

POTENCIADORES DE FUNGICIDAS EFICACES PARA EL TRATAMIENTO DE PLANTAS INFECTADAS POR PATÓGENOS FÚNGICOS

CAMPO TÉCNICO DE LA INVENCION

La presente invención se relaciona, en general, con el campo de los fungicidas y, más específicamente, con la eficacia potenciada de fungicidas para el tratamiento de plantas infectadas por patógenos fúngicos.

TÉCNICA ANTERIOR

Sin limitar el alcance de la invención, se describe este antecedente en conexión con composiciones fungicidas útiles para tratar plantas infectadas por patógenos fúngicos.

Los patógenos fúngicos causan pérdidas devastadoras de cultivos y frutos post-cultivo en todo el mundo (Chen et al., 2008). Se han utilizado numerosos fungicidas químicos en altas dosis e intervalos frecuentes para prevenir estas pérdidas mediante el exterminio de diferentes especies fúngicas. Se estima que el mercado global de fungicidas fue de más de 7,4 mil millones en 2005 (Morton y Staub, 2008) y se espera que se eleve a más de \$20,000 millones para 2017 (Israel, 2013). Para reducir el riesgo de enfermedad de los cultivos y potenciar la seguridad de los alimentos y la protección del ambiente, se deberían desarrollar nuevos fungicidas o estrategias eficaces para aumentar la potencia de los fungicidas actuales.

Una limitación de la potencia de los fungicidas es la capacidad de los hongos para desintoxicarse de los mismos mediante su secuestro y exportación a través de la membrana plasmática. Los hongos usan diversos mecanismos para eliminar los xenobióticos y es evidente que toda inhibición de estos procesos aumentaría la potencia de los fungicidas. Las plantas también se desintoxican de los xenobióticos exportándolos. Un informe anterior comprobó que la sobreexpresión de un homólogo de ABCB1 (AtPgp1) o una enzima apirasa (NTPDasa) (AtAPY1) confería resistencia a los multi herbicidas a plantas de *A. thaliana* (Windsor et al., 2003). Más aun, los inhibidores de la actividad de la enzima apirasa suprimieron la capacidad de las plantas a exportar los herbicidas

y, de esa manera, aumentaron su sensibilidad a estas toxinas (Windsor et al., 2003). Una función clave de ciertas apirasa es la de contribuir a mantener un bajo estado estable de ATP extracelular (eATP) (Knowles, 2011; Lim et al., 2014), que es un regulador conocido de diversas respuestas en plantas y animales (Clark et al., 2014). En su conjunto, los datos de Windsor et al. (2003) sostuvieron una doble función de las apirasa y los transportadores de ABC en la Resistencia a los herbicidas e indicaron que la interrupción de la actividad de apirasa o la adición exógena de ATP podría inhibir la actividad de transporte de ABC y, de esa manera, bloquear el eflujo de compuestos tóxicos.

10

SÍNTESIS DE LA INVENCION

Los inhibidores de la apirasa Al.1 {N-(m-tolil)-[1, 1'-bifenil]-4-sulfonamida}, Al.10 { 2-oxo-2H-cromen-3-carbotioato de S-heptilo}, Al.13 {3-(N-(4-bromofenil) sulfamoil)-N-(3-nitrofenil) benzamida} y Al.15 {(E)-3-metil-N'-(1-(naftalen-2-il) etilideno) benzohidrazida} potencian de manera diferencial el efecto de los fungicidas de cobre y triazol contra los hongos patógenos de las plantas. Los fungicidas preferidos que son susceptibles de potenciación son octanoato de cobre, hidróxido de cobre, miclobutanil, propiconazol, tebuconazol, epoxiconazol, difenoconazol, triticonazol y protioconazol. La combinación del fungicida y el potenciador seleccionado otorga actividad fungicida sinérgica contra los hongos patógenos de las plantas.

En una forma de realización, la presente invención incluye composiciones y métodos para tratar plantas o semillas de plantas infectadas o en riesgo de ser infectadas con un patógeno fúngico. Las composiciones de la presente invención comprenden una formulación de un fungicida y un potenciador y un vehículo inerte fitológicamente aceptable. Los fungicidas son seleccionados entre un fungicida de un compuesto de cobre y un fungicida de triazol, como por ejemplo octanoato de cobre, hidróxido de cobre, miclobutanil, propiconazol, tebuconazol, epoxiconazol, difenoconazol, triticonazol o protioconazol. Los ejemplos de inhibidores de la apirasa utilizados como potenciadores incluyen:

Al.1: N-(m-tolil)-[1, 1'-bifenil]-4-sulfonamida,

Al.10: 2-oxo-2H-cromen-3-carbotioato de S-heptilo,

Al.13: 3-(N-(4-bromofenil) sulfamoil)-N-(3-nitrofenil) benzamida o

Al.15: (E)-3-metil-N'-(1-(naftalen-2-il) etilideno) benzohidrazida.

- 5 En la composición de esta invención, la relación ponderal del fungicida al potenciador a la cual el efecto fungicida es sinérgico está dentro del rango de aproximadamente 500:1 a 5000:1.

Otra forma de realización de la invención se refiere al tratamiento de plantas o semillas de plantas infectadas o en riesgo de infectarse con hongos patógenos. El tratamiento conlleva el contacto de la planta con una formulación del fungicida y el potenciador, donde el fungicida es octanoato de cobre, hidróxido de cobre, miclobutanil, propiconazol, tebuconazol, epoxiconazol, difenoconazol, triticonazol o protioconazol y el potenciador es Al.1, Al.10, Al.13 o Al.15. Las formulaciones de la presente invención son especialmente eficaces contra los patógenos fúngicos de las plantas *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum graminicola*, *Fusarium oxysporum*, *Sclerotiana sclerotiorum*, *Verticillium dahlia*, *Mycospharella graminicola* y *Sphacelotheca reliana*.

En otra forma de realización, la presente invención incluye un fungicida que comprende: un fungicida de cobre o triazol; y un inhibidor de la apirasa en cantidades suficientes para tratar un hongo. En un aspecto, el inhibidor de la apirasa es seleccionado entre por lo menos uno de N-(m-tolil)-[1, 1'-bifenil]-4-sulfonamida; 2-oxo-2H-cromen-3-carbotioato de S-heptilo; 3-(N-(4-bromofenil) sulfamoil)-N-(3-nitrofenil) benzamida; 3-(N-(4-bromofenil) sulfamoil)-N-(3-nitrofenil) benzamida o (E)-3-metil-N'-(1-(naftalen-2-il) etilideno) benzohidrazida. En otro aspecto, el fungicida es adicionado a un medio de cultivo para cultivo celular. En otro aspecto, las células son seleccionadas entre por lo menos un tipo de células bacterianas, fúngicas, vegetales, animales, de mamífero, levadura, de anfibios, aves, nematodos o insectos. En otro aspecto, la composición es sinérgica y la relación ponderal del fungicida al inhibidor de la apirasa es de entre aproximadamente 500:1 y 5000:1.

En otra forma de realización más, la presente invención incluye un método de tratamiento de la infección por un patógeno fúngico que es resistente a los fungicidas de la clase de cobre o de triazol, método que comprende: poner en contacto el patógeno fúngico con una composición que comprende un fungicida de la clase de cobre o de triazol en combinación con un inhibidor de la apirasa fúngica, donde el inhibidor de la apirasa fúngica impide que el hongo realice por lo menos una de estas acciones: desintoxicarse del fungicida o exportar el fungicida. En un aspecto, el fungicida es por lo menos uno seleccionado entre octanoato de cobre, propiconazol, tebuconazol o epoxiconazol. En otro aspecto, el patógeno fúngico es un patógeno de las plantas seleccionado entre por lo menos uno de *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum graminicola*, *Fusarium oxysporum*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Verticillium dahlia*, *Mycosphaella graminicola* o *Sphacelotheca reiliana*. En otro aspecto, el patógeno fúngico es un patógeno de las plantas y la planta tratada es una planta frutal, una planta de hortalizas, una planta productora de nueces o una planta productora de granos. En otro aspecto, el patógeno fúngico es un patógeno de las plantas y la planta tratada es de frutilla, banana, maíz, soja, tabaco, trigo o algodón. En otro aspecto, la composición es sinérgica y la relación ponderal del fungicida al inhibidor de la apirasa es de entre aproximadamente 500:1 y 5000:1.

DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Para una comprensión más completa de las características y ventajas de la presente invención, se hace referencia, ahora, a la descripción detallada de la invención junto con las figuras que la acompañan, en las cuales:

La Figura 1 es un dendrograma que ilustra la relación filogenética entre la apirasa caracterizada de diferentes plantas y especies de hongos. Se construyó el árbol sobre la base de las secuencias de aminoácidos deducida de las secuencias de los genes de apirasa dadas a conocer de diferentes plantas y hongos: apirasa 1 de *Arabidopsis thaliana* (Acceso No. NP_187058), apirasa 2 de *Arabidopsis thaliana* (Acceso No. NP_001154717), *Pisum sativum* (Acceso No. BAA75506), *Botrytis cinerea* (Acceso No. XP_001558134), *Colletotrichum graminicola* (Acceso No. EFQ33146), *Fusarium oxysporum* (Acceso No.

ENH75262), *Sclerotiana sclerotiorum* (Acceso No. XP_001590729) y *Verticillium dahliae* (Acceso No. EGY20804).

