

307 294



307294

P A T E N T E D E I N V E N C I O N

por V E I N T E años

en España a favor de ZAIDAN HOJIN BISEIBUTSU KAGAKU
KENKYUKAI, residente en TOKIO (Japón), 403 Kamiosa--
ki-Nakamaru, Shinagawa-ku, cuya Patente tiene por -
objeto:

"PROCEDIMIENTO DE FABRICACIÓN DE UN PREVENTIVO PARA
ENFERMEDADES DE LAS PLANTAS".

-o-o-o-o-o-o-o-o-o-o-o-o-

/ MEMORIA DESCRIPTIVA /

Este invento se refiere a un nuevo agente pre-
ventivo de las enfermedades de las plantas, seleccio-
nado de aquellos que contengan kasugamicina ó sus -
sales de adición ácidas, con ó sin diluyente y - --
un agente activo de superficie que contenga kasuga--
micina ó sus sales de adición, junto con otros acti-

307294



vos y que produzcan efecto marcado contra las enfermedades de las cosechas, concretamente el tizón del arroz, y a su uso para la prevención de las enfermedades de las plantas.

5.- En los dibujos adjuntos, las Figuras 1 y 2 -- muestran curvas indicando los respectivos efectos preventivos de la kusagamicina y de otros productos químicos conocidos, contra el tizón del arroz.

10.- Convencionalmente, se ha usado compuestos mercurícos orgánicos y blasticiđina S como agentes preventivos contra el tizón del arroz. Como el tizón del arroz produce daños graves a éste, se han requerido agentes más eficaces. Usados durante un periodo largo, los compuestos mercurícos orgánicos tienen a fijarse en el organismo humano y de aquí que la cantidad de los mismos debe de ser pequeña. También, la blasticiđina S tiene una gran toxicidad, - causando la destrucción de la membrana mucosa. En relación con esto se ha requerido la aparición de nuevos agentes contra el tizón del arroz.

20.- La kasugamicina es un nuevo antibiótico descubierto por Hamao Umezawa et al., los presentes inventores, y ha mostrado excelentes efectos preventivos contra el tizón del arroz en comparación con los agentes conocidos, no solamente en ensayos en tiestos de jardín sino también en ensayos en campos. Aún cuando se usa en mezcla con los agentes preventivos conocidos, tales como los compuestos mercurí-



307294

cos orgánicos, los alquiltiocianatos más altos, particularmente hexadecil y octadecil tiocianato, blastiocidina S, no se deteriora su efecto sino que más bien se mejora. La kasugamicina es inocua para el

5.- hombre, animales y peces. Es inocua para las plantas no dando signos tóxicos, aunque se use en cantidades 100 veces mayores que la concentración usual. Las propiedades de la kasugamicina se describen detalladamente en la solicitud de patente japonesa nº

10.- 19.767/64 junto con el procedimiento de producción de la misma, y puede resumirse como sigue:

La kasugamicina es básica, tiene pK' un valor de 7,1 aproximadamente y forma sales de adición de ácido con los ácidos inorgánicos u orgánicos. Es soluble en agua, pero prácticamente insoluble en los disolventes orgánicos. En los límites de 220 a 350 mμ en el espectro ultravioleta no muestra ninguna absorción máxima excepto la absorción final. Su hidrocioruro se obtiene como cristales blancos mostrando un punto de descomposición de unos 202° C a 204° C, que son ópticamente activos y exhiben una rotación específica de $(\alpha)_D^{22} + 120^\circ$ (en 1,6 % de solución acuosa). Los cristales hidrocioruro muestran un peso molecular de 543 aproximadamente; indicando la presencia de 1 mol. de agua de cristalización al ser sometidos a la prueba de Karl Fischer. En el análisis elemental se halló que la fórmula molecular de la misma es $C_{15}H_{27}N_3O_{10} \cdot H_2O \cdot HCl$. Los cristales de

15.-

20.-

25.-



307294 18 DIC. 1944

- hidrocloruro fueron secados a 150 °C y sometidos a análisis elemental, para obtener los valores de C: 38,58, H: 6,72, O: 37,05, N: 9,66 y Cl: 8,16. La kasugamicina es positiva en reacción de nihidrina (con piridina) y en reacción de periodato permanganato potásico, y es negativa en las reacciones de Molisch, Tollens, Elson-Morgan, Sakaguchi, Fehling y cloruro ferrico. En un medio de harina de peptona extracto -
- 5.- de ágar inhibe el Corinebacterium xerosis en una concentración de 50 mcg/cc., el Streptococcus con 100 -
- 10.- mcg/cc., el Proteus vulgaris con 100 mcg/cc., las cepas de la bacteria de desentería y la Salmonella con 100 mcg/cc., y la Brusella melitensis con 6,25 mcg/cc., Sin embargo otros microorganismos ensayados no
- 15.- fueron inhibidos aún con 100 mcg/cc. La kasugamicina muestra acciones antimicrobianas más fuertes en el medio sintético Stephenson-Wetham que en un medio de extracto de harina de peptona. Inhibe las Pseudomonas ceae con 6,25 50mcg/cc., en agua de peptona, no inhibe la Piricularia oryzae en medio de Sabouraud con -
- 20.- 100 mcg/cc., pero inhibe a éste organismo con 0,1 a 1,0 mcg/cc. en un medio consistente en jugo de arroz y ágar ajustado a pH 4,0. La inyección intravenosa - de 1000mg./Kg. a un ratón no muestra toxicidad. Aún administrándose cotidianamente a ratones por vía in-
- 25.- tramuscular durante 10 días, 1000mg./Kg. por día no produce toxicidad. Además, aún cuando se da a un perro ó mono por inyección subcutánea de 500 mg/Kg. no

307294



se observa toxicidad en el hígado, riñones y órganos hematopoiéticos. La kasugamicina está purificada según el procedimiento de intercambio de iones, o por tratamiento con carbón activo.

