

MÉTODO PARA CONTROLAR UNA FITOENFERMEDAD RESISTENTE A
MÚLTIPLES FÁRMACOS DE TIPO EXUDADO

CAMPO TÉCNICO

- 5 La presente solicitud reivindica prioridad y el beneficio de la solicitud de patente japonesa N.º 2017-099583 presentada el 19 de mayo de 2017, cuyos contenidos completos se incorporan en la presente por referencia.

La presente invención se refiere a un método para controlar una fitoenfermedad resistente a múltiples fármacos de tipo eflujo.

10 ANTECEDENTES DE LA TÉCNICA

- 1 Recientemente, el uso frecuente de agentes de control de fitoenfermedades da como resultado una emergencia de un hongo particular en el que se adquiere cualquier resistencia a una pluralidad de agentes de control de fitoenfermedades que se han utilizado para ello. Se dice que estos hongos
- 15 que tienen resistencia adquirida han adquirido cualquier resistencia a una pluralidad de agentes de control de fitoenfermedades al mutar el sitio de acción del agente de control de fitoenfermedades (proteína diana) o al adquirir capacidad para descomponer el agente de control de fitoenfermedades.

- Por otro lado, se ha informado recientemente la presencia de algunos
- 20 hongos en los que se han adquirido sus resistencias no solo a los agentes de control de fitoenfermedades que se usaron para ello sino también los otros agentes de control de fitoenfermedades, por una adquisición de una capacidad para exportar un agente de control de fitoenfermedades fuera de las células (véanse los Documentos No de Patente 1 y 2).

25 LISTA DE CITAS

DOCUMENTO NO PATENTE

2 Documento no de patente 1: *Pest Management Science*. 2006; 62, 195-207

Documento no patente 2: *European Journal of Plant Pathology*. 2013;
5 135, 683-693

SUMARIO DE LA INVENCION

(PROBLEMAS QUE SE HAN DE RESOLVER MEDIANTE LA INVENCION)

3 Un objeto de la presente invención consiste en proporcionar un método para controlar fitoenfermedades causadas por un hongo en las que se adquiere una resistencia a un agente de control de fitoenfermedades por una adquisición
10 de una capacidad para exportar un agente de control de fitoenfermedades fuera de las células (en lo sucesivo en el presente documento, dicho hongo se denomina en ocasiones “hongo resistente a múltiples fármacos de tipo eflujo”) (en lo sucesivo en el presente documento, dicha fitoenfermedad con frecuencia se denomina “fitoenfermedad resistente a múltiples fármacos de tipo eflujo”).
15

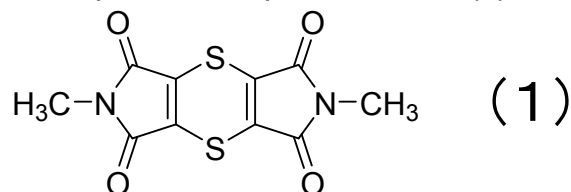
(MEDIOS PARA RESOLVER LOS PROBLEMAS)

Los presentes inventores hallaron un método que muestra una excelente eficacia de control contra fitoenfermedades resistentes a múltiples fármacos de tipo eflujo y, como resultado, que un compuesto de ditiintetracarboxamida representado por la siguiente fórmula (1) tiene una excelente eficacia de control
20 contra fitoenfermedades resistentes a múltiples fármacos de tipo eflujo.

Es decir, la presente invención proporciona lo siguiente.

[1] Un método para controlar una fitoenfermedad causada por un hongo resistente a múltiples fármacos de tipo eflujo, comprendiendo dicho método una
25 etapa de aplicación de una cantidad eficaz de un compuesto de

ditiintetracarboxamida representado por la fórmula (1):



a una planta o suelo donde crece la planta.

[2] El método para controlar una fitoenfermedad de acuerdo con el punto
5 [1], en el que el hongo resistente a múltiples fármacos de tipo eflujo es un hongo en el que se adquiere una resistencia a un agente de control de fitoenfermedades por una sobreexpresión de uno o más transportadores de membrana seleccionados entre el grupo que consiste en un transportador ABC y un transportador MFS.

10 [3] El método para controlar una fitoenfermedad de acuerdo con [1] o [2], en el que la fitoenfermedad es una o más fitoenfermedades seleccionadas entre el grupo que consiste en enfermedad del trigo y enfermedad de las uvas.

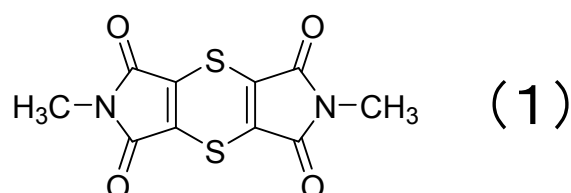
[4] El método para controlar una fitoenfermedad de acuerdo con [1] o [2], en el que el hongo resistente a múltiples fármacos de tipo eflujo es uno o más
15 hongos resistentes a múltiples fármacos de tipo eflujo seleccionados entre el grupo que consiste en hongo de la mancha de la hoja del trigo Septoria y hongo de moho gris de las uvas.

[5] El método para controlar una fitoenfermedad de acuerdo con uno cualquiera de los puntos [1] a [4], en el que el hongo resistente a múltiples
20 fármacos de tipo eflujo es un hongo resistente a múltiples fármacos de tipo eflujo que tiene una resistencia derivada de una mutación de un gen que codifica la proteína diana del agente de control de fitoenfermedades y/o una resistencia derivada de una sobreexpresión de la proteína diana, siendo dicha

resistencia contra uno o más agentes de control de fitoenfermedades seleccionados entre el grupo que consiste en un inhibidor de la respiración y un inhibidor de la biosíntesis de esterol.

[6] El método para controlar una fitoenfermedad de acuerdo con uno cualquiera de los puntos [1] a [5], en el que la etapa de aplicación a una planta o suelo donde la planta crece es una etapa de aplicación a una semilla.

[7] Uso de un compuesto de ditiíntetracarboxamida representado por la fórmula (1):



para controlar una fitoenfermedad causada por un hongo resistente a múltiples fármacos de tipo eflujo.

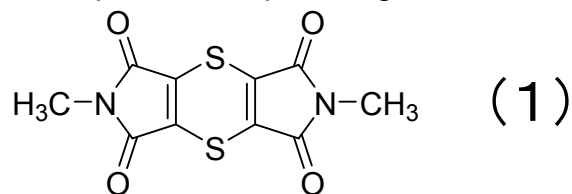
La presente invención puede controlar fitoenfermedades resistentes a múltiples fármacos de tipo eflujo.