Las Figuras 2A a 2C son gráficos que demuestran que los Inhibidores de la apirasa aumentan de manera diferencial la potencia de tres fungicidas diferentes.

5 2A. Octanoato de cobre, 2B. Propiconazol, y 2C. Miclobutanil contra los hongos patógenos *Botrytis cinerea*. Se cultivaron cepas de hongos patógenos de las plantas (*Botrytis cinerea*) en placas de petri con medio YPD en presencia de 65 μ M de inhibidores de la apirasa (AI # 1, 10, 13 y 15) a 30°C por espacio de 12 días. Se agregó un volumen equivalente de dimetilsulfóxido (DMSO) como

10 control. Se repitieron dos veces los estudios con resultados similares. Las barras de error indican las desviaciones standard (n=5). Las significancias de la potencia de los fungicidas están indicadas: *** (Test t de Student, $P < 0.001$); ** (Test t de Student, $P < 0.01$) o * (Test t de Student, $P < 0.05$).

Las Figuras 3A a 3C son gráficos que demuestran que los Inhibidores de la apirasa aumentan de manera diferencial la potencia de tres fungicidas diferentes

15 3A. Octanoato de cobre, 3B. Propiconazol, y 3C. Miclobutanil contra los hongos patógenos *Colletotrichum graminicola*. Se cultivaron cepas de hongos patógenos de las plantas (*Colletotrichum graminicola*) en placas de petri con medio YPD en presencia de 65 μ M de inhibidores de la apirasa (AI # 1, 10, 13 y 15) a 30°C por

20 espacio de 7 días. Se agregó un volumen equivalente de dimetilsulfóxido (DMSO) como control. Se repitieron dos veces los estudios con resultados similares. Las barras de error indican las desviaciones standard (n=5). Las significancias de la potencia de los fungicidas están indicadas: *** (Test t de Student, $P < 0.001$); ** (Test t de Student, $P < 0.01$) o * (Test t de Student, $P < 0.05$).

Las Figuras 4A a 4C son gráficos que demuestran que los Inhibidores de la apirasa aumentan de manera diferencial la potencia de tres fungicidas diferentes

25 4A. Octanoato de cobre, 4B. Propiconazol, y 4C. Miclobutanil contra los hongos patógenos *Fusarium oxysporum*. Se cultivaron cepas de hongos patógenos de las plantas (*Fusarium oxysporum*) en placas de petri con medio YPD en presencia

30 de 65 μ M de inhibidores de la apirasa (AI # 1, 10, 13 y 15) a 30°C por espacio de 12 días. Se agregó un volumen equivalente de dimetilsulfóxido (DMSO) como

control. Se repitieron dos veces los estudios con resultados similares. Las barras de error indican las desviaciones standard (n=5). Las significancias de la potencia de los fungicidas están indicadas: *** (Test t de Student, $P < 0.001$); ** (Test t de Student, $P < 0,01$) o * (Test t de Student, $P < 0,05$).

5 Las Figuras 5A a 5C son gráficos que demuestran que los Inhibidores de la apirasa aumentan de manera diferencial la potencia de tres fungicidas diferentes 5A. Octanoato de cobre, 5B. Propiconazol, y 5C. Miclobutanil contra los hongos patógenos *Sclerotiana sclerotiorum*. Se cultivaron cepas de hongos patógenos de las plantas (*Sclerotiana sclerotiorum*) en placas de petri con medio YPD en presencia de 65 μM de inhibidores de la apirasa (AI # 1, 10, 13 y 15) a 30°C por espacio de 12 días. Se agregó un volumen equivalente de dimetilsulfóxido (DMSO) como control. Se repitieron dos veces los estudios con resultados similares. Las barras de error indican las desviaciones standard (n=5). Las significancias de la potencia de los fungicidas están indicadas: *** (Test t de Student, $P < 0.001$); ** (Test t de Student, $P < 0,01$) o * (Test t de Student, $P < 0,05$).

Las Figuras 6A a 6C son gráficos que demuestran que los Inhibidores de la apirasa aumentan de manera diferencial la potencia de tres fungicidas diferentes 6A. Octanoato de cobre, 6B. Propiconazol, y 6C. Miclobutanil contra los hongos patógenos *Verticillium dahliae*. Se cultivaron cepas de hongos patógenos de las plantas (*Verticillium dahliae*) en placas de petri con medio YPD en presencia de 65 μM de inhibidores de la apirasa (AI # 1, 10, 13 y 15) a 30°C por espacio de 12 días. Se agregó un volumen equivalente de dimetilsulfóxido (DMSO) como control. Se repitieron dos veces los estudios con resultados similares. Las barras de error indican las desviaciones standard (n=5). Las significancias de la potencia de los fungicidas están indicadas: *** (Test t de Student, $P < 0.001$); ** (Test t de Student, $P < 0,01$) o * (Test t de Student, $P < 0,05$).

La FIGURA 7 ilustra ejemplos de estructuras químicas y nombres sistemáticos de los inhibidores de la apirasa (AI) estudiados.

Aunque a continuación se describe la preparación y uso de diversas formas de realización de la presente invención en forma detallada, se ha de apreciar que la presente invención ofrece numerosos conceptos inventivos aplicables que se pueden incorporar a una amplia variedad de contextos específicos. Las formas de realización específicas descritas en la presente son meramente ilustrativas de las maneras específicas de preparar y utilizar la invención y no limitan el alcance de la invención.

En el presente contexto, el término “potenciador”, “intensificador”, se refiere a uno o más compuestos que inhiben la actividad enzimática de la apirasa (un “inhibidor de la apirasa”, “AI” o “ai”), lo que da lugar a la potenciación, acentuación o intensificación de un fungicida leads. Por ejemplo, cuando el potenciador o intensificador se utiliza en combinación con un fungicida, la combinación del potenciador y el fungicida intensifica el efecto fungicida del fungicida y/o convierte en susceptible al fungicida a un hongo que se había tornado resistente al mismo como resultado de la actividad del potenciador. Con mucha frecuencia, estos potenciadores o intensificadores no tienen actividad perjudicial sobre el hongo en sí ni en un organismo que está (o podría estar) infectado con un hongo. Los potenciadores de la presente invención son inhibidores de la apirasa que se dirigen a la resistencia a los hongos de los fungicidas. Entre los ejemplos no excluyentes de potenciadores de la presente invención se cuentan: N-(m-tolil)-[1, 1'-bifenil]-4-sulfonamida (Inhibidor de la apirasa 1 o (AI.1)); 2-oxo-2H-cromen-3-carbotioato de S-heptilo; 3-(N-(4-bromofenil) sulfamoil)-N-(3-nitrofenil) benzamida (AI.10); 3-(N-(4-bromofenil) sulfamoil)-N-(3-nitrofenil) benzamida (AI.13); y/o (E)-3-metil-N'-(1-(naftalen-2-il) etilideno) benzohidrazida (AI.15). La FIGURA 7 ilustra ejemplos de estructuras químicas y nombres sistemáticos de los inhibidores de la apirasa (AI) estudiados. En ciertas formas de realización, el o los potenciadores de fungicidas hacen que una cantidad sub-óptima del fungicida se torne óptima para el tratamiento del hongo, reduciendo así la cantidad de fungicida necesaria para tratar el hongo. Dada la resistencia incrementada de los hongos a los agentes fungicidas debido al uso excesivo de fungicidas, la presente invención no sólo vuelve a tornar susceptibles a hongos que de otro modo eran resistentes, sino que también se espera que reduzca la

probabilidad de que los hongos se tornen resistentes a los fungicidas como resultado de un régimen de dosificación más bajo.

Las apirasas son enzimas cuya característica unificadora es su capacidad para hidrolizar el fosfato gamma de ATP y, en menor medida, el fosfato beta de ADP. La mayoría de las apirasas se expresan en forma de proteínas asociadas a la membrana plasmática con su actividad hidrolítica dirigida a la matriz extracelular. Con frecuencia se hace referencia a las apirasas extracelulares como ecto-apirasas. Frecuentemente las ecto-apirasas hidrolizan el ATP extracelular.

La resistencia de los hongos a los fungicidas se produce habitualmente porque el hongo desarrolla la capacidad de desintoxicarse rápidamente de los fungicidas, por ej., secuestrando el fungicida o exportando el fungicida a través de la membrana plasmática. Los hongos utilizan diversos mecanismos para eliminar estos xenobióticos, y, por ello, ha resultado difícil contrarrestar este efecto. La inhibición de la Resistencia de los hongos a la desintoxicación de los xenobióticos aumentaría la potencia de los fungicidas y/o tornaría nuevamente susceptibles a los hongos que han adquirido resistencia a los fungicidas.

Los compuestos de esta invención se pueden aplicar en forma de una composición que comprende un fungicida, el inhibidor de la apirasa de la presente invención, con, por ej., un vehículo o diluyente fitológicamente aceptable opcional. Estas composiciones con frecuencia son formulaciones concentradas que se pueden diluir en agua u otro líquido para su aplicación. En ciertas formas de realización, también se pueden formular las composiciones para obtener partículas o formulaciones granuladas que se rocían o aplican sin más tratamiento.

