

404388

20



404388

P.- 51.415

F-1682 A
Div.

F.C. 4-3-75

Int. Cl. ² : <i>A01N</i>

MEMORIA DESCRIPTIVA

para solicitar PATENTE DE INVENCION por 20 años

a nombre de TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.

entidad japonesa

establecida en 27, Doshomachi 2-chome, Higashi-ku,
Osaka, Japón.

por: UN PROCEDIMIENTO DE PREPARACION DE UN AGENTE PARA
REPRIMIR ENFERMEDADES DE LAS PLANTAS"

(Clase Internacional A01n)

3-7-72

-1-

404388



La presente invención se refiere a nuevos anti-
tibióticos, y más en particular al nuevo antibiótico T-7545
(Validamicina), que significa antibiótico T-7545-A, anti-
biótico T-7545-B, sus ésteres, sus sales, o mezclas de e-
5 llos, obtenido por cultivo de una cepa productora de anti-
biótico T-7545 perteneciente a los actinomicetos.

En busca de nuevas sustancias antibióticas, los
autores de la presente invención aislaron gran número de
microorganismos de la tierra, y estudiaron sus metabolitos.
10 El trabajo de investigación condujo a los hallazgos de que
ciertos microorganismos de la tierra son capaces de produ-
cir el nuevo antibiótico T-7545, que aquellos microorganis-
mos pertenecen a los actinomicetos, y que se puede obtener
dicho antibiótico cultivando estos microorganismos de ma-
15 nera que dicho antibiótico pueda acumularse en el medio
de cultivo.

Antes de ahora se han usado ampliamente agentes
de arsénico orgánico para el control del tizón de la vaina
de la planta de arroz, compuestos de mercurio orgánico pa-
20 ra el control de la putrefacción del tallo, y agentes de
pentacloronitrobenceno (denominados en lo sucesivo PCNB
brevemente) para el exceso de humedad y el tizón escleró-
tico (tizón meridional). Sin embargo, estas drogas no siem-
pre son inocuas para el hombre y los animales domésticos,
25 o incluso para peces y plantas. Por ejemplo, los agentes



'404388'

de arsénico orgánico no solo son tóxicos de forma crónica para el hombre y los animales, sino que también perjudican al rendimiento de la cosecha de arroz, mientras que los compuestos de mercurio orgánico no están exentos de toxicidad crónica para el hombre y los animales, además de ser venenosos para los peces. El PCNB también es fitotóxico, ya que afecta al crecimiento de los brotes jóvenes que han de ser protegidos. A la luz de lo que antecede, se ha esperado con interés el desarrollo de una nueva droga mejorada.

En busca de una droga satisfactoria para el control del tizón de la vaina, los autores de la presente invención efectuaron un extenso estudio del problema y han descubierto, inesperadamente, que el caldo de cultivo de una cepa de microorganismo productora de T-7545 presenta una poderosa acción de inhibición frente al tizón de la vaina, en ensayos in vivo (aplicación a brotes jóvenes de arroz), a pesar del hecho de que no muestra sustancialmente ninguna actividad antimicrobiana en determinaciones microbiológicas ordinarias (ensayo in vitro). Nuevos estudios han revelado que este antibiótico T-7545 tiene la característica peculiar de que solo muestra fuerte efecto de represión de la enfermedad cuando se trata con él la planta o el terreno.

La invención es la culminación de los ante-



404388

5 riores descubrimientos. Así, la invención se refiere a un nuevo antibiótico que se caracteriza por cultivar una cepa productora de T-7545, perteneciente a los actinomicetos (denominada a veces en lo sucesivo cepa productora de T-7545) de manera que se pueda producir dicho antibiótico y el antibiótico T-7545 se pueda acumular en el caldo de fermentación, y recuperar el antibiótico acumulado, de dicho caldo de fermentación.

10 Además, se ha hallado inesperadamente que estos nuevos antibióticos T-7545 muestran excelente efecto de represión frente a enfermedades de plantas, por ejemplo el tizón de la vaina de la planta de arroz, por aplicación in vivo, aunque no muestran potencia antimicrobiana in vitro contra bacterias ni hongos.

15 Además, se ha hallado que el antibiótico T-7545 es muy eficaz, no solo contra el tizón de la vaina de la planta de arroz, sino también contra otras enfermedades de plantas, tales como la putrefacción del tallo del arroz y el exceso de humedad y el tizón esclerótico
20 de los vegetales, plantas floríferas y brotes de vegetales madereros. Además, el antibiótico T-7545 es sustancialmente inofensivo para el hombre y los animales, así como para los peces, y no afecta sustancialmente a la germinación, crecimiento, rendimiento y otras características
25 de las plantas útiles, incluso cuando se aplica en alta con-

10 JUL.



404388

centración.

La presente composición venenosa económica puede contener el caldo de cultivo de una cepa productora de antibiótico T-7545 perteneciente al género Actinomycetes, un filtrado del mismo, un concentrado del mismo, o una preparación purificada del mismo. También se puede emplear antibiótico T-7545 en forma de base libre, o como sales con ácidos orgánicos o inorgánicos adecuados (es decir, ácido oxálico, ácido succínico, ácido sulfúrico, ácido clorhídrico, etc) o con metales (por ejemplo sodio, cobalto, cobre, aluminio, calcio, etc.). Además, es permisible emplear un éster o éter del antibiótico, por ejemplo, que puede ser obtenido esterificando el hidroxilo del T-7545 con un ácido (por ejemplo ácido acético, ácido malónico o ácido málico).

La presente composición venenosa económica puede ser aplicada de cualquier manera adecuada. Así, dependiendo del objeto de la aplicación, del tiempo de aplicación, del método de aplicación, etc, la composición puede ser aplicada directamente como tal, tras disolución o dispersión en un vehículo líquido adecuado, o tras mezcla con un vehículo sólido adecuado. Si se desea, por adición de un agente emulsificante, dispersante, agente de suspensión, adsorbente, penetrador, agente humectante, espesador, estabilizador y/o coadyuvante, la presente composición pue-



404388

de ser usada en formulaciones tan variadas como solución en aceite, emulsión, polvo humedecible, solución acuosa, polvo soluble, polvo, tabletas, gránulos y pulverización, etc.

5 Además, es permisible el uso de tal composición tras haber sido compuesta o mezclada con otros germicidas tales como germicidas de cobre, germicidas de azufre orgánico, germicidas de cloro orgánico, germicidas de fósforo orgánico, otros antibióticos, etc, insecticidas tales
10 como insecticidas de cloro orgánico, insecticidas de fósforo orgánico, insecticidas de ácido carbámico, insecticidas naturales, etc, acaricidas, nematocidas, herbicidas, reguladores del crecimiento de las plantas, agentes sinérgicos, atractivos, repulsores, perfumes, sustancias nutri-
15 tivas para plantas, abonos, y similares.

El objeto principal de la invención es proporcionar el nuevo antibiótico T-7545, y un método para prepararlo.

20 Otro objeto es proporcionar un fungicida para combatir enfermedades bacterianas o fúngicas de plantas, sin fitotoxicidad sustancial.

Otro objeto es proporcionar un fungicida que es sustancialmente no tóxico contra tanto los seres humanos como los animales, así como los peces.

25 Otro objeto es proporcionar una forma concen-

404388



trada de dicho fungicida, que es aplicable al hùésped simplemente diluída en el momento del uso, con el mismo fin que se acaba de mencionar, y que es estable y más conveniente que la composición diluída, en almacenamiento y transporte, para su fácil uso en la planta.

Otro objeto es proporcionar un fungicida sistémico que muestra fuerte acción de infiltración en las plantas.

Otros objetos serán evidentes por la descripción detallada que sigue en esta memoria descriptiva.

El antibiótico T-7545 se obtiene por cultivo de una cepa productora de T-7545, perteneciente a los actinomicetes, siempre que sea capaz de producir el antibiótico T-7545. Por ejemplo, se puede emplear de manera particularmente ventajosa la cepa que fué aislada de la tierra por los autores de la presente invención, recogida en la ciudad Akashi, prefectura de Hyogo, Japón, y denominada Streptomyces hygrosopicus var. limoneus, así como sus cepas relacionadas.

A continuación se muestran algunas de las características microbiológicas y de cultivo del Streptomyces hygrosopicus var. limoneus. En las siguientes descripciones de las características de cultivo, "Rdg" significa el nombre del color según la "Norma de color y nomenclatura de color" de Ridgeway.

404388



(1) Características morfológicas

El micelio aéreo de esta cepa muestra ramifi-
cación monopodial, y la cadena del conidio se forma en es-
piral. Son ovoides o rectangulares, comprendidos entre
5 1,0 - 1,3 μ X 1,0 - 1,5 μ , y tienen superficie lisa.

(2) Características de cultivo

Las siguientes características de cultivo, a
no ser que se indique otra cosa, son las observadas por
cultivo a 28°C. Cuando se llevó a cabo el cultivo a cual-
10 quier temperatura distinta de 28°C, se indica tal tempera-
tura entre paréntesis.

a. Agar de Czapek

Crecimiento: incoloro, doblado

15 Reverso: siena crudo (Rdg., III, 17-i) a
marrón sudán (Rdg., III, 15-k).

Micelio aéreo: ante Tilleul (Rdg., XL,

17''-f) a ante ligero

20 (Rdg., XV, 17'-f), parcial-
mente gris ratón (Rdg., LI,
15''') a lo largo de la peri-
feria de la colonia.

Pigmento soluble: amarillo con débil matiz parduzco.

b. Agar de Czapek glucosa

Crecimiento: incoloro a amarillo sulfina

25 (Rdg., IV, 21-i), doblado



404388'

- Reverso: siena crudo.
- Micelio aéreo: ante Tilleul a amarillo litargirio (Rdg., XVI, 21'-f), parcialmente gris aceituna claro (Rdg., LI, 23'''-d) a lo largo de la periferia de la colonia.
- 5 Pigmento soluble: amarillo con débil matiz parduzco.
- c. Agar de Czapek glicerina
- Crecimiento: incoloro a citrina naranja (Rdeg., 10 IV, 19-k), doblado.
- Reverso: siena crudo.
- Micelio aéreo: ante Tilleul a amarillo litargirio, parcialmente gris aceituna claro.
- 15 Pigmento soluble: amarillo con débil matiz parduzco.
- d. Agar de asparagina glucosa
- Crecimiento: incoloro.
- Reverso: oro viejo (Rdg., XVI, 19'-i) a amarillo antimonio (Rdg., XV, 17'-b) a marrón cinamomo (Rdg., XV, 15'-k).
- 20 Micelio aéreo: gris aceituna claro a gris ratón, con parches amarillos y áreas húmedas negras.
- 25 Pigmento soluble: marrón claro.



404388

e. Agar de malato cálcico

Crecimiento: amarillo primulina (Rdg., XVI, 19').

Reverso: amarillo primulina.

Micelio aéreo: escaso primero, pero después ante Ti-

5 lleul a gris aceituna claro.

Pigmento soluble: amarillo pálido.

f. Agar de almidón

No hay crecimiento.

g. Agar de almidón modificado con los siguientes componen-

10 tes:

Almidón soluble 1%

Monohidrogenofosfato potásico 0,3%

Carbonato cálcico 0,3%

Sulfato de magnesio 0,1%

15 Sulfato amónico 0,2%

Cloruro sódico 0,05%

Agar 2%

Crecimiento: incoloro a amarillo bario (Rdg., XVI, 23'-d).

20 Reverso: ante colonial profundo (Rdg., XXX, 21"-b) a marrón rapé (Rdg., XXIX, 15"-k).

Micelio aéreo: ante cartucho (Rdg., XXX, 19"-f) a gris ratón, con áreas húmedas negras.

Pigmento soluble: marrón claro.

25 Se observó hidrólisis del almidón.



404388'

- h. Agar de tirosina
Crecimiento: incoloro a amarillo estróncico
(Rdg., XVI, 23')
Reverso: ante ocre pálido (Rdg., XV, 15'-f)
5 a ante ocre claro (Rdg., XV, 15'-d).
Micelio aéreo: ninguno.
Pigmento soluble: ninguno.
- i. Agar de extracto de levadura
Crecimiento: incoloro, doblado.
10 Reverso: color crema (Rdg., XVI, 19'-f).
Micelio aéreo: blanco.
Pigmento soluble: marrón claro.
- j. Agar Nutriente (37°C)
Crecimiento: incoloro.
15 Reverso: incoloro.
Micelio aéreo: ninguno.
Pigmento soluble: ninguno.
- k. Agar Nutriente de glucosa (37°C)
Crecimiento: incoloro, arrugado.
20 Reverso: ante cartucho a ante ocre pálido.
Micelio aéreo: ninguno.
Pigmento soluble: ninguno.
- l. Caldo Nutriente (37°C)
Crecimiento: crecimiento superficial incoloro,
25 y crecimiento floculento incolo-



404388

- ro en el fondo.
Micelio aéreo: ninguno.
Pigmento soluble: ninguno.
- 5 m. Caldo Nutriente de glucosa (37°C)
Crecimiento: crecimiento superficial ante cartucho, y crecimiento floculento incoloro en el fondo.
Micelio aéreo: ninguno.
Pigmento soluble: ninguno.
- 10 n. Taco de patata
Crecimiento: incoloro a ante ocre pálido.
Micelio aéreo: ante Tilleul a gris ratón.
El taco se vuelve marrón sayal (Rdg., XXIX, 15"-i).
- 15 o. Taco de zanahoria
Crecimiento: incoloro.
Micelio aéreo: blanco a gris ratón.
El taco se vuelve bermejo cinamomo (Rdg., XIV, 11"-i) a marrón cinamomo.
- 20 p. Celulosa
Crecimiento: amarillo chartreuse (Rdg., XXXI, 25"-d) a amarillo caña (Rdg., XXX, 23"-b).
Micelio aéreo: gris ratón.
- 25 Pigmento soluble: amarillo pálido.

404388



- q.- Gelatina (25°C)
Crecimiento: muy pobre.
Micelio aéreo: ninguno.
Pigmento soluble: ninguno.
5 La gelatina es licuada ligeramente.
Lo mismo sucede con gelatina nutriente.
- r. Huevo entero (37°C)
Crecimiento: incoloro.
Micelio aéreo: ninguno.
10 Pigmento soluble: ninguno.
- s. Leche de tornasol (37°C).
Crecimiento: crecimiento superficial, color
crema a rosa concha marina
(Rdg., XIV, 11'-f).
15 Micelio aéreo: ninguno.
El medio es coagulado débilmente, y luego pep-
tonizado, para pasar a marrón ejército (Rdg.,
XL, 13''-i), y se hace débilmente ácido.
- t. Medio de Löffler (37°C)
20 Crecimiento: amarillo nápoles (Rdg., XVI,
19'-d) primero, y ante claro
después.
Micelio aéreo: ninguno,
Pigmento soluble: ninguno.
25 No hubo licuación.

404388



u. Agar de glucosa peptona

Crecimiento: amarillo chartreuse.

Reverso: amarillo miel.

Micelio aéreo: fino, ante crema.

5 Pigmento soluble: amarillo con matiz parduz-
co.

v. Agar solo

Crecimiento: crecimiento escaso e incoloro es
la sustancia del medio.

10 Reverso: incoloro a gris ratón.

Micelio aéreo: escaso, ante Tilleul a gris
ratón.

Pigmento soluble: ninguno.

(3) Propiedades fisiológicas

15 a) Temperatura e intervalo de pH

No hay crecimiento a 10°C y 50°C en agar
de Bennett ni agar de asparagina glucosa,
bajo condiciones aerobias. El crecimiento
tiene lugar a de 15 a 45°C, y mejor creci-
20 miento a de 37 a 45°C. No hay crecimiento
cuando el medio está a pH 4. Aunque hay cre-
cimiento a pH de 5 a 10, el intervalo ópti-
mo es a pH de 6 a 7.

b) Gelatina: ligeramente licuada.

25 c) Almidón: hidrolizado.



404388

Diámetro del área hidrolizada/diámetro de la colonia = 33 mm/8 mm.

- d) Reacción de tirosinasa: negativa.
- e) Leche de tornasol: peptonizada. Coagulación dudosa.
- f) Reducción de nitrato: negativa.
- g) Hidrólisis de celulosa: negativa.
- h) Cromogenicidad: negativa.
- i) Producto: antibiótico T-7545.

10 (4) Utilización de fuentes de carbono

La tabla 1 muestra la utilización de fuentes de carbono por la presente cepa, según se examina por el método de Pridham y otros (Journal of Bacteriology, 56, 107-114 (1948)).

