preferiblemente seleccionados entre -OR<sub>5</sub>, -N(R<sub>5</sub>)<sub>2</sub>, -CF<sub>3</sub> y un alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, un monosacárido o un disacárido. En ciertas realizaciones, el motivo de vectorización es un motivo de tipo oligo o poliéter, por ejemplo, un polietilenglicol, un polipropilenglicol o incluso un politetrametilenglicol. En ciertas realizaciones, L comprende o consiste en -(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)<sub>n</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-OH donde n es un número entero que va de 1 a 19.

Se describe también que el compuesto de fórmula (I) se caracteriza por que:

40 - R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> y R<sub>4</sub> se seleccionan independientemente entre el grupo constituido por un hidrógeno, un halógeno, preferiblemente -Cl, o -F, -OH, -O(CO)-CH<sub>3</sub>, -OCH<sub>3</sub>, -NH<sub>2</sub>, CF<sub>3</sub> y -CN

- X e Y son O,

- M es Bi o Cu, y

- L es H, un hidroxialquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, un radical glicosilo o una cadena de oligo o poliéter, tal como -(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)<sub>n</sub>, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-OH donde n es un número entero que va de 1 a 19

Se describe que el compuesto de fórmula (I) se caracteriza por que:

- R<sub>1</sub> y R<sub>3</sub> son -H,

5 - R<sub>2</sub> y R<sub>4</sub> son independientemente el grupo constituido por -H, -Cl, -F, -OH, -O(CO)-CH<sub>3</sub>, -OCH<sub>3</sub>, -NH<sub>2</sub> y -CN. Preferiblemente, R<sub>2</sub> y R<sub>4</sub> se seleccionan entre -H, -Cl o -F,

- X e Y son O,

- M es Bi o Cu, preferiblemente Bi, y

10 - L es H, un hidroxialquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, un radical glicosilo o una cadena de oligo o poliéter, tal como -(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)<sub>n</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-OH donde n es un número entero que va de 1 a 19.

Se describe también que el compuesto de fórmula (I) se caracteriza por que:

- R<sub>1</sub> y R<sub>3</sub> son -H,

- R<sub>2</sub> y R<sub>4</sub> se seleccionan independientemente entre -H, -Cl y -F

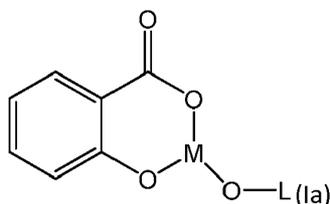
- X e Y son O

15 - M es Cu o Bi, preferiblemente Bi, y

- L es H, un hidroxi-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, o -(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)<sub>n</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-OH donde n es un número entero que va de 1 a 19, preferiblemente de 1 a 10.

20 La presente invención se refiere al uso de un compuesto de fórmula (I) como se ha descrito antes y con M que es Bi, para tratar o prevenir una enfermedad criptogámica que se desarrolla en la madera de una planta, estando asociada o siendo causada dicha enfermedad criptogámica por uno o varios hongos fitopatógenos seleccionados entre los basidiomicetos parásitos y los ascomicetos parásitos.

Compuestos preferidos según la invención son los compuestos de fórmula (Ia):



donde M es Bi y L es como se ha definido antes.

25 Preferiblemente:

L es H, un hidroxialquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, o -(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)<sub>n</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-OH con n que es un número entero que va de 1 a 19, preferiblemente de 1 a 10.

Se describen compuestos de fórmula (Ia) tal que L = H y M = Bi o Cu.

30 Los compuestos de fórmula (I) se pueden preparar por síntesis química como se ilustra en Timakova et al., *Chemistry for Sustainable Development*, 2009, 305-313.

Estos compuestos se pueden usar para el tratamiento de cualquier enfermedad criptogámica que afecta a las plantas descritas en la presente descripción.

35 Los compuestos según la fórmula (I) se pueden usar para tratar o prevenir las patologías en la madera y las raíces, pero también las que se desarrollan en partes aéreas de la planta tales como los frutos, hojas, tallos, espigas, flores y panículas.

40 Los síntomas producidos por las enfermedades criptogámicas que se desarrollan en las partes aéreas de las plantas son variados y comprenden, entre otros, manchas, por ejemplo, negras, marrones o amarillentas, quemaduras o necrosis en las hojas, tallos o semillas, enfermedad de los semilleros, aparición de picnidios, aparición de pústulas en las hojas, fenómenos de marchitamiento de las hojas, secado de las hojas en particular, clorosis o decoloración de las hojas, aparición de peritecas en el tallo o incluso moho y marchitamiento de los frutos.

A modo de ejemplo de enfermedades criptogámicas, se pueden citar:

- Las alternariosis que son causadas por los hongos del género *Alternaria*. Se puede citar la alternariosis de la remolacha (*Alternaria alternata*), de la zanahoria (*Alternaria dauci*), de las crucíferas (*Alternaria brassicicola*, *Alternaria brassicae*), de las solanáceas (*Alternaria solani*) o del trigo (*Alternaria triticina*),
- 5 - las fusariosis causadas, en especial, por los fitopatógenos del género *Fusarium*, que según la especie vegetal afectada, se pueden manifestar por lesiones y/o coloraciones marrones en las semillas y los tallos así como la aparición de podredumbre seca. A modo de ejemplo, se pueden citar las especies *Fusarium graminearum* y *Fusarium nivale* que afectan al trigo o *Fusarium sambucinum* que afecta a la patata. Se puede citar también la fusariosis de la caña de azúcar.
- 10 - las septoriosis causadas por fitopatógenos de la familia de *Mycosphaerellaceae*, en particular del género *Septoria*. Se puede citar a modo de ejemplo, la septoriosis de la zanahoria (*Septoria dauci*), del tomate (*Septoria lycopersici*) o del trigo (*Septoria tritici*),
- las verticilosis causadas por los fitopatógenos del género *Verticillium* en especial por *Verticillium dahliae* y *Verticillium albo-atrum* y que pueden afectar a diferentes tipos de plantas herbáceas como el tomate o la berenjena,
- 15 - la pirculariosis que afecta principalmente al arroz y es causada por *Magnaporthe grisea*,
- las moniliosis causadas por fitopatógenos del género *Monilinia* y que afectan principalmente a los árboles frutales. Se puede citar a modo de ejemplo de fitopatógenos *Monilinia fructigena* que ataca principalmente a los frutos con pepitas y *Monilinia laxa* que ataca principalmente a los frutos con hueso,
- Las enfermedades de podredumbre y mohos de los frutos causadas en especial por *Penicillium digitatum*, *Aspergillus Niger* o *Botrytis cinerea*.
- 20 - Las cercosporiosis causadas por hongos del género imperfecto *Cercospora* o por el género *Mycosphaerella*. Se puede citar la cercosporiosis de la remolacha (*Cercospora beticola*), o la cercosporiosis del maíz (*Cercospora zeaemaydis* y *Cercospora zeina*). La cercosporiosis negra que es una enfermedad foliar del banano y que es causada por *Mycosphaerella fijiensis*,
- 25 - Las helmintosporiosis causadas en especial por el género *Bipolaris* y que afecta principalmente a las gramíneas. Se puede citar la helmintosporiosis del arroz causada por *Bipolaris oryzae*, la helmintosporiosis del maíz causada por *Bipolaris maydis* y *Bipolaris zeicola*, la helmintosporiosis de los cereales causada por *Bipolaris sorokiniana*,
- Las royas causadas por hongos parasitarios del orden Pucciniales. A modo de ejemplo, se puede citar la roya del cafetal causada por los hongos basidiomicetos, *Hemileia vastatrix* y *Hemileia coffeicola*.
- 30 - El mal del pie que afecta principalmente a cereales y otras gramíneas, tales como el trigo, cebada y centeno. La contaminación tiene lugar en las raíces y los síntomas son visibles en el tallo, raíces (ennegrecimiento y necrosis) y las espigas (emblanqueamiento). Esta enfermedad produce una enfermedad de los semilleros. El mal del pie es causado principalmente por *Gaeumannomyces graminis*.
- 35 Las patologías criptogámicas que afectan a las partes aéreas pueden comprender también enfermedades de podredumbre y de moho del fruto o de las hojas, tales como la podredumbre gris, black rot (conocido también con el nombre de podredumbre negra o podredumbre seca) y *Macrophoma rot*. Estas patologías pueden implicar diferentes tipos de hongos. A modo de ejemplo, los hongos fitopatógenos que afectan a las hojas, frutos, bayas y/o flores, en especial en la viña, abarcan, sin estar limitados a *Guignardia bidwellii* (conocido también con el nombre de *Botryosphaeria bidwellii*) (Black rot), *Botryosphaeria dothidea* (*Macrophoma rot*) y *Botrytis cinerea* (podredumbre gris).
- 40 Se describe que la enfermedad criptogámica se puede seleccionar del grupo constituido por la alternariosis, fusariosis, septoriosis, verticilosis, pirculariosis, moniliosis, royas causadas por hongos parásitos del orden de Pucciniales, cercosporiosis, helmintosporiosis, mal del pie, enfermedades de podredumbre y moho de frutos, en especial la podredumbre gris, black rot y *Macrophoma rot*.
- 45 Se describe también que la patología criptogámica está asociada o es causada por un hongo fitopatógeno seleccionado del grupo constituido por *Verticillium dahliae*, *Verticillium albo-atrum*, *Magnaporthe grisea*, *Monilinia fructigena*, *Monilinia laxa*, *Penicillium digitatum*, *Aspergillus Niger*, *Botrytis cinerea*, *Septoria dauci*, *Septoria lycopersici*, *Septoria tritici*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium nivale*, *Alternaria triticina*, *Alternaria alternata*, *Alternaria dauci*, *Alternaria solani*, *Alternaria brassicicola*, *Alternaria brassicae*, *Guignardia bidwellii*, *Botryosphaeria dothidea*, *Botrytis cinerea*, *Cercospora beticola*, *Cercospora zeaemaydis*, *Cercospora zeina*, *Mycosphaerella fijiensis*, *Bipolaris oryzae*, *Bipolaris maydis*, *Bipolaris zeicola*, *Bipolaris sorokiniana*, *Gaeumannomyces graminis*, *Hemileia vastatrix* y *Hemileia coffeicola*.
- 50 Se describe también el uso de compuestos de fórmula (I) para prevenir o tratar una enfermedad de podredumbre o de moho del fruto y/o las hojas, en particular de la vid. Dicha enfermedad puede estar asociada a uno o varios patógenos

