

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 936 218**

21 Número de solicitud: 202130856

51 Int. Cl.:

**A01N 61/00** (2006.01)

**A01N 65/00** (2009.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

**15.09.2021**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**15.03.2023**

71 Solicitantes:

**BODEGA MATARROMERA, S.L. (100.0%)  
Ctra. San Bernardo s/n  
47359 Valbuena de Duero (Valladolid) ES**

72 Inventor/es:

**MORO GONZÁLEZ, Luis Carlos;  
VILLANUEVA SÁNCHEZ, Sonia;  
VENDRELL LAGUNA, Victor David;  
PINTO SOLANO, Julio Andrés;  
GONZÁLEZ HERRANZ, Raquel;  
GUTIÉRREZ CABANILLA, Juan Ignacio y  
GARCÍA BARRADO, Jose Antonio**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

54 Título: **Composición fungicida para la prevención y lucha contra las enfermedades de la madera de la vid**

57 Resumen:

La invención se refiere a una composición fungicida para la prevención y lucha contra las enfermedades de la madera de la vid, que contiene como componente activo un extracto de uva o de un subproducto del proceso de vinificación rico en polifenoles. La invención contempla también el uso de la composición para la eliminación o inhibición de hongos causantes de enfermedades de la madera de la vid y su método de aplicación.

**ES 2 936 218 A1**

## DESCRIPCIÓN

Composición fungicida para la prevención y lucha contra las enfermedades de la madera de la vid

5

### **CAMPO DE LA INVENCION**

La presente invención se engloba dentro del campo de la viticultura y más concretamente en el ámbito de la prevención y lucha contra las enfermedades de la madera de la vid (EMV).

10

### **OBJETO DE LA INVENCION**

La presente invención se centra en resolver una de las mayores problemáticas existentes en la actualidad en el viñedo: las enfermedades de la madera de la vid (EMV) que anualmente provocan grandes pérdidas en la producción y afectan negativamente a la calidad de los vinos.

15

Más específicamente la presente invención tiene como objetivo el desarrollo de un nuevo producto natural que permita solucionar los problemas de las EMV ocasionadas por hongos. Al tratarse de un producto natural se pretende obtener una uva y vino sin residuos de pesticidas y disminuir así el uso de materias activas de origen químico en el cultivo.

20

La invención se refiere específicamente a un compuesto fungicida que contiene como componente activo un extracto de uva o de un subproducto del proceso de vinificación.

25

También es objeto de la presente invención el desarrollo de una composición que comprenda el producto natural activo y que permita el control de las EMV mediante aplicación aérea y el procedimiento para el uso del mismo.

30

### **ESTADO DE LA TÉCNICA CONOCIDO**

Las enfermedades de la madera se encuentran entre los problemas fitosanitarios más perjudiciales que afectan al cultivo de la vid, tanto en planta joven como adulta. Diversos factores como la intensificación del cultivo, el uso de material vegetal de propagación de baja calidad sanitaria, la prohibición en el uso del arsenito sódico, la realización de podas

35

cada vez menos esmeradas, y la escasa protección de las heridas de poda, entre otros, han contribuido a un aumento considerable de la incidencia de las enfermedades de la madera de la vid en todo el mundo en las últimas dos décadas. Actualmente se estima que afectan a un 10 a 15% del viñedo.

5

Concretamente en España, las enfermedades más importantes detectadas en la actualidad (“enfermedades de la madera de la vid”, C. Agustí-Brisach et al., 2017) son:

En nuevas plantaciones:

10

- **La enfermedad de Petri:** La enfermedad de Petri es característica de vides jóvenes, apareciendo sus síntomas pocos años después de la plantación. Los síntomas asociados a esta enfermedad consisten en un retraso del desarrollo y escasa vitalidad de las plantas mostrando brotación reducida o retrasada, brotes con entrenudos cortos, hojas de menor tamaño y cloróticas y, finalmente, la muerte de las plantas (García-Jiménez et al., 2010).

15

La enfermedad afecta a la parte basal del patrón, colonizando los tejidos xilemáticos, de modo que al realizar cortes transversales y longitudinales de la madera se observan pequeñas punteaduras o estrías necróticas, respectivamente, correspondientes a los vasos afectados por la enfermedad, observándose en ocasiones exudaciones gomosas. La obstrucción de los vasos xilemáticos provoca una insuficiencia hídrica y la escasez de suministro de nutrientes a las partes vegetativas de la planta provocando el decaimiento general de la planta (García-Jiménez et al., 2010).

20

Los agentes causales son *Phaeoacremonium spp.*, *Phaeomoniella chlamydospora* y *Ca. luteo-olivacea* (Gramaje y Armengol, 2011). Además, estos hongos están asociados a la yesca en planta adulta, ya que actuarían previamente en la degradación de la madera, favoreciendo la colonización posterior de ésta por *F. mediterranea* y *S. hirsutum* (García-Jiménez et al., 2010).

25

Los hongos causantes de la enfermedad de Petri se consideran hongos de suelo pudiendo infectar a las plantas a través de las heridas provocadas en el sistema radicular o en la parte basal del patrón en contacto con el suelo. Estos hongos pueden sobrevivir en los viñedos en hospedantes alternativos como las malas hierbas (Agustí-Brisach et al., 2011). Además, también pueden infectar de forma aérea a través de la infección de las heridas de poda (Agustí-Brisach et al., 2015).

30

35

- **La enfermedad del pie negro:** Esta enfermedad se caracteriza por afectar al sistema radical y a la base del patrón de plantas jóvenes, provocando lesiones necróticas que resultan en una reducción de la masa radicular.

5 En la madera del portainjerto puede observarse una necrosis generalizada que se inicia desde la base del mismo y se extiende hacia arriba. En cortes transversales, estas lesiones necróticas pueden ir desde la médula hasta la corteza. Como consecuencia, las plantas infectadas presentan una reducción del desarrollo y menor vigor, ausencia o retraso de la brotación, acortamiento de entrenudos, clorosis en hojas y/o marchitez, y un decaimiento general que puede acabar con la  
10 muerte de la planta.

Los agentes causales de esta enfermedad pertenecen a los géneros *Campylocarpon*, *Cylindrocarpon*, *Cylindrocladiella*, *Dactylonectria* e *Ilyonectria*. Estos hongos infectan las plantas a través de heridas en las raíces o en la parte basal del patrón que está en contacto con el suelo (Agustí-Brisach y Armengol,  
15 2013).

Cabe destacar, que estos patógenos son frecuentes en vivero donde pueden aislarse de las raíces y de la base del patrón tanto de plantas madre, como de planta injertada, por lo que el material de propagación de vid podría estar ya infectado al establecer una nueva plantación (Agustí-Brisach et al., 2013b).

20 Algunos de estos hongos producen estructuras de resistencia (clamidosporas) que les permiten sobrevivir durante largo tiempo en ausencia de su hospedante, siendo el suelo una importante fuente de inóculo (Agustí-Brisach et al., 2014). Las malas hierbas también son hospedantes alternativos de estos patógenos que les permitirán sobrevivir en los viñedos durante largos periodos de tiempo (Agustí-Brisach et al., 2011)  
25

En viñedos productivos:

- **El decaimiento por *Botryosphaeria*:** El síntoma típico de esta enfermedad es la necrosis sectorial de la madera de los brazos o del tronco principal de las plantas, observándose el decaimiento progresivo de brazos o la muerte de plantas (Úrbez-Torres, 2011).