15 Tabla 1. - Utilización de fuentes de carbono por Streptomyces hygroscopicus var. limoneus

	Eritrita	-	Inosita	++
	Adonita	-	D-mannita	++
	Sorbita	+	Dulcita	-
20	D-xilosa	++	Trehalosa	++
	L-arabinosa	++	Salicina	-
	L-sorbosa	-	Esculina	-
	D-galactosa	++	Inulina	++
	Glucosa	++	Dextrano	+
25	D-fructosa	++	Mannosa	++

404388



	L-ramnosa	‡‡	Almidón	‡‡
	Melibiosa	‡‡	Glicerina	‡‡
	Maltosa	‡‡	Acetato sódico	‡
	Sacarosa	‡‡	Succinato sódico	‡
5	Lactosa	‡‡	Citrato sódico	‡
	Rafinosa	‡‡	2-cetogluconato cálcico -	

‡‡ = bien utilizada

‡ = bastante utilizada

- = no utilizada

10 Así, la presente cepa muestra ramificación mono-
 podial, estando arrollada la punta de su micelio aérec. Los
 conidios tienen superficie lisa. Da un crecimiento de ama-
 rillo brillante a color ante en medios sintéticos, general-
 mente; no produce pigmento marrón soluble en medios que
 15 contienen proteínas.

 Las anteriores características de cultivo fueron
 comparadas con las descripciones dadas en "Bergey's Manual
 of Determinative Bacteriology" (Manual de Bergey de bacte-
 riología determinativa), 7ª ed. (The Williams and Wilkins,
 20 1957); S.A. Waksman, "The Actinomycetes" (Los actinomic-
 etos), vol. 2 (The Williams and Wilkins, 1962); y Ralph
 Hütter, "Systematik der Streptomyceten" (Sistemática de
 los estreptomicetos), (Es. Karugas, 1967), por ejemplo.
 Se halló que la cepa se parece al Streptomyces ambofaciens,
 25 Streptomyces platensis y Streptomyces hygroscopicus.



404388

Sin embargo, a pesar del gran parecido en color a tanto los micelios vegetativos como aéreos, el Streptomyces ambofaciens y la presente cepa difieren entre sí en que el primero no da manchas húmedas negras en el micelio aéreo, 5 licúa la gelatina en grado medio, y da un crecimiento flocculento amarillo en la parte licuada, y utiliza fuentes de carbono diferentes de las utilizadas por la presente cepa. El Streptomyces platensis se diferencia de la presente cepa porque el primero produce un micelio vegetativo aceituna 10 profundo en agar de Czapek, haciéndose aceituna oscuro el reverso de la colonia al pasar el tiempo; da un crecimiento de crema a amarillento sucio en agar de almidón, cambiando el color de su micelio aéreo de blanco a gris ratón con parches negros; y en que utiliza fuentes de carbono 15 diferentes de las utilizadas por la presente cepa. La comparación de las descripciones del Streptomyces hygrosopicus con las características de cultivo de la presente cepa muestra que la presente cepa se diferencia del Streptomyces hygrosopicus en que el crecimiento o el reverso 20 de la colonia de la presente cepa muestra un color amarillo claro a ante en agar de Czapek (incluyendo el agar de Czapek glucosa y el agar de Czapek glicerina), agar de asparagina glucosa, agar de malato cálcico y otros medios, y produce un micelio de blanco amarillento a amarillo en dichos 25 medios de agar de Czapek. Sin embargo, muchas de las ca-

404388



racterísticas de cultivo de esta cepa coinciden con las características estables del Streptomyces hygrosopicus indicadas por Tresner y Backus (Applied Microbiology, vol. 4, pág. 243, 1956). Por tanto, se ha identificado la presente cepa como una variante de Streptomyces hygrosopicus, y ha sido designada Streptomyces hygrosopicus var. limoneus. Esta cepa ha sido depositada en el Instituto de la Fermentación, Osaka, bajo los números de acceso IFO-12703.

10 Como carácter general de los actinomicetos, sus características microbiológicas son muy mutantes, y el Streptomyces hygrosopicus var. limoneus no es excepción a la regla. Por ejemplo, sus características de cultivo y esquema de utilización de fuentes de carbono están pres-
15 tos al cambio, y puede haber muchos mutantes. Particularmente, de esta cepa se obtienen fácilmente mutantes que tienen micelios aéreos amarillos, por ejemplo un mutante designado como IFO-12704 tiene propiedades similares a las de la cepa IFO-12703, salvo en que tiene micelios aéreos
20 amarillos que no se hacen higroscópicos. Sin embargo, incluso estos mutantes pueden ser empleados en la invención, siempre que posean la capacidad de producir el antibiótico T-7545. Desde luego, no importa que los mutantes sean inducidos espontánea o artificialmente.

25 En el medio de cultivo empleado en la invención

404388



se incorporan fuentes de carbono asimilable, fuentes de nitrógeno digestible, sales inorgánicas y similares. Si se requiere, se pueden añadir elementos de traza tales como trazas de nutritivos, factores de crecimiento, precursores, etc, al medio de cultivo. Entre las fuentes de carbono que asimila la cepa productora de T-7545 se incluyen, entre otras, los hidrocarburos, glucosa, sacarosa, maltosa, almidón, dextrina y glicerina. Entre las fuentes de nitrógeno se incluyen compuestos nitrogenados orgánicos tales como extracto de carne, harina de soja, líquido de maceración de maíz, peptona, caseína, etc, así como compuestos nitrogenados inorgánicos tales como nitratos y compuestos amoniacos, y cualquiera de ellos puede ser empleado ventajosamente.

Aunque el cultivo puede ser efectuado por cultivo en superficie, es más usual adoptar el cultivo sumergido aerobio. En el caso del cultivo sumergido, el pH del medio es preferiblemente casi neutro, y mientras tiene lugar el crecimiento a la temperatura de incubación de 20 a 40°C, es preferible mantener el medio dentro del intervalo de aproximadamente 23 a 37°C. La acumulación del antibiótico buscado se completa generalmente en de 4 a 7 días.

El T-7545 no inhibe el crecimiento de bacterias y hongos en ensayos in vitro, sino que solo provoca en



404388

Pellicularia sasakii y hongos próximamente relacionados una ramificación anormal (ramificación excesiva, o las hifas ramificadas adoptan una forma tipo umbela) en las puntas de las hifas. Por tanto, la biodeterminación del presente
5 antibiótico T-7545 debe efectuarse de la siguiente manera.

Se usan Pellicularia sasakii y simple agar como organismo de ensayo y medio de determinación, respectivamente. El organismo de ensayo es cultivado en un bisel de agar de sacarosa patata, durante de 2 a 5 días, y el cultivo resultante es usado para inocular en el centro de
10 una placa Petri de 9 cm, de medio de Pfeffer modificado, que luego es incubada a 27°C durante 2 días. Al final de este período, el micelio se habrá extendido por toda la superficie de la placa. El crecimiento en la circunferencia de aproximadamente 3 a 3,5 cm de radio desde el
15 centro es cortado con un taladrador de corchos, y el disco de agar así obtenido es usado como inoculador.

Se prepara una serie de dilución en serie de placas de agar que contienen una concentración variable del antibiótico T-7545, de la misma manera que en el método usual de dilución de agar.
20

En el centro de cada una de las placas de agar en serie de dilución, antes mencionada, se pone un disco de vidrio de 8 mm de diámetro y aproximadamente 0,2 mm de espesor, y luego se pone sobre el disco de vidrio el disco
25



404388

inoculador de agar. Tras incubar a 27°C durante 40 horas, se evalúa el resultado. Un examen a simple vista revela que la punta de las hifas del organismo de ensayo que crece a partir del disco inoculador de agar experimenta una ramificación anormal. La unidad de dilución significa el valor de la máxima dilución a la que la solución es capaz de mostrar tal ramificación anormal. La solución acuosa que contiene 1000 gammas/ml de T-7545-A o T-7545-B purificada presenta 100.000 unidades de dilución/ml y 1500 unidades de dilución/ml, respectivamente.

El medio de Pfeffer modificado que se emplea en esta determinación tiene la siguiente composición:

	Sacarosa	3%
	L-asparagina	0,2%
15	Nitrato amónico	0,3%
	Dihidrogenofosfato potásico	0,1%
	Sulfato de magnesio	0,1%
	Velsenol [®] (Dow Chemical)	0,001%
	Agar	1,2%
20	Ajustado a pH 7.	

Antes de usar el medio se añaden las siguientes vitaminas en las cantidades especificadas (peso por ml de medio):

	Tiamina	1 gamma/ml
25	Riboflavina	1 "

404388



	Pantotenato cálcico	1 gamma/ml
	Niacina	1 "
	Biotina	0,005 "
	Acido fólico	0,5 "
5	Clorhidrato de piridoxina	2 "
	Acido p-aminobenzoico	0,5 "
	Cianocobalamina	0,0002 "

²²Compuesto quelato, etilendiaminotriacetato de hierro sodio etanol.

10 Cuando el Streptomyces hygrosopicus var. limoneus es cultivado de la manera anterior, el antibiótico T-7545 es producido y acumulado principalmente en la fase líquida del caldo. Por tanto, para recuperar el antibiótico T-7545 es preferible filtrar el caldo y recuperar luego el antibió-

15 tico del filtrado resultante. Cuando el microorganismo empleado es capaz de producir solo uno de los dos antibióticos T-7545-A y T-7545-B, el antibiótico producido puede ser recogido, desde luego, del caldo de cultivo, de manera usual por sí misma. Sin embargo, en caso de que el microor-

20 ganismo empleado pueda producir ambos simultáneamente, son acumulados concomitantemente en el caldo, de manera que ambos antibióticos pueden ser recogidos del caldo en forma de una mezcla de ellos, o como antibióticos individuales T-7545-A o T-7545-B.

25 Con el fin de aislar los antibióticos se pueden

404388



emplear, individualmente o en combinación, los medios que se emplean usualmente para recuperar los metabolitos de microorganismos a partir de sus caldos. Así, entre los medios se incluyen técnicas tales como filtración, concentra-
5 ción, cromatografía de intercambio de iones con intercambia-
dores de iones, cromatografía de adsorción sobre carbono ac-
tivo, gel de sílice, alúmina, etc, filtración de gel con
Sephadex (marca registrada de Pharmacia), Bio-Gel-P (BIO.
RAD Laboratories), etc, uso de diversos disolventes para lle-
10 var el soluto a otra fase líquida, precipitación, eliminación
de impurezas, diálisis, secado y recristalización, entre
otros.

Para la separación de impurezas y purificación del
antibiótico T-7545, por ejemplo, es soluble en agua, y se
15 usan sus propiedades básicas; por ejemplo, cuando están pa-
sando impurezas de menor peso molecular, solubles en agua,
el antibiótico T-7545 puede ser adsorbido sobre carbono ac-
tivo y eluido con un alcohol acuoso ácido y/o acetona acuo-
sa.

20 El antibiótico T-7545 puede ser adsorbido fuerte-
mente sobre resinas intercambiadoras de cationes, cuando es-
tá en estado de solución neutra o débilmente ácida, y ser
eluido con solución tamponizada, solución básica, o una so-
lución salina acuosa. El antibiótico T-7545 también puede
25 ser adsorbido débilmente sobre resinas intercambiadoras de



404388'

aniones, y eluido con agua.

La separación de los antibióticos T-7545-A y T-7545-B se lleva a cabo por cromatografía de intercambio de iones, usando resinas intercambiadoras de cationes y aniones tamponizadas. Por ejemplo, el antibiótico T-7545 puede ser adsorbido en Dowex 50Wx2, tamponizado con tampón de piridina-ácido acético (pH 5-6), y el T-7545-B es eluido con la solución tamponizada (pH 6,2-6,8) mientras que el T-7545-A es eluido con la solución tamponizada (pH 7-7,5). Cuando se usa Dowex lx2 se eluye primero el antibiótico T-7545-A, y luego se eluye el T-7545-B con agua. Cuando se usa gel de sílice como adsorbente, se eluye primero el antibiótico T-7545-B, y luego sigue el T-7545-A con n-propanol-ácido acético-agua (4:1:1).

Entre las resinas intercambiadoras de iones (fuertes o débiles) que se pueden emplear para el fin anterior, se pueden mencionar, por ejemplo, la Amberlite IR-100, 112 y 120, Amberlite XE-69, Amberlite IRC-50, Amberlite XE-89, Amberlite XE-64, Amberlite IR-45 e IRA-900 (todas las resinas anteriores con marca registrada de Rohm and Haas Co.), Dowex 50x2, Dowex lx2, Dowex lx8 (estas tres resinas son marca registrada de Dow Chemical Co.), Duolite CS-65 (marca registrada de Chemical Process Co.), Permutit-50 (marca registrada de Permutit Co.), etc. Estas resinas pueden ser preparadas por métodos tales como



20 May 1972

404388

los descritos en "Ion Exchange Resin" (Resinas intercambia-
 doras de iones) (Robert Kumin, publicado por John Wiley &
 Sons, Inc, Nueva York, N.Y. EE.UU., págs. 89-97) o los
 descritos en las referencias de la literatura allí citadas,
 5 y el tamaño de partícula y grado de reticulación apropiados
 deben ser elegidos para cada tipo de resina, según la fase
 o etapa concreta del procedimiento.

Entre las sales antes mencionadas no solo
 se incluyen las sales alcalinas de ácidos fuertes, tales co-
 10 mo cloruro sódico y cloruro amónico, sino también las sales
 alcalinas de ácidos orgánicos tales como acetato sódico,
 acetato amónico, etc, así como las sales de ácidos débiles
 o bases débiles, tales como las de ácido acético, piridina
 y similares.

15 La sustancia deseada, que ha sido purificada
 suficientemente (pureza del 80% o mayor) de las maneras an-
 tes mencionadas, es derivada a su clorhidrato (1 mol), que
 puede ser purificado más, por cristalización con una mez-
 cla de metanol y acetona, en forma de polvo cristalino.
 20 Por tanto, tanto la forma libre de la sustancia como su
 sal cálcica (por ejemplo clorhidrato, sulfato, sulfonato
 orgánico) pueden ser usadas ventajosamente para su purifica-
 ción.

Los antibióticos que pueden ser obtenidos
 25 así tienen las siguientes propiedades físicas, químicas y
 fisiológicas:

- (1) Propiedades físicas y químicas del anti-
 biótico T-7545-A.
 - a. Aspecto, p.f. etc.
 - Polvo higroscópico blanco, débilmente

404388



básico, que no tiene punto de fusión definido y se descompone a 100-135°C.

b. Solubilidad

5 Fácilmente soluble en agua y disolventes orgánicos polares (por ejemplo metanol, piridina, dimetilformamida, sulfóxido de dimetilo, etc); escasamente soluble en acetona y etanol); e insoluble en acetato de etilo, éter y éter de petróleo.

c. Reacciones de color

10	Reacción de Molish	positiva
	Reacción de Fehling (bajo calentamiento)	"
	Reacción de antrona	"
	Reacción de ácido fenolsulfónico	"
15	Reacción de ácido orcinolsulfónico	"
	Reacción de ácido naftorresorcinsulfónico	"
	Reacción de peryodato de bencidina	"
	Reacción de detección de péptido (hipoclorito de terc-butilo)	"
20	Permanganato potásico alcalino	reduce
	Reacción de ninhidrina	débil color púrpura

d. pK'a y peso molecular

	pK'a	6,2
25	peso molecular estimado por titulación	510±25

404388



car con pentóxido de fósforo a 60°C durante 6 horas, bajo presión reducida, la muestra aún muestra presencia de agua.

C, 47,6 \pm 1,5%; H, 7,17 \pm 0,5%; N, 3,01 \pm 0,5%

5

j. Cromatografía en papel y cromatografía en capa delgada.

10

La tabla 1 muestra los valores de R_f medidos por cromatografía en papel, en papeles Whatman nº 1, y los medidos por cromatografía en capa delgada, en gel de sílice. Como reactivo detector se usa una solución alcalina de permanganato potásico (una solución acuosa que contiene 2% de carbonato sódico y 1% de permanganato potásico).