Un método para controlar fitoenfermedades resistentes a múltiples fármacos de tipo eflujo de la presente invención (en lo sucesivo en el presente documento, denominado “Presente método” o “método de la presente invención”) comprende una etapa de aplicación de una cantidad eficaz del compuesto de ditiíntetracarboxamida representado por la fórmula mencionada anteriormente (1) (en lo sucesivo en el presente documento, denominado “presente compuesto (1)” o “compuesto (1) de la presente invención”) a plantas o suelo donde crecen las plantas.

En primer lugar, se explica el presente compuesto (1).

El presente compuesto (1) representa un compuesto de

ditiíntetracarboxamida representado por la siguiente fórmula (1):



y también se describe, por ejemplo, en el documento WO 2011/128263 y se puede preparar también por medio de un método descrito en el documento.

- 5 A pesar de que una forma que se usa para el presente compuesto (1) puede ser el presente compuesto (1) como tal, el presente compuesto (1) se prepara por lo general mezclando con uno o más vehículos inertes y, de ser necesario, añadiendo tensioactivos y los otros agentes auxiliares para formulación, para formular en una formulación tal como polvos humectables,
- 10 gránulos dispersables en agua, agentes fluidos, gránulos, polvos, agentes fluidos secos, concentrados emulsionables, soluciones acuosas, soluciones oleosas, agentes fumantes, aerosoles y microcápsulas (en lo sucesivo en el presente documento, mencionada como “presente formulación” o “formulación de la presente invención”). Por ejemplo, en estas presentes formulaciones, el
- 15 presente compuesto (1) está comprendido por lo general dentro de un intervalo del 0,1 al 99 % en peso, preferentemente, del 0,2 al 90 % en peso, más preferentemente, del 5 al 50 % en peso, con respecto al peso total de la formulación. La formulación se puede usar como tal o por adición de otro u otros ingredientes inertes, para su uso como un agente para controlar una
- 20 fitoenfermedad resistente a múltiples fármacos de tipo eflujo.

Los ejemplos del vehículo inerte usado en la formulación incluyen un vehículo sólido y un vehículo líquido.

Los ejemplos del vehículo sólido incluyen polvos finamente divididos o

partículas de arcillas (por ejemplo, caolín, tierra de diatomeas, dióxido de silicio hidratado sintético, arcilla de Fubasami, bentonita y arcilla ácida), talcos o los otros minerales inorgánicos (por ejemplo, sericita, cuarzo en polvo, azufre en polvo, carbón activado, carbonato de calcio y sílice hidratada).

5 Los ejemplos del vehículo líquido incluyen agua, alcoholes, cetonas (por ejemplo, acetona, metiletilcetona, ciclohexanona), hidrocarburos aromáticos (por ejemplo, benceno, tolueno, xileno, etilbenceno, metilnaftaleno), hidrocarburos alifáticos (por ejemplo, n-hexano, queroseno), ésteres, nitrilos, éteres, amidas ácidas e hidrocarburos halogenados.

10 Los ejemplos de los tensioactivos incluyen sulfatos de alquilo, sulfonatos de alquilo, sulfonatos de alquilarilo, éteres de alquilarilo y compuestos polioxietilenados de los mismos, polioxietilenglicoléteres, poliolésteres y derivados de alcohol de azúcar.

 Los ejemplos de los otros agentes auxiliares para formulación incluyen
15 adhesivos, dispersantes y estabilizantes y específicamente caseína, gelatina, polisacáridos (por ejemplo, almidón, goma arábiga, derivados celulósicos y ácido algínico), derivados de lignina, bentonita, azúcares, polímeros sintéticos solubles en agua (por ejemplo, alcohol polivinílico, polivinilpirrolidona y ácidos poliacrílicos), PAP (fosfato de isopropilo ácido), BHT (2,6-di-terc-butil-4-
20 metilfenol), BHA (una mezcla de 2-terc-butil-4-metoxifenol y 3-terc-butil-4-metoxifenol) y ácidos grasos o ésteres de los mismos, y otros.

 Además, la presente formulación se puede usar mezclando
adicionalmente con varios tipos de aceites (tales como aceites minerales y
aceites vegetales) y/o los otros tensioactivos y otros. Los ejemplos específicos
25 de los aceites o tensioactivos que se pueden mezclar para el uso incluyen

Nimbus (marca registrada), Assist (marca registrada), Aureo (marca registrada), Iharol (marca registrada), Silwet L-77 (marca registrada), BreakThru (marca registrada), Sundancell (marca registrada), Induce (marca registrada), Penetrator (marca registrada), AgriDex (marca registrada), Lutensol
5 A8 (marca registrada), NP-7 (marca registrada), Triton (marca registrada), Nufilm (marca registrada), Emulgator NP7 (marca registrada), Emulad (marca registrada), TRITON 45 (marca registrada), AGRAL 90 (marca registrada), AGROTIN (marca registrada), ARPON (marca registrada), EnSpray N (marca registrada), BANOLE (marca registrada) y otros.

10 En el método de la presente invención, el presente compuesto (1) se puede usar en combinación con uno o más compuestos seleccionados entre el grupo que consiste en otros compuestos que tienen una actividad de control de fitoenfermedades y compuestos que tienen actividad insecticida.

El método de la presente invención se lleva a cabo aplicando una
15 cantidad eficaz del presente compuesto (1) a plantas o suelo donde crecen las plantas. Los ejemplos de la planta incluyen follaje de la planta, semillas de la planta, bulbos de la planta y otros. En el presente documento, bulbos se refieren a un tallo discoide, un cormo, un rizoma, un tubérculo, una raíz tuberosa, un rizóforo y similares.

20 Un método de aplicación del presente compuesto (1) no se limita en particular siempre que su forma de aplicación sea una forma sustancial aplicable del presente compuesto (1) e incluye, por ejemplo, una aplicación a un cuerpo de planta (tal como pulverización foliar), una aplicación a lugares en los que crecen las plantas (tal como tratamiento de suelo), una aplicación a
25 semillas (tal como desinfección de semillas) y otros.

Los ejemplos del tratamiento foliar incluyen un método de aplicación de ingredientes activos a tallos y hojas de plantas por crecer.