seleccionados entre la familia de *Botryosphaeriaceae*, y el género *Botrytis*, en especial *Botrytis cinerea*. Preferiblemente, la planta tratada es un cultivo de interés agronómico. A modo de ejemplo, las plantas de interés agrícola comprenden la vid, fresas, tomate, girasol y árboles frutales.

5 En el marco de las enfermedades criptogámicas que implican una contaminación de las partes aéreas de la planta como las hojas y los frutos, el compuesto de fórmula (I) se puede administrar durante los periodos de desarrollo foliar, floración y maduración de los frutos, por ejemplo, en forma de una solución pulverizable, directamente sobre los frutos y/o las hojas.

10 Se describe que el compuesto de fórmula (I) se puede usar para prevenir o tratar la podredumbre o moho de productos de cultivos. Se entiende por "productos de cultivos" los productos recogidos o recolectados, en especial las legumbres, frutos, flores o semillas. Los frutos abarcan, sin estar limitados, racimos de uvas o grosellas, bayas tales como moras y frambuesas, fresas, frutas de pepita como manzanas, cítricos, tomates y peras, frutas de hueso, en especial cerezas, melocotones, nectarinas, ciruelas, albaricoques, aguacates o incluso mangos. De forma más precisa, el compuesto de fórmula (I) se puede usar a modo de agente de conservación para el acondicionamiento y almacenamiento de los productos recogidos. Típicamente, el compuesto se puede aplicar a los productos recolectados, antes o durante su  
15 acondicionamiento, por pulverización.

Según la invención, las patologías criptogámicas de la madera abarcan las enfermedades llamadas de "decaimiento" tales como la yesca, *Botryosphaeria dieback*, en particular el Black Dead Arm, decaimiento por *Diplodia* o chancro por *Botryosphaeria*, eutipiosis, antracnosis y excoriosis. Estas enfermedades están asociadas a uno o varios patógenos tales como los que pertenecen a la familia de *Botryosphaeriaceae*.

20 La yesca, eutipiosis y Black Dead Arm son las principales enfermedades de la madera que afectan a la vid. Estas enfermedades se describen, entre otros, en Bertsch et al., *Plant Pathology*, 2013, 1-23, cuyo contenido se incorpora en la presente memoria por referencia.

Las patologías de la madera son causadas por diferentes tipos de patógenos criptogámicos. A modo de ejemplo, se pueden citar los patógenos que pertenecen a la familia de *Botryosphaeriaceae* en particular a los géneros *Spencermatinsia*, *Neofusicoccum*, *Botryosphaeria*, *Diplodia* y *Lasioidiplodia*, los patógenos que pertenecen al género *Eutypa*, por ejemplo *Eutypa lata*, o incluso los patógenos que pertenecen a los géneros *Phaeomoniella*, *Phaeoacremonium*, *Fomitiporia*, *Verticillium* o *Phomopsis* tales como *P. viticola*., *Phaeomoniella chlamydospora*, *Phaeoacremonium aleophilum*, *Eutypa lata*, *Fomitiporia mediterranea*, *Fomitiporia punctata*, *Botryosphaeria stevensii*, *Diplodia seriata*, *Neofusicoccum parvum*, *Stereum hirsutum* y *Verticillium longisporum* que están particularmente  
30 implicados en las enfermedades de decaimiento de la madera de la vid. A modo de ejemplo, *Eutypa lata* es el agente patógeno principal de la eutipiosis. *Neofusicoccum parvum* está asociado en especial a *Botryosphaeria dieback*, en especial al Black Dead Arm. La yesca está asociada en general a *Phaeomoniella chlamydospora*, *Phaeoacremonium aleophilum* y *Fomitiporia mediterranea*, así como a *Eutypa lata*.

35 Así, según una realización particular, la presente invención tiene por objeto el uso de un compuesto de fórmula (I) como se ha definido antes, para prevenir o tratar una enfermedad de la madera asociada a uno o varios patógenos seleccionados entre *Phaeomoniella chlamydospora*, *Phaeoacremonium aleophilum*, *Eutypa lata*, *Fomitiporia punctata*, *Botryosphaeria stevensii*, *Fomitiporia mediterranea*, *Diplodia seriata*, *Neofusicoccum parvum*, *Stereum hirsutum* y *Verticillium longisporum*.

40 De forma más general, un compuesto de fórmula (I) se puede usar para prevenir, tratar o ralentizar la colonización o infección de una planta por un patógeno seleccionado entre *Phaeomoniella chlamydospora*, *Phaeoacremonium aleophilum*, *Eutypa lata*, *Fomitiporia mediterranea*, *Fomitiporia punctata*, *Botryosphaeria stevensii*, *Diplodia seriata*, *Neofusicoccum parvum*, *Stereum hirsutum* y *Verticillium longisporum*

45 Para el tratamiento o prevención de las enfermedades de la madera, el compuesto según la invención se puede administrar sobre una parte de la planta infectada, que puede ser infectada o que presenta síntomas, por ejemplo, sobre una parte del tronco, pie, ramas o ramitas. Como alternativa, el compuesto según la invención se puede aplicar también sobre las hojas (por ejemplo, sobre la cara inferior de las hojas), las flores o frutos, en particular cuando se busca la administración sistémica.

50 En el contexto de los árboles frutales, la vid o incluso las plantas ornamentales u hortícolas, las contaminaciones por los agentes patógenos responsables de las enfermedades de la madera pueden ser consecuencia de la poda de las plantas. La poda de las plantas puede tener lugar durante el periodo vegetativo pero también durante el periodo "verde" (se habla entonces de despampanado, deshojado, desnietado, recorte o aclareo). Así, en una realización particular, el compuesto de fórmula (I) se puede usar para prevenir o tratar infecciones de heridas de poda, en especial en cultivos de vides, árboles frutales tales como albaricoquero, mango, ciruelo, melocotonero, manzano, peral, cerezo, membrillero, nogal, higuera, y los cítricos, cultivos de rosales, o incluso plantas perennes hortícolas y ornamentales.  
55 En esta realización, el compuesto de fórmula (I) se puede administrar a la planta en el momento de la poda, en forma de una composición de cualquier tipo, por ejemplo, en forma de una disolución pulverizable o incluso en forma de una pasta, un gel, un inserto o una disolución que se puede impregnar directamente sobre las heridas de poda o inyectar en la madera.