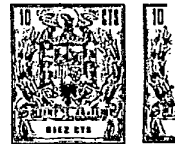
404388



Tabla 2

Sistema disolvente	Cromatografía sobre papel		Cromatografía sobre capa delgada T-7545-A
	T-7545-A	Clorhidrato de T-7545-A	
n-butanol:ácido acético:agua (4:1:2)	0,10-0,12	0,10-0,12	0,10
Acetona acuosa al 70%	0,44	0,37-0,44	0,53
n-butanol:etanol:agua:amoníaco acuoso concentrado (40:10:49:1)	0,11-0,12	0,11-0,12	0,08
Acetato de etilo:ácido acético:agua (3:1:3)	0,01	0,01	0,00
Acetato de etilo:piridina:agua(2:1:2)	0,01-0,02	0,01-0,02	0,01
n-butanol:piridina:agua(4:2:1)	0,05	0,05	0,18
n-butanol:piridina:agua(4:3:7)	0,46-0,48	0,46-0,48	0,27
Fenol al 80% (NH ₃)	0,55	0,55	0,38
n-butanol:etanol:agua:piridina (35:15:40:10)	0,35-0,39	0,35-0,39	0,44
n-propanol:agua:amoníaco acuoso concentrado (70:29:1)	0,06-0,07	0,06	0,07
n-propanol-ácido acético:agua(4:1:1)	-	-	0,30

404388



k. Electroforesis

La electroforesis en papel se llevó a cabo usando tampón de ácido bórico 0,05M (pH 10), a una diferencia de potencial eléctrico de 2 KV durante 2 horas, y usando piridina-ácido acético (pH 6,0) a una diferencia de potencial eléctrico de 2 KV durante 3 horas.

El espectro de movilidad de la presente sustancia es como sigue:

10	Tampón de ácido bórico (pH 10)	+1,5 cm
	Tampón de piridina-ácido acético (pH 6,0)	-8,5 cm

l. Sal de ácido

El antibiótico T-7545-A tiene propiedades débilmente básicas, y forma una sal con ácidos (por ejemplo ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, ácidos sulfónicos orgánicos, etc.).

(2) Propiedades físicas y químicas del antibiótico

T-7545-B

a. Aspecto, p.f., etc-

Polvo higroscópico blanco débilmente básico, que no tiene punto de fusión definido, y se descompone a de 95 a 140°C.

b. Solubilidad

Fácilmente soluble en agua y disolventes orgánicos polares (por ejemplo metanol, piridina, dimetilfor-



404388

mamida, sulfóxido de dimetilo. etc); escasamente soluble en acetona y etanol; e insoluble en acetato de etilo, éter y éter de petróleo.

c. Reacciones de color

5	Reacción de Molish	Positiva
	Reacción de Fehling (bajo calentamiento)	"
	Reacción de antrona	"
	Reacción de ácido fenolsulfónico	"
10	Reacción de ácido orcinolsulfónico	"
	Reacción de ácido naftorresorcín-sulfónico	"
	Reacción de peryodato de bencidina	"
	Reacción de detección de péptido (hipoclorito de terc-butilo)	"
15	Permanganato potásico alcalino	Reduce
	Reacción de ninhidrina	Débil color púrpura

d. pK'a y peso molecular

20	pK'a	5,0
	Peso molecular estimado por titulación	520 \pm 25

e. Espectro de absorción ultravioleta

25	No se observa absorción característica a más de 210 m μ .
----	---



20 y

404388

f. Espectro de absorción infrarroja

Bandas de absorción significativas 3400(F), 2910(M)
1638(M), 1415(M)
1080(F), 1025(F)
900(M), 840(M)

5

Las abreviaturas "M", "D" y "F" entre paréntesis indican adsorciones medias, adsorciones débiles y adsorciones fuertes.

10

g. El espectro de resonancia magnética nuclear de la muestra sugiere la presencia de protones de metina (-C-H) adyacentes al oxígeno.



h. Rotación óptica

$$[\alpha]_D^{23} = 102 \pm 10^\circ \quad (c = 1, \text{H}_2\text{O})$$

15

i. Análisis elemental

Elementos constituyentes: C, H, N y O. Tras secar con pentóxido de fósforo a 60°C durante 6 horas, bajo presión reducida, la muestra aún muestra presencia de agua.

20

C, 46,46±1,5%; H, 7,06±0,5%; N, 2,44±0,5%.

j. Cromatografía en capa delgada

El valor R_f fué 0,43, medido por cromatografía en capa delgada en gel de sílice, en la que se usa como reactivo de detección una solución alcalina de permanganato potásico (solución acuosa

25



404388'

que contiene 2% de carbonato sódico y 1% de permanganato potásico), y como revelador n-propanol: ácido acético:agua (4:1:1).

k. Electroforesis

5 La electroforesis en papel se efectuó usando tampón de ácido bórico (pH 10) a una diferencia de potencial eléctrico de 2 KV durante 2 horas, y usando piridina:ácido acético (pH 6) a una diferencia de potencial eléctrico de 2 KV durante 3 horas.

10 El espectro de movilidad de la presente sustancia es como sigue:

Tampón de ácido bórico (pH 10)	+ 5,0 cm
Tampón de piridina:ácido acético (pH 6,0)	- 4,0 cm

- - 15 l. Sal de ácido

El antibiótico T-7545-B tiene propiedades de base débil, y forma una sal con ácidos (por ejemplo ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, ácidos sulfónicos orgánicos, etc).

20 3. Propiedades biológicas del antibiótico T-7545

El espectro antimicrobiano se muestra en la tabla 2.

El medio de determinación usado fué un medio de Pfeffer modificado (antes indicado) para hongos filamentosos comunes y levaduras, agar de caldo glucosa para hongos filamentosos patógenos y bacterias patógenas de plantas, agar de caldo

25



404388'

para bacterias comunes, y agar de caldo glicerina para bacterias resistentes a los ácidos. En cada caso, se empleó el método de dilución de agar por rayas.

5

Tabla 3

Espectros antimicrobianos del T-7545

	<u>Organismo determinado</u>	<u>Condiciones de la determinación</u>	<u>Mínima concentración inhibitoria, gammas/ml</u>	
			<u>T-7545-A</u>	<u>T-7545-B</u>
	<i>Piricularia oryzae</i>	28°C, 40 hrs.	>100	>100
10	<i>Pellicularia sasakii</i>	28°C, 40 hrs.	>100	>100
	<i>Colletotrichum lagenarium</i>	28°C, 40 hrs.	>100	>100
	<i>Alternaria kikuchiana</i>	28°C, 40 hrs.	>100	>100
	<i>Aspergillus niger</i>	28°C, 40 hrs.	>100	>100
15	<i>Penicillium chrysogenum</i>	28°C, 40 hrs.	>100	>100
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	28°C, 40 hrs.	>100	>100
	<i>Candida albicans</i>	28°C, 40 hrs.	>100	>100
20	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	28°C, 40 hrs.	>100	>100
	<i>Xanthomonas oryzae</i>	28°C, 40 hrs.	>100	>100
	<i>Bacillus subtilis</i>	37°C, 14 hrs.	>100	>100
	<i>Staphylococcus aureus</i>	37°C, 14 hrs.	>100	>100
	<i>Sarcina lutea</i>	37°C, 14 hrs.	>100	>100
25	<i>Escherichia coli</i>	37°C, 14 hrs.	>100	>100
	<i>Proteus vulgaris</i>	37°C, 14 hrs.	>100	>100
	<i>Mycobacterium avium</i>	37°C, 40 hrs.	>100	>100
	<i>Mycobacterium ATCC 607</i>	37°C, 40 hrs.	>100	>100



404388

5 En las tablas 3 y 4 se muestran las actividades de las presentes sustancias contra varios hongos patógenos de plantas, según se mide por el método aplicando el mismo método de determinación microbiológica antes descrito.

10 En las tablas, cada cifra significa el valor de la dilución máxima que origina ramificación anormal por una solución acuosa (1 mg/ml) del antibiótico T-7545-A o T-7545-B purificados, respectivamente.

Tabla 4

Actividades del T-7545-A contra hongos patógenos de plantas

15

Organismo determinado	Valor de la máxima dilución que origina ramificación anormal en la punta de las hifas
Pellicularia sasakii	100.000
Rhizoctonia solani	50.000
Corticium rolfsii	< 100
Phytophthora infestans	< 2000

20



404388'

Tabla 5

Actividades del T-7545-B contra hongos patógenos de plantas

5	Organismo determinado	Valor de la máxima dilución que origina ramificación anormal en la punta de las hifas
	Pellicularia sasakii	1500
	Rhizoctonia solani	< 20
	Corticium rolfsii	<100
10	Phytophthora infestans	<2000

Así, aunque el T-7545 no inhibe un cierto número de microorganismos, incluyendo incluso el Pellicularia sasakii, en los métodos de ensayo ordinarios (in vitro),
15 mostró un notable efecto de control contra el tizón de la vaina de la planta de arroz, in vivo.

El espectro ultravioleta, espectro de absorción infrarroja, espectro de resonancia magnética nuclear, análisis elemental, y demás propiedades químicas del antibiótico T-7545, sugieren que es un antibiótico de aminociclitol, que contiene glucosa en la molécula.
20

Sin embargo, el presente antibiótico difiere de los antibióticos conocidos de aminociclitol, o sus compuestos relacionados, en cuanto a microorganismos de partida, propiedades físicas y químicas, así como propiedades fisio-
25



20 11

404388

lógicas. Por tanto, se considera que el presente antibiótico es un antibiótico nuevo. El T-7545-A y T-7545-B tienen espectros de absorción infrarroja y espectros de absorción ultravioleta casi iguales, pero el valor R_f en cromatografía en capa delgada, la movilidad en electroforesis en papel a alto voltaje, y el $pK'a$ son claramente diferentes entre sí, y pueden ser separados por cromatografía de líquido.

Aunque estos antibióticos no muestran actividad antimicrobiana sustancial in vitro, tienen fuerte efecto protector de las plantas vivas, contra Pellicularia sasakii, Leptosphaeria salvinii, Rhizoctonia solani, Corticium rolfsii, Phytophthora infestans, Sclerotinia sclerotium, Xanthomonas oryzae, Cladosporium fulvum, de manera que estos antibióticos de la invención pueden ser utilizables como fungicidas agrícolas o componentes del mismo. Se pueden usar en forma de composición pulverulenta, líquida o granular, con o sin coadyuvantes o diluyentes. La concentración de estos antibióticos en tales composiciones puede ser generalmente de aproximadamente 0,0001 a aproximadamente 80%, aunque la concentración puede variar con las plagas a tratar o con el estado o con otras características.

Las toxicidades de las sustancias antibióticas T-7545-A y T-7545-B son como sigue:

a) La toxicidad del antibiótico T-7545-A, que es



404388

uno de los ingredientes eficaces de la presente composición, puede confirmarse, por ejemplo, administrando intravenosamente el antibiótico T-7545-A a ratones, y midiendo el valor DL₅₀, o midiendo la dosis letal media para el Oryzias latipes. Los resultados de tales medidas se muestran en la tabla 1.

Tabla 6.- Toxicidad agua del T-7545-A

Animal de ensayo	Método de ensayo	Toxicidad
Ratón	Inyección intravenosa	DL ₅₀ > 2000 mg/kg
<u>Oryzias latipes</u>	Dejar en solución acuosa	DL _m > 4C ppm

b) La toxicidad del antibiótico T-7545-B, que es otro ingrediente eficaz de la presente composición, puede ser confirmada, por ejemplo, administrando intravenosamente el antibiótico T-7545-B a ratones, y midiendo el valor DL₅₀, o midiendo la dosis letal media para Oryzias latipes. Los resultados de tales medidas se muestran en la tabla 2.

Tabla 7.- Toxicidad aguda del T-7545-B

Animal de ensayo	Método de ensayo	Toxicidad
Ratón	Inyección intravenosa	DL ₅₀ > 2000 mg/kg
<u>Oryzias latipes</u>	Dejar en solución acuosa	DL _m > 40 ppm



404388

Las concentraciones de ingrediente activo en los presentes fungicidas, listos para su uso, está usualmente comprendida entre aproximadamente 0,0001% y aproximadamente 1,0% en peso, más preferiblemente entre aproximadamente 5 0,0003% y aproximadamente 0,3% en peso, en el caso de la forma líquida (es decir, solución, suspensión o emulsión), mientras que en el caso de composición sólida es preferible de aproximadamente 0,01% a aproximadamente 30% en peso, o mejor de aproximadamente 0,1% a aproximadamente 20% en pe- 10 so. Sin embargo, si es necesario, se pueden usar composiciones que contengan una concentración mayor o menor que el valor antes mencionado. El contenido del ingrediente activo en la composición puede ser de aproximadamente 0,5% a aproximadamente 80% en peso, en relación a la composición, cuando 15 do se prepara en forma de concentrado.

Ejemplo 1

Se añade 0,4% de carbonato cálcico precipitado a una mezcla acuosa (pH 7) que contiene 3% de glucosa, 2,2% 20 de harina de soja y 0,3% de peptona. Se miden porciones de 50 ml de 4 litros de esta mezcla, y se introducen en matraces erlenmeyer de 200 ml, que luego son esterilizados. Cada matraz es inoculado con 1 ml de un cultivo de siembra de Streptomyces hygrosopicus var. limoneus (IFO-12703), que 25 ha sido preparado por cultivo con agitación en un medio que



404388

tiene la misma composición que antes, durante 2 días, y se ha incubado a 28°C durante 114 horas, en un agitador rotatorio a 200 rpm. Los caldos resultantes son combinados y filtrados. El método produce 2,8 litros de un caldo filtrado. (Este caldo contiene 200 gammas/ml de T-7545-A y 150 gammas/ml de T-7545-B). Alternativamente, el cultivo de Streptomyces hygrosopicus var. limoneus (IFO-12704) muestra un resultado similar.

10

Ejemplo 2

Se añade 0,4% de carbonato cálcico precipitado a una mezcla acuosa (pH 7) que contiene 3% de glucosa, 2,2% de harina de soja y 0,3% de peptona. Se miden porciones de 500 ml de 2 litros de esta mezcla, y se introducen en 4 matraces sakaguchi de 2 litros de capacidad, que luego son esterilizados. Cada matraz es inoculado con un bucle de un cultivo en bisel de Streptomyces hygrosopicus var. limoneus (IFO-12703). Los matraces inoculados son incubados a 28°C durante 2 días, en un agitador alternativo que tenía una amplitud de carrera de 10 cm a 120 carreras/min, para preparar un cultivo de siembra. Por otra parte, en un depósito de acero inoxidable, de 200 litros de capacidad, se cargan 100 litros de un medio preparado añadiendo 0,6% de carbonato cálcico precipitado a una mezcla acuosa (pH 7) que contiene 5% de glucosa, 3,6% de harina de soja y 0,5% de peptona. La mezcla



404388

del depósito es esterilizada, y luego es inoculada con 2
litros del cultivo de siembra antes mencionado, y se incuba
a 27°C durante 114 horas, bajo condiciones de aireación al
50% y 200 rpm. El cultivo es filtrado usando como coadyuvan-
5 te de filtración 4 kg de tierra de diatomeas, y se obtie-
nen 68 litros de un caldo filtrado que contiene una mezcla
de 100 gammas/ml de T-7545-A y 150 gammas/ml de T-7545-B.
Se obtienen resultados sustancialmente similares cuando se
emplea un cultivo de Streptomyces hygrosopicus var. limo-
10 neus (IFO-12704).

Ejemplo 3-A

Se añaden 13,6 kg de carbono activo a 680 litros
de un caldo filtrado (que contiene 100 gammas/ml de T-7545-A
15 y 150 gammas/ml de T-7545-B) obtenido de igual forma que en
el ejemplo 2. La mezcla es agitada durante 1 hora, de manera
que los ingredientes activos contenidos en el caldo filtrado
son adsorbidos sobre el carbono activo. El carbono activo
así tratado es recogido luego por filtración, seguida por
20 lavado dos veces con respectivas porciones de 136 litros de
agua. El carbono activo así lavado es sometido dos veces a
elución de los ingredientes activos con porciones de 136 li-
tros de una mezcla de acetona:ácido clorhídrico 0,5N (7:3),
con lo que se obtienen 272 litros de eluido que luego es
25 llevado a través de una columna rellena con 20 litros de



404388

Amberlite IR-45 (forma OH). La solución pasada es concentra-
da bajo presión reducida, seguida por adición de 10 veces
su volumen de acetona, obteniéndose 4,2 kg de una sustancia
cruda que contiene 10 gammas/mg de T-7545-A y 15 gammas/mg
5 de T-7545-B (rendimiento, aproximadamente 62%).

Ejemplo 3B

Se añaden 13,6 kg de carbono activo a 680 litros
de un caldo filtrado (que contiene 100 gammas/ml de T-7545-A
10 y 150 gammas/ml de T-7545-B) obtenido de igual manera que
en el ejemplo 2. La mezcla es agitada durante 1 hora, de ma-
nera que los ingredientes activos contenidos en el caldo
filtrado son adsorbidos sobre el carbono activo. El carbono
activo así tratado es recogido luego por filtración, segui-
15 da por lavado dos veces con respectivas porciones de 136
litros de agua. Una columna (70 litros), rellena de carbono
activo así tratado, es sometida a elución con 250 litros
de agua saturada de butanol, de manera que el ingrediente
eficaz es eluído del carbono activo. El eluído es concentra-
20 do bajo presión reducida, y se le añade 10 veces su volumen
de acetona, obteniéndose 770 g de una mezcla cruda que con-
tiene 70 gammas/mg de T-7545-A y 100 gammas/mg de T-7545-B
(rendimiento, aproximadamente 80%).