Esta enfermedad está causada por un gran número de especies fúngicas de la familia *Botryosphaeriaceae*, siendo las más frecuentes en España *Diplodia seriata*  
35 y *Neofusicoccum parvum* (García-Jiménez et al., 2010). Estos hongos se caracterizan por producir picnidios en la madera afectada cuando las condiciones

de humedad y temperatura son adecuadas para su desarrollo. Las esporas (picnidiosporas) son dispersadas por el viento y por el impacto de las gotas de agua durante las lluvias.

Estos hongos también tienen una fase de reproducción sexual en invierno durante la cual forman peritecios en los restos de madera muerta (en vides afectadas o restos de poda) en los que se forman ascas y ascosporas que también pueden servir de fuente de inóculo para infecciones tempranas, al inicio del ciclo productivo de la planta.

La infección de estos hongos se produce principalmente cuando las esporas se depositan sobre las heridas de poda, y germinan penetrando en el interior de los tejidos vegetales (García-Jiménez et al., 2010; Agustí-Brisach et al., 2015)..

- **La eutipiosis:** Los síntomas típicos son presencia de brotes raquíticos con entrenudos cortos y pequeños en las plantas afectadas, y hojas con clorosis y/o necrosis marginal e internervial con tejido muerto. En el tronco y brazos se observa una necrosis sectorial de color marrón oscuro, en forma de cuña, que provoca la muerte de brazos, y progresivamente la muerte total de la planta. En España, esta enfermedad está causada principalmente por el hongo ascomiceto *Eutypa lata* y, en menor medida, por otras especies pertenecientes a la familia *Diatrypaceae*, de las cuales se han referenciado hasta cuatro de ellas en madera afectada por esta enfermedad: *Anthostoma decipiens*, *Cryptovalsa ampelina*, *Eutypella citricola* y *Eutypella microtheca* (Luque et al., 2012).

*Eutypa lata* produce estromas en la madera afectada formando peritecios (estructuras de reproducción sexual). Las ascosporas se liberan a lo largo del año diseminándose por el viento, y los conidios se diseminan principalmente por el impacto de las gotas de lluvia, penetrando en la planta a través de las heridas de poda realizadas durante el invierno o inicios de primavera, infectando y colonizando la madera (Bertsch et al., 2013).

- **La yesca:** es la enfermedad más conocida. Las hojas de las plantas afectadas adquieren un color verde claro volviéndose cloróticas progresivamente, desarrollándose puntos irregulares entre las venas o en los márgenes de las hojas, que se extienden hacia el exterior de las partes distales de los brotes evolucionando posteriormente a necrosis. El síntoma más común es una podredumbre seca de la madera, característicamente blanda, interna, y de color crema o amarillento. La podredumbre comienza normalmente a partir de una herida de poda y aparece

separada por una línea negra de otra zona más exterior, de consistencia dura, en la que se pueden apreciar puntos o estrías necróticas.

Esta enfermedad está causada por los hongos basidiomicetos *Fomitiporia mediterranea* y, con mucha menor frecuencia, *Stereum hirsutum*. De la línea negra y puntos y estrías necróticas se aíslan mayoritariamente ascomicetos asociados a la enfermedad de Petri, como son *Phaeoacremonium spp.*, *Phaeomoniella chlamydospora* y *Cadophora luteo-olivacea*. Cualquier tipo de herida en la planta favorece la infección de estos hongos (Mugnai et al., 1999; García-Jiménez et al., 2010).

5  
10

La lucha contra las enfermedades de la madera es un problema de gran importancia. Actualmente, no existen estrategias de manejo que permitan un control óptimo de las enfermedades de la madera de la vid. Desde la prohibición del uso del arsenito sódico, y la sustitución de esta materia activa por fungicidas menos efectivos, se ha venido observando un aumento progresivo de las enfermedades de la madera de la vid en todo el mundo. Debido a la poca eficacia de los tratamientos fungicidas, la mayoría de estudios realizados en los últimos años para el control de estas enfermedades han sido enfocados desde el punto de vista de la prevención y del uso de adecuadas prácticas culturales.

15

20 La prevención de las enfermedades de la madera de la vid tiene que llevarse a cabo desde el momento en el que se adquiere el material vegetal para establecer una nueva plantación.

El uso de agentes de biocontrol, como *Pythium oligandrum* y *Trichoderma atroviride*, ha resultado efectivo para reducir la infección de estos hongos en vivero. Son conocidos en el Estado de la técnica productos como VINTEC® que emplea *Trichoderma Atro SC* (que compiten con los hongos EMV) o BLINDAR® que emplea *Trichoderma asperellum* y *gamsii*

25

Recientemente, cepas bacterianas aisladas de la madera de la vid y del hollejo de la uva han resultado ser antagonistas de las especies *N. parvum* y *P. chlamydospora* (Gramaje, 2017).

30

Una vez establecida la plantación, se recomienda realizar un manejo adecuado del cultivo, particularmente en lo relativo a la poda, y el uso de las buenas prácticas culturales. Evitar las situaciones de estrés hídrico sin dar riegos excesivos y realizar una fertilización adecuada sin forzar la producción serán prácticas esenciales que deberán llevarse a cabo durante los primeros años de la plantación.

35

La protección de las heridas de poda mediante el pintado con soluciones fungicidas evitará en gran medida la infección de las plantas por parte de los hongos de dispersión aérea. Los restos de poda son una importante fuente de inóculo de estos patógenos, por lo que se recomienda su destrucción tras la poda retirando del campo todos los restos de material vegetal podado (Agustí-Brisach et al., 2013).

Actualmente, en el mercado existen algunos productos fungicidas empleados para prevenir las enfermedades de la madera con efecto de inhibición parcial. Todos ellos se aplican (con brocha o pistola) sobre los cortes de poda, protegiendo de la infección causada por la germinación de esporas o el desarrollo de micelio de los hongos que atacan la madera expuesta. Entre los productos existentes en el mercado, podemos señalar los siguientes:

<b>Producto comercial</b>	<b>Principal(es) Ingrediente(s) activo(s)</b>
Podexal®	Piraclostrobina
PODASTIK®	Tebuconazol y clorotalonilo
Tessor®	F500®(Piraclostrobina); Boscalina Polímero acrílico
Bloccade®	Polímeros y arcillas sin fungicidas
Polyram®	Metiram (Ditiocarbamato)

A diferencia de los productos químicos empleados actualmente, la presente invención tiene como objetivo el desarrollo de un nuevo producto natural que permita solucionar los problemas de las EMV ocasionadas por hongos. Al tratarse de un producto natural se pretende obtener una uva y vino sin residuos de fungicidas químicos y disminuir así el uso de materias activas de origen químico en el cultivo.

La tendencia reciente es el uso de productos naturales para controlar a dichos hongos, lo cual requiere la exploración de fuentes alternativas de principios activos naturales, seguros, eficaces y aceptables. Las plantas o sus extractos estandarizados altamente concentrados pueden proporcionar oportunidades ilimitadas para el control del crecimiento microbiano, debido a su diversidad química.

