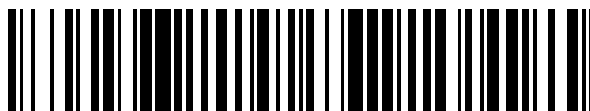


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 926 368**

51 Int. Cl.:

**A01N 25/08** (2006.01)  
**A01N 59/02** (2006.01)  
**A01N 59/14** (2006.01)  
**A01N 59/16** (2006.01)  
**A01N 59/20** (2006.01)  
**A01N 65/00** (2009.01)  
**A01N 65/22** (2009.01)  
**A01N 65/28** (2009.01)  
**A01N 65/48** (2009.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.05.2016 PCT/IB2016/052863**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **24.11.2016 WO16185380**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.05.2016 E 16725238 (6)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.06.2022 EP 3297432**

54 Título: **Uso de hidroxiapatita como portador de sustancias bioactivas para tratar enfermedades vasculares en plantas**

30 Prioridad:

**18.05.2015 IT UB20150693**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**25.10.2022**

73 Titular/es:

**NDG NATURAL DEVELOPMENT GROUP S.R.L.  
(100.0%)  
Via Salvatore Quasimodo, 42  
40013 Castel Maggiore, IT**

72 Inventor/es:

**PIVA, MASSIMO;  
COLETTI, MATTEO;  
BATTISTON, ENRICO y  
MANFREDINI, GIANLUCA**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

**Observaciones:**

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

**ES 2 926 368 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Uso de hidroxiapatita como portador de sustancias bioactivas para tratar enfermedades vasculares en plantas

**Campo de la invención**

- 5 La presente invención se refiere al uso de hidroxiapatita sustituida con carbonato como portador de sustancias bioactivas para el tratamiento de enfermedades vasculares de las plantas, en particular: amarilleamiento de la vid (causado por fitoplasma de la vid), cancro bacteriano en kiwi (causado por *Pseudomonas syringae*), síndrome de declive rápido del olivo (causado por *Xylella fastidiosa*) y enfermedad del cancro bacteriano de los cítricos (causada por *Xanthomonas axonopodis*).

**Técnica anterior**

- 10 La protección vegetal está cada vez más orientada a fomentar el desarrollo de enfoques sostenibles e innovadores de bajo impacto. Esto es aún más desafiante en el control de enfermedades aún poco conocidas que pueden afectar gravemente al cultivo. Es el caso de las enfermedades vasculares.

- 15 Generalmente, las enfermedades vasculares son responsables de la pérdida de turgencia en una planta completa o en ciertas partes de una planta como resultado de alteraciones funcionales del sistema vascular. Las principales causas de las enfermedades vasculares están relacionadas con el micelio de hongos fitopatógenos o la acumulación de bacterias fitopatógenas o fitoplasmas, que obstruyen el sistema vascular. Este fenómeno puede ser la consecuencia directa de la acción tóxica de los parásitos sobre los tejidos de la planta-anfitrión y/o el efecto indirecto tras la formación en los vasos de tálides (hinchazones protoplásticas de las células parenquimatosas del xilema, que crecen en los vasos).

- 20 Las enfermedades vasculares más comunes de las plantas son las traqueomicosis y las traqueobacteriosis. Las traqueomicosis son un grupo de enfermedades causadas por hongos patógenos. Incluyen, marchitez por *fusarium* y verticiliosis en algodón y muchas otras plantas. Las traqueobacteriosis son causadas por bacterias fitopatógenas. Incluyen la marchitez bacteriana en las solanáceas, el cancro bacteriano en los kiwis, los tomates y los cítricos, y el síndrome de declive rápido del olivo. Las secciones transversales y longitudinales de los tejidos de una planta enferma muestran claramente un oscurecimiento de los vasos de la planta. Otra forma de enfermedad vascular es causada por fitoplasmas, que son formas parecidas a bacterias y parásitos obligados del tejido del floema de las plantas. Los fitoplasmas son transmitidos por insectos (vectores) y son patógenos de plantas de importancia agrícola, como la vid en la que son responsables del amarilleamiento de la vid, un amarilleo leve que provoca la muerte de las vides infectadas.

**Amarilleamiento de la vid**

- 30 Los amarilleamientos de la vid (AV) son enfermedades asociadas a fitoplasmas que aparecen en muchas áreas de cultivo de uva en todo el mundo y tienen una importancia cada vez mayor. Los fitoplasmas de la vid se localizan en el floema de las vides infectadas desde donde es adquirido por el vector para su posterior transmisión. Un solo insecto infeccioso puede ser suficiente para transmitir la enfermedad, iniciando así una epidemia. Dado que no se conoce ningún anfitrión alternativo además de la vid, es probable que todo el ciclo biológico se complete en la vid y el vector.
- 35 Los síntomas casi idénticos del síndrome AV son causados por diferentes fitoplasmas y aparecen en hojas, brotes y racimos de vid. Los síntomas típicos incluyen decoloración y necrosis de las nervaduras y láminas de las hojas, enrollamiento de las hojas hacia abajo, ausencia o lignificación incompleta de los brotes, atrofia y necrosis de los brotes, aborto de las inflorescencias y marchitamiento de las bayas. Esos síntomas están relacionados con el depósito calloso en las placas cribosas y la subsiguiente degeneración del floema. Aunque hasta el momento no se conocen cultivares de *Vitis vinifera* resistentes o portainjertos, las diversas variedades de uva difieren considerablemente en lo que se refiere a la gravedad de los síntomas. Va desde un rápido declive y muerte en cultivares altamente susceptibles hasta portainjertos tolerantes como portadores asintomáticos del patógeno. Si bien los fitoplasmas son microorganismos no cultivables y, en el caso de AV, aún no se han cumplido los postulados de Koch, cuando los fitoplasmas de un grupo o subgrupo específico se encuentran consistentemente asociados con una enfermedad
- 45 específica de la uva, se los considera agentes causales de la misma. Los grupos de fitoplasmas detectados en la vid son: el grupo Stolbur que también es el agente causante de la Madera negra o "Bois noir" (BN), "Elm yellows" que también es el agente causante de la Flavescencia dorada (FD) y el grupo Aster yellow. El manejo de AV se basa en el control de sus vectores mediante el tratamiento periódico de los viñedos con insecticidas: el manejo de FD incluye la erradicación de las plantas infectadas que sirven como fuente de infección, así como el control del saltahoja vectorizador *Scaphoideus titanus*. El control biológico de *S. titanus* aún no es aplicable. Debido al ciclo epidémico más complejo de BN que incluye plantas anfitrionas alternativas como fuentes de inóculo y un vector no amleófago cuya historia de vida lo pone fuera del alcance de los insecticidas, el control de BN es considerablemente más difícil y menos eficiente que el control de FD. No existen métodos directos de control sobre AV.

**Cancro bacteriano en kiwi**

- 55 El cancro bacteriano del kiwi causado por *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* es una grave amenaza para la producción de kiwi en todo el mundo. Muchos aspectos de la biología y epidemiología de *P. syringae* pv. *actinidiae* aún requieren una investigación en profundidad. La propagación de *P. syringae* pv. *actinidiae* en xilema y floema se

investigó mediante la realización de experimentos de inoculación artificial con análisis histológicos y dendrocronológicos de plantas enfermas de forma natural en Italia: se descubrió que la bacteria puede infectar las plantas anfitrionas al ingresar por las aberturas y lesiones naturales. En plantas de kiwi naturalmente infectadas, *P. syringae* pv. *actinidiae* está presente en las lenticelas, así como en el tejido muerto del floema debajo de las lenticelas, rodeado por una lesión en el peridermo. En casos de estadios avanzados de infección por *P. syringae* pv. *actinidiae*, se producen neurosis del floema, seguidas de muerte regresiva cambial y muy probablemente de infección del xilema. Se observaron cambios anatómicos en la madera, tales como la reducción del ancho del anillo, una reducción drástica del tamaño de los vasos y la presencia de tñides en varios sitios infectados. En el campo, estos cambios ocurren solo un año después de que se observan los primeros síntomas en las hojas, lo que sugiere un lapso de tiempo significativo entre los síntomas primarios y secundarios. Una serie de estudios y ensayos de campo sobre epidemiología, técnicas agronómicas, efectividad de nuevos bactericidas, así como análisis de tipificación molecular, genómica y proteómica, permitieron dilucidar el ciclo de enfermedad del patógeno, modificar algunas técnicas agronómicas básicas y permitir a los agricultores coexistir con el patógeno alcanzando el pleno rendimiento y calidad del cultivo como antes de la aparición de la enfermedad. Sin embargo, no existen controles químicos altamente efectivos y de baja toxicidad para el cáncer bacteriano del kiwi.

#### Síndrome de declive rápido del olivo

El síndrome de declive rápido del olivo (SDRO) es una enfermedad que apareció repentinamente hace unos años en la provincia de Lecce, península de Salento (sureste de Italia). El principal incidente de la enfermedad es *Xylella fastidiosa*, un patógeno cuarentenario de origen americano cuya introducción no deseada en la zona ha creado mucha perturbación debido a: (i) el daño dramático sufrido por los olivares donde se ha establecido el patógeno; (ii) la alarma que ha despertado este hallazgo en un país (Italia) cuya industria olivarera es un activo primordial, y en la Unión Europea, que se enfrenta al primer registro confirmado en su territorio de este extraño y temido microorganismo. El SDRO se caracteriza por la presencia de chamuscado foliar y desecación de ramillas y ramitas, que prevalecen primero en la parte superior del dosel, luego se extienden al resto de la copa, la cual adquiere un aspecto quemado. Los cultivadores podan fuertemente las plantas más afectadas para favorecer un nuevo crecimiento, que, sin embargo, es escaso y se seca en poco tiempo. Los árboles de aspecto esquelético empujan una multitud de chupones desde la base y sobreviven durante algún tiempo, es decir, mientras las raíces sean viables. *X. fastidiosa* es una bacteria con una epidemiología inusual (la transmisión de planta a planta se produce únicamente a través de insectos vectores), que infecta a una amplia gama de anfitriones (309 especies de plantas pertenecientes a 193 géneros, según una lista reciente emitida por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria). Invade, se multiplica y ocluye los vasos del xilema de la planta, lo que dificulta la absorción de agua. En el caso del olivo, el daño puede verse agravado por la presencia de hongos de diferentes géneros, en particular *Phaeoacremonium* y *Phaemoniella*, pero también *Pleumostomophora* y *Neofusicoccum*, que colonizan y necrosan la albura. Además del olivo, la cepa salenciana de *X. fastidiosa* infecta en la naturaleza a varios anfitriones leñosos (almendros, cerezos) y arbustivos (adelfas, retamas, romero, *Acacia saligna*, *Polygala myrtifolia*, *Westringia fruticosa*, *Rhamnus alaternus*, *Myrtus communis*), pero no a las vides y cítricos. Una pista para la búsqueda de *X. fastidiosa* en olivos afectados por SDRO estuvo dada por: (i) los síntomas, que recordaban mucho el severo quemado de hojas de árboles frutales y de sombra inducido por esta bacteria, como se describe en la bibliografía norteamericana; (ii) la modalidad de propagación de la enfermedad, que era compatible con la de las infecciones por *X. fastidiosa*. *Philaenus spumarius* (salivazo de los prados), un saltamontes muy común en el área de Salento, donde prospera en el olivo, fue identificado experimentalmente como el vector principal. El conocimiento actual dice que la erradicación de la enfermedad y el saneamiento de las plantas infectadas por *Xylella*, incluido el olivo, son inviables. Las únicas medidas previstas para contener la difusión de la enfermedad son el deshierbe mecánico en primavera, para matar el mayor número posible de juveniles del vector, que prosperan especialmente en las malas hierbas, seguido de tratamientos insecticidas en los olivos, sobre los que los adultos se desplazan tras la muda y viven sin trabas. Estas medidas van acompañadas de la más drástica e impopular: arrancar de raíz los olivos infectados (muchos de ellos son gigantes de varios siglos de edad) y los de los alrededores.

#### Enfermedad por cancro bacteriano de los cítricos

El cancro de los cítricos es una enfermedad que afecta a las especies de *Citrus* causada por la bacteria *Xanthomonas axonopodis*. La bacteria *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* es un bacilo gramnegativo con forma de varilla y tiene un solo flagelo polar. Los rangos de temperatura máxima y óptima para el crecimiento son de 39°C (95 a 102°F) y de 28 a 30°C (82 a 86°F), respectivamente. En general, en las plantaciones de campo, el pomelo, los limones mexicanos y la naranja trifoliada son muy susceptibles al cancro; la naranja agria, el limón y la naranja dulce son moderadamente susceptibles; y las mandarinas son moderadamente resistentes. Dentro de los cultivares de naranja, los cultivares de maduración temprana son más susceptibles que los cultivares de temporada media que, a su vez, son más susceptibles que los cultivares de temporada tardía. Sin embargo, cuando los tejidos de la planta son interrumpidos por heridas o por las galerías de alimentación del minador asiático, los tejidos internos de la hoja (mesófilo) quedan expuestos. Cuando esto ocurre, todos los cultivares y la mayoría de los parientes de los cítricos que expresan cierto nivel de resistencia en el campo pueden infectarse. El cancro de los cítricos puede ser una enfermedad grave donde la lluvia y las temperaturas cálidas son frecuentes durante los periodos de emergencia de los brotes y desarrollo temprano de la fruta. Este es especialmente el caso donde prevalecen las tormentas tropicales. El cancro de los cítricos es principalmente una enfermedad que mancha las hojas y la cáscara de la fruta, pero cuando las condiciones son muy favorables para la infección, las infecciones causan defoliación, muerte regresiva de los brotes y caída de la fruta. Las lesiones del cancro de los cítricos comienzan como manchas puntiformes y alcanzan un tamaño máximo de

2 a 10 mm de diámetro. Las lesiones jóvenes son elevadas o 'pustulosas' en ambas superficies de la hoja, pero particularmente en la superficie inferior de la hoja. Un síntoma característico de la enfermedad en las hojas es el halo amarillo que rodea las lesiones. Un síntoma de diagnóstico más confiable del cancro de los cítricos es el margen empapado de agua que se desarrolla alrededor del tejido necrótico, que se detecta fácilmente con luz transmitida. Las lesiones del cancro de los cítricos en frutos y tallos se extienden hasta 1 mm de profundidad y son superficialmente similares a las de las hojas. En la fruta, las lesiones pueden variar en tamaño porque la cáscara es susceptible por más tiempo que las hojas y puede ocurrir más de un ciclo de infección. La infección de la fruta puede causar la caída prematura de la fruta, pero si la fruta permanece en el árbol hasta la madurez, tal fruta reduce la comerciabilidad de la fruta fresca. La primera línea de defensa contra el cancro de los cítricos es la exclusión. El cancro de los cítricos aún no existe en algunos países o regiones de países donde las condiciones climáticas son favorables para el establecimiento del patógeno, lo que probablemente se deba a las estrictas restricciones a la importación de material de propagación y frutos de áreas con cancro. Desafortunadamente, con el aumento de los viajes y el comercio internacional, la probabilidad de introducción de *X. axonopodis* pv. *citri* va en aumento, al igual que con muchas plagas y patógenos exóticos. Cuando el cancro es un problema importante, el control requiere la integración de prácticas culturales apropiadas que incluyen saneamiento, cortavientos y control de minadores de hojas con aplicaciones frecuentes de pulverizaciones de cobre. Se ha demostrado que las pulverizaciones de cobre reducen un poco la infección. Una vez introducido en un área, la eliminación del inóculo mediante la remoción y destrucción de los árboles infectados y expuestos es la forma de erradicación más aceptada.