404388



Ejemplo 4

El caldo filtrado obtenido de igual manera que en el ejemplo 2 (680 litros que contienen 100 gammas/ml de T-7545-A y 150 gammas/ml de T-7545-B) es llevado a través de una columna rellena de 55 litros de Amberlite IR-120 (H, V.E. = 5), y luego a través de otra columna rellena de 65 litros de Amberlite IR-45 (OH, V.E. = 5). Estas columnas son lavadas con 120 litros de agua, y los lavados son combinados luego con la solución pasada. La solución combinada es pasada (V.E. = 2) a través de una columna rellena de 60 litros de Dowex 50Wx-2 (H, 297-149 micras), para adsorber en la resina los ingredientes activos.

Tras lavar con 350 litros de agua, los ingredientes activos son eluidos con 200 litros de NH_4OH 0,5N. Tras haber retirado los 30 litros iniciales del efluente, se recogen los 125 litros siguientes, y se concentran bajo presión reducida, seguido por adición de 10 veces su volumen de acetona, obteniéndose 420 g de ingredientes activos crudos, en polvo, que contienen aproximadamente 150 gammas/mg de T-7545-A y 200-250 gammas/mg de T-7545-B (rendimiento, 92%).

Ejemplo 5

Se disuelven 420 g del polvo crudo obtenido en el Ejemplo 4, en 21 litros de tampón de piridina:ácido acético (0,1M, pH 6,0). La solución es vertida a V.E. = 2 sobre la

404388



columna rellena de 35 litros de Dowex 50x-2 (297-149 micras), tamponizada con la misma solución tampón que antes, con lo que los ingredientes activos son adsorbidos en la resina.

5 Se vierten además en la columna 75 litros de la misma solución tampón, de manera que se eluyan las impurezas y pigmentos, seguido por elución de T-7545-B con 125 litros de tampón de piridina:ácido acético (0,1M, pH 6,5) a V.E.=2, y luego se recogen 75 litros del eluido, correspondientes a
10 3 - 5 fracciones (25 litros/fracción) que muestran reacción positiva al reactivo antrona. El eluido así recogido es concentrado bajo presión reducida, seguido por liofilización, con lo que se obtienen 112 g (750 gammas/mg) de T-7545-B
15 90%.

 En la columna de la que se ha eluido el T-7545-B se vierten 500 litros de tampón de piridina:ácido acético (0,1M, pH 7,5) a V.E. =2, y después se recogen 250 litros del eluido correspondiente a 5-14 fracciones (25 litros/fracción),
20 que muestran reacción positiva al reactivo antrona. El eluido así recogido es concentrado bajo presión reducida, seguido por liofilización, con lo que se obtienen 75 g (750 gammas/mg) de T-7545-A en forma de polvo. El rendimiento es aproximadamente 90%.

404388

20 JUN 1972

Ejemplo 6

Se disuelven en 210 ml de agua 42 g cogidos de la mezcla (que contiene 150 gammas/mg de T-7545-A y 200-250 gammas/mg de T-7545-B) obtenida en el ejemplo 4. Se hace pasar
5 la solución a través de una columna rellena de 600 ml de Amberlite IRA-900 (OH) (841-250 micras), seguido por elución sucesiva con agua, para recoger 200 ml de cada uno de los efluentes, fraccionadamente.

Se detectan las fracciones que contienen los ingredientes activos positivos al reactivo antrona, y luego se dividen las fracciones en fracciones ricas en T-7545-A (fracciones 3ª a 7ª) y fracciones ricas en T-7545-B (fracciones 8ª a 16ª), con ayuda de cromatografía en capa delgada.

Las primeras fracciones (fracciones ricas en T-7545-A)
15 son combinadas entre sí, luego se les añade una pequeña cantidad de Amberlite IRC-50 (H), seguido por ajuste del pH a 8. La solución es concentrada bajo presión reducida, y luego se le añade 10 veces su volumen de acetona, dando 5,6 g de sustancia cruda que contiene 650-700 gammas/mg de T-7545-A y
20 250-300 gammas/mg de T-7545-B.

Se efectúa el mismo método en las últimas fracciones (fracciones ricas en T-7545-B), dando 9,5 g de sustancia cruda que contiene 200 gammas/mg de T-7545-A y 600-700 gammas/mg de T-7545-B. Rendimiento, aproximadamente 85%.

404388



Ejemplo 7

5 A 150 g de carbono activo grado cromatográfico (Tokusei-Thirasagi, vendido por Takeda Chemical Industries Ltd, Japón) se añaden 450 ml de agua, seguida por adición
gota a gota de HCl N, hasta hacer igual a 3 el pH del líquido que sobrenada. La mezcla es introducida en una columna de 750 ml (la relación entre su altura y su diámetro es igual a 10), y luego se lava la columna con agua, para hacer el pH del lavado igual a 3,5. Se hace pasar a través
10 de esta columna, a V.E. = 3, una solución que contiene 8,5 g de T-7545-A crudo, obtenido de la misma manera que en el ejemplo 5 (750 gammas/mg), en 750 ml de HCl N/500, para adsorber el ingrediente activo.

15 La columna es lavada con 3 litros de HCl N/500, seguido por elución del ingrediente activo con una mezcla de metanol y HCl N/500 (3:7). Se retira el medio litro inicial de efluente, y se recogen 2,0 litros del efluente siguiente, que es incoloro y positivo a la reacción de la antrona. La fracción activa así obtenida se hacer pasar a
20 V.E. = 5 a través de una columna (200 ml, siendo la relación de su altura a su diámetro igual a 6), rellena de Amberlite IR 45 (OH) que ha sido previamente lavado con metanol acuoso al 30%, para recoger la solución pasada. La columna es lavada con 500 ml de metanol acuoso al 30%, para lavar
25 los ingredientes activos que permanecen en la columna.



404388

La solución pasada es combinada con el lavado y concentrada a presión reducida. Se añade al concentrado 10 veces su volumen de acetona, obteniéndose 5,4 g de T-7545-A casi puro (950-1000 gammas/mg), en forma de polvo blanco (rendimiento, aproximadamente 85%).

El mismo método que antes, con 8,5 g de T-7545-B crudo (750 gammas/mg) obtenidos de la misma manera que en el ejemplo 5, da 5,7 g de T-7545-B casi puro (950-1000 gammas/mg), en forma de polvo blanco (rendimiento, aproximadamente 85%).

Ejemplo 8

Se disuelven en 30 ml de agua, 5,6 g de polvo crudo rico en T-7545-A (700 gammas/mg de T-7545-A, 300 gammas/mg de T-7545-B), obtenido de la manera descrita en el ejemplo 6. La solución es vertida en la columna (la relación altura a diámetro es 30), rellena de 500 ml de resinas (Dowex lx2, OH), para adsorber en las resinas los ingredientes activos. Las resinas son sometidas a elución con agua. El efluente es recogido en fracciones de 500 ml cada una, mientras se examina la presencia de ingredientes activos en cada fracción con ayuda del reactivo antrona, con lo que se detecta T-7545-A en las fracciones 5^a-7^a, y T-7545-B en las fracciones 17^a-25^a. Las primeras fracciones mencionadas son concentradas bajo presión redu-



404388

cida, seguida por liofilización, con lo que se obtienen
3,6 g de T-7545-A (1000 gammas/mg). El rendimiento es
aproximadamente 90%. Las últimas fracciones mencionadas
son concentradas bajo presión reducida seguida por lio-
5 filización, con lo que se obtienen 1,3 g de T-7545-B
(1000 gammas/mg). El rendimiento es aproximadamente
80%.

Se disuelven en 50 ml de agua 9,5 g de
polvo crudo rico en T-7545-B (700 gammas/mg de T-7545-B,
10 180 gammas/mg de T-7545-A) obtenido de la manera descrita
en el ejemplo 6. La solución es vertida en la columna
(la relación altura a diámetro es 30) rellena con 1 li-
tro de resina (Dowex 1 x 2, OH), para adsorber los in-
gredientes activos en la resina. La resina es sometida
15 a elución con agua. El efluente es recogido en fraccio-
nes de 500 ml cada una, mientras se examina la presencia
de ingredientes activos en cada fracción, con ayuda del
reactivo antrona, con lo que se detecta T-7545-A en las
fracciones 9^a-11^a, y T-7545-B en las fracciones 35^a-60^a.
20 Las primeras fracciones mencionadas son concentradas
bajo presión reducida, seguida por liofilización, con
lo que se obtienen 1,45 g de T-7545-A (1000 gammas/mg).
El rendimiento es aproximadamente 85%. El mismo método
con las últimas fracciones mencionadas, da 5,5 g de
25 T-7545-B (1000 gammas/mg). El rendimiento es aproxima-



404388

mente 83%.

Ejemplo 9

5 Se disuelven en 50 ml de metanol 1 g ex-
traído de la mezcla cruda de T-7545-A y T-7545-B, rica
en T-7545-A, obtenida en el anterior ejemplo 6. La so-
lución es mezclada a fondo con 1 g de gel de sílice, y
la mezcla es secada bajo presión reducida. La mezcla
seca es puesta en la parte superior de la columna
10 (1,3 cm x 90 cm) rellena de gel de sílice, seguido por
cromatografía en columna, eluyendo con n-propanol:áci-
do acético:agua (4:1:1), con ayuda de cromatografía en
capa delgada.

15 Luego se observa que primero se eluye el
T-7545-B y después el T-7545-A. Las respectivas fraccio-
nes, que contienen cada uno de los ingredientes activos,
son recogidas, y cada una de las fracciones es sometida
a concentración bajo presión reducida, seguida por pre-
cipitación con acetona, obteniéndose 190 mg de T-7545-B
20 en forma de polvo blanco (rendimiento, aproximadamente
65%) y 420 mg de T-7545-A en forma de polvo blanco (ren-
dimiento, aproximadamente 60%).

20 JU



404388

Ejemplo 10

5 Se disuelven en 20 ml de metanol 1 g de polvo purificado de T-7545-A, obtenido de la manera descrita en los ejemplos 7, 8 ó 9. Se añaden a la solución 2 ml de HCl N, y después se eliminan por destilación el agua y metanol, obteniéndose 1 g de clorhidrato de T-7545-A.

10 El mismo método que antes, con 1 g de polvo purificado de T-7545-B, obtenido de la manera descrita en los ejemplos 7, 8 ó 9, da 1 g de clorhidrato de T-7545-B.

Experimento 1

15 Ensayo de represión del tizón de la vaina del arroz.

Método de ensayo

Plantas del ensayo: arroz

20 Se plantaron las plantas (variedad Kinmaze) en tiestos de tierra de 9 cm de diámetro, 3 rizomas por tiesto. Se sometieron a ensayo los brotes, 80 días después de plantar, y se usaron 6 tiestos por grupo.

25 Método de inoculación: Se cultivó el hongo patógeno Pellicularia sasakii en una placa de infusión de patata-azúcar-agar, a 30°C durante 48 horas, y su disco de agar, de 10 mm de diámetro, fué cortado de una colonia perifé-

404388



rica. El disco fué insertado en el espacio interior de la vaina de la hoja, cerca de la superficie de la tierra, un disco por tallo. Los tiestos fueron mantenidos en un invernadero de vinilo, a temperatura ambiente de 5 32 a 25°C y humedad relativa de 100 a 70%. La inoculación fué efectuada inmediatamente después de haberse secado al aire la droga aplicada en el ensayo de profilaxis, y 3 días antes de la aplicación, en el ensayo de curación.

10 Aplicación de la droga: Se prepararon una serie de soluciones acuosas preparadas a partir de caldo de cultivo, de 10.000 unidades de dilución/ml, de Streptomyces hy-
groscopicus var. limoneus, y preparaciones líquidas diluídas de drogas activas de control comerciales. A
15 cada una de estas soluciones y preparaciones se añadió 0,05% (concentración final) de Dyne (extensor manufacturado por Takeda Chemical Industries Ltd., que contiene 20% de éter alcohilarílico de polioxietileno y 12% de ligniu-
20 sulfonato cálcico), y la mezcla fué pulverizada uniformemente sobre el follaje, mediante una pistola de pulverización, en cantidad de 30 ml por 6 tiestos. El cultivo de la cepa productora de antibiótico se efectuó de la manera siguiente. Se midieron en matraces erlenmeyer de 200 ml unas porciones de 60 ml de un medio líquido, y
25 cada matraz fué inoculado con 1 bucle de la cepa ante-



404388

rior. Los matraces fueron incubados a 28°C durante 5 días, en un agitador rotatorio a 200 rpm.

5 El medio anterior tenía la siguiente composición: 3% de glucosa, 2,2% de harina de soja cruda, 0,3% de peptona y 0,4% de carbonato cálcico.

Método de determinación: 10 días después de la aplicación de la droga se midió directamente la longitud de cada tallo, desde el nivel del suelo hasta el borde superior de la lesión.

10

Resultados

Tabla 8.- Efecto del caldo cultivado en la represión del tizón de la vaina (longitud media de las lesiones/tallo (cm))

Droga	Dosis	Efecto preventivo	Efecto de curación	Daño a la planta
Control sin tratar	-	27,9	30,1	-
Concentrado emulsificable de Polyoxylin PS(1)	x 600	6,4	15,0	-
Polvo humedecible Monzet (2)	x2.000	0	1,1	↓↓
Caldo de cultivo de <u>Streptomyces hygroscopicus</u> var. <u>limoneus</u>	Sin diluir	0	0,4	-
	x 2	0	0,4	-
	x 4	0	0,7	-
	x 8	0	1,2	-
	x 16	0	1,5	-
	x 32	0	3,7	-



404388

Evaluación

Hasta un múltiplo de dilución de 16, el caldo de cultivo fué muy eficaz, tanto respecto a profilaxis como a tratamiento, contra el tizón de la vaina del arroz, y no se observó ningún daño en absoluto a la planta.

Notas: (1) Contenía 30.000 unidades PS/g como Polyoxin B (PS son las iniciales de Pellicularia sasakii, y "unidad PS/g como Polyoxin B" significa las unidades/g de la fracción eficaz de Polyoxin B contra Pellicularia sasakii).

(2) Contenía 20% de bis-dimetiltiocarbamato de metilarsina, 20% de dimetilditiocarbamato de cinc y 40% de disulfuro de bis-(dimetilditiocarbamoilo).

15 Experimento 2

Ensayo de represión del tizón de la vaina del arroz, por inyección al terreno.

Método de ensayo

Plantas de arroz del ensayo: las mismas que en el experimento 1.

Método de inoculación: el mismo que antes

Aplicación de la droga: unas soluciones acuosas de polvo de T-7545-A fueron pulverizadas según el método del experimento 1, o inyectadas en el terreno en cantidad de 5 ml por tiesto.

404388



Método de determinación: como en el experimento 1.

Resultados

5 Tabla 9. Efecto de represión del tizón de la vaina, por inyección en el terreno (longitud media de las lesiones/ tallo (cm))

Droga	Concen- tración	Efecto preventi- vo	Efecto de curación	Pitotoxici- dad	
Control sin tra- tar	-	25,2	28,7	--	
Pulve- riza- ción	20 ppm.	0,7	1,5	--	
	40 ppm.	0	0,6	--	
	80 ppm.	0	0,3	--	
T-7545-A	20 ppm.	0,6	1,3	--	
	Inyec- ción en el te- rreno	40 ppm.	0	0,5	--
	30 ppm.	0	0,4	--	

Evaluación

El T-7545-A fué eficaz contra el tizón de la vaina del arroz, tanto por inyección en el terreno como por pulverización.

No se observó daño a la planta, tampoco en el tratamiento de antes del brote.



404388

Experimento 3

Ensayo de represión del tizón de la vaina del
arroz

Método de ensayo

5 Plantas de ensayo: Unas plantas de arroz (variedad Kinma-
ze) fueron plantadas en tiestos Wagner a/5000, 3 rizomas
por tiesto. Se usaron para el ensayo 5 tiestos por grupo,
en estado en que tenían espigas.

10 Método de inoculación: Según el experimento 1, se acopló
un disco de agar de 20 mm de diámetro, a la vaina de la
hoja, cerca de la superficie de la tierra, a razón de 1
disco por 2 tallos, y los tiestos fueron puestos en un
invernadero de vinilo.

15 Aplicación de la droga: 5 días después de la inoculación,
se aplicó T-7545-A en dosis de 100 ml por 5 tiestos, como
en el experimento 1.

Método de determinación: se siguió el método del experi-
mento 1, a los 21 y 35 días, respectivamente, después
del tratamiento.