- Según un aspecto particular, el compuesto de fórmula (I) se puede usar para tratar o prevenir la necrosis de la madera, o ralentizar su desarrollo en una planta leñosa, estando asociada dicha necrosis con un patógeno de la familia de *Botryosphaeriaceae*, en especial *Neofusicoccum parvum*. Preferiblemente, la planta leñosa es un árbol, por ejemplo un árbol frutal, tal como el olivo, mango o eucalipto, un arbusto tal como el del arándano, o una vid. Como se ha mencionado antes, el compuesto según la invención se puede usar para prevenir o tratar una necrosis en una herida de poda.
- Según otro aspecto, los compuestos según la invención se pueden usar también durante la preparación de las plantas en el vivero, como agente desinfectante. En particular, se pueden usar para desinfectar el material de propagación, o las plantas cuando salen del vivero, antes de ponerlas en los campos.
- Según un aspecto particular, la presente invención tiene por objeto el uso de un compuesto de fórmula (I) para prevenir o tratar una enfermedad, preferiblemente criptogámica, de la vid.
- En el sentido de la invención, el término "vid" abarca todas las especies que pertenecen al género *Vitis*, en especial las que pertenecen al subgénero *Mucadinia*, tales como *V. rotundifolia* o *V. munsoniana*; y las que pertenecen al subgénero *Euvitis* incluyendo las especies americanas, tales como *V. berlandieri*, *V. riparia*, *V. rupestris*, *V. cinerea* o incluso *Vitis labrusca*, las especies asiáticas, tales como *V. amurensis* y *V. coignetiae*, y la especie eurasiática *V. vinifera* L. que es la especie más cultivada en Europa y en el mundo..
- Se describe que la enfermedad criptogámica de la vid puede ser una enfermedad de la madera, por ejemplo la yesca, una enfermedad de decaimiento por *Botryosphaeria* tal como Black Dead Arm, eutipiosis, antracnosis y excoriosis, o una enfermedad que afecta a las hojas o bayas como la podredumbre negra (Black rot), *Macrophoma rot* o podredumbre gris.
- Se puede tratar de una enfermedad criptogámica seleccionada entre la podredumbre gris, un *Botryosphaeria dieback*, en particular Black Dead Arm y yesca. Más en general, los compuestos de fórmula (I) se pueden usar para prevenir o tratar una enfermedad criptogámica de la vid que implica un patógeno que pertenece al género *Botrytis* o a la familia de *Botryosphaeriaceae*, preferiblemente *Botrytis cinerea* o *Neofusicoccum parvum*. Según una realización particular de la invención, la enfermedad criptogámica es una enfermedad de la madera de la vid, por ejemplo la yesca, una enfermedad de decaimiento por *Botryosphaeria* tal como el Black Dead Arm, eutipiosis, antracnosis y excoriosis. Para el tratamiento o prevención de las enfermedades que afectan a las partes aéreas de la vid tales como la podredumbre negra (black rot), *Macrophoma rot* o la podredumbre gris, es preferible tratar las vides al final del periodo vegetativo y/o durante los periodos de desarrollo foliar, florecimiento y/o maduración de los frutos. Típicamente, los compuestos se pueden aplicar en forma de una disolución, por ejemplo por pulverización sobre las vides. Para el tratamiento o prevención de las enfermedades de la madera de la vid, el compuesto se puede usar en vivero, cuando se preparan las plantas, o en el momento o en previsión de la poda.
- Por ejemplo, los compuestos de fórmula (I) se pueden usar para la desinfección del material de propagación o multiplicación, es decir los portainjertos e injertos. Los compuestos de fórmula (I) también se pueden usar para tratar injertos-estacas antes o después de la estratificación. Alternativamente o de forma adicional, los compuestos según la invención se pueden usar para la desinfección de las plantas antes de ponerlas en maceta o de ponerlas en el campo. A modo de ilustración, los materiales de propagación y las plantas se pueden poner en remojo en un baño que contiene uno o varios compuestos según la invención. Típicamente, se puede tratar de una disolución acuosa o hidroalcohólica que presenta una concentración comprendida entre 0,1 mM y 1 M de un compuesto de fórmula (I), por ejemplo, entre 1 mM y 500 mM de compuesto de fórmula (I).
- Si procede, se pueden pulverizar o impregnar usando una disolución que comprende uno o varios compuestos según la invención. De forma ventajosa, los compuestos según la invención se pueden usar en combinación o en sustitución de los tratamientos con agua caliente o usando baños de benomilo, captan o cloruro de didecilmetilamonio descritos en el estado de la técnica.
- Hay que decir que los compuestos según la invención se pueden usar también para tratar a modo preventivo las cepas madre de injertos y portainjertos.
- Como se ha mencionado antes, los compuestos según la invención se pueden usar para prevenir o tratar infecciones de las heridas de poda, en particular infecciones por *N. parvum*. Para este fin, se pueden aplicar antes o después de la poda, típicamente justo después de la poda por pulverización, impregnación o inyección en la madera.
- En el conjunto de los usos como los descritos antes, los compuestos preferidos según la invención son los compuestos de fórmula (Ia) y, en particular el subsalicilato de bismuto.
- De forma general, los compuestos de fórmula (I) preferiblemente se formulan en una composición fitofarmacéutica antes de usarlos. Por lo tanto, se describe también una composición fitofarmacéutica que comprende un compuesto de fórmula (I) y al menos un excipiente aceptable en el plano fitofarmacéutico. No hace falta decir que dicha composición fitofarmacéutica está dirigida y es adecuada para usar en el tratamiento o prevención de una enfermedad, preferiblemente criptogámica, en una planta. En otros términos, la composición fitofarmacéutica se caracteriza por una

forma galénica y un contenido de compuesto de fórmula (I) adecuado para administrarlo a una planta. No hace falta decir que el compuesto de fórmula (I) está presente como principio activo en la composición fitofarmacéutica.

La composición fitofarmacéutica puede comprender uno o varios compuestos de fórmula (I). Los compuestos preferidos son los compuestos de fórmula (Ia) y, en particular el subsalicilato de bismuto.

- 5 La composición fitofarmacéutica puede ser de cualquier tipo. Puede ser una solución acuosa o hidroalcohólica, una pasta, un gel en particular un gel acuoso (o hidrogel), un pegamento, una espuma, una emulsión de agua en aceite o de aceite en agua, una emulsión múltiple, una micro o nanoemulsión, una solución micelar, una suspensión o un coloide. La composición fitofarmacéutica también puede ser sólida, por ejemplo, en forma de un polvo o gránulos aplicables directamente por "espolvoreo" o que se deben disolver o dispersar en un disolvente adecuado antes de la aplicación.

10 La composición fitofarmacéutica también se puede presentar en forma de un inserto o implante dirigido a ser insertado en la madera, en particular en una parte de la madera de la planta infectada por el patógeno. La composición fitofarmacéutica se puede presentar entonces en forma de una matriz polimérica que permite la liberación controlada del compuesto de fórmula (I) en la madera.

- 15 La composición fitofarmacéutica comprende en general de 0,01% a 50% en peso del compuesto de fórmula (I) y de 50% a 99,99% en peso de uno o varios excipientes aceptables en el plano fitosanitario, estando expresados los porcentajes en peso con respecto al peso total de la composición. Preferiblemente, la composición fitofarmacéutica comprende en general de 0,1% a 30% en peso del compuesto de fórmula I y de 70% a 99,9% en peso de uno o varios excipientes.

- 20 Se entiende por "excipiente aceptable en el plano fitosanitario o fitofarmacéutico" un excipiente que no presenta toxicidad notable, en la dosis en la que se usa, con respecto a la planta, el entorno y el hombre. Los excipientes que se pueden usar en las composiciones fitofarmacéuticas son bien conocidos por el experto en la técnica y reúnen, entre otros, diluyentes y cargas, agentes humectantes, tensioactivos, por ejemplo tensioactivos iónicos, anfóteros o no iónicos, agentes dispersantes, agentes espesantes, agentes gelificantes, agentes que permiten la liberación controlada de los ingredientes activos, por ejemplo, los agentes de encapsulación o micelares tales como fosfolípidos, adyuvantes tixótrpos, colorantes, agentes antioxidantes, agentes conservantes, agentes estabilizantes, agentes filmógenos, vehículos en particular disolventes como agua y alcoholes inferiores, aceites de origen mineral, vegetal o animal, resinas, ceras, colofonia, látex, gomas tales como goma arábiga, agentes antiespumantes y agentes adhesivos.

- 30 Según un aspecto preferido, la composición comprende un excipiente seleccionado entre una carga o un diluyente, un agente espesante, un vehículo y un tensioactivo.

A modo de ejemplo de carga o diluyente, se pueden citar las arcillas, silicatos, por ejemplo, silicatos de magnesio o aluminio, caolín, talco, cuarzo, atapulguita, montmorillonita, bentonita, tierras de diatomeas, sílice, alúmina, piedra pómez, dolomita, celulosa y sus derivados, almidón y sus derivados y mezclas de estos.