Los ejemplos del tratamiento de raíz incluyen un método de imbibición de una planta entera o una raíz de la planta en una solución química que
5 comprende el presente compuesto (1) y un método de unión de una formulación sólida que comprende el presente compuesto (1) y vehículo sólido a una raíz de la planta.

Los ejemplos del tratamiento del suelo incluyen pulverización sobre suelo, mezcla con suelo e irrigación de una solución química al suelo.

10 Los ejemplos del tratamiento de semillas incluyen una aplicación del presente compuesto (1) a una semilla o un bulbo de la planta que se han de prevenir de la fitoenfermedad, específicamente, por ejemplo, un tratamiento de pulverización por pulverización de una solución mixta de la formulación que comprende el presente compuesto (1) y agua en una forma de niebla sobre una
15 superficie de una semilla o una superficie de un bulbo, un tratamiento por untado mediante aplicación del polvo humectable, el concentrado emulsionable o la formulación fluida que comprende cada una el presente compuesto (1) con adición de pequeñas cantidades de agua o como tal a una semilla o un bulbo, un tratamiento de inmersión por inmersión de una semilla en una solución del
20 presente compuesto (1) durante cierto período de tiempo, un tratamiento de recubrimiento de película y un tratamiento de recubrimiento de pellet.

En el método de la presente invención, la cantidad de aplicación del presente compuesto (1) se puede cambiar según el tipo de planta que se ha de tratar, el tipo y la frecuencia de aparición de la fitoenfermedad que se ha de
25 controlar, forma de formulación, período de tratamiento, método de tratamiento,

lugares de tratamiento, condiciones climáticas y otros y, en el caso de aplicar a tallos y hojas de la planta o el suelo donde crece la planta, la cantidad del presente compuesto (1) por 1000 m² es por lo general de 1 a 500 g, preferentemente, de 5 a 50 g.

- 5 En el caso en que la forma de formulación sean concentrados emulsionables, polvos humectables o agentes fluidos y similares, estas formulaciones se diluyen por lo general con agua y luego se aplican por pulverización. En estos casos, la concentración del presente compuesto (1) es por lo general del 0,0005 al 2 % en peso, preferentemente, del 0,001 al 1 % en
- 10 peso. Los polvos o gránulos se aplican por lo general como tales sin diluirlos.

La expresión “hongo resistente a múltiples fármacos de tipo eflujo” como se usa en la presente representa un hongo que muestra una resistencia a múltiples agentes para controlar una fitoenfermedad por sobreexpresión de varios tipos de transportadores de membrana que están presentes en la

15 membrana celular e incrementar una función de bomba de eflujo al exportar el agente de control de fitoenfermedades que se introduce en las células fuera de las células. Los ejemplos del transportador de membrana incluyen un transportador ABC y un transportador MFS, que no están limitados a los mismos. Como se usa en la presente, “transportador ABC” se refiere a un

20 transportador de casete de unión a ATP y “transportador MFS” se refiere a un transportador de la superfamilia de los principales facilitadores. La sobreexpresión del transportador de membrana se confirma por un método habitual, por ejemplo, midiendo una cantidad del transportador de membrana o una cantidad de ARNm que corresponde a un gen que codifica el transportador

25 de membrana. La cantidad de dicho ARNm se mide, por ejemplo, por medio de

una reacción de polimerasa en cadena por transcripción inversa cuantitativa (qRT-PCR). Más específicamente, el método de medición se desvela en las siguientes referencias conocidas públicamente.

Environmental Microbiology. 2015; 17(8), 2805-2823

5 *Pest Management Science*. 2001; 57(5), 393-402

PLos Pathogen., 2009; Dec; 5(12): e1000696

Es suficiente con que el hongo resistente a múltiples fármacos de tipo eflujo muestre cualquier resistencia a un agente de control de fitoenfermedades como resultado de la sobreexpresión del transportador de membrana, independientemente de la cantidad medida de ARNm. La cantidad medida de ARNm puede ser, por ejemplo, 20 veces, 50 veces, más de 100 veces o más, respecto de la cantidad de ARNm de hongo de tipo silvestre. De modo alternativo, como se menciona más abajo, se calcula un valor de CE_{50} dividiendo un valor de CE_{50} contra la cepa de hongo resistente a múltiples fármacos de tipo eflujo por un valor de CE_{50} contra la cepa de hongo de tipo silvestre y, como resultado, es suficiente que la relación del valor de CE_{50} de tolinaftato muestre 3 veces o más, preferentemente, 10 veces o más, usando tolinaftato conocido como un indicador del hongo resistente a múltiples fármacos de tipo eflujo.

20 El método de la presente invención se puede aplicar para controlar una fitoenfermedad que esté causada por un hongo resistente a múltiples fármacos de tipo eflujo. Como se ha mencionado anteriormente, el método de la presente invención se lleva a cabo aplicando una cantidad eficaz del presente compuesto (1) a una planta o suelo donde crece la planta. Un ejemplo de la
25 planta incluye una planta en la que se produce cualquier fitoenfermedad que

esté causada por un hongo resistente a múltiples fármacos de tipo eflujo y una planta en la que se puede producir cualquier fitoenfermedad que esté causada por un hongo resistente a múltiples fármacos de tipo eflujo.

El hongo resistente a múltiples fármacos de tipo eflujo puede tener una
5 resistencia derivada de una mutación de un gen que codifica la proteína diana de varios tipos de agente de control de fitoenfermedades y/o una resistencia derivada de una sobreexpresión de la proteína diana. Además, la proteína diana que tiene una mutación en un gen o se sobreexpresa puede ser de una pluralidad de tipos, siempre que la proteína diana no tenga una resistencia al
10 presente compuesto (1), derivando dicha resistencia de una mutación de un gen que codifica la proteína diana del presente compuesto (1).