20 Resultados

Tabla 10.- Efecto del T-7545-A para represión del tizón
de la vaina (longitud media de las lesiones/tallo (cm))



404388'

Drogas	Concentra- ción	Efecto de curación		Fito- toxicidad
		tras 21 días	tras 35 días	
Control sin tra- tar	-	32,5	56,3	-
Concentrado emul- sificable de Po- lyoxin PS	x 600	14,0	24,5	-
Polvo humedeci- ble Monzet	x2.000	9,9	10,1	++
	5 ppm	10,9	15,8	-
	10 ppm	9,5	9,6	-
	20 ppm	9,2	9,2	-
T-7545-A	40 ppm	9,0	9,0	-

Evaluación

5 A la concentración de 10 ppm o más, el T-7545-A fué muy eficaz en el tratamiento tras la aparición de la enfermedad, y suprimió la formación de nuevas lesiones durante más de 1 mes tras la exposición. No se observó ningún daño en absoluto, incluso a la concentración de 40 ppm.

Experimento 4

10 Ensayo de represión de la putrefacción del tallo del arroz.
Método de ensayo



404388

Plantas de ensayo: igual que en el experimento 3.

Aplicación de la droga: igual que antes

5 Método de inoculación: Se cultivaron hongos patógenos Hel-
minthosporium sigmoideum en un medio de paja de arroz,
a 28°C durante 14 días/trozo (2 cm de longitud)/tallos
del cultivo resultante fué dispuesto en el espacio in-
terior de la vaina de la hoja de abajo de cada tallo
de planta de arroz, tras haberse secado al aire la droga
pulverizada. Después se empleó el método del experimento
10 1, y los tiestos fueron puestos en un invernadero de vi-
nilo.

Método de determinación: 14 días después de la inocula-
ción se midió la longitud de la lesión en cada tallo.

Resultados

15 Tabla 11.- Efecto del T-7545-A en la represión de la pu-
trefacción del tallo (longitud media de las
lesiones/tallo (cm))

	Droga	Concentra- ción	Preventiva	Fitotoxicidad
20	Control sin tratar	-	8,5	-
	Polvo humede- cible Fumiron (3)	x 2.500	2,1	-
		x 1.250	0,6	±
		10 ppm	2,3	-
	T-7545-A	20 ppm	1,8	-
25		40 ppm	0,4	-

404388



Evaluación

A la concentración de 10 ppm o más, el T-7545-A mostró fuerte efecto sobre la putrefacción del tallo.

5 Nota: (3) Contiene 5% de yoduro fenilmercúrico

Experimento 5

Ensayo de represión contra el exceso de humedad en el pepino

10 Método de ensayo

Se cultivó Rhizoctonia solani en un medio de cebada a 28°C durante 5 días. Una muestra de tierra del campo fué empaquetada en tiestos de tierra, de 9 cm de diámetro, que luego fueron esterilizados con vapor de agua. El inoculador fué amasado uniformemente en la tierra de arriba de cada tiesto, hasta una profundidad de aproximadamente 3 cm, en cantidad de 2 g/tiesto. Los tiestos fueron mantenidos en una cámara de inoculación a 28°C durante 24 horas, y luego fueron transferidos a un invernadero.

20

Aplicación de la droga: como en el experimento 1, la droga fué pulverizada sobre la superficie de la tierra, en cantidad de 30 ml/6 tiestos/grupo.

Planta de ensayo: unas semillas sanas de pepino (variedad Suyo) fueron sembradas por enterramiento en los

25



4043881

tiestos inmediatamente después del tratamiento, en cantidad de 10 semillas por tiesto. Luego se pusieron los tiestos en un invernadero a de 32 a 28°C.

5 Método de determinación: 14 días después de la siembra, los resultados fueron evaluados frente a los siguientes coeficientes de lesión, y se calcularon los grados de daño.

Coefficientes de lesión (I)

- 0 Sano
- 10 0,5 Solo están ligeramente afectados los pelos de las raíces
- 1 Afectadas las partes aéreas cerca de la superficie de la tierra, y las raíces
- 2 Primera etapa de exceso de humedad.
- 15 3 Afectada la germinación; se inhibe el crecimiento

$$\text{Grado de daño (\%)} = \frac{\sum (nI)}{3 \times 6 \times 10} \times 100$$

20 donde n significa el número de muestras correspondientes a cada coeficiente de lesión.

Resultados

Tabla 12.- Efecto de represión contra el exceso de humedad del T-7545-A

25



404388

<u>Droga</u>	<u>Concentra- ción</u>	<u>Grado de daño, %</u>	<u>Fitotóxicidad</u>
Control sin tratar	-	100	-
Pentacloro- nitrobenceno	x 1.000	10	‡
Polvo humede- cible al 50% (control)	x 500	0	‡‡
	5 ppm	7	-
	10 ppm.	1	-
T-7545-A	20 ppm.	0,3	-
	40 ppm.	0	-

Evaluación

5 A la concentración de 10 ppm o más, el T-7545-A fué muy eficaz contra el exceso de humedad causado por *Rhizoctonia solani*, y no tenía efecto perjudicial sobre la germinación de la semilla ni el crecimiento de los brotes.

Experimento 6

10 Ensayo de control del exceso de humedad en pepinos, por revestimiento de la semilla.

Método de ensayo

Método de inoculación: como en el experimento 5.



404388

Aplicación de la droga: las semillas fueron humedecidas con agua, y luego fueron revestidas ligeramente con un polvo de T-7545-A. Cantidad media de deposición: 80 mg/10 semillas.

5 Planta de ensayo: como en el experimento 5.

Método de determinación: igual que antes.

Resultados

Tabla 13.- Efecto del T-7545-A en la represión del exceso de humedad, por revestimiento de semillas con polvo.

10

	<u>Concentra-</u> <u>ción de ingre-</u> <u>diente eficaz</u>	<u>Polvo de T-7545-A</u> <u>Grado de</u> <u>daño, %</u>	<u>Fitoto-</u> <u>xicidad</u>	<u>Polvo de pentacloronitrobenceno</u> <u>Grado de daño, %</u>	<u>Fitotoxicidad</u>
	0%, control(4)	100	-		
	0,04%	30	-	100	-
20	0,08	16	-	100	-
	0,16	6	-	100	-
	0,32	3	-	95	-
	0,64	1	-	58	-
	1,28	0,3	-	45	-
25	2,56	0	-	24	±
	5,12	0	-	12	±

20 JUL.



404388

Nota: (4) Revestimiento con polvo, con coadyuvante solamente (talco)

Evaluación

5 El T-7545-A fué eficaz contra el exceso de humedad también cuando se aplica como polvo de revestimiento de semillas. En este método tampoco se observó efecto perjudicial.

Experimento 7

10 Ensayo de represión del tizón meridional del pepino

Método de ensayo

15 Método de inoculación: como en el experimento 5, el hongo patógeno Corticium rolfsii fué cultivado durante 10 días, y el cultivo resultante fué introducido en la tierra, en cantidad de 5 g por tiesto. Los tiestos fueron mantenidos como se ha explicado antes.

Aplicación de la droga: como en el experimento 5, la droga fué aplicada en cantidad de 30 ml/6 tiestos/grupo.

20 Plantas de ensayo: igual que en el experimento 5.

Método de determinación: igual que antes

Resultados

Tabla 14.- Efecto del T-7545-A en la represión del tizón meridional

25



404388

<u>Droga</u>	<u>Concentra- ción</u>	<u>Grado de daño, %</u>	<u>Fitotoxi- cidad</u>
Control sin tratar	--	87	--
Pentacloroni- trobenceno (pol- vo humedecible al 50%)	x 4.000	38	--
	x 2.000	17	↓
	x 1.000	2	↓
	5 ppm.	21	--
	10 ppm.	13	--
T-7545-A	20 ppm.	6	--
	40 ppm.	0	--

Evaluación

A la concentración de 10 ppm o más, el T-7545-A fué eficaz contra el tizón meridional, y no fué perjudicial para la planta.

5

Experimento 8

Ensayo de represión del mildiú pulverulento del pepino.

Método de ensayo

10 Planta de ensayo: pepino sano (variedad Suyo), plantado en tiestos Wagner a/5000. Se usaron grupos de 3 tiestos de brotes, 60 días después de plantar.

15 Método de inoculación: los tiestos anteriores, y otros tiestos en que se habían plantado pepinos que ya estaban infectados con Spacrotheca fuliginea, se dejan unos al

3-7-72



404388

lado de otros, de manera que caigan enfermos por infección natural, respectivamente.

Aplicación de la droga: Se aplica una solución de la droga preparada de la misma manera que en el experimento 2, en cantidad de 100 ml por 3 tiestos.

5

Método de determinación: para esta determinación se emplean hojas de muestra, que estaban sanas antes de la aplicación de la droga, pero que han caído enfermas. Se midió el área de la lesión de 4 hojas por tiesto.

10

Resultados

Tabla 15.- Efecto del T-7545-A sobre la represión del mildiú pulverulento del pepino (área específica media de lesiones/hoja (%))

15	<u>Droga</u>	<u>Concentración</u>	<u>12 días después del tratamiento</u>	<u>Fitotoxicidad</u>
	Muestra sin tratar	-	89,3	-
	Polvo humedecible Karathane (5)	x 2.000	4,3	+
20		12,5 ppm.	6,5	-
	T-7545-A	25 ppm.	3,8	-
		50 ppm.	1,9	-

Evaluación

El T-7545-A fué eficaz como control del mildiú pulverulento, sin tener efecto perjudicial sobre los pepinos.

25



404388

Nota: (5) Contiene 19,5% de crotonato de 2-(1-metilheptil)-
-4,6-dinitrofenilo

Experimento 9

5 Ensayo de represión del tizón tardío del tomate
 Método de ensayo

Plantas de ensayo: Unas plantas de tomate (variedad ponte-
rosa) son plantadas en tiestos de 12 cm de diámetro, una
planta por tiesto. Se usaron los brotes 50 días después de
10 plantar, 6 tiestos por grupo.

Aplicación de la droga: aplicada en cantidad de 100 ml/6
tiestos/grupo, como en el experimento 2.

Método de inoculación: los hongos patógenos (Phytophthora
infestans) fueron cultivados en una placa de infusión de
15 patata-agar, a 20°C durante 10 días, y el cultivo resultan-
te fué usado para preparar una suspensión acuosa de zoosporas
(aproximadamente 10^4 zoosporas/ml). Un día después de la apli-
cación de la droga, las plantas fueron inoculadas por pul-
verización, con 20 ml de la suspensión por tiesto. Los ties-
20 tos fueron mantenidos en una cámara de inoculación a 20°C
durante 24 horas, y luego fueron transferidos a un invern-
dero.

Método de determinación: 7 días después de la inoculación,
se midió el área de cada lesión.

25 Resultados

404388



Tabla 16. - Efecto del T-7545-A en la represión del tizón tardío del tomate

<u>Droga</u>	<u>Concentración</u>	<u>Relación entre área media de lesiones por hoja y la de control, %</u>	<u>Fitotoxicidad</u>
Control sin tratar	=	100	--
Polvo humedecible Daconyl (6)	250 ppm.	21,7	--
	500 ppm.	10,3	--
	12,5 ppm.	25,6	--
T-7545-A	25 ppm.	18,2	--
	50 ppm.	11,4	--

Evaluación

El T-7545-A fué eficaz contra el tizón tardío de la planta de tomate, sin mostrar efecto perjudicial sobre la planta.

5 Nota: (6) Contiene 75% de tetracloroisoftalonitrilo (activa droga de control usada comúnmente)

Experimento 10

10 Ensayo de represión de la putrefacción del tallo de la judía

Método de ensayo

404388



Plantas de ensayo: una planta de judía (variedad Taisho Kintoki) plantada en tiestos de 12 cm de diámetro; se usaron las hojas más superiores completamente desdobladas, 40 días después de plantar, 6 hojas por grupo.

5 Aplicación de la droga: se añadió a cada solución de la droga el extensor Dyne hasta 0,05% (conc. final), y las anteriores hojas fueron sumergidas y dejadas secar inmediatamente al aire.

10 Recipiente de ensayo: se pusieron 10 ml de agua en placas Petri de 9 cm de diámetro, y se puso un anillo de policloruro de vinilo en cada uno de esos recipientes húmedos. Las hojas tratadas fueron puestas encima de los anillos, una hoja por anillo.

15 Método de inoculación: El hongo patógeno Sclerotinia sclerotiorum fué cultivado en una placa de infusión de patata-azúcar, a 20°C durante 5 días, y al final del tiempo de cultivo se cortaron de una colonia periférica algunos discos de agar de 10 mm de diámetro. Cada disco fué puesto en el centro de cada hoja, y luego fué mantenido en un recipiente termostático a 20°C.

20

Método de determinación: 6 días después de la inoculación se midió el área de la lesión en cada hoja.

Resultados

25 Tabla 17.- Efecto del T-7545-A en la represión de la putrefacción del tallo de la judía.



20

404388

Droga	Concen- tración	Relación del área media de lesiones por hoja, %	Fitoto- xicidad
Control sin tratar	-	100	-
Polvo humedecible Earthcide (7)	x1.000	13	-
T-7545-A	25 ppm	18	-
	100 ppm	14	-

Evaluación

El T-7545-A fué eficaz contra la putrefacción del tallo de la judía, y no tenía efecto perjudicial sobre la planta.

- 5 Nota: (7) Contenia 50% de 2,6-dicloro-4-nitroanilina(activa droga de control usada comúnmente)

Experimento 11

10 Ensayos de represión de plagas con compuestos en polvo.

Método de ensayo

Tizón de la vaina: igual que en el experimento 1, los compuestos en polvo fueron aplicados usando un espolvoreador de finos compactos, en cantidad de 300 mg a 6 tiestos, 3 dias des-



404388

pués de la inoculación.

Tizón bacteriano de la hoja: igual que antes, salvo en que se trataron los brotes 25 días después de plantar.

5 La bacteria patógena Xanthomonas oryzae fué cultivada en un medio de sacarosa-caldo, a 28°C durante 1 día, y la hoja más superior de cada brote fué atravesada con una aguja que llevaba una suspensión (10^8 /ml) de las células bacterianas. Los tiestos fueron mantenidos en una cámara de inoculación a 28°C durante 24 horas, y luego se transfirieron
10 los tiestos a un invernadero. 2 días después de la inoculación, los tiestos fueron espolvoreados de la misma manera que antes.

La longitud de cada lesión fué medida 10 días después de la inoculación.

15 Añublo: igual que el tizón bacteriano de la hoja

Los hongos patógenos Pyricularia oryzae fueron cultivados en un medio de infusión de paja de arroz-agar, a 28°C durante 10 días, y los tiestos fueron inoculados por pulverización con una suspensión de los conidios (10^6 /ml),
20 en cantidad de 2 ml por tiesto. Los tiestos fueron mantenidos en una cámara de inoculación a 28°C durante 24 horas. Los tiestos sacados de la cámara fueron espolvoreados de la misma manera que antes, y transferidos luego a un invernadero. 7 días después de la inoculación se midió el área
25 media de la lesión, por el método de Okamoto.



20

404388

Perforador del tallo del arroz: unas plantas de arroz en tientos Wagner a/5000, 60 días después de plantar, y en el 4º día de penetración por las larvas de Chilo suppressalis, fueron espolvoreadas en cantidad de 5 g por 5 tientos.

5 Al 8º día de penetración, los tallos fueron disecados, y se calculó la cantidad de larvas supervivientes.

Saltamontes verde del arroz: inmediatamente después de espolvorear de la misma manera antes descrita para el perforador del tallo del arroz, las plantas de arroz fueron cubiertas con una red, y se liberaron en la red saltamontes adultos (Nephotettix Cincticeps).

10 Al cabo de 1 día se examinaron los resultados y se calculó la cantidad de supervivientes.

Evaluación

15 Las formulaciones con todo mezclado no mostraron reducción de su acción contra el tizón de la vaina y cada una de las plagas usadas, y ninguna de ellas tenía efecto perjudicial sobre las plantas de arroz.

Resultados

20 Los efectos de represión de diversas formulaciones mixtas fueron según se tabulan a continuación.



404388

Tabla 18

Concentración de T-7545-A	Ingrediente mezclado Nombre químico	Concentración	Tizón de la vaina, % de aumento de la lesión (8)	Tizón bacteriano de la hoja, % de longitud de la lesión (8)
0,2%	-	-	12	-
-	2-amino-1,3,4-tiadiazol-5-tiol	5%	-	3
0,2%	2-amino-1,3,4-tiadiazol-5-tiol	5%	12	3
0,3%	-	-	9	-
-	2-formamido-1,3,4-tiadiazol	4%	-	1
0,3%	2-formamido-1,3,4-tiadiazol	4%	8	0
-	2-amino-1,3,4-tiadiazol	3%	-	0
0,2%	2-amino-1,3,4-tiadiazol	3%	3	0
-	3-bencilidénamino-4-feniltiazolino-2-tion	5%	-	8
0,3%	3-bencilidénamino-4-feniltiazolino-2-tion	5%	2	8
0,1%	-	-	15	-
-	Como Polyoxin B	1.000 unidades PS/g	28	-
0,1%	Como Polyoxin B	1.000 unidades PS/g	4	-

Nota: (8) Tanto por ciento (%) con control sin tratar igual a 100.



