

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 933 630**

21 Número de solicitud: 202130585

51 Int. Cl.:

A01N 65/03 (2009.01)

A01P 3/00 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

22.06.2021

43 Fecha de publicación de la solicitud:

10.02.2023

71 Solicitantes:

UNIVERSIDAD DE ALMERÍA (100.0%)

Ctra. Sacramento, s/n

04120 La Cañada de San Urbano (Almería) ES

72 Inventor/es:

NAVARRO LÓPEZ, Elvira;

CERÓN GARCÍA, M^a del Carmen;

LÓPEZ ROSALES, Lorenzo;

SÁNCHEZ MIRÓN, Asterio;

GARCÍA CAMACHO, Francisco y

MOLINA GRIMA, Emilio

74 Agente/Representante:

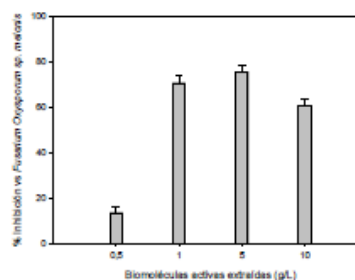
MARTINEZ, Miguel

54 Título: **FORMULACIÓN FITOSANITARIA**

57 Resumen:

Formulación fitosanitaria. La presente invención se engloba dentro de campo de los productos fitosanitarios o biopesticidas. Concretamente, la presente invención hace referencia al uso del sobrenadante obtenido de un cultivo de algas del género *Amphidinium*, para la obtención de una formulación fitosanitaria o biopesticida, particularmente una formulación antifúngica.

Figura 2



DESCRIPCIÓN
FORMULACIÓN FITOSANITARIA

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se engloba dentro de campo de los productos fitosanitarios o biopesticidas. Concretamente, la presente invención hace referencia al uso del sobrenadante
5 obtenido de un cultivo de algas del género *Amphidinium*, para la obtención de una formulación fitosanitaria o biopesticida, particularmente una formulación antifúngica.

ESTADO DE LA TÉCNICA

Amphidinium carterae es una microalga marina del grupo de los dinoflagelados. El potencial de los dinoflagelados como fuente para la obtención de diversos productos de gran interés en la agricultura ha ganado mucho interés recientemente. Las enfermedades de las plantas provocadas por infección de hongos y bacterias suponen un gran problema para los cultivos agrícolas. Además, cada vez con mayor frecuencia, se busca el empleo de prácticas de producción sostenibles, que implica por ejemplo la sustitución del uso de productos químicos, especialmente fertilizantes y plaguicidas, por sustancias naturales y de origen biológico. En
10 este sentido, las microalgas, entre las que se encuentran el grupo de los dinoflagelados, y cianobacterias se han posicionado como fuentes potenciales para la extracción y obtención de estos productos de gran interés. Estos grupos de organismos fotosintéticos están representados por una gran variedad de especies, adaptadas a muy diversos hábitats ecológicos. Para sobrevivir en un ambiente altamente competitivo, a menudo sufriendo
20 grandes fluctuaciones de factores bióticos y abióticos, han desarrollado estrategias defensivas y de adaptación, incluyendo la síntesis de una gran diversidad de compuestos obtenidos por diferentes rutas metabólicas. Algunos compuestos destacables sintetizados por estas especies son: sustancias con actividad antioxidante, como carotenoides y polifenoles; compuestos promotores del crecimiento vegetal, como fitohormonas y esteroides; sustancias con actividad
25 antimicrobiana, como ácidos grasos, polisacáridos, policétidos y sustancias con actividad antipredatoria o alelopática, como los policétidos u otras moléculas semejantes. Muchos de estos metabolitos presentan estructuras químicas muy específicas y complejas que no se encuentran entre los organismos terrestres, lo que hace difícil reproducirlos por síntesis química.

30 Las sustancias fitosanitarias son productos obtenidos a partir de un microorganismo vivo o un producto natural que son utilizados para prevenir, repeler, destruir o mitigar cualquier plaga o agente que causa daño a cultivos de plantas, humanos u otros animales. Las plagas pueden ser

insectos, animales, plantas no deseadas, microorganismos (bacterias, hongos, virus) y priones (proteínas que pueden actuar como agentes infecciosos).

Actualmente existe una necesidad no cubierta de encontrar nuevos productos fitosanitarios que sirvan de alternativa a los pesticidas tradicionales, evitando así la presencia de productos
5 químicos perjudiciales en los alimentos, al contrario que podría ocurrir con el uso de dichos pesticidas.

La presente invención se dirige a solventar dicha necesidad y por lo tanto se propone una nueva estrategia dirigida a la consecución de una formulación fitosanitaria.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

10 Breve descripción de la invención

Tal y como se indica anteriormente, la presente invención hace referencia al uso del sobrenadante obtenido de un cultivo de dinoflagelados, particularmente de algas del género *Amphidinium*, para la obtención de una formulación fitosanitaria.

Así, la presente invención propone un sistema de obtención de sustancias fitosanitarias de
15 aplicación en la agricultura a partir del sobrenadante de cultivos de microalgas marinas del género *Amphidinium*. El proceso propuesto implica tres etapas: (1) cultivo de *Amphidinium*; (2) obtención de un extracto metanólico con actividad fitosanitaria, a partir del sobrenadante del cultivo, a través de una serie de etapas dirigidas a obtener esas sustancias de interés con la mayor pureza posible; (3) preparación de una disolución acuosa con concentraciones de
20 extracto preferentemente entre 1-5 g/L para su uso como fitosanitario.