- 5.- Una característica de la kasugamicina es producir fuertes efectos preventivos contra el tizón del arroz, y tener una toxicidad marcadamente baja para los seres humanos, los animales y las plantas. Por ejemplo, un ensayo realizado rociando una solución acuosa de kasugamicina en retoños de arroz en edad de tres hojas infectados con Piricularia oryzae mostró tales resultados que mostró efecto de inhibición del 55 % de las lesiones de la hoja en una concentración de 1,25 mcg/cc., 73 % con 5 mcg/cc., y 100 % con 10 mcg/cc. Aún rociada en una concentración de 1 mg./cc. la solución no mostró fitotoxicidad. La kasugamicina ejerce su fuerte efecto preventivo contra el tizón del arroz no solamente sobre las hojas sino también contra el de las espigas. Por ejemplo, una prueba realizada rociando la solución de kasugamicina en una concentración de 40 mcg/cc. en plantas de arroz, dos días después de la infección con Piricularia oryzae, mostró que el tizón de arroz en las espigas, nódulos del tallo y granos quedaba completamente controlado.
- 10.-
- 15.-
- 20.-
- 25.- Además, el rociamiento de la solución en una concentración de 1,25 - 20 mcg/cc. mostró evidentemente un efecto preventivo. Por otra parte, una solución de blastocidina S mostró fitotoxicidad cuando la concen--

307294



- tración fué más alta de 20 mcg/cc. y no se observó prevención completa. Si se prueba el efecto contra diversas enfermedades de plantas sobre la base de efectos antimicrobianos y de la baja toxicidad de
- 5.- la kasugamicina, es natural que el área de efectividad de ésta sea más amplia. Según ensayos en un invernadero, la kasugamicina exhibió un efecto preventivo contra el tizón del trigo, y contra el sarpullido de las plantas del tabaco.
- 10.- Aunque su mecanismo de acción no está claro, la kasugamicina muestra un efecto preventivo más fuerte cuando se rocía una solución de la misma después de la infección mejor que antes de ella. Generalmente al primer efecto se la llama curativo, mientras que el último es el protector. En el caso de la
- 15.- kasugamicina el efecto curativo se muestra más fuerte que el protector. Además, la kasugamicina es excelente por su resistencia a la lluvia. Por ejemplo en una prueba realizada rociando soluciones de kasugamicina a plantas dos días después de la infección
- 20.- con Piricularia Oryzae, se dió una ducha de agua a las plantas 30 minutos después del rociamiento y, después, pasados siete días en un invernadero fueron calculados los números de lesión agrandada. En
- 25.- el caso de la kasugamicina en una concentración de 10 mcg/cc., el número de lesión agrandada por cada hoja fué 2,2, mientras que fué 4,8 en el caso de la blasticidina S con 10 mcg/cc. (control mostrado en 36,9). A fin de conocer los efectos preventivos con



307294

tra el daño producido por el tizón del arroz es también útil investigar el efecto sobre la salida de hojas nuevas sanas después de la infección y del tratamiento. En esta prueba, la kasugamicina mostró excelentes resultados en comparación con la blastocidina S.

La kasugamicina o sus sales de adición de ácido, en forma pura o cruda, ejerce un efecto preventivo. Aún un líquido cultivado conteniendo kasugamicina, como tal o en estado condensado o seco, exhibe efectos preventivos también. Simultáneamente con la kasugamicina, el Streptomyces kasugaensis produce algunas veces aureotricina, tiolutina y una sustancia pentaeno antifúngica. Generalmente, estos antibióticos en el caldo cultivado no muestran efecto perjudicial en la disolución en que se usa efectivamente la kasugamicina.

De acuerdo con el presente invento, es posible utilizar kasugamicina pura o cruda o sus sales de adición ácida, un líquido de cultivo conteniendo kasugamicina, el líquido cultivo seco o un extracto crudo de kasugamicina con o sin diluyentes y agentes activos de superficie para la prevención de las enfermedades de las plantas. En el caso de usar líquido cultivo conteniendo kasugamicina, su filtrado o líquido cultivo seco, o extracto conteniendo kasugamicina, se eliminan si es necesario otros antibióticos incorporados.

La kasugamicina ha sido esclarecida en propie

307294



- dades físicoquímicas y efecto antimicrobiano, y por lo tanto el presente invento comprende todo agente que contenga kasugamicina útil para la prevención de las enfermedades de las plantas. La kasugamicina puede utilizarse, sin ser interferida en su efecto, en combinación con la preparación convencional de mercurio, la blasticidina S, o los alquiltiocinatos, particularmente el hexadecil y octadecil-tiocianato. Dicho uso combinado puede servir para
- 5.- hacer más amplio el espectro antimicrobiano de la kasugamicina. El presente invento comprende también los agentes combinados.

- Según el presente invento, puede formarse un agente conteniendo kasugamicina, por procedimiento
- 15.- convencional aplicado a la preparación de pesticidas agrícolas ordinarios, en forma adecuada tal como, por ejemplo, polvo, líquido, líquido emulsionable, o polvo humedectible. Mezclando kasugamicina o un material que la contenga con un portador sólido tal como carbonato de calcio, yeso, arcilla, talco, sieclita, vermiculita, tierra diatomácea, etc. se obtiene una fórmula en polvo; un polvo humedectible mezclando la misma con, por ejemplo, un portador sólido y un agente activo de superficie;
- 20.- una fórmula líquida añadiendo a la misma agua o metanol o disolventes orgánicos conteniendo agua; y un líquido emulsionable emulsificando la misma con la adición de un agente activo de superficie. Si -



18 DIC

307224

- es necesario, pueden añadirse además un esparciador y un estabilizador. La kasugamicina es estable bajo condiciones neutra, débilmente acídica, y acídica, pero es menos estable bajo condiciones alcalinas y de aquí su conveniencia de que se formule en estado neutro o acídico. Además, la kasugamicina es básica, de forma que es necesario tener 2 n cuenta el caso en que sea absorbida con un sólido acídico. Las fórmulas en polvo, líquido, líquido emulsionable y polvo humedectible pueden prepararse en combinación con los fungicidas convencionales, como los compuestos mercurícos, orgánicos, la blastocidina S, y los alquiltiocianatos especialmente el hexadecil y octadecil tiocianato descubiertos por Tetsuji Ishiyama et al., uno de los presentes inventores.
- 5.-
10.-
15.-

Como la kasugamicina ha sido esclarecida en propiedades, así como en actividades biológicas, es fácil modificar el presente invento. El actual invento no se limita a los ejemplos mostrados más adelante, sino que comprende todos los productos que contengan kasugamicina.