El impacto económico de las enfermedades vasculares en la agricultura es consecuencia de varios aspectos críticos, además del conocimiento incompleto de los mecanismos de expresión de los síntomas. El principal aspecto crítico es la localización vascular de los patógenos responsables de las enfermedades y la dificultad de controlarlos por un agente de control dentro de los tejidos vasculares.

Por lo tanto, todavía existe la necesidad de proporcionar agentes que sean capaces de controlar las enfermedades vasculares en las plantas.

La hidroxiapatita es bien conocida en la técnica anterior en diferentes formas y para diferentes aplicaciones. Por ejemplo, la hidroxiapatita sintética constituye un excelente biomaterial para aplicaciones biomédicas, en particular para la reconstrucción ósea.

La hidroxiapatita y la hidroxiapatita sustituida sintética se pueden producir por diferentes procesos, por síntesis húmeda, hidrotermal, electroquímica, sol-gel o en estado sólido. Se puede encontrar en diferentes formas estequiométricas, morfológicas y cristalinas.

Los portadores de hidroxiapatita estequiométrica son conocidos del documento JPH0556105 que describe el uso de hidroxiapatita como portador de un ion metálico antimicrobiano seleccionado entre plata, cobre y zinc para esterilizar un suelo de la presencia del hongo patógeno de plantas *Pythium*. La acción del ion metálico antimicrobiano se limita al suelo ya que la publicación específica que el agente apenas se absorbe en la planta.

El documento EP0640284 describe una arena antimicrobiana recubierta con un portador estequiométrico de hidroxiapatita que contiene agentes antimicrobianos, tales como iones de plata, cobre o zinc. La arena antimicrobiana se mezcla con el suelo utilizado para cultivar plantas con flores, tales como orquídeas, ciclamen, etc., para esterilizar el suelo contra los hongos: *Rhizoctonia*, *Fusarium*, *Sclerotinia* y *Pythium*.

El documento RO 122830 describe una composición fungicida, a base de sales de ácido N,N-etilen-bis-tiocarbámico, caracterizada por el hecho de que consiste en 40-50% de N,N-etilen-bis-tiocarbamato de zinc o una mezcla del mismo con la sal de manganeso o sal de manganeso y hierro, 30-50% de hidroxiapatita, 1,5-3% de SiO<sub>2</sub> y 20-50% de acetato de potasio.

Los documentos JPH0556105 y EP 0 640 284 de la técnica anterior no describen el uso de hidroxiapatita sustituida como portador de principios activos. La técnica anterior no describe el uso de hidroxiapatita como portador de sustancias activas para el tratamiento de patologías vegetales mediante la aplicación del portador sobre la planta. La técnica anterior ilustra solo una forma de esterilizar el suelo usado para hacer crecer las plantas, en particular plantas con flores (no cultivos).

El documento RO 122830 de la técnica anterior no describe el uso de hidroxiapatita como portador de sustancias bioactivas para el tratamiento de enfermedades vasculares, en particular: amarilleamiento de la vid, cancro bacteriano en kiwi, síndrome de declive rápido del olivo y enfermedad por cancro bacteriano de los cítricos.

### Compendio de la invención

La presente invención proporciona el uso de una hidroxiapatita sustituida con carbonato según la reivindicación 1 como portador de (es decir, cargada con) sustancias bioactivas destinadas al tratamiento de enfermedades vasculares, en particular amarilleamiento de la vid, cancro bacteriano en kiwi, síndrome de declive rápido del olivo y enfermedad por cancro bacteriano cítricos.

Las hidroxiapatitas sustituidas, por regla general, pueden estar sustituidas con al menos un ion seleccionado entre ion

carbonato o ion metálico. La hidroxiapatita de la invención está sustituida con al menos un ion carbonato.

La sustitución con carbonato, pero también la sustitución con iones metálicos, tiene la ventaja de disminuir el grado de cristalinidad de la hidroxiapatita, que se vuelve más amorfa. El estado amorfo conduce a un aumento de la solubilidad de la estructura de hidroxiapatita en un medio biológico, con la ventaja de que se mejora la liberación del principio activo y se vuelve más eficaz.

El portador de hidroxiapatita sustituida con carbonato cargado con al menos una sustancia bioactiva de la invención se aplica a las plantas afectadas por enfermedades vasculares, en particular amarilleamiento de la vid, cancro bacteriano en kiwi, síndrome de decaimiento rápido del olivo y enfermedad por cancro bacteriano de los cítricos, y penetra en las plantas a través de aberturas naturales, como se explica en detalle a continuación, logrando así un contacto íntimo con las células patógenas que pueden estar presentes tanto en la superficie de la planta como en el interior de la planta.

Preferiblemente, la sustancia bioactiva es un ion metálico, tal como Cu, Zn y S. Tales iones tienen una acción antiparasitaria. Otros ejemplos de sustancias bioactivas útiles para los fines de la invención son los iones metálicos, tales como Mn, Mg, K, Fe, B (que actúan como elementos fertilizantes y nutritivos), y extractos de origen vegetal, tales como *lignina*, menta, tomillo, romero, sésamo, soja, clavo, ajo, limón, canela, *Abies sibirica*, *Malpighia glabra*, *Achillea millefolium*, *Allium sativum*, *Medicago sativa*, *Aloe vera*, *Citrus sinensis*, *Artemisia annua*, *Arnica Montana*, *Ocimum basilicum*, *Betula pendula*, *Betula pubescens*, *Calendula officinalis*, *Matricaria chamomilla*, *Chamaemelum nobile*, *Cinnamomum verum*, *Centella asiatica*, *Chelidonium majus*, *Syzygium aromaticum*, *Allium cepa*, *Equisetum arvense*, *Curcuma longa*, *Echinacea purpurea*, *Echinacea angustifolia*, *Eucalyptus globulus*, *Hypericum perforatum*, *Fucus vesiculosus*, *Gentiana lutea*, *Lavandula angustifolia*, *Citrus limon*, *Melilotus officinalis*, *Melissa officinalis*, *Punica granatum*, *Mentha piperita*, *Vaccinium myrtillus*, *Orthosiphon stamineus*, *Urtica dioica*, *Olea europaea*, *Tabebuia impetiginosa*, *Plantago lanceolata*, *Hieracium pilosella*, *Pinus sibirica*, *Polypodium leucotoms*, *Citrus paradise*, *Quassia amara*, *Rheum thais*, *Rosa canina*, *Rosmarinus officinalis*, *Ruscus aculeatus*, *Salix alba*, *Salvia officinalis*, *Camelia sinensis*, *Tilia tomentosa*, *Thymus vulgaris*, *Arctostaphylos uva-ursi*, *Valeriana officinalis*, *Solidago virgaurea*, *Loranthus europaeus*, *Zingiber officinale*. Los extractos vegetales pueden tener tanto actividad nutricional como leve actividad antiparasitaria.

La invención se refiere también a un portador de una hidroxiapatita sustituida con carbonato que tiene las características anteriores, que comprende una sustancia bioactiva adsorbida al mismo, produciendo así una hidroxiapatita sustituida con carbonato cargada con al menos una sustancia bioactiva.

Para el alcance de la presente invención, "hidroxiapatita funcionalizada con una sustancia bioactiva" es una definición equivalente a decir que la sustancia bioactiva se adsorbe sobre la hidroxiapatita.

#### Breve descripción de los dibujos

Las Figuras 1A-D muestran los resultados de la prueba de laboratorio en *Phaeomoniella chlamydospora*.

Las Figuras 2A-D muestran los resultados de la prueba de laboratorio en *Phaeoacremonium aleophilum*.

Las Figuras 3 muestran los resultados (rendimiento) de la prueba de vivero en *Agrobacterium vitis*.

Las Figuras 4 muestran los resultados (frecuencia de síntomas) de la prueba de vivero en *Agrobacterium vitis*.

Las Figuras 5 muestran los resultados (frecuencia de la cepa patógena) de la prueba de vivero en *Agrobacterium vitis*.

Las Figuras 6 muestran los resultados (parras muertas) de la prueba de campo en Flavescencia dorada.

Las Figuras 7 muestran la gravedad de la enfermedad en el ensayo de campo en SDRO (*Xylella fastidiosa*).

La Figura 8 muestra las diferencias de gravedad de la enfermedad en el ensayo de campo en SDRO (*Xylella fastidiosa*).

#### Descripción detallada de la invención

Con "hidroxiapatita sustituida" en la presente invención, se pretende hacer referencia a hidroxiapatita de fórmula  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  en la que los iones de Ca,  $\text{PO}_4$  y/o OH se reemplazan, en la red cristalina de hidroxiapatita, por uno o más iones de la misma o diferente especie.

Para el alcance de la presente invención, "hidroxiapatita funcionalizada con una sustancia bioactiva" es una definición equivalente a decir que la sustancia bioactiva está "adsorbida" o "cargada" sobre la hidroxiapatita y también equivalente a decir que la hidroxiapatita es un portador de sustancias bioactivas.

Con "extracto vegetal" en la presente invención se pretende hacer referencia a una mezcla de sustancias naturales obtenidas del tratamiento mecánico o químico de varias partes de las plantas, principalmente semillas, pero también frutos (en particular, cáscara o piel de los frutos) y otras partes de las plantas (p. ej., hojas). Los extractos vegetales de acuerdo con la invención se preparan preferiblemente utilizando un método químico de tratamiento de semillas,

flores, hojas, frutos (en particular la cáscara o piel de los frutos) (u otras partes de las plantas) con un alcohol y/o solución hidroalcohólica y eliminando a continuación el disolvente para obtener un polvo higroscópico. Los extractos vegetales de la invención pueden utilizarse tanto en forma de polvo como en forma de solución alcohólica o hidroalcohólica. Los extractos vegetales de la invención pueden ser también aceites esenciales.

- 5 Con "sustancia bioactiva" en la presente invención se pretende hacer referencia a sustancias que tienen una actividad nutricional y/o una actividad fitosanitaria. Por "tratamiento fitosanitario" o "actividad fitosanitaria" se entiende el tratamiento o prevención de enfermedades de las plantas causadas por parásitos tales como criptógamas, bacterias, hongos, fitoplasmas e insectos.

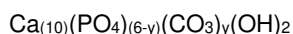
- 10 Por "tratamiento nutricional" o "actividad nutricional" se pretende hacer referencia las sustancias bioactivas que ayudan al desarrollo de las defensas naturales de la planta (y por lo tanto ayudan a las plantas a luchar contra las enfermedades), manteniendo la planta en el mejor equilibrio nutricional, prerrogativa fundamental para prevenir el desarrollo de cualquier enfermedad.

- 15 La sustancia bioactiva utilizada en la invención puede tener tanto una actividad fitosanitaria como una actividad nutricional y, por lo tanto, puede usarse para el tratamiento tanto fitosanitario como nutricional de las plantas, dependiendo de la dosificación de uso.

La presente invención se refiere al uso de una hidroxiapatita sustituida con carbonato como portador (es decir, cargada de sustancias bioactivas) destinada al tratamiento de enfermedades vasculares, en particular: amarilleamiento de la vid, cancro bacteriano en kiwi, síndrome de declive rápido del olivo y enfermedad por cancro bacteriano de los cítricos.

La hidroxiapatita según la invención está sustituida con al menos un ion carbonato.

- 20 El portador de hidroxiapatita sustituido con carbonato de la invención está sustituido con al menos un ion carbonato y tiene la siguiente fórmula:



en donde y está comprendido entre 0,002 y 2, preferiblemente entre 0,002 y 1, más preferiblemente entre 0,002 y 0,030.

- 25 La sustitución de carbonato puede ocupar el sitio B (iones fosfato  $\text{PO}_4^{3-}$ ) según las fórmulas generales anteriores y/o el sitio A (iones hidroxilo OH) de la hidroxiapatita. La razón de sustitución en el sitio A/sustitución en el sitio B está comprendida entre 0,10 y 0,60, e incluso más preferiblemente la razón está comprendida entre 0,20 y 0,40.

En las estructuras de hidroxiapatita consideradas en la presente invención, la sustitución es preferiblemente en el sitio B, siendo el porcentaje de carbonato que ocupa el sitio B superior o igual a 55% en peso, incluso más preferiblemente comprendido entre 90 y 100% en peso del peso total de carbonato contenido en la hidroxiapatita.

- 30 El contenido total de carbonato en la hidroxiapatita según la invención es de 1 a 20%, preferiblemente de 5 a 15% en peso de la estructura total de hidroxiapatita.

- 35 Las sustituciones de iones carbonato, preferiblemente en el sitio B, son muy significativas ya que permiten que la estructura de hidroxiapatita completa aumente su solubilidad en un entorno biológico. Según una realización preferida, la hidroxiapatita sustituida con carbonato anterior tiene un grado de cristalinidad comprendido entre 25 y 75%, preferiblemente entre 25 y 40%.

- 40 Preferiblemente, el portador de hidroxiapatita sustituida con carbonato está en forma de partículas menores de 2  $\mu\text{m}$ , preferiblemente con un tamaño de entre 0,2 y 0,9  $\mu\text{m}$ . Las partículas de hidroxiapatita sustituida con carbonato están preferiblemente en forma cristalina, es decir, se unen entre sí para crear agregados de partículas de hidroxiapatita (también denominados en esta solicitud como "agrupamientos" o "cristales" o "microcristales" o "agregados microcristalinos", todos estos términos con el mismo significado que "agregados" según la invención). Estos agregados tienen dimensiones micrométricas, con un tamaño comprendido entre 0,5 y 25  $\mu\text{m}$ , más particularmente entre 0,5 y 5  $\mu\text{m}$  y con un área de superficie importante. En particular, los agregados de hidroxiapatita útiles según la presente invención tienen un área de superficie comprendida entre 60 y 120  $\text{m}^2/\text{g}$ , más particularmente entre 70 y 90  $\text{m}^2/\text{gramo}$ .

- 45 Los agregados de hidroxiapatita sustituida con carbonato tienen la ventaja de tener un área de superficie mayor con respecto a las partículas individuales de hidroxiapatita y, por lo tanto, permiten adsorber más moléculas bioactivas y controlar la liberación de las mismas al medio ambiente. Por lo tanto, para una pequeña cantidad de hidroxiapatita sustituida con carbonato es posible transportar un número significativo de moléculas bioactivas que permiten aumentar aún más la actividad y la eficacia biológica de las moléculas.

