

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad Intelectual
Oficina internacional



(10) Número de Publicación Internacional
WO 2012/131117 A1

(43) Fecha de publicación internacional
4 de octubre de 2012 (04.10.2012) **WIPO | PCT**

(51) Clasificación Internacional de Patentes:
A01N 63/00 (2006.01) A01N 35/04 (2006.01)
A01N 65/42 (2009.01) A01P 3/00 (2006.01)

(21) Número de la solicitud internacional:
PCT/ES2012/000057

(22) Fecha de presentación internacional:
13 de marzo de 2012 (13.03.2012)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:
P201130461 28 de marzo de 2011 (28.03.2011) ES

(71) Solicitante (para todos los Estados designados salvo US):
BODEGAS VEGA SICILIA, S.A. [ES/ES]; Finca Vega Sicilia Cr. N122, Km. 323, 47359 Valbuena de Duero, Valladolid (ES).

(72) Inventores; e

(75) Inventores/Solicitantes (para US solamente): **MATEO BERNAL, Rosa María** [ES/ES]; Finca Vega Sicilia Cr.

N122, Km. 323, 47359 Valbuena de Duero, Valladolid (ES). **COBOS ROMÁN, Rebeca** [ES/ES]; Finca Vega Sicilia Cr. N122, Km. 323, 47359 Valbuena de Duero, Valladolid (ES). **GARCÍA ANGULO, Penélope** [ES/ES]; Finca Vega Sicilia Cr. N122, Km. 323, 47359 Valbuena de Duero, Valladolid (ES). **ALONSO MONROY, Alberto** [ES/ES]; Finca Vega Sicilia Cr. N122, Km. 323, 47359 Valbuena de Duero, Valladolid (ES). **ÁLVAREZ RODRÍGUEZ, María Luisa** [ES/ES]; Finca Vega Sicilia Cr. N122, Km. 323, 47359 Valbuena de Duero, Valladolid (ES). **SEVILLANO NISTAL, Silvia** [ES/ES]; Finca Vega Sicilia Cr. N122, Km. 323, 47359 Valbuena de Duero, Valladolid (ES). **ÁLAVARE PÉREZ, José Manuel** [ES/ES]; Finca Vega Sicilia Cr. N122, Km. 323, 47359 Valbuena de Duero, Valladolid (ES). **ACEBES ARRANZ, José Luis** [ES/ES]; Finca Vega Sicilia Cr. N122, Km. 323, 47359 Valbuena de Duero, Valladolid (ES). **GARZÓN JIMENO, Enrique** [ES/ES]; Finca Vega Sicilia Cr. N122, Km. 323, 47359 Valbuena de Duero, Valladolid (ES). **RUBIO COQUE, Juan José** [ES/ES]; Finca Vega Sicilia Cr. N122, Km. 323, 47359 Valbuena de Duero, Valladolid (ES).

[Continúa en la página siguiente]

(54) Title: USE OF NATURAL ANTIFUNGAL AGENTS IN ORDER TO PREVENT THE INFECTION OF PRUNING WOUNDS, GRAFTS AND LESIONS IN WOODY PLANTS BY PHYTOPATHOGENIC FUNGI

(54) Título : UTILIZACIÓN DE ANTIFÚNGICOS NATURALES PARA PREVENIR LA INFECCIÓN DE LESIONES, INJERTOS Y HERIDAS DE PODA EN PLANTAS LEÑOSAS POR HONGOS FITOPATÓGENOS

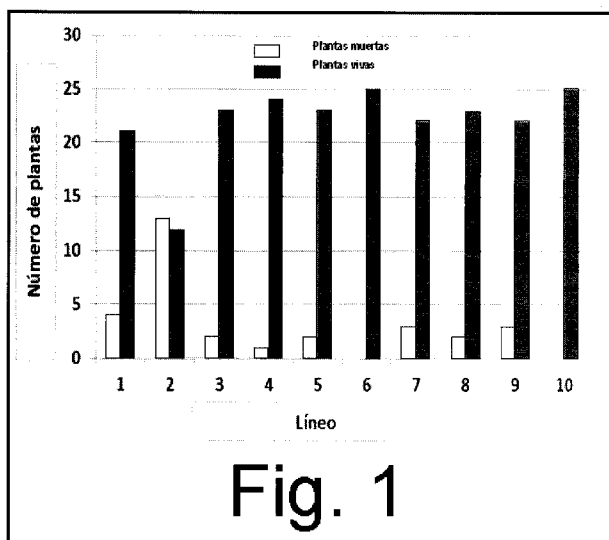


Fig. 1

(57) Abstract: The invention relates to the use of natural antifungal agents in order to prevent the infection of pruning wounds, grafts and lesions in woody plants by phytopathogenic fungi, comprising chitosan oligosaccharide, hydroalcoholic extract of garlic and/or vanillin, alone or in combination. The invention also relates to the application of chitosan oligosaccharide, hydroalcoholic extract of garlic and/or vanillin, alone or in combination, to pruning wounds, grafts or any other type of lesions affecting woody plants, preferably vines, in order to prevent infection by species of phytopathogenic fungi that cause wood diseases.

(57) Resumen: Utilización de antifúngicos naturales para prevenir la infección de lesiones, injertos y heridas de poda en plantas leñosas por hongos fitopatógenos, que comprende quitosán oligosacárido, extracto hidroalcohólico de ajo y/o vainillina, solos o en cualquier combinación. Aplicación de quitosán oligosacárido,

[Continúa en la página siguiente]

AA Number of plants
BB Dead plants
CC Living plants
DD Line

WO 2012/131117 A1



- (74) **Mandatario:** URIZAR BARANDIARAN, Miguel Angel; Gordoniz, 22, 5°, 48012 Bilbao, Bizkaia (ES).
- (81) **Estados designados** (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) **Estados designados** (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Publicada:**
— con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))

UTILIZACIÓN DE ANTIFÚNGICOS NATURALES PARA PREVENIR LA INFECCIÓN DE LESIONES, INJERTOS Y HERIDAS DE PODA EN PLANTAS LEÑOSAS POR HONGOS FITOPATÓGENOS

DESCRIPCIÓN

- 5 El objeto del invento se refiere a la utilización de antifúngicos naturales, aplicados solos o en combinación, para prevenir la infección por hongos fitopatógenos de lesiones, heridas de poda e injertos en plantas leñosas.

Campo técnico de la invención.

- 10 La presente invención se refiere a la utilización, solos o en combinación, de tres compuestos/extractos naturales que tienen propiedades antifúngicas por separado y que al combinarse muestran una efectividad muy alta para evitar la infección a través de lesiones, heridas de poda e injertos de plantas de vid por hongos fitopatógenos responsables de enfermedades de madera de vid, evitando la muerte de la planta debida a este tipo de patógenos.