20.-

Los efectos preventivos de la kasugamicina contra el tizón del arroz han sido establecidos y detallados y se ampliará el uso de la misma, cuando se comercializa la kasugamicina. Por ejemplo, se ha observado el efecto de la kasugamicina contra el tizón del trigo y el sarpullido del tabaco.

25.-

307294

18 DIC



El presente invento se refiere a los pesticidas agrícolas para provenir y curar las enfermedades de las cosechas, y el uso del mismo no se limita solamente a la prevención y curación del tizón del

5.- arroz.

Método (1): Prueba del efecto curativo.

La prueba fué realizada de acuerdo con el método de ensayo en tiesto. La planta de arroz ensayada era de la variedad mongólica en retoño de 3

10.- hojas de edad. Inmediatamente antes de la germinación fueron tomados 20 granos de arroz de cada uno de los tiestos de 9 cmts. de diámetro. En la fase de la edad de 3 hojas, se inoculó a los retoños una suspensión de spora de Piricularia oryzae. -

15.- Los retoños inoculados se mantuvieron en cámara húmeda durante 20 horas y después de ésto se les roció una solución de cada producto químico probado, a una presión de 0,5 Kg./cm² en una cantidad de 4 ml. por tiesto. A cada producto químico se añadió como esparciador 100 mg/co. de Newcol-560. -

20.- Se dejó reposar a los retoños en un invernadero durante 5 a 7 días y después se calculo el número de lesiones agrandadas por cada 10 horas. El valor curativo se estimá por medio de la siguiente

25.- fórmula:

$$V.C. = \frac{\text{Numero de lesiones no tratadas} - \text{número de lesiones tratadas}}{\text{numero de lesiones no tratadas}} \times 100$$

307294

18 DIC.



Método (2): Ensayo en tiesto del efecto protector.

Los procedimientos fueron los mismos que en el método (1), pero los retoños fueron tratados con productos químicos antes de la inoculación de la Piricularia oryzae.

El valor protector fué valorado similarmente al valor curativo.

Ejemplo 1.

10.- En éste ejemplo se adoptó el método (1), extractándose con butanol un filtrado de líquido cultivado de Streptomyces kasugaensis para eliminar la euretrocina, tiolutina y substancia pentaeno antifúngica. El filtrado se diluyó con agua destilada, 2, 4, 8 y 16 veces y, se añadió a cada uno de los filtrados diluidos 100 mcg/cc. de Newcol-560 como esparcidor. Cada agente preparador así fué rociado a los retoños en edad de 3 hojas infectados con Piricularia oryzae.

20.- Los resultados se muestran en la siguiente tabla:

<u>Agentes rociados</u>	<u>Numero de lesiones agrandadas por 10 hojas</u>
Filtrado de cultivo de kasugamicina	0
25.- Filtrado de cultivo de kasugamicina diluido dos veces	0
Filtrado de cultivo de kasugamicina diluido cuatro veces	0
Filtrado de cultivo de kasugamicina diluido ocho veces	0,9

307294

18 DIC. 53



Filtrado de cultivo de kasugamicina diluido dieciseis veces	3,0
Control	84,5

Está claro en la tabla precedente, que el agente presente, aún diluido 16 veces puede inhibir el proceso de la infección.

Ejemplo 2.

En éste ejemplo se adopto (1). Se ensayaron en el mismo un filtrado de líquido cultivado de Streptomyces kasugaensis que contenía 100 mcg/cc.

10.- de aureotricina y tiolutina), una solución acuosa de extracto de un cultivo líquido de Streptomyces kasugaensis (dicho extracto era un polvo obtenido añadiendo carbón activo al líquido cultivado al 0,5 % y pH 2,0, eliminando el carbón activo por filtración, neutralizando el filtrado resultante, añadiendo al mismo 2,0 % de carbón activo para adsorber la kasugamicina, levigando la kasugamicina con un 80 % de metanol acuoso a pH 7,0 y después concentrando el mismo bajo presión reducida seguido de secado), y una solución acuosa de hidrocloreuro de kasugamicina. Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

<u>Agentes rociados</u>	<u>Valor curativo</u>
Filtrado, diluido 2 veces	100 %
" " 4 "	"
25.- " " 16 "	"
" " 64 "	97,8 %
Extracto, 8 mg/cc.	100
" 4 "	"
" 1 "	"
" 0,5 "	98,0 %

307294



	<u>Agentes rociados</u>	<u>Valor curativo</u>
	Extracto, 0,25 mg/cc.	88,5 %
	Hidrocloruro de kasugamicina 30 mcg/cc	100 %
5.-	Hidrocloruro de kasugamicina 15 mcg/cc.	"
	Hidrocloruro de kasugamicina 3,75 mcg/cc.	98,2 %
10.-	Hidrocloruro de kasugamicina 1,0 mcg/cc.	82,2 %

Ejemplo 3:

Se ensayaron los mismos agentes que en el ejemplo 2, según el método (2) para obtener el siguiente resultado:

	<u>Agentes rociados</u>	<u>Valor protector</u>
15.-	Filtrado, diluido 2 veces	100 %
	" " 8 "	"
	" " 16 "	"
	Extracto, 4 mcg/cc.	-
20.-	" 2 "	99,5 %
	" 1 "	93,7 %
	Hidrocloruro de kasugamicina 30 mcg/cc/100	%
	Hidrocloruro de kasugamicina 15 mcg/cc.	97,8 %
25.-	Hidrocloruro de kasugamicina 7,5 mcg/cc.	96,7 %
	Hidrocloruro de kasugamicina 3,75 mcg/cc.	89,0 %