- 50 Las sustancias bioactivas con actividad antiparasitaria y/o nutricional utilizadas en la presente invención pueden ser iones metálicos, tales como Cu, Zn y S. Tales iones tienen acción antiparasitaria. Otros ejemplos de sustancias bioactivas útiles para los fines de la invención son los iones metálicos, tales como Mn, Mg, K, Fe, B (que actúan como elementos fertilizantes y nutritivos), y extractos de origen vegetal, tales como extractos de: lignina, menta, tomillo, romero, sésamo, soja, clavo, ajo, limón, canela, *Abies sibirica*, *Malpighia glabra*, *Achillea millefolium*, *Allium sativum*, *Medicago sativa*, *Aloe vera*, *Citrus sinensis*, *Artemisia annua*, *Arnica Montana*, *Ocimum basilicum*, *Betula pendula*,

*Betula pubescens, Calendula officinalis, Matricaria chamomilla, Chamaemelum nobile, Cinnamomum verum, Centella asiatica, Chelidonium majus, Syzygium aromaticum, Allium cepa, Equisetum arvense, Curcuma longa, Echinacea purpurea, Echinacea angustifolia, Eucalyptus globulus, Hypericum perforatum, Fucus vesiculosus, Gentiana lutea, Lavandula angustifolia, Citrus limon, Melilotus officinalis, Melissa officinalis, Punica granatum, Mentha piperita, Vaccinium myrtillus, Orthosiphon stamineus, Urtica dioica, Olea europaea, Tabebuia impetiginosa, Plantago lanceolata, Hieracium pilosella, Pinus sibirica, Polypodium leucotoms, Citrus paradise, Quassia amara, Rheum thais, Rosa canina, Rosmarinus officinalis, Ruscus aculeatus, Salix alba, Salvia officinalis, Camelia sinensis, Tilia tomentosa, Thymus vulgaris, Arctostaphylos uva-ursi, Valeriana officinalis, Solidago virgaurea, Loranthus europaeus, Zingiber officinale.* Los extractos vegetales pueden tener tanto actividad nutricional como leve actividad antiparasitaria.

10 Las sustancias bioactivas se adsorben sobre el portador de hidroxiapatita, obteniéndose así una hidroxiapatita cargada con al menos una sustancia bioactiva.

La absorción de tales sustancias sobre la hidroxiapatita puede realizarse por todos los procesos conocidos por el experto en la técnica. El agregado de hidroxiapatita cristalizado tiene una zona interior puramente cristalina y una zona periférica exterior con cargas eléctricas no completamente neutras, lo que permite retener las moléculas bioactivas. Por ejemplo, en el caso de adsorción de cobre y/o azufre sobre partículas de hidroxiapatita, la adsorción puede por tanto obtenerse:

- para cobre a partir de: sulfato (II) pentahidratado, cloruro de cobre, oxiclورو de cobre, hidróxido de cobre, óxido de cobre o una mezcla de estos compuestos;
- 20 – para azufre a partir de: azufre soluble, azufre micronizado, azufre atomizado o una mezcla de estos compuestos;
- para Mn a partir de: Sulfato de manganeso;
- para Mg a partir de: Sulfato de magnesio, Óxido de magnesio;
- 25 – para K a partir de: Cloruro de potasio, Sulfato de potasio;
- para Fe a partir de: Sulfato de hierro;
- 30 – para B a partir de: Ácido bórico;

Para el uso según la invención, la hidroxiapatita sustituida con carbonato cargada con la sustancia activa se integra preferiblemente en una composición, preferiblemente en forma de agregados microcristalinos. Esta composición puede presentarse en todas las formas, en particular en polvo, gránulos, líquido o gel. Según una realización preferida, los agregados de hidroxiapatita se dispersan de manera uniforme en agua. El pH de la composición en forma líquida es preferiblemente superior a 5 para evitar que los microcristales de hidroxiapatita sustituida con carbonato sufran una hidrólisis parcial o total.

Tal composición líquida permite la aplicación foliar, en particular por pulverización. La estructura y el tamaño micrométrico de los cristales de hidroxiapatita hacen que se dispersen uniformemente dentro del volumen de las gotas micronizadas durante la pulverización, lo que permite una buena distribución en todo el volumen utilizado para la aplicación y, en consecuencia, una distribución más uniforme sobre la superficie de aplicación. Según el tipo de atomizador utilizado para la aplicación de hidroxiapatita sustituida con carbonato, es posible tener gotitas cuyo diámetro varía entre 50 y 800 µm. Para evitar o limitar el arrastre de gotitas muy pequeñas y el vertido de gotitas muy grandes, y garantizar una mejor aplicación sobre la superficie a tratar, es posible utilizar medios de pulverización que permitan obtener gotitas de un tamaño comprendido entre 150 y 250 µm.

Una vez aplicadas, las partículas agregadas se adhieren a la hoja sin necesidad de utilizar agentes mejoradores de la adhesividad en la composición. De hecho, según su superficie, su tamaño, sus irregularidades morfológicas y sus características electrostáticas, los cristales de hidroxiapatita se adhieren a la superficie de las hojas, asegurando así una óptima resistencia de adherencia al agua escurrida, a diferencia de los productos existentes actualmente que son arrastrados por la lluvia o el rocío. El uso de las composiciones, aplicadas por hectárea, debe adaptarse según las condiciones climáticas encontradas, la estación y las estrategias de protección y nutrición del suelo.

Preferiblemente las composiciones contienen entre 5 y 70% de hidroxiapatita sustituida con carbonato y/o agregados de partículas de hidroxiapatita sustituida con carbonato, incluso más preferiblemente entre 6 y 60% (como porcentaje en peso de sólidos totales de la composición).

En el caso de una formulación acuosa para aplicación foliar, las partículas de hidroxiapatita sustituida con carbonato y/o los agregados de partículas de hidroxiapatita sustituida con carbonato están preferiblemente entre 2 y 5% en peso del peso total de la composición.

Las dosificaciones preferidas son entre 2 y 5 kg, preferiblemente de 2,5 kg por hectárea a 250 l/ha en pleno desarrollo vegetativo, con una densidad de aproximadamente 4000 tallos/ha.

Un ejemplo de un protocolo de aplicación particularmente adecuado es:

- Implementación en otoño antes de la caída de las hojas (savia descendente) después de la cosecha
- Aplicación de invierno inmediatamente después de la corta (mismo día o al día siguiente)
- Aplicación de primavera antes de la floración (savia ascendente)
- Aplicación a finales de junio, julio y principios de agosto después de la floración.

Se puede realizar una aplicación adicional en caso de granizo.

Una vez aplicadas a la planta, las sustancias bioactivas pueden liberarse directamente o los microcristales de hidroxiapatita sustituidos con carbonato pueden transportar estas sustancias a los espacios intercelulares. Las sustancias bioactivas se liberan así por hidrólisis, en la proximidad de los objetivos, en particular en la proximidad de los parásitos objetivo, tales como hongos y bacterias.

De hecho, los agregados microcristalinos de hidroxiapatita sustituida con carbonato penetran en la planta según la difusión pasiva que sigue a la descarga de fluidos, tales como dióxido de carbono y agua, a través de las aberturas naturales de los tejidos vegetales. En el interior de la planta, la hidroxiapatita se comporta como un "sol-gel": no se estanca en un medio líquido, se desplaza en el xilema y el floema siguiendo la circulación de la linfa. Por lo tanto, no hay riesgo de acumulación en la planta. Cuando la hidroxiapatita sustituida con carbonato se encuentra con un patógeno, el agregado se descompone ya que la pared más ácida del microorganismo promueve la disolución y la liberación de moléculas bioactivas transportadas por la hidroxiapatita sustituida con carbonato, que por lo tanto puede actuar contra el patógeno.

Las sustancias bioactivas siguen el flujo linfático y ejercen su actividad en particular como fertilizantes para mejorar el desarrollo de la planta y/o reforzar sus defensas naturales. A diferencia de los métodos convencionales, no hay por tanto acción sobre las rutas metabólicas intracelulares, sino una acción de contacto entre los elementos funcionales de los agregados de hidroxiapatita sustituida con carbonato y los patógenos a nivel intercelular o en la superficie de las plantas.

Por lo tanto, las sustancias bioactivas pueden actuar cuando se pulverizan sobre la superficie pero también en profundidad en el núcleo de los tejidos vegetales tratados.

Las partículas de hidroxiapatita sustituida con carbonato también se pueden utilizar para su aplicación sobre el tronco, sobre la madera de las plantas o sobre sus raíces según el propósito de la aplicación.

Según otro aspecto, la invención se refiere a partículas de hidroxiapatita sustituida con carbonato cargadas con al menos una sustancia bioactiva. En otras palabras, la invención se refiere a un portador de partículas (o agregados) de hidroxiapatita sustituida con carbonato que comprende sustancias bioactivas adsorbidas sobre el mismo. Las sustancias bioactivas son las enumeradas anteriormente.

La invención también se refiere a agregados de partículas de hidroxiapatita sustituida con carbonato cargadas con al menos una sustancia bioactiva como se describe anteriormente. Estos agrupamientos tienen un tamaño comprendido entre 0,5 y 25  $\mu\text{m}$ , preferiblemente comprendido entre 0,5 y 5  $\mu\text{m}$ . La invención también se refiere a una composición que comprende al menos una partícula de hidroxiapatita sustituida con carbonato o al menos un agregado de partículas de hidroxiapatita sustituida con carbonato según la invención, cargados con sustancias bioactivas. Preferiblemente, tal composición comprende entre 5 y 70% en peso de partículas y/o agregados de hidroxiapatita sustituida con carbonato con relación al peso total de la materia seca de la composición, aún más preferiblemente entre 6 y 60%.

La invención se ilustra ahora mediante ejemplos de procesos de fabricación, ejemplos de composición y ejemplos de usos.

Ejemplo de fabricación 1

La hidroxiapatita se sintetiza mezclando ácido fosfórico con una composición que comprende hidróxido de calcio y carbonato de calcio previamente dispersados en una cantidad adecuada de agua.

La reacción requiere de aproximadamente 12 a 48 horas, más particularmente de aproximadamente 15 a 30 horas. Tras la suspensión de los microcristales se añade una solución de sulfato (II) pentahidratado y cloruro de cobre, previamente disueltos en una cantidad adecuada de agua.

Una vez que se combinan estas dos soluciones, se mezclan para permitir la adsorción de iones de cobre en los cristales inorgánicos de hidroxiapatita.

La adsorción de la solución de cobre dura aproximadamente de 12 a 72 horas, más particularmente de 24 a 60 horas.

Ejemplo de fabricación 2

La hidroxiapatita se sintetiza mezclando ácido fosfórico con una composición que comprende hidróxido de calcio y carbonato de calcio, previamente dispersados en una cantidad adecuada de agua.

- 5 La reacción requiere de aproximadamente 12 a 48 horas, más particularmente de aproximadamente 15 a 30 horas. Tras la suspensión de microcristales, se añade una suspensión de azufre y azufre micronizado dispersos en un volumen adecuado de agua.

Una vez que se combinan estas dos soluciones, se mezclan para permitir la adsorción de iones de azufre en los cristales inorgánicos de hidroxiapatita.

La reacción requiere de aproximadamente 2 a 10 horas, más particularmente de aproximadamente 4 a 6 horas.

10 Ejemplo de fabricación 3

La hidroxiapatita se sintetiza mezclando ácido fosfórico con una composición que comprende hidróxido de calcio y carbonato de calcio, previamente dispersados en una cantidad adecuada de agua.

- 15 La reacción requiere de aproximadamente 12 a 48 horas, más particularmente de aproximadamente 15 a 30 horas. Tras la suspensión de microcristales, se añade una suspensión de aceites esenciales dispersos en un volumen adecuado de agua.

Una vez que se combinan estas dos soluciones, se mezclan para permitir la adsorción de los aceites esenciales en los cristales inorgánicos de hidroxiapatita.

La reacción requiere de aproximadamente 2 a 10 horas, más particularmente de aproximadamente 4 a 6 horas.

Ejemplo de fabricación 4

- 20 La hidroxiapatita se sintetiza mezclando ácido fosfórico con una composición que comprende hidróxido de calcio y carbonato de calcio previamente dispersados en una cantidad adecuada de agua.

La reacción requiere de aproximadamente 12 a 48 horas, más particularmente de aproximadamente 15 a 30 horas. Tras la suspensión de microcristales se añade una suspensión de extractos vegetales tales como extractos de menta, tomillo, romero, clavo, canela, limón y ajo, previamente disueltos en una cantidad adecuada de agua.

- 25 Una vez que se combinan estas dos soluciones, se mezclan para permitir la adsorción de extractos vegetales en la hidroxiapatita.

La adsorción de la solución de cobre dura de aproximadamente 12 a 72 horas, más particularmente de 24 a 60 horas.

Ejemplo de fabricación 5

- 30 La hidroxiapatita se sintetiza mezclando ácido fosfórico con una composición que comprende hidróxido de calcio y carbonato de calcio, previamente dispersados en una cantidad adecuada de agua.

La reacción requiere de aproximadamente 12 a 48 horas, más particularmente de aproximadamente 15 a 30 horas. Tras la suspensión de microcristales, se añade una formulación de microelementos tales como ácido bórico y óxido de magnesio en un volumen adecuado de agua.

- 35 Una vez que se combinan estas dos soluciones, se mezclan para permitir la adsorción de los iones metálicos en la hidroxiapatita.

La reacción requiere de aproximadamente 2 a 10 horas, más particularmente de aproximadamente 4 a 6 horas.

Ejemplo de fabricación 6

La hidroxiapatita se sintetiza mezclando ácido fosfórico con una composición que comprende hidróxido de calcio y carbonato de calcio, previamente dispersados en una cantidad adecuada de agua.

- 40 La reacción requiere de aproximadamente 12 a 48 horas, más particularmente de aproximadamente 15 a 30 horas.

Después de la suspensión de microcristales, una suspensión de extractos vegetales tales como el extracto alcohólico o hidroalcohólico (en forma de polvo higroscópico) de *Citrus paradisi*, *Loranthus europaeus*, *Medicago sativa* y *Solidago virgaurea*, se dispersa en un volumen adecuado de agua.

- 45 Una vez que se combinan estas dos soluciones, se mezclan para permitir la adsorción de los extractos en la hidroxiapatita.

La reacción requiere de aproximadamente 2 a 10 horas, más particularmente de aproximadamente 4 a 6 horas.

Ejemplos de composición

Una composición a base de azufre puede comprender la siguiente formulación:

- 5 – Hidroxiapatita de azufre al 10% (hidroxiapatita con carbonato con iones de azufre adsorbidos)
- Agua destilada 83%
- Goma xantana 1%
- 10 – Glicerina 4%
- Ácido benzoico 2%

Una composición a base de cobre puede comprender la siguiente formulación:

- 15 – Hidroxiapatita de cobre al 10% (hidroxiapatita con carbonato con iones de cobre adsorbidos)
- Agua destilada 83,5%
- Goma xantana 1%
- 20 – Glicerina 4%
- Ácido benzoico 1,5%

Una composición a base de selenio puede comprender la siguiente formulación:

- 25 – Hidroxiapatita de selenio al 10% (hidroxiapatita con carbonato con iones de selenio adsorbidos)
- Agua destilada 83%
- Goma xantana 1%
- 30 – Glicerina 4%
- Ácido benzoico 2%

Una composición a base de Boro puede comprender la siguiente formulación:

- 35 – Hidroxiapatita de boro al 10 % (hidroxiapatita con carbonato con iones de boro adsorbidos)
- Agua destilada 83,5%
- Goma xantana 1%
- 40 – Glicerina 4%
- Ácido benzoico 1,5%

Una composición según la invención puede ser también una composición que comprenda una mezcla de las dos composiciones descritas anteriormente.

