

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 817 831**

51 Int. Cl.:

G01N 23/04 (2008.01)

G01N 33/46 (2006.01)

A01G 7/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.10.2011** **PCT/EP2011/068320**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.04.2012** **WO12052506**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.10.2011** **E 11772970 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.06.2020** **EP 2630475**

54 Título: **Método de diagnóstico y tratamiento**

30 Prioridad:

21.10.2010 PT 2010105345

27.10.2010 GB 201018097

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
08.04.2021

73 Titular/es:

INSTITUTO SUPERIOR DE AGRONOMIA (100.0%)
Universidade Técnica de Lisboa, Tapada de
Ajuda
1349-017 Lisboa, PT

72 Inventor/es:

DE SEIXAS BOAVIDA FERREIRA, RICARDO
MANUEL;
VALADAS DA SILVA MONTEIRO, SARA
ALEXANDRA y
MENDES DA COSTA FERREIRA CORREIA DE
OLIVEIRA, MARIA HELENA

74 Agente/Representante:

RUO, Alessandro

ES 2 817 831 T3

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

DESCRIPCIÓN

Método de diagnóstico y tratamiento

Campo de la invención

5 [0001] La invención se refiere al diagnóstico y tratamiento de infecciones fúngicas de plantas leñosas, especialmente plantas del género *Vitis*, *Actinidia* y *Citrus* e híbridos de las mismas, y especialmente infecciones fúngicas comprendiendo yesca, brazo negro muerto (hongos *Botryosphaeriaceae*), o infecciones similares a la yesca, o infecciones por *Eutypa lata*.

Antecedentes y técnica anterior conocida por el solicitante

10 [0002] Las enfermedades de la madera provocadas por hongos son actualmente la amenaza más importante contra la vida útil de árboles frutales y vides comerciales en todo el mundo. Ponen en peligro la rentabilidad y la producción sostenida reduciendo el rendimiento y la calidad de la fruta, principalmente induciendo la podredumbre y la muerte de plantas infectadas. Las especies clave afectadas por dichas enfermedades incluyen la vid (*Vitis* spp. y sus híbridos), el kiwi (*Actinidia* spp. y sus híbridos), aunque se reconoce cada vez más que hay enfermedades similares que afectan a muchos otros hospedadores, según se describirá más adelante.

15 [0003] En la vid (*Vitis* spp. y sus híbridos), la yesca, la enfermedad de Petri, la muerte regresiva *Eutypa* y el brazo negro muerto (BDA, por sus siglas en inglés) son las principales enfermedades de la madera que inducen dicha podredumbre y la muerte de las plantas de vid (Luque *et al.*, 2009, "Symptoms and fungi associated with declining mature grapevine plants in northeast Spain", *Journal of Plant Pathology* 91, 381-390). Al no haber disponibles medidas de control efectivas contra estas enfermedades, estas afectan gravemente a la durabilidad del patrimonio vitivinícola (Larignon *et al.*, 2009, "Esca et Black Dead Arm: deux acteurs majeurs des maladies du bois chez la vigne", *Comptes Rendus Biologies* 332, 765-783.).

25 [0004] La yesca es una compleja enfermedad de la madera de la vid que está alcanzando una importancia creciente y sin precedentes a nivel mundial. Aunque al principio se pensaba que solo afectaba a las vides maduras, la enfermedad se halla actualmente a niveles altos en muchas plantas más jóvenes. Se acepta que la yesca comprende una serie de enfermedades distintas y que los principales agentes causantes (fundamentalmente hongos vasculares) invaden las vides no solo mediante daños en el campo, sino también como resultado de prácticas en viveros. Cuando la infección comienza en el vivero, las plantas pueden desarrollar distintas enfermedades, que van desde el declive por Petri (también conocido como "black goo" o sustancia negra pegajosa) a la yesca completa, con o sin podredumbre blanca de los tejidos leñosos.

30 [0005] La yesca se produce por la presencia de al menos tres hongos, *Phaeomoniella chlamydospora*, *Phaeoacremonium aleophilum* y *Fomitiporia mediterranea*, que actúan solos, combinados o de forma sucesiva. Los dos primeros hongos son responsables de las necrosis vasculares, que se manifiestan como manchas negras en la madera, en ocasiones con algunas zonas de necrosis oscuras y duras, mientras que *F. mediterranea* (y/u otros basidiomicetos que pudren la madera) inducen pudrición blanca o «amadou».

35 [0006] Sin embargo, el patrón de síntomas y la aparición inicial de su expresión es altamente variable: las plantas gravemente infectadas pueden permanecer asintomáticas en años sucesivos durante una serie de años sin síntomas visibles (en las hojas) de yesca (yesca «oculta»). Este patrón intermitente de expresión de síntomas da como resultado que las plantas infectadas no se puedan distinguir de las plantas sanas.

40 [0007] Es de suma importancia garantizar una propagación sana de la vid en el vivero, donde únicamente se debería seleccionar material sin manchas en la madera. Una vez plantado en el viñedo, el material de propagación infectado desarrolla declive o enfermedad de Petri, y también se caracteriza por manchas oscuras en la madera, muerte regresiva lenta y "black goo". Puesto que estos hongos crecen en el interior de la madera del tronco y ramas leñosas grandes, no se pueden alcanzar mediante la pulverización con fungicidas en las hojas. La mejor solución sigue siendo desenterrar la vid infectada y quemarla.

45 [0008] El mayor problema de la yesca procede de sus etapas iniciales: habitualmente, las plantas son externamente asintomáticas, aunque ocasionalmente podrían presentar cuerpos fructíferos y esporas. No obstante, son capaces de propagar la enfermedad por medio de prácticas habituales en los viñedos, como la poda. Dicho de otro modo, una máquina vitícola convencional puede pasar la enfermedad de una vid infectada, pero asintomática, a las siguientes. Las esporas también se diseminan por la acción del viento y la lluvia. Por lo tanto, a pesar de que las herramientas de poda y la maquinaria vitícola especializada no son importantes en la diseminación de las esporas, estas pueden desempeñar un papel en la propagación de los micelios fúngicos de plantas enfermas a plantas sanas. Sin embargo, en lo que se refiere a la diseminación y penetración de las esporas, las heridas de poda y otras heridas provocadas por la maquinaria vitícola especializada son de particular importancia. Por todos estos motivos, es de suma importancia desarrollar metodologías que puedan realizar cribados no destructivos y detectar las etapas iniciales de la yesca, ya sea en viveros

50

55 o en viñedos. También se necesitan estrategias y métodos mejorados para tratar dichas infecciones fúngicas en una etapa temprana, mientras la erradicación de la enfermedad todavía es posible.

[0009] Otras especies de plantas distintas a la vid son también objeto de enfermedades que afectan a la madera, similares a la yesca. En 1999, se observó por primera vez una podredumbre de la madera de la planta trepadora del kiwi

(*Actinidia*) en cultivos italianos. Posteriormente se informó de una enfermedad similar en Grecia y Nueva Zelanda. Dichas enfermedades se describieron con los términos «similar a la yesca» en Francia y «elefantiasis» en Italia.

[0010] El análisis de cultivos de kiwi que mostraban síntomas visuales de enfermedad similar a la yesca reveló la presencia de dos tipos de necrosis en la madera: a) podredumbre dura y marrón iniciándose en los tejidos medulares y expandiéndose gradualmente en la totalidad del tronco o ramas, y b) podredumbre suave y blanca como la «madera de amadou» de la vid. Aislamientos de partes necróticas de madera mostraron varios hongos, incluyendo: *Fomitiporia mediterranea*, *Phaeoacremonium aleophilum*, *Phaeoacremonium parasiticum* y *Cadophora malorum*. Al menos dos de las especies fúngicas expuestas (*F. mediterranea* y *P. aleophilum*) también están implicadas en la enfermedad de la yesca en la vid, y se pueden suponer aspectos en común entre la podredumbre del kiwi y la yesca de la vid.

[0011] Las especies de *Citrus* (como la naranja cv. Washington navel, el limón y la mandarina común injertada en portainjertos de naranja amarga) están experimentando un serio declive provocado por *F. mediterranea* en plantaciones del sur de Grecia. Los árboles afectados muestran clorosis en las hojas, defoliación y muerte de ramitas y brotes. Las secciones transversales de los troncos y ramas grandes revelan una pudrición en el centro, que está rodeada de madera necrótica dura y marrón. Los síntomas comienzan por las heridas de poda y se extienden a la madera del portainjerto, siendo similares a los síntomas de la madera con yesca en la vid.

[0012] Al igual que en la vid, el kiwi y los cítricos, también se han identificado enfermedades similares a la yesca en muchas otras especies. Se ha notificado la presencia de *Phaeoacremonium aleophilum* en especies de *Prunus* que muestran síntomas de muerte regresiva en la provincia del Cabo Occidental (Sudáfrica). Se han observado síntomas graves de muerte regresiva, provocados por *Pm. parasiticum*, en cerezos en Grecia. Se mostró que *Phaeoacremonium mортoniae* provocaba manchas marrones en la madera de *Fraxinus pennsylvanica* y *Salix* spp.

[0013] Uno de los principales agentes causantes, *Fomitiporia mediterranea*, también se halla en *Corylus avellinus*, *Olea europaea*, *Lagerstroemia indica*, *Actinidia sinensis*, *Acer negundo*, *Olea europaea*, *Quercus* sp., *Quercus ilex*, *Ligustrum vulgare* y *Robinia pseudoacacia*.

[0014] Otra enfermedad de las plantas, y que afecta del mismo modo a especies leñosas, es la eutipiosis, también conocida como «muerte regresiva Eutypa», que es provocada por el hongo *Eutypa lata*. *E. lata* es un patógeno vascular que se encuentra en al menos 88 especies de dicotiledóneas leñosas (Carter, 1991. "The status of *Eutypa lata* as pathogen", Phytopathological Paper 32) y es responsable de importantes daños económicos, principalmente en la vid y el albaricoque.

[0015] Muchas especies forestales y ornamentales también hospedan al patógeno, pero no se sabe con seguridad si todos los aislamientos son patógenos, aunque se ha confirmado la patogenicidad de *E. lata* en la vid, el albaricoque, el cerezo dulce (*Prunus avium* L.), el cerezo de Virginia (*Prunus virginiana* L. var. *demissa*), el guindo (*Prunus cerasus* L.), el almendro (*Prunus dulcis*), el manzano (*Malus domestica* Borkh.), el peral (*Pyrus communis* L.), el nogal (*Juglans regia* L.), el olivo (*Olea europaea* L.), y *Ceanothus* L. spp.

[0016] En la vid, el síntoma más reconocible de la muerte regresiva Eutypa es el aspecto atrofiado de los brotes en el período de crecimiento temprano, con pequeñas hojas cloróticas y deformadas, y entrenudos cortos. No obstante, la expresión sintomática varía notablemente de año en año. Aún no hay disponibles técnicas no destructivas para el diagnóstico de la muerte regresiva Eutypa.

[0017] Por otra parte, no hay disponible un tratamiento eficaz, y las plantas infectadas morirán en unos cuantos años.

[0018] Otra enfermedad de interés, especialmente en la vid (*Vitis*), se asocia a la infección por hongos *Botryosphaeriaceae*. Estos tienen una amplia distribución y se asocian habitualmente a la muerte regresiva y chancros de plantas hospedadoras leñosas y no leñosas, incluyendo árboles forestales, p. ej. *Pinus* spp., *Eucalyptus* spp., *Quercus* spp., *Olea*, árboles de drupas, *Protea* y vid.

[0019] En la vid, varias especies de *Botryosphaeriaceae* se asocian a la necrosis de la madera y también son capaces de infectar tanto tejidos jóvenes como maduros, así como brotes verdes, produciendo chancros, decoloración vascular y/u otros tipos de manchas oscuras en la madera.

[0020] Algunas especies de *Botryosphaeriaceae* son responsables de la enfermedad del brazo negro muerto (BDA), cuyos síntomas en la madera incluyen necrosis en forma de V, similares a las provocadas por *Eutypa lata*, y manchas longitudinales marrones a lo largo de los tejidos afectados. Se suelen observar otros síntomas similares a los de la muerte regresiva Eutypa, como brotes cloróticos atrofiados u hojas deformadas con zonas necróticas.

[0021] Se puede apreciar que todas estas enfermedades comparten características comunes: (1) son principalmente enfermedades de plantas leñosas, y especialmente plantas leñosas frutales de importancia comercial; (2) son de origen fúngico, y (3) los patógenos colonizan invariablemente la vasculatura de la planta, especialmente el xilema. Por otro lado, puesto que (4) los síntomas de la enfermedad se localizan a menudo (al menos en las etapas tempranas) en el interior de las partes leñosas de la planta, resulta difícil, si no imposible, hacer un diagnóstico no invasivo de las condiciones. Además, una vez detectada, (5) el tratamiento de la enfermedad es difícil, ya que la internalización de la infección fúngica hace que sea poco susceptible a la aplicación externa de fungicidas.