Es conocido que algunos extractos de plantas poseen actividad antifúngica, y en concreto los extractos naturales ricos en polifenoles. Si bien existen ciertos indicios en el estado del arte de que los compuestos polifenólicos pueden presentar propiedades antifúngicas, no es conocido actualmente la efectividad de los polifenoles en la lucha contra las

enfermedades de la madera (EMV) ni tampoco cuál es la composición óptima a tales efectos.

5 Los polifenoles son compuestos químicos o sustancias que se encuentran en una gran cantidad de alimentos derivados de plantas. El término abarca una amplia variedad de moléculas con una estructura común, caracterizada por tener varios grupos hidroxilo unidos a anillos aromáticos. Sin embargo, los polifenoles también incluyen moléculas con un anillo de fenol, como en el caso de los ácidos fenólicos o los alcoholes fenólicos.

10 Los polifenoles se clasifican en función del número de anillos de fenol que contienen, así como de los elementos estructurales que unen estos anillos. Como tal, los principales grupos de polifenoles son:

15 *Flavonoides*: los cuales presentan un esqueleto de carbono de difenilpropano y dos anillos de benceno unidos juntos por una cadena lineal de 3 átomos de carbono. Hasta la fecha, se han identificado más de 6.000 flavonoides en las plantas, y la lista continúa creciendo. Los flavonoides se pueden dividir en 6 subclases, en función del estado de oxidación del anillo de pirano central. Los flavonoides se pueden dividir en Flavonoles, Flavonas, Flavanonas, Isoflavonas, Antocianinas y Flavanoles.

- 20
- *Flavonoles*: que tienen un doble enlace entre los carbonos 2 y 3, con un grupo hidroxilo en C3. Son los flavonoides más ubicuos en los alimentos, y la quercetina es la más representativa.
  - *Flavonas*: Presentan un doble enlace entre los carbonos 2 y 3, y son los flavonoides menos comunes. Se encuentran en el perejil y en el apio.

25

  - *Flavanonas*: Se caracterizan por tener una cadena saturada de 3 átomos de carbono y un átomo de oxígeno en el carbono 4. Se encuentran solo en altas concentraciones en los cítricos, aunque también están presentes en los tomates y en algunas plantas aromáticas como la menta.
  - *Isoflavonas*: que son estructuralmente similares a los estrógenos, y en los pies se pueden unir a sus receptores, por lo que también se conocen como fitoestrógenos. La soja y sus derivados son las principales fuentes de isoflavonas.

30

  - *Antocianinas*: que son los pigmentos responsables de la coloración roja, azul y púrpura de frutas, flores y otros tejidos y productos vegetales
  - *Flavanoles*: que tienen una cadena saturada de 3 carbonos, con un grupo hidroxilo

35

  - en C3. Existen tanto como monómeros como polímeros, conocidos como catequinas y proantocianidinas, respectivamente.

Los principales flavonoides en la fruta son la catequina y la epicatequina, mientras que la galocatequina, la epi-galocatequina y el galato de epigalocatequina se encuentran esencialmente en el té. Las catequinas se encuentran en frutas como los albaricoques y las cerezas y en otros productos como el té, el chocolate y el vino blanco.

*Ácidos fenólicos:* que se dividen en dos grupos, los derivados del ácido benzoico y los derivados del ácido cinámico.

- *Ácidos hidrobenczoicos:* que se encuentran en muy pocas plantas consumidas por humanos, y por lo tanto no se consideran de particular interés para la nutrición. Entre ellos, destacan el ácido gálico o ácido elágico.
- *Ácidos hidroxicinámicos:* que están representados principalmente por ácido cumárico, ácido cafeico y ácido ferúlico.

15

*Alcoholes fenólicos:* tirosol e hidroxitirosol son los principales tipos. Se encuentran principalmente en el aceite de oliva. El tirosol también se encuentra en el vino, tanto blanco como tinto, y en la cerveza; el hidroxitirosol, por otro lado se encuentra en el vino tinto.

*Estilbenos:* el principal estilbeno presente en la dieta de los humanos es el resveratrol, aunque la cantidad de estos compuestos ingeridos en la dieta es pequeña. Los estilbenos son producidos por las plantas como respuesta a patógenos o a ciertas condiciones de estrés. Se han detectado en más de 70 especies de plantas, como uvas, bayas y cacahuetes.

*Lignanós:* los lignanos se producen por la dimerización oxidativa de dos unidades de fenilpropano. La principal fuente de estos compuestos es la semilla de lino.

Una fuente importante de polifenoles para su empleo industrial (Ej: como suplemento alimenticio, o en cosmética) es el orujo de uva. El orujo de uva es un subproducto de la bodega compuesto básicamente por semillas de uva, piel y tallos. Es rico en fibra dietética y polifenoles, incluidas las antocianinas (en tinto), flavan-3-oles, flavonoles, ácidos fenólicos y estilbenos, que proporcionan una amplia variedad de posibles actividades biológicas.

El producto fungicida objeto de la presente invención es una composición cuyo componente activo es un extracto natural obtenido a partir de uva o de un orujo de uva sometido a un procedimiento de extracción según se describe en la patente ES2319032.

## **DESARROLLO DE LA FASE EXPERIMENTAL**

### 5 **1. CARACTERIZACIÓN DE LAS ENFERMEDADES DE MADERA**

#### **Resumen de las actuaciones realizadas.**

10 En primer lugar la presente investigación se centró en analizar un total de 12 muestras de madera de vid para la detección de hongos causantes de Enfermedades de la Madera de la Vid (EMV). Las muestras fueron tomadas en campo en diferentes viñedos.

15 En plantas adultas se empleó una barrena que permite extraer una porción de madera de la zona central del tronco. En otros casos, se recogieron plantas enteras que no habían tenido desarrollo vegetativo en el año anterior. Las muestras fueron enviadas al laboratorio de análisis en condiciones de refrigeración. Todas las muestras provenían de plantas con síntomas de EMV, observadas en campo por un equipo técnico durante el ciclo vegetativo de 2019.

#### 20 **Material y métodos.**

Para alcanzar el objetivo se realizó un análisis de tipo microbiológico. Este análisis consiste en un aislamiento de hongos a partir de madera, en medio de cultivo y su posterior identificación como especies causantes de las EMV.

25

1. Valoración de síntomas. En primer lugar, se evaluaron y anotaron los síntomas internos observados en la madera en el momento de la recepción. Para ello se estableció la siguiente valoración:

- 30
- N: tejido necrosado de coloración marrón oscura o negruzca, con consistencia dura y quebradiza.
  - S: tejido aparentemente sano de coloración y textura normal.
  - E: madera blanca o amarillenta de consistencia blanda y esponjosa.
  - P: tejido con punteaduras de coloración negra dispuestas alrededor de la médula,
- 35 características de la Enfermedad de Petri.

- SC: Madera seca, en la cual no es posible valorar síntomas propios y específicos de EMV.