45 Una composición a base de extracto vegetal y cobre puede comprender la siguiente formulación:

- Hidroxiapatita de cobre al 10 % (hidroxiapatita con carbonato con iones de cobre adsorbidos)
- hidroxiapatita cargada con aceites esenciales al 10%
- 50 – Agua destilada 73,5%
- Goma xantana 1%
- Glicerina 4%
- 55

- Ácido benzoico 1,5%

Ejemplo de uso

Para optimizar las propiedades funcionales y la estabilidad estructural de las composiciones líquidas que comprenden las partículas de hidroxapatita, se puede implementar un uso de acuerdo con las siguientes recomendaciones en particular:

- 5 - Agitar la composición antes de su uso para volver a poner las partículas y/o agregados de partículas en suspensión en la composición;
- 10 - Utilizar un atomizador que asegura una humectación completa y uniforme de la vegetación y evita volúmenes demasiado bajos o demasiado altos;
- 15 - Utilizar cantidades de agua que varían de 60L/ha a 250L/ha en plantas completamente desarrolladas, evitando cantidades excesivas de agua que generen escorrentías;
- Reducir la cantidad de producto por hectárea en caso de aplicación manual;
- Controlar el pH de la solución en agua para que sea superior a 5.

### Ejemplos A

#### Pruebas experimentales en enfermedades de las vides

LEYENDA DE LAS FORMULACIONES PROBADAS	
<i>Todas las formulaciones contienen agua, hidroxapatita sustituida con iones carbonato y/o cobre y/o zinc, y cargada de iones (K, Mg, B, Mn) y/o extractos vegetales.</i>	
Código	Sustancias funcionales (F) o sustituyentes (S) (g/kg formulación)
FI	cobre = 50 (S); Zn (S) = 18; mezcla de extractos vegetales = 30 (F)
F10	cobre = 50 (F); mezcla de extractos vegetales = 30 (F)

#### 1. AMARILLEAMIENTO DE LA VID (Flavescence dorée y Bois Noir)

Para evaluar la acción de las formulaciones contra Flavescence dorée (FD), se han identificado 3 viñedos diferentes que presentan la enfermedad, en Piamonte, en la provincia de Cuneo (en las fincas Gaja y Ferrero) y Asti (en la finca Tenute dei Vallarino Gancia) .

Granja	CV.	Año de plantación	Superficie total	Núm. vides	Período de tratamiento	Tipo de Tratamiento	Control de síntomas		Tratamientos		
							I	II	I	II	III
A	Arneis	2008	0,50 ha	89	después de la cosecha	planta individual	10/10/2014		11/10/2014		
B	Barbera	2003	1,00 ha	124	primavera / verano + después de la cosecha	planta individual	30/09/2013	12/08/2014	04/10/2013	12/08/2014	23/09/2014
C	Barbera	2005	0,50 ha	95	verano + después de la cosecha	planta individual			25/06/2014	27/10/2014	

Para cada viñedo se registró la gravedad de los síntomas, indicando si presentaba síntomas generalizados (síntomas foliares en todo el follaje) o localizados (síntomas en algunas ramas); cada planta sintomática se marcó con un símbolo de marca especial.

En los viñedos elegidos, la mitad de las vides fueron tratadas con FI y la otra mitad se mantuvo como comparación (Prueba). Las vides sintomáticas fueron tratadas individualmente en forma alterna en la misma hilera. Los tratamientos se realizaron en primavera y verano y después de la cosecha de la siguiente manera: En la finca "C" (Cuneo) se recolectaron muestras foliares de 10 plantas tratadas y 10 plantas no tratadas (cv. Barbera) en octubre de 2014 del viñedo experimental, y se sometieron a prueba mediante RT-PCR multiplex en tiempo real para determinar la presencia del fitoplasma Bois Noir (BN) y FD. El análisis mostró la presencia de fitoplasma FD en 8 plantas no tratadas y 0 tratadas. En 3 vides no tratadas se encontró el fitoplasma BN (Tabla 1).

## ES 2 926 368 T3

Núm.	MUESTRA	RT-PCR múltiplex en tiempo real	
		BN	FD
TAB 1 - GRANJA B			
AT1	Núm. 1 TRATADA	neg	neg
AT2	Núm. 1 NO TRATADA	neg	neg
AT3	Núm. 2 TRATADA	neg	neg
AT4	Núm. 2 NO TRATADA	neg	pos
AT5	Núm. 3 TRATADA	neg	neg
AT6	Núm. 3 NO TRATADA	neg	neg
AT7	Núm. 4 NO TRATADA	neg	pos
AT8	Núm. 4 TRATADA	neg	neg
AT9	Núm. 5 TRATADA	neg	neg
AT10	Núm. 5 NO TRATADA	neg	pos
AT11	Núm. 6 TRATADA	neg	neg
AT12	Núm. 6 NO TRATADA	neg	pos
AT13	Núm. 7 TRATADA	neg	neg
AT14	Núm. 7 NO TRATADA	positivo	pos
AT15	Núm. 8 TRATADA	neg	neg
AT16	Núm. 8 NO TRATADA	positivo	pos
AT17	Núm. 9 TRATADA	neg	neg
AT18	Núm. 9 NO TRATADA	neg	pos
AT19	Núm. 10 TRATADA	neg	neg
AT20	Núm. 10 NO TRATADA	positivo	pos

En la finca "A" (Cuneo), el ensayo se inició el año 2014 tratando después de la cosecha y el primer análisis mostró la presencia de fitoplasma FD en 9 plantas no tratadas y 0 tratadas y la presencia de fitoplasma BN en 1 planta no tratada y 0 plantas tratadas (Tabla 2).

Núm.	MUESTRA	RT-PCR múltiplex en tiempo real	
		BN	FD
TAB 2 - GRANJA C			
CN17	Núm. 1 TRATADA	neg	neg
CN18	Núm. 1 NO TRATADA	pos	pos
CN19	Núm. 2 TRATADA	neg	neg
CN20	Núm. 2 NO TRATADA	neg	pos
CN21	Núm. 3 TRATADA	neg	neg
CN22	Núm. 3 NO TRATADA	neg	pos
CN23	Núm. 4 NO TRATADA	neg	pos
CN24	Núm. 4 TRATADA	neg	neg
CN25	Núm. 5 TRATADA	neg	neg
CN26	Núm. 5 NO TRATADA	neg	neg
CN27	Núm. 6 TRATADA	neg	neg
CN28	Núm. 6 NO TRATADA	neg	pos
CN29	Núm. 7 TRATADA	neg	neg
CN30	Núm. 7 NO TRATADA	neg	pos
CN31	Núm. 8 TRATADA	neg	neg
CN32	Núm. 8 NO TRATADA	neg	pos
CN33	Núm. 9 TRATADA	neg	neg

## ES 2 926 368 T3

Núm.	MUESTRA	RT-PCR múltiplex en tiempo real	
		BN	FD
TAB 2 - GRANJA C			
CN34	Núm. 9 NO TRATADA	neg	pos
CN35	Núm. 10 TRATADA	neg	neg
CN36	Núm. 10 NO TRATADA	neg	pos

En la finca "B" (Asti), se tomaron muestras de hojas de 10 plantas, en el viñedo experimental (cv. Barbera), en octubre de 2014. El análisis mostró la presencia de fitoplasma FD en 8 plantas no tratadas y 0 tratadas (Tabla 3).

Núm.	MUESTRA	RT-PCR múltiplex en tiempo real	
		BN	FD
TAB 3 - GRANJA A			
AA1	Núm. 1 TRATADA	neg	neg
AA2	Núm. 1 NO TRATADA	neg	pos
AA3	Núm. 2 TRATADA	neg	neg
AA4	Núm. 2 NO TRATADA	neg	pos
AA5	Núm. 3 TRATADA	neg	neg
AA6	Núm. 3 NO TRATADA	neg	pos
AA7	Núm. 4 NO TRATADA	neg	pos
AA8	Núm. 4 TRATADA	neg	neg
AA9	Núm. 5 TRATADA	neg	neg
AA10	Núm. 5 NO TRATADA	neg	pos
AA11	Núm. 6 TRATADA	neg	neg
AA12	Núm. 6 NO TRATADA	neg	pos
AA13	Núm. 7 TRATADA	neg	neg
AA14	Núm. 7 NO TRATADA	neg	pos
AA15	Núm. 8 TRATADA	neg	neg
AA16	Núm. 8 NO TRATADA	neg	pos
AA17	Núm. 9 TRATADA	neg	neg
AA18	Núm. 9 NO TRATADA	neg	neg
AA19	Núm. 10 TRATADA	neg	neg
AA20	Núm. 10 NO TRATADA	neg	neg

5 Posteriormente se realizó el análisis de 13 muestras de hojas, tomadas de 10 plantas en viñedos "sometidos a prueba", en las cuales se realizaron tratamientos igualmente con la formulación FI. Las muestras se identificaron, en la misma rama, como "hojas sintomáticas" y "hojas asintomáticas" (salidas en el ápice después del tratamiento). Solo las hojas sintomáticas fueron positivas a FD.

10 Al mismo tiempo, se establecieron pruebas en ambiente controlado (invernadero) para evaluar y comparar la eficacia de la formulación FI y F10 mediante el tratamiento de plantas de *Catharanthus roseus*, infectadas artificialmente con diferentes agentes de Amarilleamiento de la vid.

Las plantas se cultivaron durante tres meses para alcanzar un estado de desarrollo adecuado para asegurar la eficacia del inóculo, que se realizó acoplado porciones de planta herbácea con agentes infectados: Stolbur o Bois Noir (16SrXII-A), Aster Yellow (16SrI-B) y Flavescente dorée (16SrV-C).

15 Las pruebas en invernadero fueron 3:

- 1- Productos FI y F10 sobre plantas infectadas con el fitoplasma Stolbur (16SrXII-A);
- 2- Productos FI y F10 en plantas infectadas con el fitoplasma Aster Yellow (16SrI-B);
- 3- Producto F10 sobre plantas infectadas con el fitoplasma Flavescente dorée (16SrV-C).

Para las pruebas se utilizaron: 15 plantas infectadas con el fitoplasma y no tratadas, 15 plantas infectadas con el fitoplasma y tratadas con FI, 15 plantas infectadas con el fitoplasma y tratadas con F10, 15 plantas sanas tratadas con FI y 15 plantas sanas tratadas con F10.

- 5 Los tratamientos se inician transcurrido 1 mes desde la inoculación, tras la plena manifestación de los síntomas, inicialmente a una concentración de 6,6 g/l (0,6%) cada 9 días y posteriormente de 50 g/l (5%) cada dos semanas. A continuación se muestran los resultados del seguimiento de síntomas:

DF	Vides muertas	Vides en crecimiento	Hojas asintomáticas
Control	81%	19%	0%
F10	15%	63%	22%
FI	13%	61%	26%

BN	Vides muertas	Vides en crecimiento	Hojas asintomáticas
Control	81%	19%	0%
F10	14%	66%	20%
FI	11%	70%	19%

AY/FI	Vides muertas	Vides en crecimiento	Hojas asintomáticas
Control	89%	11%	0%
F10	8%	61%	31%
FI	7%	60%	33%

- 10 Los tratamientos confirmaron la reducción de la expresión de síntomas en las plantas afectadas de Amarilleamientos de la vid, revelando una eficacia similar de las formulaciones FI y F10 en comparación con cada control.

### Ejemplos B

#### Pruebas experimentales en enfermedades de la vid

LEYENDA DE LAS FORMULACIONES PROBADAS	
Todas las formulaciones contienen agua, hidroxapatita sustituida con iones carbonato y/o cobre y/o zinc, y cargada con iones (K, Mg, B, Mn) y/o extractos vegetales.	
código	Sustancias funcionales (F) o sustituyentes (S) (formulación g/kg)
T1	Cu [sulfato] = 35 (F); Zn (F) = 18; mezcla de extractos vegetales = 30 (F)
T2	Cu [sulfato tribásico] = 35 (F); Zn (F) = 18; mezcla de extractos vegetales = 30 (F)
T3	Cu [oxiclورو] = 35 (F); Zn (F) = 18; mezcla de extractos vegetales = 30 (F)
T4	Cu [hidróxido] = 35 (F); Zn (F) = 18; mezcla de extractos vegetales = 30 (F)
MS	Hidroxapatita sustituida con iones de carbonato = 120
OE1	mezcla de extractos vegetales = 30 (F)
OE2	mezcla de extractos vegetales = 30 (F)

### 15 1. Introducción

Se probaron varias formulaciones a base de hidroxapatita sustituida con iones carbonato y/o cobre y/o zinc, y cargadas con extractos vegetales *in vitro* e *in vivo* contra patógenos de la vid.

### 2. Yesca o enfermedad del tronco de la vid

- 20 Muestras constituidas por agua y a base de Hidroxapatita con Carbonato (HCA) cargadas con varias sales de cobre (sulfato, sulfato tribásico, oxiclورو, hidróxido), sulfato de zinc y extractos vegetales (aceites esenciales) fueron probadas *in vitro* contra los patógenos relacionados con la yesca: *Phaeoconiella chlamydospora*, *Phaeoacremonium aleophilum*.

El protocolo consistió en el crecimiento de patógenos en un medio adecuado (MEA - Agar Extracto de Malta) como muestra no tratada, y el mismo medio con 4 concentraciones diferentes de los agentes de prueba, 0,6%, 1,2%, 2,4%

y 4,8.

El crecimiento fúngico se midió, en la dirección diametral, desde el punto de inoculación. La medida se expresó en mm. Se observaron diferencias de crecimiento de *Phaeoacremonium aleophilum* y *Phaeomoniella chlamydospora* cada 7 días durante cuatro semanas (a continuación, a los 7, 14, 21 y 28 días).

- 5 Restando a los valores, el valor diametral 0,7 mm, correspondiente al inóculo inicial, se determinó el crecimiento real de la colonia; sin embargo, la efectividad del producto único se calculó observando (Moghaddam et al, 2014) el porcentaje de inhibición del crecimiento en comparación con el control (abreviado % IG), mediante la fórmula:

$$\% IG = [Valor de crecimiento de la muestra inoculada - Valor de crecimiento control] / Valor de crecimiento control$$

- 10 Con el fin de mejorar la información sobre los datos relacionados con el efecto de estos tratamientos, se sometieron a análisis de varianza (ANOVA) y la significación de las diferencias entre los promedios de los tratamientos se probó mediante la prueba HSD de Tukey. El paquete utilizado para el análisis estadístico de los resultados fue la versión 10 desarrollada por StatSoft. Inc., Tulsa, OK 74104 EE. UU.