307294

18 DIC.



Ejemplo 4:

- A 3 grs. de polvo crudo de un 8 % de pureza de kasugamicina extractado de un filtrado de líquido cultivado de Streptomyces kasugaensis según el procedimiento de resina de intercambio de iones, se añadió, para formar una fórmula de polvo, 60 g. de sieclita, 34 g. de talco, y 2 g. de vitasil. La fórmula en polvo así preparada fué es polvoreada en una cantidad de 200 mg. por tiesto.
- 5.- También se preparó una fórmula de polvo humedectible añadiendo a 20 g. de polvo crudo de kasugamicina de una pureza del 8 %, 75 g. de Tolite MT-S, 2 g. de Newcol-560 y 3g. de Toyolignin CP. La fórmula se diluyó 500 veces con agua y después fué rociada en una cantidad de 4 ml. por tiesto.
- 10.- Cada ensayo se realizó de acuerdo con el método (1) y mostró el valor curativo dentro de los límites del 90 al 100 %.
- 15.-

Ejemplo 5:

- 20.- Se mezcló kasugamicina con preparados mercuricos y las mezclas químicas resultantes fueron comparadas en efecto preventivo con productos químicos individuales para obtener los siguientes resultados (se adoptó el método (L)):

25.-

Agentes y concentración	Numero de lesiones agrandadas por hoja.
Kasugamicina 30 mcg/cc.	0
" 15 "	0,3

707294

18 DIC. 1953



<u>Agentes y concentración</u>		<u>Numero de lesiones agrandadas por hoja</u>
	Kasugamicina 7,5 mcg/cc.	2,3
	" 3,75 "	4,8
	Kasugamicina 15 mcg/cc. +	
5.-	+ ioduro fenilmercúrico 20 mcg/cc,	0
	Kasugamicina 15 mcg/cc. +	
	+ ioduro fenil mercúrico 10 mcg/cc.	0,2
10.-	Kasugamicina 15 mcg/cc. + ioduro fenil mercúrico 5 mcg/cc.	2,1
	Kasugamicina 7,5 mcg/cc.+ ioduro fenil mercúrico	
15.-	20 mcg/cc.	0
	Kasugamicina 7,5 mcg/cc.+ ioduro fenil mercúrio 10 mcg/cc.	0,2
	Kasugamicina 7,5 mcg/cc.+	
20.-	ioduro fenil mercúrio 5 mcg/cc.	2,1
	Kasugamicina 3,75 mcg/cc. + ioduro fenil mercúrico 20 mcg/cc.	0,1
25.-	Kasugamicina 3,75 mcg/cc. + ioduro fenil mercúrico 10 mcg/cc.	0,2

307294

18 DIC.



Agentes y concentración	Numero de lesiones - agendadas por hoja.
Kasugamicina 5,75 mcg/cc. + ioduro fenil mercúrico 5 mcg/cc.	2,9
5.- Ioduro fenil mercúrico 40 mcg/cc.	16,6
Ioduro fenil mercúrico 20 mcg/cc.	20,2
Ioduro fenil mercúrico 10.- 10 mcg/cc.	20,8
Ioduro fenil mercúrico 5 mcg/cc.	18,7
Kasugamicina 15 mcg/cc. + acetato fenil mercúri 15.- co 10 mcg/cc.	0
Acetato fenilmercúrico 20 mcg/cc.	19,5
Control	20,4

20.- Los resultados precedentes muestran que las mezclas de kasugamicina con preparaciones mercúricas no se deterioran en actividad, sino que son más bien sinérgicas.

Ejemplo 6:

25.- Se ensayaron los mismos productos químicos que en el ejemplo 5 según el método (2), inoculándose Piricularia oryzae a las plantas después de la aplicación de los agentes, obteniendo los siguientes resultados:

307294



<u>Agentes rociados</u>	<u>Numero de lesiones agrandadas por hoja</u>
Kasugamicina 15 mcg/cc.	3,9
" 7,5 "	8,3
Ioduro fenil mercúrico	
5.- 10 mcg/cc.	1,1
Ioduro fenil mercúrico	
5 mcg/cc.	3,0
Acetato fenil mercúrico	
20 mcg/cc.	3,4
10.- Kasugamicina 15 mcg/cc.	
+ ioduro fenil mercúrico 10 mcg/cc.	0
Kasugamicina 15 mcg/cc.	
+ ioduro fenil mercúrico 5 mcg/cc.	0,6
15.- Kasugamicina 7,5 mcg/cc.	
+ ioduro fenil mercúrico 5 mcg/cc.	0,8
Kasugamicina 15 mcg/cc.	
20.- + ioduro fenil mercúrico 20 mcg/cc	0,9
Control	20,0

Los anteriores resultados muestran que la mezcla de los dos agentes aumenta el efecto protector.

Ejemplo 7:

Se añadieron 100 mcg/cc. de NNP (Newcol-560) como esparciador a un líquido conteniendo -



307294

- kasugamicina obtenida por extracción de un filtrado de líquido cultivado de Streptomyces kasugaensis con etanol, para eliminar la aureotricina, la tiolutina y una substancia pentaeno antifúngica.
- 5.- ca. El producto químico así preparado se sometió a prueba. La prueba se realizó en el campo de la Agricultural Experiment Station de la Hokkoh Chemical Industry Co., en Atsugi, Prefectura de Kanawa.
- 10.- En éste campo, se inoculó la planta de arroz con hojas de arroz enfermas a fin de causar una vigorosa infección de Piricularia oryzae. Cuatro días después de la inoculación, es decir, cuando se reconoció la aparición de las manchas de la enfermedad, se rociaron 20 cc. por 0,6 cm² del antedicho agente conteniendo kasugamicina. El rociamiento se verificó de 1 a 3 veces. A efectos de comparación, se rociaron, 20 mcg/cc. de ioduro fenilmercurio y 40, 20 y 10 mcg/cc, de blasticidina S respectivamente, en una cantidad de 20 cc. por cada 0,6 cm² en la parcela respectiva. A los 7, 9, 11, 13, 15, 19, y 23 días después de la inoculación con hojas enfermas, se calculó el área de lesiones en cada parcela, y los resultados se muestran en las figuras 1 y 2. En cada gráfico, el eje vertical muestra el porcentaje de área enferma con lesión, el eje horizontal muestra el número de días, la curva A indica un control (no tratado), la curva B los resultados de 20 ppm. de -