- 35 A modo de ejemplo de vehículo, se puede citar el agua, alcoholes en particular butanol o un glicol, disolventes orgánicos, aceites minerales tales como aceite de vaselina y aceite de parafina, aceites vegetales, por ejemplo, aceite de colza o de girasol y sus mezclas. El agente tensioactivo puede ser un agente emulsionante, un agente dispersante o un agente humectante de tipo iónico o no iónico o una mezcla de dichos agentes tensioactivos. Entre ellos, se pueden citar por ejemplo, sales de poli(ácidos acrílicos), sales de ácidos lignosulfónicos, sales de ácidos fenol-sulfónicos o sales de ácidos naftalenosulfónicos, policondensados de óxido de etileno con alcoholes grasos, ácidos grasos o aminas grasas, fenoles sustituidos (en particular alquilfenoles), derivados de taurina, (en particular derivados alquilados), ésteres de alcoholes fosfóricos o policondensados de óxido de etileno con fenoles, ésteres de ácidos grasos con polioles, o derivados funcionales de sulfatos, sulfonatos o fosfatos de estos compuestos. Los tensioactivos comprenden también compuestos tales como alquilpoliglucósidos, sucroglicéridos de ácidos grasos, copolímeros de vinilpirrolidona-acetatos de vinilo, vinilpirrolidona-metacrilato de etilo, éter de metilo y vinilo-anhídrido maleico o incluso fosfolípidos. La presencia de al menos un agente tensioactivo puede ser necesaria cuando el principio activo y/o la carga son solo débilmente solubles o no son solubles en el vehículo usado, por ejemplo agua.

- 40 Como agente espesante adecuado, se pueden citar el hidrato de alúmina, hidróxido de magnesio, arcillas del tipo bentonita y sílice coloidal, albúmina, caseína de la leche, materias amiláceas, por ejemplo almidón de maíz, gomas vegetales, por ejemplo goma arábiga, goma de xantano y goma adraganto, y derivados del almidón, alginatos, carragenanos, éteres celulósicos tales como metilcelulosas, carboximetilcelulosas, metilhidroxietilcelulosas, hidroxietilcelulosas e hidroxipropilmetilcelulosas, poli(alcoholes vinílicos), poli(ácidos acrílicos) y sus mezclas.

50 Preferiblemente, la composición fitofarmacéutica comprende al menos un excipiente seleccionado entre los emulsionantes aniónicos o no iónicos y los aceites minerales o vegetales.

- 55 A modo de ejemplo, se pueden usar uno o varios excipientes, en particular uno o varios tensioactivos, recomendados por el ITCF (Instituto Técnico de los Cereales y Forrajes).

La composición fitofarmacéutica puede comprender además uno o varios agentes fitosanitarios o fitofarmacéuticos adicionales. El o los agentes fitosanitarios o fitofarmacéuticos adicionales se pueden seleccionar entre agentes plaguicidas, bactericidas, agentes fúngicos, virucidas, reguladores del crecimiento, estimuladores de defensas naturales de la planta tales como elicitores...

5 El agente elicitador puede ser un compuesto tal como laminarina, oligogalacturónidos o quitina.

El agente fungicida adicional puede seleccionarse por ejemplo entre fenhexamida, fluopiram, trifloxiestrobina, espiroxamina, epoxiconazol, piraclostrobin, mancozeb, cimoxanilo, fosetil-aluminio, folpel, tetraconazol, tebuconazol, sulfato de cobre, clortalonil, kiralaxil, fenpropimorfo, ciazofamida, ametocradina, metiram, ditianona y dimetomorfo

10 La composición fitofarmacéutica puede, además o alternativamente, comprender uno o varios compuestos seleccionados entre los abonos y agentes fertilizantes.

La composición fitofarmacéutica se puede preparar por métodos bien conocidos para el experto en la técnica, por ejemplo, mezclando un compuesto de fórmula (I) con uno o varios excipientes y opcionalmente uno o varios agentes fitosanitarios adicionales.

15 La forma galénica y los excipientes de la composición fitofarmacéutica dependen de la enfermedad tratada y/o del modo de administración deseado.

20 Los modos de administración según la invención abarcan la pulverización, espolvoreo, inyección en la madera o en las zonas de necrosis de la madera, impregnación o esparcimiento, en particular sobre las heridas de poda. También puede ser una administración por inmersión, por ejemplo, para el tratamiento del material de propagación y de las plantas. El modo de administración se puede basar también en la introducción de un inserto en la madera o necrosis de la madera. Cuando proceda, el compuesto o la composición según la invención se puede administrar en el agua de riego de la planta.

A modo de ilustración, una composición fitofarmacéutica puede ser una solución pulverizable que comprende de:

- 1% a 5% de un compuesto de fórmula (I)

- 1% a 10% de un agente tensioactivo, por ejemplo una lecitina,

25 - 85 a 98% de un vehículo, preferiblemente agua,

- opcionalmente de 1% a 20% de un agente filmógeno, preferiblemente un aceite mineral, un polisacárido,

- opcionalmente, de 0,1% a 5% de un agente fitofarmacéutico adicional, preferiblemente un agente fungicida.

Dicha solución preferiblemente se diluye por un factor de 2 a 10 antes de la aplicación.

30 La frecuencia, dosis y periodo de administración del compuesto o de la composición según la invención depende de la enfermedad criptogámica que se va a tratar o prevenir, así como del tipo de planta o cultivo que se va a tratar

A modo de ejemplo, se puede calcular que la dosis del compuesto (I) administrada para tratamiento está comprendida entre 1 g y 1 kg por ha de cultivo, preferiblemente de 5 g a 1 kg por ha de cultivo (por ejemplo, de cultivo de vides).

35 Para prevenir o tratar una enfermedad de las partes aéreas de la planta tal como la podredumbre gris, o el black rot, la composición fitofarmacéutica según la invención se puede usar en un cultivo tal como un huerto o un viñedo, a razón de al menos una vez al mes, por ejemplo 1 vez cada tres semanas, 1 vez cada dos semanas, o incluso 1 vez por semana. La composición fitofarmacéutica se aplica preferiblemente sobre las hojas y/o el fruto por pulverización. El ciclo de tratamiento se puede iniciar durante el periodo de desarrollo foliar y terminar en el momento de la recogida de los frutos o racimos.

40 Con el fin de prevenir las infecciones de las heridas de poda, el cultivo se puede tratar antes, durante y/o después de la poda, preferiblemente antes y después de la poda. Por ejemplo, las plantas (p. ej., vides o árboles frutales) se pueden tratar por pulverización con una composición fitofarmacéutica según la invención en las 48, 24 o 12 horas anteriores a la poda, incluso en la hora antes de la poda. Las plantas se pueden tratar de nuevo en las 24 horas o 48 horas posteriores a la poda, preferiblemente por pulverización o impregnación de una composición fitofarmacéutica según la invención. El tratamiento se puede repetir tantas veces como sea necesario, por ejemplo a razón de una vez por quincena.

45 También se puede aplicar la composición fitofarmacéutica según la invención simultáneamente con la poda, por ejemplo, usando un dispositivo que permite a la vez cortar y distribuir la composición fitofarmacéutica según la invención. En esta realización, la composición fitofarmacéutica según la invención se presenta ventajosamente en forma de una disolución líquida o gelificada.

A modo de ejemplo complementario de llevar a cabo la invención, un pie de vid que presenta una necrosis, por ejemplo una necrosis típica de la yesca, eutipiosis o de *Botryosphaeria dieback*, se puede tratar aplicando directamente sobre la zona de necrosis la composición fitofarmacéutica según la invención, pudiendo presentarse dicha composición en forma de una pasta.

- 5 Según un aspecto complementario, la presente invención tiene también por objeto un método para tratar o prevenir una enfermedad criptogámica en una planta, comprendiendo dicho método la aplicación de un compuesto de fórmula (I) o de una composición fitofarmacéutica tal como se ha definido antes, sobre al menos una parte de dicha planta. Hay que decir que este método se puede llevar a cabo según una cualquiera de las condiciones descritas antes.

- 10 La presente invención tiene también por objeto un método de desinfección del material de multiplicación usado durante la preparación de las plantas, o de una planta cuando sale del vivero, comprendiendo dicho método la aplicación de un compuesto de fórmula (I) o de una composición fitofarmacéutica según la invención sobre el material de multiplicación o la planta, preferiblemente por inmersión.

- 15 Finalmente, se describe también un método para prevenir o tratar la podredumbre o moho de los productos de la cosecha, comprendiendo dicho método la aplicación de un compuesto de fórmula (I) o una composición fitofarmacéutica como se ha definido antes, sobre dichos productos de la cosecha.

Esta aplicación se puede realizar, por ejemplo, por pulverización, antes o durante el acondicionamiento de los productos de la cosecha.

Otros aspectos y ventajas de la presente invención aparecerán tras la lectura de los siguientes ejemplos, que se deben considerar como ilustrativos y en ningún caso limitantes del alcance de la invención.

## 20 **EJEMPLOS**

Ejemplo 1: Estudio del crecimiento micelar de *N. parvum* aislado de Borgoña S-116 en diferentes medios de cultivo complementados - evaluación de la actividad biocida del subsalicilato de bismuto

- Protocolo

- 25 El hongo *N. parvum* de Borgoña se cultiva en medio sólido agar de dextrosa y patata (PDA 20 g/l) complementado con citrato de bismuto ( $C_6H_7BiO_4$  - MM=398,08 g/mol), en óxido de bismuto ( $Bi_2O_3$  - MM=465,95 g/mol), en subsalicilato de bismuto ( $C_7H_5BiO_4$  - MM=362,09 g/mol), en óxido de cobre ( $CuO$  - MM=79,54 g/mol - testigo "acción antifúngica") o en óxido de antimonio ( $O_3Sb_2$  - MM=291,5 g/mol).