Resultados YESCA (*Phaeomoniella chlamydospora*) - Figuras 1A-D

- 15 Todas las placas tratadas con MS no se inhiben, sino que se observa una fuerte acción probiótica que alcanza el máximo en el primer control con valores que, para las concentraciones muy altas, pueden alcanzar valores superiores a 50%. La efectividad en la inhibición de *P. chlamydospora* por parte de T1 es bien observable inmediatamente, de hecho tiene 100% de inhibición para cada concentración. El día 28 ninguna de las placas sometidas a prueba había producido micelio por lo que se mantuvieron inalterados los valores durante todo el tiempo de la prueba. El efecto de inhibición T2 es observable desde el primer día hasta los siete días a todas las concentraciones, que alcanzan el máximo de eficacia el segundo día, hasta el final de la prueba, para descender. Para el tratamiento T3 se observa que el efecto inhibidor no está presente. Para el tratamiento T4 se observa, desde el primer control a los siete días un efecto de inhibición significativo para la concentración más alta, 4,8%, alcanza 100%. El tratamiento OE1 mostró una tendencia diferente que resultó no ser inhibidor a la concentración más alta, pero sí inhibidor a los 14 días del inicio de la prueba. También el tratamiento OE2 muestra un bajo efecto inhibidor: hay una diferencia estadísticamente significativa solo al final de la prueba a las concentraciones más altas.

Resultados YESCA (*Phaeoacremonium aleophilum*) - Figuras 2A-D

- 30 El tratamiento MS mostró, ya en la primera observación, un efecto probiótico sobre el hongo, especialmente para las dos concentraciones más bajas que demuestran diferencias estadísticamente detectables entre ellas. Comparando con el resultado anterior, en este caso, el tratamiento T1 tiene un efecto de inhibición pero inconstante durante la duración de la prueba y a todas las concentraciones. Para el tratamiento T2 se observa que las concentraciones más altas, 4,8% y 2,4%, tienen un efecto inhibidor del crecimiento del hongo ya en el primer control a los 7 días que para la concentración de 4,8% que es de 98%. Como se informó en el patógeno anterior, el tratamiento T3 mostró un efecto probiótico sobre *P. aleophilum*. Con la misma tendencia, el tratamiento OE1 tiene un efecto probiótico sobre el crecimiento del hongo que alcanza su máximo al día 21, hasta valores superiores a 100%. Mientras que para el tratamiento OE2 se observa que la inhibición de 100% del hongo comienza ya el día 7 para todas las concentraciones y se mantiene invariable durante todo el tiempo de la prueba. En el tratamiento T4, la concentración de 4,8%, es durante todo el tiempo de ensayo, inhibidora contra el hongo alcanzando un porcentaje superior a 70% que se mantiene constante en el tiempo.

### 3. Agente de la agalla de la corona de la vid (*Agrobacterium vitis*)

- 40 Se determinó la eficacia biológica de los agentes de prueba en el control de la infección por *Agrobacterium vitis* en material de propagación de vid (portainjertos) en vivero. Para ello, 400 vástagos de Glera ISV 19 (no infectados) y 400 esquejes 41B E12 (naturalmente infectados por el patógeno) se dividieron en cuatro tesis experimentales, cada una diseñada para producir 100 esquejes injertados, tratados con diferentes concentraciones de T1 (1 y 2%), según el siguiente esquema:

Tesis	Esquejes	pre-hidratación	hidratación	post-hidratación	post-injerto
NT	100	-	7h en agua	-	-
T1/1	100	-	7h en agua	-	1h en T1 2%
T1/2	100	10 min en T1 2%	7h en agua	10 min en T1 2%	10 min en T1 2%
T1/3	100	-	7h en T1 1%	-	10 min en T1 1%

- 45 El tratamiento se realizó sobre portainjertos de 4 tesis experimentales, en 25 L de agua. Al día siguiente se realizaron los injertos y el primer parafinado. En todas las etapas de elaboración se mantuvieron separadas las cuatro tesis en ensayo y se desinfectaron las máquinas injertadoras con hipoclorito sódico al 3%, tanto al inicio como al final de los injertos experimentales.

Los estudios de campo sobre el rendimiento y los síntomas (cáncer a nivel del punto de injerto) se realizaron 3 veces a lo largo de la temporada de crecimiento.

5 La presencia del patógeno fue controlada por análisis molecular en dos etapas: antes del tratamiento, de portainjertos e injertos y al final del callo en vástagos injertados. El diagnóstico se realizó mediante análisis microbiológico en sustrato de agar semiselectivo y a continuación, se confirmó mediante técnica molecular con PCR Multiplex (Bini et al. 2008).

Los datos de rendimientos en vivero de los esquejes injertados y su contaminación por el patógeno se sometieron a análisis de varianza (ANOVA) y comparación de medias con pruebas S.N.K. En las tablas y gráficos, las mismas letras corresponden a medias no estadísticamente diferentes ( $P < 0,05$ ). El análisis estadístico se realizó utilizando el soporte lógico CoStat 6400 (Cohort Software).

10 *Resultados del AGENTE DE LA AGALLA DE LA CORONA DE LA VID (Agrobacterium vitis)*

15 La Figura 3 proporciona una representación gráfica del comportamiento de los datos de material de vivero sometidos al tratamiento experimental con el agente T1, en las tres diferentes estrategias de empleo, en tres etapas, respectivamente, en post-callos, pre-cosecha y cosecha. Sobre el no tratado (NT) se observa un rendimiento final de 70%, en línea con los rendimientos normales de vivero, considerando que el material está mayoritariamente infectado. Los tres tratamientos T1 han dado lugar a reducciones variables del rendimiento en vivero, respecto al control no tratado, con diferentes porcentajes según la fase de producción. Antes de la cosecha, los tres tratamientos T1 mostraron rendimientos aceptables (53 y 59% de plantas vivas, respectivamente), ligeramente inferiores al control no tratado.

20 Las vides injertadas en la cosecha fueron sometidas a control, no sólo de la vitalidad para evaluar el rendimiento final, sino también de la presencia de síntomas evidentes de la enfermedad, consistentes en tumores a nivel del punto de acoplamiento, en el portainjerto y en los vástagos. La Figura 4 proporciona una representación gráfica de la frecuencia relativa de esquejes sintomáticos en la cosecha, bajo las tres diferentes estrategias de uso de T1, en comparación con el control no tratado. La presencia de síntomas en el control no tratado fue muy alta: de hecho el 67% de los esquejes presentaron tumores, principalmente en el portainjerto. Las tesis T1/1 y T1/2 mostraron un comportamiento similar, básicamente con una menor presencia de síntomas en comparación con el control, respectivamente, en 44 y 47% de las plantas. Los esquejes tratados con T1/3 en cambio han destacado el menor porcentaje de presencia de síntomas, 17%, confirmado por la prueba estadística.

25 La Figura 5 muestra, para cada tesis, el análisis molecular realizado para resaltar la presencia de cepas tumorigénicas de *Agrobacterium vitis*: en las tres tesis experimentales fue menor que en el control no tratado. La tesis T1/3, en particular, condujo a una reducción considerable del patógeno, mostrando una reducción de aproximadamente 65% en comparación con el control no tratado.

30 Considerando globalmente los datos de los tres tratamientos, en cuanto a la efectividad para destruir el patógeno, el mayor rendimiento y la reducción de síntomas en la cosecha fueron logrados por la tesis T3/3, que ha demostrado ser el mejor compromiso entre rendimiento y eficacia.

**4. Amarilleamientos de la vid (Flavescencia dorada/Flavescenza dorata)**

35 Para evaluar la acción de las formulaciones frente a Flavescencia dorada//Flavescenza dorata (FD), se han identificado 5 viñedos similares (cv. Barbera) que presentan la enfermedad, en Piamonte, en la provincia de Cuneo.

Para cada viñedo, se registró la gravedad de la enfermedad en términos de vides muertas por hectárea. El primer reconocimiento se realizó en agosto de 2011 hasta agosto de 2014. Los tratamientos se iniciaron en la poscosecha de 2011, aplicando el siguiente protocolo en función de los estados fenológicos de crecimiento de la vid:

- 40
- 1) BBCH 91 (Octubre- Post-cosecha)
  - 2) BBCH 14 (mayo)
  - 3) BBCH 71 (junio)
  - 4) BBCH 77 (julio)
  - 5) BBCH 81 (agosto)\*

45 \*tratamiento seguido del reconocimiento anual del viñedo.

En cada tratamiento se aplicaron 2 l/ha del agente T1, utilizando el pulverizador tradicional para viñedo y una media de 300-400 l/ha de agua.

Resultados de AMARILLEAMIENTOS DE LA VID (Flavescencia Dorada/Flavescenza dorata)

50 La Figura 6 ilustra el número/ha de vides muertas en los 5 viñedos tratados. Los datos referidos a 2011 representan el estado inicial de los viñedos antes de aplicar el agente T1. El siguiente esquema notifica los mismos datos:

	2011	2012	2013	2014
VIÑEDO 1	250	300	50	40
VIÑEDO 2	550	480	180	120
VIÑEDO 3	350	300	120	100
VIÑEDO 4	400	380	250	150
VIÑEDO 5	450	420	400	480

5 Globalmente en todos los viñedos se registró una reducción positiva y significativa, por años, del número de vides muertas por DF. La tendencia opuesta mostrada entre 2011 y 2012 en el viñedo 1 y entre 2013 y 2014 en el viñedo 5 se explicó por la exposición excesiva del viñedo a una presencia extraordinaria del *Scaphoisus titanus*, el insecto vector de la EF.

Los resultados confirmaron el efecto positivo de los tratamientos con el agente T1 en la reducción de la pudrición de la vid relacionada con *Grapewine Yellows* (FD) en los viñedos seleccionados.

### 5. Síndrome del declive rápido del olivo (*Xylella fastidiosa*)

10 Tal y como describe Martelli (2013), el síndrome de declive rápido del olivo (SDRO) es una enfermedad que apareció repentinamente hace unos años en la provincia de Lecce, península de Salento (sureste de Italia). El principal desencadenante de la enfermedad es la *Xylella fastidiosa*, un patógeno cuarentenario de origen americano cuya introducción no deseada en la zona ha creado mucha perturbación debido a: (i) el daño dramático sufrido por los olivares donde se ha establecido el patógeno; (ii) la alarma que ha despertado este hallazgo en un país (Italia) cuya industria olivarera es un activo primordial, y en la Unión Europea, que se enfrenta al primer registro confirmado en su territorio de este extraño y temido microorganismo.

15 El SDRO se caracteriza por la presencia de chamuscado foliar y desecación de ramillas y ramitas, que prevalecen primero en la parte superior del dosel y luego se extienden al resto de la copa, que adquiere un aspecto quemado. Los cultivadores podan fuertemente las plantas más afectadas para favorecer un nuevo crecimiento que, sin embargo, es escaso y se seca en poco tiempo. Los árboles de aspecto esquelético empujan una multitud de chupones desde la base y sobreviven durante algún tiempo, es decir, mientras las raíces sean viables.

20 El objetivo del ensayo fue comprobar en un primer año preliminar, la eficacia del agente T1, al contrastar el desarrollo de los síntomas del SDRO, causados por *Xylella fastidiosa*.

25 La prueba se realizó en olivos en un campo experimental bajo la responsabilidad y supervisión del C.I.H.E.A.M. - IAMB (Instituto Agronómico Mediterráneo de Bari), autorizado por el Ministerio de Agricultura italiano para realizar ensayos de campo sobre SDRO. Se seleccionó olivar de aproximadamente 30 años de edad (cv. Ogliarola Salento), con síntomas de SDRO. El esquema de la prueba se caracterizó por cuatro bloques al azar donde cada bloque estuvo compuesto por cuatro árboles, los bloques de las plantas tratadas se alternaron con los de las no tratadas en dos hileras separadas por dos hileras de plantas no tratadas.

30 La prueba tuvo una duración de nueve meses comenzando en abril y finalizando en diciembre, se realizaron con 6 tratamientos, 4 fertilizaciones y 8 reconocimientos de la sintomatología asociada al SDRO. Las plantas se trataron con un pulverizador (mod. LIBICCI de Tecnopress) equipado con una boquilla de distribución, aplicando 0,5% (v/v) del agente T1 para las primeras 4 aplicaciones y 0,75% para las últimas 2 aplicaciones:

1) Mayo, 4

2) Junio, 3

35 3) Julio, 3

4) Agosto, 4

5) Noviembre

6) Noviembre

40 La prueba se realizó con un esquema experimental a bloques 'aleatorizados' con 4 repeticiones (4 plantas/cada uno) véase la figura 7, para un total de 32 plantas además de 12 plantas con manifestación evidente de síntomas (plantas muertas). Para el análisis estático se utilizó ANOVA.

Las observaciones visuales se realizaron mensualmente y cubrieron el grado de progreso de los síntomas asociados con SDRO basándose en una escala empírica de gravedad de los síntomas.

0 = sin síntomas foliares

- 1 = 1-5% del follaje con ramas muertas
- 2 = 6-10% del follaje con ramas muertas
- 3 = 11-25% del follaje con ramas muertas
- 4 = más del 25% del follaje con ramas muertas

5 **Resultados del SÍNDROME DE DECLIVE RÁPIDO DEL OLIVO (*Xylella fastidiosa*)**

El curso de la enfermedad (SDRO), evaluado según la escala empírica notificada, no ha dado las diferencias estadísticas de las plantas tratadas respecto a las no tratadas. No obstante, observando la Figura 7, la línea roja muestra el grado de la enfermedad en las plantas tratadas: el valor más bajo indica un mejor grado de "salud" de la planta. Como se muestra, al final de la prueba (diciembre) a las plantas tratadas se les dio un valor más bajo que el grado de los síntomas de SDRO, lo que indica una mejora inicial de las plantas (Figura 7).

En la Figura 8 se muestra la evaluación del grado de la enfermedad (SDRO) desde el inicio y el final del ensayo: se observa que las plantas no tratadas no tuvieron variación en el desarrollo de los síntomas de la enfermedad, pero las plantas tratadas mostraron una reducción, indicando el inicio del proceso de mejoramiento de la planta (Figura 8). Considerando el olivo, que no tiene una respuesta inmediata al tratamiento y considerando la complejidad de la enfermedad que se articula con diversos patógenos asociados, los resultados fueron muy prometedores para lograr una mejor mejora del estado de salud de la planta en los 2 años siguientes de aplicación en campo del mismo tratamiento, siguiendo al menos el mismo tiempo en el que se recogieron resultados significativos frente a otras enfermedades de las plantas.

**6. Cancro bacteriano en kiwi (*Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*)**

*Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* es particularmente peligrosa en kiwi, siendo responsable del desarrollo de un cancro que causa la muerte de la planta. En la actualidad, para controlar este patógeno bacteriano, especialmente en agricultura orgánica, se pueden adoptar pocas estrategias efectivas. Se sugieren tratamientos con cobre y prácticas agronómicas apropiadas, tales como certificación de semillas, riego y fertilización (Colin et al., 1984; Varvaro et al., 2001).

Debido a la reciente restricción de la UE sobre el uso de cobre en la agricultura orgánica y al aumento del movimiento de material vegetal entre países de la UE y fuera de la UE, la posibilidad de limitar la aplicación de agentes de control a base de cobre y la amplificación de su eficacia asumen una importancia relevante para el control de estos patógenos bacterianos especialmente en la agricultura orgánica.

Con este fin, se diseñó un estudio in vitro para evaluar la eficacia de los agentes T1 y T2 en el control de *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*.