[0022] En el contexto más amplio de las enfermedades de las partes leñosas de plantas importantes desde el punto de vista comercial, uno de los mayores problemas a los que se enfrenta la agricultura es la lucha contra patógenos e

insectos que se desarrollan dentro de la madera y, por lo tanto, en una ubicación que no alcanzan los fungicidas/insecticidas convencionales. Por consiguiente, es sumamente importante desarrollar métodos para detectar la existencia y la ubicación, dentro de las plantas infectadas, de enfermedades de la madera durante las fases iniciales, pero asintomáticas y contagiosas, de la infección (y, por lo tanto, durante una fase potencialmente tratable) y para desarrollar regímenes de tratamiento que sean efectivos frente a tales enfermedades. El hecho de abordar estos problemas se encuentra entre los objetivos de la presente invención.

Sumario de la invención

[0023] En consecuencia, los inventores proporcionan un método para detectar infección fúngica en una planta leñosa de acuerdo con la reivindicación 1 anexa. Hay disponible una amplia gama de metodologías de imágenes tomográficas, incluyendo rayos X, PET (tomografía por emisión de positrones), tomografía de resistencia eléctrica y tomografía acústica (incluyendo ultrasonido). No obstante, los inventores han descubierto que el uso de técnicas de tomografía de rayos X, incluyendo tomografía axial computarizada (TAC), tomografía microcomputarizada, exploración tangencial, radiografía simple y radiografía simple de múltiples ángulos, permite diagnosticar plantas externamente asintomáticas con una amplia gama de infecciones fúngicas.

[0024] En este sentido, el presente método de la invención ofrece la posibilidad de detectar una infección fúngica en dicha planta, en una etapa en la que sea posible aplicar una metodología de tratamiento en una etapa temprana, es decir, cuando el tratamiento sea posible. Si dichas enfermedades permanecen sin detectar y, por lo tanto, sin tratar, la planta normalmente morirá, y será una fuente de infección que se puede propagar a otras plantas.

[0025] Aunque las imágenes tomográficas se han utilizado para tomar imágenes de la pudrición de la madera provocada por la podredumbre fúngica del material leñoso muerto, y también de las etapas tardías de la podredumbre en zonas muertas de material leñoso en los troncos de árboles en crecimiento, la presente invención se refiere, en cambio, a la detección temprana de infección fúngica de plantas vivas en crecimiento susceptibles a dicha infección por hongos fitopatógenos. Por ejemplo, el documento de patente estadounidense 4,283,629 a nombre de Habermehl describe una técnica tomográfica para detectar «podredumbre roja» en árboles, en la que las zonas leñosas internas muertas en los troncos del árbol se pueden detectar mediante la reducción de la radiodensidad en comparación con las zonas sanas circundantes. Los métodos presentados en esta publicación están orientados a la producción comercial de madera para construcción, para ayudar en la toma de decisiones comerciales sobre cuándo se debería talar un árbol maderero, y hasta qué punto se pueden emplear sus partes leñosas en diversos procesos de fabricación, como la producción de celulosa o madera para la construcción.

[0026] En formas de realización particularmente preferidas de la presente invención, dicha planta leñosa es una planta del género *Vitis* o un híbrido de la misma, una planta del género *Actinidia* o un híbrido de la misma, o una planta del género *Citrus* o un híbrido de la misma.

[0027] En cualquier aspecto de la invención, también se prefiere que dicha infección fúngica sea una infección fúngica que provoque una acumulación o modificación de fluido en el xilema de dicha planta. Este fluido, como el “black goo” observado en la infección de yesca, da como resultado una particular respuesta característica en la imagen tomográfica, permitiendo que se diferencie de otras características internas, como la podredumbre fúngica.

[0028] Por consiguiente, es especialmente preferible que dicha infección fúngica comprenda yesca o una enfermedad similar a la yesca.

[0029] En otros aspectos preferidos de la invención, dicha infección fúngica comprende infección por *Eutypa lata*, o chancros asociados a *Botryosphaeria* (o generalmente infección por hongos de la familia *Botryosphaeriaceae*), o infección por *Phoma tracheiphila*.

[0030] En cualquier aspecto de la invención, es especialmente preferible que dichas imágenes tomográficas comprendan tomografía axial de rayos X. Los inventores han demostrado que la tomografía axial de rayos X es especialmente efectiva en las regiones de identificación de material vegetal, especialmente las que no son visibles en el exterior de la planta, que están colonizadas por hongos fitopatógenos.

[0031] De acuerdo con la invención, los inventores proporcionan dicho método utilizando tomografía de rayos X, y especialmente tomografía axial de rayos X o microtomografía de rayos X, donde dicho método comprende las etapas de: obtención de una imagen tomográfica de un tallo de dicha planta leñosa, comprendiendo dicha imagen tomográfica mediciones de radiodensidad distribuidas espacialmente; determinación de la presencia o ausencia de regiones en dicha imagen que presenten una radiodensidad superior a una primera radiodensidad predeterminada; siendo la presencia de dichas regiones de alta radiodensidad indicativa de la presencia de dicha infección fúngica.

[0032] Excepcionalmente, los inventores han descubierto que dichas imágenes tomográficas de rayos X revelan regiones de material vegetal vivo que están colonizadas por patógenos fúngicos y, especialmente en los casos en los que los hongos patógenos colonizan la vasculatura de la planta con la posterior producción de fluido en la vasculatura o una modificación química de fluido en el xilema (p. ej., mediante la producción de material polifenólico o gomas), esto se pone de manifiesto por las regiones de mayor radiodensidad. Los hongos patógenos tienden a inducir la producción de material radiodenso en la vasculatura (esto es, más radiodenso que el fluido que se suele encontrar, p. ej., en el xilema de la planta), que deriva en una indicación positiva de dicha infección. En cambio, un uso previo de tomografía de rayos X para tomar imágenes de la podredumbre en madera muerta (p. ej., en materiales de construcción o en árboles vivos

de zonas urbanas) detecta la zona podrida como regiones de muy baja radiodensidad, produciendo, de hecho, pocas o nulas señales en comparación con las señales producidas en ausencia de madera. Por lo tanto, a menudo no es posible diferenciar la presencia de podredumbre en madera muerta (p. ej., por hongos de pudrición blanda) de los agujeros en la propia madera.

5 **[0033]** En dicho método, es especialmente preferible que dicha primera radiodensidad predeterminada sea la radiodensidad media de una región correspondiente en una planta de control no infectada. En este sentido, el método puede adaptarse fácilmente para su aplicación en una serie de especies leñosas calibrando las imágenes tomográficas frente a imágenes tomadas de plantas sanas.

10 **[0034]** Preferiblemente, en cualquier método de este tipo, y especialmente en el caso de la vid, dicha primera radiodensidad predeterminada comprende 100, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190 o 200 unidades Hounsfield.

[0035] Las unidades Hounsfield se conocen bien en el campo de la tomografía de rayos X, y son una transformación lineal del coeficiente de atenuación radiológica en el material, ajustado con respecto a la atenuación correspondiente en el aire y el agua, a saber:

$$15 \quad R = 1000 * (\mu_x - \mu_w) / (\mu_w - \mu_a)$$

donde:

R es la radiodensidad en unidades Hounsfield

μ_x es el coeficiente de atenuación lineal en la muestra

μ_w es el coeficiente de atenuación lineal del agua

20 μ_a es el coeficiente de atenuación lineal del aire

[0036] En otras formas de realización preferidas, los inventores proporcionan un método que además comprende la etapa de: determinación de la presencia o ausencia de regiones en dicha imagen que presenten una radiodensidad inferior a una segunda radiodensidad predeterminada; siendo la presencia de las dos regiones de alta y baja radiodensidad indicativa de la presencia de una etapa avanzada de dicha infección fúngica. Preferiblemente, dicha segunda radiodensidad predeterminada comprende -200, -300, -400, -500, -600, -700 u -800 unidades Hounsfield.

25 **[0037]** En cualquier aspecto de la invención, es preferible que dichas regiones radiodensas presenten una dimensión espacial de menos de 5 mm, 2 mm, 1 mm, 500 micras, 200 micras, 100 micras o incluso 50 micras. Los inventores han descubierto que las regiones radiodensas corresponden a la acumulación de un "black goo", principalmente de origen vegetal, y que posiblemente comprende una excreción de compuestos polifenólicos secretados por la planta como parte de un mecanismo de defensa del huésped. El fluido se acumula principalmente en los vasos del xilema de la planta y, por lo tanto, las regiones radiodensas reflejan la naturaleza estrecha y alargada de la vasculatura. Por lo tanto, al menos una de las dimensiones espaciales (anchura, altura y longitud) de las regiones radiodensas es de pequeño tamaño, como se ha indicado anteriormente. Los inventores han descubierto que se pueden tomar imágenes de estas regiones mediante las técnicas descritas en el presente documento, y son especialmente indicativas de infecciones por yesca o relacionadas con la yesca.

35 **[0038]** Un método de este tipo se puede aplicar especialmente a infecciones fúngicas como la yesca o infecciones similares a la yesca, donde a la acumulación de material radiodenso en la vasculatura de la planta le sigue, durante el desarrollo de la infección, la aparición de regiones de pudrición de tejido muerto en la estructura de la planta, como los denominados «amadou» en la yesca de la vid. En este sentido, la presencia de ambas regiones de radiodensidad relativamente alta y relativamente baja puede detectar una etapa especialmente avanzada de una infección fúngica de ese tipo. Esto puede ayudar a tomar decisiones en relación con las medidas correctivas que se deben tomar, como el tratamiento de la planta infectada, o una decisión de arrancar y sustituir la planta.

40 **[0039]** También en cualquier aspecto de la invención, es preferible que dicho tallo presente un diámetro de entre 1 y 10 cm. La razón para la metodología de análisis descrita es ser capaz de tratar plantas leñosas infectadas, y especialmente vides, y el uso de la técnica en tallos relativamente pequeños sirve de ayuda para identificar la enfermedad en una etapa temprana.

45 **[0040]** También en cualquier aspecto de la invención, es preferible que dicha planta leñosa comprenda material de injerto o portainjerto, y que dicho tallo tenga un diámetro de menos de 1 cm. Los inventores han descubierto que las técnicas descritas en el presente documento permiten la selección rápida del portainjerto y del material de injerto, normalmente presentando diámetros del tallo inferiores a 1 cm, cuando salen de los viveros. Esto es especialmente cierto en el caso de las vides, donde es fundamental impedir que el material infectado salga de los viveros de viñedos, suponiendo una posible fuente de infección a otras plantas sanas. La disponibilidad de dichos métodos para diagnosticar estas enfermedades devastadoras en especies de importancia comercial lleva a los inventores a ser capaces de proporcionar estrategias y métodos que no estaban disponibles hasta ahora para gestionar dichas enfermedades en especies leñosas.

[0041] En consecuencia, los inventores proporcionan un método de control de infección fúngica en plantas leñosas de acuerdo con la reivindicación 12 anexa.

[0042] En cualquier aspecto de la invención, se contempla una serie de fungicidas, y estos pueden ser seleccionados por el experto en la materia basándose en su eficacia frente al hongo patógeno concreto que se quiere tratar. Entre las familias de fungicidas disponibles para los expertos en la materia se encuentran los productos a base de cobre; anilino pirimidinas; azoles y no azoles (inhibidores de la biosíntesis de ergosterol); carboxamidas; fenilpirroles; fosfonatos; piridiniletilbenzamidas y estrobilurinas de QoI.

[0043] Entre los ejemplos concretos de dichos fungicidas se incluye el ciprodinil, el fludioxonil, la piraclostrobina, la boscalida y mezclas de los mismos (ciprodinil + fludioxonil y piraclostrobina + boscalida), el tebuconazol y fosfonatos.

[0044] También hay otros compuestos que presentan actividad fungicida, pero que no están registrados específicamente como fungicidas, como: bicarbonato de sodio (NaHCO_3) y bicarbonato de potasio (KHCO_3), y dióxido de hidrógeno (peróxido de hidrógeno).

[0045] Se prefieren especialmente los fungicidas que presentan actividad de estimulación del crecimiento vegetal, tales como el blad. El blad es un polipéptido que se puede extraer de los cotiledones de *Lupinus albus*, o que se puede producir mediante el uso de técnicas de ADN recombinante. Se proporcionan detalles sobre el blad en la solicitud de patente internacional pendiente de aprobación WO2007010459.

[0046] Se prefieren particularmente fungicidas con una actividad inductora de defensa del huésped, como el quitosano.

[0047] También se prefieren especialmente fungicidas que presenten una actividad inductora de defensa del huésped, además de algunos efectos directos sobre los hongos, como el ácido hialurónico (un elicitor para la inducción de resistencia sistémica, véase World J Microbiol Biotechnol (2008) 24:1153-1158) o acibenzolar-S-metil.

[0048] Preferiblemente, dicho fungicida se inyecta en dicha planta. Por «inyectar» se entiende que dicho fungicida se introduce directamente en la región interna de la planta donde las imágenes tomográficas han detectado la infección fúngica. Al igual que la inyección literal de dicho fungicida, se pueden emplear otros medios, como la perforación de un agujero en el tallo o tronco de la planta y la dispensación del fungicida en su interior. Un tapón de fungicida de liberación lenta se considera especialmente ventajoso.