En el presente contexto, el término “fitológicamente aceptable” se refiere a composiciones, diluyentes, excipientes y/o vehículos que en general son aplicables para usar con cualquier parte de una planta durante cualquier parte de su ciclo vital, incluyendo, aunque no a modo de limitación, plántulas, células vegetales, plantas o flores. Las composiciones se pueden preparar de acuerdo con procedimientos, métodos y fórmulas que son convencionales en la técnica

agrícola. Siguiendo los principios de la presente invención, el técnico capacitado en la técnica agrícola y/o química puede preparar fácilmente una composición deseada. Muy comúnmente, los compuestos de la presente invención pueden ser formulados para ser almacenados y/o aplicados en forma de suspensiones o emulsiones acuosas o no acuosas preparadas puras o a partir de formulaciones concentradas de las composiciones. También se pueden convertir en sólidas formulaciones hidrosolubles, aptas para suspender en agua o emulsionables o formularlas en esta forma (por ej., polvos humectables), que luego pueden ser diluidas para obtener una formulación final. En ciertas formulaciones, las composiciones de la presente invención también se pueden presentar en medios de cultivo, por ej., medios de cultivo in vitro de células vegetales u otro tipo de células, en medios de cultivo vegetal en laboratorio, en tierra o para rociar sobre semillas, plántulas, raíces, tallos, tallos leñosos, hojas, flores o la planta entera.

Los inventores de la presente notaron que la capacidad de los inhibidores de la apirasa para suprimir la exportación de los herbicidas de las células vegetales mediante la inhibición de la actividad de transporte de ABCB elevaba la posibilidad de que pudieran suprimir la exportación de los fungicidas de los hongos patógenos y, de esa manera, aumentar la potencia de los fungicidas. Los transportadores ABC desempeñan una función clave para contribuir a la resistencia de los hongos patógenos a los fungicidas mediante la exportación de los fungicidas (Kretschmer et al., 2009). No se podía prever que los inhibidores de la apirasa de las plantas podían ser eficaces contra los transportadores de ABC fúngicos (ya que son contrarios a los transportadores de ABCB vegetal) o que pudieran aumentar la potencia fungicida de los fungicidas, tal como aumentan la potencia herbicida de los herbicidas.

Las apirasas son han sido muy estudiadas en células animales y células vegetales, aunque han sido tan bien caracterizadas en hongos patógenos de las plantas (Knowles et al., 2011; Clark et al., 2014). Las ectofosfatasas fúngicas han sido mejor caracterizadas y también hidrolizan el ATP y ADP, aunque su K_m para estos sustratos es mucho más elevada que la de las apirasas. Se ha demostrado que las ectofosfatasas desempeñan funciones importantes en los procesos de nutrición, proliferación, diferenciación, adhesión, virulencia e infección, por lo que

podrían afectar la resistencia de los hongos a los fungicidas de otras maneras. La adhesión a las células huésped es el primer paso para establecer una infección fúngica y las ectofosfatasa pueden ser una de las primeras proteínas parasitarias que entran en contacto con las células huésped. Varios resultados indican que

5 las actividades de ectofosfatasa aumentan la potencia de los hongos para adherirse a las células huésped (Freitas–Mesquita AL et al., 2014).

La presente invención demuestra, por primera vez, que determinados inhibidores de la apirasa aumentan la potencia de los fungicidas corrientes existentes para restringir de manera más efectiva el desarrollo de varias especies

10 de hongos patógenos de las plantas. En ciertas formas de realización no limitantes, los inhibidores de la apirasa se pueden presentar en una relación en peso de: 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,5, 3,0, 4,0, 5,0, 7,5, y 10% en una composición final. Cuando se presentan en forma líquida, los inhibidores de la apirasa se pueden incluir en una relación en volumen

15 de: 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,5, 3,0, 4,0, 5,0, 7,5, y 10% en una composición final diluida. La persona con capacitación en la técnica ha de reconocer que la formulación del fungicida y el inhibidor de la apirasa se puede presentar en un concentrado que se puede diluir antes de usar o se puede presentar en forma diluida ya preparada para el

20 tratamiento.

Para fines analíticos, se utilizaron los diversos fungicidas e inhibidores con la presente invención en ciertas concentraciones. La persona con capacitación en la técnica reconocerá las diversas composiciones utilizadas comercialmente en concentraciones y formulaciones varias. Por ejemplo, es habitual aplicar los

25 fungicidas comercialmente en concentraciones de 14–30% debido, por ej., a reglamentaciones ambientales. La presente invención fue de particular utilidad con diversos fungicidas conocidos por perder efectividad como resultado de un aumento de la resistencia de los hongos, por ej., fungicidas de cobre y de triazol.

Por ejemplo, el Propiconazol es un miembro de la clase de fungicidas de

30 triazol, el grupo más numeroso de fungicidas por su participación en el mercado. El Propiconazol se utiliza en frutas, hortalizas, cultivos en surco y hierbas de

césped para controlar una variedad de enfermedades fúngicas. El Miclobutanil también es un miembro de la clase de fungicidas de triazol. El Miclobutanil se utiliza en frutas, hortalizas, cultivos en surco y hierbas de césped para controlar una variedad de enfermedades fúngicas.

5 El octanoato de cobre es un miembro de la clase de fungicidas de compuestos de cobre, que es la segunda clase en tamaño de fungicidas utilizados en los Estados Unidos por su participación en el mercado. El octanoato de cobre se utiliza principalmente en frutas y hortalizas para controlar una variedad de enfermedades fúngicas.

10 La presente invención busca producir formulaciones fungicidas particularmente eficaces contra patógenos fúngicos de las plantas, por ejemplo, *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum graminicola*, *Fusarium oxysporum*, *Sclerotiana sclerotiorum*, *Verticillium dahlia*, *Mycospharella graminicola* y *Sphacelotheca reliana*.

15 *Botrytis cinerea* es un patógeno aerotransportado de las plantas con un estilo de vida necrotrófico que ataca a más de 200 cultivos en todo el mundo. Ataca principalmente especies de plantas dicotiledóneas, incluyendo cultivos importantes productores de proteínas, aceite, fibra y hortalizas, vides y frutillas. Muchas clases de fungicidas han fracasado en el control de *Botrytis cinerea*
20 debido a su plasticidad genética (Williamson et al., 2007). *Botrytis* también causa podredumbre blanda secundaria de las frutas y hortalizas durante su almacenamiento, tránsito y permanencia en el mercado (González et al., 2006).

El género *Colletotrichum* comprende ~600 especies que atacan a más de 3.200 especies de plantas mono y dicotiledóneas. *Colletotrichum graminicola*
25 infecta principalmente al maíz (*Zea mays*), causando pérdidas anuales de aproximadamente 1.000 millones de dólares en los Estados Unidos solamente (Connell et al., 2012).

El marchitamiento por *Fusarium* de la banana, causado por el hongo transmitido por el suelo *Fusarium oxysporum f.sp. cubense*, fue dado a conocer
30 por primera vez en Australia en 1874. El marchitamiento por *Fusarium* de la banana es una importante amenaza para la producción de banana en el mundo.

En la actualidad no se dispone de fungicidas para controlar con eficacia la enfermedad una vez infectadas las plantas (Peng J et al., 2014).

Se sabe que el hongo de moho blanco *Sclerotinia sclerotiorum* ataca a más de 400 especies hospedadoras y se considera uno de los patógenos más generalizados de las plantas. La mayoría de estas especies son dicotiledóneas, junto con un número de plantas monocotiledóneas de importancia agrícola (Bolton et al., 2006). Algunos cultivos importantes afectados por *S. sclerotiorum* incluyen legumbres (soja), la mayoría de las hortalizas, frutas de carozo y tabaco.

El ascomiceto *Verticillium dahliae* es un patógeno fúngico de las plantas transmitido por el suelo que causa enfermedades de marchitamiento vascular en una amplia gama de especies hospedadoras dicotiledóneas (Klosterman et al., 2009). *V. dahliae* puede causar graves pérdidas de rendimiento y calidad en el algodón y otros cultivos importantes tales como hortalizas, fibras, fruta, árboles productores de nueces, plantaciones forestales y plantas ornamentales (Bhat y Subbarao, 1999; Pegg y Brady, 2002).

El hongo ascomiceto *Mycosphaella gramincola* (anamorfo: *Septoria tritici*) es una de las enfermedades foliares más importantes de las hojas de trigo, que aparece dondequiera que se cultive el trigo. Las pérdidas de rendimiento atribuidas a esta enfermedad oscilan entre 25%–50%, y son especialmente elevadas en Europa, la región del Mediterráneo y África oriental. La infección por *M. gramincola* se inicia a causa de ascosporas aerotransportadas producidas en residuos del cultivo de la temporada anterior. La infección primaria se produce habitualmente una vez emergidas las plántulas en la primavera u otoño. La enfermedad madura se caracteriza por lesiones necróticas en las hojas y tallos de las plantas infectadas.

El hongo basidiomiceto *Sphacelotheca reiliana* infecta el maíz (*Zea mays*) en forma sistémica, causando carbón de las espigas. La pérdida de rendimiento atribuida a la enfermedad es variable, y depende directamente de la incidencia de la enfermedad. El hongo pasa el invierno en forma de teliosporas diploides en los desechos del cultivo o el suelo. Las estructuras florales se convierten en masas

de teliosporas pulverulentas con contenido de soros que se asemejan a las agallas maduras del carbón o tizón común.

Se obtuvieron cepas fúngicas de los patógenos de las plantas *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum graminicola*, *Fusarium oxysporum*, *Sclerotiana sclerotiorum* y *Verticillium dahliae* del Institute for Plant Genomics & Biotechnology, Texas A & M University, EE. UU. Se utilizó comúnmente agar de papa y dextrosa (PDA, Sigma–Aldrich) para el cultivo de diferentes cepas de hongos patógenos.

