

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 805 948**

51 Int. Cl.:

A01P 3/00 (2006.01)

A01N 43/54 (2006.01)

A01N 37/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.03.2017 PCT/EP2017/055764**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.09.2017 WO17157814**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.03.2017 E 17709451 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.04.2020 EP 3429356**

54 Título: **Método para controlar hongos tolerantes al pirimetanil**

30 Prioridad:

14.03.2016 EP 16160132

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

16.02.2021

73 Titular/es:

**JANSSEN PHARMACEUTICA NV (100.0%)
Turnhoutseweg 30
2340 Beerse , BE**

72 Inventor/es:

**DE BOLLE, MIGUEL, FRANCESCO, COLETA;
BARKER, MARTYN, CHARLES y
VERHEYEN, DIMITRI, DENNIS, PAUL**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 805 948 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).

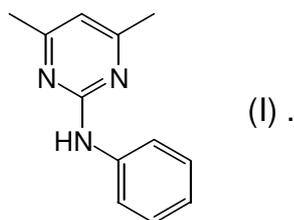
DESCRIPCIÓN

Método para controlar hongos tolerantes al pirimetanil

La presente invención se refiere a un método para controlar hongos resistentes al pirimetanil o tolerantes al pirimetanil, o para restablecer la sensibilidad al pirimetanil en hongos resistentes al pirimetanil o tolerantes al pirimetanil, poniendo en contacto dichos hongos con una composición que comprende una combinación de pirimetanil y un ácido alcano carboxílico de fórmula $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_n-\text{COOH}$ donde n es 4 a 7 en la que la relación en peso de pirimetanil a ácido alcano carboxílico de fórmula $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_n-\text{COOH}$ es de 1/10 a 1/100. Además, la presente invención también se refiere a un método para proteger materiales, plantas, semillas, cultivos o frutas que están en riesgo de infectarse por hongos resistentes al pirimetanil u hongos tolerantes al pirimetanil mediante la puesta en contacto de dichos materiales, plantas, semillas, cultivos o frutas con una composición que comprende una combinación de pirimetanil y un ácido alcano carboxílico $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_n-\text{COOH}$ donde n es 4 a 7 en la que la relación en peso de pirimetanil al ácido alcano carboxílico de fórmula $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_n-\text{COOH}$ es de 1/10 a 1/100.

Los microorganismos son extremadamente útiles, e incluso indispensables, en procesos tales como, por ejemplo, la fermentación alcohólica, la maduración del queso, la cocción del pan, la producción de penicilina, la purificación de aguas residuales, la producción de biogás y similares. Sin embargo, los microorganismos también pueden ser nocivos o muy peligrosos; causando enfermedades infecciosas, formando metabolitos venenosos o carcinógenos y atacando materiales valiosos, perturbando procesos de producción o deteriorando la calidad de los productos.

El pirimetanil, componente (I), es un fungicida de contacto que inhibe la biosíntesis de la metionina y tiene propiedades protectoras y curativas. Se puede aplicar como un tratamiento de semillas o como una pulverización foliar a un número de cultivos. El pirimetanil previene enfermedades causadas por un amplio espectro de hongos, incluyendo *Alternaria* spp., *Botrytis cinerea*, *Cercospora* spp., *Cladosporium* spp., *Colletotrichum* spp., *Monilia* spp., *Mycosphaerella* spp., *Penicillium* spp. y *Venturia* spp. El pirimetanil (I) es el nombre genérico para 4,6-dimetil-N-fenil-2-pirimidinamina, que se puede representar por la fórmula



Green et al, Pesticide Science, vol. 54, n.º 3, 1998, páginas 313-314 describe la influencia de formulantes y formación de sales en la volatilización y actividad del pirimetanil. El documento US 2010/137337 describe cocristales de pirimetanil y un compuesto que forma cocristales que tiene al menos un grupo funcional de tipo ácido orgánico. Desafortunadamente, los hongos pueden desarrollar resistencia contra el pirimetanil dando como resultado la necesidad de aumentar la cantidad usada de pirimetanil o incluso requerir el uso de un fungicida diferente. Por lo tanto, existe la necesidad de controlar dichos hongos resistentes al pirimetanil u hongos tolerantes al pirimetanil o de restablecer la sensibilidad al pirimetanil de los hongos resistentes al pirimetanil o tolerantes al pirimetanil.