[0049] En formas de realización especialmente preferidas de la invención, la imagen tomográfica se utiliza para identificar la región de la planta en la que se localiza la infección (mediante las regiones de radiodensidad relativamente alta), y el fungicida se introduce directamente en estas regiones.

Breve descripción de los dibujos

[0050] La invención se describirá con referencia a los dibujos adjuntos, en los cuales:

la figura 1 muestra fotografías de secciones transversales en tallos de vid infectados con yesca;

la figura 2 es una micrografía óptica de una vid infectada con yesca;

la figura 3 muestra fotografías de “black goo” en la vasculatura de la vid infectada con yesca;

la figura 4 muestra una fotografía y una correspondiente tomografía de rayos X de una vid infectada con yesca;

la figura 5 muestra fotografías y unas correspondientes tomografías de rayos X de tallos de vid en diversas etapas de la infección por yesca;

la figura 6 es una serie de tomografías y gráficos de radiodensidad en tallos de vid sanos;

la figura 7 es una serie de tomografías y gráficos de radiodensidad en tallos de vid infectados con yesca; y

las figuras 8 a 12 son imágenes microtomográficas de rayos X en tallos de vid infectados con yesca.

Descripción de formas de realización preferidas

[0051] La figura 1 representa, fotográficamente, una progresión típica (de A a D) de la infección por yesca en madera de vid junto con algunos rasgos estructurales característicos de la madera en su estado enfermo. La figura 1A muestra una sección a través de una vid en sus etapas iniciales de infección, que muestra puntos negros (a) en un fondo de madera aparentemente sano. Las figuras 1B y 1C muestran etapas intermedias de la infección por yesca, que presentan puntos negros (a) y madera marrón afectada (b), así como cicatrices (c) y médula (d), que son características normales de la madera. La figura 1D muestra etapas finales de la infección por yesca con madera muerta (e) y «amadou» (f). Se puede observar claramente que, en las etapas más tempranas de la infección (figuras 1A y 1B), la infección se localiza en el interior de las partes leñosas de la vid. No se presentan síntomas externos hacia la periferia de la madera y, por lo tanto, no hay signos visibles de infección aparentes en la planta.

[0052] La microscopía óptica de una sección de una vid infectada con yesca y asintomática revela (en la figura 2) la presencia de “black goo” en el lumen de las traqueidas y vasos del xilema de la planta (flechas negras). La presencia de este material comparativamente radiodenso es la que se puede detectar utilizando imágenes tomográficas y especialmente imágenes tomográficas de rayos X.

[0053] La figura 3 muestra la presencia de “black goo” tanto en el interior como rezumando de los vasos del xilema en una sección de corte de madera de vid infectada con yesca. En la figura 3(a), una región periférica del tallo (B1) muestra madera de vid sana y no infectada, mientras que la región oscura (B2) muestra “black goo” dentro del xilema. En la figura 3(b), se observa el “black goo” rezumando (B3) de los vasos del xilema.

5 [0054] La figura 4A es una fotografía de una sección transversal de un tronco de vid infectado con yesca en una etapa intermedia de infección, tomada tras varios análisis TAC (tomografía axial computarizada) de un tronco de vid intacto infectado con yesca. La figura 4B es una imagen tomográfica obtenida mediante tomografía axial de rayos X de acuerdo con la presente invención. La imagen tomográfica (4B) muestra radiodensidad conforme a la escala presentada en el lado derecho de la figura 5D. Los colores oscuros indican regiones de baja radiodensidad, con zonas más claras que indican niveles crecientes de material radiodenso. El negro representa en la imagen una radiodensidad de aproximadamente -135 unidades Hounsfield, y el blanco representa aproximadamente +215 unidades Hounsfield. Las imágenes fueron obtenidas mediante el uso de un aparato de tomografía axial computarizada TOMOSCAN AV de Philips. Las imágenes se obtuvieron con los siguientes parámetros:

Escáner: 120 kV, 90 mA, 2 s

15 Inclinación: 0,0°

[0055] En función del tamaño del tronco del que se quisiera tomar imágenes, se utilizaron las siguientes aperturas:

250 mm/1,2

270 mm/1,1

160 mm/1,9

20 [0056] La figura 4B representa gráficamente la capacidad que tiene la tomografía axial de rayos X de detectar signos de infección por yesca en el núcleo del material leñoso, en virtud del “black goo” de material radiodenso en el sistema vascular de la planta. Se proporcionan los valores de radiodensidad de dos puntos en la imagen (184 y 246 unidades Hounsfield), que indican regiones que presentan vasculatura llena del “black goo” característico de la infección por yesca.

25 [0057] La figura 5 (A-D) representa fotografías de secciones transversales (columna a la izquierda) de madera de vid con varios grados de infección por yesca, junto con imágenes de tomografía axial computarizada de rayos X (columna a la derecha) obtenidas antes de seccionar la madera para tomar las fotografías. Las imágenes tomográficas muestran mapas de radiodensidad de la madera, de acuerdo con la escala adyacente a la figura 5D, con regiones oscuras que representan baja radiodensidad y regiones claras con una correspondiente radiodensidad alta. Las regiones negras presentan una radiodensidad de -135 unidades Hounsfield o inferior, con regiones blancas que presentan una radiodensidad de 215 unidades Hounsfield o superior.

30 [0058] La figura 5A muestra imágenes de un tallo sano y no infectado; la figura 5B es de un tallo durante las etapas iniciales y asintomáticas de la infección. Son especialmente perceptibles las regiones de alta radiodensidad (zonas blancas en el mapa de radiodensidad de la figura 5B) que se corresponden con las zonas negras en la fotografía correspondiente, y que comprenden regiones de tejido vascular que presentan “black goo” dentro del xilema, así como las zonas de madera afectada marrón que las rodean.

35 [0059] Las imágenes de la figura 5C corresponden a un tallo en una etapa intermedia de la infección por yesca. De nuevo, las zonas de radiodensidad alta representadas como regiones de color claro se corresponden con las regiones radiodensas oscuras que comprenden regiones llenas de “black goo” del tallo leñoso que se muestra en la fotografía.

40 [0060] Por último, las imágenes de la figura 5D corresponden a un tallo en una etapa avanzada de la infección por yesca. Al igual que las regiones de alta radiodensidad (las manchas de color claro en la tomografía) correspondientes a vasculatura llena, las imágenes también muestran (en el lado izquierdo) regiones de baja radiodensidad (las regiones oscuras o negras en la tomografía) que corresponden a zonas afectadas por pudrición blanca o «amadou» que se muestran en la fotografía.

45 [0061] Las imágenes demuestran la capacidad que tiene la tomografía axial computarizada de rayos X de identificar, de forma no invasiva, etapas tempranas de la infección por yesca mediante la detección de regiones de alta radiodensidad, así como de identificar etapas más tardías de la infección mediante la detección de regiones de baja radiodensidad, correspondientes a «amadou».

50 [0062] La figura 6 (a)-(e) muestra patrones de radiodensidad obtenidos mediante tomografía axial computarizada basada en rayos X de un tallo de vid sano e intacto. La representación gráfica de la radiodensidad corresponde a la sección ilustrada en la imagen tomográfica 2-D representada con una línea de color claro. El punto en la imagen 2-D está representado por la línea de referencia vertical en cada gráfico, con la correspondiente línea horizontal determinando la medición de radiodensidad del punto expresada en unidades Hounsfield.

55 [0063] En cada gráfico, el rango de radiodensidades ilustrado se representa en una escala de -478 a +173 unidades Hounsfield, y los «valores del punto» son los siguientes:

Figura	Valor del punto (unidades Hounsfield)
6(a)	+119
6(b)	-46
6(c)	-478
6(d)	+125
6(e)	+25

[0064] La radiodensidad muy baja del valor del punto de la figura 6(c) se corresponde con una región de material de médula suave y esponjoso en el centro del tallo. Los valores más elevados (p. ej., +119 y +125) corresponden a valores normales de radiodensidad observados en regiones muy hidratadas de tejido de madera sana.

5 **[0065]** Las figuras 7 (a)-(l) muestran patrones de radiodensidad obtenidos mediante tomografía axial computarizada basada en rayos X en tres secciones de un tallo de vid infectado con yesca. La representación gráfica de la radiodensidad corresponde a la sección ilustrada en la imagen tomográfica 2-D representada con una línea de color claro. De nuevo, el punto en la imagen 2-D está representado por la línea de referencia vertical en cada gráfico, con la correspondiente línea horizontal determinando la medición de radiodensidad del punto expresada en unidades Hounsfield.

10 **[0066]** En cada gráfico, el rango de radiodensidades ilustrado y los «valores del punto» son los siguientes:

Figura	Mínimo en el eje Y (Hounsfield)	Máximo en el eje Y (Hounsfield)	Valor del punto (Hounsfield)
7(a)	-274	+277	-265
7(b)	-274	+277	+277
7(c)	-274	+277	+263
7(d)	-998	+333	-170
7(e)	-998	+333	+308
7(f)	-998	+333	-998
7(g)	-998	+333	+333
7(h)	-998	+333	+255
7(i)	+153	+266	+265
7(j)	+153	+266	+162
7(k)	+153	+266	+153
7(l)	+153	+266	+233

15 **[0067]** Los niveles de radiodensidad muy elevados (normalmente por encima de +250 Hounsfield en este ejemplo concreto) corresponden a regiones en las que se ha acumulado “black goo” en la vasculatura de la planta. Los niveles muy bajos (normalmente los valores negativos en este ejemplo) se corresponden con regiones correspondientes a un «amadou», o a un agujero o médula en el tallo.

[0068] El análisis de la radiodensidad de un gran número de muestras de madera de vid en las que se han identificado características mediante su posterior seccionamiento ha revelado los rangos habituales de radiodensidad observados en esta especie para diversas características botánicas, o características de la infección por yesca. Estos valores se indican en la tabla 1.

5

Tabla 1

Radiodensidad típica de características en la vid	
Característica	Radiodensidad (media +/- S.D.) Unidades Hounsfield
Médula y agujero	-900 ± 50
«Amadou»	-840 ± 70
Madera muerta afectada	-450 ± 123
Vasos vacíos	-109 ± 48
Madera sana	80 ± 32
Nudos	195 ± 77
Puntos negros	234 ± 56
Madera marrón afectada	294 ± 71

10

[0069] Mediante el uso de imágenes tomográficas de rayos X, seguido por un posterior seccionamiento e identificación de las características, los expertos en la materia pueden determinar fácilmente el rango típico de densidades para las características en otras especies leñosas y para otras infecciones fúngicas. En este sentido, las técnicas descritas en el presente documento se pueden aplicar en una amplia gama de especies e infecciones fúngicas.

15

[0070] Las figuras 8 a 12 muestran imágenes obtenidas utilizando tomografía computarizada de rayos X con alta sensibilidad de tallos de vid (*Vitis*) infectados por yesca en una etapa temprana de la infección, antes de que aparecieran síntomas externos.

[0071] La figura 8 muestra una sección transversal (A) y un detalle (B) de un tronco delgado de una vid de dos años de edad infectada con etapas iniciales de yesca. La barra de escala representa 5 mm. Las zonas brillantes en la imagen representan regiones de alta radiodensidad, indicativas de la infección por yesca. El punto brillante más grande en el recuadro (B) tiene un diámetro de aproximadamente 250 micras, representando la sorprendente capacidad de la técnica de visualizar incluso etapas tempranas de la infección por yesca.

20

[0072] La figura 9 muestra una imagen tomográfica de rayos X en sección transversal longitudinal de un tronco delgado de una vid (*Vitis*) de dos años de edad infectada con etapas iniciales de yesca. La barra de escala representa 5 mm. Las zonas brillantes en la imagen representan de nuevo regiones de alta radiodensidad, indicativas de la infección por yesca. En las imágenes se pueden observar regiones de alta radiodensidad tan pequeñas como de 50 micras.

25

[0073] La figura 10 muestra imágenes tomográficas de rayos X de vasos del xilema con distintos grados de llenado con el “black goo” característico de la infección por yesca. Las imágenes se toman en un tronco de vid durante las etapas iniciales y asintomáticas de la infección por yesca. La barra de escala representa 100 micras, representando de nuevo que se pueden identificar características muy pequeñas relacionadas con la infección.

[0074] Las figuras 11 y 12 son reconstrucciones tomográficas axiales tridimensionales de un tronco de vid (*Vitis*), destacando su forma irregular. La barra de escala representa 10 cm en la figura 11 y 10,13 cm en la figura 12.