- 15 Los distintos compuestos/extractos y su mezcla han mostrado en ensayos realizados en laboratorio sobre placas de medio de cultivo una gran capacidad de inhibir el crecimiento de los siguientes hongos fitopatógenos implicados en el desarrollo de enfermedades de madera de vid: *Botryosphaeria dothidea*, *Cylindrocarpon macrodidymum* (*Neonectria macrodidyma*), *Diplodia seriata*, *Eutypa*
20 *lata*, *Phaeomoniella chlamydospora*, *Phaeoacremonium aleophyllum* y *Phomopsis viticola*.

- Los distintos compuestos/extractos y su mezcla han mostrado en ensayos realizados en laboratorio con sarmientos de vid de 7-10 cm de longitud una gran capacidad para inhibir el desarrollo y colonización de los hongos citados
25 anteriormente del interior de los sarmientos, evitando su desplazamiento por el interior de los mismos.

- Los distintos compuestos/extractos y su mezcla han mostrado en ensayos realizados en campo no tener un efecto negativo sobre el desarrollo de la planta, además de inhibir la infección de la planta por los hongos citados anteriormente a
30 través de las heridas de poda. Las plantas sometidas a tratamiento e infectadas artificialmente mostraron, tras dos años de ensayo una tasa de mortalidad del 0-12%, frente a plantas de vid no tratadas e infectadas artificialmente que mostraron

una tasa de mortalidad del 52%. Estos datos confirman la eficacia en campo del tratamiento realizado a fin de evitar la infección de hongos fitopatógenos a través de heridas de poda.

Aunque estos compuestos/extractos podrían ser usados individualmente, o en distintas combinaciones, es especialmente recomendable su uso conjunto como antifúngicos para evitar la infección de plantas de vida a través de heridas de poda, injertos u otro tipo de lesiones.

Antecedentes de la invención

En el actual estado de la técnica, el solicitante desconoce precedentes de invenciones referidas a la utilización de antifúngicos naturales, aplicados solos o en combinación, para prevenir la infección de lesiones, injertos y heridas de poda en plantas leñosas por hongos fitopatógenos.

El término enfermedades de madera de vid (grapevine trunk diseases) o decaimiento de la vid (grapevine decline) engloba un conjunto de patologías producidas como consecuencia de la infección de la planta por una serie de hongos fitopatógenos. La infección de las plantas es un problema sin resolver que generalmente se inicia a través de la raíz o más frecuentemente a través de las heridas de poda u otro tipo de lesiones producidas durante el laboreo del viñedo o el ataque de insectos.

Tradicionalmente, estos problemas a resolver se han distinguido entre varias patologías. En función de los síntomas y los hongos más frecuentemente aislados en el caso de plantas enfermas, las enfermedades o patologías más importantes son las que indicamos a continuación:

- Enfermedad de Petri. Afecta principalmente a plantas jóvenes. Causa graves pérdidas económicas en nuevas plantaciones, provocando a veces la muerte de hasta el 90% de las plantas. Los agentes causales serían *Phaeocremonium aleophylum* y *Phaeomoniella chlamydospora* [Bertelly et al., (1998), *Phytopathol. Mediterr.* 37: 79-82]. Las plantas presentan un crecimiento débil y una reducción de la masa radicular que produce un agotamiento prematuro. En el caso de esta enfermedad se ha establecido una clara relación entre la aparición de síntomas en viñedo y la presencia de plantas infectadas en vivero [Giménez-Jaime et al., (2006), *J. Phytopathol.* 154: 598–602].

- Yesca (apoplejía). Una de las enfermedades de vid más antiguas que se conocen considerada como endémica de todas las zonas vitivinícolas mundiales. Afecta principalmente a cepas de más de 25 años y los principales hongos asociados son (como en el caso de la enfermedad de Petri) *P. aleophyllum* y *P. chlamydospora*, aunque con cierta frecuencia se pueden aislar los patógenos *Stereum hirsutum* y *Fomitiporia mediterranea* [Surico et al., (2006), *Phytopathol. Mediterr.* 45: 68–86]. Las plantas presentan decoloraciones y necrosis foliares muy evidentes. La producción se reduce y los racimos llegan a pasificarse. Con cierta frecuencia la enfermedad produce una apoplejía o muerte repentina de la planta sobre todo en climas cálidos [Cobos, (2008), Tesis Doctoral. Departamento de Microbiología y Genética. Universidad de Salamanca].
- Eutipiosis. Se trata de una enfermedad de distribución mundial producida por el hongo *Eutypa lata*. Las plantas presentan pámpanos débiles con entrenudos cortos y hojas pequeñas, deformadas y cloróticas [Lecomte et al., (2000), *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 4475-4480].
- Pie negro. Enfermedad de distribución mundial que afecta preferentemente a plantas jóvenes (2-10 años). El nombre de la enfermedad hace referencia a la presencia de raíces necrosadas con oscurecimiento de los vasos xilemáticos [Hallen et al., (2004), *Stud. Mycol.* 50: 431-455]. Se trata de una patología asociada a distintas especies del género *Cylindrocarpon* [Alaniz y col., (2007), *Plant Disease* 91: 1187-1193].
- Excoriosis. Patología de distribución mundial producida por *Phomopsis viticola*. Afecta a todos los órganos de la planta y los daños ocasionados son variados [Dubos, (2002), *Maladies cryptogamiques de la vigne*. Ed. Feret. Bordeaux].
- Síndrome del brazo muerto. El síntoma más característico es la aparición de necrosis superficiales en ramas y tronco que se observan al levantar la corteza. En sección transversal el tejido muestra una decoloración sectorial de color negro, desarrollándose el patógeno en los haces vasculares. Los principales hongos asociados son miembros de la familia

Botryosphaeriaceae como *Diplodia seriata* y *Diplodia mutila*. [van Niekerk et al., (2006), *Phytopathol. Mediterr.* 45: (Supplement): 43–54].

El límite que existe entre estas enfermedades es muy tenue y de hecho ocasionalmente las plantas pueden presentar síntomas que se podrían atribuir a 2 ó
5 más enfermedades. Además, a partir de plantas afectadas es muy frecuente poder aislar una mezcla de diferentes hongos fitopatógenos. Por ello la tendencia actual es la de considerar que todas estas enfermedades son una misma patología (enfermedad de madera o decaimiento de la vid), pudiendo variar la sintomatología en función de los hongos patógenos implicados en el proceso infeccioso y de las
10 condiciones ambientales, o diferencias atribuibles a las diferentes variedades de vid [Cobos, (2008), Tesis Doctoral. Departamento de Microbiología y Genética. Universidad de Salamanca].