Se ha descubierto recientemente que se pueden controlar los hongos resistentes al pirimetanil o tolerantes al pirimetanil, o que se puede restablecer su sensibilidad al pirimetanil, añadiendo un ácido alcano carboxílico de fórmula $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_n-\text{COOH}$ donde n es 4 a 7 a una composición que comprende pirimetanil. Este descubrimiento es muy sorprendente puesto que estos ácidos alcano carboxílicos de fórmula $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_n-\text{COOH}$ donde n es 4 a 7 tienen poca a ninguna actividad fungicida.

Los ácidos alcano carboxílicos de fórmula $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_n-\text{COOH}$ donde n es 4 a 7 (en lo sucesivo denominados componente II) tienen la siguiente estructura:

| n | Estructura | Nombre | Componente (II) |
|---|---|------------------|-----------------|
| 4 | $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_4-\text{COOH}$ | Ácido hexanoico | (II-a) |
| 5 | $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_5-\text{COOH}$ | Ácido heptanoico | (II-b) |
| 6 | $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_6-\text{COOH}$ | Ácido octanoico | (II-c) |
| 7 | $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_7-\text{COOH}$ | Ácido nonanoico | (II-d) |

El pirimetanil (I) puede estar presente en forma de base libre o en forma de una sal de adición de ácido, obteniéndose esta por reacción de la forma básica con un ácido apropiado. Los ácidos apropiados comprenden, por ejemplo, ácidos

5 inorgánicos, tales como los ácidos hidroácidos, es decir, ácido fluorhídrico, clorhídrico, bromhídrico y yodhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico, ácido fosfínico y similares; o ácidos orgánicos, tales como, por ejemplo, ácido acético, propanoico, hidroxiaacético, 2-hidroxi-propanoico, 2-oxo-propanoico, etanodioico, propanodioico, butanodioico, (Z)-2-butenodioico, (E)-2-butenodioico, 2-hidroxi-butanodioico, 2,3-dihidroxi-butanodioico, 2-hidroxi-1,2,3-propano-tricarboxílico, metanosulfónico, etanosulfónico, bencenosulfónico, 4-metilbenceno-sulfónico, ciclohexanosulfámico, 2-hidroxi-benzoico, 4-amino-2-hidroxi-benzoico y los ácidos similares.

10 Las proporciones relativas en peso de componente (II) - es decir, el ácido alcano carboxílico de fórmula $\text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)}_n\text{-COOH}$ donde n es 4 a 7 - al componente (I) - es decir, pirimetanil - que se necesita para restablecer la sensibilidad al pirimetanil de los hongos resistentes al pirimetanil o tolerantes al pirimetanil o para controlar los hongos resistentes al pirimetanil o tolerantes al pirimetanil es de 100/1 a 10/1.

15 En una realización, la presente invención proporciona un método para controlar los hongos resistentes al pirimetanil u hongos tolerantes al pirimetanil mediante la puesta en contacto de dichos hongos con una composición que comprende una combinación de pirimetanil y un ácido alcano carboxílico de fórmula $\text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)}_n\text{-COOH}$ donde n es 4 a 7 en la que la relación en peso de pirimetanil al ácido alcano carboxílico de fórmula $\text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)}_n\text{-COOH}$ es de 1/10 a 1/100. Otras relaciones en peso de pirimetanil al ácido alcano carboxílico de fórmula $\text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)}_n\text{-COOH}$ donde n es 4 a 7 son de 1/25 a 1/75 o de 1/25 a 1/50.

20 La presente invención también proporciona un método para proteger materiales, plantas, semillas, cultivos o frutas que están en riesgo de infectarse por hongos resistentes al pirimetanil u hongos tolerantes al pirimetanil mediante la puesta en contacto de dichos materiales, plantas, semillas, cultivos o frutas con una composición que comprende una combinación de pirimetanil y un ácido alcano carboxílico $\text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)}_n\text{-COOH}$ en donde n es 4 a 7 en la que la relación en peso de pirimetanil a ácido alcano carboxílico de fórmula $\text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)}_n\text{-COOH}$ es de 1/10 a 1/100. Otras relaciones en peso de pirimetanil al ácido alcano carboxílico de fórmula $\text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)}_n\text{-COOH}$ donde n es 4 a 7 son de 1/25 a 1/75 o de 1/25 a 1/50.