5 2. Análisis microbiológico. Se realizó un aislamiento de especies fúngicas causantes de EMV. Para ello se ha seguido la metodología descrita en Martín y Martín (2013). La metodología consiste en el cultivo en medio extracto de malta –MEA- (Laboratorios Conda S.A., Madrid) suplementado con cloranfenicol (0,25 mg/mL) de 12 fragmentos de madera (3 x 3 x 3 mm) por muestra. La madera fue previamente desinfectada superficialmente por inmersión y sucesivos lavados en NaClO comercial (30%) diluido en agua destilada estéril 10 1:1 durante 3 minutos, seguido de tres lavados sucesivos en agua estéril de 5 minutos. Todo este proceso se realizó en una cabina de flujo laminar, bajo condiciones asépticas. Las placas se incubaron a 25°C en oscuridad durante 10-20 días. Transcurrido ese tiempo, las colonias fúngicas crecidas a partir de la madera fueron transferidas a placas individuales de medio MEA o PDA (dextrosa-patata-agar) (Merck, Darmstadt, Alemania) 15 suplementado con cloranfenicol.

Las colonias aisladas fueron identificadas por caracteres morfológicos macro y microscópicos, de acuerdo con diferentes trabajos descriptivos que se citan a continuación.

20 La tabla siguiente muestra los resultados obtenidos a partir de las 12 muestras analizadas:

Muestra	Síntomas en madera	Infección	Aislados fúngicos
B1	N: 20% / S: 80%	SÍ	Botryosphaeriaceae 42%; Otros 33%
B2	N: 70% / E: 30%	SÍ	Fomitiporia sp. 17%; Otros 58%
B3	N: 50% / S: 50%	SÍ	<i>Phaeoacremonium sp.</i> 12%
E1	N: 50% / N: 50%	SÍ	Botryosphaeriaceae 8%; Otros 17%
E2	N: 70% / N: 30%	SÍ	Fomitiporia sp. 17% P; <i>chlamydospora</i> 42%
E3	N: 50% / S: 50%	SÍ	Fomitiporia sp. 8% P; <i>chlamydospora</i> 50%
S1	E: 80% / N: 20%	SÍ	<i>Phaeoacremonium sp.</i> 58%
S2	N: 70% / N: 30%	SÍ	<i>Phaeoacremonium sp.</i> 67%; Otros 33%
S3	N: 80% / S: 20%	SÍ	<i>Phaeoacremonium sp.</i> 42%; <i>chlamydospora</i> 25%

C1	SC: 100%	SÍ	Botryosphaeriaceae 67%
C2	SC / P: 100%	NO	Otros 17%
C3	SC: 100%	NO	Otros 17%

Los síntomas internos observados en la madera de las muestras recibidas se corresponden con EMV. De especial relevancia fue la presencia de secciones madera necrosada, con coloración negra y textura quebradiza (N), en la mayoría de las muestras de las parcelas denominadas Badén, Espadaña y Solanas. Se observó además en algunas muestras la presencia de madera esponjosa (E) correspondiente al máximo nivel de degradación de la madera asociado con la enfermedad de yesca.

En todas las muestras se han aislado hongos causantes de las EMV, como son: la especie *Phaeomoniella chlamydospora*, el género *Phaeoacremonium sp.*, especies de la familia *Botryosphaeriaceae* y basidiomicetos del tipo *Fomitiporia sp.* Estos resultados confirman la infección por hongos causantes de EMV.

3. Identificación molecular. Se aislaron unas 27 cepas de hongos y se determinó la especie con microscopía óptica. Se amplificaron las regiones ITS,  $\beta$ -tubulina y factor de elongación. Para la extracción de ADN fúngico se liofilizó el micelio directamente de la placa de Petri y se deshidrató por liofilización. Se trituró el micelio con arena de mar en mortero estéril de porcelana y se utilizaron unos 100 mg del triturado para la extracción del ADN utilizando el kit NuKex Pure RNA/DNA de Gerbion®, siguiendo las instrucciones del fabricante.

La amplificación se realizó utilizando la Taq polimerasa Master Mix de Promega Go Taq®, con una concentración final de ambos primers de 0,5 $\mu$ M. Para comprobar la pureza de la zona amplificada, las muestras se corrieron en gel de agarosa a 1,5%.

Las muestras PCR se trataron con ExoSap de (Thermo Fisher) previo a su secuenciación, que se realizó en un laboratorio externo. Una vez recibidas las secuencias se utilizó el Algoritmo BLAST, para comprobar homologías de ADN y determinar su identidad.

Una vez identificados los hongos mediante esta técnica, se seleccionaron 8 de las cepas con buena identificación para determinar la capacidad de los extractos a ensayar para inhibir su crecimiento. Se resumen en la siguiente tabla las cepas de hongos sobre los que se han realizados los ensayos para medir la capacidad antifúngica de los diferentes extractos:

Tabla: Hongos identificados.

PRIMERS	SECUENCIAS (5´-3´)
BV-287	<i>Phaeomoniella chlamydospora</i>
PCH 32	<i>Phaeomoniella chlamydospora</i>
BV-050	<i>Phaeoacremonium minimum</i>
PM 77	<i>Phaeoacremonium minimum</i>
BV-057	<i>Eutypa lata</i>
CYL 28	<i>Ilyonectria liriodendri</i>
CYL 30	<i>Ilyonectria liriodendri</i>
BV-056	<i>Neofusicoccum parvum</i>

## 2. PREPARACIÓN DE EXTRACTOS Y VALIDACIÓN PRIMARIA IN VITRO

5

### Resumen de las actuaciones realizadas.

Se utilizaron los hongos aislados y secuenciados en la actividad anterior para determinar la actividad fungicida de tres extractos obtenidos a partir de residuos del proceso de vinificación: M1, M2, M3.

10

Los tres extractos (M1 - M3) se obtuvieron como ya se ha expuesto por el procedimiento de extracción descrito en la patente ES2319032 a partir de residuos del proceso de vinificación. Los extractos de orujo ensayados eran sólidos, ya que después de la extracción fueron sometidos a un secado en spray.

15

### Material y métodos.

#### 1. Obtención y caracterización de extractos.

20

Se incorporaron al ensayo tres extractos procedentes de orujo de uva tinta (M1-M3) diferentes de los lotes de Bodega Matarromera S.L.: M1 L-4324CECO, M2 L-52892 y M3 L-4333C. Cada uno de los lotes procedente de un depósito en el que se elaboraba uva de una parcela concreta y con un protocolo de vinificación específico.

25

Los tres extractos (M1 - M3) fueron obtenidos a partir de los hollejos de uva tinta variedad tempranillo después de sufrir un proceso de fermentación alcohólica.

5 Los extractos obtenidos se identifican como M1 lote L-4324CECO de uva tempranillo subvariedad Tinta de Toro, proveniente de uvas de viñedo ecológico de la D.O. Toro. Los extractos identificados como M2 lote L-52892 y M3 lote L-4333C de uva tempranillo, proveniente de uvas de viñedo convencional de la D.O. Ribera del Duero.

10 El objetivo a la hora de seleccionar dichos lotes fue obtener unos extractos con diferentes composiciones fenólicas para así poder realizar un estudio comparativo. Obviamente, al igual que ocurre con los vinos, las propiedades de cada extracto dependen fundamentalmente del tipo de uva, el tipo de suelo, las condiciones climáticas y el proceso de vinificación. Por tanto, aunque el procedimiento de extracción a partir de los residuos del proceso de vinificación es común, las características de cada extracto son claramente  
15 diferentes según se observa en la tabla resumen que se aporta más abajo.