REIVINDICACIONES

1. Método para detectar una infección fúngica en una planta leñosa que comprende las etapas de:
 - uso de imágenes tomográficas de rayos X;
 - obtención de una imagen tomográfica de un tallo de dicha planta leñosa comprendiendo vasculatura,
 - comprendiendo dicha imagen tomográfica mediciones de radiodensidad distribuidas espacialmente;**caracterizado por que** el método comprende, además, las etapas de determinación de la presencia o ausencia de regiones en dicha imagen que presenten una radiodensidad superior a una primera radiodensidad predeterminada del fluido que se encuentra generalmente en el xilema de la vasculatura de la planta;
- siendo la presencia de dichas regiones de mayor radiodensidad indicativa de la presencia de una infección fúngica en la vasculatura de la planta.
2. Método de acuerdo con la reivindicación 1 donde dicha planta leñosa es una de:
 - una planta del género *Vitis* o un híbrido de la misma;
 - una planta del género *Actinidia* o un híbrido de la misma;
 - una planta del género *Citrus* o un híbrido de la misma.
3. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2 donde dicha infección fúngica provoca acumulación de fluido en el xilema de dicha planta.
4. Método de acuerdo con la reivindicación 2 donde dicha infección fúngica comprende una o más de
 - yesca o una enfermedad similar a la yesca;
 - infección por *Eutypa lata*;
 - chancros asociados a *Botryosphaeria*;
 - infección por *Phoma tracheiphila*.
5. Método de acuerdo con cualquier reivindicación anterior donde dicha tomografía es tomografía axial de rayos X o microtomografía de rayos X.
6. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde dicha primera radiodensidad predeterminada es la radiodensidad media de una correspondiente región en una planta de control no infectada; o dicha primera radiodensidad predeterminada es de 100, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190 o 200 unidades Hounsfield.
7. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, comprendiendo, además, la etapa de: determinación de la presencia o ausencia de regiones en dicha imagen que presenten una radiodensidad inferior a una segunda radiodensidad predeterminada;
- siendo la presencia de las dos regiones de alta y baja radiodensidad indicativa de la presencia de una etapa avanzada de dicha infección fúngica.
8. Método de acuerdo con la reivindicación 7 donde dicha segunda radiodensidad predeterminada es de -200, -300, -400, -500, -600, -700 u -800 unidades Hounsfield.
9. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, donde dichas regiones radiodensas poseen una dimensión espacial de menos de 5 mm, 2 mm, 1 mm, 500 micras, 200 micras, 100 micras o 50 micras.
10. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9 donde dicha planta leñosa comprende un tallo con un diámetro de entre 1 y 10 cm.
11. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9 donde dicha planta leñosa comprende portainjerto o material de injerto, y comprende un tallo con un diámetro de menos de 1 cm.
12. Método de control de infección fúngica en plantas leñosas que comprende las etapas de:
 - determinación de la presencia o ausencia de dicha infección fúngica utilizando un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11; y
 - tratamiento de dicha planta leñosa con un fungicida, y preferiblemente un fungicida sistémico, si se detecta de este modo dicha infección fúngica.
13. Método de acuerdo con la reivindicación 12 donde dicho fungicida se inyecta en dicha planta.
14. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 12 o 13 donde dicha imagen tomográfica se utiliza para identificar la ubicación en la planta en la que está presente dicha infección fúngica, y dicho fungicida se introduce en esa ubicación.

Figura 1

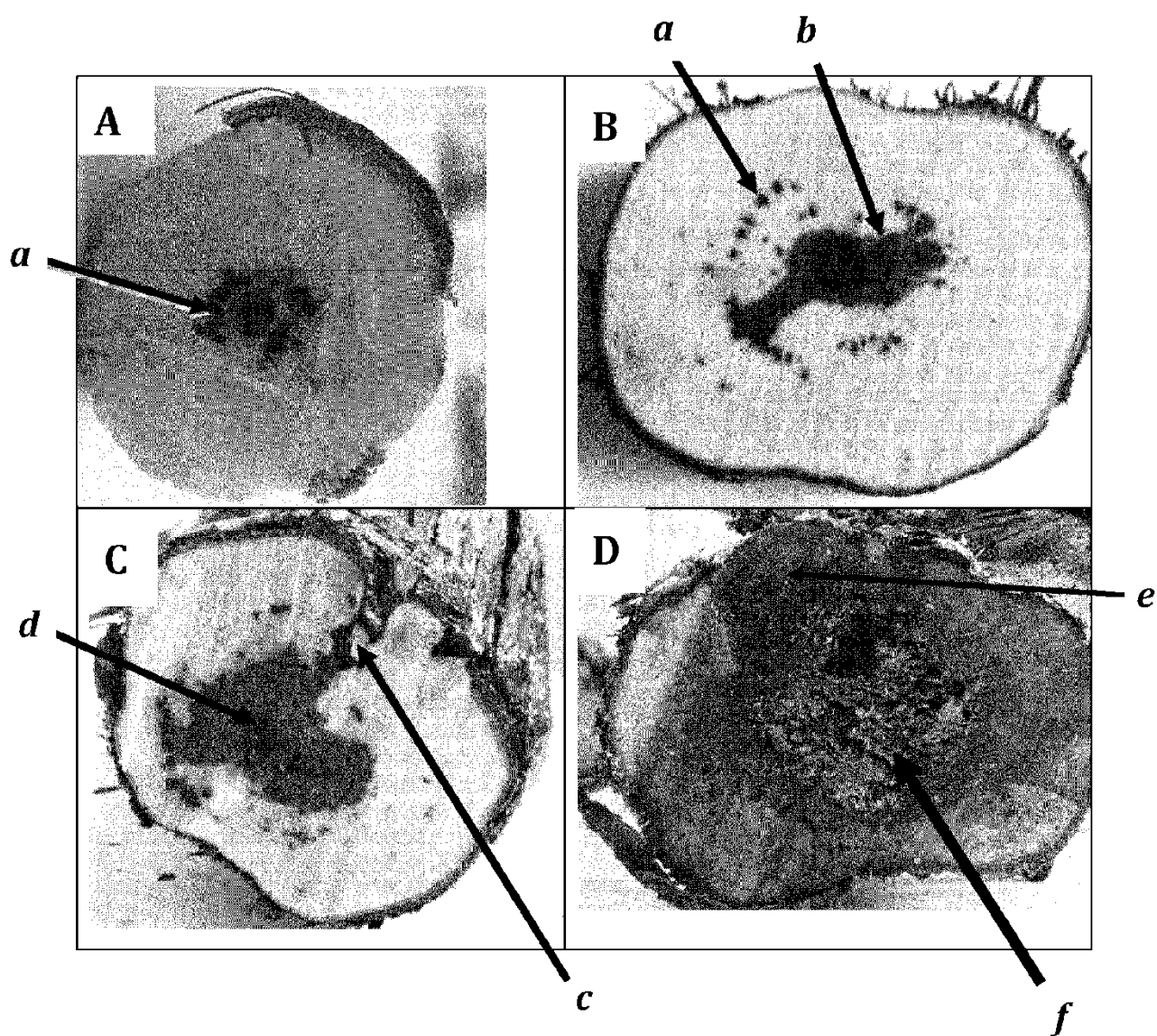


Figura 2

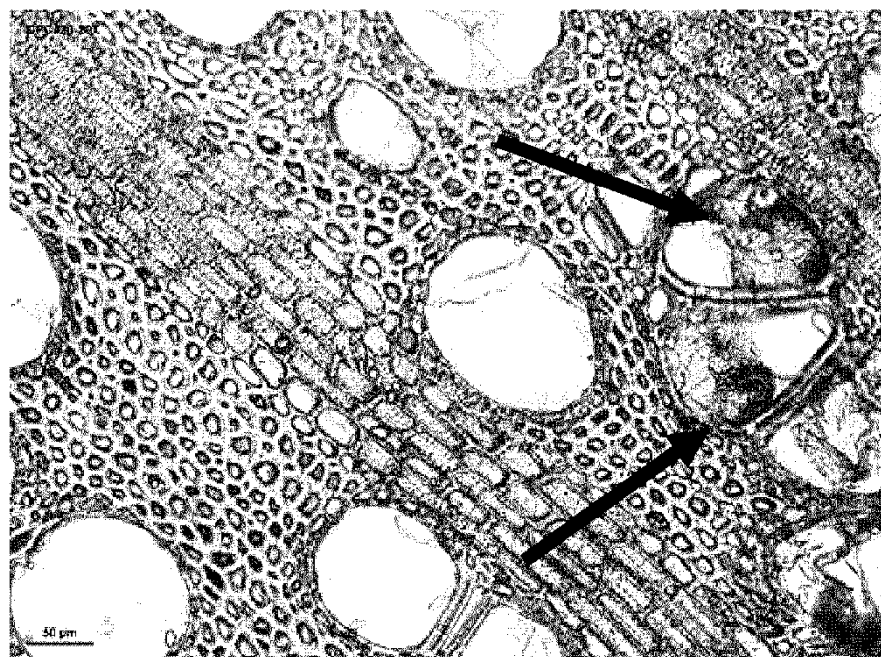
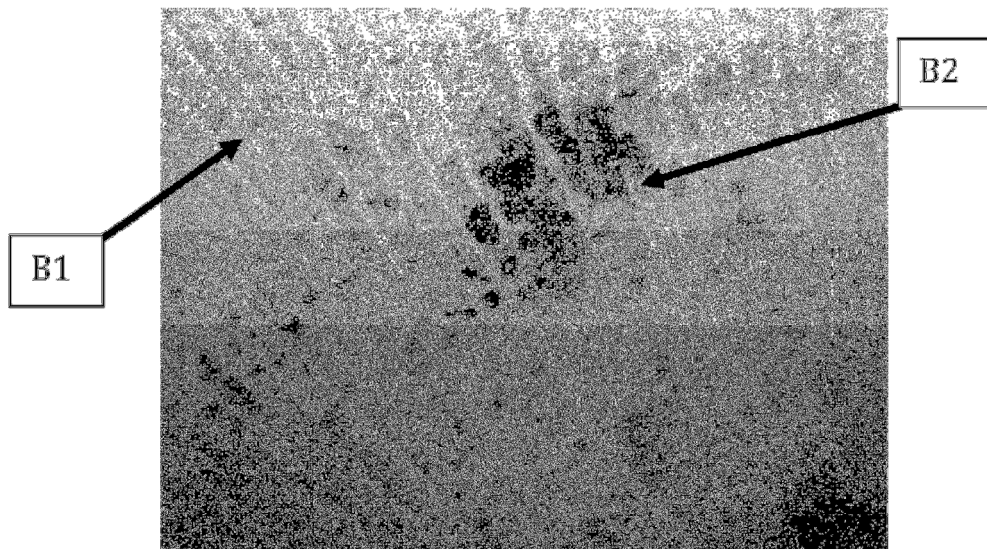


Figura 3

(a)



(b)