25 La presente invención proporciona además un método para superar la resistencia al pirimetanil en hongos resistentes al pirimetanil o tolerantes al pirimetanil que comprende poner en contacto los hongos resistentes al pirimetanil o tolerantes al pirimetanil con una composición que comprende una combinación de pirimetanil y un ácido alcano carboxílico de fórmula $\text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)}_n\text{-COOH}$ donde n es 4 a 7 donde la relación en peso de pirimetanil al ácido alcano carboxílico de fórmula $\text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)}_n\text{-COOH}$ es de 1/10 a 1/100. Otras relaciones en peso de pirimetanil al ácido alcano carboxílico de fórmula $\text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)}_n\text{-COOH}$ donde n es 4 a 7 son de 1/25 a 1/75 o de 1/25 a 1/50.

30 En otra realización, la presente invención se refiere a:

- el uso de una combinación de pirimetanil y un ácido alcano carboxílico de fórmula $\text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)}_n\text{-COOH}$ donde n es 4 a 7 en la que la relación en peso de pirimetanil al ácido alcano carboxílico de fórmula $\text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)}_n\text{-COOH}$ es de 1/10 a 1/100 para reducir la resistencia al pirimetanil en el tratamiento de hongos resistentes al pirimetanil;

35 - el uso de una combinación de pirimetanil y un ácido alcano carboxílico de fórmula $\text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)}_n\text{-COOH}$ donde n es 4 a 7 en la que la relación en peso de pirimetanil al ácido alcano carboxílico de fórmula $\text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)}_n\text{-COOH}$ es de 1/10 a 1/100 para restablecer la sensibilidad contra pirimetanil en el tratamiento de hongos resistentes al pirimetanil o tolerantes al pirimetanil;

40 - el uso de una combinación de pirimetanil y un ácido alcano carboxílico de fórmula $\text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)}_n\text{-COOH}$ donde n es 4 a 7 en la que la relación en peso de pirimetanil al ácido alcano carboxílico de fórmula $\text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)}_n\text{-COOH}$ es de 1/10 a 1/100 para reducir el nivel de resistencia al pirimetanil en hongos resistentes al pirimetanil o tolerantes al pirimetanil; y

- el uso de una combinación de pirimetanil y un ácido alcano carboxílico de fórmula $\text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)}_n\text{-COOH}$ donde n es 4 a 7 en la que la relación en peso de pirimetanil al ácido alcano carboxílico de fórmula $\text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)}_n\text{-COOH}$ es de 1/10 a 1/100 para gestionar el control de los hongos resistentes al pirimetanil o tolerantes al pirimetanil.

45 En una realización adicional, la presente invención se refiere a una composición para el uso en el tratamiento de hongos resistentes al pirimetanil que comprende una combinación de pirimetanil y un ácido alcano carboxílico de fórmula $\text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)}_n\text{-COOH}$ donde n es 4 a 7 en la que la relación en peso de pirimetanil al ácido alcano carboxílico de fórmula $\text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)}_n\text{-COOH}$ es de 1/10 a 1/100, y uno o más portadores. Otras relaciones en peso de pirimetanil al ácido alcano carboxílico $\text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)}_n\text{-COOH}$ en la que n es 4 a 7 son de 1/25 a 1/75 o de 1/25 a 1/50.

50 Las composiciones de la presente invención son útiles para proteger las plantas de cultivo, o partes de plantas, por ejemplo, fruta, brotes, flores, follaje, tallos, raíces, esquejes, tubérculos de plantas y semillas contra el ataque fúngico. El tratamiento postcosecha de cultivos recolectados contra hongos fitopatógenos puede prevenir o reducir ciertos trastornos de almacenamiento postcosecha tales como, por ejemplo, escaldadura, quemadura, ablandamiento, descomposición senescente, zonas de lenticelas, depresión amarga (bitter pit), pardeamiento, corazón acuoso, descomposición vascular y similares.