307294 18D



productos químico mercurico, la curva C 10 ppm. de blasticidina S, la curva D 20 ppm. de blasticidina S, la curva E 40 ppm. de blasticidina S, y la curva F kasugamicina. La figura 2 muestra -

5.- los resultados del ensayo en el que el primer rociamiento fué realizado en el cuarto día después de la inoculación, el segundo rociamiento en el noveno día, y el tercer rociamiento en el día on ceno. Se advirtió que las plantas de arroz trata

10.- das con kasugamicina tenían menor número de lesiones y el crecimiento de las plantas era marcadamente fuerte.

Ejemplo 8:

En éste ejemplo se usó hidrocioruro de kasugamicina, una kasugamicina cruda de 1, 5 % de pureza y un filtrado de líquido cultivado de -

15.- Streptomyces kasugaensis conteniendo 400 mcg/cc. de kasugamicina con 1,5 y 30 mcg/cc. de aureotri cina. Se diluyeron para obtener soluciones conte

20.- niendo kasugamicina en concentraciones de 80 mcg /cc. 40 mcg/cc., 20 mcg/cc. y 10 mcg/cc., respec tivamente. A cada solución se añadió Newcol 560- en 100 mcg/cc.. De la misma forma que en el ejem plo 7, los agentes así preparados fueron rociados

25.- en el campo de ensayo. Para fines de comparación, se rociaron soluciones de blasticidina S en con centración de 20 mcg/cc. y 10 mcg/cc. Un mes des pués del rociamiento de las soluciones contien



3072948 DIO

do kasugamicina en 80 mcg/cc. se dieron los mejores resultados y los retoños rociados con las mismas crecían como se no estuviesen infectados. Además, los retoños rociados con el filtrado de líquido cultivado mostraron un crecimiento más fuerte que los retoños no infectados. Entre los retoños infectados, casi todos los no tratados habían muerto. Los rociados con kasugamicina eran más fuertes en crecimiento que los rociados con -

5.- 10.- blasticidina S.

Ejemplo 9:

El hidrocloreuro de kasugamicina y su mezcla con aureotricina fueron probados de acuerdo con el metodo (1) para obtener los siguientes resultados:

	Agentes rociados	Numero de lesiones agrandadas por 10 hojas
	Kasugamicina 20 mcg/cc	0
	" 5 "	7,4
20.-	" 12,5 "	50,4
	Kasugamicina 20 mcg/cc	
	+ aureotricina 5 "	2,7
	Kasugamicina 5 mcg/cc.	
	+ aureotricina 5 "	10,20
25.-	Kasugamicina 1,25 "	25,6
	+ aureotricina 5 "	
	Blasticidina S 30 "	8,4
	Control	102,4

Se observó que la aureotricina mejoraba -



307294

18 DI

las acciones de la kasugamicina en baja concentración sin rebajar su efecto preventivo. Que la presencia de una ligera cantidad de aureotricina y tiolutina acelera el crecimiento de las plantas, era ya un hecho conocido. Este ejemplo mostró que la presencia de aureotricina en la concentración al no causar fitotoxidad no interfiere el efecto de la kasugamicina.

Ejemplo 10:

10.- Se prepararon hidrocioruro de kasugamicina blastocidina S y una mezcla de ambos y se probaron según el método (1) para obtener los siguientes resultados:

	<u>Agentes rociados</u>	<u>Valor curativo</u>
15.-	Kasugamicina 30 mcg/cc.	100 %
	" 15 "	96,5%
	" 7,5 "	92,1%
	" 3,75 "	63,0%
	Blastocidina S 30 mcg/cc	98,5%
20.-	" 20 "	98,0%
	" 10 "	89,0%
	Mezcla 30 mcg/cc	100 %
	" 15 "	97,0%
	" 7,5 "	86,0%
25.-	" 3,75 "	73,2%

Ejemplo 11:

Prueba para examen del efecto preventivo en campo;



Metodo: 307294

En una caja de vinilo, se inocularon retoños de arroz con hojas fuertemente infectadas con Piricularia oryzae. Dos días después de la inoculación se rociaron fórmulas en polvo y en polvo humedectible de cada uno de los siguientes agentes: kasugamicina, ioduro fenil mercurico, y kasugamicina + ioduro fenil mercurico. Una semana después se rociaron de nuevo los mismos agentes.

5.- Doce, 17, y 25 y después del primer rociamiento se investigaron las áreas de hojas muertas por la Piricularia oryzae, obteniendose los siguientes resultados:

Agentes y concentración-	Area muerta(%) después de:		
	12 días	17 días	25 días
15.- Ninguno	77,9	Comple- tament. muerta	Comple- tament. muerta
Fórmula de polvo humedectible:			
Kasugamicina 20 ppm.	8,1	34	50
20.- Ioduro fenil mercurico			
20 ppm. (como Hg)	19,7	58	80
Kasugamicina + ioduro fenil mercurico 10 ppm IO - ppm. (como Hg)	6,6	26	30
25.- Fórmula de polvo:			
Kasugamicina 0,2 % Ioduro fenil mercurico, 0,2 % (como Hg)	17,9	55	63
	24,5	62	45



307294

Agentes de concentración - Area muerta(%) después de:
12 días-17 días-25 días

Kasugamicina + ioduro fer-
nil mercúrico. 0,1 % 0,1 %

5.- (como Hg) 6,6 24 30

Estos resultados muestran que, también en la prueba preventiva en campo, la mezcla de kasugamicina con preparado mercúrico exhibe efecto sinérgico.

10.- Ejemplo 12:

Se mezcló kasugamicina con alquiltiocianatos (una mezcla de hexadecil- y octadeciltiocianato) en diversas concentraciones y se probaron los efectos de las mezclas resultantes según el método (1) comparandose con los efectos de los agentes individuales.