404388

Tabla 19

Concentración de T-7545-A (%)	Ingredientes mezclados		Tizón de la vaina, % de aumento de la lesión (8)	Añublo, área específica de la lesión (8)
	Nombre químico	Concentración		
0,3%	-	-	10	-
-	S-bencilaminobenceno-sulfonato de blastici-dina	0,2%	-	0,3
0,3%	S-bencilaminobenceno-sulfonato de blastici-dina	0,2%	10	0,3
-	Kasugamicina	0,2%	-	0,4
0,3%	Kasugamicina	0,2%	8	0,3
-	S-benciltiofosfato de O,O-diisopropilo	1,5%	-	2,7
0,3%	S-benciltiofosfato de O,O-diisopropilo	1,5%	5	2,5
-	S,S-difenilditiofosfa-to de O-etilo	2%	-	0,3
0,3%	S,S-difenilditiofosfa-to de O-etilo	2%	3	0,2

Nota: (8) Tanto por ciento (%) con control sin tratar igual a 100



20

404388

Tabla 20

Concentra- ción de T-7545-A %	Ingrediente mezclado Nombre químico	Concen- tración	Tizón de la vaina, % de aumento de la lesión (8)	Cantidad de supervivien- tes, %, del perforador del tallo del arroz (8)
0,2%	-	-	12	-
-	Clorhidrato de 1,3- bis-(carbamoiltio)- 2-(N,N-dimetilamino) -propano	2%	-	1
0,2%	Clorhidrato de 1,3- bis-(carbamoiltio)- 2-(N,N-dimetilamino) -propano	2%	8	0
-	(3-metil-4-nitrofe- nil)-tiofosfato de dimetilo	2%	-	3
0,2%	(3-metil-4-nitrofenil) -tiofosfato de dime- tilo	2%	9	3

Nota: (8) Tanto por ciento (%) con control sin tratar igual a 100.



404388

Tabla 21

Concentra- ción de T-7545	Ingrediente mezclado		Tizón de la vaina, % de aumento de la lesión (8)	Cantidad de supervivien- tes, %, del saltamontes verde del arroz
	Nombre químico	Concen- tración		
0,3%	-	-	9	-
-	N-metilcarbamato de 1-naftilo	1,5%	-	4
0,3%	N-metilcarbamato de 1-naftilo	1,5%	7	2

Nota: (8) Tanto por ciento (%) con control sin tratar igual a 100.

Experimento 12

5 Ensayo de represión del moho de la hoja del toma-
te.

Método de ensayo

Plantas de ensayo: igual que en el experimento 9

Aplicación de la droga: igual que antes

10 Método de inoculación: el hongo patógeno Cladosporium fulvum
fué cultivado en una placa de infusión de patata-sacarosa-
agar, a 20°C durante 14 días, y se preparó a partir del cul-
tivo una suspensión de conidios (10^5 /ml).

15 Las plantas fueron inoculadas por pulverización con
la suspensión 3 días antes de la aplicación de la droga, en

404388



cantidad de 5 ml por tiesto. Los tiestos fueron mantenidos en una cámara de inoculación a 25°C durante 24 horas, y luego fueron transferidos a un invernadero.

Método de determinación: 14 días después de la inoculación, se midió la proporción específica del área media de lesión en las hojas.

Resultados

Tabla 22.- Efecto del T-7545-A en la represión del moho de la hoja de tomate

10

Droga	Concentración	Área específica de la lesión %	Fitotoxicidad
Control sin tratar	-	98,9	-
	12,5 ppm	6,1	-
T-7545-A	25,0 ppm.	3,4	-
	50,0 ppm.	1,7	-

Evaluación

El T-7545-A fué eficaz contra el moho de la hoja de tomate, y no tenía efecto perjudicial sobre las plantas.



404388

Experimento 13

Ensayo de represión del tizón de la vaina del arroz bajo lluvia artificial, para T-7545-A

Método de ensayo

- 5 Plantas de ensayo: arroz, como en el experimento 3.
Método de inoculación: como en el experimento 3.
Aplicación de la droga: como en el experimento 3.
Método de determinación: como en el experimento 3, salvo
 en que se aplicó lluvia artificial en la torre de lluvia,
 10 a 25 mm por 30 min, al cabo de 1 hora desde la aplicación
 de la droga.

Resultados

Tabla 23.- Efecto del T-7545-A en la represión del tizón de la vaina del arroz, bajo lluvia artificial

15

<u>Contenido del ingrediente eficaz</u>	<u>Concentración</u>	<u>Longitud media de la región enferma, cm.</u>
Control sin tratar	-	46,2
Concentrado emulsificable de Polyoxin PS (3%)	x 300	45,8
Polvo humedecible de Monzet	x 2.000	11,4
	12,5 ppm	18,1
	25 ppm	11,4
	50 ppm	12,3
T-7545-A	100 ppm	10,2



404388

Experimento 14

Ensayo de represión del tizón de la vaina del
arroz, en campo

Método de ensayo

5 Lugar del ensayo: Fukuchiyama, Japón

Plantas de ensayo: en este ensayo se usaron plantas de arroz
(variedad Gohyakumangoku) que fueron plantadas en arrozal el
1 de mayo, y brotes en 18 de julio.

10 Método de inoculación: Se cultivaron hongos patógenos Pelli-
cularia sasakii en un medio de paja de arroz de 2 cm de lon-
gitud, a 28°C durante 5 días. Estas pajas fueron insertadas
en el espacio interior de la vaina de la hoja, cerca del
agua del arrozal, el 4 de Julio.

15 Aplicación de la droga: el 11 de Julio y el 17 de julio,
cada droga fué esparcida uniformemente sobre el arrozal,
mediante una pistola de pulverización, en cantidad de 20
litros/área (solución acuosa), y mediante un espolvoreador,
en cantidad de 0,3 kg/área (polvo), respectivamente.

20 Método de determinación: Los resultados fueron evaluados
frente a los siguientes coeficientes de lesión de cada ta-
llo, y se calcularon los grados de daño.

Coefficientes de lesión

3 Formación de mancha de enfermedad en la vaina de la hoja
primaria

25 2 Formación de mancha de enfermedad en la vaina de la hoja



404388

secundaria

1 Formación de mancha de enfermedad en la vaina de la hoja

3^a-4^a

$$5 \quad \text{Grado de daño} = \frac{3x(\text{n}^\circ \text{ de tallos con clasificación 3}) + 2x(\text{n}^\circ \text{ de tallos con clasificación 2}) + 1x(\text{n}^\circ \text{ de tallos con clasificación 1})}{3 \times \text{ todos los tallos ensayados}} \times 100$$

3 x todos los tallos ensayados

Resultados

Tabla 24.- Efecto del T-7545-A en la represión del tizón de la vaina, en campo

Droga	Concen- tración	Longitud me- dia de la le- sión	% de tallos enfermos
Control sin tratar	-	88,2(cm)	100,0%
Concentrado emulsifica- ble de Polyoxin PS(3%)	x 600	48,0	84,4
Solución de Monkit (9)	x2.000	19,8	41,1
Solución de T-7545-A	28 ppm	19,2	45,2
Polvo de T-7545-A	0,28%	16,8	40,3

Nota: (9) Contiene 6,5% de ácido hierro-amonio-metanoar-
sónico



Experimento 15

404388

Ensayo de represión del tizón de la vaina del arroz.

5 Método de ensayo

Plantas de ensayo: como en el experimento 3.

Método de inoculación: como en el experimento 3.

Aplicación de la droga: como en el experimento 3, salvo en que se cambió el T-7545-A por T-7545-B.

10 Método de determinación: 14 días después del tratamiento, se siguió el método del experimento 1.

Resultados

Tabla 25.- Efecto del T-7545-B en la represión del tizón de la vaina (longitud media de lesiones/tallo (cm)).

15

<u>Droga</u>	<u>Contra- ción</u>	<u>Efecto de cu- ración al cabo de 21 días</u>	<u>Fitotoxici- dad</u>
Control sin tratar	-	32,5	-
	10 ppm.	14,5	-
20 T-7545-B	20 ppm	12,6	-
	40 ppm	12,6	-
	80 ppm	12,6	-

25

Evaluación

A la concentración de 20 ppm o más, el



404388

T-7545-B fué muy eficaz en el tratamiento del brote de la enfermedad, y suprimió la formación de nuevas lesiones durante más de 2 semanas después de la exposición. No se observó absolutamente ningún daño, incluso a concentración de 80 ppm.

5

Experimento 16

Ensayo de represión del tizón de la vaina del arroz, para la mezcla de antibióticos T-7545-A y T-7545-B.

10

Método de ensayo

Plantas de ensayo: como en el experimento 1.

Método de inoculación: como en el experimento 1.

Aplicación de la droga: como en el experimento 3, salvo

15

en que se cambió el "T-7545-A" por "T-7545-A" y "T-7545-B" o "una mezcla de ellos".

Método de determinación: como en el experimento 1.

Resultados

Tabla 26.- Efecto de una mezcla de T-7545-A y T-7545-B en la represión del tizón de la vaina.

20



404388

<u>Droga y concentración (ppm)</u>	<u>% de longitud media de la lesión</u>
Control sin tratar	100 (27,8 cm)
T-7545-A (2,5)	23
T-7545-A (5)	11
T-7545-B (6,25)	65
T-7545-B (12,5)	47
T-7545-A (2,5)‡T-7545-B(6,25)	1
T-7545-A (5)‡T-7545-B(12,5)	1

Tabla 27.- Efecto de una mezcla de T-7545-A y T-7545-B en la represión del tizón de la vaina.

<u>Dosis de la droga y concentración, ppm</u>	<u>% de longitud media de la lesión</u>
Control sin tratar	100 (30,1cm)
T-7545-A (5)	25
T-7545-A (10)	21
T-7545-A (20)	2
T-7545-B (10)	76
T-7545-B (20)	7
T-7545-B (40)	4
T-7545-A(8)‡T-7545-B (2)	5
T-7545-A(5)‡T-7545-B (5)	5
T-7545-A(2)‡T-7545-B (8)	42

Evaluación

El T-7545-B fué muy eficaz en el efecto de control del tizón de la vaina; particularmente, una

404388



mezcla de T-7545-B y T-7545-A ha mostrado la gran eficacia de la invención.

Experimento 17

5 Ensayo de control del exceso de humedad en pepino

Método de ensayo

Como en el experimento 5

Resultados

10 Tabla 28.- Efecto del T-7545-B en la represión del exceso de humedad.

	<u>Droga</u>	<u>Concentración</u>	<u>Grado de daño, %</u>	<u>Fitotoxicidad</u>
15	Control sin tratar	-	100	-
	Pentacloroni-trobenceno	x 1.000	10	‡
	Polvo humedecible al 50% (control)	x 500	0	‡‡
20		5 ppm	25	-
		10 ppm	9	-
	T-7545-B	20 ppm	3	-
		40 ppm	1	-

25



404388

Evaluación

A la concentración de 20 ppm o más, el T-7545-B fué muy eficaz contra el exceso de humedad causado por el Rhizoctonia solani, y no tenía efecto perjudicial sobre la germinación de semillas ni el crecimiento de brotes.

Experimento 18

Ensayo de represión del exceso de humedad en el pepino, por revestimiento de las semillas.

Método de ensayo

Como en el experimento 5.

Resultados

Tabla 29.- Efecto del T-7545-B en la represión del exceso de humedad, por revestimiento de las semillas con polvo.

Droga	Concen- tración	Polvo de T-7545-B		Polvo de pentaclo- ronitrobenceno	
		Grado de daño, %	Fitoto- xicidad	Grado de daño, %	Fitoto- xicidad
Control (4)	-	100	-	-	-
T-7545-B	0,625	22	-	100	-
	1,25	8	-	88	-
	2,5	2	-	25	-
	5	0	-	18	‡
	10	0	-	10	‡



404388

Nota: (4) Revestimiento de polvo con solo coadyuvante
(talco)

Evaluación

5 El T-7545-B también es eficaz contra el exceso de humedad cuando se aplica como revestimiento en polvo para semillas. En este método tampoco se observó efecto perjudicial.

Experimento 19

10 Ensayo de represión del exceso de humedad en pepino, con una mezcla de T-7545-A y T-7545-B

Método de ensayo

15 Se cultivó Rhizoctonia solani en un medio de cebada, a 28°C durante 5 días. En 10 kg de muestra de la tierra del suelo, que fueron esterilizados con vapor de agua, se mezclaron 1,2 kg del inoculador cultivado, y la mezcla fué empaquetada uniformemente en el tiesto, hasta una profundidad de aproximadamente 5 cm, y luego se mantuvo en reposo durante 24 horas, bajo humedad re-
20 lativa del 100%, a 28°C. Después, la mezcla es secada a temperatura ambiente durante 2 días, y luego se hace pasar el inoculador cultivado a través de un tamiz, y se filtra. La tierra obtenida, inoculada con Rhizoctonia solani, fué mantenida en tiestos de tierra de 12 cm de
25 diámetro, a razón de 450 g/tiesto.

404388



Aplicación de la droga: como en el experimento 5, la droga fué pulverizada sobre la superficie de la tierra, en cantidad de 40 ml/2 tiestos/grupo.

Método de determinación: como en el experimento 5.

5 Resultados

Tabla 30.— Efecto de una mezcla de T-7545-A y T-7545-B en la represión del exceso de humedad en pepinos

	<u>Droga y concentración, ppm</u>	<u>% de daño</u>
10	Control sin tratar	100
	Pentacloronitrobenceno (500)	16
	Pentacloronitrobenceno (1000)	3
	T-7545-A (10)	69
	T-7545-A (20)	24
15	T-7545-A (40)	11
	T-7545-B (10)	88
	T-7545-B (20)	32
	T-7545-B (40)	16
	T-7545-A (5) † T-7545-B (5)	56
20	T-7545-A (10) † T-7545-B (10)	16
	T-7545-A (20) † T-7545-B (20)	3

404388



Tabla 31.- Efecto de represión del exceso de humedad en pepino

<u>Droga</u>	<u>Concentración método de aplicación</u>	<u>Media de semillas germinadas</u>	<u>% de supervivencia de brotes al exceso de humedad tras 14 días</u>
Control sin tratar	-	0	0
Sin inoculación	-	90	90
T-7545-A	5 ppm; uso de la tierra	20	16
	13 ppm; uso de la tierra	63	53
	26 ppm; uso de la tierra	88	82
	0,625%; revestimiento de semilla con polvo	63	12
	1,25%; revestimiento de semilla con polvo	75	37
	2,5%; revestimiento de semilla con polvo	97	83
	5,0%; revestimiento de semilla con polvo	95	95
	10%; revestimiento de semilla con polvo	92	92

Evaluación

El T-87545-B fué muy eficaz en el efecto de control del exceso de humedad en pepino; particularmente, una mezcla de T-7545-B y T-7545-A ha mostrado la gran efi-



404388

caja de la invención.

Experimento 20

Ensayo de represión del tizón de la vaina del
arroz.

5 Método de ensayo

Planta de arroz del ensayo: como en el experimento 3

Método de inoculación: como en el experimento 3

Aplicación de la droga: igual que en el experimento 1,
salvo en que se aplica cada una de las drogas relaciona-
10 das en cantidad de 30 ml/tiesto, 3 días antes de la ino-
culación.