En este estudio se utilizaron los inhibidores de la ectofosfatasa NGXT191 (Al. 1), Al.10, NGXT1913 (Al. 13), y Al. 15. Se emplearon los fungicidas octanoato de cobre ($C_{16}H_{30}CuO_4$), miclobutanil ($C_{15}H_{17}ClN_4$) y propiconazol ($C_{15}H_{17}Cl_2N_3O_2$). Las concentraciones de estos compuestos utilizadas fueron: octanoato de cobre (285 mM), miclobutanil (53.6 mM) y propiconazol (418 mM).

Ensayo de cultivo de hongos:

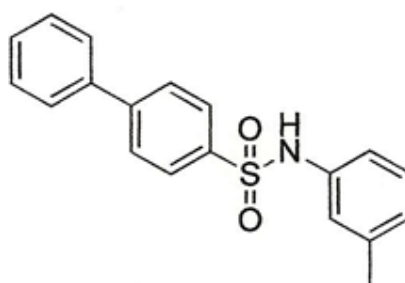
Se realizaron análisis de discos standard para determinar la susceptibilidad antifúngica para determinar algún efecto potenciador de los inhibidores de la ectofosfatasa sobre el desarrollo de hongos patógenos. Se cultivaron cepas de hongos patógenos de tipo salvaje en medio PDA con discos de papel que contenían los fungicidas en el centro de la placa. Las placas contenían inhibidores de la ectofosfatasa (65 μ M) o una concentración igual de solvente DMSO (que sirvió como control) que, aplicada sola, no afectó el desarrollo de los hongos patógenos. Las placas fueron incubadas a 30°C por espacio de 7 días (*C. graminicola* y *S. sclerotiorum*) o 12 días (*B. cinerea*, *F. oxysporum* y *V. dahliae*), dependiendo de la velocidad de crecimiento de los hongos. Se fotografiaron las placas y se midió la zona de inhibición fúngica utilizando el software IMAGE J™ (NIH, USA). Todos los ensayos se llevaron a cabo con 5 repeticiones. Los estudios se realizaron dos veces. Se analizaron los resultados para determinar la significancia utilizando tests T de Student.

Análisis de secuencia y filogenético de la apirasa:

Comparación de la secuencia de aminoácidos deducida de la apirasa (nucleósido trifosfato–difosfohidrolasas) de diferentes plantas y hongos patógenos. Se preparó apirasa 1 de *Arabidopsis thaliana* (Acceso No. NP_187058), apirasa 2 de *Arabidopsis thaliana* (Acceso No. NP_001154717),
 5 *Pisum sativum* (Acceso No. BAA75506), *Botrytis cinerea* (Acceso No. XP_001558134), *Colletotrichum graminicola* (Acceso No. EFQ33146), *Fusarium oxysporum* (Acceso No. ENH75262), *Sclerotinia sclerotiorum* (Acceso No. XP_001590729) y *Verticillium dahliae* (Acceso No. EGY20804). Un alineamiento múltiple de las secuencias de aminoácidos deducidas reveló que la estructura
 10 primaria de las apirasas de diferentes hongos patógenos difiere en el tamaño de sus extremos C–terminales de otras apirasas vegetales conocidas, pero retienen los dominios conservados de la funcionalmente importante superfamilia de la GDA1/CD39 (nucleósido fosfatasa). De los cinco hongos estudiados, *B. cinerea* no presenta ninguna región de unión nucleotídica del dominio de la superfamilia
 15 del azúcar quinasa /HSP70/actina, aunque esta región está presente en *C. graminicola*, *F. oxysporum*, *S. sclerotiorum* y *V. dahliae*. El árbol filogenético demuestra que *C. graminicola* y *V. dahliae* están cerca uno de otro y se encuentran en la misma rama, en tanto que *B. cinerea*, *F. oxysporum* y *S. sclerotiorum* yacen en ramas diferentes (Fig. 1).

20 Los inhibidores de la apirasa inhiben el crecimiento de los patógenos fúngicos de las plantas:

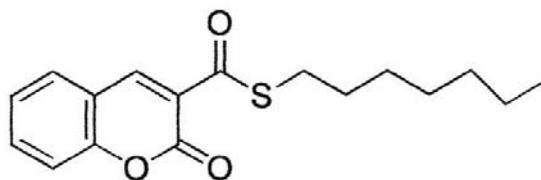
Se utilizaron los siguientes ejemplos de inhibidores de la ectofosfatasa (apirasa) en este estudio:



Fórmula: $C_{19}H_{17}NO_2S$

NOMBRE: N-(m-tolil)-[1,1'-bifenil]-4-sulfonamida

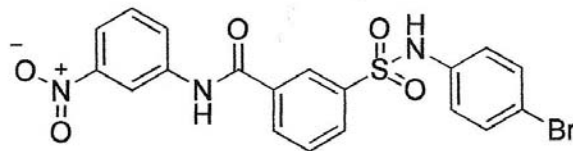
AI.1: N-(m-tolil)-[1, 1'-bifenil]-4-sulfonamida.



Fórmula $C_{17}H_{20}O_3S$

N. NOMBRE: 2-oxo-2H-cromen-3-carbotioato de S-heptilo

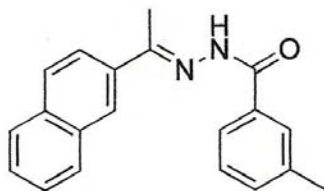
AI.10: 2-oxo-2H-cromen-3-carbotioato de S-heptilo.



Fórmula: $C_{14}H_{14}N_3O_5SBr$

NOMBRE; 3-(N-(4-bromofenil) sulfamoil)-N-(3-nitrofenil) benzamida

AI.13: 3-(N-(4-bromofenil) sulfamoil)-N-(3-nitrofenil) benzamida.



Fórmula: $C_{20}H_{18}N_2O$

I NOMBRE: (E)-3-metil-N'-(1-(naftalen-2-il) etilideno) benzohidrazida

AI.15: (E)-3-metil-N'-(1-(naftalen-2-il) etilideno) benzohidrazida.

Estos inhibidores de la apirasa potenciaron de manera diferencial el efecto de los fungicidas de compuestos de cobre y de triazol (octanoato de cobre, miclobutanil, propiconazol, tebuconazol o epoxiconazol) contra los hongos

patógenos de las plantas, a juzgar por los ensayos de cultivo utilizados (Wang et al., 2012) y como se describe en detalle en las siguientes secciones.

Al analizar cada uno de los compuestos, abreviados por conveniencia como: Al.1, Al.10, Al.13 y Al.15 (ver lo anterior), respectivamente, solos en
5 ensayos de cultivo fúngico, no se detectó actividad fungicida alguna. Los inhibidores de la apirasa analizados no afectaron el desarrollo de los hongos.

Ejemplo 1: *Botrytis cinerea*

Se cultivó el hongo patógeno *B. cinerea* en presencia de fungicidas (Octanoato de cobre, Miclobutanil y Propiconazol) suplementados con los
10 inhibidores de la apirasa Al.1, Al.10, Al.13 y Al. 15. El octanoato de cobre combinado con el inhibidor Al.1 tuvo un efecto inhibitorio significativamente mayor sobre el crecimiento de *B. cinerea* (22%) en comparación con el octanoato de cobre solo (Fig. 2A). También el miclobutanil combinado con los inhibidores Al.1, Al.13 y Al.15, 1 tuvo un efecto inhibitorio significativamente mayor sobre el
15 crecimiento de *B. cinerea* en comparación con el miclobutanil solo (Fig. 2B). El fungicida propiconazol combinado con los inhibidores Al.1, Al.10 y Al.15 tuvo un efecto inhibitorio mayor sobre el crecimiento de *B. cinerea* en comparación con el propiconazol solo (Fig. 2C).

Ejemplo 2: *Colletotrichum graminicola*

Se cultivó el hongo patógeno *C. graminicola* en presencia de fungicidas (octanoato de cobre, miclobutanil y propiconazol) suplementados con los
20 inhibidores de la apirasa Al.1, Al.10, Al.13 y Al.15. El octanoato de cobre combinado con los inhibidores Al.1 y Al.13 tuvo un efecto inhibitorio significativamente mayor sobre el crecimiento de *C. graminicola* en comparación con el octanoato de cobre solo (Fig. 3A). En presencia de los inhibidores Al.1, Al.10, Al.13 y Al.15, el fungicida miclobutanil tuvo un efecto inhibitorio significativamente mayor sobre el desarrollo de *C. graminicola* en comparación
25 con el miclobutanil solo (Fig. 3B). Ninguno de los cuatro inhibidores junto con el propiconazol pudo inhibir el desarrollo del hongo de manera más significativa que el propiconazol usado solo (Fig. 3C).
30

Ejemplo 3: *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*

Se cultivó el hongo patógeno *F. oxysporum* en presencia de fungicidas (octanoato de cobre, miclobutanil y propiconazol) suplementados con los inhibidores de la apirasa Al.1, Al.10, Al.13 y Al.15. El octanoato de cobre
 5 combinado con los inhibidores Al.1 y Al.13 tuvo un efecto inhibitorio significativamente mayor sobre el desarrollo de *F. oxysporum* que el octanoato de cobre solo (Fig. 4A). El fungicida miclobutanil en presencia del inhibidor Al.10 tuvo un efecto inhibitorio significativamente mayor sobre el desarrollo de *F. oxysporum* que el miclobutanil solo (Fig. 4B). En presencia del Al.10 el fungicida
 10 propiconazol tuvo un efecto inhibitorio significativamente mayor sobre el desarrollo de *F. oxysporum* que el propiconazol solo (Fig. 4C).