Las enfermedades de madera de vid son un grave problema para el sector vitivinícola mundial. A nivel europeo el sector vitivinícola es importantísimo para la
15 Unión Europea. Representa el 47% de la superficie vitícola mundial y el 60% de la producción mundial de vino. Los principales productores a nivel mundial son Francia, Italia, España, abarcando entre los tres más del 50% de la producción mundial y acaparando el 53,8% de las exportaciones mundiales.

El sector vitivinícola español es de gran importancia por el valor económico que
20 genera, por la extensión que ocupa, así como por el papel que desempeña en la conservación medioambiental y la buena imagen que aporta de España a nivel internacional. España dedica 1,2 millones de hectáreas al cultivo de la uva (de la que el 97,4 % se destina a vinificación, el 2% a uva de mesa, el 0,3 % a la elaboración de pasas y el 0,3 % restante a viveros). Se trata del país con mayor
25 extensión de viñedo del mundo. Además la vid ocupa el tercer lugar en extensión de los cultivos españoles, detrás de los cereales y el olivar.

Las enfermedades de madera de vid son probablemente en la actualidad la mayor amenaza a la que tienen que enfrentarse los viticultores y viveros de vid en todo el mundo por varios motivos:

30 1).- La ausencia de métodos de control efectivos. De hecho en la actualidad los viticultores únicamente pueden recurrir al empleo de medidas preventivas para limitar o minimizar la transmisión de los hongos responsables entre las que podemos citar métodos culturales (como la eliminación lo más rápida posible de la

madera enferma, quema de residuos de poda, desinfección de las herramientas de poda, etc) y métodos físicos como tratar los plantones con calor (baños de agua a 50°C durante 15-30 minutos) antes de su plantación en suelo [Cobos, (2008), Tesis Doctoral. Departamento de Microbiología y Genética. Universidad de Salamanca].

5 No obstante se han realizado algunos estudios que plantean el uso de agentes de control biológico para tratar estas enfermedades. Así, Di Marco y Osti [(2007), Phytopathol. Mediterr. 46: 73-83] comprobaron la efectividad de un preparado comercial del BCA *Trichoderma harzianum* para controlar la infección por *P. chlamydospora* en viveros. El BCA mostró cierta eficacia promoviendo el desarrollo

10 del sistema radicular e incrementando el porcentaje de plantas que sobrevivían a la infección con el patógeno. Sin embargo, también como efecto adverso se observó un incremento en la mortalidad de las plantas tratadas con el BCA, posiblemente debido a la ausencia de adaptación BCA-vid. Otros autores [Munkvold y Marois, (1993), Phytopathol. 83: 624-629] aislaron a partir de heridas de poda de vid una

15 cepa del hongo *Fusarium lateritium* que se comporta como BCA frente a *Eutypa lata* (el principal fitopatógeno responsable de la eutipiosis) y del que se han aislado incluso mutantes resistentes al antifúngico benomilo a fin de incrementar la eficacia del tratamiento [McMahan et al., (2001), J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 26: 151-155]. También se ha descrito el aislamiento de BCAs bacterianos antagonista contra

20 *Eutypa lata* [Schmidt et al., (2001), J. Phytopathol. 149: 427-435] aunque no se ha probado su eficacia en plantas vivas.

II).- Las enfermedades de madera de vid generan graves pérdidas económicas debido a disminución de los rendimientos de la planta, pérdida de calidad de la uva, muerte de plantas, gastos de arrancamiento y replantación, etc. Aunque cuantificar

25 dichas pérdidas es muy difícil algunos análisis indican que sólo en el estado de California (USA) la enfermedad de madera conocida como eutipiosis suponía en el año 2001 unas pérdidas económicas estimadas en 260 millones de dólares [Siever, (2001), Wines & Vines (April): 50-56]. Más recientemente y sólo en el caso de la enfermedad de madera conocida como yesca las pérdidas para los viticultores se

30 han estimado entre 213-788 dólares por acre (o lo que es lo mismo unos 532-1970 dólares por hectárea [Vasquez et al., (2007), Phytopathol. Mediterr. 46: 118].

III).- La incidencia del problema es elevada. En efecto, desde la prohibición del uso del arsenito sódico en 2003 para su tratamiento se observa un lento pero continuado aumento del número de plantas afectadas. Así en un estudio realizado

en viñedos de Castilla y León correspondientes a las denominaciones de origen Cigales, Toro, Ribera de Duero, y Tierra de León se ha pasado de un grado de afectación del 1.8% en el año 2001 a un grado de afectación del 10.5% en el año 2007 [Martín y Cobos, (2007), *Phytopathol. Mediterr.* 46: 18-25]. Este efecto tiene un carácter global detectándose en otros países europeos [Michelon et al., (2006), *Phytopathol. Mediterr.* 46: 105].

IV).- El problema no sólo afecta a los viticultores de todo el mundo sino que es también un grave problema para los viveros de planta de vid, ya que varios estudios indican que en una elevada proporción las plantas se infectan en el vivero y cuando llegan al viticultor para ser cultivadas en campo ya están infectadas, desarrollando la patología en momentos diferentes dependiendo de variados factores como características del suelo, condiciones climáticas, situaciones de estrés, variedad de vid, etc [Giménez-Jaime et al., (2006), *J. Phytopathol.* 154: 598–602; Aroca y Raposo, (2005), *Phytoma* 167: 56-59].

15 **Objeto de la invención.**

El objeto de la invención se relaciona con el uso de quitosán oligosacárido, extracto de ajo (*Allium sativum* L.) y vainillina (4-hidroxi-3 metoxibenzaldehído), utilizados solos o en combinación para el tratamiento de heridas de poda de vid. Estos compuestos/extractos se han seleccionado tras ensayar numerosos compuestos/extractos naturales con propiedades antifúngicas.

Todos ellos son productos naturales:

- El quitosán se obtiene a partir del exoesqueleto de crustáceos (gambas, langostino, etc) y su consumo está permitido en humanos como suplemento dietético.
- 25 • El extracto hidroalcohólico de ajo se obtiene a partir de ajos de cualquier variedad aptos para el consumo humano.
- La vainillina es el principal componente de la vaina de la vainilla y se emplea como saborizante en el sector alimentario y también como preservante alimentario.
- 30 Estos compuestos/extractos, solos o en combinación, se aplican sobre la herida de poda inmediatamente después de producirse ésta mediante aplicación con brocha,

pulverización o mediante tijeras de poda especiales que aplican el producto simultáneamente a la realización del corte.

Ensayo 1: Para determinar el efecto inhibitorio del quitosán, extracto hidroalcohólico de ajo y vainillina sobre el crecimiento de hongos fitopatógenos responsables de enfermedades de madera de vid determinado mediante ensayos en placa.

Todos los ensayos (a menos que se indique lo contrario) se realizaron frente a los siguientes patógenos: *Botryosphaeria dothidea*, *Cylindrocarpon macrodidymum* (*Neonectria macrodidyma*), *Diplodia seriata*, *Eutypa lata*, *Phaeoconiella chlamydospora*, *Phaeoacremonium aleophilum* y *Phomopsis viticola*.