Una vez realizada la extracción y el posterior secado en Spray, se procedió a la caracterización del perfil de Polifenoles, índice de Polifenoles totales (IPT) y Capacidad antioxidante. La Capacidad antioxidante viene expresada en  $\mu$ moles equivalentes de Trolox/g (Huang D et al, 2005). El índice de Polifenoles Totales se realiza en dilución en agua destilada 1:500 y absorbancia UV a 280 nm de longitud de onda, conforme Ribéreau-Gayon, P, 1974.  
20

*Tabla: Codificación de los extractos aportados al proyecto.*

CODIFICACIÓN	TIPO	LOTE
M1	UVA TINTA	L-4323 CECO
M2	UVA TINTA	L-52892
M3	UVA TINTA	L- 4333C

25

En la tabla siguiente se muestra la composición de los extractos en relación a su Índice Polifenólico Total (IPT) y su capacidad antioxidante expresada como ( $\mu$ mol eq. de Trolox/g)

A modo de resumen, en la siguiente tabla se muestra su composición:

30

MUESTRA	IPT			CAPACIDAD ANTIOXIDANTE ( $\mu\text{mol eq. De Trolox/g}$ )		
	DILUCIÓN	WL-280	VALOR IPT	MEDIA	ST	CV (%)
M1	1-500	0,677	33,875	504,16	23,37	4,64
M2	1-500	0,686	34,308	479,95	17,77	3,70
M3	1-500	0,649	32,465	520,71	14,40	2,77

Como puede observarse, el Índice Polifenólico Total (IPT) y su capacidad antioxidante expresada como ( $\mu\text{mol eq. de Trolox/g}$ ) fueron bastante similares para los tres extractos.

- 5 En la siguiente tabla, se especifican los detalles de la composición fenólica de los diferentes extractos ensayados:

Compuestos fenólicos	M1	M2	M3
	L4324 CECO	L52892	L-4333C
	Concentración del extracto mg/ g		
<b>Ácidos benzoicos y derivados</b>			
Ácido gálico	0.03 – 0.07	0.02 – 0.06	0.1 – 0.4
Galato de etilo	0.03 - 0.08	0.2 – 0.5	0.4 – 0.9
Ácido protocatético	0.1 – 0.5	0.3 – 0.6	0.1 – 0.4
Ácido vanílico	n.d.	trazas	trazas
Ácido siríngico	trazas	trazas	trazas
Ácido elágico	trazas	trazas	trazas
<b>Ácidos hidroxicinámicos y derivados</b>			
Ácido cafeíco	n.d.	n.d.	trazas
Ácido cumárico	n.d .	1.0 – 2.5	trazas
Ácido ferúlico	n.d .	n.d.	trazas
<b>Flavan-3-oles</b>			
(+)-Catequina	1.2 – 1.9	n.d.	1.1 – 1.6
(-)-Epicatequina	0.3 – 0.9	n.d.	0.8 – 1.3
Galato de epicatequina	trazas	n.d.	trazas
Procianidina C1	trazas	n.d.	trazas
Procianidina B3	trazas	n.d.	trazas
<b>Flavonoles</b>			
Quercitina	0.2 – 0.5	trazas	trazas
Mirecitina	0.6 – 0.9	n.d.	0.4 – 0.8
Kaempferol	1.0 – 2.0	1.1 – 1.7	0.6 – 1.2

Quercetina-3-0-glucósido	0.1 – 0.3	0.05 – 0.2	0.05 – 1.7
<b>Antocianinos</b>			
Delfinidina-3-0-glucósido	9.0 – 12.0	trazas	1.0 – 1.4
Cianidina-3-0-glucósido	1.0 – 2.6	0.0 – 0.02	0.07 – 0.21
Petunidina-3-0-glucósido	12.4 – 14.7	trazas	1.7 – 2.5
Peonidina-3-0-glucósido	7.2 – 8.8	trazas	0.6 – 1.3
Malvidina-3-0-glucósido	39.6 – 43.2	0.0 – 0.06	8.1 – 10.7
Malvidina-3-0-(6"-acetil)glucósido	2.0 – 3.1	n.d.	0.35 – 0.72
Petunidina-3-0-(6"-acetil)glucósido	0.41 – 0,73	n.d.	0.08 ± 0.25
Delfinidina-3-0-(6"-acetil)glucósido	trazas	n.d.	n.d.
Malvidina-3-0-(6"- <i>p</i> -coumaroil)glucósido	1.4 – 2.1	n.d.	0.21 – 0.52
Petunidina-3-0-(6"- <i>p</i> -coumaroil)glucósido	0.22 – 0.52	n.d.	0.12 – 0.42

## 2. Validación primaria in vitro.

5 Para la validación primaria se realizaron ensayos de inhibición de crecimiento de micelio (placas 12 pocillos): Los hongos se mantienen en placas Petri con medio PDA y el ensayo se realiza en placas de 12 pocillos con el mismo medio. Se hace un pase de cada especie a ensayar 2-3 días antes para utilizar hongos que estén recientemente cultivados

10 Las soluciones stock de muestras se prepararon en EtOH, a la concentración final a ensayar (del 2,5% al 10% p/v concentración final en pocillo). En el caso del control se utilizó EtOH en lugar de la muestra.

Ensayos:

- 15
- Se realizaron 10 repeticiones (pocillos) por cada concentración y 10 para el control.
  - El medio esterilizado (PDA) se mantiene caliente en un baño a 40° C para evitar que se solidifique, y se le añaden los volúmenes de muestra o etanol, justo en el momento previo a la distribución en placa.
  - Se distribuyó en volúmenes de 1ml/pocillo (placa 12 pocillos) previamente preparados
- 20 en los tubos de ensayo y dejar que solidifique.

- Posteriormente se realizaron las siembras del hongo en cada placa distribuidas uniformemente y se incubaron en oscuridad a una temperatura de 25° C o temperatura ambiente, dependiendo de la especie de hongo, durante 5-7 días. La siembra se realizó por sacabocados para las dos especies de hongos.
- 5
- Transcurrido el tiempo de incubación, se midió el diámetro del hongo.

El cálculo del porcentaje de inhibición de cada concentración se realiza con la siguiente fórmula, utilizando el valor medio de las colonias sembradas:

10

$$\%I = C - T/C \times 100$$

C: control; T: tratamiento.

Disolución del extracto: Se evaluó el extracto (concentraciones finales en placa desde 0 % p/v a 10 % p/v). Todos los extractos se filtraron con filtro de 0,25µm para asegurar la esterilidad de los mismos.

15

Preparación del medio de cultivo: Se colocó 1 mL de cada dilución del extracto y se añadieron 9 mL de Agar PDA a 45°C, homogeneizando el conjunto. Se dejó el agar solidificar a temperatura ambiente. A continuación, se removió para facilitar su homogeneización y en la cabina de flujo laminar se repartió el medio de cultivo con la esencia correspondiente en la concentración adecuada, sobre las placas de Petri.