15.-

Los resultados de las pruebas fueron como sigue:

Agentes y concentración - Número de lesiones agrandadas por 10 hojas.

20.-

Parcela A-Parcela B-Promedio

Kasugamicina	15 mgc/cc.	0,2	0,3	0,3
"	7,5 "	2,1	2,4	2,3
"	3,75 "	3,5	6,1	4,8

25.-

Alquiltiocianato	1000 "			
+ kasugamicina	15 mgc/cc.	0	0	0
Alquiltiocianato	1000 "	0,6	0,8	0,7
+ Kasugamicina	7,5 "			
Alquiltiocianato	1000 "	0,2	1.1	0,7
+ Kasugamicina	3,75 "			

707974 18 DIC



Agentes y concentración Numero de lesiones agran
dadas por 10 hojas

Parcela A-Paro.B-Promedio

5.-	Alquiltiocianato 500 mcg/ cc. + Kasugamicina 15 mcg /cc.	0	0	0
	Alquiltiocianato 500mcg/ cc. + Kasugamicina 7,5 - mcg/cc.	0,5	0,7	0,6
10.-	Alquiltiocianato 500 mcg /cc.+ Kasugamicina 3,75 mcg/cc.	1,8	2,4	2,1
	Alquiltiocianato 1000 - mcg/cc.	13,7	19,2	17,7
15.-	Alquiltiocianato 500 mcg /cc.	15,1	20,2	17,7
	Blasticidina S 30 mcg/cc	0	0	0
	Control	13,2	20,1	16,7

Los mencionados resultados indican que los efectos curativos respectivos de los alquiltiocianatos y la kasugamicina se incrementan cuando se usan los dos en mezcla, y que el agente mezclado es más eficaz que dos veces la cantidad del agente individual. Así, los agentes muestran efecto sinérgico cuando se usan en mezcla.

25.- Ejemplo 13:

Se probaron los mismos agentes que en el ejemplo 12 según el metodo (2).

Los resultados son los siguientes:



30720418

Numero de lesiones agrandadas por hoja.

	<u>Agentes y concentración</u>	<u>Sec.a</u>	<u>Sec.b</u>	<u>Sect.c</u>	<u>Promed.</u>
	Kasugamicina 15 mcg/cc.	2,7	3,9	4,8	3,7
	" 7,5 "	5,0	4,2	6,4	5,2
5.-	" 3,75 "	8,2	8,7	10,1	9,0
	Alquiltiocianato 100g/cc	0	0,17	0,43	0,20
	" 50 "	0	1.50	2,00	1,00
	" 100 y/cc				
	+ Kasugamicina 15 y/cc.	0	0	0	0
10.-	Alquiltiocianato 100 y/ cc. + Kasugamicina 7,5 y/cc.	0	0	0,03	0,86
	Alquiltiocianato 100 y/ cc. + Kasugamicina 3,75 y/cc.	0	0	0	0
15.-	Alquiltiocianato 50 y/ cc. + Kasugamicina 15 - y/cc.	0	0	0	0
	Alquiltiocianato 50 y/ cc. + Kasugamicina 7,5 y/cc.	0	0	0,29	0
20.e	Alquiltiocianato 50 y/ cc. + Kasugamicina 3,75 y/cc.	0	0	0,59	0,20
25.-	Control	12,57-12,15-14,60	-	13,11	

Los anteriores resultados indican que los agentes mezclados tiene mayor efecto preventivo que dos veces la cantidad de agentes individuales y eviden-

307294

48 D



temente muestran efectos sinérgicos.

Ejemplo 14:

Campo de prueba I

Metodo:

- 5.- Utilizando hojas enfermas como fuente de inoculación, se inoculó Piricularia oryzae a retoños de arroz "Norin N^o 21" en edad de 4 a 5 hojas cultivado en vivero. Después de reconocer que habían sido atacados los retoños, se rociaron los mismos agentes que
- 10.- en el ejemplo 12, 3 veces, y se investigó el estado de enfermedad de los retoños 4 veces antes y después de cada rociamiento.

Fecha de inoculación: 10 de Mayo de 1.964

Fecha del rociamiento: 1. 18 de Mayo de 1.964

15.-

2. 25 de Mayo de 1.964

3. 1 Junio de 1.964

Los resultados fueron los siguientes:

Agentes y concentración	Area de lesiones (%)			
	Mayo - 17	Mayo - 24	Mayo - 31	Junio - 7
Kasugamicina 60 mcg/cc.	2	4	8	20
20.- " 30 "	3	5	23	39
" 15 "	2	9	28	55
" 7,5 "	4	12	46	80
Kasugamicina 30 mcg/cc + alquiltiocianato 1000				
25.- mcg/cc.	2	5	10	18
Kasugamicina 30 mcg/cc + Alquiltiocianato 500 mcg				
/cc.	3	8	11	21

307094 18 DIC



Agentes y concentración	Area de lesiones (%)			
	Mayo - 17	Mayo - 24	Mayo - 31	Junio - 7
5.- Kasugamicina 30 mcg/cc + alquiltiocianato 250 mcg /cc.	4	6	11	29
Kasugamicina 15 mcg/cc + alquiltiocianato 1000 mcg/cc.	2	9	10	22
10.- Kasugamicina 15 mcg/cc. + alquiltiocianato 500 mcg/cc.	2	8	17	31
Kasugamicina 15 mcg/cc + alquiltiocianato 250 mcg /cc.	2	8	23	41
15.- Kasugamicina 7,5 mcg/cc. + alquiltiocianato 1000 mcg/cc.	2	5	15	38
Kasugamicina 7,5 mcg/cc. + alquiltiocianato 500 mcg/cc.	3	10	20	56
20.- Kasugamicina 7,5 mcg/cc. alquiltiocianato 250 mcg /cc.	3	12	21	33
Alquiltiocianato 1000 mcg/cc.	3	6	24	42
25.- Alquiltiocianato 500 mcg /cc.	2	13	24	64
Alquiltiocianato 250 mcg /cc.	3	14	52	83