Las pruebas in vitro se realizaron mediante la prueba con principio activo incluido en el medio de cultivo que simula la reacción del patógeno al crecer sobre una superficie tratada con el agente de prueba.

Se utilizó una mezcla obtenida con 50% de T1 y 50% de T2 a la siguiente concentración: 0,5-1-2-3-4-5-6-7-8 g/l (9 dosis). El agente de control se incluyó en el medio NSA (caldo nutritivo 8 g/l, sacarosa 50 g/l y agar 18 g/l), que luego se vertió en cajas Petri y se dejó solidificar.

Se utilizaron cepas bacterianas, caracterizadas por un mayor nivel de virulencia y aisladas de plantas de kiwi en el centro de Italia, a la concentración de  $10^6$  ufc/ml.

La suspensión bacteriana se colocó en placas Petri NSA (100 µl por placa Petri) y después de la incubación a 26°C durante 48 h, se midió cualquier crecimiento bacteriano en mm, observando las placas Petri con un microscopio estereoscópico. La prueba in vitro se llevó a cabo en condiciones de laboratorio.

40 **Resultados del CANCRO BACTERIANO EN KIWI (*Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*)**

En prueba *in vitro*, el agente de prueba inhibe el crecimiento de la cepa bacteriana utilizada. La inhibición comenzó a manifestarse a concentraciones mayores e iguales a 2 g/l: las 7 concentraciones efectivas inhibieron totalmente la cepa bacteriana. Las concentraciones más bajas (0,5 y 1 g/l) no produjeron inhibición.

El medio NSA no tratado permitió un buen crecimiento de la cepa bacteriana, confirmando la validez de la prueba.

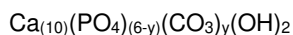
45 Los agentes de control T1 y T2 parecen ser útiles para patógenos bacterianos *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*.

El uso de estas sustancias parece ser especialmente interesante para su aplicación en campo en tratamientos protectores del kiwi, debido al bajo contenido de cobre. La actividad antimicrobiana de los extractos vegetales reserva interesantes oportunidades para sustituir o asociarse a cantidades de cobre inferiores a las normalmente utilizadas en la agricultura ecológica.

50

## REIVINDICACIONES

1. Una hidroxiapatita sustituida con carbonato que tiene la siguiente fórmula:



en donde y está comprendido entre 0,002 y 2,

5 combinada con al menos una sustancia bioactiva

seleccionada del grupo formado por:

un ion de Cu, Zn, S, Mn, Mg, K, Fe y B y un extracto vegetal, o

un ion de Mn, Mg, K, Fe y B o un extracto vegetal;

10 donde el extracto vegetal se selecciona del grupo que consiste en un extracto de: lignina, menta, tomillo, romero, sésamo, soja, *clavo*, *ajo*, *limón*, *canela*, *Abies sibirica*, *Malpighia glabra*, *Achillea millefolium*, *Allium sativum*, *Medicago sativa*, *Aloe vera*, *Citrus sinensis*, *Artemisia annua*, *Arnica Montana*, *Ocimum basilicum*, *Betula pendula*, *Betula pubescens*, *Calendula officinalis*, *Matricaria chamomilla*, *Chamaemelum nobile*, *Cinnamomum verum*, *Centella asiatica*, *Chelidonium majus*,  
 15 *Syzygium aromaticum*, *Allium cepa*, *Equisetum arvense*, *Curcuma longa*, *Echinacea purpurea*,  
*Echinacea angustifolia*, *Eucalyptus globulus*, *Hypericum perforatum*, *Fucus vesiculosus*, *Gentiana lutea*, *Lavandula angustifolia*, *Citrus limon*, *Melilotus officinalis*, *Melissa officinalis*, *Punica granatum*,  
*Mentha piperita*, *Vaccinium myrtillus*, *Orthosiphon stamineus*, *Urtica dioica*, *Olea europaea*, *Tabebuia impetiginosa*, *Plantago lanceolata*, *Hieracium pilosella*, *Pinus sibirica*, *Polypodium leucotoms*, *Citrus paradise*, *Quassia amara*, *Rheum thais*, *Rosa canina*, *Rosmarinus officinalis*, *Ruscus aculeatus*, *Salix alba*,  
 20 *Salvia officinalis*, *Camelia sinensis*, *Tilia tomentosa*, *Thymus vulgaris*, *Arctostaphylos uva-ursi*, *Valeriana officinalis*, *Solidago virgaurea*, *Loranthus europaeus* o *Zingiber officinale*,

y en donde la sustancia bioactiva se adsorbe sobre la hidroxiapatita sustituida.

2. La hidroxiapatita sustituida con carbonato según la reivindicación 1, en forma de agregado de partículas de hidroxiapatita sustituida con carbonato, en donde el agregado tiene un tamaño comprendido entre 0,5 y 5 µm.

25 3. La hidroxiapatita sustituida con carbonato según la reivindicación 1 o 2, en donde el extracto vegetal se presenta en forma de polvo o de solución alcohólica o hidroalcohólica o como aceite esencial.

4. Una composición que comprende la hidroxiapatita sustituida con carbonato según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en una cantidad de 5-70% con respecto al peso total de materia seca de la composición.

30 5. El uso de la hidroxiapatita sustituida con carbonato según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o de la composición según la reivindicación 4 para el tratamiento de plantas afectadas por amarilleamientos de la vid (causados por fitoplasmas de la vid), cancro bacteriano en kiwi (causado por *Pseudomonas syringae*), síndrome de declive (causado por *Xylella fastidiosa*) y enfermedad del cancro bacteriano de los cítricos (causada por *Xanthomonas axonopodis*).

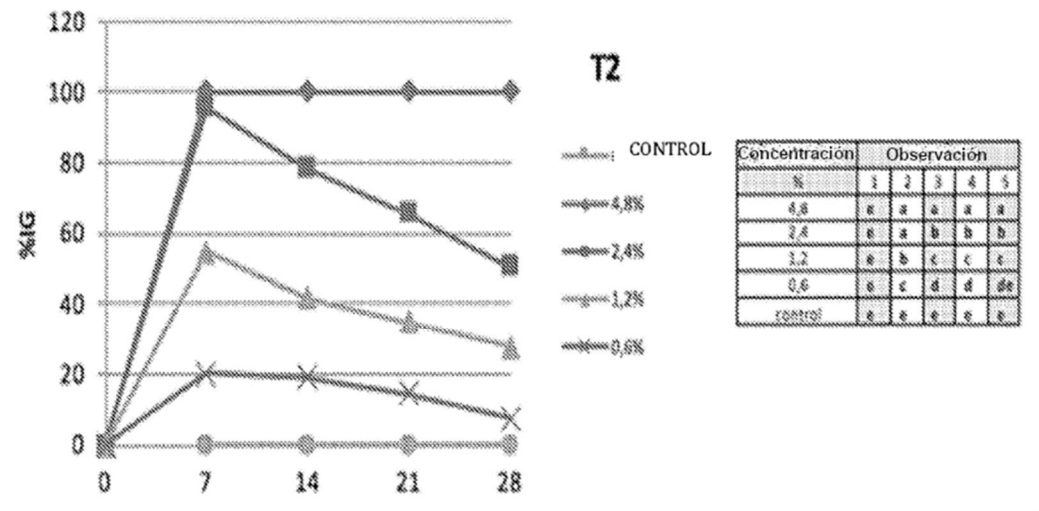
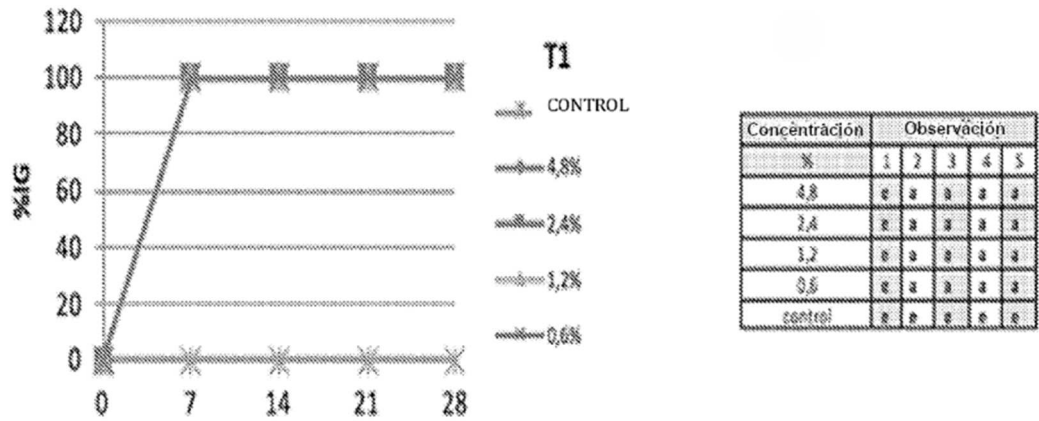


Fig. 1A

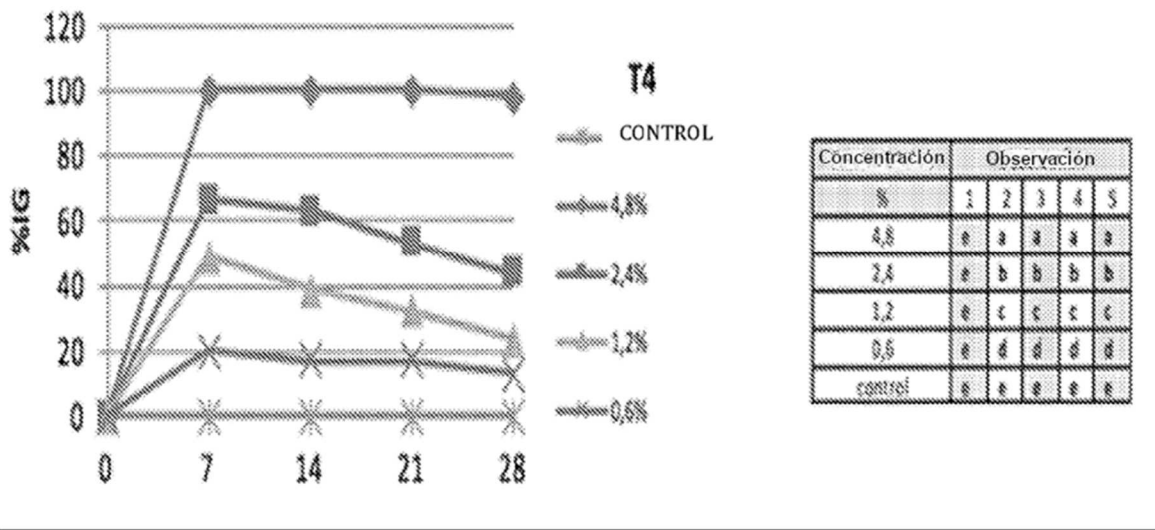
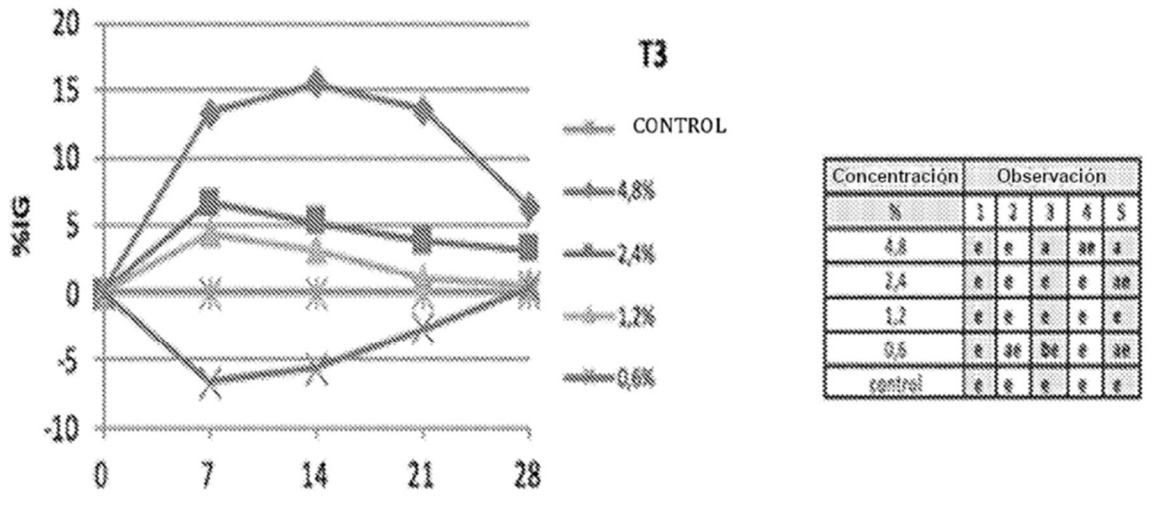