Ejemplo 4: *Sclerotiana sclerotiorum*

Se cultivó el hongo patógeno *Sclerotiana sclerotiorum* en presencia de fungicidas (octanoato de cobre, miclobutanil y propiconazol) suplementados con los inhibidores de la apirasa Al.1, Al.10, Al.13 y Al.15. El octanoato de cobre
 15 combinado con los inhibidores Al.1, Al.10, Al.13 y Al.15 tuvo un efecto inhibitorio significativamente mayor sobre el desarrollo de *Sclerotiana sclerotiorum* que el octanoato de cobre solo (Fig. 5A). Miclobutanil en presencia de los inhibidores Al.1, Al.10, Al.13 y Al.15 tuvo un efecto inhibitorio significativamente mayor sobre
 20 el desarrollo de *Sclerotiana sclerotiorum* que el miclobutanil (Fig. 5B) solo. El fungicida propiconazol combinado con los inhibidores Al.1, Al.10, Al.13 y Al.15 tuvo un efecto inhibitorio significativamente mayor sobre el desarrollo de *Sclerotiana sclerotiorum* que el propiconazol solo (Fig. 5C).

Ejemplo 5: *Verticillium dahliae*

Se cultivó el hongo patógeno *V. dahliae* en presencia de fungicidas (octanoato de cobre, miclobutanil y propiconazol) suplementados con los inhibidores de la apirasa Al.1, Al.10, Al.13 y Al.15. El octanoato de cobre
 25 combinado con los inhibidores Al.1, Al.10, Al.13 y Al.15 tuvo un efecto inhibitorio significativamente mayor sobre el desarrollo del hongo *V. dahliae* que el octanoato de cobre solo (Fig. 6A). Miclobutanil combinado con el inhibidor Al.15 15 tuvo un
 30 efecto inhibitorio significativamente mayor sobre el desarrollo de *V. dahliae* que el

miclobutanil solo (Fig. 6B). Propiconazol en presencia de los inhibidores AI.10 y AI.15 tuvo un efecto inhibitorio significativamente mayor sobre el desarrollo de *V. dahliae* que el propiconazol solo (Fig. 6C).

Ejemplo 6: Tebuconazol y AI

5 Los compuestos fueron analizados para determinar la eficacia contra la enfermedad en combinación con el fungicida RAXIL® (tebuconazol), junto con una baja proporción de metalaxil sobre la semilla de trigo. Las proporciones de tebuconazol, de 0,15 y 0,25 gm ia/100 kg, analizadas en combinación con el Potenciador AI.1 fueron 7,5 y 10 veces inferiores a la tasa de aplicación comercial
10 de 1,5 gm ia/100 kg. Previamente se realizaron evaluaciones de enfermedad con las proporciones reducidas de tebuconazol y metalaxil para garantizar la falta de eficacia a estas proporciones más bajas. Se incluyó triazol en una proporción standard de 1,5 gm ia/100 kg en el estudio como control. Los productos fueron aplicados tanto en forma de tratamiento adicional de semillas pretratadas con la
15 combinación de tebuconazol + metalaxil y en forma de mezcla acuosa única de los dos fungicidas. Se evaluaron dos proporciones, 2,5 y 10 gm ia/100kg, del Potenciador AI.1.

Bioensayos en las semillas. Los bioensayos se llevaron a cabo en cajas cerradas estériles que permiten la detección de patógenos fúngicos acarreados
20 por las semillas. Se esterilizó la superficie de cajas de zapatos plásticas y se colocaron papeles secante estériles en el fondo de cada recipiente. Las evaluaciones de monocotiledóneas difieren de las evaluaciones de dicotiledóneas según los métodos utilizados para matar las semillas. Se colocan monocotiledóneas sobre los secantes humedecidos con agua esterilizada y se las
25 deja incubar a 25°C durante 1 día para luego colocarlas a 0°C por espacio de 24 horas para matar los embriones de las semillas. Se colocan semillas de dicotiledóneas sobre secantes embebidos con una solución suave del herbicida 2,4-D utilizado para matar los embriones. Luego se colocan las cajas de bioensayo a 25°C por espacio de 7 días. Se observa y registra el desarrollo de
30 los hongos por medio de una evaluación por microscopio de cada semilla.

Normalmente se realizan dos replicaciones de 50 semillas cada una. Los resultados están consignados en la Tabla 1.

Tabla 1. Eficacia de los tratamientos de las semillas contra la enfermedad transmitida por la semilla del fungicida RAXIL® (tebuconazol) y el Potenciador Al.1.

Tratamiento	Recuentos de hongos totales * Var. A	Recuentos de hongos totales * Var. B
Sin tratar	56	69
Raxil @ 1.5 gm ia/100 kg	20	25
Raxil @ 0.25 gm ia/100 kg	28	36
Raxil @ 0.25 gm ia/100 kg + Potenciador 1 @ 2.5 gm ia/100 kg	11	29
Raxil @ .15 gm ia/100 kg	23	46
Raxil @ 0.15 gm ia/100 kg + Potenciador 1 @ 2.5 gm ia/100 kg	9	21

* Los recuentos de las poblaciones fúngicas fueron recuentos combinados de poblaciones de *Alternaria*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, y *Cladosporium*

Ensayo NSL+. Una evaluación de limo arenoso (NSL) está compuesta por una mezcla 1:1 de arena a limo, en la cual el limo está infectado naturalmente con *Pythium* spp. y otros microbios endémicos del suelo. El ensayo NSL+ mantiene la misma mezcla de tierra y un componente adicional de *Fusarium graminearum*. Se inoculó un aislado apropiado de *F. graminearum* en la zona de siembra. Se colocan las semillas plantadas en atmósfera a 10°C para dar lugar un ambiente óptimo para la presión de *Pythium*. Después de 10 días en las condiciones descritas, las semillas fueron trasladadas al invernadero (27°C) para la emergencia de las plántulas y la evaluación de la supervivencia. El ensayo NSL+ permite la evaluación de un compuesto en cuanto a la actividad tanto de *Pythium* como de *Fusarium* en el mismo ensayo, similar a lo que ocurre en condiciones típicas de campo. Todos los tratamientos se repitieron cinco veces y se realizó en forma aleatoria la ubicación en el invernadero. Se evaluó la emergencia y supervivencia de las plántulas. Se incluyó un control estéril en todas las

evaluaciones. El control estéril estaba compuesto por semillas sin tratar colocadas en una mezcla NSL esterilizada. Los resultados se presentan en las Tablas 2 y 3.

Tabla 2.

Tratamiento	% Grado de establecimiento a los 21 Días
Sin tratar	20
Raxil @ 1.5 gm ai/ 100 kg	96
Raxil @ .25 gm ai/ 100 kg	84
Raxil @ .25 gm ia/100 kg + A.I. #1 @ 2.5 gm ai/ 100 kg	96
Raxil @ .15 gm ai/ 100 kg	80
Raxil @ .15 gm ia/100 kg + A.I. #1 @ 2.5 gm ai/ 100 kg	88
Control Estéril	100

Tabla 3: El ensayo de campo demuestra la potenciación de Raxil (tebuconazol) contra el Carbón (tizón) de las Espigas (*Sphacelotheca reiliana*) de Maíz.

Tratamiento	Tipo de Tratamiento	Recuento de establecidas	% Total de plantas infectadas
Sin tratar Control	Sin Control Fungicida	275	31.2
Metalaxil + Triadiminol @ 62 gms ia/100 kg	Proporción según Etiqueta de Control Fungicida	293	24.2
Metalaxil + Triadiminol @ 20.7 gms ia/100 kg + A.I. #1 @ 10 gms ai/ 100 kg	1/3 de Proporción de Control Fungicida + Potenciador #1	255	36.6
Metalaxil + Tebuconazol @ 7.5 gms ia/100 kg	Proporción según Etiqueta de Tebuconazol	252	24.9
Metalaxil + Tebuconazol @ 2.5 gms ia/100 kg + A.I. #1 @ 10 gms ia/100 kg	1/3 de Proporción según Etiqueta de Tebuconazol + Potenciador #1	271	16

5

Ejemplo 7: Comparación de diferentes Inhibidores de la apirasa sobre la Actividad de Epoxiconazol.

Se cultivaron aislados en agar de Levadura Papa y Dextrosa. Se llevaron a cabo ensayos de sensibilidad a los fungicidas basados en mediciones de DO en
 10 placas de 96 pocillos utilizando aproximadamente 10.000 esporas por pocillo (recuentos de esporas por microscopía). Las concentraciones de ensayo de los potenciadores eran de 0, 0,003, 0,016, 0,08, 0,4, 2, 10 y 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$. Las concentraciones de fungicidas analizadas eran de 0, 0,00128, 0,0064, 0,016, 0,032, 0,08, 0,16, 0,8, 4, 10, 20 y 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$. Los resultados están consignados
 15 en las Tablas 4 y 5.

Tabla 4. Efecto de diferentes inhibidores de la apirasa sobre la susceptibilidad al epoxiconazol del aislado de *Mycosphaerella graminicola* FLU4–02.