20

Preparación del hongo: Partiendo de muestras del hongo crecido en medio PDA a 22°C en estufa, se procedió a realizar cortes circulares de 0,5 cm de diámetro con un sacabocados estéril y traspasar estos cortes con unas pinzas y en condiciones de esterilidad dentro de una campana de flujo laminar horizontal a placas de Petri donde habíamos depositado anteriormente el medio de cultivo con las distintas concentraciones del extracto. A continuación, los cultivos realizados se pasaron a una estufa de cultivo donde permanecieron en condiciones de oscuridad y 22°C de temperatura durante 5 días.

25

30

Observación y toma de datos: Se estableció un protocolo de observación y toma de datos durante 5 días, mientras los cultivos crecían en la estufa. La toma de datos consiste en medir el diámetro del halo de crecimiento del hongo en milímetros, en la placa control para así posteriormente referenciar y calcular el porcentaje de inhibición del extracto en estudio, en cada placa con respecto al control.

35

Cálculo del porcentaje de inhibición:

% de crecimiento = (Diámetro hongo con extracto x 100) / Diámetro control negativo

5

% Inhibición = 100 - % crecimiento

**3. Composición fungicida.**

10 Para lograr una adecuada aplicación del extracto fungicida sobre los viñedos es necesario elaborar una composición fungicida que contenga como componente activo dicho extracto de uva o de un subproducto del proceso de vinificación y además un vehículo aceptable agrícolamente.

15 Lo primero que se verificó durante la fase experimental fue la solubilidad de los tres extractos en agua. La conclusión alcanzada fue que los tres extractos son parcialmente solubles y dispersables en agua, pudiendo considerar a los tres extractos como muy solubles o totalmente solubles. Por tanto, en un primer modo de realización preferente, la composición fungicida es una composición acuosa.

20

Para lograr una composición fungicida de aplicación directa por pulverización, a la solución acuosa de los extractos se añadieron los siguientes co-formulantes:

- Coadyuvantes de formulación que permitan homogenizar totalmente los extractos en agua, evitando precipitados y fases (emulgentes, estabilizantes...)
- Emulgentes que faciliten la aplicación del producto mediante pulverización (dispersantes, adherentes...)
- Co-formulantes a base de nutrientes para proporcionar una matriz orgánica al ingrediente activo

30

La presente invención contempla por tanto una composición fungicida que es una composición acuosa pulverizable.

La invención contempla también un método de aplicación de la composición fungicida, tal que la composición se aplica justo después de poda de forma localizada en la zona de los cortes, pero sin ser pintado, sino aplicado por pulverización en toda la zona planta donde

35

haya cortes. El producto se aplica desde unas cubas de tratamiento mediante medios conocidos de pulverización.

### 3. RESULTADOS EXPERIMENTALES EN RELACIÓN CON LA CAPACIDAD ANTIFUNGICA DE LOS EXTRACTOS ESTUDIADOS

#### Resumen de las actuaciones realizadas.

Debido al crecimiento muy lento de algunas cepas de los hongos probados, no se pudo determinar la capacidad fungicida en alguno de los ensayos, representado en las tablas correspondientes como (nd), bien porque perdía viabilidad en el agar que se utilizó, o bien porque proliferaba microflora acompañante, en principio muy minoritaria, pero que era capaz de colonizar la placa con más rapidez.

En otras ocasiones no se podía evitar la deshidratación de los agares en periodos de incubación muy largos (más de dos semanas) debido al crecimiento lento de ciertas cepas.

No obstante, como se aprecia en los ensayos, se utilizaron en casi todas las ocasiones dos cepas de la misma especie, y se analizaron los datos en su conjunto, por lo que los resultados permiten estimar las capacidades fungicidas de los extractos estudiados.

#### Datos obtenidos para los diferentes hongos y extractos.

En las siguientes tablas se resumen los datos obtenidos para los diferentes hongos y extractos

*Tabla: Determinación de la capacidad fungicida de M1.*

% P/V DEL EXTRACTO	BV-057	CYL28	CYL30	BV050	BV287	PCH 32	PM77	BV056
	% INHIBICIÓN							
10	100	68,33	62,5	nd	100	100	nd	nd
5	81,66	38,33	47,22	nd	95	0	nd	nd
2,5	63,33	0	16,66	nd	90	0	nd	nd

Tabla: Determinación de la capacidad fungicida de M2.

% P/V DEL EXTRACTO	BV-057	CYL28	CYL30	BV050	BV287	PCH 32	PM77	BV056
	% INHIBICIÓN							
10	100	51,28	100	90	100	100	nd	nd
5	100	5,12	72,22	86,66	100	100	nd	nd
2,5	81,6	0	59,72	90	0	93	nd	nd

Tabla: Determinación de la capacidad fungicida de M3.

5

% P/V DEL EXTRACTO	BV-057	CYL28	CYL30	BV050	BV287	PCH 32	PM77	BV056
	% INHIBICIÓN							
10	100	0	0	85	0	100	80	-
5	0	0	0	0	0	0	76,6	-
2,5	0	0	0	0	0	0	71,66	-

### Resultados y discusión

10 Los ensayos se realizaron in vitro según se ha especificado más arriba. Los ensayos se realizaron en placa para evaluar la actividad antifúngica específica contra los hongos responsables de Enfermedades de madera: Eutipiosis (*Eutypa lata*), Pie Negro de la vid (*Ilyonectria Iriodendri*), Enfermedad de Petri y Yesca (*Phaeomoniella chlamydospora*, *Phaeoacremonium mínimum*).

### 15 Prevención y lucha contra la Eutipiosis

Los resultados muestran que los tres extractos tienen capacidad de inhibir totalmente el crecimiento de la cepa analizada (BV-057) de *Eutypa lata* responsable de la Eutipiosis a la concentración máxima analizada del 10% p/v. El extracto M3 no presenta capacidad alguna de inhibición del crecimiento del micelio del hongo a las concentraciones menores testadas.

20 El hongo *Eutypa lata* muestra mayor sensibilidad al extracto M2, con una inhibición del crecimiento del 81,6% a una concentración del 2,5% p/v del extracto.

Prevención y lucha contra la enfermedad de Pie Negro de la vid

El extracto M3 no tiene actividad antifúngica alguna sobre el crecimiento del micelio de las dos cepas (CYL28 y CL30) del hongo *Ilyonectria Iriodendri* cuando es analizado a las tres concentraciones estudiadas. Los extractos M1 y M2 muestran capacidad antifúngica para ambas cepas. La cepa CYL28 es más sensible a la actividad del extracto M1 y la cepa  
5 CYL30 al extracto M2. El hongo *Ilyonectria Iriodendri* responsable de la enfermedad de Pie Negro de la Vid muestra mayor sensibilidad al extracto M2 con inhibición del 100% del crecimiento de la cepa CYL30.

Prevención y lucha contra la enfermedad de Petri

10 Los extractos M2 y M3 muestran actividad inhibitoria del crecimiento del micelio de alguna de las dos cepas (BV050 y PM77) analizadas del hongo *Phaeomoniella chlamydospora* responsable de la Enfermedad de Petri. El extracto M1 no presenta actividad antifúngica alguna sobre el crecimiento del micelio de las dos cepas. El extracto M3 muestra mayor espectro de actividad de inhibición sobre la especie, siendo el único que tiene capacidad  
15 inhibitoria de la cepa PM77, sin embargo, la cepa BV50 del hongo muestra mayor sensibilidad a bajas concentraciones al extracto M2, con una inhibición del 90% del crecimiento a la concentración del 2,5% p/v.