Los ejemplos de los diversos tipos mencionados anteriormente de agentes de control de fitoenfermedades incluyen inhibidores de la síntesis de ácidos nucleicos (tales como fungicidas de fenilamida y fungicidas de
15 acilaminoácido), inhibidores de la mitosis y la división celular (tales como fungicidas de MBC y fungicidas de N-fenilcarbamato), inhibidores de la respiración (tales como fungicidas de QoI, fungicidas de Qil y fungicidas de SDHI), inhibidores de la síntesis de amino y la síntesis de proteínas (tales como fungicidas de anilinopirimidina), inhibidores de la transducción de señales (tales
20 como fungicidas de fenilpirrol y fungicidas de dicarboximida), inhibidores de la síntesis de lípidos y la síntesis de la membrana celular (tales como fungicidas de fosforotiorato, fungicidas de ditiolano, fungicidas de hidrocarburos aromáticos, fungicidas heteroaromáticos y fungicidas de carbamato), inhibidores de la biosíntesis de esterol (tales como fungicidas de DMI (tales
25 como fungicidas de triazol), fungicidas de hidroxianilida y fungicidas de

aminopirazolinona), inhibidores de la síntesis de la pared celular (tales como inhibidores de polioxina y fungicidas de amida de ácido carboxílico), inhibidores de la síntesis de melanina (tales como fungicidas de MBI-R, fungicidas de MBI-D y fungicidas de MBI-P), así como los demás fungicidas (tales como

5 fungicidas de cianoacetamida oxima y fungicidas de fenilacetamida), preferentemente, uno o más agentes de control de fitoenfermedades seleccionados entre el grupo que consiste en inhibidor de la respiración e inhibidor de biosíntesis del estero. Los ejemplos de sitio de mutación del gen que codifica la proteína diana mencionada anteriormente en cada hongo de

10 fitoenfermedad incluyen aquellos indicados en la Tabla 1 a continuación.

Tabla 1

Genes que codifican proteína diana de diversos tipos de agente de control de fitoenfermedades									
Hongo patógeno (nombre científico)	citocromo b	Cyp51	β - tubulina	CesA3	SdhB	SdhC	SdhD	OS-1	ERG27
<i>Ajiellomyces capsulatus</i>		Y136F							
<i>Alternaria alternata</i>	G143A				H277R/Y	H134R	H133R		
<i>Alternaria brassicicola</i>								E753K	
<i>Alternaria longipes</i>								G420D	
<i>Alternaria arborescens</i>	G143A								
<i>Alternaria solani</i>	F129L				H277R/Y		H133R		
<i>Alternaria tomato</i>	G143A								
<i>Aspergillus flavus</i>		Y132N, K197N, D282E, M288L, T469S, H399P, D411N, T454P							
<i>Aspergillus fumigatus</i>		N22D, S52T, G54E/K/R/ V/W, Y68, Q88H, L98H, V101F, Y121F, N125I, G138C/R/S, Q141H, H147Y, P216L, F219S, M220K/L/T /V, T289A, S297T, P394L, Y431C, G432S, G434C, T440A, G448S, Y491H, F495I							
<i>Emericella nidulans</i>			Q134K, E198D/K/Q, F200Y						
<i>Aspergillus parasiticus</i>		G54W							

(Tabla 1 (continuación))

Genes que codifican proteína diana de diversos tipos de agente de control de fitoenfermedades									
Hongo patógeno (nombre científico)	citocromo b	Cyp51	β - tubulina	CesA3	SdhB	SdhC	SdhD	OS-1	ERG27
Botryotinia fuckeliana	G143A		E198A/G/K/V, F200Y		P225H/F/L /T, N230I, H272L/R/V /Y	P80H/L, A85V	H132R	I365N/R/S, V368F, Q369H/P, N373S, T447S	S9G, F26S, P57A, T63I, G170R, V192I, L195F, N196T, A210G, I232M, P238S/Δ, P250S, P269L, P298Δ, V309M, A314V, S336C, V365A, E368D, N369D, E375K, A378T, L400F/S, Y408S, F412L/S/V/ C, A461S, R496T
Candida albicans		A61V, Y132F/H, K143E, S405F, F449S, G464S, R467K, I471T							
Cochliobolus heterostrophus									
Glomerella graminicola	G143A								
Corynespora cassicola	G143A					S73P	S89P, G109V		
Cercospora beticola	G143A	E297K, I330T, P384S	E198A						
Cercospora sojae	G143A								
Cladsporium carpophilum	G143A								
Colletotrichum graminicola	G143A								
Glomerella cingulata	G143A								
Stagonosporopsis cucurbitacearum					H277R/Y				
Blumeria graminis f. sp. hordei	G143A	Y136F, K147Q, S509T							
Blumeria graminis f. sp. tritici	G143A	S79T, Y136F, K175N							
Eurotium oryzae					H249L/N/Y	T90I	D124E		
Filobasidiella neoformans		Y145F, G484S							
Gibberella fujikuroi			E198V, F200Y						
Gibberella zeae			E198K/L/Q, F200Y						

(Tabla 1 (continuación))

Hongo patógeno (nombre científico)	Genes que codifican proteína diana de diversos tipos de agente de control de fitoenfermedades							
	citocromo b	Cyp51	β - tubulina	CesA3	SdhB	SdhC	SdhD	OS-1
<i>Helminthosporium solani</i>			E198A/Q					
<i>Hypomyces odoratus</i>								
<i>Parastagonospora nodorum</i>	G143A							
<i>Monographella nivalis</i>	G143A							
<i>Monilinia fructicola</i>		Y136F	E198A/K					
<i>Monilinia laxa</i>								
<i>Microdochium majus, nivale</i>	G143A							
<i>Mycosphaerella fijiensis</i>	G143A	Y136F, A313G, A381G, Y461D, G462A, Y463D/H/N						
<i>Didymella rabiei</i>	G143A							
<i>Neurospora crassa</i>			E198G					
<i>Penicillium aurantiogriseum</i>			E198A/K, F200Y					
<i>Penicillium expansum</i>			E198A/K/V					
<i>Penicillium italicum</i>			E198K, F200Y					
<i>Phakopsora pachyrhizi</i>	F129L	F120L, Y131F/H, K142R, I145F, I475T				I86F		
<i>Phytophthora capsici</i>				Q1077K, V1109L/M				
<i>Phytophthora drechsleri</i>				V1109L				
<i>Phytophthora infestans</i>				G1105A/V, V1109L				
<i>Plasmopara viticola</i>	F129L G143A			G1105S/V				
<i>Pleospora allii</i>	G143A							F267L, L290S, T765R, Q777R
<i>Podosphaera fusca</i>	G143A							
<i>Podosphaera xanthii</i>	G143A							
<i>Pseudoperonospora cubensis</i>	G143A			G1105V/W				
<i>Puccinia triticina</i>		Y134F						
<i>Magnaporthe oryzae</i>	F129L G143A							

(Tabla 1 (continuación))