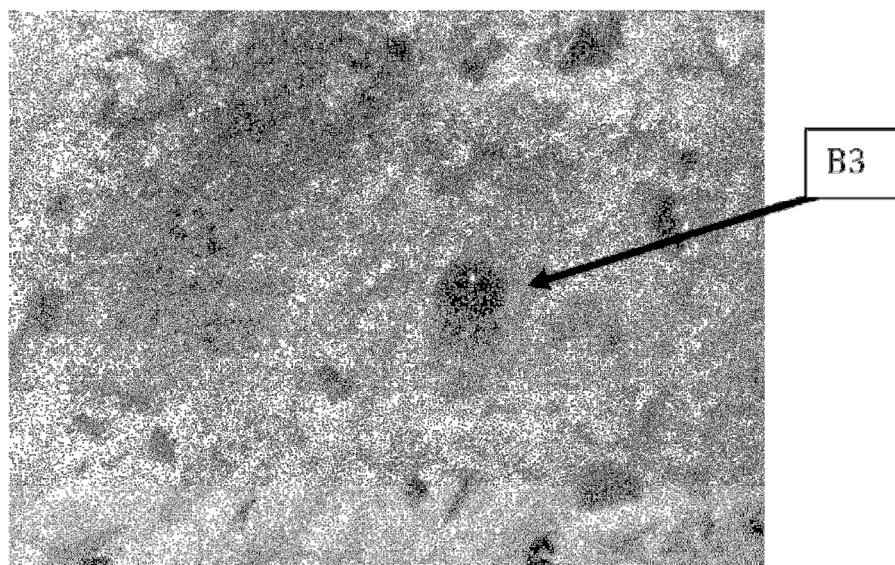


Figura 4

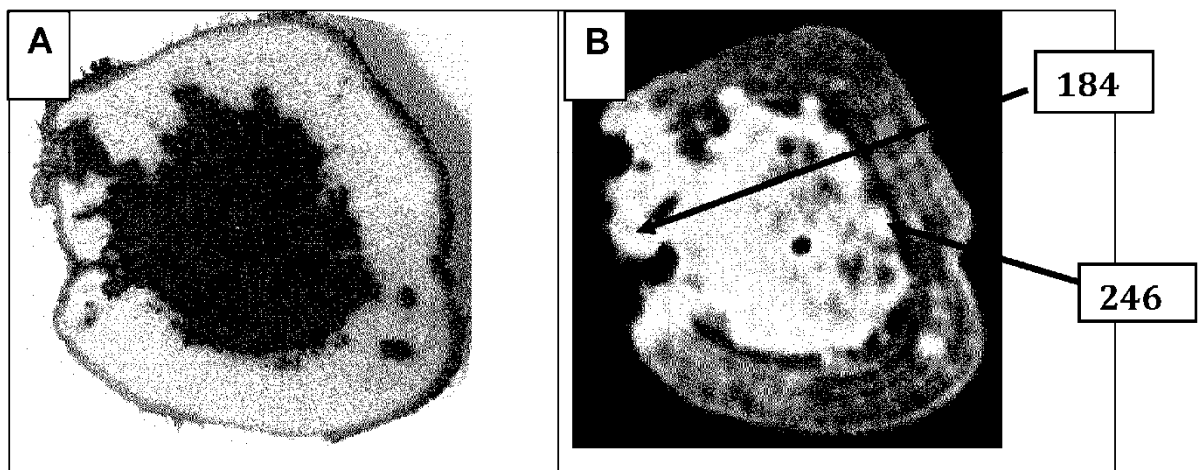


Figura 5

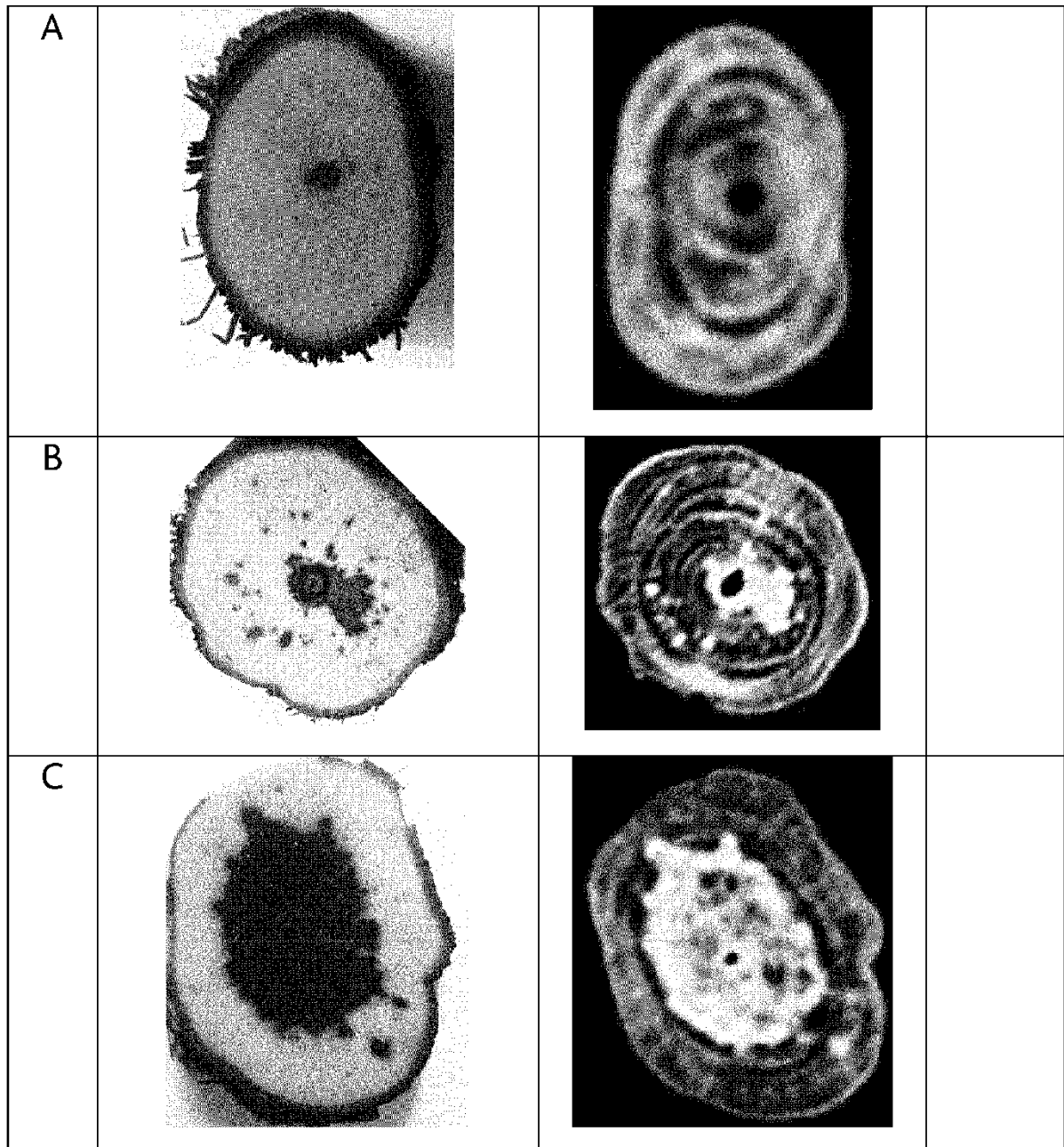


Figura 5

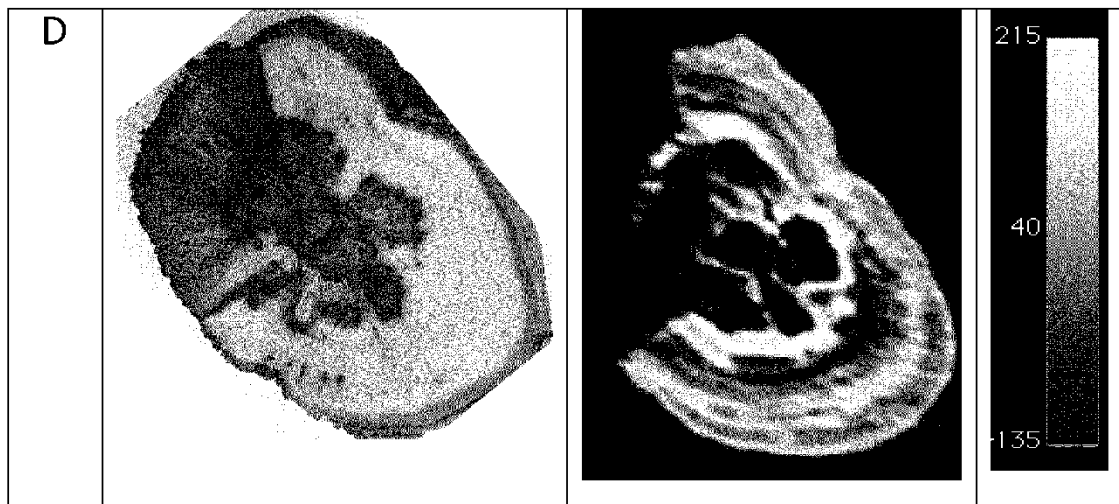
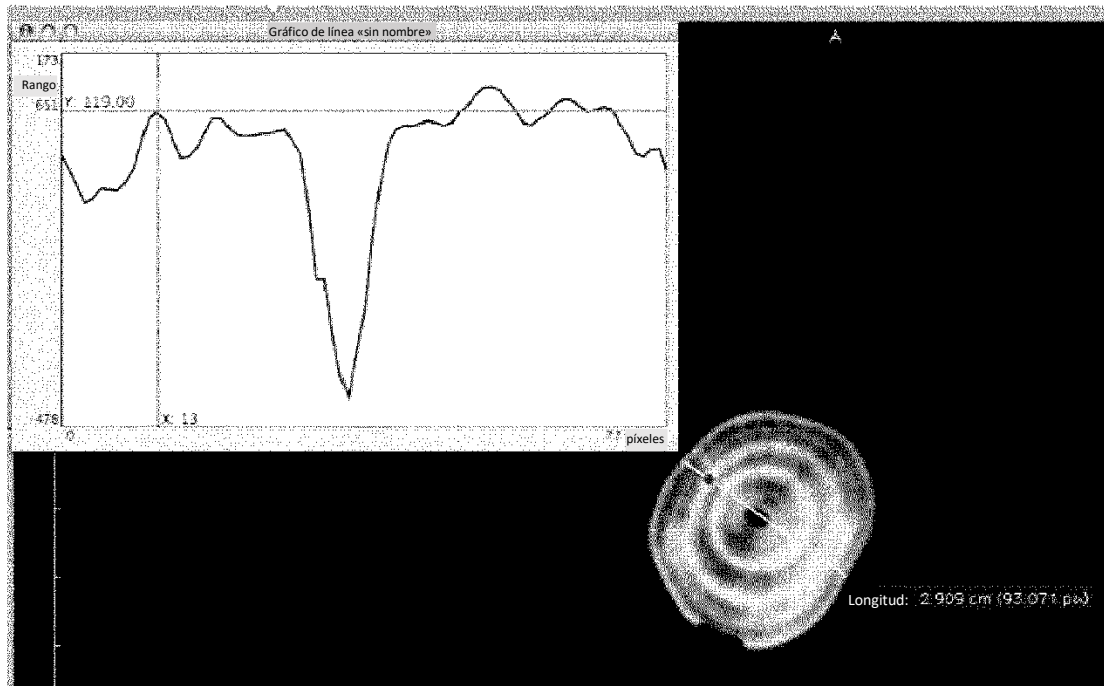


Figura 6

(a)



(b)

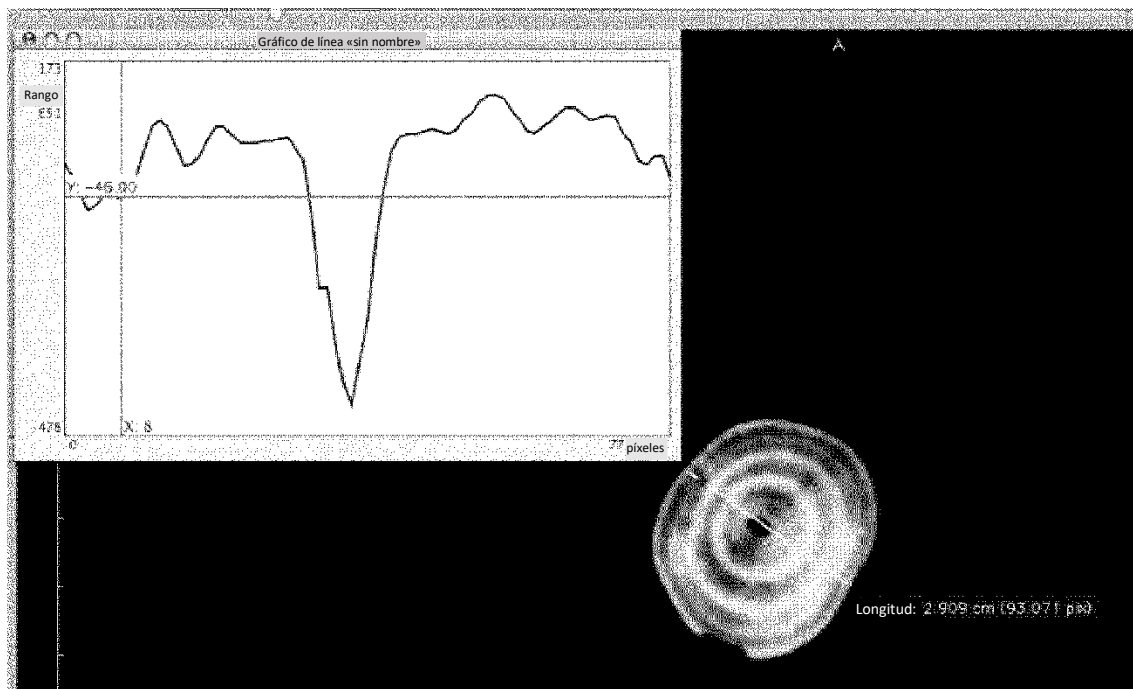
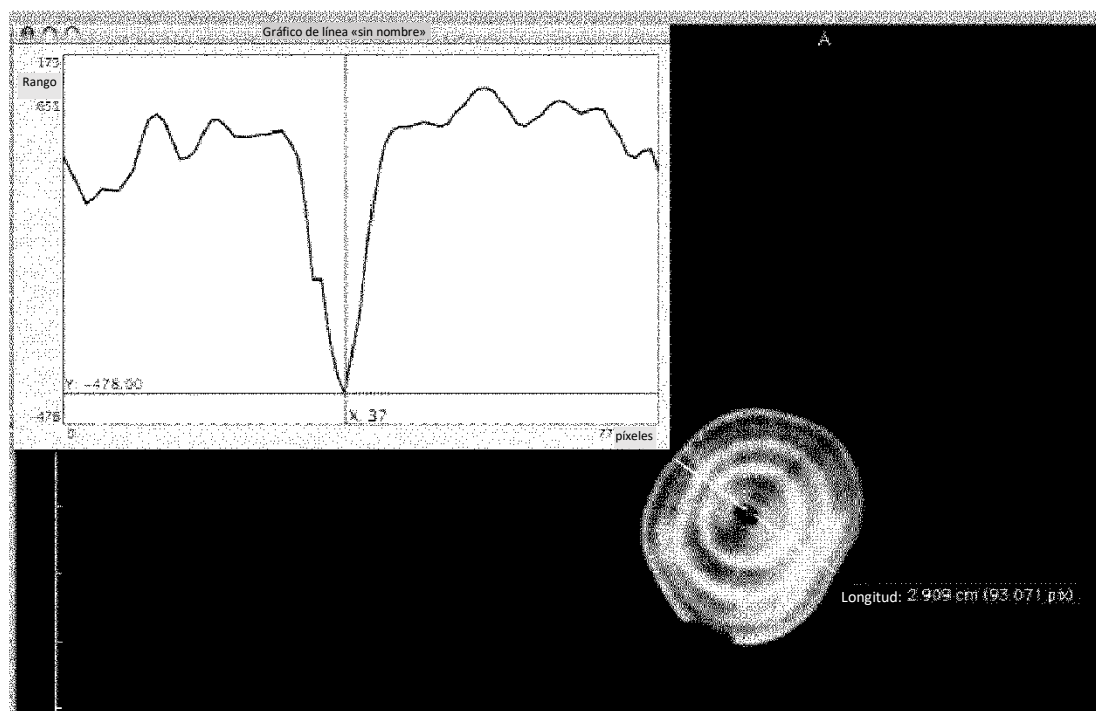