Se han ensayado diferentes concentraciones de producto: 0 - 0,05 - 0,1 - 0,2 - 0,5 - 1 - 2 - 5 y 10 g/l es decir de 0 a 125 mM según el compuesto ensayado.

- 30 Se deposita un tapón circular de 7 mm de diámetro de micelio de 10 días de edad, de forma estéril en el centro de cada placa de Petri. A continuación, las placas de Petri se incuban a 25°C en la oscuridad y se lleva a cabo la medición del crecimiento del micelio (en mm) cada 24 horas hasta saturación de la placa testigo que no contiene ningún complemento es decir 5 días. Se llevaron a cabo 3 repeticiones técnicas y biológicas durante este ensayo.

- Resultados

- 35 La figura 1 muestra los resultados el D-1 de saturación del micelio en las cajas "testigo" es decir 4 días después. Se expresan en porcentaje medio (+/- desviación estándar) del crecimiento del micelio en comparación con los testigos (100%).

Los medios que contienen óxido de bismuto, citrato de bismuto u óxido de antimonio no inhiben significativamente el crecimiento del hongo en el medio de cultivo.

- 40 El óxido de cobre que es el testigo positivo de la inhibición del crecimiento de los hongos, tiene un efecto inhibitor con dosis pequeña y se observa una DL50 del hongo a partir de 5 mM. En comparación con este compuesto químico, el subsalicilato de bismuto inhibe de forma significativa el crecimiento micelar, con una DL50 de inhibición del crecimiento micelar a partir de 14 mM cuando se añade al medio de cultivo clásico del hongo.

- 45 Ejemplo 2: Estudio del crecimiento micelar de *B. cinerea* B0510 en diferentes medios de cultivo complementados - evaluación de la actividad biocida del subsalicilato de bismuto

Protocolo

Estos experimentos se llevaron a cabo en las mismas condiciones que el ejemplo 1 y se ha ensayado también la influencia del ácido salicílico ( $C_7H_6O_3$  - MM = 138,12 g/mol) en el medio de cultivo de *B. cinerea*. Hay que indicar que la saturación de micelio en las placas testigo tiene lugar al cabo de 9 días con *B. cinerea* B0510.

- 50 - Resultados

La figura 2 presenta los resultados obtenidos el D-1 de saturación del micelio en las placas "testigo" es decir después de 8 días. Se expresan en porcentaje medio (+/- desviación estándar) del crecimiento del micelio en comparación con los testigos (100%).

5 Los medios que contienen óxido de bismuto, citrato de bismuto u óxido de antimonio no inhiben significativamente el crecimiento del hongo en el medio de cultivo.

El óxido de cobre que es el testigo positivo de la inhibición del crecimiento de los hongos, tiene un efecto inhibitor con dosis pequeña y se observa una DL50 del hongo a partir de 5 mM. El subsalicilato de bismuto inhibe también el desarrollo micelar de *B. cinerea* con una DL50 a partir de 20 mM.

10 Ejemplo 3: Estudio del desarrollo de necrosis en las maderas de vid (*V. vinifera* L. cv Chardonnay) infectado por aislado de *N. parvum* de Borgoña S-116 después de tratamiento mediante baño con diferentes compuestos químicos (14 dpi)

#### Protocolo

15 Los entrenudos verdes de *V. vinifera* L. cv Chardonnay se perforan usando un taladro de 5 mm de diámetro. Cada entrenudo perforado después se sumerge durante 10 min en un baño de agua (testigo negativo) o de óxido de bismuto, ácido salicílico o subsalicilato de bismuto 15 mM. Después un tapón de micelio de aislados de *N. Parvum* de Borgoña o medio de malta (control) de 5 mm de diámetro se introduce en el entrenudo y después se recubre con parafilm. Los entrenudos a continuación se incuban a 25°C en la oscuridad con una humedad de aproximadamente 70% durante 14 días. Después de estos 14 días de inoculación, se elimina de los entrenudos la capa superficial de madera y después se calculan las áreas de necrosis usando el programa informático ImageJ®

20 Los resultados se expresan en porcentaje medio (+/- desviación estándar) de las áreas de necrosis observadas en los entrenudos. Se realizaron 3 repeticiones biológicas que comprende cada una 7 repeticiones técnicas por tratamiento durante este ensayo. Se realizó una prueba estadística de Duncan ( $p \leq 0,05$ ) con el fin de comparar los tratamientos.

#### - Resultados

25 La figura 3 presenta los resultados obtenidos para cada baño ensayado. De forma notable, el tratamiento con ácido salicílico 15 mM no inhibe significativamente el desarrollo de necrosis en los entrenudos inoculados. El tratamiento con óxido de bismuto disminuye solamente 5% el área de las necrosis. En cambio, el tratamiento previo con subsalicilato de bismuto 15 mM permite prevenir de forma significativa el desarrollo de necrosis con respecto a las muestras testigo, puesto que se observa una disminución de la superficie de las lesiones necróticas de cerca de 50%.

30 Por lo tanto, un tratamiento previo de los entrenudos mediante un baño de 10 minutos en el subsalicilato de bismuto 15 mM inhibe de forma considerable y significativa el crecimiento del hongo en la madera y por lo tanto la formación de necrosis.

Ejemplo 4: Evaluación de la fitotoxicidad del subsalicilato de bismuto sobre masas celulares de la vid (*V. vinifera* L. cv Chardonnay)

#### - Protocolo

35 Los callos (o masas de células indiferenciadas) de *V. vinifera* cv. Chardonnay se obtienen a partir de anteras como se describe en Mauro et al. (1986) y en Bertsch et al. (2005).

Todos los callos se trasplantan a medio sólido MPM1 (Perrin et al. 2004) de nueva aportación cada 3 semanas y se incuban a  $25 \pm 0,5^\circ\text{C}$  en la oscuridad con una humedad relativa de  $70 \pm 10\%$ .

Para este experimento se ha complementado el medio de cultivo de los callos con subsalicilato de bismuto, óxido de bismuto o ácido salicílico 0, 5 o 10 mM.

40 Este experimento se repitió 3 veces. Para cada condición, se usaron 15 callos blanco-amarillos, con un diámetro de  $10 \pm 2$  mm.

45 El crecimiento de los callos en cada condición ensayada se evalúa cada día por pesada durante 5 días. Las medias de los resultados obtenidos, así como las desviaciones estándar se someten a una prueba estadística de Duncan ( $p \leq 0,05$ ). Además de las pesadas los autores de la invención evalúan visualmente el aspecto y el color de los callos por seguimiento del medio de cultivo durante 2 meses.

#### - Resultados

Los resultados después de 5 días de cultivo indican que no hay ni inhibición ni aumento significativo del crecimiento de los callos en los diferentes medios de cultivo ensayados.

50 En lo que se refiere al aspecto y color de los callos no hay cambio en los medios complementados con óxido de bismuto 5 y 10 mM. Se observa una ligera coloración grisácea en la periferia de los callos pero no se constata ninguna

necrosis en los medios complementados con subsalicilato de bismuto o ácido salicílico 5 o 10 mM. Después de 2 semanas de cultivo, estos callos presentan zonas de multiplicación celular de color normal (blanco-amarillento) incluido desde zonas que presentan un color grisáceo después de 5 días de cultivo.

- 5 Después de 3 semanas de cultivo en medio MPM1 complementado, los callos se trasplantan a medio MPM1 de nueva aportación de blanco. Presentan un aspecto, un color y un crecimiento similares a los de los testigos y retoman todos un color blanco-amarillento después de 2 meses de experimentación. La adición de subsalicilato de bismuto no tiene, por lo tanto, ningún impacto en términos de crecimiento, multiplicación o aspecto necrótico en las células de la vid.

Ejemplo 5: Inducción de genes de defensa de la planta por el subsalicilato de bismuto y ácido salicílico en las masas celulares de la vid (*V. vinifera* L. cv Chardonnay)

- 10 - Protocolo

Los callos del ejemplo 4 se extraen después de 4 días de cultivo en medio MPM1 de blanco (testigo) o complementado con ácido salicílico 10 mM o subsalicilato de bismuto 10 mM, con el fin de ser usados para análisis moleculares por qRT-PCR como se describe en Ramirez-Suero et al. (2014). Se extrajeron 3 callos por condición para cada experimento.