Los ensayos consistieron en inocular dichos hongos en el centro de placas de medio de cultivo PDA (agar dextrosa de patata) conteniendo el compuesto/extracto antifúngico. Las placas se incubaron a 25°C durante 5-30 días dependiendo de la especie de hongo y midiendo el crecimiento radial de la colonia cada 24 horas. Los valores de crecimiento radial obtenidos se compararon con datos de crecimiento radial del mismo hongo creciendo sobre placas de medio PDA que no contenían el antifúngico.

* Efecto inhibitorio del quitosán en placa. Los resultados obtenidos en placa para la actividad antifúngica del quitosán oligosacárido (ensayado en el rango 0,05 – 4 mg/ml preparado por disolución en agua) revelaban que 4 mg/ml de quitosán oligosacárido inhibía al 100% el crecimiento del micelio de todos los hongos analizados. No obstante, la MIC (concentración mínima de inhibición) varía entre algunos tipos de hongos siendo de 0.5 mg/ml para *E. lata*, de 0.75 mg/ml para *C. macrodidyma*, *P. chlamydospora*, *P. aleophilum* y *P. viticola* y de 1 mg/ml para los hongos *D. seriata* y *B. dothidea*. El efecto del quitosán a una concentración de 2 mg/ml fue fungistático para todos los hongos ensayados, excepto para *C. macrodidymum* y *P. aleophilum* que exhibió un carácter fungicida.

* Efecto inhibitorio del extracto hidroalcohólico de ajo en placa. En este caso se trataba de un extracto hidroalcohólico de ajo al 30% (p/v) preparado en etanol al 10%. El extracto hidroalcohólico de ajo se ensayó en el rango de concentración 2-20%. El extracto hidroalcohólico de ajo al 6% inhibía al 100% el crecimiento de todos los hongos patógenos con la excepción de *C. macrodidymum* (inhibición del

95%) y de *E. lata* (inhibición del 82%). El extracto hidroalcohólico de ajo al 10% mostró un efecto fungistático frente a todos los hongos ensayados.

* Efecto inhibitorio de la vainillina en placa. La vainillina se preparó inicialmente a una concentración de 300 mg/ml en metanol al 50% y se diluyó en agua hasta la
5 concentración de trabajo. En este caso el efecto antifúngico de la vainillina se ensayó en un rango de concentración de 0.5-10 mg/ml. La vainillina a una concentración de 4 mg/ml inhibió al 100% el crecimiento en placa de los hongos *B. dothidea*, *C. macrodidimum*, *D. seriata* y *P. viticola*. El crecimiento de *E. lata*, *P. chlamydospora* y *P. aleophyllum* fue inhibido al 100% a una concentración de 8
10 mg/ml. La vainillina a una concentración de 10 mg/ml mostró efecto fungistático frente a todos los hongos ensayados, excepto frente a *B. dothidea*, *C. macrodidimum* y *P. chlamydospora* que mostró efecto fungicida.

* Efecto inhibitorio de la mezcla quitosán-extracto hidroalcohólico de ajo-vainillina (mezcla QAV) en placa. La mezcla se preparó conteniendo quitosán (2 mg/ml),
15 extracto hidroalcohólico de ajo (4%) y vainillina (2 mg/ml). Con esta composición la mezcla mostró un claro efecto sinérgico de sus componentes ya que inhibía al 100% el crecimiento de todos los patógenos ensayados, mientras que ninguno de sus componentes por separado mostró esa capacidad. El efecto sinérgico y las propiedades mejoradas de la mezcla se pusieron también de manifiesto porque la
20 mezcla tenía carácter fungicida frente a todos los patógenos, provocando su muerte tras una incubación en su presencia de 1-6 horas de duración.

Ensayo 2: Para determinar el efecto inhibitorio del quitosán, extracto hidroalcohólico de ajo y vainillina sobre el crecimiento de hongos fitopatógenos responsables de enfermedades de madera de vid determinado mediante ensayos
25 realizados sobre sarmientos de vid.

Los ensayos se realizaron con sarmientos de vid de 7-10 cm de longitud. Los sarmientos se esterilizan en autoclave para eliminar cualquier hongo o bacteria que pueda interferir en el ensayo. El ensayo consiste en realizar una pequeña cavidad en el sarmiento de unos 4 mm de diámetro y profundidad utilizando un bisturí. A
30 continuación añadimos 100 microlitros del antifúngico (o de la mezcla) y dejamos que sea adsorbido durante 1-2 horas. A continuación se introduce en la cavidad un fragmento de agar de unos 3 mm de diámetro portador del hongo fitopatógeno. Seguidamente el orificio se sella con papel plástico y el sarmiento se introduce en un tubo de plástico estéril en cuyo fondo introducimos algodón estéril empapado en

agua para conservar condiciones de humedad en el interior del tubo que favorezcan el desarrollo del hongo. Seguidamente el tubo se incubaba a 25°C durante 7-30 días dependiendo del hongo utilizado. Seguidamente procedemos al análisis de los sarmientos cortando 2 rodajas de madera 1 cm por encima y por debajo del punto
5 de inoculación. De cada rodaja se extraen 7 astillas de madera que se depositan sobre placas de medio PDA. Tras una incubación a 25°C, para permitir el crecimiento del hongo, se calculan los resultados de inhibición de crecimiento del patógeno por el antifúngico, que se expresan como la relación (porcentaje) de astillas desde las que se desarrolla patógeno en el caso de sarmientos tratados con
10 antifúngico, frente al número de astillas que desarrollan crecimiento del patógeno en el caso de sarmientos infectados pero no tratados con el antifúngico. Cada ensayo se realizó por triplicado utilizando lotes de 3 sarmientos control y 3 sarmientos tratados con antifúngico.

En este caso los ensayos se realizaron frente a los siguientes hongos:
15 *Botryosphaeria dothidea*, *Cylindrocarpon macrodidymum* (*Neonectria macrodidyma*), *Diplodia seriata*, *Eutypa lata*, *Phaeoconiella chlamydospora*, y *Phomopsis viticola*.

* Efecto inhibitorio del quitosán en sarmientos de vid. En este ensayo se utilizó una concentración de quitosán de 10 mg/ml. A esta concentración el quitosán inhibía al
20 100% la capacidad de propagarse a través del sarmiento de todos los hongos, excepto *C. macrodidymum* (inhibición del 90%) y *E. lata* (inhibición del 75%).

* Efecto inhibitorio del extracto hidroalcohólico de ajo en sarmientos de vid. En estos ensayos se utilizó extracto hidroalcohólico de ajo al 10%. A esta concentración se produjo una inhibición del 100% del crecimiento para todos los
25 hongos excepto para *C. macrodidymum* (en que la inhibición fue del 40%).