55 Como ejemplos de la amplia variedad de plantas de cultivo en las que se pueden usar las combinaciones de los componentes (I) y (II) de acuerdo con la presente invención, se pueden citar, por ejemplo, cereales, por ejemplo, trigo,

5 cebada, centeno, avena, arroz, sorgo y similares; remolachas, por ejemplo, remolacha azucarera y remolacha forrajera; frutas y bayas con hueso y con pepitas, por ejemplo, manzanas, peras, ciruelas, melocotones, almendras, cerezas, fresas, frambuesas y moras; plantas leguminosas, por ejemplo, judías, lentejas, guisantes, semillas de soja; plantas oleaginosas, colza, mostaza, amapola, olivo, girasol, coco, planta de aceite de ricino, cacao, cacahuetes; cucurbitáceas, por ejemplo, calabazas, pepinillos, melones, pepinos, calabacines; plantas fibrosas, por ejemplo, algodón, lino, cáñamo, yute; frutas cítricas, por ejemplo, naranja, limón, pomelo, mandarina; vegetales, por ejemplo, espinaca, lechuga, espárrago, 10 brasicáceas tales como coles y nabos, zanahorias, cebollas, tomates, patatas, pimiento picante y dulce; plantas de tipo laurel, por ejemplo, aguacate, canela, alcanfor; o plantas tales como maíz, tabaco, nueces, café, caña de azúcar, té, vides, lúpulos, plátanos, árbol de caucho, así como plantas ornamentales, por ejemplo, flores, arbustos, árboles de hoja caduca y árboles de hoja perenne tales como coníferas. Esta enumeración de plantas de cultivo se da con el fin de ilustrar la invención y no como limitación de la misma.

15 Las composiciones de la presente invención también son útiles en la conservación de la madera, productos de madera, cuero, tejidos naturales o sintéticos, fibras, telas no tejidas, tejidos técnicos, materiales plastificados y termoplásticos no plastificados como polipropileno, cloruro de polivinilo, etc..., papel, papel pintado, material aislante, laminados, compuestos de moldeo a base de amina, pinturas y revestimientos, telas, revestimientos de suelos, fibras sintéticas de tipo polímeros plastificados, arpillera, cuerda y cordaje y materiales biodegradables y para proteger dichos materiales contra el ataque y la destrucción por bacterias u hongos. Como madera o productos de madera que pueden conservarse con las composiciones de acuerdo con la presente invención se consideran, por ejemplo, productos de madera tales como vigas, listones, traviesas ferroviarias, postes telefónicos, cerramientos, revestimientos de madera, artículos de mimbre, 20 ventanas y puertas, tablero de contrachapado, tablero de partículas, tableros de madera ("waferboard"), aglomerado, ensamblado, vigas usadas sobre el suelo en ambientes expuestos tales como tarima y vigas usadas en contacto con el suelo o ambientes de agua dulce o de agua salada, puentes o productos de madera que se usan generalmente en la construcción de viviendas, construcción y carpintería. Como materiales biodegradables además de la madera que pueden beneficiarse del tratamiento con las composiciones de la invención, se incluye el material celulósico tal como el algodón.

25 Las composiciones de la presente invención también son útiles en la prevención de la contaminación microbiana o formación de biopelículas en varios procesos industriales como juntas, tubos y tuberías en contacto con fluidos o implicados en el transporte de fluidos, cintas transportadoras, superficies y componentes de plástico usados en el transporte, procesamiento o producción de alimentos, y actividades médicas como equipos y dispositivos médicos como catéteres, marcapasos, implantes, equipo de cirugía y tejidos estériles.

30 Las composiciones de la presente invención son útiles para proteger los materiales de ingeniería contra los microorganismos. Los materiales de ingeniería que se prevé proteger pueden ser pegamentos, colas, pinturas y artículos de plástico, lubricantes refrigerantes, fluidos hidráulicos acuosos y otros materiales no vivos que pueden infectarse por, o descomponerse por, los microorganismos.

35 Las composiciones de acuerdo con la presente invención que comprenden una combinación de componente(I), pirimetanil, y componente (II), un ácido alcano carboxílico de fórmula $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_n-\text{COOH}$ donde n es 4 a 7, en la que la relación en peso de pirimetanil al ácido alcano carboxílico de fórmula $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_n-\text{COOH}$ es desde 1/10 hasta 1/100 comprenden además uno o más portadores aceptables.

40 Estos portadores son cualquier material o sustancia con los que la composición de los componentes (I) y (II) se formula para facilitar su aplicación/diseminación al locus que se debe tratar, por ejemplo, disolviendo, dispersando o difundiendo dicha composición, y/o para facilitar su almacenamiento, transporte o manipulación sin perjudicar su efectividad antifúngica. Dichos portadores aceptables pueden ser un sólido o un líquido o un gas que se ha comprimido para formar un líquido que incluye la condición física descrita como fluido supercrítico, es decir, las composiciones de la presente invención se pueden usar de manera adecuada como concentrados, emulsiones, concentrados emulsionables, concentrados en suspensión miscibles en aceite, líquido miscible en aceite, concentrados solubles, disoluciones, 45 granulados, polvos, pulverizaciones, aerosoles, gránulos o polvos.