Hongo patógeno (nombre científico)	Genes que codifican proteína diana de diversos tipos de agente de control de fitoenfermedades								
	citocromo b	Cyp51	β -tubulina	CesA3	SdhB	SdhC	SdhD	OS-1	ERG27
<i>Pyrenophora teres</i>	F129L				H277Y	K49E, R64K, N75S, G79R, H134R, S135R	D124E/N, H134R, G138V, D145G		
<i>Pyrenophora tritici-repentis</i>	F129L G137R G143A								
<i>Pyrenopeziza brassicae</i>		S508T							
<i>Pythium aphanidermatum</i>	F129L								
<i>Thanatephorus cucumeris</i>	F129L G143A								
<i>Ramularia collo-cygni</i>	G143A					N87S, H146R, H153R			
<i>Rhynchosporium secalis</i>	G143A		E198G/K, F200Y						
<i>Rhizoctonia solani</i>	F129L								
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>		Y140F/H							
<i>Sclerotinia homoeocarpa</i>			E198A/K						
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>			E198A		H273Y	H146R	H132R		
<i>Zymoseptoria tritici</i>	F129L G137R G143A	L50S, D107V, D134G, V136A/C/G, Y137F, M145L, N178S, S188N, S208T, N284H, H303Y, A311G, G312A, A379G, I381V/Δ, A410T, G412A, Y459C/D/N/S/P/Δ, G460D/Δ, Y461D/H/S, V490L, G510C, N513K, S524T			N225I/T, H273Y, T268I/A, I269V	I29V, N33T, N34T, T79I/N, W80S, A84V, N86K/S/A, G90R, R151T/S, H152R, I161S	I50F, M114V, D129E		
<i>Erysiphe necator</i>	G143A	Y136F			H242R	G169D			
<i>Ustilago maydis</i>					H257L				
<i>Venturia inaequalis</i>	G143A		E198A/K, F200Y		T253I	H151R			

El hongo resistente a múltiples fármacos de tipo eflujo puede ser un hongo de la mancha de la hoja del trigo *Septoria* que muestra una resistencia a múltiples fármacos de tipo eflujo y tiene uno o más sitios de mutación de genes seleccionados entre el grupo que consiste en los siguientes (A), (B), (C-1), (C-2) y (C-3).

(A) genes que codifican el citocromo b: F129L, G137R, G143A;

(B) genes que codifican Cyp51: L50S, D107V, D134G, V136A/C/G, Y137F, M145L, N178S, S188N, S208T, N284H, H303Y, A311G, G312A, A379G, I381V/Δ, A410T, G412A, Y459C/D/N/S/P/Δ, G460D/Δ, Y461D/H/S, V490L, G510C, N513K, S524T;

(C-1) genes que codifican SDHB: N225I/T, H273Y, T268I/A, I269V;

(C-2) genes que codifican SDHC: I29V, N33T, N34T, T79I/N, W80S, A84V, N86K/S/A, G90R, R151T/S, H152R, I161S;

(C-3) genes que codifican SDHD: I50F, M114V, D129E.

El hongo resistente a múltiples fármacos de tipo eflujo puede ser un hongo de moho gris de las uvas que muestra una resistencia a múltiples fármacos de tipo eflujo y tiene uno o varios sitios de mutación de genes seleccionados entre el grupo que consiste en los siguientes (D), (E-1), (E-2) y (E-3).

(D) genes que codifican el citocromo b: G143A;

(E-1) genes que codifican SDHB: P225H/F/L/T, N230I, H272L/R/V/Y;

(E-2) genes que codifican SDHC: P80H/L, A85V

(E-3) genes que codifican SCHD: H132R.

El presente compuesto (1) se puede usar como un agente para el control de fitoenfermedades resistentes a múltiples fármacos de tipo eflujo en tierras

agrícolas tales como arrozales, céspedes y huertas. El método de la presente invención se puede aplicar a tierras agrícolas donde crecen las siguientes “plantas”.

Cultivos:

- 5 maíz, arroz, trigo, cebada, centeno, avena, sorgo, algodón, soja, cacahuete, trigo buck, nabo, colza, girasol, caña de azúcar, tabaco y similares;

Verduras:

- verduras solanáceas (por ejemplo, berenjena, tomate, pimiento, pimienta y patata),
- 10 verduras cucurbitáceas (por ejemplo, pepino, calabaza, calabacín, sandía o melón),
- verduras crucíferas (por ejemplo, rábano japonés, nabo blanco, rábano picante, colinabo, col china, col, mostaza de hoja, brócoli, coliflor),
- verduras asteráceas (por ejemplo, bardana, margarita de corona,
- 15 alcachofa o lechuga),
- verduras liliáceas (por ejemplo, cebolleta, cebolla, ajo o espárrago),
- verduras amiáceas (por ejemplo, zanahoria, perejil, apio o chirivía),
- verduras quenopodiáceas (por ejemplo, espinaca o acelga),
- verduras lamiáceas (por ejemplo, perilla, menta o albahaca),
- 20 fresa, boniato, *Dioscorea japonica*, colocasia, u otras;

Flores;

plantas de follaje ornamental;

césped;

Frutas:

- 25 frutas pomáceas (por ejemplo, manzana, pera, pera japonesa, membrillo

chino o membrillo),

frutas carnosas de hueso (por ejemplo, melocotón, ciruela, nectarina, *Prunus mume*, cereza, albaricoque o ciruela ácida),

frutas cítricas (por ejemplo, Citrus unshiu, naranja, limón, lima o pomelo),

5 nueces (por ejemplo, castañas, nueves, avellanas, almendras, pistachos, anacardos o nueces de macadamia),

bayas (por ejemplo, arándano, arándano rojo, frambuesa o mora),

uvas, caqui japonés, oliva, ciruela japonesa, plátano, café, palmera datilera, cocos, palma oleífera, y otros;

10 Árboles distintos de árboles frutales:

té, morera, planta de flores,

árboles a la vera del camino (por ejemplo, fresno, abedul, cornejo, eucalipto, ginkgo (*Ginkgo biloba*), lila, arce, roble (*quercus*), álamo, árbol de Judas, liquidámbar (*Liquidambar formosana*), plátano, zelkova, arborvitae japonés (*Thuja standishii*), haya, cicuta, enebro, pino, picea o tejo (*Taxus cuspidate*)),

y otros.

La “planta” mencionada anteriormente puede incluir cultivos genéticamente modificados.

20 Los ejemplos de una fitoenfermedad resistente a múltiples fármacos de tipo eflujo en los que se puede controlar el presente compuesto (1) incluyen una fitoenfermedad causada por patógenos de plantas tales como hongos filamentosos y sus ejemplos específicos incluyen los siguientes, sin embargo, no están limitados a ellos.