* Efecto inhibitorio de la vainillina en sarmientos de vid. La concentración de vainillina utilizada en los ensayos fue de 4 mg/ml. En estas condiciones el antifúngico inhibía al 100% el crecimiento de *P. chlamydospora* y *P. viticola*, al 78% el crecimiento de *C. macrodidymum*, al 67% el crecimiento de *D. seriata* y *B.*
30 *dothidea* y al 50% el crecimiento de *E. lata*.

* Efecto inhibitorio de la mezcla quitosán-extracto hidroalcohólico de ajo-vainillina (mezcla QAV) en sarmientos de vid. La mezcla utilizada en este caso contenía: quitosán (10 mg/ml) – Extracto hidroalcohólico de ajo (10%)- Vainillina 4 mg/ml. La

mezcla de los 3 componentes mostró un claro efecto sinérgico frente al empleo por separado de cada uno de ellos ya que el crecimiento de todos los hongos fue inhibido con una eficacia del 100%.

Ensayo 3: Para determinar el efecto protector de quitosán, extracto hidroalcohólico de ajo y vainillina sobre plantas de vid infectadas artificialmente con hongos fitopatógenos.

Los ensayos se realizaron con plantas de la variedad de uva Tempranillo en un viñedo experimental.

La metodología del ensayo se indica a continuación:

10 ✓ Cada planta se cultivó independientemente en una maceta de 800 litros de capacidad que contenía un sustrato comercial adaptado especialmente para plantas de vid. Las plantas (500 en total) se organizaron en 20 líneas de 25 plantas por línea.

En total en este estudio se sembraron 10 líneas que se describen a continuación:

- 15 • Líneo 1. Líneo control de plantas sin tratar.
- Líneo 2. Plantas infectadas artificialmente sobre las heridas de poda con los hongos *D. seriata* (10.000 unidades formadoras de colonias), *P. chlamydospora* (10.000 unidades formadoras de colonia) y *C. macrodidymun* (2000 unidades formadoras de colonia).
- 20 • Líneo 3. Plantas tratadas con quitosán (25 mg/ml)
- Líneo 4. Plantas tratadas con extracto hidroalcohólico de ajo (10%)
- Líneo 5. Plantas tratadas con vainillina (5 mg/ml)
- Líneo 6. Plantas tratadas con la mezcla QAV (cada compuesto individual a la concentración indicada anteriormente)
- 25 • Líneo 7. Plantas tratadas con quitosán (como en línea 3) e infectadas con los patógenos.
- Líneo 8. Plantas tratadas con extracto hidroalcohólico de ajo (como en línea 4) e infectadas con los patógenos
- Líneo 9. Plantas tratadas con vainillina (como en línea 5) e infectadas con
- 30 los patógenos

- Líneo 10. Plantas tratadas con la mezcla QAV (cómo en líneo 6) e infectadas con los patógenos.

En todos los casos los antifúngicos se aplicaron con brocha sobre las heridas de poda.

- 5 La relación de plantas vivas y muertas en cada uno de los líneas del viñedo experimental tras 2 años de poda, aplicación del antifúngico e infección artificial con hongos fitopatógenos, se ha representado en la figura 1.

✓ Las plantas se sembraron en la primavera del año 2008. En noviembre de 2008 las plantas fueron podadas y una vez podadas se les aplicó a los líneas correspondientes el tratamiento a base de antifúngicos (líneos 3 a 10). A 10 continuación 24 horas más tarde se procedió a la infección artificial de las plantas mediante adición de suspensiones acuosas que contenían los hongos fitopatógenos y en las cantidades anteriormente citados.

Esta metodología se repitió sucesivamente (poda en noviembre de 2009 y 15 aplicación de antifúngicos y hongos; análisis de plantas en junio 2010; y finalmente poda en noviembre de 2010 y aplicación de antifúngicos y hongos).

Transcurridos 2 años desde el inicio del estudio se analizaron dos tipos de parámetros:

a).- Índice de mortalidad de plantas en cada líneo (ver figura 1).

20 Como podemos apreciar en la figura 1 a los dos años de iniciarse el estudio y proceder a la infección artificial del viñedo experimental pudimos comprobar como en el caso del líneo 2 (plantas infectadas y no tratadas con antifúngicos) el nivel de mortalidad fue del 52%, mostrando las restantes plantas vivas en algunos casos síntomas foliares evidentes (lesiones) atribuibles a hongos patógenos responsables 25 de enfermedades de madera. Este dato indica que la inoculación realizada sobre heridas de poda fue efectiva provocando la infección de las plantas de vid.

La mortalidad natural en el líneo control (líneo 1) fue del 12.0%, mientras que en el caso de los líneas correspondientes a plantas no infectadas y tratadas con antifúngico los niveles de mortalidad fueron respectivamente del 8% (quitosán; líneo 30 3), 4% (extracto hidroalcohólico de ajo; líneo 4), 8% (vainillina; líneo 5) y 0% (mezcla QAV; líneo 6).

Por el contrario en el caso de los líneas tratados con antifúngicos e infectados artificialmente observamos una tasa de mortalidad del 12% (líneo 7), 8% (líneo 8), 12% (líneo 9) y 0% (líneo 10). Estos resultados permiten concluir que la aplicación individual de los antifúngicos sobre heridas de poda tiene un claro efecto protector sobre las plantas de vid ya que los niveles de mortalidad se redujeron considerablemente frente a la tasa de mortalidad del 52% observada en el líneo 2 (plantas infectadas y no tratadas con antifúngicos). La mayor protección era ejercida por el extracto hidroalcohólico de ajo (mortalidad del 8%), seguida del quitosan y la vainillina (mortalidad del 12%). La mezcla QAV mostró unas propiedades mejoradas respecto a la aplicación individual de sus componentes ya que no se produjo la muerte de ninguna de las plantas tratadas con la mezcla, por lo que de su aplicación conjunta podemos deducir un claro efecto sinérgico.

b).- Análisis de 6 plantas por líneo a fin de determinar la presencia en plantas de hongos responsables de enfermedades de madera de vid. Para ello las plantas se arrancaron y se analizó la presencia de hongos en rodajas de madera 2, 5 y 10 cm por encima y por debajo del lugar de inoculación de los hongos.