Prevención y lucha contra la Yesca

20 Los tres extractos tienen una gran capacidad de inhibir el crecimiento del micelio del hongo *Phaeoacremonium mínimum* responsable de la Yesca, en alguna de las dos cepas estudiadas (BV27 y PCH32). Los tres extractos tienen capacidad de inhibir en un 100% el crecimiento de la cepa PCH32 en la máxima concentración testada correspondiente al 10% p/v. Ambas cepas del hongo muestran la mayor sensibilidad a la actividad del extracto M2,  
25 cuya acción inhibe en su totalidad el crecimiento del micelio de las cepas del hongo a una concentración del 5% p/v.

Los tres extractos muestran actividad inhibitoria sobre el crecimiento del micelio del alguno de los hongos estudiados.

30

El extracto M3 es el que presenta menor actividad antifúngica tanto por el espectro de cepas sobre el que tiene capacidad de inhibir el desarrollo del micelio del hongo, así como por la sensibilidad demostrada por la totalidad de las cepas a baja concentración con la única e interesante excepción de la actividad inhibitoria sobre la cepa PM77  
35 correspondiente al hongo *Phaeomoniella chlamydospora* responsable de la Enfermedad

de Petri, siendo el único extracto que presenta actividad alguna sobre esta cepa en particular.

5 El extracto M1, obtenido de hollejos de uvas de viñedo ecológico de DO Toro, presenta un espectro de actuación amplio y una actividad a baja concentración eficiente sin embargo no muestra actividad alguna sobre el hongo *Ilyonectria Iriodendri* responsable de la Enfermedad del pie negro.

10 El extracto M2, obtenido de hollejos de uvas de viñedo convencional de DO Ribera del Duero, es el que presenta mayor espectro de actividad ya que muestra capacidad de inhibir el crecimiento en su totalidad de alguna de las cepas de tres de los hongos estudiados: *Eutypa lata*, *Ilyonectria Iriodendri* y *Phaeoacremonium mínimum* y en un 90% el de la cepa BV50 del hongo *Phaeomoniella chlamydospora* a la concentración de 10% p/v. Así mismo, de modo general, los hongos analizados muestran mayor sensibilidad a los componentes  
15 del extracto M2, observándose una inhibición superior al 80% en alguna de las cepas de los hongos *Eutypa Lata*, *Phaeomoniella chlamydospora* y *Phaeoacremonium mínimum* a la concentración menor testada correspondiente al 2,5% p/v.

20 Por tanto, concluimos que, por espectro de actividad y sensibilidad de los hongos analizados, el extracto M2 es el que presenta mayor actividad antifúngica sobre el crecimiento del micelio de los hongos responsables de enfermedades de la madera de la vid.

25 El análisis del índice de polifenoles totales de los tres extractos analizados es muy similar, siendo de 33,87 para M1, 34,30 para M2 y 32,46 para M3. Así mismo la capacidad Antioxidante Media se mueve en rangos similares que oscilan entre el más alto de 520,71 para M3 a 479,95 para M2.

30 Hay que buscar la actividad del extracto M2 en el perfil de Polifenoles. La concentración de ácidos benzoicos y sus derivados es similar en los tres extractos. El perfil de Polifenoles Flavonoides analizados (Flavonoles, Flavan-3-ols) y No Flavonoides (ácidos hidroxicinámicos y derivados) es muy similar en los extractos M1 y M3, a excepción de las Antocianinas, que en el caso de varios de los derivados de antocianidina glicosilados (Malvidina y Pentunidina) es del orden de cinco veces superior en M1.

35

El extracto M3 es de los tres extractos, el que menor actividad inhibitoria presenta, y podría atribuirse a la baja concentración de Antocianinas comparado al M1, la falta de actividad.

5 Según Galeotti et al, (Flavonoids from carnation (*Dianthus caryophyllus*) and their antifungal activity, *Phytochemistry Letters*, 2008, 1(1):44-48.) los Flavonoides glicosilados como las Antocianinas, parecen presentar alguna actividad antifúngica. Sin embargo, el extracto M2 sorprendentemente presenta una muy baja concentración de antocianinas (prácticamente nula), no detectándose para la mayoría de los compuestos analizados, su presencia en el extracto. En consecuencia, no se puede atribuir la actividad del extracto  
10 M2 a la presencia de antocianinas.

De los tres extractos analizados, el extracto M2 es el único que presenta en su composición el fenol no flavonoide ácido cumárico. El ácido cumárico se encuentra generalmente en poca cantidad bajo forma libre, tanto en uva como en vino. La forma más común se  
15 encuentra esterificado con ácido tartárico. Parece claro por los resultados obtenidos que el ácido p-cumárico tiene capacidad de restringir marcadamente el crecimiento de los hongos fitopatógenos estudiados.

La riqueza en ácido cumárico que presenta el extracto M2 de mayor actividad de inhibición  
20 del crecimiento del micelio de los hongos analizados y supone una evidencia de la actividad y especificidad de este polifenol en su actividad antifúngica contra hongos causantes de enfermedades de la madera de vid (EMV).

## REIVINDICACIONES

1. Composición fungicida que contiene como componente activo un extracto de uva o de un subproducto del proceso de vinificación, caracterizado porque es un extracto sólido y  
5 comprende  
entre 0,16 y 1,7 mg/g de ácidos benzoicos  
entre 0 y 2,5 mg/g de ácidos hidroxicinámicos.  
entre 0 y 2,9 mg/g de flavon-3-oles  
entre 1,05 y 3,7 mg/g de flavonoles; y  
10 entre 0 y 87,8 mg/g de antocianos,
2. Composición fungicida de acuerdo a la reivindicación 1, donde el extracto procede de uva tinta o de un subproducto del proceso de vinificación de dicha uva tinta, y comprende  
entre 0,16 y 0,65 mg/g de ácidos benzoicos  
15 0 mg/g de ácidos hidroxicinámicos.  
entre 1,5 y 2,8 mg/g de flavon-3-oles  
entre 1,9 y 3,7 mg/g de flavonoles; y  
entre 73,2 y 87,8 mg/g de antocianos,
- 20 3. Composición fungicida de acuerdo a la reivindicación 1, donde el extracto procede de uva tinta o de un subproducto del proceso de vinificación de dicha uva tinta, y comprende  
entre 0,52 y 1,16 mg/g de ácidos benzoicos,  
entre 1,0 y 2,5 mg/g de ácidos hidroxicinámicos,  
0 mg/g de flavon-3-oles,  
25 entre 1,15 y 1,90 mg/g de flavonoles; y  
entre 0 y 0,08 mg/g de antocianos.
4. Composición fungicida de acuerdo a la reivindicación 1, donde el extracto procede de uva tinta o de un subproducto del proceso de vinificación de dicha uva tinta, y comprende  
30 entre 0,6 y 1,7 mg/g de ácidos benzoicos,  
0 mg/g de ácidos hidroxicinámicos,  
entre 1,9 y 2,9 mg/g de flavon-3-oles,  
entre 1,05 y 3,70 mg/g de flavonoles; y  
entre 12,2 y 18,0 mg/g de antocianos.