Figura 6

(c)



(d)

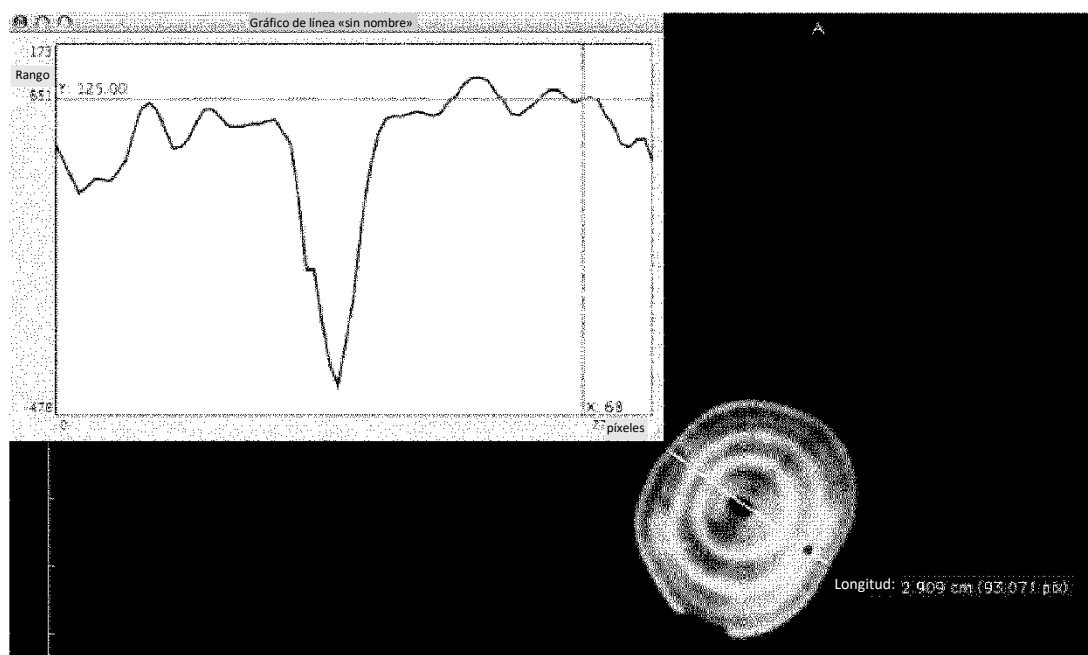


Figura 6

(e)

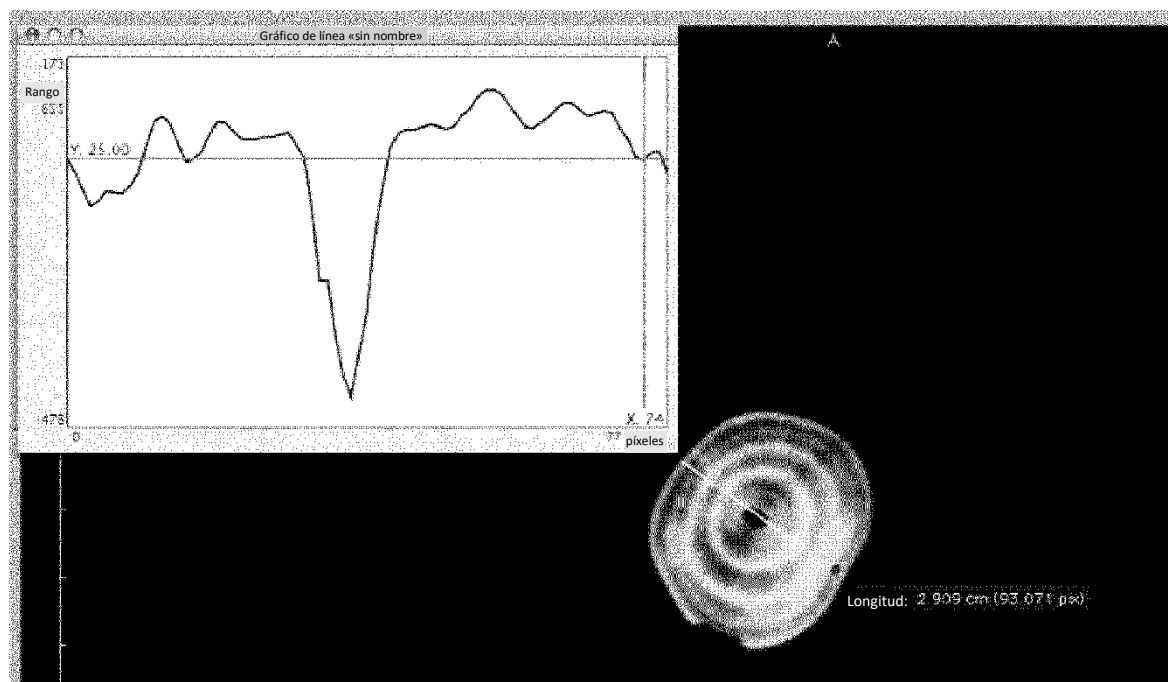
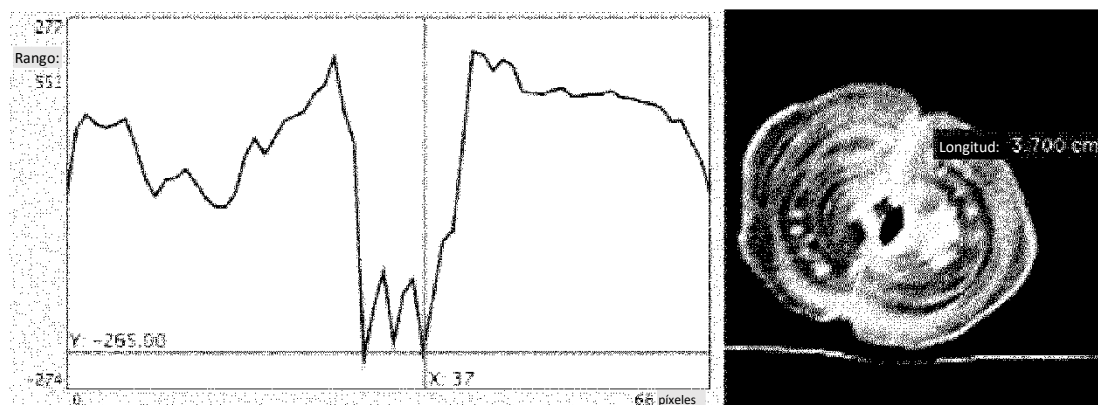
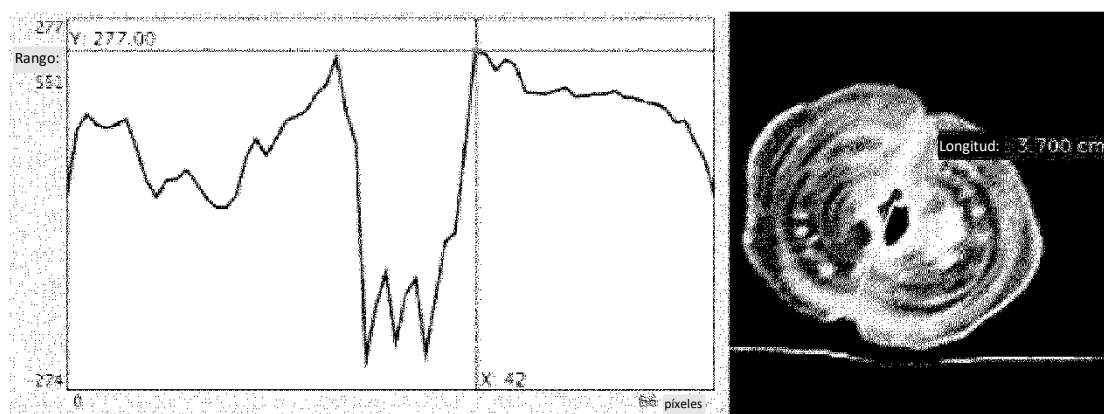


Figura 7

(a)



(b)



(c)

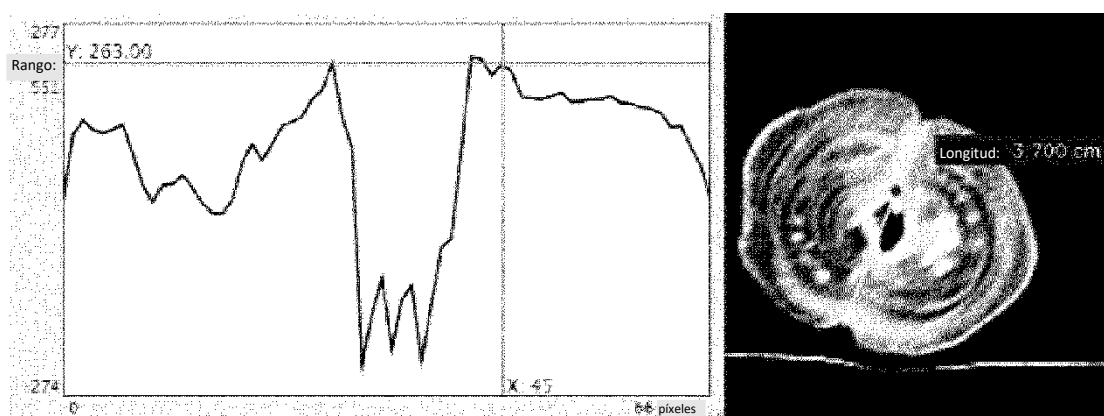
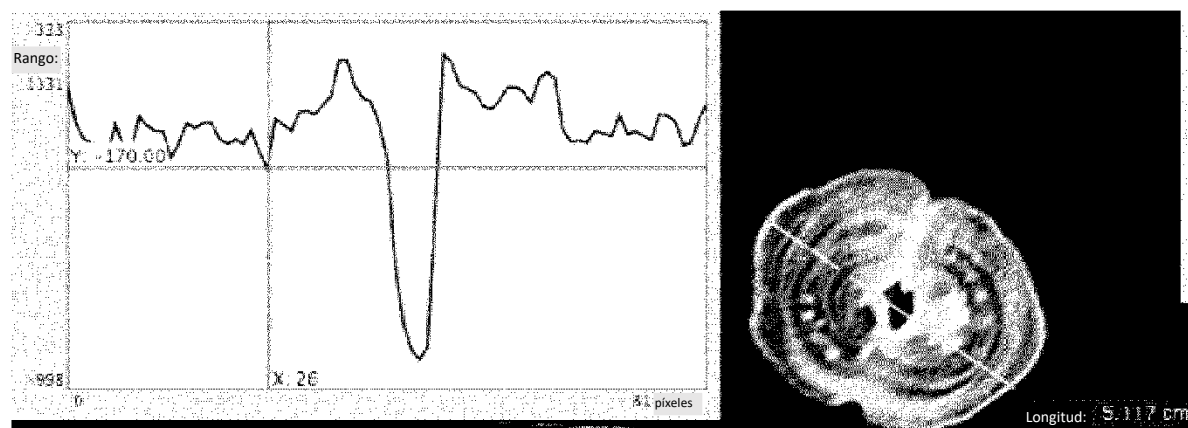
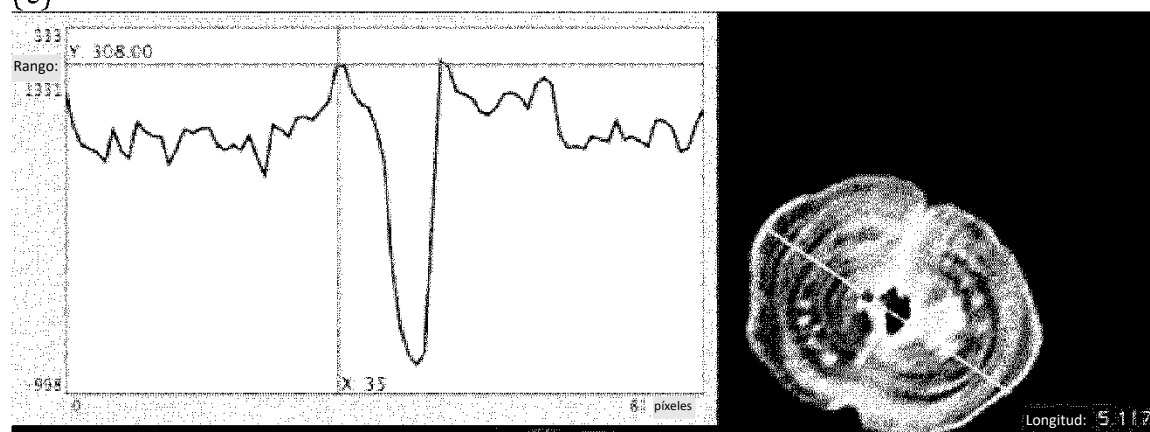