Los portadores y adyuvantes adecuados para el uso en las composiciones de la presente invención pueden ser sólidos o líquidos y corresponden a sustancias adecuadas conocidas en la técnica de la formulación, tales como, por ejemplo, sustancias minerales naturales o regeneradas, disolventes, dispersantes, tensioactivos, agentes humectantes, adhesivos, espesantes, aglutinantes, fertilizantes o agentes anticongelantes.

50 En muchos casos, las composiciones que se deben usar directamente se pueden obtener de concentrados, tales como, por ejemplo, concentrados emulsionables, concentrados en suspensión o concentrados solubles, después de la dilución con medios acuosos u orgánicos, se prevé que dichos concentrados estén cubiertos por el término composición según se utiliza en las definiciones de la presente invención. Dichos concentrados pueden diluirse hasta una mezcla lista para el uso en un tanque de pulverización antes del uso. Preferentemente, las composiciones de la invención deberían contener desde aproximadamente 0.01 hasta 95 % en peso de la combinación de componentes (I) y (II). Más preferentemente este intervalo es desde 0.1 hasta 90 % en peso. Más preferentemente este intervalo es desde 1 hasta 80 % en peso, dependiendo del tipo de formulación que se debe seleccionar para fines de aplicaciones específicas, como se explicará en detalle en lo sucesivo.

Un concentrado emulsionable es una formulación homogénea, líquida, de los componentes (I) y (II) que se deben aplicar como una emulsión después de la dilución en agua. Un concentrado en suspensión es una suspensión estable del principio activo en un fluido que está previsto para la dilución con agua antes del uso. Un concentrado soluble es una formulación homogénea, líquida que se debe aplicar como una solución verdadera de los principios activos después de la dilución en agua.

Las composiciones de acuerdo con la presente invención se pueden usar en un tratamiento postcosecha de cultivos, en particular, de fruta. En este último caso, la fruta se pulverizará con o se sumergirá o empapará en una formulación líquida o la fruta se recubrirá con una composición cerosa. Esta última composición cerosa se prepara convenientemente mezclando completamente un concentrado en suspensión con una cera adecuada. Las formulaciones para pulverizar, sumergir o empapar las aplicaciones puede prepararse después de la dilución de un concentrado tal como, por ejemplo, un concentrado emulsionable, un concentrado en suspensión o un líquido soluble, con un medio acuoso. Dicho concentrado en la mayoría de los casos consiste en los principios activos, un agente de dispersión o de suspensión (tensoactivo), un agente espesante, una pequeña cantidad de disolvente orgánico, un agente humectante, opcionalmente algún agente anticongelante y agua.

Las composiciones biocidas de la presente invención también se pueden usar para proteger las semillas contra los hongos. Para este fin, las presentes composiciones fungicidas se pueden recubrir sobre las semillas, en cuyo caso, los granos de semillas se empapan consecutivamente con una composición líquida del principios activos o si se recubren con una composición previamente combinada. Las composiciones también pueden pulverizarse o atomizarse sobre las semillas usando, por ejemplo, un atomizador de disco rotativo.

20 **Parte experimental**

Experimento 1: ensayo en placa con veneno

Nombre del componente (I): pirimetanil

Nombre del componente (II): ácido hexanoico (= CH₃-(CH₂)_n-COOH donde n es 4)

Preparación de la prueba: a cada pocillo de una placa de microtitulación de 24 pocillos, se añaden 2 ml de Agar Glucosa (GA: 10 g glucosa, 1.5 g K₂HPO₄, 2 g KH₂PO₄, 1 g (NH₄)₂SO₄, 0.5 g MgSO₄ y 12.5 g de agar en 1 litro de agua desionizada). Los compuestos de la prueba, pirimetanil, así como un ácido alcano carboxílico (II), se disuelven en DMSO con la concentración adecuada y se añaden al agar líquido en gotículas de 5 µl cada uno. El medio nutriente se inocula con los hongos de la prueba añadiendo 2.5 µl de una suspensión de espora/micelio. Las placas de micropocillos se incubaron entonces a oscuras a 20 °C y 60 % de humedad relativa. El crecimiento de los hongos se evaluó después de dos semanas, cuando el diámetro de crecimiento de los controles sin tratar había alcanzado 15 mm.