Concentración del Potenciador ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	Epoxiconazol EC_{50} ($\mu\text{g ml}^{-1}$)					
	Potenciador A.I.1	Potenciador A.I. 2	Potenciador A.I. 10	Potenciador A.I. 12	Potenciador A.I. 14	Potenciador A.I. 16
0	0,091	0,078	0,084	0,088	0,077	0,073
0,003	0,071	0,075	0,074	0,074	0,08	0,072
0,016	0,073	0,058	0,066	0,066	0,07	0,07
0,08	0,044	0,064	0,065	0,065	0,077	0,068
0,4	0,018	0,080	0,078	0,078	0,086	0,069
2,0	0,002	0,076	0,073	0,075	0,086	0,069
10	0,002	0,077	0,083	No hubo desarrollo	0,098	0,081

5

El Potenciador A.I.1 es N-(m-tolil)-[1, 1'-bifenil]-4-sulfonamida.

El Potenciador A.I. 2 es 3-hexil-2,3-dihidro-N,4-difeniltiazol-2-bromuro de amonio.

El Potenciador A.I. 10 es 2-oxo-2H-cromen-3-carbotioato de S-heptilo.

- 10 El Potenciador A.I. 12 es 2-[(N-ciclohexilglicil) amino]-4,5,6,7-tetrahidro-1-benzotiofen-3-carboxilato de etilo.

El Potenciador A.I. 14 es (E)-N'-(2-hidroxi-5-nitrobencilideno)hexanhidrazida.

El Potenciador A.I. 16 es benzoato de prop-2-inil 2-(4-clorofenilcarbamoilo).

Tabla 5. Efecto del Potenciador A.I.1 sobre la susceptibilidad a diferentes fungicidas del aislado de *Septoria tritici* G3-03.

Concentración del Potenciador A.I.1 ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	EC ₅₀ ($\mu\text{g mL}^{-1}$)				
	Azoxistrobina	Carbendazim	Clorotalonil	Ciprodinil	Epoxiconazol
0	7,210	>50	0,370	3,055	0,142
0,003	7,339	>50	0,369	3,135	0,142
0,016	7,071	>50	0,357	2,995	0,141
0,08	6,914	>50	0,369	2,838	0,145
0.4	6,958	>50	0,335	3,244	0,06
2.0	5,157	>50	0,36	4,046	0,008
10	2,816	>50	0,364	4,220	0,004

Las composiciones de esta invención se aplican a las plantas en forma de dispersiones, soluciones, suspensiones, aerosoles y polvo, que comprenden el fungicida y el potenciador de esta invención y un vehículo inerte fitológicamente aceptable. El vehículo de uso más generalizado es agua. Las composiciones son formulaciones concentradas que se dispersan en agua para la aplicación, o bien son formulaciones de polvo o gránulos que se aplican sin más tratamiento. Las composiciones se preparan de acuerdo con procedimientos y fórmulas que son convencionales en la técnica agroquímica, aunque son novedosas e importantes debido a la presencia en las mismas de los compuestos de esta invención.

La cantidad real de la composición que se ha de aplicar a las plantas no es crucial y puede ser fácilmente determinada por las personas con capacitación en la técnica. En general, se estima que concentraciones de 10 ppm a 5000 ppm en peso del compuesto activo debe producir un control favorable. Con muchos de los compuestos, han de bastar concentraciones de 100 a 1500 ppm.

Se pueden controlar las enfermedades fúngicas de las plantas aplicando cantidades efectivas de la composición de la invención a los patógenos de las

plantas o al lugar en que habitan los patógenos de las plantas o al lugar (planta, suelo) en que pueden habitar los patógenos de las plantas. Se pueden controlar las enfermedades fúngicas de las plantas aplicando cantidades efectivas de las composiciones a una planta o al lugar en que se deja crecer una planta. La
5 aplicación se efectúa específicamente al tallo y las hojas de la planta, a las semillas de la planta, a los bulbos de la planta, incluyendo el bulbo, cormo, rizoma, tallo tuberoso, raíz tuberosa y rizóforo.

Como tratamiento del suelo en el método de control de la presente invención, se puede incluir, por ejemplo, la fumigación del suelo, la mezcla con el
10 suelo, la perfusión de un agente líquido en el suelo (irrigación de un agente líquido, inyección en el suelo, goteo de un agente líquido). El tratamiento se puede llevar a cabo antes de la diseminación, en el momento de la diseminación, inmediatamente después de la diseminación, durante el período de emergencia de las plántulas, antes de la plantación establecida, en el momento de la
15 plantación establecida y el tiempo de crecimiento posterior a la plantación establecida.

Se contempla la posibilidad de implementar cualquier forma de realización descrita en esta memoria descriptiva con respecto a cualquier método, kit, reactivo o composición de la invención, y vice versa. Más aun, se pueden emplear
20 las composiciones de la invención para obtener métodos de la invención.

Se ha de comprender que sólo se exponen las formas de realización específicas descritas en la presente a modo de ilustración y no como limitaciones de la invención. Las características principales de esta invención se pueden emplear en diversas formas de realización sin apartarse del alcance de la
25 invención. Las personas con capacitación en la técnica han de reconocer o poder determinar, sin recurrir a más que la experimentación de rutina, los numerosos equivalentes de los procedimientos específicos aquí descritos. Esos equivalentes se consideran incluidos dentro del alcance de esta invención y cubiertos por las reivindicaciones.

30 Todas las publicaciones y solicitudes de patente mencionadas en la memoria descriptiva son indicativas del nivel de capacitación de las personas con

capacitación en la técnica a la cual pertenece esta invención. Todas las publicaciones y solicitudes de patente se incorporan a la presente como referencia en la misma medida que si se indicara que cada publicación o solicitud de patente individual se incorpora a la presente como referencia.

- 5 El uso de la palabra “un” o “una” utilizada en combinación con el término “que comprende” en las reivindicaciones y/o en la memoria descriptiva pueden referirse a “uno”, aunque también es consistente con el significado de “uno o más”, “por lo menos uno” y “uno o más de uno”. El uso del término “o” en las
- 10 términos se refiere sólo a alternativas o que las alternativas son mutuamente excluyentes, si bien la descripción admite una definición que se refiere a sólo alternativas e “y/o.” En toda la extensión de esta solicitud, se utiliza el término “aproximadamente” para indicar que un valor incluye la variación de error inherente correspondiente al dispositivo, al método que se está empleando para
- 15 determinar el valor o a la variación que existe entre los sujetos en estudio.

- En el marco de la presente memoria y las reivindicaciones, las palabras “que comprende” (y cualquier forma del verbo comprender, tal como “comprende” y “comprenden”), “que tiene” (y cualquier forma del verbo tener tal como “tiene” y “tienen”), “que incluye (y cualquier forma del verbo incluir tal como “incluye” e
- 20 “incluyen”) o “que contiene” (y cualquier forma del verbo contener tal como “contiene” y “contienen”) son incluyentes o de alcance abierto y no excluye otros elementos o pasos de método adicionales no mencionados.

- El término “o combinaciones de los mismos” se refiere, en el presente contexto, a todas las permutaciones y combinaciones de los elementos
- 25 enumerados que preceden al término. Por ejemplo, “A, B, C o combinaciones de los mismos” ha de incluir por lo menos uno de: A, B, C, AB, AC, BC o ABC, y si el orden es importante en un contexto determinado, también BA, CA, CB, CBA, BCA, ACB, BAC o CAB. Continuando con este ejemplo, se incluyen expresamente las combinaciones que contienen repeticiones de uno o más
- 30 elementos o términos, como por ejemplo BB, AAA, AB, BBC, AAABCCCC, CBBA, CABABB, y así sucesivamente. La persona con capacitación en la

técnica comprenderá que por lo general no hay límite en cuanto al número de elementos o términos en cualquier combinación, a menos que del contexto surja evidentemente lo contrario.

5 Todas las composiciones y/o métodos descriptos y reivindicados en la presente se pueden preparar y ejecutar sin indebida experimentación a la luz de la presente revelación. Si bien se han descripto las composiciones y métodos de esta invención en términos de formas de realización preferidas, ha de ser evidente para las personas con capacitación en la técnica que se pueden aplicar variaciones a las composiciones y/o métodos y a los pasos o la secuencia de
10 pasos del método descripto en la presente sin apartarse del concepto, espíritu y alcance de la invención. Todos dichos sustitutos y modificaciones similares evidentes para las personas con capacitación en la técnica se consideran incluidos en el espíritu, alcance y concepto de la invención definida por las reivindicaciones adjuntas.