Los resultados de este análisis confirmaron la presencia de hongos fitopatógenos responsables de madera en el 50-90% de las muestras analizadas correspondientes a plantas infectadas artificialmente (líneo 2). Los niveles de detección de hongos fitopatógenos en plantas del líneo 1 o control oscilaron entre el 5-8% de las muestras analizadas y entre el 0-2% (líneo 3; quitosán), 0-3% (líneo 4; extracto hidroalcohólico de ajo), 1-3% (líneo 5; vainillina) y 0-1% (líneo 6; mezcla QAV). Niveles similares fueron detectados en el caso de los líneas infectados artificialmente y tratados con antifúngicos: 0-4% (líneo 7), 1-2.5% (líneo 8), 0-6% (líneo 9) y 0-1% (líneo 10). Estos datos claramente confirman que la aplicación de los antifúngicos seleccionados, y en especial de la mezcla, son capaces de disminuir los niveles de infección de hongos fitopatógenos de enfermedades de madera a través de heridas de poda, tanto en el caso de infecciones naturales como en el caso de infecciones artificiales en las que los patógenos se aplicaban directamente sobre las heridas de poda.

✓ En junio de 2009 y de 2010 se procedió al análisis de una serie de parámetros incluyendo longitud del décimo entrenudo, longitud total y número de hojas cloróticas. Además se tomaron muestras de hojas de plantas de cada líneo a partir de los que se obtuvieron extractos en los que se analizaron parámetros tales como

concentración de proteínas, peroxidación lipídica, actividad catalasa, actividad guayacol peroxidasa (GPX), glutatión S transferasa (GST) y superóxido dismutasa (SOD) utilizando protocolos estándar. El objetivo de estos estudios era por un lado confirmar que la aplicación de los antifúngicos no tenía efecto negativo o estresante sobre las plantas y por otro determinar un posible efecto estimulador de los mecanismos de defensa sistémicos de la planta. Los resultados obtenidos indican que en ningún caso la aplicación de antifúngicos tuvo un efecto nocivo para la planta ya que no se incrementaron los niveles de los marcadores de estrés utilizados.

Preparación de los antifúngicos y su aplicación sobre las heridas de poda.

10 El quitosán oligosacárido se prepara mediante disolución en agua destilada a una concentración inicial de 100 mg/ml. Se aplica sobre las heridas de poda a una concentración de 10-25 mg/ml.

El extracto hidroalcohólico de ajo se prepara mediante homogeneización de dientes de ajo pelados a una concentración inicial del 30% (p/v) en etanol al 10%. La homogeneización se consigue mediante trituración con batidora o similar hasta obtener una suspensión homogénea y fina. La suspensión se incuba a continuación durante 2 horas a 4°C con agitación para una máxima extracción de los principios activos. La suspensión se puede filtrar a fin de eliminar materiales sólidos. La aplicación sobre las heridas de poda se realiza a una concentración del 7-10% (p/v) mediante la disolución de la suspensión inicial en agua destilada.

20 La vainillina se prepara mediante disolución en metanol a una concentración inicial de 200 mg/ml. La aplicación sobre las heridas de poda se realiza a una concentración 3-5 mg/ml, mediante disolución de disolución inicial en etanol al 10% (v/v) o agua.

25 La combinación de quitosán oligosacárido, extracto hidroalcohólico de ajo y vainillina se prepara a partir de las disoluciones o suspensiones concentradas de los productos por separado y se aplica sobre las heridas de poda con una composición del quitosán (20-25 mg/ml)-extracto hidroalcohólico de ajo (8-10%)-vainillina (3-4 mg/ml).

REINVINDICACIONES

- 1.- Utilización de antifúngicos naturales para prevenir la infección de lesiones, injertos y heridas de poda en plantas leñosas por hongos fitopatógenos, caracterizada porque comprende, solos o en combinación, quitosán oligosacárido, extracto hidroalcohólico de ajo y/o vainillina.
- 5
- 2.- Procedimiento para preparar la combinación de antifúngicos de la reivindicación 1, caracterizado porque consta de las etapas de:
- a) preparar el quitosán oligosacárido mediante disolución en agua destilada a una concentración inicial de 100 mg/ml; y se aplica sobre las heridas de poda a una concentración de entre 10 y 25 mg/ml;
- 10
- b) preparar el extracto hidroalcohólico de ajo mediante homogeneización de dientes de ajo pelados a una concentración inicial del 30% (p/v) en etanol al 10%; y la aplicación sobre las heridas de poda se realiza a una concentración de entre 7% y 10% (p/v) mediante la disolución de la suspensión inicial en agua destilada.
- 15
- c) preparar la vainillina mediante disolución en metanol a una concentración inicial de 200 mg/ml; y la aplicación sobre las heridas de poda se realiza a una concentración de entre 3 y 5 mg/ml (por disolución de la disolución inicial en etanol al 10% (v/v) o agua);
- d) preparar la combinación de quitosán oligosacárido, extracto hidroalcohólico de ajo y vainillina a partir de las disoluciones o suspensiones concentradas de los productos por separado y se aplica sobre las heridas de poda con una composición del quitosán (entre 20 y 25 mg/ml)-extracto hidroalcohólico de ajo (entre 8 y 10%)-vainillina (entre 3 y 4 mg/ml).
- 20
- 3.- Utilización según las reivindicaciones 1 y 2, para lo cual se aplica quitosán oligosacárido a una concentración de entre 10 y 25 mg/ml, sobre heridas de poda, injertos u otro tipo de lesiones de plantas leñosas, preferentemente vid, para evitar la infección por especies de hongos fitopatógenos descritos como causantes de enfermedades de madera.
- 25
- 4.- Utilización según las reivindicaciones 1 y 2, para lo cual se aplica un extracto hidroalcohólico de ajo a una concentración de entre 7 y 10% (p/v) preparado en etanol (10%), sobre heridas de poda, injertos u otro tipo de lesiones de plantas
- 30

leñosas, preferentemente vid, para evitar la infección por especies de hongos fitopatógenos descritos como causantes de enfermedades de madera.

5.-Utilización según las reivindicaciones 1 y 2, para lo cual se aplica vainillina a una concentración de entre 3 y 5 mg/ml, preparada por disolución en agua o etanol 10%
5 sobre heridas de poda, injertos u otro tipo de lesiones de plantas leñosas, preferentemente vid para evitar la infección por especies de hongos fitopatógenos descritos como causantes de enfermedades de madera.

6.- Utilización según las reivindicaciones 1 y 2, para lo cual se aplica quitosán oligosacárido y extracto hidroalcohólico de ajo, en cualquier combinación, sobre
10 heridas de poda, injertos u otro tipo de lesiones de plantas leñosas, preferentemente vid, para evitar la infección por especies de hongos fitopatógenos descritos como causantes de enfermedades de madera.