25 Enfermedades del arroz: tizón (*Magnaporthe grisea*), mancha marrón

(*Cochliobolus miyabeanus*) y chancro de la vaina (*Rhizoctonia solani*);

Enfermedades del trigo: mildiú blanco (*Erysiphe graminis*), roya (*Puccinia striiformis*, *P. graminis*, *P. triticea*), moho de la nieve (*Microneoctria nivale*, *M. majus*), tizón de la nieve por *Typhula* (*Typhula* sp.), cercosporiosis (*Pseudocercospora herpotrichoides*), mancha de la hoja (*Zymoseptoria tritici*), mancha marrón (*Pyrenophora tritici-repentis*), tizón de la plántula por *Rhizoctonia* (*Rhizoctonia solani*) y mal de pie del trigo (*Gaeumannomyces graminis*);

Enfermedades de la cebada: mildiú blanco (*Erysiphe graminis*), roya (*Puccinia striiformis*, *P. graminis*, *P. hordei*), escaldado (*Rhynchosporium secalis*), manchas en red de la cebada (*Pyrenophora teres*), mancha de punto (*Cochliobolus sativus*), estriado de las hojas (*Pyrenophora graminea*), Enfermedad por *Ramularia* (*Ramularia collo-cygni*) y tizón de la plántula por *Rhizoctonia* (*Rhizoctonia solani*);

Enfermedades del maíz: roya (*Puccinia sorghi*), roya del sur (*Puccinia polysora*), tizón de la hoja del norte (*Setosphaeria turcica*), roya tropical (*Physopella zeae*), tizón de la hoja del sur (*Cochliobolus heterostrophus*) y mancha de la hoja gris (*Cercospora zeae-maydis*);

Enfermedades del algodón: mildiú gris (*Ramularia areola*);

Enfermedades del café: roya (*Hemileia vastatrix*) y mancha foliar (*Cercospora coffeicola*);

Enfermedades de la caña de azúcar: roya (*Puccinia melanocephala*, *Puccinia kuehnii*);

Enfermedades del girasol: roya (*Puccinia helianthi*);

Enfermedades de los cítricos: melanosa (*Diaporthe citri*), sarna (*Elsinoe*

fawcetti) y podredumbre de la fruta (*Penicillium digitatum*, *P. italicum*);

Enfermedades de la manzana: tizón de la flor (*Monilinia mali*), mildiú blanco (*Podosphaera leucotricha*), sarna (*Venturia inaequalis*), mancha parda (*Diplocarpon mali*), mancha de anillo (*Botryosphaeria berengeriana*);

- 5 Enfermedades de la pera: sarna (*Venturia nashicola*, *V. pirina*) y roya (*Gymnosporangium haraeaeum*);

Enfermedades del melocotón: podredumbre parda (*Monilinia fructicola*), sarna (*Cladosporium carpophilum*) y podredumbre por *Phomopsis* (*Phomopsis* sp.);

- 10 Enfermedades de las uvas: antracnosis (*Elsinoe ampelina*), podredumbre blanca (*Glomerella cingulata*), mildiú blanco (*Uncinula necator*), roya (*Phakopsora ampelopsidis*) y podredumbre negra (*Guignardia bidwellii*);

Enfermedades del caqui japonés: mancha foliar (*Cercospora kaki*, *Mycosphaerella nawae*);

- 15 Enfermedades de la familia de las calabazas: mildiú blanco (*Sphaerotheca fuliginea*), tizón del tallo gomoso (*Didymella bryoniae*) y mancha en forma de diana (*Corynespora cassiicola*);

- Enfermedades del tomate: moho de la hoja (*Cladosporium fulvum*), moho de la hoja (*Pseudocercospora fuligena*), tizón tardío (*Phytophthora infestans*) y
20 mildiú blanco (*Leveillula taurica*);

Enfermedades de la berenjena: mancha parda (*Phomopsis vexans*) y mildiú blanco (*Erysiphe cichoracearum*);

Enfermedades de la cebolla galesa: roya (*Puccinia allii*);

- Enfermedades de la soja: mancha púrpura (*Cercospora kikuchii*), roya
25 (*Phakopsora pachyrhizi*), mancha en forma de diana (*Corynespora cassiicola*),

tizón aéreo por *Rhizoctonia* (*Rhizoctonia solani*), mancha parda por *Septoria* (*Septoria glycines*), mancha de ojo de rana de la hoja (*Cercospora sojina*) y mildiú blanco (*Microsphaera diffusa*)

Enfermedades de la judía: roya (*Uromyces appendiculatus*);

- 5 Enfermedades del cacahuete: mancha foliar temprana (*Cercospora personata*) y mancha foliar tardía (*Cercospora arachidicola*);

Enfermedades del guisante de jardín: mildiú blanco (*Erysiphe pisi*);

Enfermedades de la fresa: mildiú blanco (*Sphaerotheca humuli*);

- Enfermedades de la remolacha azucarera: mancha foliar por *Cercospora*
10 (*Cercospora beticola*), tizón foliar (*Thanatephorus cucumeris*) y podredumbre de la raíz (*Thanatephorus cucumeris*);

Enfermedades de las rosas: mildiú blanco (*Sphaerotheca pannosa*);

Enfermedades del crisantemo: tizón de la hoja (*Septoria chrysanthemi-indici*);

- 15 Enfermedades de la cebolla: tizón de la hoja por *Botrytis* (*Botrytis cinerea*, *B. byssoidea*, *B. squamosa*), podredumbre del cuello por moho gris (*Botrytis alli*) y podredumbre esclerótica pequeña (*Botrytis squamosa*);

Enfermedades de diversos cultivos: moho gris (*Botrytis cinerea*);

- Enfermedades del césped: parche marrón y parche grande (*Rhizoctonia*
20 *solani*); y

Enfermedades del banano: enfermedad de Sigatoka (*Mycosphaerella musicola*).

EJEMPLOS

- 45 En lo sucesivo en el presente documento, el presente método se
25 explica con mayor detalle usando Ejemplos de formulación y Ejemplos de

ensayo.

Los Ejemplos de formulación que se usan en el presente método se muestran a continuación. Las “partes” en los Ejemplos de formulación representan “partes en peso”.

5 Ejemplo de formulación 1

Cincuenta (50) partes del presente compuesto (1), 3 partes de ligninsulfonato de calcio, 2 partes de laurilsulfato de magnesio y 45 partes de óxido de silicio hidratado sintético se muelen bien mezclando para obtener un polvo humectable.