- 15 Una vez extraído el ARN de estos callos y sintetizado su ADNc, se llevaron a cabo análisis por qRT-PCR de acuerdo con las condiciones descritas en Bénard-Gellon et al. (2014), con el fin de observar la expresión de 2 genes específicos de la ruta del ácido salicílico: *VvPR1* (temperatura de adquisición = 83°C) y *VvEDS1* (temperatura de adquisición = 77°C). Se realizaron 3 repeticiones técnicas y biológicas para cada muestra y cada gen ensayado. Los genes *VvACT* y *VvEF1-Cs* se usan como genes de referencia con el fin de normalizar los resultados. Se considera que los genes son sobreexpresados cuando la relación de inducción de los genes sea  $\geq 4$ . Los valores medios de expresión y las desviaciones estándar se calculan de acuerdo con el procedimiento de Hellemans et al. (2007). Se realizan pruebas de Duncan ( $p \leq 0,05$  - Duncan 1955) y análisis multifactoriales ANOVA (StatgraphicPlus®-Manugistics, Inc., Maryland, EE.UU.) para comparar la expresión de los genes en cada medio de cultivo.
- 20

- Resultados

- 25 Los resultados se presentan en la figura 4. Los análisis moleculares por qRT-PCR indican que los callos cultivados en un medio complementado con ácido salicílico 10 mM o subsalicilato de bismuto sobreexpresan los genes *VvPR1* y *VvEDS1*. De forma remarcable, estos estudios de la expresión de genes de defensa muestran que el subsalicilato de bismuto induce una sobreexpresión de los genes característicos de la ruta del ácido salicílico en las células que han estado en contacto con este producto y que esta sobreexpresión génica es superior a la observada con el ácido salicílico.
- 30

Ejemplo 6: evaluación de la actividad biocida del subsalicilato de bismuto en un panel de 8 hongos modelo (comparativo).

Se ha evaluado la actividad biocida del subsalicilato de bismuto en 8 hongos modelo complementarios, en concreto:

- *Alternaria alternata*: microorganismo modelo de la alternariosis (o quemadura por alternaria).
- 35 - *Fusarium graminearum*: microorganismo modelo de la fusariosis,
- *Septoria tritici*: microorganismo responsable de la septoriosis del trigo
- *Verticillium dahliae*: microorganismo modelo de la verticiliosis,
- *Magnaporthe grisea*: microorganismo modelo de la piriculariosis
- *Monilia laxa*: microorganismo modelo de la moniliosis
- 40 - *Penicillium digitatum*: agente responsable de la podredumbre de los frutos, en concreto de los cítricos (podredumbre verde)
- *Black aspergilli* (*Aspergillus niger*): microorganismo responsable de la aparición de moho negro en los frutos y las legumbres.

La actividad biocida del compuesto se ha vuelto a ensayar también en *Botrytis cinerea*.

- 45 Los ensayos de actividad se han realizado en placas de Petri en medio agar-agar salvo para *Septoria tritici* donde se ha usado una técnica llamada sobre microcúpulas. La actividad biocida del subsalicilato de bismuto se ha evaluado en 7 concentraciones, en concreto 1 g/l, 3 g/l, 7 g/l, 9 g/l, 10 g/l y 12,5 g/l. Con este fin, se ha preparado una solución madre acuosa que comprende 50 g/ml de compuesto, 1% (v/v) de MES 10 mM, pH 6 y 3% (v/v) de DMSO.

Ensayo en placas de Petri

Se ha llevado a cabo el siguiente protocolo:

5 El subsalicilato de bismuto se ha integrado en el medio de cultivo de agar-agar antes de solidificación en la concentración deseada. Después de solidificación, se ha depositado un inserto fúngico o un confeti previamente sumergido en una suspensión de esporas, en el centro de cada placa de Petri, en condiciones estériles. Las placas de Petri se han incubado en un recinto microbiológico a 21°C. El crecimiento micelar (diámetro en cm) se ha realizado hasta saturación de las placas de Petri "testigo". Cada experimento se ha realizado por triplicado. Se han calculado los valores medios de diámetro para cada experimento, incluido para el experimento testigo, es decir realizado en ausencia de subsalicilato de bismuto. La eficacia en porcentaje del compuesto a una concentración dada se ha determinado según la siguiente fórmula:

$$10 \text{ eficacia} = \frac{\text{Media (diámetro de testigo)} - \text{Media (diámetro en presencia de compuesto)}}{\text{Media (diámetro de testigo)}} \times 100$$

Una eficacia de 100% significa que el compuesto ha inhibido completamente el crecimiento micelar.

Los resultados obtenidos se presentan en la siguiente tabla 1:

	Concentración de subsalicilato de bismuto en g/l						
	1	3	5	7	9	10	12,5
Hongos fitopatógenos							
<i>Magnaporthe grisea</i>	0%	0%	100%	100%	100%	100%	100%
<i>Verticillium dahliae</i>	0%	0%	0	100%	100%	100%	100%
<i>Penicillium digitatum</i>	0	0%	100%	100%	100%	100%	100%
<i>Black aspergilli</i>	0%	0%	0%	36	100%	100%	100%
<i>Botrytis cinerea</i>	0%	39%	100%	100%	100%	100%	100%
<i>Alternaria alternata</i>	32	100%	100%	100%	100%	100%	100%
<i>Fusarium graminearum</i>	0%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
<i>Monilia laxa</i>	0%	0%	100%	100%	100%	100%	100%

Tabla 1: eficacia del subsalicilato de bismuto en función de la concentración y de la especie criptogámica.

15 Los resultados ilustrados en la tabla anterior muestran que el subsalicilato de bismuto es capaz de bloquear totalmente el crecimiento micelar en todos los fitopatógenos ensayados, en una concentración de 9 g/l. Este efecto de inhibición también se puede observar para una concentración de 3 g/l frente a *Alternaria alternata* y *Fusarium graminearum*.

Ensayo en microcúpulas

La actividad biocida del subsalicilato de bismuto se ha ensayado también en *Septoria triticii* por un ensayo en microcúpula. Se ha llevado a cabo el siguiente protocolo:

20 El subsalicilato de bismuto se ha integrado en el medio de cultivo. A continuación se ha inoculado en el medio una suspensión de esporas de *Septoria triticii*. Las microcúpulas se han incubado en un recinto microbiológico a 21°C. Cada experimento se ha realizado tres veces. Para cada microcúpula, se ha determinado el número de colonias formadas (UFC). Se han calculado los valores medios de UFC para cada experimento así como para el experimento testigo realizado en ausencia de subsalicilato de bismuto. El porcentaje de eficacia del compuesto a una concentración dada se ha determinado según la siguiente fórmula:

$$25 \text{ eficacia} = \frac{\text{Media (UFC de testigo)} - \text{Media (UFC en presencia de compuesto)}}{\text{Media (UFC de testigo)}} \times 100$$

Una eficacia de 100% significa que el compuesto ha inhibido completamente la formación de colonia (es decir que no hay ninguna colonia formada).

Los resultados obtenidos se presentan en la siguiente tabla 2:

	Concentración de subsalicilato de bismuto en g/l						
	1	3	5	7	9	10	12,5

<i>Septoria triticii</i>	0%	0%	100%	100%	100%	100%	100%
--------------------------	----	----	------	------	------	------	------

Tabla 2: Eficacia del subsalicilato de bismuto en función de la concentración frente a *Septoria triticii*.

Se observa por lo tanto que el subsalicilato de bismuto inhibe totalmente la formación de colonias de *Septoria triticii* desde que está presente en el medio en una concentración de 5 g/l.

5 Ejemplo 7: Evaluación del potencial efecto biocida del bismuto del subsalicilato en dos microorganismos oomicetos responsables del mildiú (comparativo).

Estudios relativamente antiguos mencionan que el bismuto del subsalicilato tendría una actividad biocida frente a los oomicetos patógenos responsables del mildiú.

10 Por lo tanto, el subsalicilato de bismuto se ha ensayado en dos oomicetos modelos, en concreto *Plasmopora viticola* y *Phytophthora infestans*, Este estudio se ha llevado a cabo sobre discos vegetales. Se ha aplicado por pulverización una disolución acuosa de subsalicilato (concentración de 1 g/l a 12,5 g/l) al conjunto de los discos vegetales, usando un banco de pulverización equipado con 5 boquillas. El volumen de aplicación ha sido 200 l/ha. La pulverización se ha repetido una vez. Cada experimento se ha realizado por duplicado en 20 discos foliares. Después del periodo de incubación (en general 8 días), se realiza una puntuación de la colonización y de la esporulación del oomiceto con una lupa binocular. La superficie de los discos foliares colonizada por el oomiceto y la intensidad de la esporulación  
15 conducen a la atribución de una nota en una escala de 0 a 10. Se calculó una media de los daños en los diez discos y permitió obtener la eficacia de la modalidad en comparación con los discos no tratados. La fórmula de cálculo aplicada es: (Eficacia de la dosis d) =  $\{[(T-D)/T]*100\}$  donde T es la nota media de ataque a los 10 discos testigos, y D es la observada en los discos tratados con la dosis d. Los porcentajes de eficacia del subsalicilato de bismuto son los siguientes (tabla 3):

Oomicetos	Concentración de subsalicilato de bismuto en g/l						
	1	3	5	7	9	10	12,5
<i>Plasmopora viticola</i>	0%	0%	0%	0%	0%	22,5%	37,5%
<i>Phytophthora infestans</i>	0%	0%	0%	0%	5,0%	2,5%	6,3%

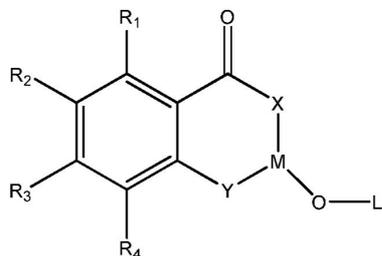
20 Resulta de estos resultados que la actividad biocida del subsalicilato de bismuto es muy pequeña, incluso insignificante frente a los oomicetos responsables del mildiú. Por lo tanto, la acción biocida del subsalicilato de bismuto es específica de los hongos fitopatógenos.