Los patógenos(hongos) usados como organismos modelo representativos para hongos resistentes al pirimetanil u hongos tolerantes al pirimetanil son:

- cepa PE110014 de *Penicillium expansum*, resistente al pirimetanil (EC₅₀ = 15.40 ppm, EC₉₅ >100 ppm)
- cepa PE110030 de *Penicillium expansum*, resistente al pirimetanil (EC₅₀ = 16.38 ppm, EC₉₅ >100 ppm)
- 35 - cepa PE110048 de *Penicillium expansum*, resistente al pirimetanil (EC₅₀ = 22.39 ppm, EC₉₅ >100 ppm)

(Como comparación, una cepa sensible al pirimetanil de tipo PE110101 de *Penicillium expansum* tiene EC₅₀ = 0.29 ppm y EC₉₅ = 0.88 ppm, mientras que una tolerante al pirimetanil de tipo PE110091 de *Penicillium expansum* tiene EC₅₀ = 5.01 ppm y EC₉₅ = 74.99 ppm).

Evaluación:

40 Después de un periodo de incubación adecuado, se midieron los diámetros de las colonias sobre el agar. El porcentaje de crecimiento (no % de efecto, véase a continuación) se calcula entonces para cada tratamiento comparando el diámetro de las colonias con el diámetro para los controles sin tratar (que es 15 mm).

Cálculo:

45 El efecto de añadir un ácido alcano carboxílico de fórmula CH₃-(CH₂)_n-COOH (donde n es 4 a 7) para restablecer la sensibilidad al pirimetanil de los hongos resistentes al pirimetanil o tolerantes al pirimetanil se calculó usando la fórmula de sinergia de Colby (Colby S.R., Weeds (1967), 15(1), 20-22).

50 Cuando **a** es el % de crecimiento (no el % de actividad) todavía observado bajo tratamiento con un compuesto A solo a una concentración dada y **b** es el % de crecimiento todavía observado bajo tratamiento con el compuesto B solo a una concentración dada, el crecimiento esperado **esp** bajo tratamiento con la combinación de ambos compuestos a las mismas concentraciones es:

$$\text{esp} = (a \times b) / 100.$$

ES 2 805 948 T3

Cuando el crecimiento observado de los patógenos de la prueba bajo la combinación es menor que el crecimiento esperado, hay sinergia.

Abreviaturas:

esp: crecimiento esperado de los patógenos de la prueba según se calcula usando la fórmula de Colby;

5 obs: crecimiento observado de los patógenos de la prueba.

Tabla 1: % de crecimiento de hongos resistentes al pirimetanil PE110014, PE110030 y PE110048 sobre un medio de agar glucosa desafiado con pirimetanil (0 y 10 ppm) y ácido hexanoico (0, 250, 500 y 750 ppm)

| PE110014, % de crecimiento | | crecimiento observado | | |
|----------------------------|---------|-----------------------|-----------|-----|
| | | pirimetanil | | |
| | | 0 ppm | 10 ppm | |
| ácido hexanoico | 0 ppm | 100 | 67 | esp |
| | 250 ppm | 100 | 60 | 67 |
| | 500 ppm | 100 | 60 | 67 |
| | 750 ppm | 100 | 53 | 67 |

| PE110030, % de crecimiento | | crecimiento observado | | |
|----------------------------|---------|-----------------------|-----------|-----|
| | | pirimetanil | | |
| | | 0 ppm | 10 ppm | |
| ácido hexanoico | 0 ppm | 100 | 80 | esp |
| | 250 ppm | 100 | 53 | 80 |
| | 500 ppm | 100 | 40 | 80 |
| | 750 ppm | 100 | 40 | 80 |

10

| | | crecimiento observado | | |
|-----------------|---------|-----------------------|-----------|-----|
| | | pirimetanil | | |
| | | 0 ppm | 10 ppm | |
| ácido hexanoico | 0 ppm | 100 | 53 | esp |
| | 250 ppm | 100 | 47 | 53 |
| | 500 ppm | 100 | 33 | 53 |
| | 750 ppm | 100 | 20 | 53 |

En la Tabla 1 se puede observar que cuando se evalúa el ácido hexanoico solo a 250, 500 y 750 ppm no tiene ningún efecto fungicida contra los tres hongos resistentes al pirimetanil (columna con 0 ppm de pirimetanil). Cuando se añade ácido hexanoico a pirimetanil, el crecimiento observado de los hongos resistentes al pirimetanil es inferior al crecimiento esperado, demostrando de este modo la capacidad del ácido hexanoico para restablecer la sensibilidad al pirimetanil.