10 Ejemplo de formulación 2

Veinte (20) partes del presente compuesto (1) y 1,5 partes de trioleato de sorbitano se mezclan con 28,5 partes de agua que contienen 2 partes de alcohol polivinílico y la mezcla se muele luego finamente por medio de un método de molienda húmeda. A esta mezcla, se añaden 40 partes de agua que
15 contienen 0,05 partes de goma de xantano y 0,1 partes de silicato de magnesio y aluminio y luego se añaden también 10 partes de propilenglicol. La mezcla se agita para obtener un agente fluido.

Ejemplo de formulación 3

Dos (2) partes del presente compuesto (1), 88 partes de arcilla de caolín y
20 10 partes de talco se muelen bien mezclando para obtener un polvo.

Ejemplo de formulación 4

Cinco (5) partes del presente compuesto (1), se mezcla bien 14 partes de polioxietilenestirilfeniléter, 6 partes de dodecilbencensulfonato de calcio y 75 partes de xileno para obtener un concentrado emulsionable.

25 Ejemplo de formulación 5

Dos (2) partes del presente compuesto (1), 1 parte de óxido de silicio hidratado sintético, 2 partes de ligninsulfonato de calcio, 30 partes de bentonita y 65 partes de arcilla de caolín se muelen bien mezclando y a ello se añade agua y la mezcla se amasa bien y luego se granula y se seca para obtener un gránulo.

Ejemplo de formulación 6

Veinte (20) partes del presente compuesto (1), 35 partes de una mezcla de carbón blanco y polioxietilen alquil éter sulfato de amonio (la relación en peso es de 1:1) y la cantidad apropiada de agua se mezcla para lograr su cantidad total de 100 partes y la mezcla se muele luego finamente con un triturador para obtener un agente fluido.

Ejemplo de formulación 7

Cada uno de los materiales de partida descritos en la Tabla 2 se mezcló en una relación en peso prescripta que se describió en la Tabla 2, respectivamente, y luego se agitaron para preparar una solución homogénea, para obtener cada formulación. Aquí, la cantidad numérica descrita en la Tabla 2 representa la "parte en peso".

Tabla 2

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Presente compuesto (1)	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0
Agnique AMD810	15,0	3,0	30,0			20,0		20,0	20,0	20,0	20,0
Hallcomid M-8-10							20,0				
Agnique AMD3L				20,0	30,0						
Solvesso 200ND	40,0	40,0	10,0	10,0	39,5	24,0	19,5	24,5	31,5	14,5	14,5
Alcohol bencílico		7,0									
Calsogen 4814	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5
ATPLUS245	6,5	6,5	6,5	4,0	4,0	6,5	4,0		4,0		
Brij O3								5,0		5,0	5,0
Atlas G5002L							2,0	1,0		1,0	1,0
Toximul 8323				5,0	5,0				5,0		
Rhodiasolv Polarclean		30,0		39,5		40,0	45,0	40,0	20,0		
PURASOLV ML										50,0	
PURASOLV EL											50,0
N, N' — dimetilpropilenurea	25,0			8,0	8,0				10,0		
γ — butil lactona			40,0								
Total	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100

Los nombres de producto descritos en la anterior Tabla 2 son los siguientes.

Agnique AMD810: una mezcla de N,N-dimetil octanamida y N,N-dimetil decanamida (fabricada por BASF Corporation);

Hallcomid M-8-10: una mezcla de N,N-dimetil octanamida y N,N-dimetil decanamida (fabricada por Stepan Company);

Agnique AMD3L: N,N-dimetil lactamida (fabricada por BASF Corporation);

Sorbesso 200ND: principalmente alquil C11-14-naftaleno como hidrocarburo aromático (fabricado por Exxon Mobil Corporation);

Calsogen 4814: dodecibencensulfonato de calcio (fabricado por Clariant International Ltd.);

ATPLUS245: polioxietilenpolioxipropilenaalquiléter (fabricado por Croda International plc);

Brij O3: polioxietilenoleiléter, HLB: 7 (fabricado por Croda International plc);

Atlas G5002L: copolímero de bloque de butilo (fabricado por Croda

International plc);

Toximul 8323: copolímero de bloque de polioxietileno-polioxipropileno (fabricado por Stepan Company);

5 Rhodiasolv Polarclean: contiene 80 al 90 % en peso de 5-(dimetilamino)-2-metil-5-oxopentanoato de metilo (siempre que la cantidad total se considere del 100 % en peso) (fabricado por Solvay Nicca, Ltd.);

PURASOLV ML: L-lactato de metilo (fabricado por Corbion purac.);

PURASOLV EL: L-lactato de etilo (fabricado por Corbion purac.).

A continuación, los Ejemplos de ensayo se muestran más abajo. Las
10 cepas de hongos resistentes a múltiples fármacos de tipo eflujo que se usaron en los siguientes Ejemplos de ensayo son todas cepas de hongos que se mantienen y se controlan internamente en lo del solicitante y también se depositan en Depositario de microorganismos de patentes del INTE (DMPI) (dirección: 2-5-8, Kazusakamatari, Kisarazu-shi, Chiba, Japón) presentados el
15 10 de abril de 2018. Cada uno de los nombres de las cepas de hongos se indica como un número de acceso a INTE junto con un código de control interno, respectivamente.

Ejemplo de ensayo 1

Ensayo de control contra hongo de la mancha de la hoja del trigo *Septoria*
20 (*Zymoseptoria tritici*) resistente a múltiples fármacos de tipo eflujo

Cada uno del presente compuesto (1) y tolnafrato se diluyó con dimetilsulfóxido hasta su concentración prescrita, respectivamente. Cada una de las soluciones químicas que comprendían el respectivo compuesto de ensayo se dispensó en una placa de titulación (con 96 pocillos) en la cantidad
25 de 1 µl. A ello, se dispensaron 150 µl de un caldo de dextrosa de patata (medio

de cultivo PDB) al que se inoculó cada conidio de hongo de la mancha de la hoja del trigo Septoria (cepas de hongo resistente a múltiples fármacos de tipo eflujo) (nombre de la cepa fúngica: St 106-6 como códigos de control internos) o cepa fúngica de tipo silvestre, respectivamente, por adelantado. La placa se
5 cultivó a 18 °C durante 4 días, dejando que cada hongo de la mancha de la hoja del trigo Septoria se sometiera a proliferación y luego se midió la absorbancia a 600 nm de cada pocillo de la placa de titulación para determinar el grado de crecimiento del hongo de la mancha de la hoja del trigo Septoria (grupo tratado). Por otro lado, cada uno de los grupos en los que creció la cepa
10 de hongo de tipo silvestre o la cepa de hongo de la mancha de la hoja del trigo Septoria resistente a múltiples fármacos de tipo eflujo excepto porque la solución química se reemplazó con dimetilsulfóxido, se preparó en el grupo no tratado, respectivamente y luego se examinó el grado de su crecimiento (grupo no tratado).