Figura 7

(d)



(e)



(f)

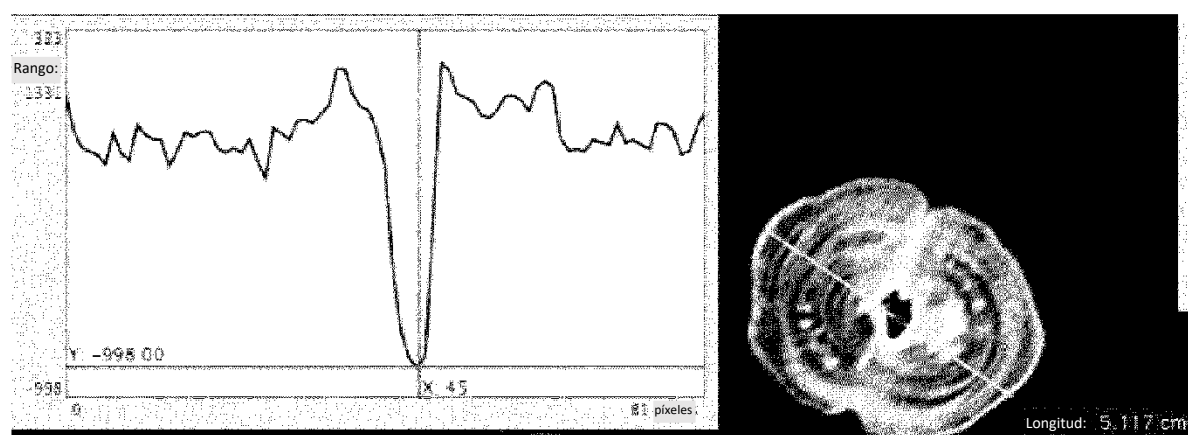
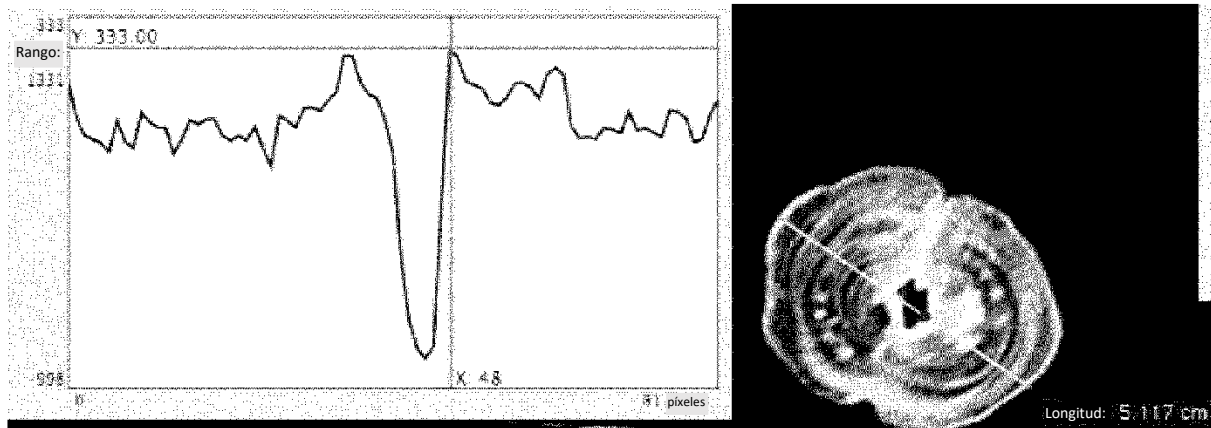
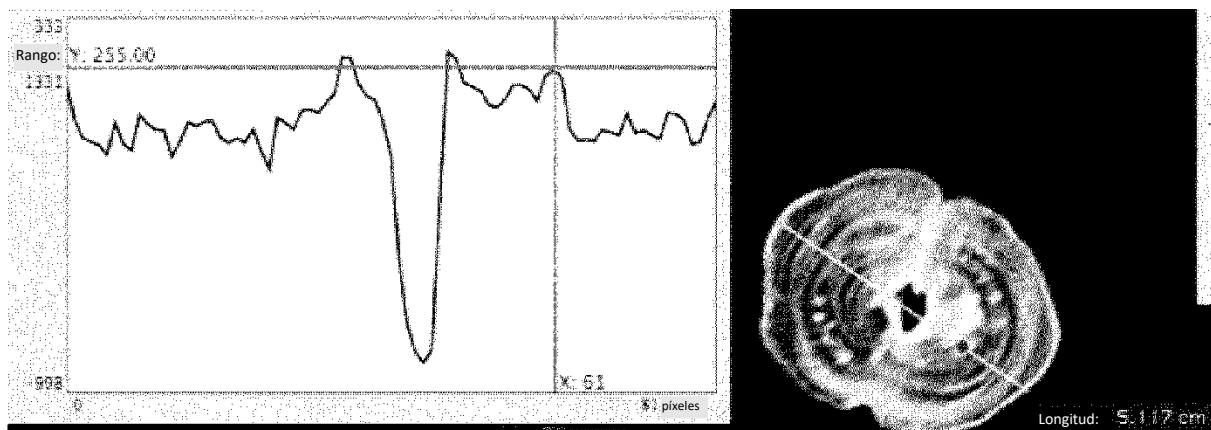


Figura 7

(g)



(h)



(i)

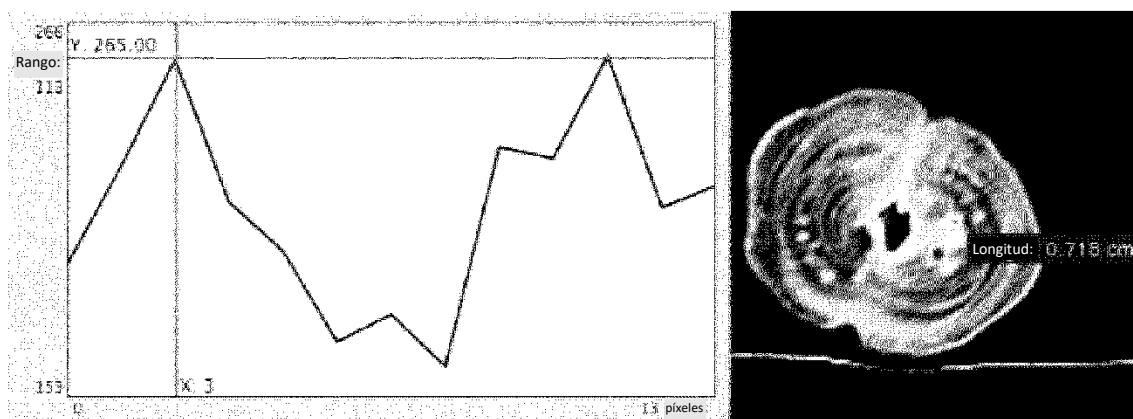
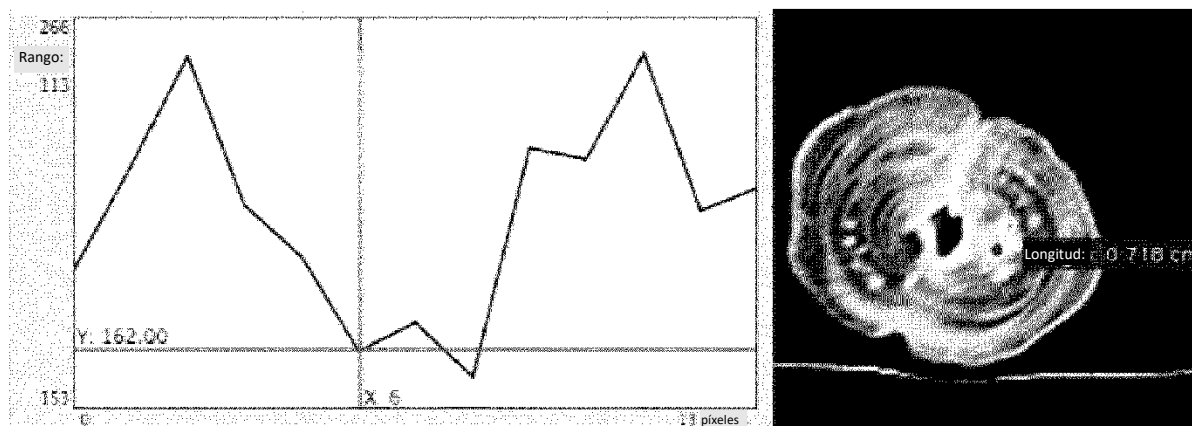
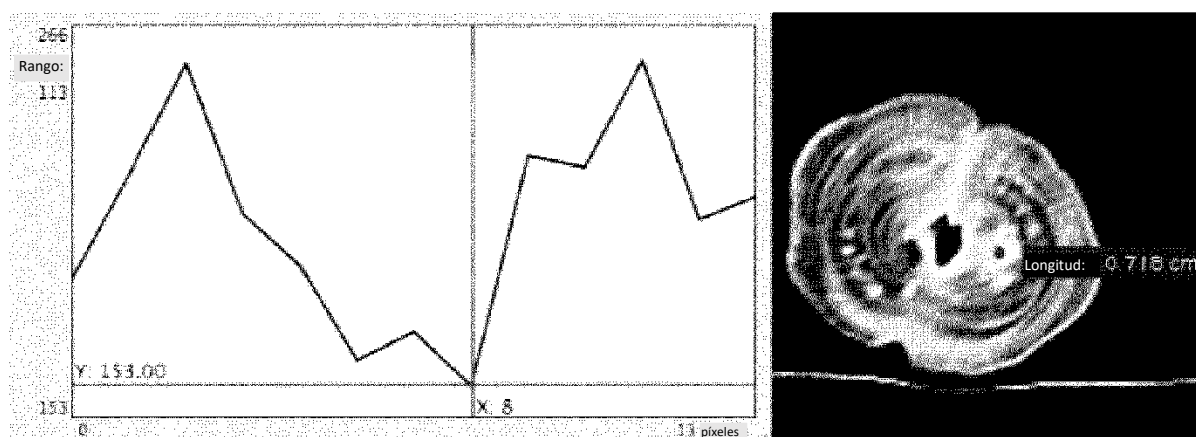


Figura 7

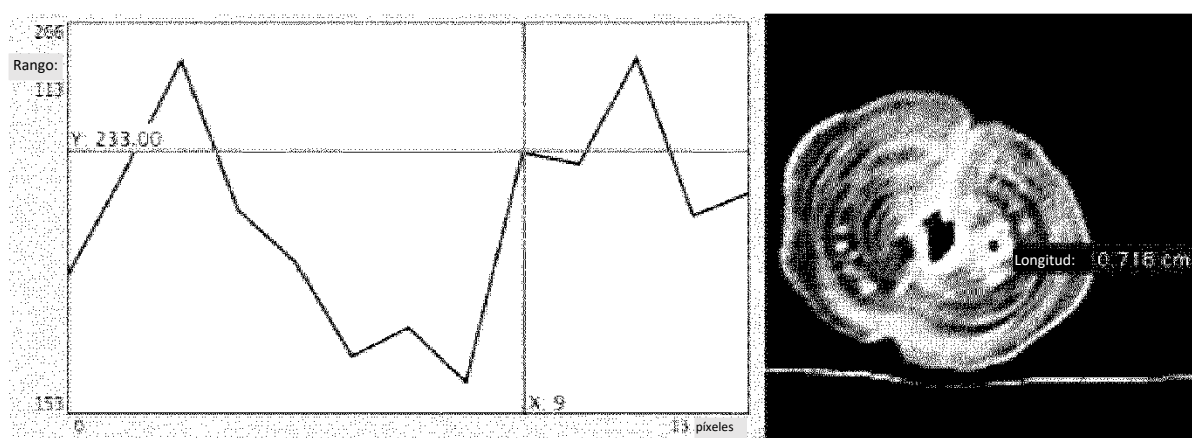
(j)



(k)



(l)