Referencias bibliográficas citadas en la parte experimental:

- Bénard-Gellon M, Farine S, Goddard ML, Schmitt M, Stempien E, Pensec F, Laloue H, Mazet-Kieffer F, Fontaine F, Larignon P, Chong J, Tarnus C, Bertsch C (2014) Toxicity of extracellular proteins from *Diplodia seriata* and *Neofusicoccum parvum* involved in grapevine botryosphaeria dieback. Protoplasma doi: 10.1007/s00709-014-0716-y.
- Bertsch C, Kieffer F, Maillot P, Farine S, Butterlin G, Merdinoglu D, Walter B (2005) Genetic chimerism of *Vitis vinifera* cv. Chardonnay 96 is maintained through organogenesis but not somatic embryogenesis. BMC Plant Biology 5:20.
- Hellemans J, Mortier G, De Paepe A, Speleman F, Vandesompele J (2007) qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. Genome Biol 8 (2): R19.
- Mauro M, Nef C, Fallot J (1986) Stimulation of somatic embryogenesis and plant regeneration from anther culture of *Vitis vinifera* cv. Cabernet-Sauvignon. Plant Cell Reports 5:377-380.
- Perrin M, Gertz C, Masson JE (2004) High efficiency of regenerable embryogenic callus from anther filaments of 19-grapevine genotypes grown worldwide. Plant Science 167:1343-1349.
- Ramirez-Suero M, Bénard-Gellon M, Chong J, Laloue H, Stempien E, Abou-Mansour E, Fontaine F, Larignon P, Mazet-Kieffer F, Farine S, Bertsch C (2014) Extracellular compounds produced by fungi associated with Botryosphaeria dieback induce differential defence gene expression patterns and necrosis in *Vitis vinifera* cv. Chardonnay cells. Protoplasma. doi: 10.1007/s00709-014-0643-y.
- Bertsch C, Ramírez-Suero M, Magnin-Robert M, Larignon P, Chong J, Abou-Mansour E, Spagnolo A, Clément C, Fontaine F (2013) Grapevine trunk diseases: complex and still poorly understood. Plant Pathology 62:243-265.
- Andolfi A, Mugnai L, Luque J, Surico G, Cimmino A, Evidente A (2011) Phytotoxins produced by fungi associated with grapevine trunk diseases. Toxins 3:1569-1605.
- Urbez-Torres JR (2011) The status of *Botryosphaeriaceae* species infecting grapevines. Phytopathol. Mediterr. 50 S5-S45

REIVINDICACIONES

1. Uso de un compuesto de fórmula (I)



en la que

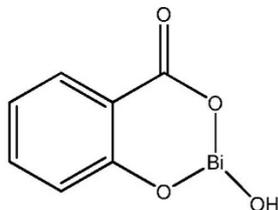
- 5 - R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> y R<sub>4</sub> se seleccionan independientemente entre el grupo constituido por un hidrógeno, un halógeno, preferiblemente -Cl, -Br o -F, -OH, -O(CO)CH<sub>3</sub>, un alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, un alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, -NH<sub>2</sub>, y -CN,
- X e Y son independientemente entre sí, O, S o NR<sub>5</sub>,
- M es Bi,
- L es H, o un motivo de vectorización que comprende de 1 a 40 átomos de carbono, y
- 10 - Cada grupo R<sub>5</sub> es independientemente H o un alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>,

o una de sus sales, como agente fitofarmacéutico para tratar o prevenir una enfermedad criptogámica que se desarrolla en la madera de una planta, estando asociada o siendo causada dicha enfermedad criptogámica por uno o varios hongos fitopatógenos seleccionados entre los basidiomicetos parásitos y los ascomicetos parásitos.

2. Uso según la reivindicación 1, en el que el compuesto de fórmula (I) se caracteriza por que:

- 15 - R<sub>1</sub> y R<sub>3</sub> son -H,
- R<sub>2</sub> y R<sub>4</sub> se seleccionan independientemente de -H, -Cl y -F
- X e Y son O
- M es Bi, y
- 20 - L es H, un hidroxi-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, o -(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)<sub>n</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-OH donde n es un número entero que va de 1 a 19, preferiblemente de 1 a 10.

3. Uso según la reivindicación 1 o 2, en el que el compuesto de fórmula (I) es el subsalicilato de bismuto:



- 25 4. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la planta es una planta leñosa seleccionada entre el grupo constituido por árboles frutales, árboles forestales, árboles y arbustos ornamentales y árboles y arbustos hortícolas.
- 5. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicha enfermedad criptogámica es una enfermedad de la madera de la vid.
- 6. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicha enfermedad criptogámica es una enfermedad criptogámica de la madera asociada a uno o varios patógenos seleccionados de los patógenos que pertenecen a la familia de *Botryosphaeriaceae*, al género *Eutypa*, género *Phaeomoniella*, género *Phaeoacremonium*, género *Formitoporia*, género *Verticillium*, género *Stereum* o género *Phomopsis*.
- 30 7. Uso según la reivindicación 6, en el que dicha enfermedad criptogámica está asociada a un patógeno seleccionado del grupo constituido por *Phaeomoniella chlamydospora*, *Phaeoacremonium aleophilum*, *Eutypa lata*, *Fomitoporia*

*mediterranea*, *Fomitiporia punctata*, *Botryosphaeria stevensii*, *Diplodia seriata*, *Neofusicoccum parvum*, *Stereum hirsutum* y *Verticillium longisporum*.

- 5 8. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que dicha enfermedad criptogámica se selecciona del grupo constituido por la yesca, *Botryosphaeria dieback*, en particular el Black Dead Arm, decaimiento por *Diplodia* o chancro por *Botryosphaeria*, eutipiosis, antracnosis y excoriosis.
9. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el compuesto de fórmula (I) se usa para prevenir o tratar una necrosis de la madera asociada a un patógeno de la familia *Botryosphaeriaceae*.
10. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que el compuesto de fórmula (I) se usa para prevenir o tratar infecciones de heridas de poda.
- 10 11. Uso según la reivindicación 10, en el que el compuesto de fórmula (I) se administra a la planta en el momento de la poda, en forma de una disolución pulverizable, una pasta, un gel, un inserto o una composición que se puede impregnar sobre las heridas de poda o inyectar en la madera.
12. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que el compuesto de fórmula (I) se usa para tratar o prevenir una enfermedad de la madera de la vid, en el momento de preparación de las plantas en el vivero o en el momento o en previsión de la poda.
- 15 13. Uso según la reivindicación 12, en el que el compuesto de fórmula (I) se usa para desinfectar el material de propagación o de multiplicación tal como los portainjertos o injertos.
14. Método para tratar o prevenir una enfermedad criptogámica que se desarrolla en la madera y asociada o causada por uno o varios hongos fitopatógenos seleccionados entre los basidiomicetos parásitos y ascomicetos parásitos en una planta, comprendiendo dicho método la aplicación del compuesto de fórmula (I) como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, sobre al menos una parte de dicha planta.
- 20