707904

48D



	<u>Area de lesiones (%)</u>			
	<u>Mayo - 17</u>	<u>Mayo - 24</u>	<u>Mayo - 31</u>	<u>Junio - 7</u>
<u>Agentes y concentración</u>				
Ioduro fenil mercurico				
20 mcg/cc.	2	14	56	72
5.- Blastidima 30 mcg/cc	4	17	35	61
Control	2	28	74	95

Campo de prueba II

Método:

En la misma forma que en el Campo de prueba I,

10.- se cultivaron retoños de arroz en viveros en un invernadero, y el 16 de Mayo de 1.964 se distribuyeron las hojas enfermas en el vivero para inocular Piricularia oryzae. Dos días después de la inoculación se roció dos veces cada uno de los siguientes productos químicos

15.- en forma de polvo: kasugamicina, alquiltiocianato (una mezcla de hexadecil y octadecil tiocianato) y kasugamicina + el mencionado alquiltiocianato. Doce, 17, y 25 días después del primer rociamiento se investigaron las áreas de hojas muertas por la piricularia oryzae.

20.- Los resultados fueron los siguientes :

<u>Producto químico</u>	<u>Concentración</u>	<u>Area de hojas muertas (%) despues de</u>		
		<u>12 días-</u>	<u>17 días-</u>	<u>25 días</u>
Ninguno	-	77,9	comple- tam.	muertas
25.- Alquiltiocianato	4,0 %	34,5	60	85
Kasugamicina	0,2 %	27,9	55	68
I Kasugamicina + alquiltiocianato	0,1 % 2,0 %	12,1	27	41

307294



<u>Producto químico</u>	<u>Concentración</u>	<u>Arca de hojas muertas</u>		
		<u>(%) después de</u>		
		<u>12 días</u>	<u>17 días</u>	<u>25 días</u>
Kasugamicina	0,0 %	39,5	81	94
II Kasugamicina alquiltiocianato	0,05 %	14,7	33	51

-5-

Está claro que se alcanza el efecto sinérgico por medio de la mezcla de los dos agentes.

/ N O T A /

Se declaran como de novedad y propiedad para todo el territorio español el contenido de las siguientes:

-10-

/ R E I V I N D I C A C I O N E S /

1ª.- "Procedimiento de fabricación de un preventivo para enfermedades de las plantas", en el que el ingrediente activo es la kasugamicina.

-15-

2ª.- "Procedimiento de fabricación de un preventivo para enfermedades de las plantas", según apartado 1º en el que la kasugamicina y un compuesto de fenil mercurio, en la relación 1-1000 del anterior por 1-20 del último, se añaden a un vehículo adecuado.

-20-

3ª.- "Procedimiento de fabricación de un preventivo para enfermedades de las plantas", según apartado 1º en el que la kasugamicina y blasticidina S, en la relación de 1-1000 del primero por 1-100 del último, se añaden a un vehículo adecuado.

-25-

4ª.- "Procedimiento de fabricación de un preventivo para enfermedades de las plantas", según apartado 1º, en el que la kasugamicina y un alquiltiocianato, particularmente el hexadecil y octadecil tiocianato, se añaden a un vehículo adecuado.

707904



den a un vehículo.

5ª.- "Procedimiento de fabricación de un preventivo para enfermedades de las plantas", según apartados -- anteriores, en las que la kasugamicina se selecciona del grupo consistente de kasugamicina cruda ó pura, sus sales de adición ácidas, kasugamicina conteniendo líquido de cultivo, líquido de cultivo seco y extracto crudo de kasugamicina.

6ª.- "PROCEDIMIENTO DE FABRICACION DE UN PREVENTIVO PARA ENFERMEDADES DE LAS PLANTAS".

Todo ello conforme se describe y reivindica en la presente memoria, que consta de TREINTA hojas escritas a máquina por una sola de sus caras y dibujos que la ilustran.