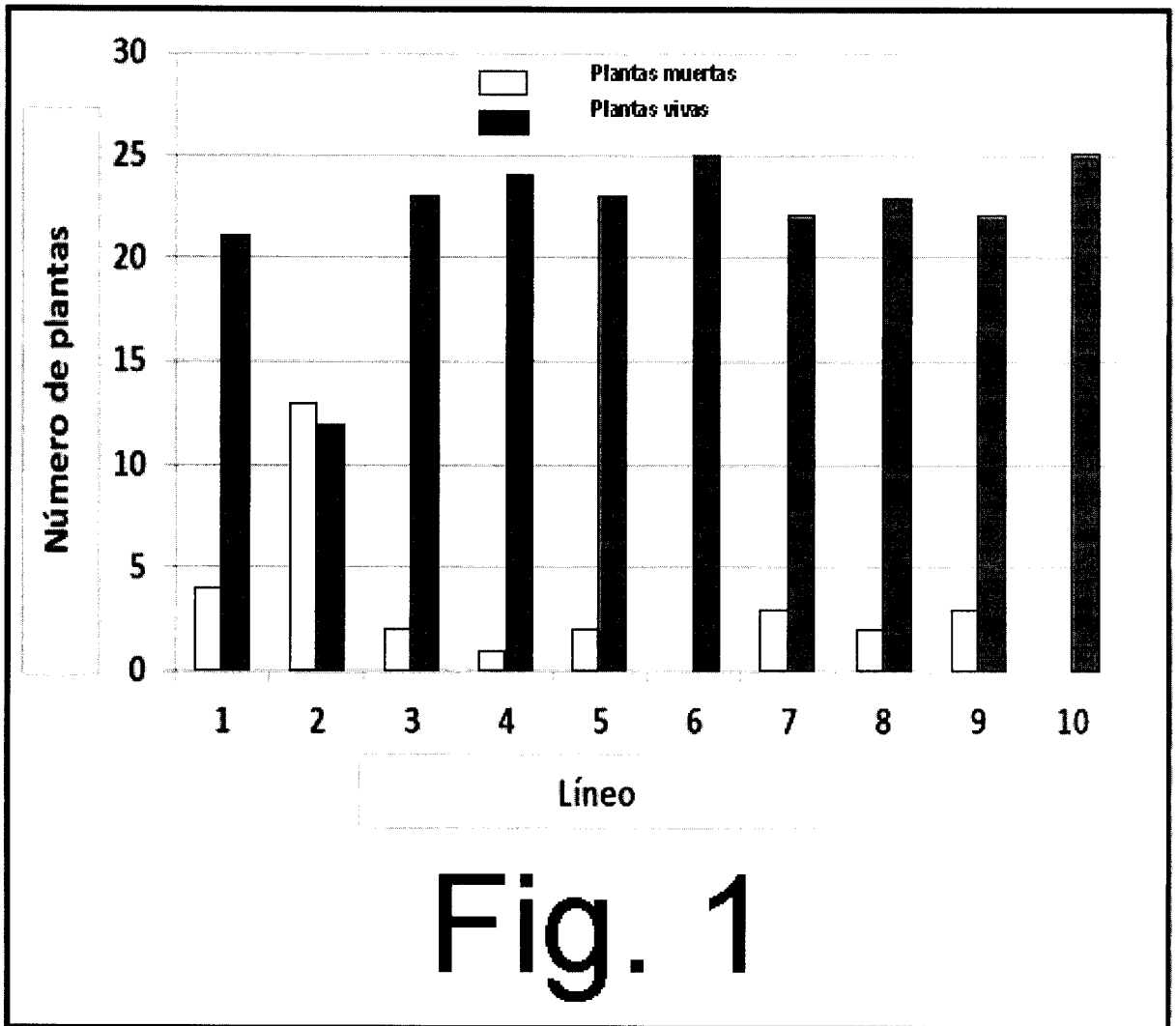
7.- Utilización según las reivindicaciones 1 y 2, para lo cual se aplica quitosán oligosacárido y vainillina, en cualquier combinación, sobre heridas de poda, injertos
15 u otro tipo de lesiones de plantas leñosas, preferentemente vid, para evitar la infección por especies de hongos fitopatógenos descritos como causantes de enfermedades de madera.

8.- Utilización según las reivindicaciones 1 y 2, para lo cual se aplica extracto hidroalcohólico de ajo y vainillina, en cualquier combinación, sobre heridas de poda,
20 injertos u otro tipo de lesiones de plantas leñosas, preferentemente vid, para evitar la infección por especies de hongos fitopatógenos descritos como causantes de enfermedades de madera.

9.- Utilización según las reivindicaciones 1 y 2, para lo cual se aplica quitosán oligosacárido, extracto hidroalcohólico de ajo y vainillina, combinados en cualquier
25 proporción, sobre heridas de poda, injertos u otro tipo de lesiones de plantas leñosas, preferentemente vid para evitar la infección por especies de hongos fitopatógenos descritos como causantes de enfermedades de madera.

10.- Utilización según la reivindicación 3, para lo cual se aplica quitosán oligosacárido a una concentración de 25 mg/ml, sobre heridas de poda, injertos u
30 otro tipo de lesiones de plantas leñosas, preferentemente vid, para evitar la infección por especies de hongos fitopatógenos descritos como causantes de enfermedades de madera.

- 11.-Utilización según la reivindicación 4, para lo cual se aplica extracto hidroalcohólico de ajo a una concentración del 10%, sobre heridas de poda, injertos u otro tipo de lesiones de plantas leñosas, preferentemente vid para evitar la infección por especies de hongos fitopatógenos descritos como causantes de enfermedades de madera.
- 5
- 12.- Utilización según la reivindicación 5, para lo cual se aplica vainillina a una concentración de 5 mg/ml, sobre heridas de poda, injertos u otro tipo de lesiones de plantas leñosas, preferentemente vid para evitar la infección por especies de hongos fitopatógenos descritos como causantes de enfermedades de madera.
- 10
- 13.- Utilización según la reivindicación 9, para lo cual se aplica la combinación de quitosán oligosacárido, extracto hidroalcohólico de ajo y vainillina, en una proporción de quitosán oligosacárido (25 mg/ml), extracto hidroalcohólico de ajo (10%) y vainillina (4 mg/ml).