FIG. 1

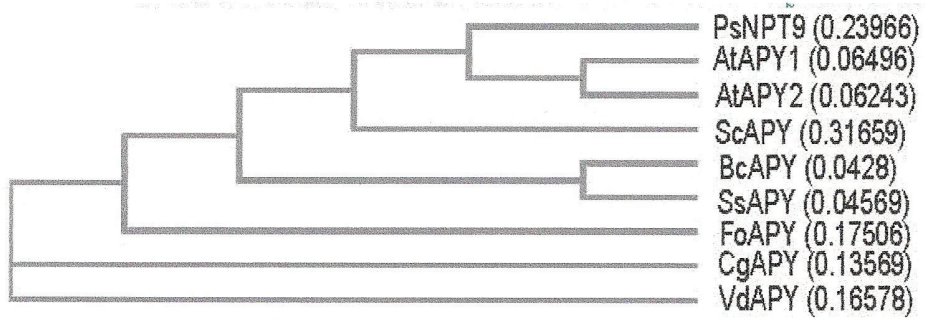


FIG. 2

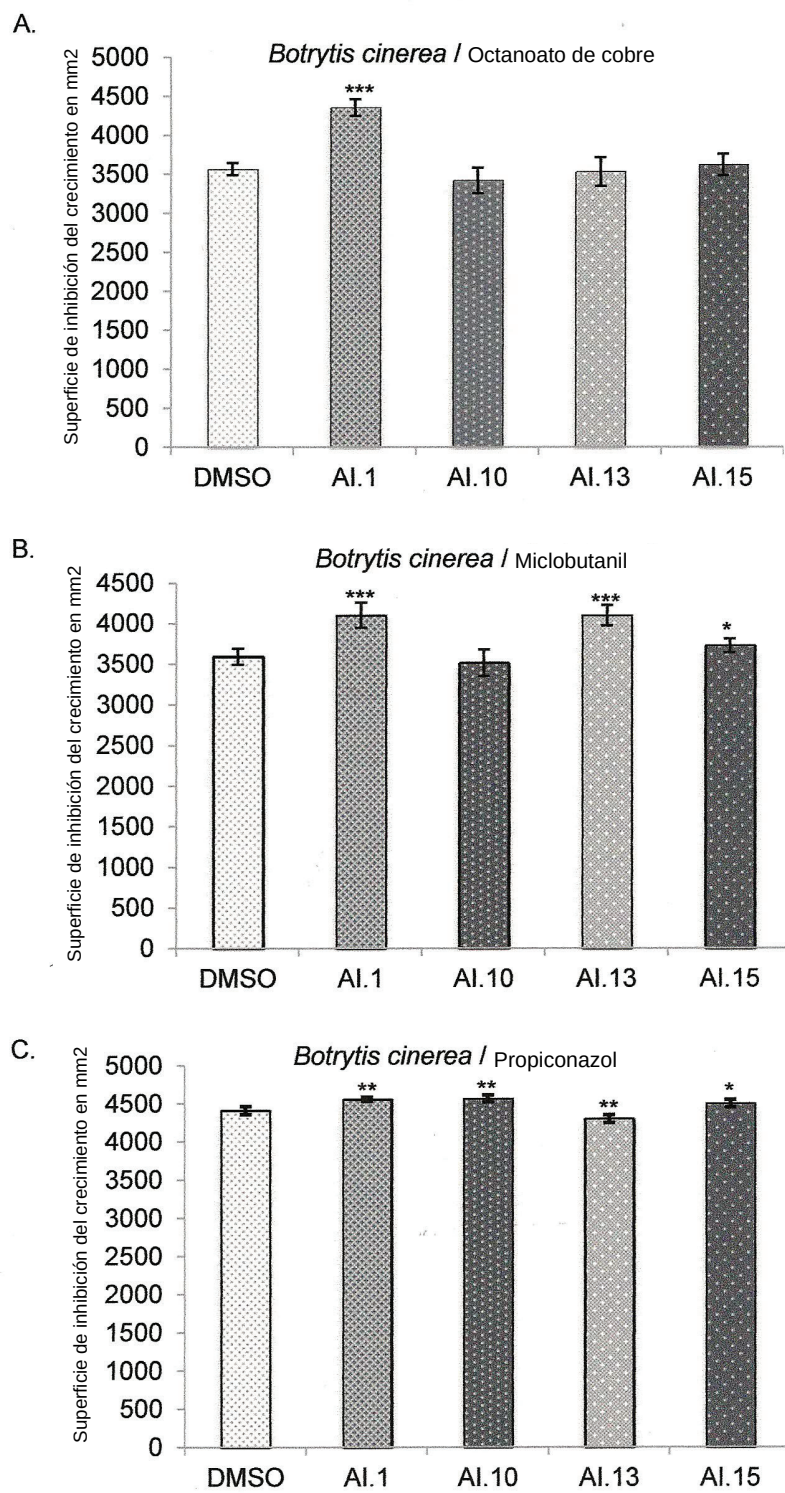
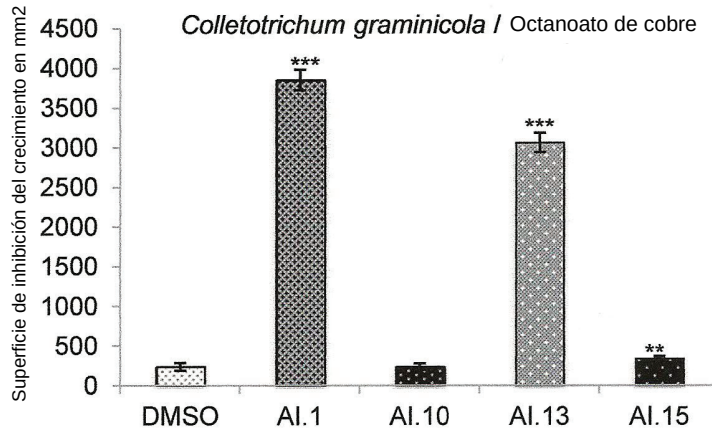
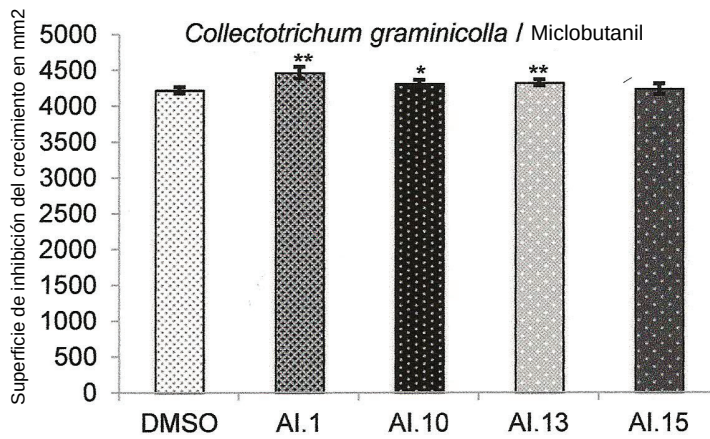


FIG. 3

A.



B.



C.