15 La eficacia se calculó a partir del grado de crecimiento por medio de la “Ecuación 1” mencionada más abajo y luego cada valor de CE_{50} del compuesto de ensayo, respectivamente, se calculó contra las cepas de hongo resistente a múltiples fármacos de tipo eflujo y la cepa de hongo de tipo silvestre. A continuación, como se muestra en la “Ecuación 2” mencionada más abajo, se
20 calculó una relación de valor de CE_{50} dividiendo un valor de CE_{50} contra cepas de hongo resistente a múltiples fármacos de tipo eflujo por un valor de CE_{50} contra la cepa de hongo de tipo silvestre.

Los resultados de ensayo se muestran en la Tabla 3. La relación de valor de CE_{50} para tolnaftato era de 19, mientras que la relación de valor de CE_{50}
25 para el presente compuesto (1) era de 1,1. A partir de los resultados de

ensayo, se sugirió que el presente compuesto (1) muestra un grado equivalente de eficacia de control respecto de las cepas de hongo resistente a múltiples fármacos de tipo eflujo al de la cepa de hongo de tipo silvestre.

“Ecuación 1”

5 $Eficacia = 100 \times (X-Y) / X$

X: grado de crecimiento de hongos del grupo no tratado

Y: grado de crecimiento de hongos en el grupo tratado

“Ecuación 2”

10 Relación de valor de CE_{50} = valor de CE_{50} respecto de la cepa de hongo resistente a múltiples fármacos de tipo eflujo / valor de CE_{50} respecto de la cepa de hongo de tipo silvestre

[Tabla 6]

Tabla 3

Nombre del compuesto	Valor de CE_{50} (ppm)		Relación de valor de CE_{50}
	Cepa de hongos de tipo silvestre	Cepa de hongos resistentes a múltiples fármacos de tipo eflujo	
Presente compuesto (1)	1,2	1,3	1,1
Tolnaftato	0,51	>10	>19

15 Ejemplo de ensayo 2

Ensayo de control contra hongo de moho gris de las uvas (*Botrytis cinerea*) resistente a múltiples fármacos de tipo eflujo

20 Cada uno del presente compuesto (1), fludioxonilo y tolinafrato se diluyó con dimetilsulfóxido hasta su concentración prescrita, respectivamente. Cada una de las soluciones químicas que comprendían el respectivo compuesto de

ensayo se dispensó en una placa de titulación (con 96 pocillos) en la cantidad de 1 µl. A ello luego se dispensaron 150 µl de un caldo de dextrosa de patata (medio de cultivo PDB) al que se inoculó cada conidio de los hongos del moho gris de las uvas, es decir, cepas de hongo resistente a múltiples fármacos de tipo eflujo (específicamente, cepa 1 de hongo resistente a múltiples fármacos de tipo eflujo: cepa de hongo que sobreexpresa el transportador ABC (nombre de cepa fúngica: número de acceso a INTE (INTE BP-02676), códigos de control internos (Bc-56)); cepa 2 de hongo resistente a múltiples fármacos de tipo eflujo: cepa de hongo que sobreexpresa el transportador MFS (nombre de cepa fúngica: número de acceso a INTE (INTE BP-02678), códigos de control internos (Bc-107)); y cepa 3 de hongo resistente a múltiples fármacos de tipo eflujo: cepa de hongos que sobreexpresa el transportador ABC y el transportador MFS (nombre de cepa fúngica: número de acceso a INTE (INTE BP-02677), códigos de control internos (Bc-103))) o cepa de hongo de tipo silvestre, por adelantado. La placa se cultivó a 18 °C durante 2 días, dejando que cada hongo de moho gris de las uvas se sometiera a proliferación y luego se midió la absorbancia a 600 nm de cada pocillo de la placa de titulación para determinar un grado de crecimiento de cada uno de los hongos de moho gris de las uvas (grupo tratado). Por otro lado, cada uno de los grupos en los que creció la cepa de hongo de tipo silvestre o las cepas de hongo de moho gris de las uvas resistente a múltiples fármacos de tipo eflujo excepto porque la solución química se reemplazó con dimetilsulfóxido, se preparó en el grupo no tratado, respectivamente y luego se examinó el grado de su crecimiento (grupo no tratado).

La eficacia se calculó a partir del grado de crecimiento por la “Ecuación 1”

abajo mencionada y luego se calculó cada valor de CE_{50} del compuesto de ensayo, respectivamente, respecto de las cepas de hongo resistente a múltiples fármacos de tipo eflujo y la cepa de hongo de tipo silvestre. Además, se calculó una relación de valor de CE_{50} por medio de la “Ecuación 2”
5 mencionada anteriormente.

Los resultados de ensayo se muestran en la Tabla 4. La relación de valor de CE_{50} para fludioxonilo era de 23, 14 o 43, respectivamente, y cada relación de valor de CE_{50} para tolinaftato también era de más de 4,5, mientras que la relación de valor de CE_{50} del presente compuesto (1) era de 0,89, 0,89 o 1,3,
10 respectivamente. A partir de los resultados de ensayo, se sugería que el presente compuesto (1) muestra un grado equivalente de eficacia de control contra las cepas de hongo resistente a múltiples fármacos de tipo eflujo al de la cepa de hongo de tipo silvestre.

Tabla 4

Nombre del compuesto	Valor de CE ₅₀ (ppm)				Relación de valor de CE ₅₀		
	Cepa de hongo de tipo salva-je	Cepa de hongo resistente a múltiples fármacos de tipo eflujo					
		1	2	3	1	2	3
Presente compuesto (1)	1,9	1,7	1,7	2,4	0,89	0,89	1,3
Fludioxonilo	0,0085	0,19	0,12	0,36	23	14	43
Tolnaftato	2.2	>10	>10	>10	>4.5	>4.5	>4.5