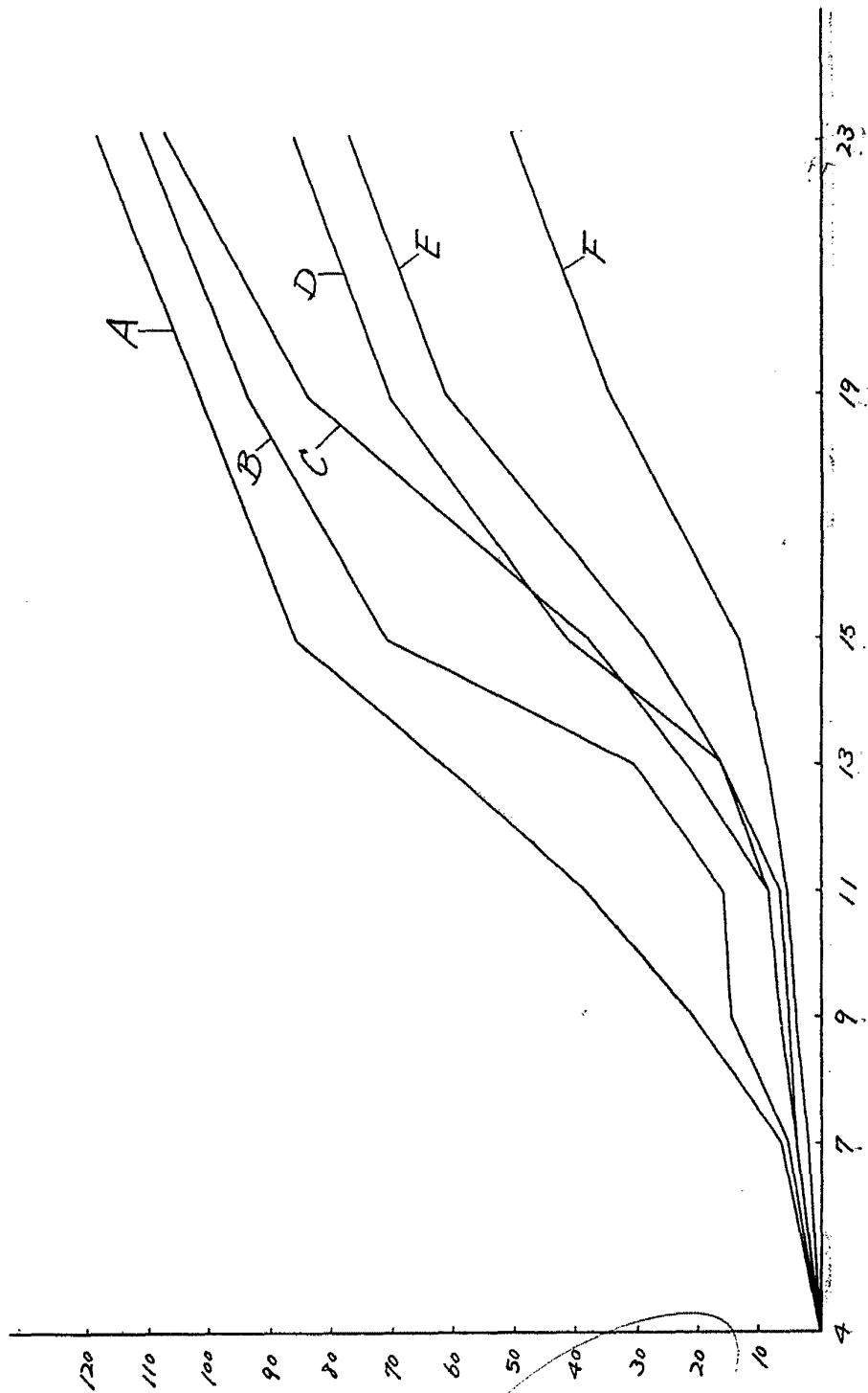
Madrid, 18 de Diciembre de 1.964

E. GONZALEZ VAGAN
P. P.



18 DIC

Fig. 1



MADRID 18 DICIEMBRE DE 1964

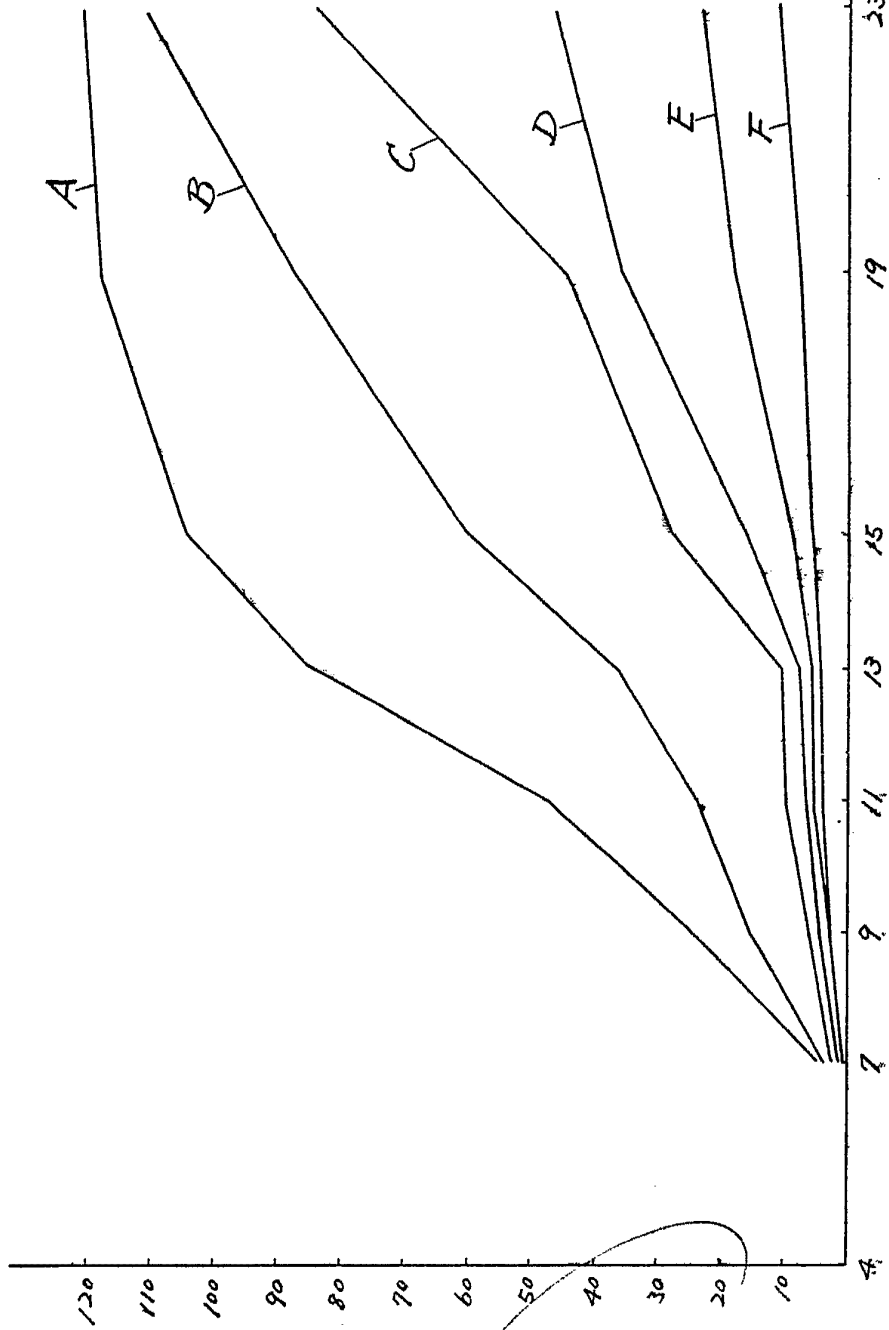
P. A.

E. GONZALEZ VACA

ESCALA VARIABLE



Fig. 2



MADRID 18 DICIEMBRE DE 1964

P. A.

E. GONZALEZ VACAS

ESCALA VARIABLE