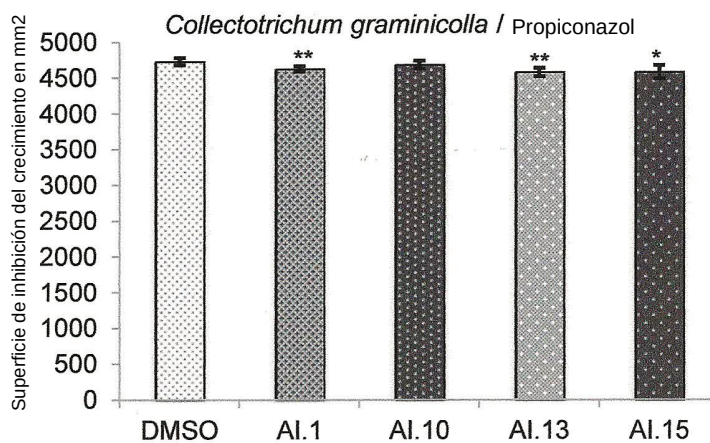


FIG. 4

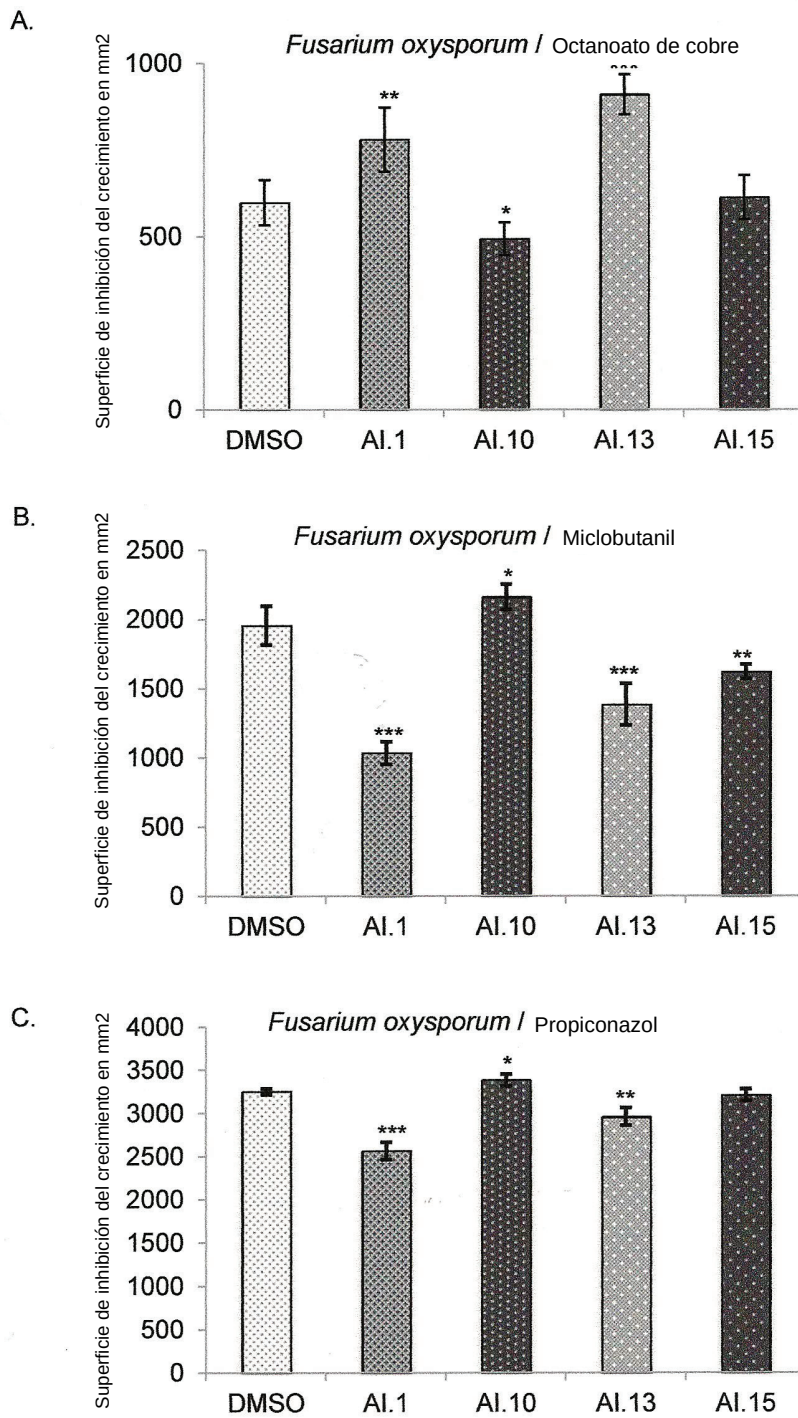


FIG. 5

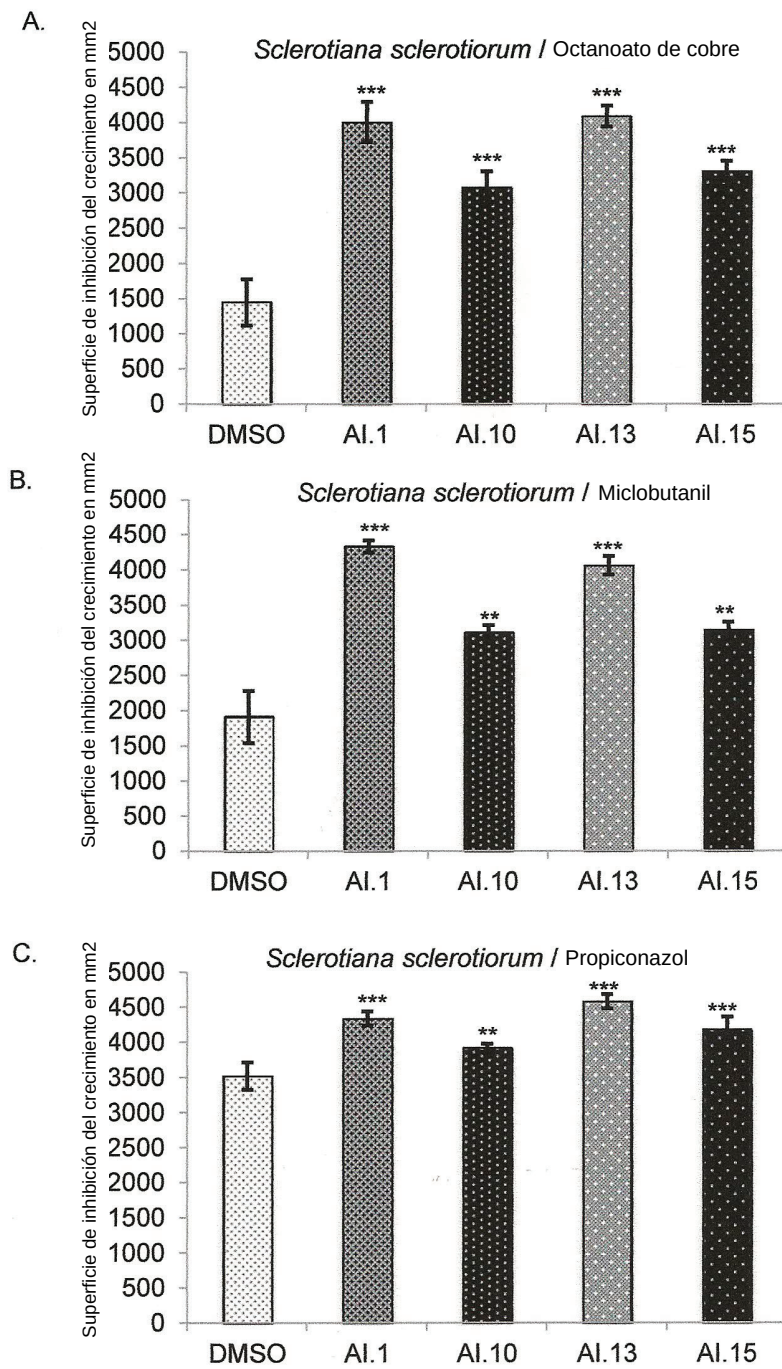


FIG. 6

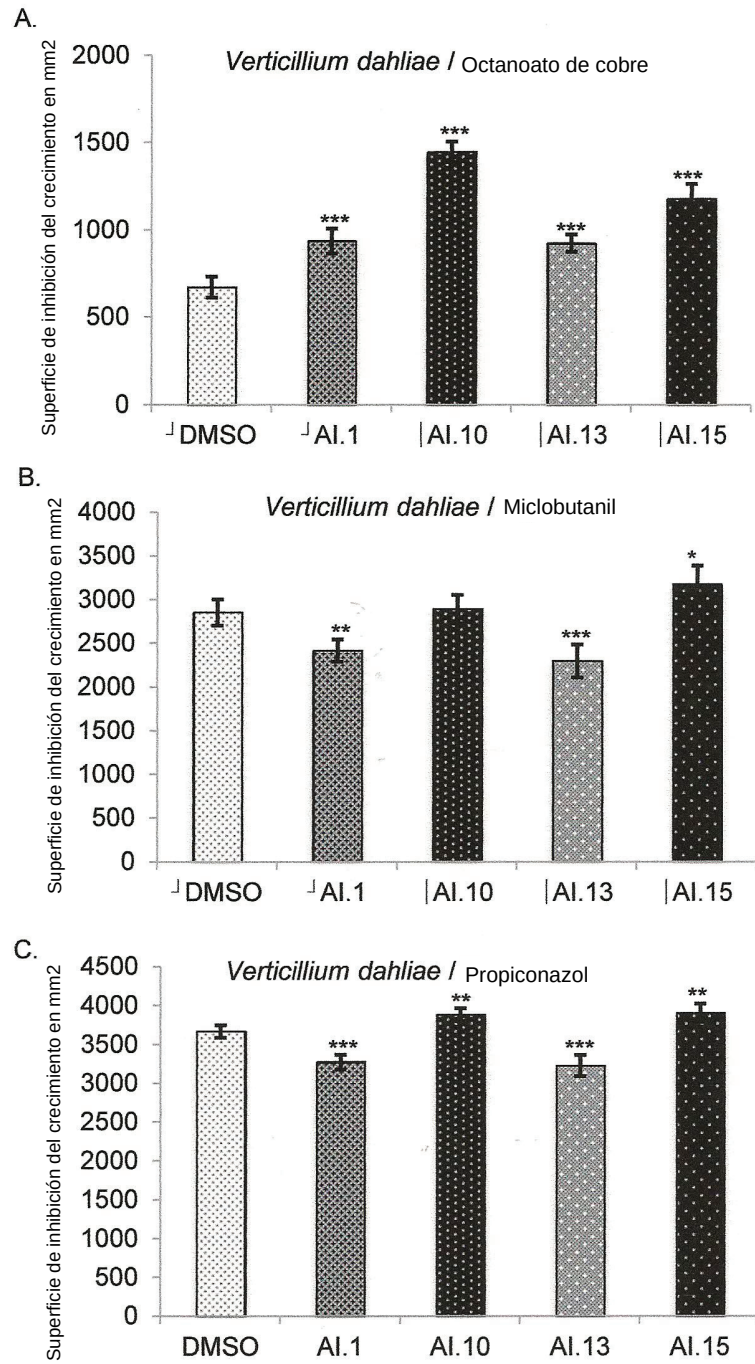
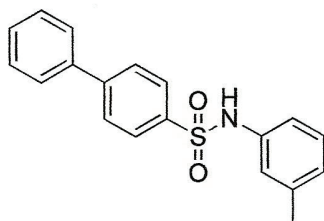
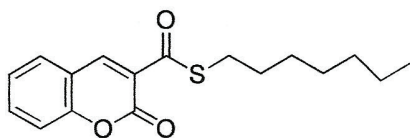


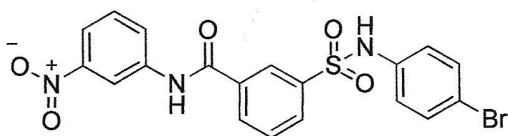
FIG. 7

Fórmula : $C_{19}H_{17}NO_2S$

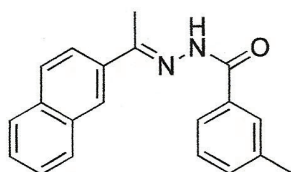
NOMBRE : N-(m-tolil)-[1, 1'-bifenil]-4-sulfonamida

Fórmula : $C_{17}H_{20}O_3S$

NOMBRE : 2-oxo-2H-cromen-3-carbotioato de S-heptilo

Fórmula : $C_{19}H_{14}N_3O_5SBr$

NOMBRE : 3-(N-(4-bromofenil) sulfamoil)-N-(3-nitrofenil) benzamida

Fórmula : $C_{20}H_{18}N_2O$

NOMBRE : (E)-3-metil-N'-(1-(naftalen-2-il) etilideno) benzohidrazida