Fig. 1B

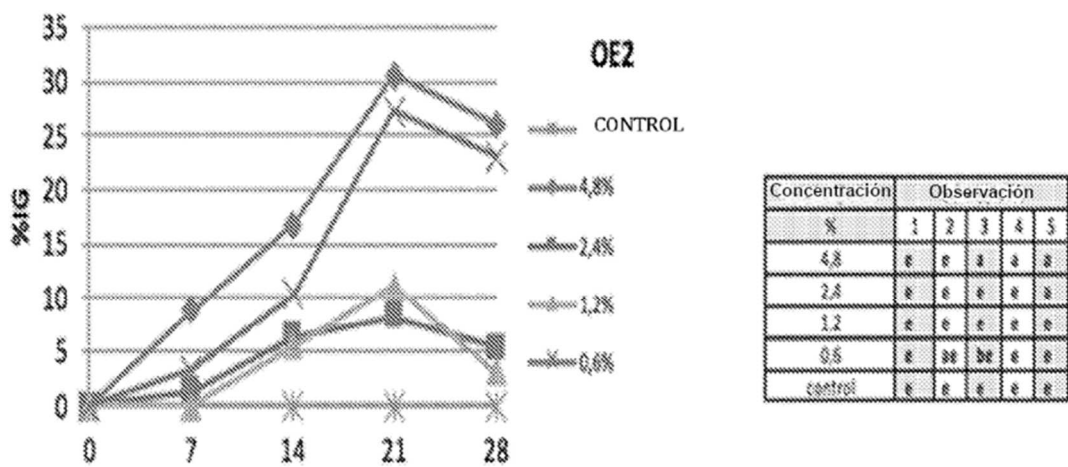
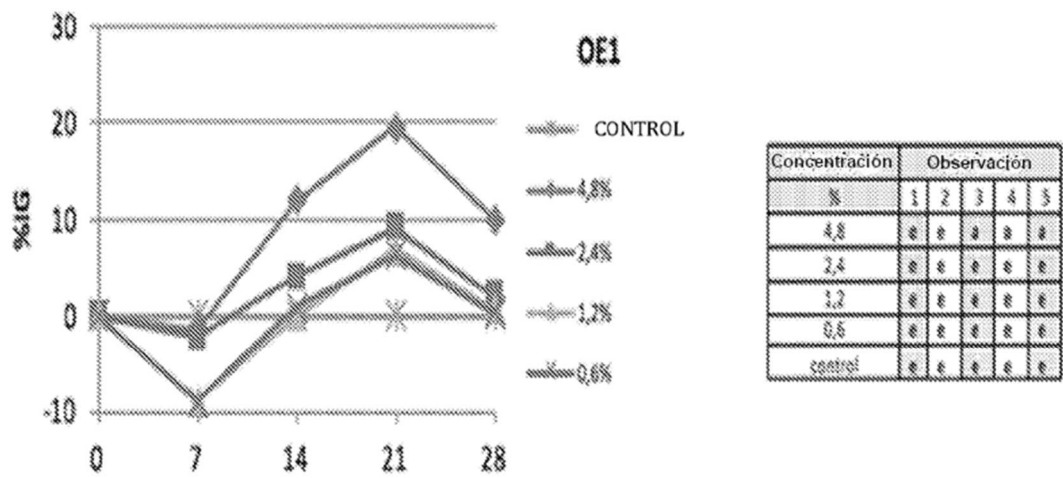
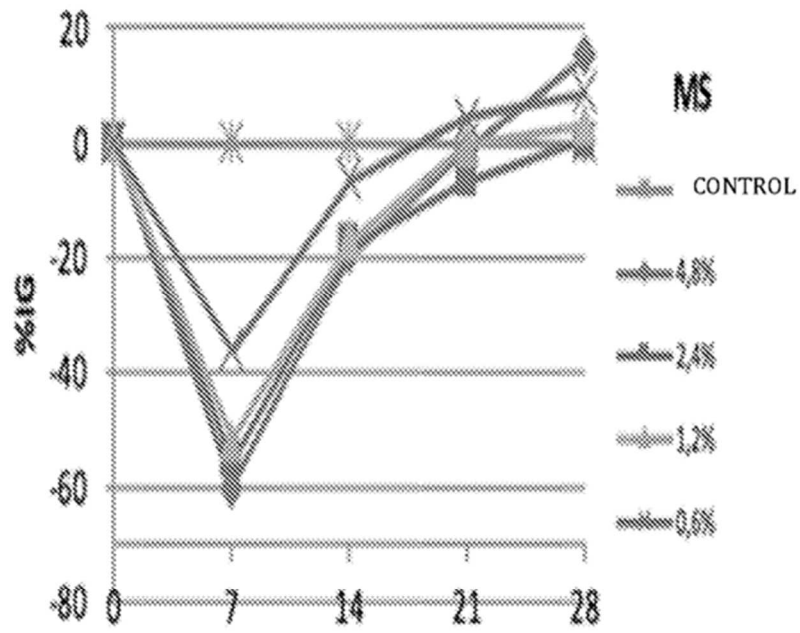


Fig. 1C



Concentración	Observación				
%	1	2	3	4	5
4.8	e	a	e	ae	ae
2.4	e	b	b	ae	ae
1.2	e	b	b	e	e
0.6	e	b	b	ae	ae
control	e	e	e	e	e

Fig. 1D

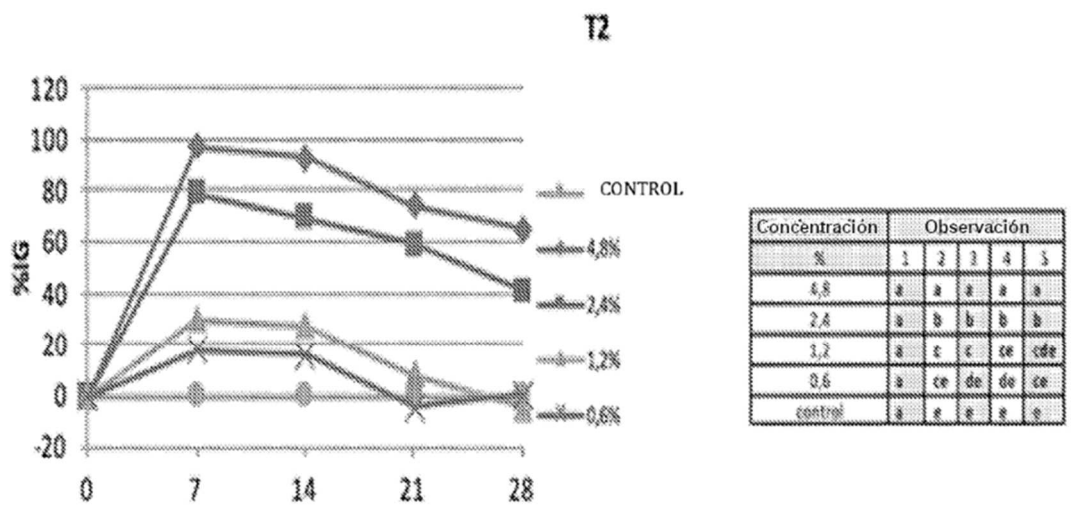
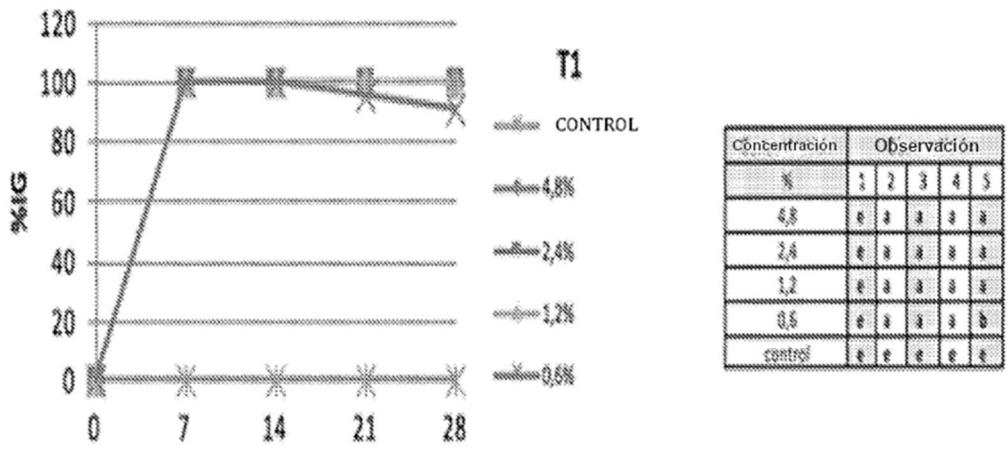
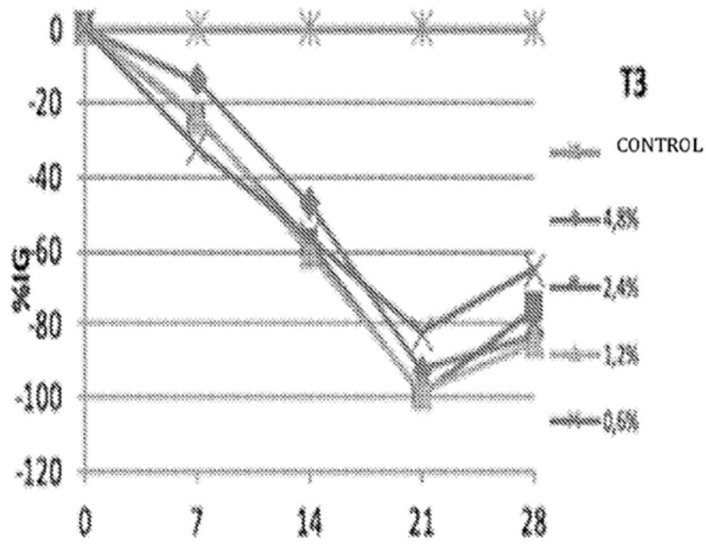
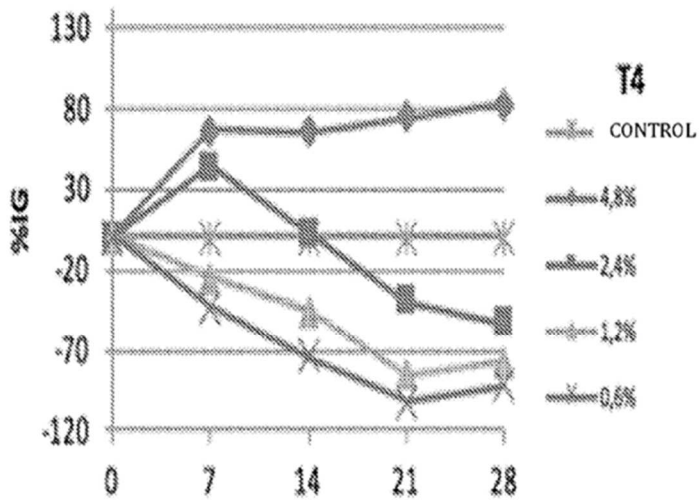


Fig. 2A



Concentración	Observación				
%	1	2	3	4	5
4.8	e	ae	a	ab	a
2.4	e	ab	ab	a	a
1.2	e	ab	b	a	a
0.6	e	b	ab	b	b
control	e	e	e	e	e



Concentración	Observación				
%	1	2	3	4	5
4.8	e	a	a	a	a
2.4	e	b	be	b	b
1.2	e	ce	c	c	c
0.6	e	be	d	d	c
control	e	e	e	e	e

Fig. 2B

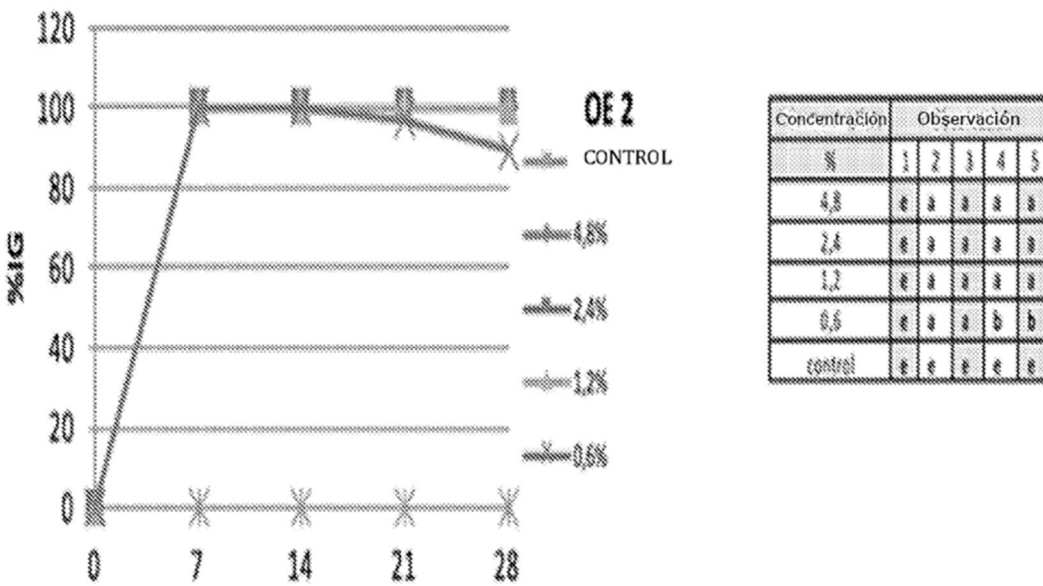
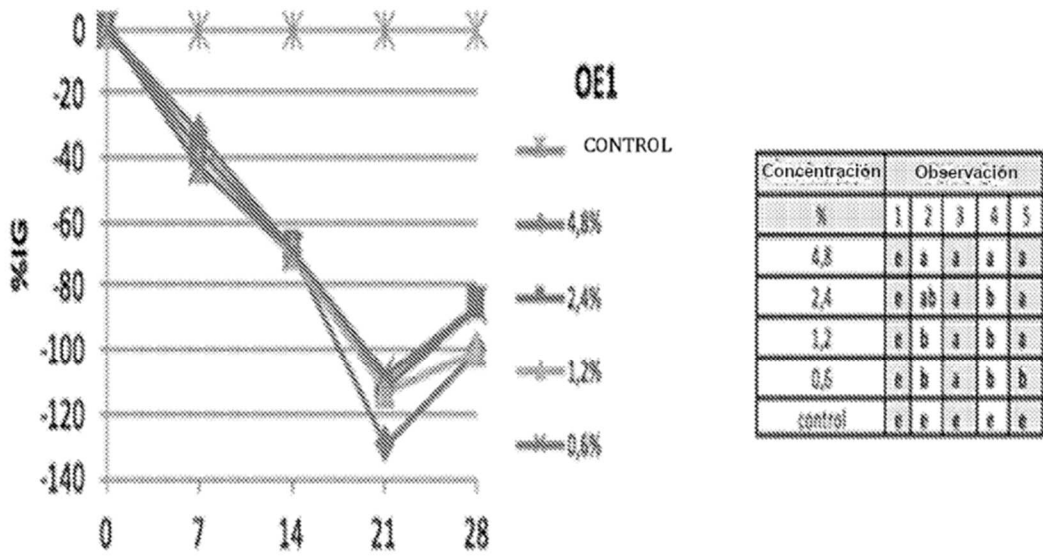
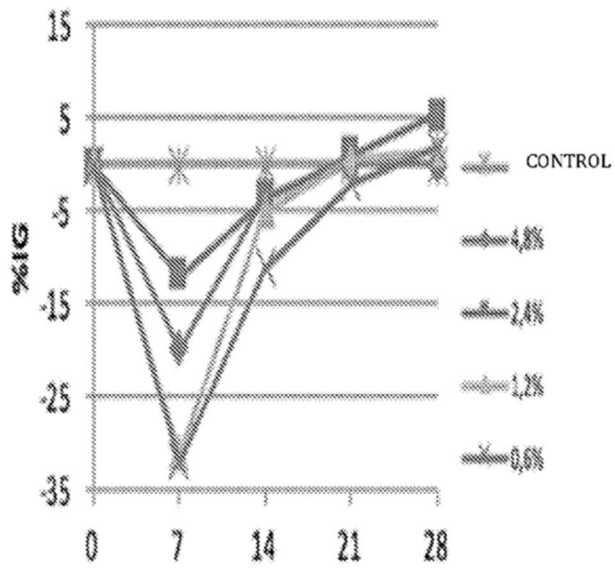


Fig. 2C



MS

Concentración	Observación				
%	1	2	3	4	5
4,8	e	a	e	e	a
2,4	e	b	e	e	e
1,2	e	c	e	e	e
0,6	e	c	a	e	e
control	e	e	e	e	e