15

Experimento 2: tratamiento de la fruta

Objetos de la prueba:

Manzanas o peras sin tratar (detalles a continuación), inoculadas con patógenos fúngicos cortando las frutas con un punzón contaminado sobre dos manchas, e incubadas a 20 °C y 96 % humedad relativa.

5 Los patógenos(hongos) usados como organismos modelo representativos para hongos resistentes al pirimetanil u hongos tolerantes al pirimetanil son:

- cepa PE110091 de *Penicillium expansum*, tolerante al pirimetanil (EC₅₀ = 5.01 ppm, EC₉₅ = 74.99 ppm)

Tratamiento:

10 Preventivo: las frutas se sumergen durante 30 segundos en agua corriente que contiene la concentración adecuada de los compuestos de la prueba. Una hora después, las frutas tratadas se infecta con un punzón sumergido en una suspensión de esporas del hongo de la prueba.

Curativo: las frutas se infectan primero con un punzón y se tratan por inmersión cuatro horas después.

Evaluación:

15 Después de un periodo de incubación adecuado, se midieron los diámetros de las zonas infectadas con un calibrador. El diámetro promedio se calcula para todas las zonas en el mismo tratamiento (entre 14 y 40 zonas por tratamiento, véase a continuación). El porcentaje de efecto del tratamiento se calcula entonces comparando el diámetro promedio de las zonas con el promedio para los controles sin tratar. Un porcentaje de efecto superior demuestra un efecto superior sobre la reducción del crecimiento fúngico.

Cálculo:

20 El efecto de añadir un ácido alcano carboxílico de fórmula CH₃-(CH₂)_n-COOH (donde n es 4 a 7) para restablecer la sensibilidad al pirimetanil de los hongos resistentes al pirimetanil o tolerantes al pirimetanil se calculó usando la fórmula de sinergia de Limpel (Limpel, L.E. et al. (1962) "Weed control by dimethyl tetrachloroterephthalate alone and in certain combinations", Proceedings of the N. E. Weed Control Conference 16: 48-53).

25 Cuando **a** es el % de efecto obtenido por el compuesto A solo a una concentración dada y **b** es el % de efecto obtenido por el compuesto B solo a una concentración dada, el efecto esperado **e** de la combinación de ambos compuestos a las mismas concentraciones es:

$$e = a + b - (a \times b)/100.$$

Cuando el efecto observado de la combinación es superior al efecto esperado, hay sinergia, indicando de este modo que se ha restablecido la sensibilidad al pirimetanil.

30 Formulación:

El pirimetanil se añadió a agua corriente como el 40 % de una formulación de PENBOTEC 400SC disponible en el comercio para obtener una concentración de 100 ppm de pirimetanil.

El ácido alcanoico se añadió a agua corriente para obtener una solución de 2000 ppm, o el ácido alcanoico se añadió a la composición de pirimetanil con una concentración de 2000 ppm.

35 Fruta: Manzana biológica "Elstar"

Patógeno: PE110091 de *Penicillium expansum* (tolerante al pirimetanil)

Tratamiento: Curativo

Repeticiones: Dos cortes por fruta, 15 frutas por tratamiento

Comienzo: 11 de marzo de 2014

40 Evaluaciones: 17 de marzo (6 días), 20 de marzo (9 días)

Diámetro promedio de podredumbre sin tratar: 6 días: 21.3 mm

9 días: 36.0 mm

Tabla 2: % de efecto sobre el hongo PE110091 tolerante al pirimetanil desafiado con pirimetanil (0 y 100 ppm) y ácido hexanoico (0 y 2000 ppm)

| % de efecto después de 6 días | | observado | | |
|-------------------------------|------|-------------|-----------|-----|
| | | pirimetanil | | esp |
| | | 0 | 100 | |
| conc. | ppm | | | |
| ácido hexanoico | 0 | 0 | 19 | esp |
| | 2000 | 15 | 42 | 31 |

| % de efecto después de 9 días | | observado | | |
|-------------------------------|------|-------------|-----------|-----|
| | | pirimetanil | | esp |
| | | 0 | 100 | |
| conc. | ppm | | | |
| ácido hexanoico | 0 | 0 | 12 | esp |
| | 2000 | 6 | 24 | 17 |