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2012/000057

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

See extra sheet

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A01N, A01P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

INVENES, EPODOC, WPI, NPL, X-FULL, CAPLUS, AGRICOLA, CABA, CROPU, FSTA, SCISEARCH, INTERNET

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	NASCIMENTO, T., REGO, C., OLIVEIRA, H. Potential use of chitosan in the control of grapevine trunk diseases. <i>Phytopathologia Mediterranea</i> , 2007. Vol. 46, n° 2, pages 218-224. ISSN 0031-9465 (print), ISSN 1593-2095 (online) http://91.121.146.53/index.php/pm/article/view/2156/2077	1
Y		3
X	TORR, K. M. et al. Advances in understanding bioactivity of chitosan and chitosan oligomers against selected wood-inhabiting fungi. <i>Holzforschung</i> , 2005. Vol. 59, n° 5, pages 559-567. ISSN 0018 3830 (Print), ISSN (Online) 1437-434X. Doi: 10.1515/HF.2005.092	1

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance.	
"E" earlier document but published on or after the international filing date	
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"O" document referring to an oral disclosure use, exhibition, or other means.	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
12 July 2012 (12.07.2012)

Date of mailing of the international search report
(17/07/2012)

Name and mailing address of the ISA/

Authorized officer

OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)
Facsimile No.: 91 349 53 04

A. Sukhwani

Telephone No. 91 3495473

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2012/000057

C (continuation).		DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT
Category *	Citation of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KROL, E. Chitosan activity in an inhibition of <i>in vitro</i> growth of <i>Phomopsis viticola</i> and protection of grapevine canes against the pathogen. <i>Phytopathologia Polonica</i> , 2006. Vol. 39, pages155-162. ISSN 1230 0462 http://antywirus.au.poznan.pl/ptfit/pdf/PP39a/PP_39_155-162.pdf	1
X	SARDI (SOUTH AUSTRALIAN RESEARCH AND DEVELOPMENT INSTITUTE). Sustaining grapevines infected with <i>Eutypa dieback</i> . Final Report to Grape and Wine Research & Development Corporation, 2010. Páginas, 1-60. See pages 2, 7-12, 16, 44 (electronic file, pages 5, 10-15, 19, 47) http://www.sardi.sa.gov.au/__data/assets/pdf_file/0004/133897/GWRDC_Final_Report_SAR_06_01.pdf	1
Y		4, 6, 11
Y	WO 2006102766 A1 (UNIVERSITÉ LAVAL) 05.10.2006, page 2, lines 14-26; pages 3, 4, 7-10; page 13, lines 21-25; claims 1, 19, 34	1, 3, 4, 6, 11
Y	RATTANAPITIGORN, P., ARAKAWA, M., TSURO, M. Vanillin enhances the antifungal effect of plant essential oils against <i>Botrytis cinerea</i> . <i>The International Journal of Aromatherapy</i> , 2006. Vol. 16, n° 3-4, pages 193-198. ISSN 0962 5462. Doi: 10.1016/j.ijat.2006.09.003	1, 7
Y	ES 2328322 A1 (TIMAC AGRO ESPAÑA, S. A.) 11.11.2009, page 2; claims 2, 4	7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2012/000057

Information on patent family members

Patent document cited in the search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO2006102766 A	05.10.2006	CA2604352 A AU2006228963 A EP1871395 A US2008260876 A AT530190 T	05.10.2006 05.10.2006 02.01.2008 23.10.2008 15.11.2011
----- ES2328322 A -----	----- 11.11.2009 -----	----- EP2047749 A -----	----- 15.04.2009 -----

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2012/000057

CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A01N63/00 (2006.01)

A01N65/42 (2009.01)

A01N35/04 (2006.01)

A01P3/00 (2006.01)

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ES2012/000057

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

Ver Hoja Adicional

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A01N, A01P

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, NPL, X-FULL, CAPLUS, AGRICOLA, CABA, CROPU, FSTA, SCISEARCH, INTERNET

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
X	NASCIMENTO, T., REGO, C., OLIVEIRA, H. Potential use of chitosan in the control of grapevine trunk diseases. <i>Phytopathologia Mediterranea</i> , 2007. Vol. 46, nº 2, páginas 218-224. ISSN 0031-9465 (print), ISSN 1593-2095 (online) http://91.121.146.53/index.php/pm/article/view/2156/2077	1
Y		3
X	TORR, K. M. et al. Advances in understanding bioactivity of chitosan and chitosan oligomers against selected wood-inhabiting fungi. <i>Holzforschung</i> , 2005. Vol. 59, nº 5, página 559-567. ISSN 0018 3830 (Print), ISSN (Online) 1437-434X. Doi: 10.1515/HF.2005.092	1

En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos

Los documentos de familias de patentes se indican en el anexo

* Categorías especiales de documentos citados:

"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.

"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.

"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).

"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.

"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.

"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.

"X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.

"Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.

"&" documento que forma parte de la misma familia de patentes.

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.
12 Julio 2012 (12.07.2012)

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional.
17 de julio de 2012 (17/07/2012)

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional
OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)
Nº de fax: 91 349 53 04

Funcionario autorizado
A. Sukhwani

Nº de teléfono 91 3495473

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº
PCT/ES2012/000057

C (Continuación).		DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES
Categoría *	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
X	<p>KROL, E. Chitosan activity in an inhibition of <i>in vitro</i> growth of <i>Phomopsis viticola</i> and protection of grapevine canes against the pathogen. <i>Phytopathologia Polonica</i>, 2006. Vol. 39, páginas 155-162. ISSN 1230 0462 http://antywirus.au.poznan.pl/ptfit/pdf/PP39a/PP_39_155-162.pdf</p>	1
X	<p>SARDI (SOUTH AUSTRALIAN RESEARCH AND DEVELOPMENT INSTITUTE). Sustaining grapevines infected with <i>Eutypa dieback</i>. Final Report to Grape and Wine Research & Development Corporation, 2010. Páginas, 1-60. Ver páginas 2, 7-12, 16, 44 (en fichero electrónico, numeradas en papel como 5, 10-15, 19, 47) http://www.sardi.sa.gov.au/_data/assets/pdf_file/0004/133897/GWRDC_Final_Report_SAR_06_01.pdf</p>	1
Y		4, 6, 11
Y	<p>WO 2006102766 A1 (UNIVERSITÉ LAVAL) 05.10.2006, página 2, líneas 14-26; páginas 3, 4, 7-10; página 13, líneas 21-25; reivindicaciones 1, 19, 34</p>	1, 3, 4, 6, 11
Y	<p>RATTANAPITIGORN, P., ARAKAWA, M., TSURO, M. Vanillin enhances the antifungal effect of plant essential oils against <i>Botrytis cinerea</i>. <i>The International Journal of Aromatherapy</i>, 2006. Vol. 16, nº 3-4, páginas 193-198. ISSN 0962 5462. Doi: 10.1016/j.ijat.2006.09.003</p>	1, 7
Y	<p>ES 2328322 A1 (TIMAC AGRO ESPAÑA, S. A.) 11.11.2009, página 2; reivindicaciones 2, 4</p>	7

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ES2012/000057

Informaciones relativas a los miembros de familias de patentes

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de Publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de Publicación
WO2006102766 A	05.10.2006	CA2604352 A	05.10.2006
		AU2006228963 A	05.10.2006
		EP1871395 A	02.01.2008
		US2008260876 A	23.10.2008
		AT530190 T	15.11.2011
-----	-----	-----	-----
ES2328322 A	11.11.2009	EP2047749 A	15.04.2009
-----	-----	-----	-----

CLASIFICACIONES DE INVENCION

A01N63/00 (2006.01)

A01N65/42 (2009.01)

A01N35/04 (2006.01)

A01P3/00 (2006.01)