35

5. Composición fungicida de acuerdo a la reivindicación 1 o 3, donde el extracto procede de uva tinta o de un subproducto del proceso de vinificación de dicha uva tinta, y comprende entre 1,0 y 2,5 mg/g de ácido cumárico en estado libre no conjugado.
- 5 6. Composición fungicida de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, que comprende además un vehículo aceptable agrícolamente.
7. Composición fungicida de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la composición está formulada como una solución acuosa de los extractos que  
10 incorpora uno o más coadyuvantes de formulación, uno o más emulgentes y uno o más co-formulantes a base de nutrientes para proporcionar una matriz orgánica al ingrediente activo.
8. Composición fungicida según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores que es  
15 una composición acuosa pulverizable.
9. Composición fungicida de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el extracto es obtenido a partir de hollejos de uva tinta Tempranillo.
- 20 10. Uso de la composición fungicida según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes donde el componente activo inhibe el crecimiento del micelio del hongo.
11. Uso de la composición fungicida según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes para la eliminación o inhibición de hongos causantes de enfermedades de la  
25 madera de la vid (*vitis vinífera*).
12. Uso de la composición fungicida según la reivindicación 11, donde los hongos se seleccionan entre el grupo que consiste en *Eutypa lata*; *Ilyonectria liriodendri*; *Phaeomoniella chlamydospora* y *Phaeoacremonium mínimum*.  
30
13. Uso de la composición fungicida según la reivindicación 2 para combatir una cualquiera de las siguientes enfermedades de la madera de la vid: la Eutipiosis, la enfermedad de Petri y la Yesca.
- 35 14. Uso de una composición fungicida según la reivindicación 13, donde la composición se aplica con las siguientes dosis del extracto que actúa como componente activo:

- 10% p/v para combatir la Eutipiosis
- 10% p/v para combatir la enfermedad de Petri
- 10% p/v para combatir la Yesca

5 15. Uso de la composición fungicida según la reivindicación 3 o 5 para combatir una cualquiera de las siguientes enfermedades de la madera de la vid: la Eutipiosis, la enfermedad del pie negro, la enfermedad de Petri y la Yesca.

10 16. Uso de una composición fungicida según la reivindicación 15, donde la composición se aplica con las siguientes dosis del extracto que actúa como componente activo:

- 5 % p/v para combatir la Eutipiosis
- 10 % p/v para combatir la enfermedad del pie negro
- 5 % p/v para combatir la enfermedad de Petri
- 5 % p/v para combatir la Yesca

15

17. Uso de la composición fungicida según la reivindicación 4 para combatir una cualquiera de las siguientes enfermedades de la madera de la vid: la Eutipiosis, la enfermedad de Petri y la Yesca.

20 18. Uso de una composición fungicida según la reivindicación 17, donde la composición se aplica con las siguientes dosis del extracto que actúa como componente activo:

- 10% p/v para combatir la Eutipiosis
- 10% p/v para combatir la enfermedad de Petri
- 10% p/v para combatir la Yesca

25

19. Método para combatir la Eutipiosis que comprende tratar los hongos, su hábitat o las plantas, suelos y/o materiales que han de liberarse de los mismos con una cantidad efectiva de al menos el compuesto activo de las reivindicaciones 1-5

30 20. Método para combatir la Eutipiosis según la reivindicación 19, donde la composición fúngica se aplica por pulverización.

35 21. Método para combatir la Eutipiosis según la reivindicación 19, donde la composición fúngica se aplica a una dosis de entre 5 y el 10 % p/v del extracto que actúa como componente activo.

22. Método para combatir la enfermedad del pie negro que comprende tratar los hongos, su hábitat o las plantas, suelos y/o materiales que han de liberarse de los mismos con una cantidad efectiva de al menos el compuesto activo de la reivindicación 3.

5 23. Método para combatir la enfermedad del pie negro según la reivindicación 22, donde la composición fúngica se aplica por pulverización.

10 24. Método para combatir la enfermedad del pie negro según la reivindicación 22, donde la composición fúngica se aplica a una dosis del 10 % p/v del extracto que actúa como componente activo.

15 25. Método para combatir la enfermedad de Petri o la Yesca que comprende tratar los hongos, su hábitat o las plantas, suelos y/o materiales que han de liberarse de los mismos con una cantidad efectiva de al menos el compuesto activo de las reivindicaciones 1-5

26. Método para combatir la enfermedad de Petri o la Yesca según la reivindicación 25, donde la composición fúngica se aplica por pulverización.

20 27. Método para combatir la enfermedad de Petri o la Yesca según la reivindicación 25, donde la composición fúngica se aplica a una dosis de entre 5 y el 10 % p/v del extracto que actúa como componente activo.



- ②① N.º solicitud: 202130856  
②② Fecha de presentación de la solicitud: 15.09.2021  
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. ci.: **A01N61/00** (2006.01)  
**A01N65/00** (2009.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
Y	ES 2319032 A1 (MORO GONZALEZ CARLOS) 01/05/2009, página 2, líneas 36-40, 51	1-27
Y	ES 2193881 A1 (UNIV MADRID COMPLUTENSE <i>et al.</i> ) 01/11/2003, página 2, columna 1, líneas 8-22, 47-67; página 2, columna 2, líneas 3-8, 24-28, 53-66; página 3, columna 4, líneas 28-35.	1-27
Y	ES 2431338T T3 (INDENA SPA) 26/11/2013, página 2, líneas 46-50; página 3, líneas 15-45.	1-27
Y	ES 2779984 A1 (BODEGA MATARROMERA SL <i>et al.</i> ) 21/08/2020, página 21, líneas 12-26, 28-32.	1-27
A	DEL RIO JOSE A <i>et al.</i> Phenolic compounds have a role in the defence mechanism protecting grapevine against the fungi involved in Petri disease. <i>Phytopathologia Mediterranea</i> April 2004, 31/03/2004, Vol. 43, Nº 1, Páginas 87-94, ISSN 0031-9465 (ISSN print). página 88, columna derecha, tercer párrafo; página 89, columna izquierda, último párrafo; página 91, columna izquierda; tabla 1; resumen.	1-27
A	FLORENCE FONTAINE <i>et al.</i> Grapevine trunk diseases. A review. abril 2016, páginas 1-25. <i>International Organisation of vine and wine</i> , abril 2016, Páginas 1-25. página 17, penúltimo párrafo,	1-27
A	GIOVANNA SIMONETTI <i>et al.</i> Antifungal Activity of Phenolic and Polyphenolic Compounds from Different Matrices of <i>Vitis vinífera</i> L. against Human Pathogens. <i>Molecules</i> , 17/08/2020, Vol. 25, Nº 3748, Páginas 1-22, <DOI: doi:10.3390/molecules25163748>. página 2, primer y segundo párrafos.	1-27

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia  
Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría  
A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita  
P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud  
E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe  
27.06.2022

Examinador  
S. González Peñalba

Página  
1/2

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

A01N

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

INVENES, EPODOC, WPI, NPL, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE, COMPDX, INSPEC