Fig. 2D

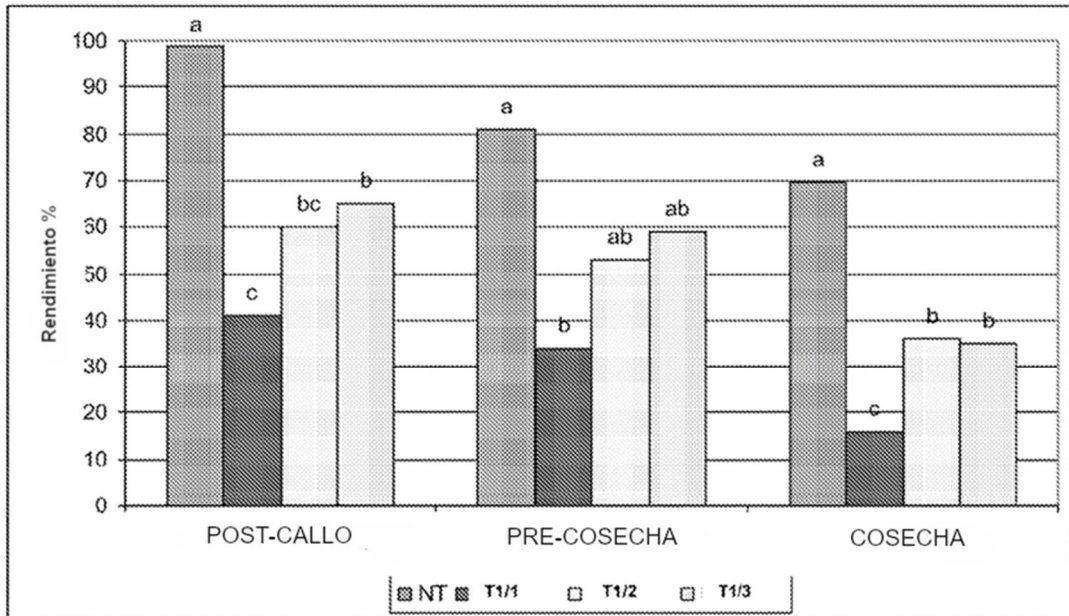


Fig. 3

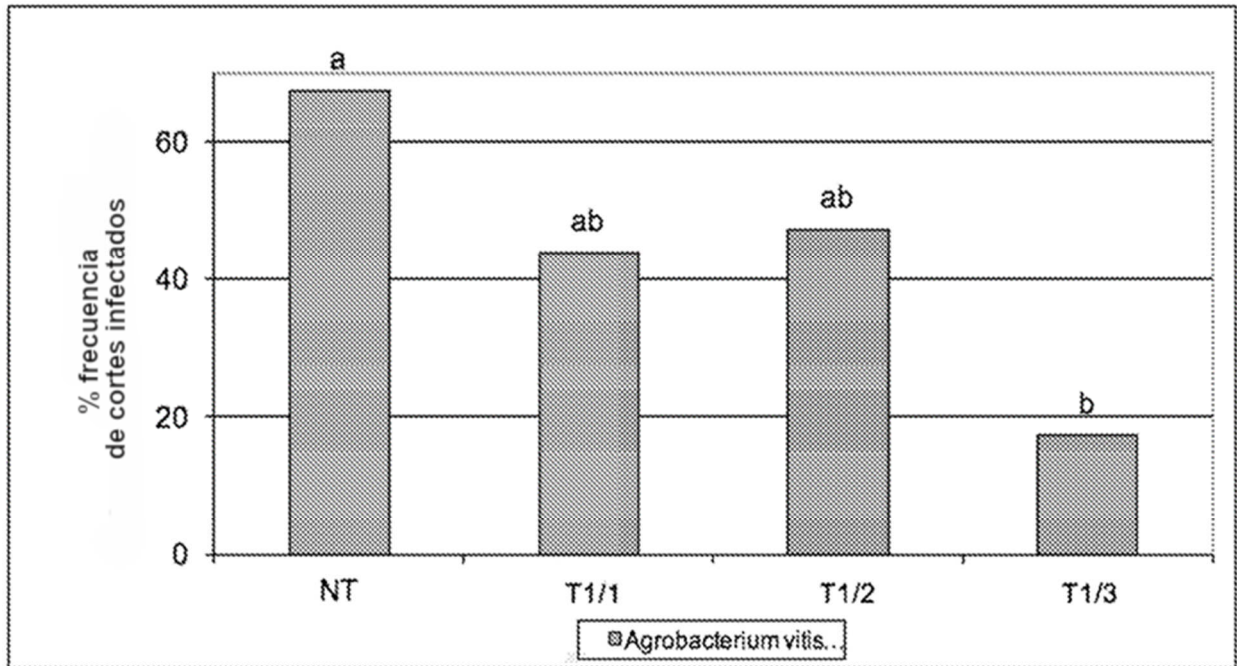


Fig. 4

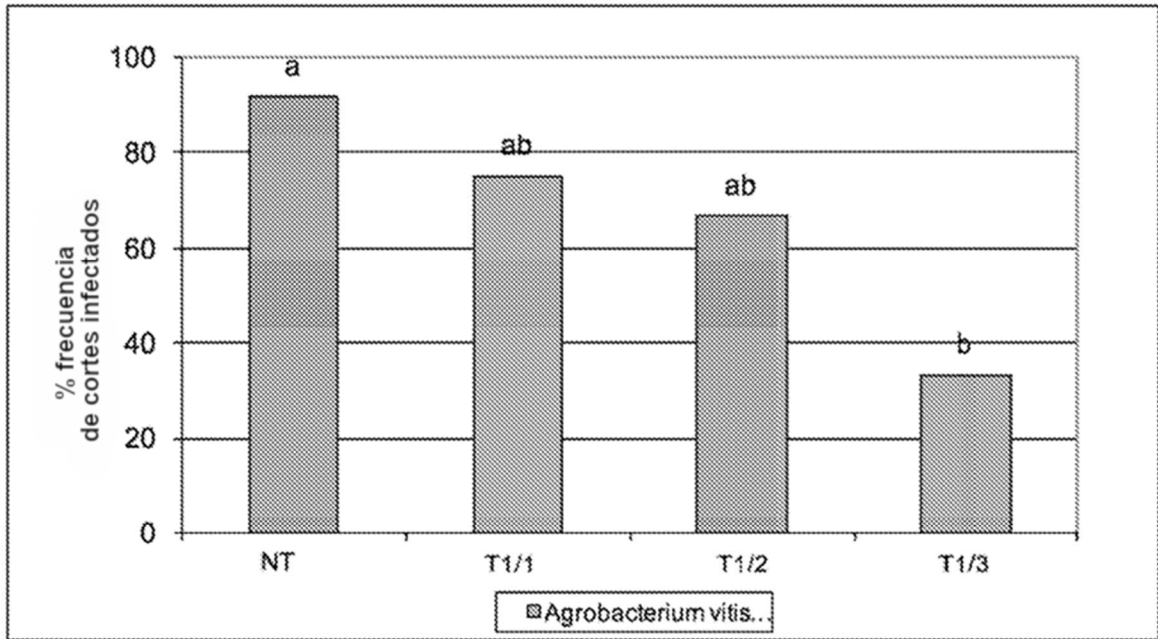


Fig. 5

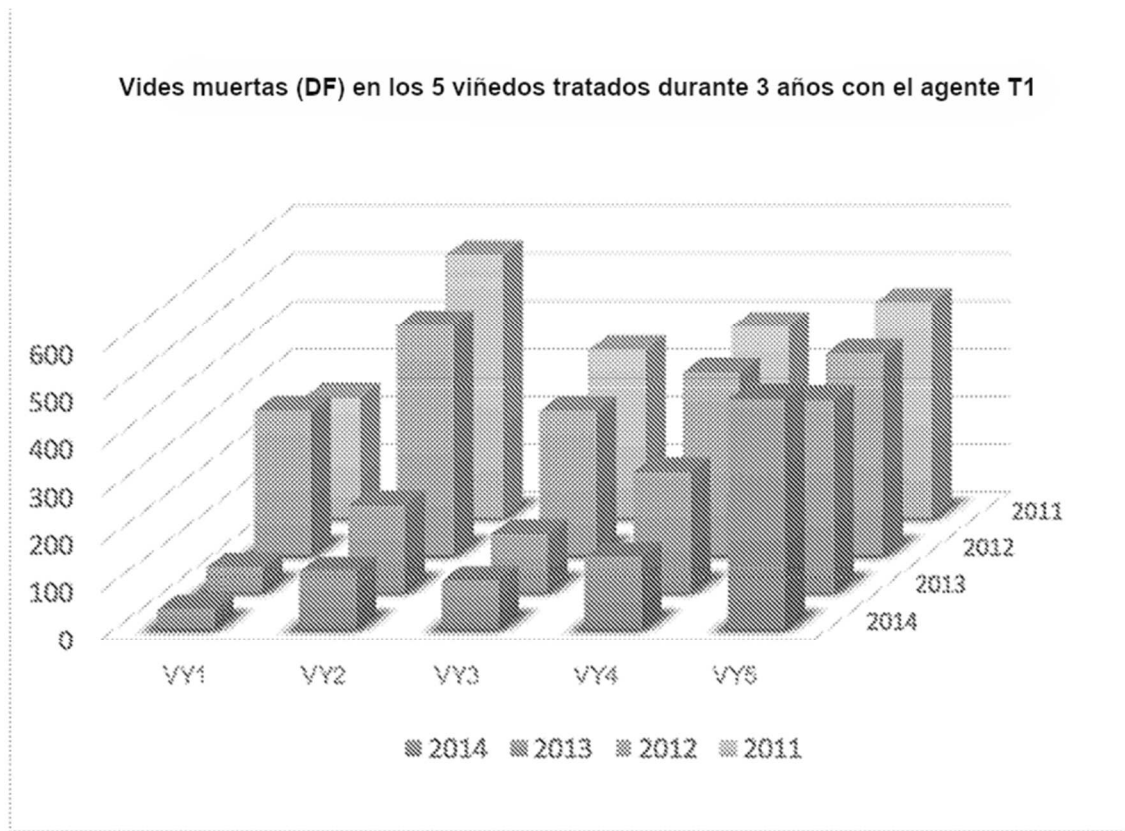


Fig. 6

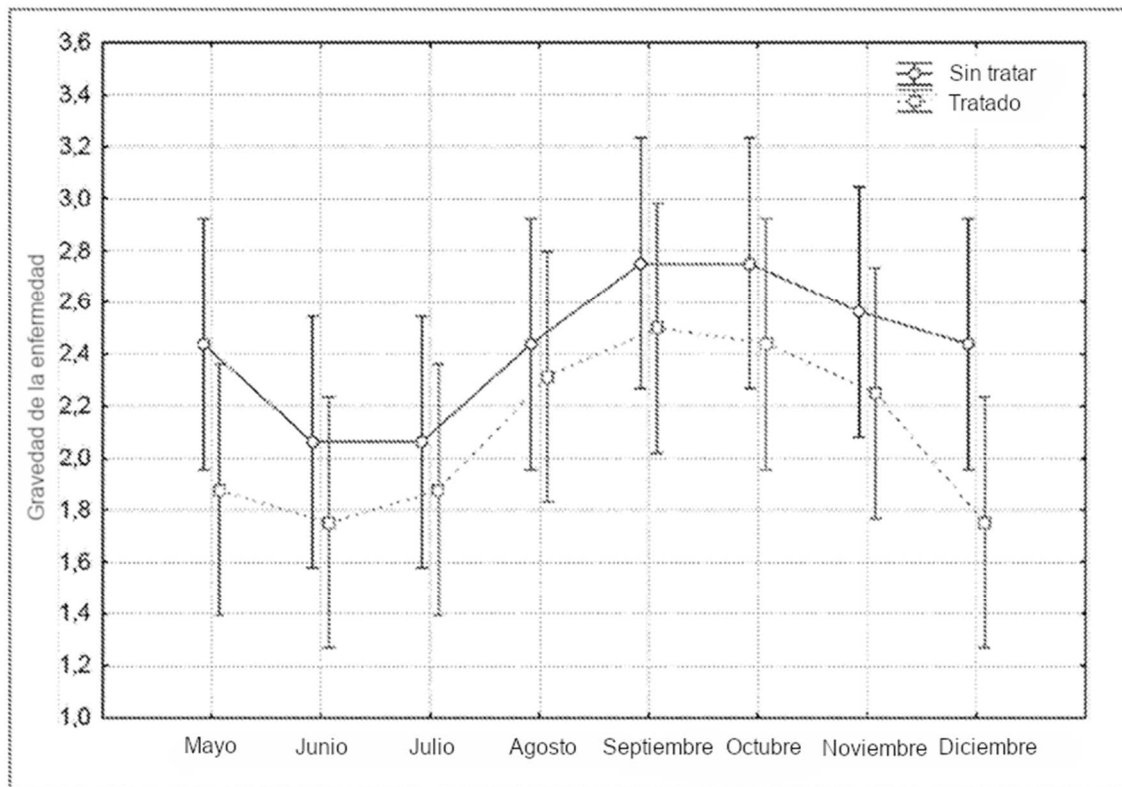


Fig. 7

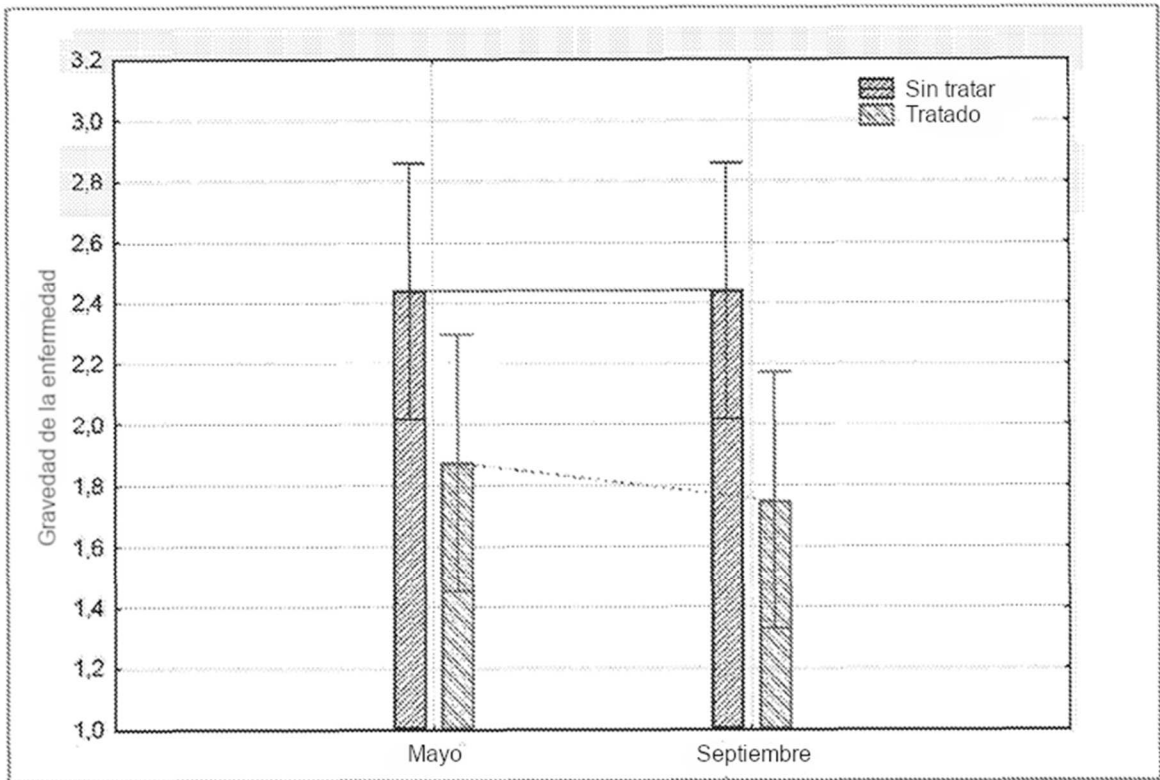


Fig. 8