Método de determinación: como en el experimento 1

Resultados

Tabla 32.- Efecto de represión del tizón de la vaina
15 (longitud media de lesiones/tallo (cm))



404388

Tabla 32-I

<u>Droga</u>	<u>Concentra- ción como T-7545-A</u>	<u>Efecto pre- ventivo tras 14 días, cm</u>	<u>Pitoto- xicidad</u>
Control sin tratar	-	24,3	-
T-7545-mixto [Ⓜ]	12,5 ppm 25 ppm	8,5 7,5	-
Sal de ácido lau- rilsulfónico con T-7545 mixto	25 ppm	2,9	-
Sal de ácido benceno- sulfónico con T-7545 mixto	25 ppm	3,9	-
Sal de ácido p-toluen- sulfónico con T-7545 mixto	25 ppm	4,6	-
Sal de ácido 4-sul- fosalicílico con T-7545 mixto	25 ppm	6,1	-
Sal de ácido sul- fonílico con T-7545 mixto	25 ppm	5,3	-
Sal de ácido flaviánico con T-7545 mixto	25 ppm	5,3	-
Sal de ácido beta- naftalensulfónico con T-7545 mixto	25 ppm	5,1	-

[Ⓜ]T-7545 mixto = mezcla de T-7545-A y T-7545-B (5:3)



404388

Tabla 32-II

<u>Droga</u>	<u>Concentra- ción como T-7545-A</u>	<u>Efecto pre- ventivo tras 14 días, cm</u>	<u>Pitoto- xicidad</u>
Control sin tratar	-	24,3	-
T-7545-A	25 ppm	5,1	-
Sal potásica de T-7545-A	25 ppm	3,4	-
Sal de cinc de T-7545-A	25 ppm	3,6	-
Sal de cobre de T-7545-A	25 ppm	4,6	-
Sal de ácido cítrico de T-7545-A	25 ppm	4,4	-
Sal de ácido tar- tárico de T-7545-A	25 ppm	3,6	-

Tabla 32-III

<u>Droga</u>	<u>Concentra- do como T-7545-A</u>	<u>Efecto pre- ventivo tras 14 días, cm</u>	<u>Pitoto- xicidad</u>
Control sin tratar	-	28,7	-
T-7545 mixto ^{3E}	5 ppm	8,2	-
Sal doble de CaCl ₂ de T-7545- mixto	5 ppm	8,0	-
Acetato de T-7545 mixto	5 ppm	6,9	-
Bencilidén de T-7545 mixto	5 ppm	7,5	-

^{3E} T-7545 mixto = mezcla de T-7545-A y T-7545-B (5:3)



404388

Experimento 21

Ensayo de represión del tizón de la vaina del
arroz

Método de ensayo

- 5 Planta de arroz del ensayo: como en el experimento 1.
Método de inoculación: como en el experimento 1.
Aplicación de la droga: las drogas relacionadas son apli-
cadas en cantidad de 30 ml/tiesto, justamente después de
la inoculación con hongos.
- 10 Método de determinación: como en el experimento 1.

Resultados

Tabla 33.- Efecto de represión del tizón de la vaina (lon-
gitud media de lesiones/tallo (cm))

Tabla 33-I

15	<u>Droga</u>	<u>Concentra- ción como T-7545-A</u>	<u>Efecto de remedio tras 21 días, cm</u>	<u>Fitoto- xicidad</u>
	Control sin tratar	-	23,3	-
	T-7545 mixto ^{3x}	12,5 ppm	4,9	-
		25 ppm	3,5	-
	Sal de ácido beta-naftoquinon- sulfónico con T-7545 mixto	25 ppm	3,5	-
	Sal de ácido 1,5- -naftalendisulfó- nico con T-7545 mixto	25 ppm	3,0	-

404388

20 JUN



<u>Droga</u>	<u>Concentra- ción como T-7545-A</u>	<u>Efecto de remedio tras 21 días, cm</u>	<u>Fitoto- xicidad</u>
Sal de ácido 2-7-naftalendi- sulfónico con T-7545 mixto	25 ppm	1,4	--
Sal de ácido 1,3,6-naftalen- trisulfónico con T-7545 mixto	25 ppm	1,6	--

⊞ T-7545 mixto = mezcla de T-7545-A y T-7545-B (5:3)

Tabla 33-II

<u>Droga</u>	<u>Concentra- ción como T-7545-A</u>	<u>Efecto de remedio tras 21 días, cm</u>	<u>Fitoto- xicidad</u>
Control sin tratar	-	23,3	-
T-7545-A	3,125 ppm 6,2 ppm	2,3 2,3	-- --
Sal de HNO ₃ de T-7545-A	6,2 ppm	3,5	-
Sal de H ₂ SO ₄ de T-7545-A	6,2 ppm	1,9	-
Sal de H ₃ PO ₄ de T-7545-A	6,2 ppm	2,6	-
Sal de HCl de T-7545-A	6,2 ppm	3,7	-
Sal doble de CaCl ₂ de T-7545-A	6,2 ppm	1,2	-

404388



Ejemplos de formulaciones

Ejemplo I

Polvo humedecible

	T-7545-A	1,0%
5	Lignosulfonato sódico	0,1%
	Eter alcohilarílico de polioxietileno	0,1%
	Carbono blanco	0,1%
	Arcilla	98,7%

10 Según el objeto y el método de aplicación,
la anterior formulación es diluída al intervalo de 1 a
200 ppm, en función del antibiótico presente, y la pre-
paración diluída es pulverizada mediante un pulverizador,
es aplicada a la superficie del terreno, o el polvo ante-
15 rior es usado sin diluir, para revestir la semilla.

Ejemplo II

Tabletas

	Clorhidrato de T-7545-A	15,0%
20	Eter alcohilarílico de polioxietileno	2,0%
	Lactosa	83,0%

 Antes de la aplicación, la formulación ante-
rior es diluída hasta el intervalo de concentraciones
25 que se muestra en el ejemplo I.

404388



Ejemplo III

Solución acuosa

	T-7545-A	40,0%
	Metanol	5,0%
5	Estearato de amina	5,0%
	Agua	50,0%

La anterior formulación es diluída hasta el intervalo de 500 a 100.000 ppm, y la preparación diluída es pulverizada mediante un pulverizador de concentrado fino, por ejemplo desde un avión.

Ejemplo IV

Concentrado emulsificable

	T-7545-A	10,0%
15	Eter alcohilarí- lico de polioxie- tileno	5,0%
	Metanol	20,0%
	Metilnaftaleno	40,0%
	Dimetilformamida	25,0%

20 Antes de la aplicación, la anterior formulación es diluída al intervalo de concentraciones que se indica en el ejemplo 1.

404388



Ejemplo V

Polvo

	T-7545-A	0,1%
	Estearato de aluminio	0,02%
5	Talco	99,88%

Según el objetivo y la forma de aplicación, la mezcla anterior, como tal, es espolvoreada mediante un espolvoreador, en cantidad de 1 a 8 kg por 10 áreas, o es usada para revestir las semillas.

10

Ejemplo VI

Polvo mixto A

	T-7545-A	0,2%
	2-amino-1,3,4-tiadiazol-5-tiol	5,0%
15	Estearato de aluminio	0,02%
	Talco	94,78%

La anterior preparación es aplicada según el ejemplo 5.

20

Polvo mixto B

Ejemplo VII

	T-7545-A	0,3%
	2-formamido-1,3,4-tiadiazol	4,0%
	Talco	95,7%

La anterior preparación es aplicada como en el ejemplo 5.

25

404388



Ejemplo VIII

Polvo mixto C

	T-7545-A	0,2%
	2-amino-1,3,4-tiadiazol	3,0%
5	Talco	96,8%

La anterior preparación es aplicada como en el ejemplo 5.

Ejemplo IX

10 Polvo mixto D

	T-7545-A	0,3%
	3-bencilidenamino-4-fenil-tiazolino-2-tiona	5,0%
	Talco	94,7%

15 La anterior preparación es aplicada como en el ejemplo 5.

Ejemplo X

Polvo mixto E

20	T-7545-A	0,3%
	S-bencilaminobencenosulfonato de blasticidina	0,2%
	Talco	99,5%

25 La anterior preparación es aplicada como en el ejemplo 5.

404388



Ejemplo XI

Polvo mixto F

	T-7545-A	0,3%
	Kasugamicina	0,2%
5	Talco	99,5%

La anterior preparación se aplica como en el ejemplo 5.

Ejemplo XII

10 Polvo mixto G

	T-7545-A	0,3%
	S-benciltiofosfato de 0,0-- diisopropilo	1,5%
	Talco	98,2%

15 La anterior preparación se aplica como en el ejemplo 5.

Ejemplo XIII

Polvo mixto H

	T-7545-A	0,3%
20	S,S-difenilditiofosfato de O-etilo	2,0%
	Talco	97,7%

La anterior preparación se aplica como en el ejemplo 5.

404388



Ejemplo XIV

Polvo mixto I

	T-7545-A	0,1%
	Polyoxin (B; 1000 unidades PS/g)	0,1%
5	Talco	99,8%

La anterior preparación se aplica como en el ejemplo 5.

Ejemplo XV

10 Polvo mixto J

	T-7545-A	0,2%
	Clorhidrato de 1,3-bis-(carbamóltio)-2-(N,N-dimetilamino)-propano	2,0%
	Talco	97,8%

15 La preparación anterior se aplica como en el ejemplo 5.

Ejemplo XVI

Polvo mixto K

20	T-7545-A	0,2%
	(3-metil-4-nitrofenil)-tiofosfato de dimetilo	2,0%
	Talco	97,8%

25 La preparación anterior se aplica como en el ejemplo 5.

404388



Ejemplo XVII

Polvo mixto I

	T-7545-A	0,3%
	N-metilcarbamato de l-naftilo	1,5%
5	Talco	98,2%

La anterior preparación es aplicada como en el ejemplo 5.

Ejemplo XVIII

10 Polvo humedecible

	T-7545-B	1,0%
	Ligninsulfonato sódico	0,1%
	Eter alcohilarílico de polioxietileno	0,1%
15	Carbono blanco	0,1%
	Arcilla	98,7%

Según la finalidad y el método de aplicación, la anterior formulación es diluída al intervalo de 2 a 400 ppm, expresado en función del antibiótico presente, y la preparación diluída es pulverizada mediante un pulverizador, aplicada a la superficie del terreno, o el polvo anterior es usado sin diluir, para revestir las semillas.

Ejemplo XIX

25 Tabletas

20
404388



Clorhidrato de T-7545-B	15,0%
Eter alcohilarílico de polioxietileno	2,0%
Lactosa	83,0%

5 Antes de la aplicación, la formulación anterior es diluída al intervalo de concentraciones que se muestra en el ejemplo 18.

Ejemplo XX

Solución acuosa

10	T-7545-B	40,0%
	Metanol	5,0%
	Estearato de amina	5,0%
	Agua	50,0%

15 La formulación anterior es diluída al intervalo de 1000 a 200.000 ppm, y la preparación diluída es pulverizada mediante un pulverizador de concentrados finos, por ejemplo desde un avión.

Ejemplo XXI

20 Concentrado emulsificable

	T-7545-B	10,0%
	Eter alcohilarílico de polioxietileno	5,0%
	Metanol	20,0%
	Metilnaftaleno	40,0%
25	Dimetilformamida	25,0%

404388



Antes de la aplicación, la formulación anterior es diluída al intervalo de concentraciones que se indica en el ejemplo 18.

5

Polvo Ejemplo XXIII

T-7545-B	0,2%
Estearato de aluminio	0,02%
Talco	99,78%

Según el objetivo y modo de aplicación, la mezcla anterior, como tal, es espolvoreada mediante un espolvoreador, en cantidad de 1 a 8 kg por 10 áreas, o es usada para revestir las semillas.

15 Polvo mixto M Ejemplo XXIII

T-7545-B	0,2%
2-amino-1,3,4-tiadiazol	3,0%
Talco	96,8%

La preparación anterior es aplicada como en el ejemplo 5.

25 Polvo mixto N Ejemplo XXIV

T-7545-B	0,4%
S-bencilaminobencenosulfonato de blasticidina	0,2%

404388



Talco 99,4%

La preparación anterior es aplicada como en el ejemplo 5.

5 Ejemplo XXV

Polvo mixto O

T-7545-B	0,4%
Kasugamicina	0,2%
Talco	99,4%

10 La anterior preparación se aplica como en el ejemplo 5.

Ejemplo XXVI

Polvo mixto P

15 T-7545-B	0,4%
S-benciltiofosfato de O,O-dii-sopropilo	1,5%
Talco	98,1%

La anterior preparación es aplicada como en el ejemplo 5.

20

Ejemplo XXVII

Polvo mixto Q

T-7545-B	0,4%
S,S-difenilditiofosfato de O-etilo	2,0%
Talco	97,6%

25 La anterior preparación es aplicada como en el

404388



ejemplo 5.

Ejemplo XXVIII

Polvo mixto R

5	T-7545-B	0,2%
	Polyoxin (B; 1000 unidades PS/g)	0,1%
	Talco	99,7%

La anterior preparación es aplicada como en el ejemplo 5.

10

Ejemplo XXIX

Polvo mixto S

	T-7545-B	0,4%
	Clorhidrato de 1,3-bis-(carbamóltio)-2-(N,N-dimetilamino)-propano	2,0%
	Talco	97,6%

15 La anterior preparación se aplica como en el ejemplo 5.

Ejemplo XXX

Polvo mixto T

20	T-7545-B	0,3%
	(3-metil-4-nitrofenil)-tiofosfato de dimetilo	2,0%
	Talco	97,7%

25 La anterior preparación se aplica como en el ejemplo 5.



404388

Ejemplo XXXI

Polvo mixto U

	T-7545-B	0,4%
	N-metilcarbamato de l-naftilo	1,5%
5	Talco	98,1%

La anterior preparación es aplicada como en el ejemplo 5.

Ejemplo XXXII

10 Polvo mixto V

	T-7545-A	0,2%
	T-7545-B	0,1%
	Talco	99,7%

15 La anterior preparación es aplicada como en el ejemplo 5.

Ejemplo XXXIII

Polvo mixto W

20	Polvo liofilizado del caldo de cultivo de <u>Streptomyces hygroscopicus</u> var. <u>limoneus</u>	100%
----	--	------

La anterior preparación es aplicada como en el ejemplo 5.

25 Esta solicitud que corresponde a las presentadas en Japón, el 28 de Marzo de 1.969, con el n.º. 23962/1969 y

404388



el 20 de septiembre de 1.969, bajo el nº 74.855/1969, se
acoge a los beneficios del Artículo 51 del vigente Estatu-
to sobre Propiedad Industrial.

5

REIVINDICACIONES

10 Los puntos de invención propia y nueva que se
presentan para que sean objeto de esta solicitud de Paten-
te de Invención en España, por VEINTE años, son los que se
recogen en las reivindicaciones siguientes:

15 1ª.- Un procedimiento de preparación de un agen-
te para reprimir enfermedades de las plantas, que comprende
combinar un miembro seleccionado del grupo que consta de un
antibiótico T-7545-A, un antibiótico T-7545-B, una sal de
ácido de los mismos y una mezcla de los mismos con un vehí-
culo adecuado, de modo que el contenido de dicho miembro
puede ser de aproximadamente 0,0001% a aproximadamente 80%
20 en peso con relación al agente.

2ª.- Un procedimiento según la reivindicación 1ª,
en el que la composición está en forma líquida y el conte-
nido del ingrediente activo es de aproximadamente 0,0001%
a aproximadamente 1% en peso con respecto a la composición.

25 3ª.- Un procedimiento según la reivindicación 1ª,

A handwritten mark or signature, possibly initials, located at the bottom left of the page. It consists of a stylized, circular shape with a diagonal line through it.

404388 14 ENE. 1975



en el que la composición está en forma de polvo y el contenido del ingrediente activo es de aproximadamente 0,01% a aproximadamente 30% en peso con respecto a la composición.

5 4ª.- Un procedimiento según la reivindicación 1ª, en el que la composición está en forma concentrada y el contenido del ingrediente activo es de aproximadamente 0,5% a aproximadamente 80% en peso con respecto a la composición.

5ª.- Un procedimiento de preparación de un agente para reprimir enfermedades de las plantas.

10 Tal y como se ha descrito en la Memoria que antecede, representado en los dibujos que se acompañan y con los fines que se han especificado.

Esta Memoria consta de ciento cinco hojas escritas a máquina por una sola cara.

15

Madrid,

P.A.