5 En la Tabla 2 se puede observar que cuando se evalúa el ácido hexanoico solo a 2000 ppm tiene poco efecto fungicida contra el hongo PE110091 tolerante al pirimetanil (columna con 0 ppm de pirimetanil). Cuando se añade ácido hexanoico al pirimetanil, el % de efecto observado es superior al % de efecto esperado demostrando de este modo la capacidad del ácido hexanoico para restablecer la sensibilidad al pirimetanil.

REIVINDICACIONES

1. Método para controlar los hongos resistentes al pirimetanil u hongos tolerantes al pirimetanil mediante la puesta en contacto de dichos hongos con una composición que comprende una combinación de pirimetanil y un ácido alcano carboxílico de fórmula $\text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)}_n\text{-COOH}$ donde n es 4 a 7 en la que la relación en peso de pirimetanil al ácido alcano carboxílico de fórmula $\text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)}_n\text{-COOH}$ es de 1/10 a 1/100.
5
2. Método para proteger materiales, plantas, semillas, cultivos o frutas que están en riesgo de infectarse por hongos resistentes al pirimetanil u hongos tolerantes al pirimetanil mediante la puesta en contacto de dichos materiales, plantas, semillas, cultivos o frutas con una composición que comprende una combinación de pirimetanil y un ácido alcano carboxílico $\text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)}_n\text{-COOH}$ donde n es 4 a 7 en la que la relación en peso de pirimetanil a ácido alcano carboxílico de fórmula $\text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)}_n\text{-COOH}$ es de 1/10 a 1/100.
10
3. Método para superar la resistencia al pirimetanil en hongos resistentes al pirimetanil o tolerantes al pirimetanil que comprende poner en contacto los hongos resistentes al pirimetanil o tolerantes al pirimetanil con una composición que comprende una combinación de pirimetanil y un ácido alcano carboxílico de fórmula $\text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)}_n\text{-COOH}$ donde n es 4 a 7 en la que la relación en peso de pirimetanil al ácido alcano carboxílico de fórmula $\text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)}_n\text{-COOH}$ es de 1/10 a 1/100.
15
4. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 donde el ácido alcano carboxílico de fórmula $\text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)}_n\text{-COOH}$ tiene n = 4.
5. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 donde el ácido alcano carboxílico de fórmula $\text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)}_n\text{-COOH}$ tiene n = 5.
- 20 6. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 donde el ácido alcano carboxílico de fórmula $\text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)}_n\text{-COOH}$ tiene n = 6.
7. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 donde el ácido alcano carboxílico de fórmula $\text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)}_n\text{-COOH}$ tiene n = 7.
8. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 donde la relación en peso de pirimetanil al ácido alcano carboxílico de fórmula $\text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)}_n\text{-COOH}$ es de 1/25 a 1/75.
25
9. Método de acuerdo con la reivindicación 8 donde la relación en peso de pirimetanil al ácido alcano carboxílico de fórmula $\text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)}_n\text{-COOH}$ es de 1/25 a 1/50.
10. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 donde la puesta en contacto comprende la pulverización, inmersión o recubrimiento.
- 30 11. Uso de una combinación de pirimetanil y un ácido alcano carboxílico de fórmula $\text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)}_n\text{-COOH}$ según se define en una cualquiera de las reivindicaciones anteriores para reducir la resistencia al pirimetanil en el tratamiento de hongos resistentes al pirimetanil.
- 35 12. Uso de una combinación de pirimetanil y un ácido alcano carboxílico de fórmula $\text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)}_n\text{-COOH}$ según se define en una cualquiera de las reivindicaciones anteriores para restablecer la sensibilidad contra el pirimetanil en el tratamiento de hongos resistentes al pirimetanil o tolerantes al pirimetanil.
13. Una composición para el uso en el tratamiento de hongos resistentes al pirimetanil que comprende una combinación de pirimetanil y un ácido alcano carboxílico de fórmula $\text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)}_n\text{-COOH}$ como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, y uno o más portadores.