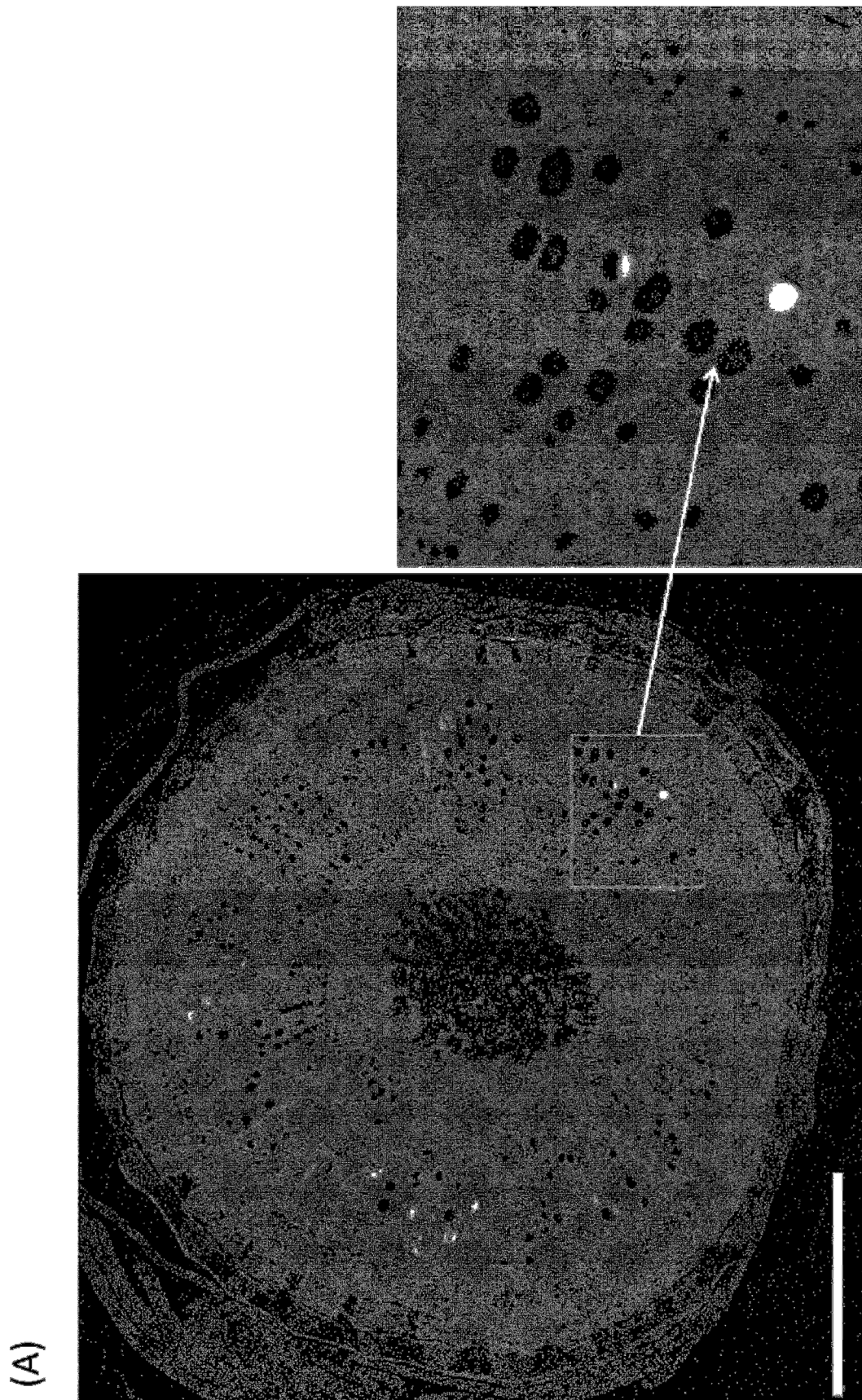


Figura 8

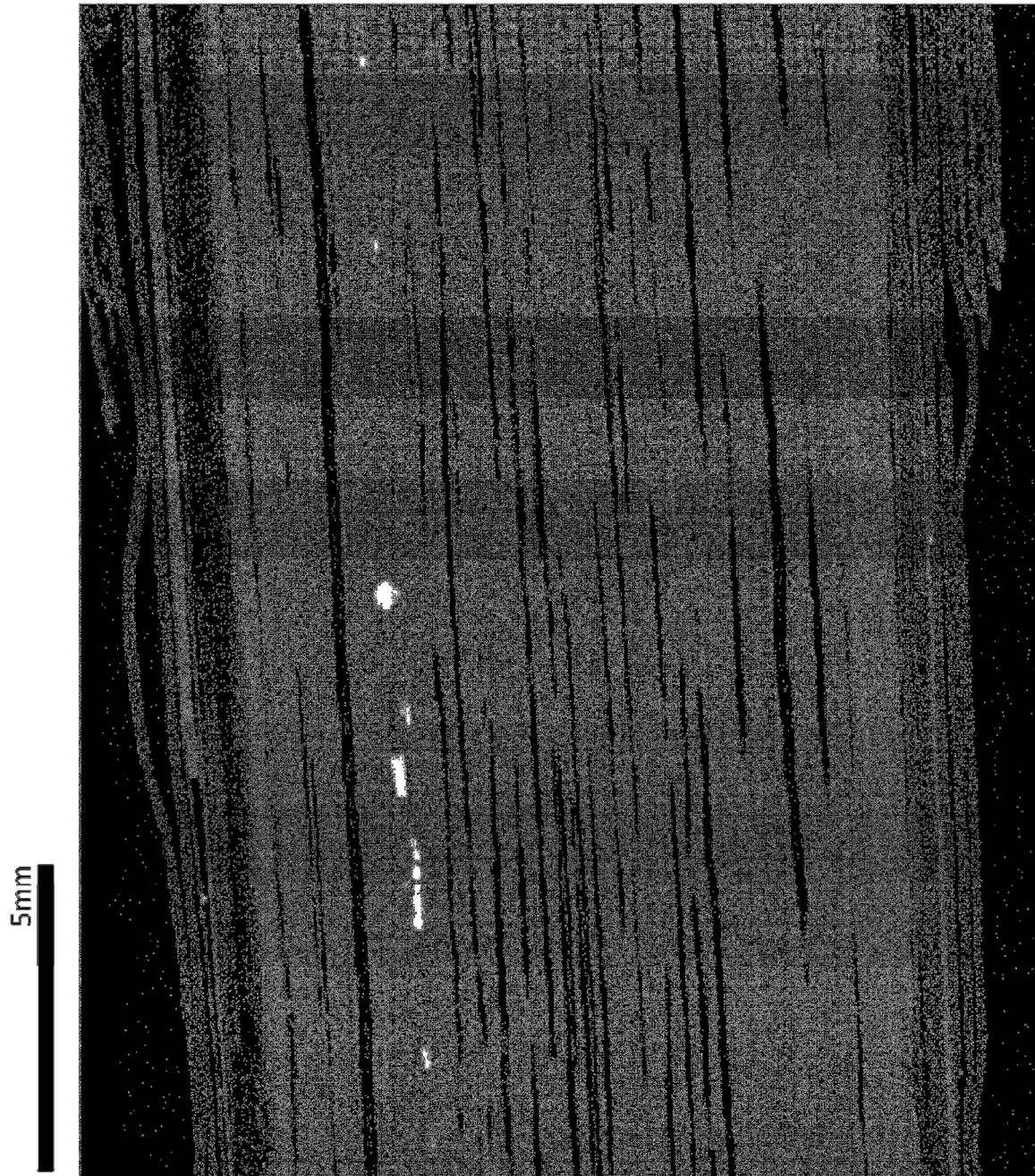


Figura 9

Figura 10

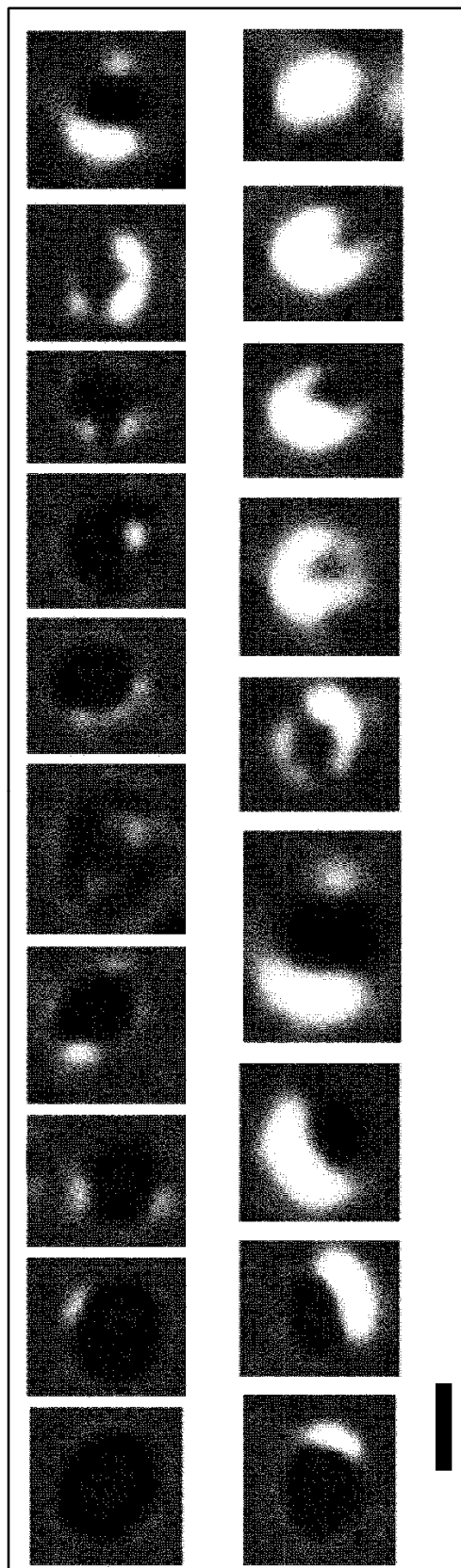


Figura 11

10cm

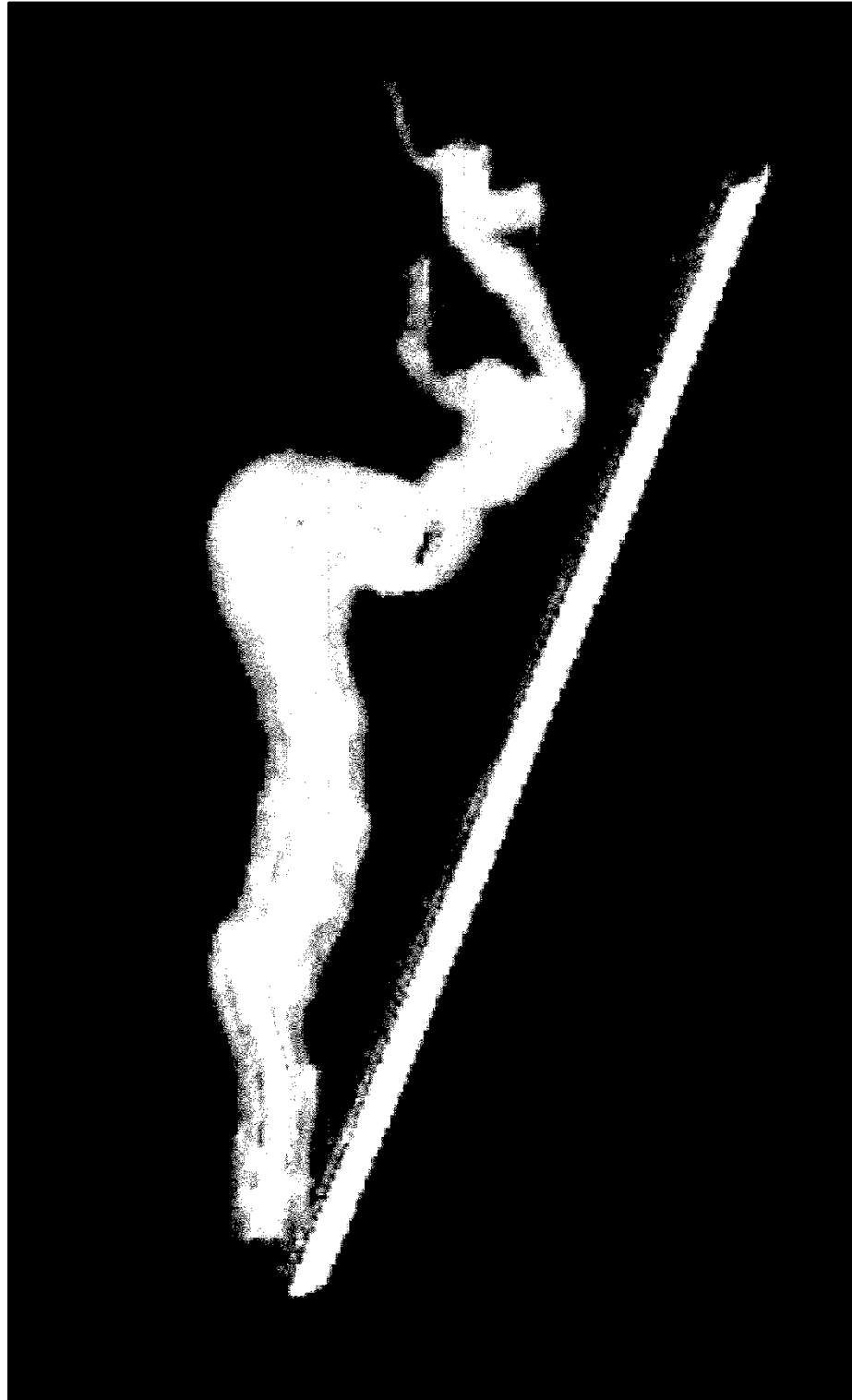


Figura 12