14 ENE. 1975

Alberto de Cazorla

Por Poderes

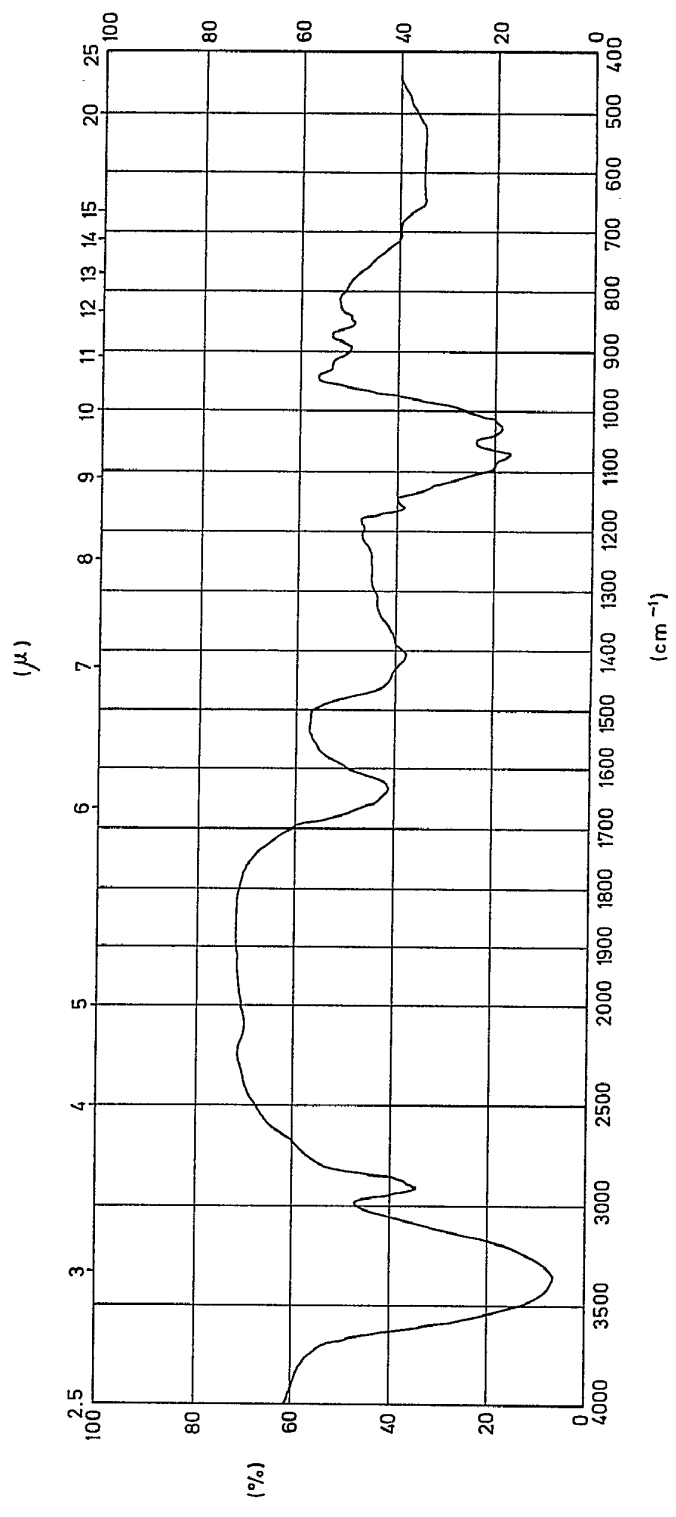
9.1.75.
Amc.

- 105 -

404388

404388

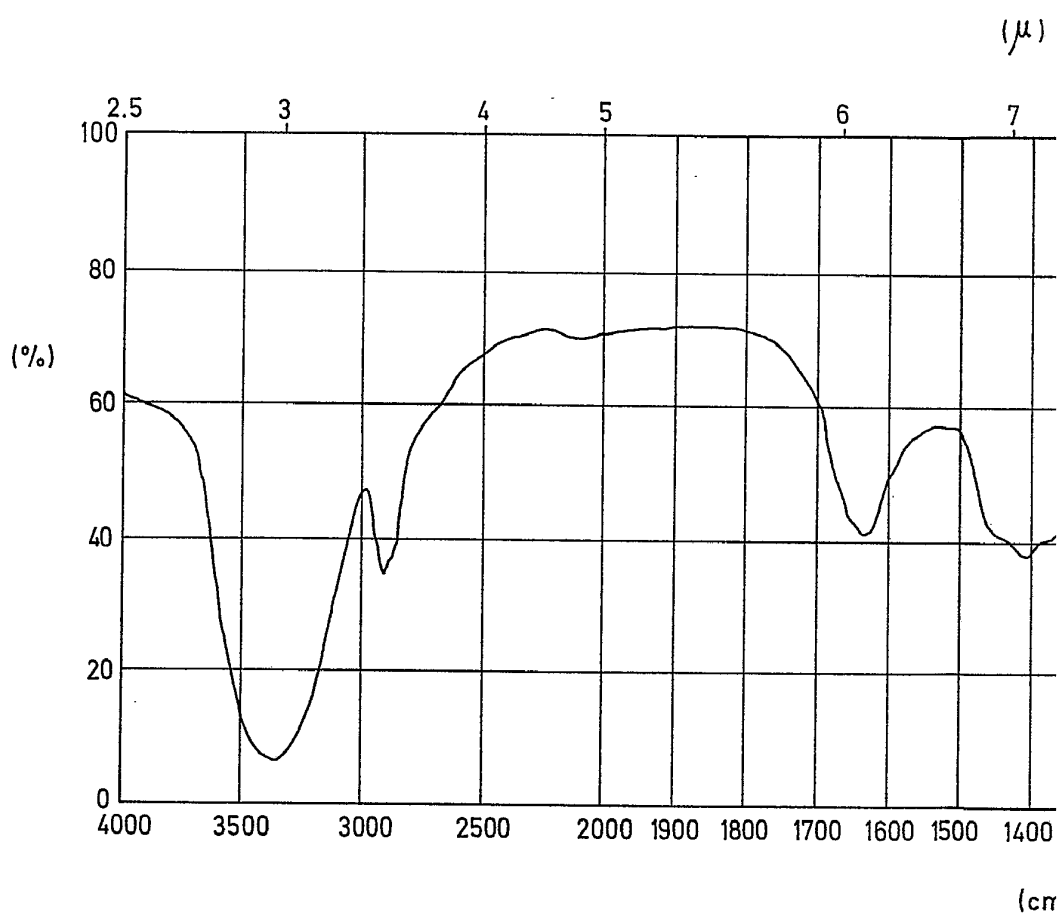
Fig.1



Alberto de Elizaburu
Patron

404388

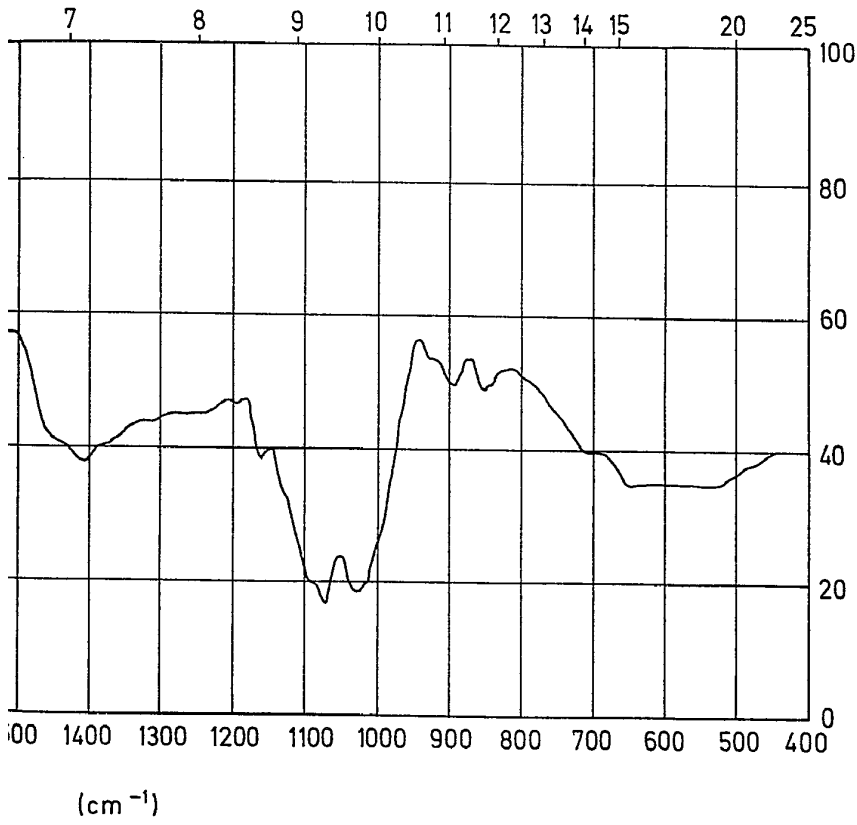
Fig.1



404388

1.1

(μ)

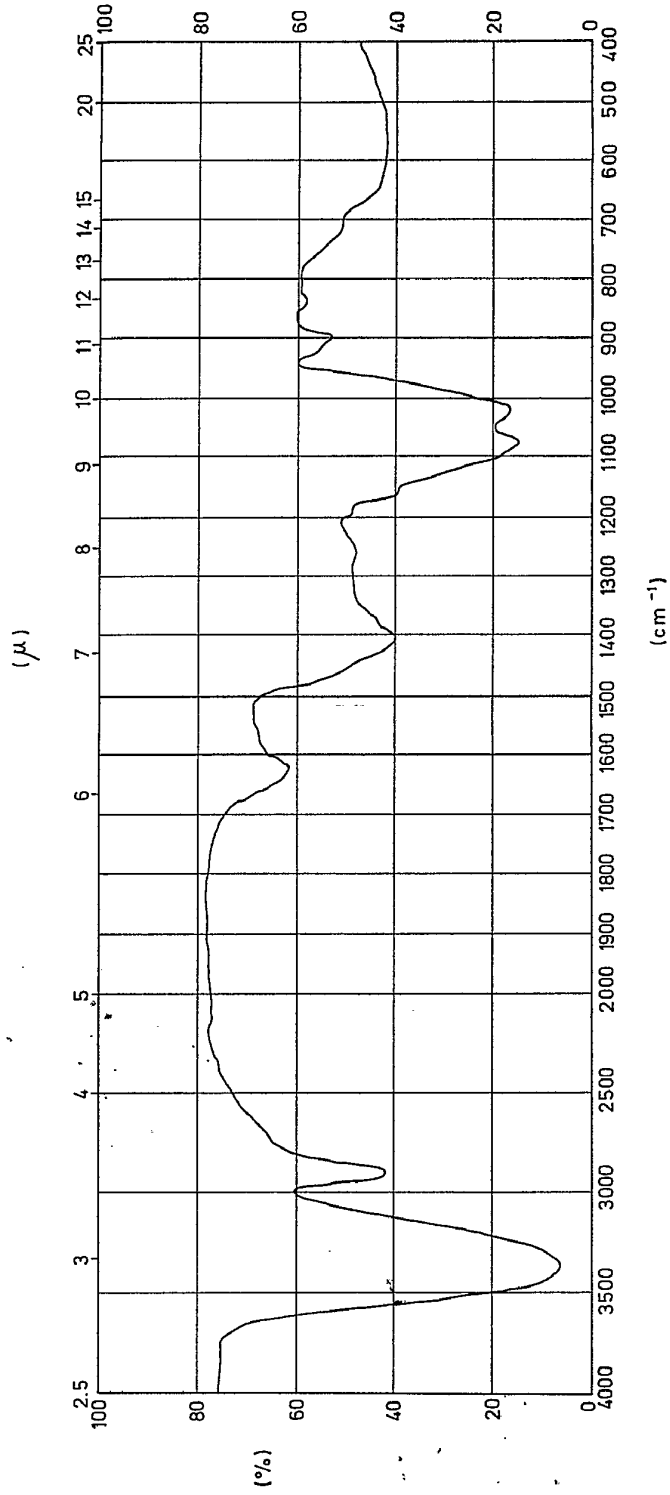


Alberto de Elizaburd
Per Ferrer

404388

404388

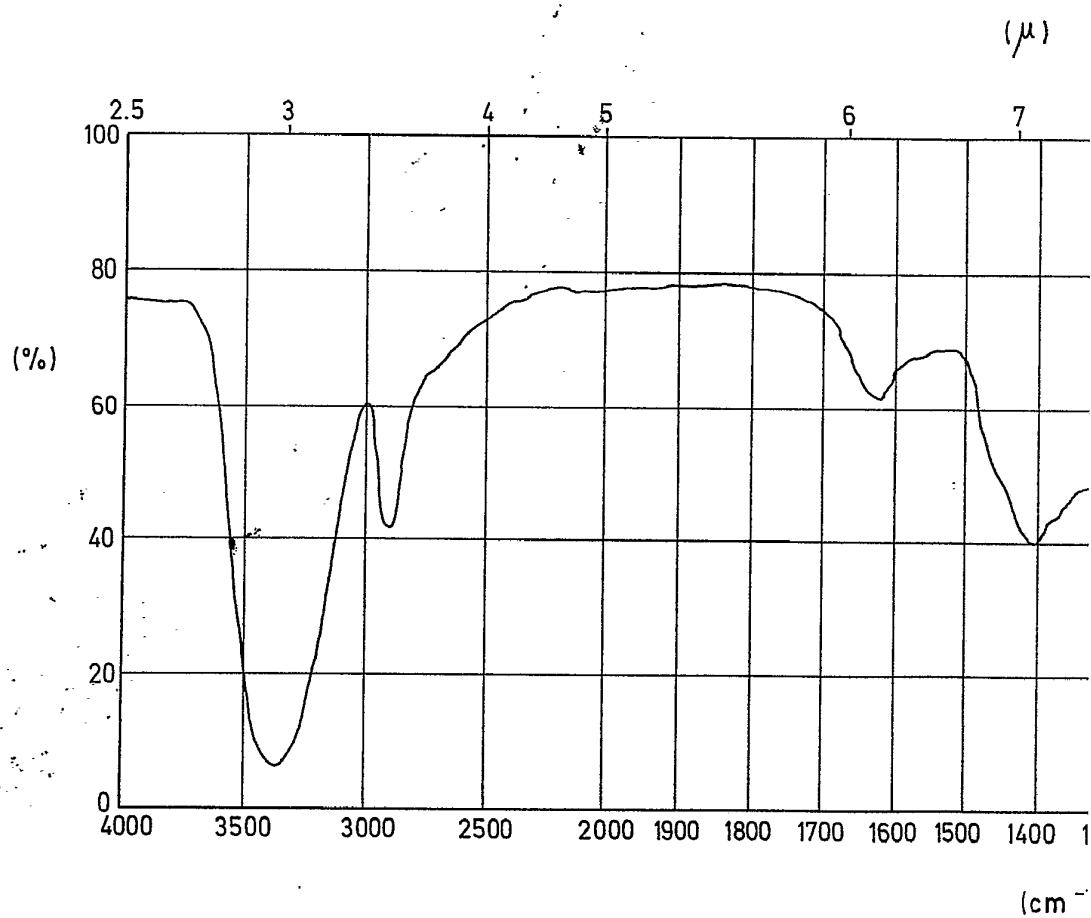
Fig.2



Alberto de Elcuburu
Ferrederu

404388

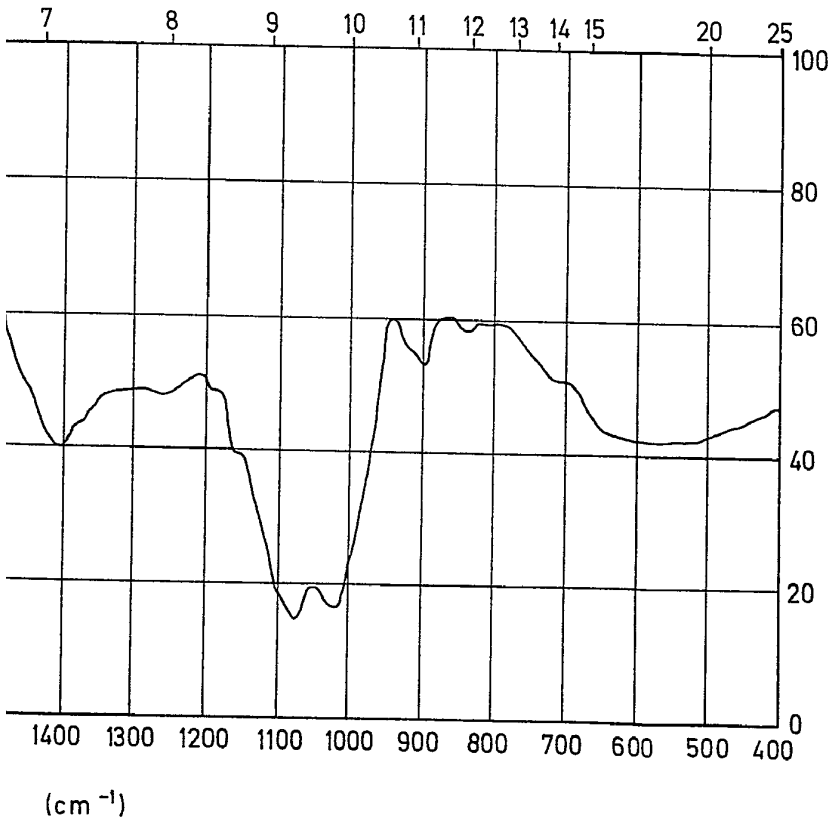
Fig.2



404388

2

(μ)



Alberto de Elzaburde
Fotógrafo