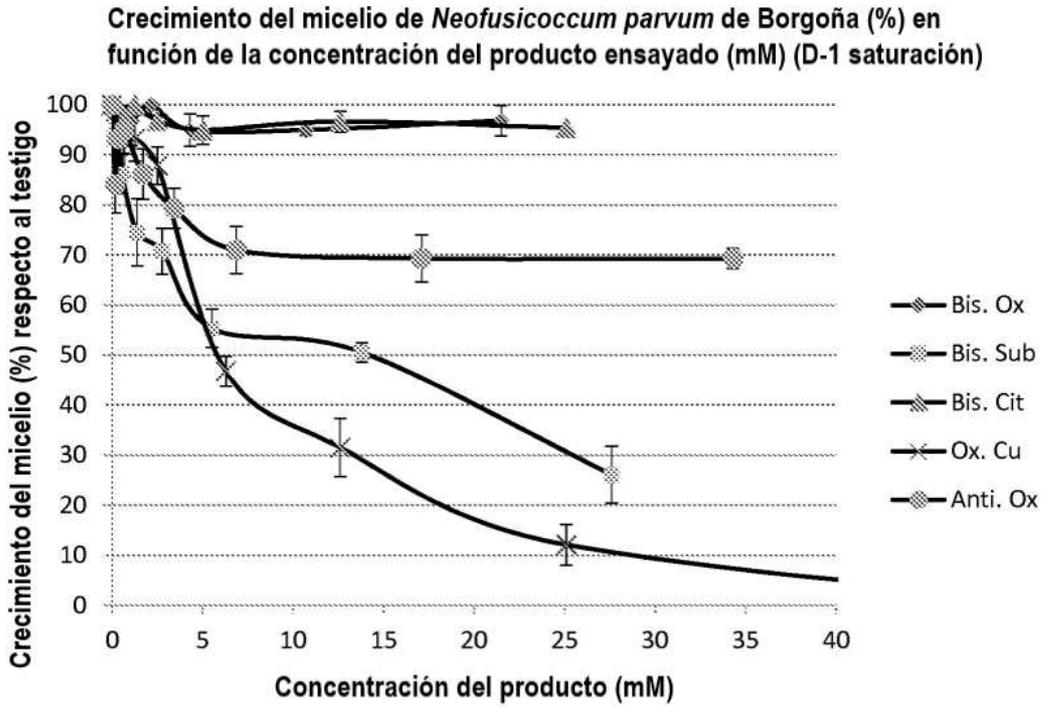


Figura 1

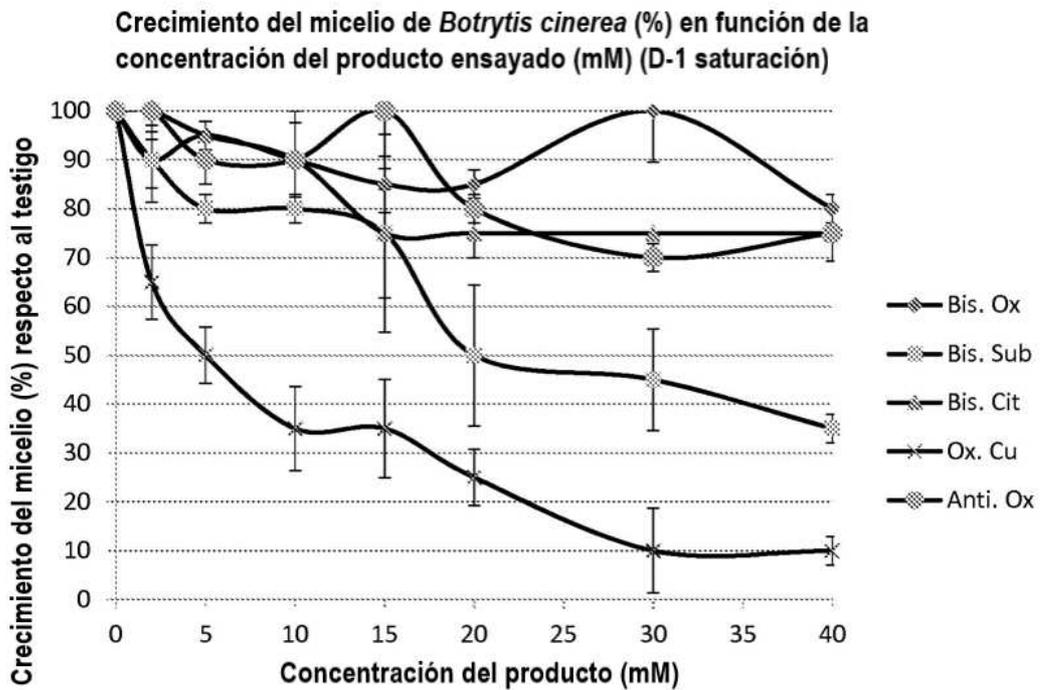


Figura 2

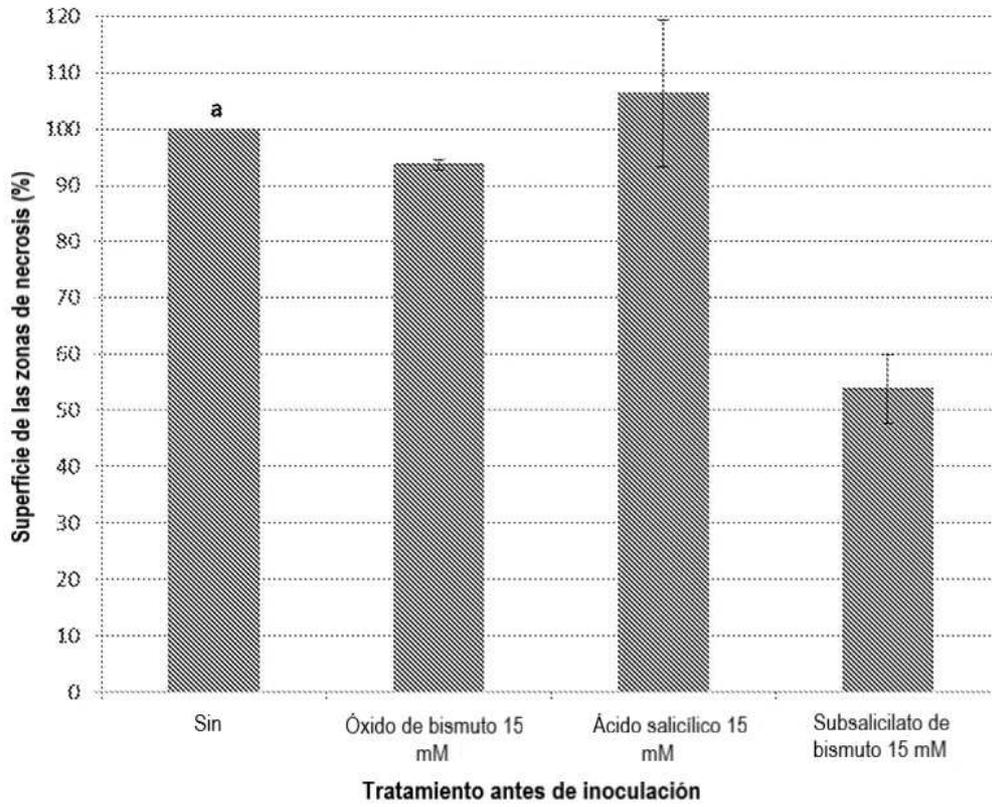


Figura 3

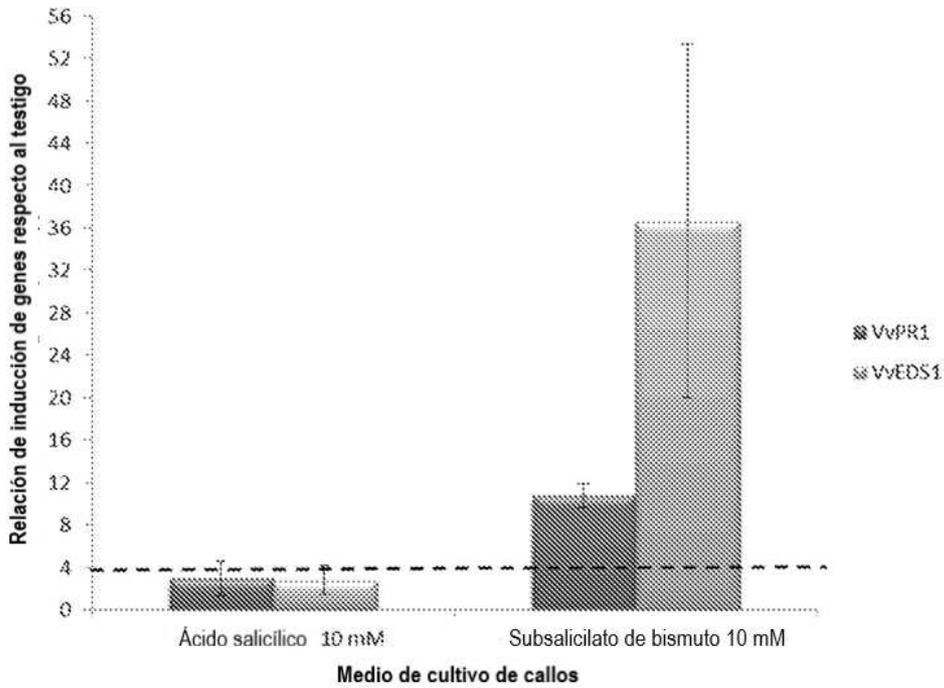


Figura 4