Así, la presente invención muestra la obtención de sustancias fitosanitarias utilizando el sobrenadante del cultivo de dinoflagelados, particularmente de algas del género *Amphidinium*, como materia prima y una secuencia de etapas adecuadamente diseñadas para la maximización de la recuperación de dichas sustancias. Se trata de un proceso robusto y
25 escalable. Además, es un proceso competitivo en coste, ya que permite la utilización integral de todo el cultivo, destinando el sobrenadante a la obtención de fitosanitarias y la biomasa a la obtención de otros productos de gran interés como carotenoides, ácidos grasos poliinsaturados y compuestos bioactivos tales como por ejemplo anfidiholes y anfidinólidos, etc., lo que aumenta la rentabilidad del proceso.

30 De forma particular, el proceso comprende:

- Producción de biomasa a partir de dinoflagelados usando un fotobiorreactor. El tamaño del fotobiorreactor viene determinado por las necesidades de producción y puede operarse en modo semicontinuo para generar un flujo cuasi-constante de cultivo de dinoflagelado como producto.
- 5 • Etapa de cosechado, por ejemplo, por centrifugación del cultivo o cualquier otra etapa de separación de las células del sobrenadante si es un cultivo suspendido. Dado que nos centraremos en los compuestos con propiedades antimicrobianas presentes en el medio de cultivo, será necesario recolectar el sobrenadante para continuar con el proceso. La biomasa resultante se usará para la obtención de otros productos de gran
10 interés.
- Se requiere disponer de una etapa (preferentemente microfiltración por debajo de 0,22 μm) para eliminar otros microorganismos tales como bacterias y demás componentes que pueda interferir en la acción biopesticida de las moléculas de interés contenidas en el sobrenadante .
- 15 • A continuación, se dispone de una etapa de extracción de las biomoléculas de interés, por ejemplo, tipo sólido-líquido por cromatografía de adsorción en lecho fijo a través de columnas de relleno C-18 para producir un extracto metanólico enriquecido en las sustancias de interés (biomoléculas activas y otros antifúngicos).
- Finalmente se hará una etapa de concentración, como puede ser la evaporación, con el
20 fin de eliminar el disolvente, por ejemplo, metanol en el que se encuentran suspendidos los anfidiolos, para finalmente resuspenderlos en agua y ajustar la concentración final del producto.

Tal y como se observa en el **Ejemplo 1** y **Ejemplo 2** mostrados en la presente invención, la formulación obtenida del sobrenadante proveniente del cultivo de algas del género
25 *Amphidinium*, muestra un potente efecto fitosanitario, particularmente antifúngico.

Así, el primer aspecto de la presente invención hace referencia a un método (en adelante método de la invención) para la obtención de una formulación fitosanitaria que comprende: a) Disponer algas del género *Amphidinium* en un medio de cultivo adecuado para su crecimiento, b) Obtener el sobrenadante una vez procesado el cultivo, y c) Aislar los
30 componentes activos presentes en el sobrenadante.

El segundo aspecto de la presente invención hace referencia al uso del sobrenadante obtenido de un cultivo de algas del género *Amphidinium* para la obtención de una formulación fitosanitaria.

5 El tercer aspecto de la presente invención hace referencia a una formulación obtenible a través del método de la invención. En un aspecto particular, la formulación comprende o consiste en al menos uno de los siguientes compuestos: Acetato, Etanol, Colina, Glicerol, anfidiol, Fenilalanina, Formiato, Alanina y Lactato.

10 En un aspecto preferido, la formulación fitosanitaria es una formulación antifúngica, preferentemente frente a hongos del género *Fusarium*, en particular *Fusarium oxysporum*. No obstante, dicha formulación podría usarse frente a diferentes tipos de hongos, por ejemplo:

A)

Acrocalymma, Acrocalymma medicaginis,

Acrodontium, Acrodontium simplex

Acrophialophora, Acrophialophora fusispora,

15 *Acrosporium, Acrosporium tingitaninum,*

Aecidium, Aecidium aechmantherae, Aecidium amaryllidis, Aecidium breyniae, Aecidium campanulastris, Aecidium cannabis, Aecidium cantensis, Aecidium caspicum, Aecidium foeniculi, Aecidium narcissi,

Ahmadiago,

20 *Albonectria, Albonectria rigidiuscula,*

Allodus, Allodus Podophylli,

Alternaria, Alternaria alternata, Alternaria brassicae, Alternaria brassicicola, Alternaria carthami, Alternaria cinerariae, Alternaria dauci, Alternaria dianthi, Alternaria dianthicola, Alternaria euphorbiicola, Alternaria helianthi, Alternaria helianthicola, Alternaria japonica,

25 *Alternaria leucanthemi, Alternaria limicola, Alternaria linicola, Alternaria padwickii, Alternaria panax, Alternaria radicina, Alternaria raphani, Alternaria saponariae, Alternaria senecionis, Alternaria solani, Alternaria tenuissima, Alternaria triticina, Alternaria zinniae,*

Amphobotrys, Amphobotrys ricini,

Anguillosporella, Anguillosporella vermiformis,

Anthostomella, Anthostomella pullulons,

Antrodia, Antrodia albida Antrodia serialiformis, Antrodia serialis,

Apiospora, Apiospora mountain,

5 *Appendiculella,*

Armillaria Armillaria heimii, Armillaria sinapina, Armillaria socialis, Armillaria tabescens,

Arthrocladiella, Arthuriomyces, Arthuriomyces peckianus,

Ascochyta, Ascochyta asparagina, Ascochyta bohémica, Ascochyta caricae, Ascochyta

doronici, Ascochyta fabae f.sp. lentis, Ascochyta graminea, Ascochyta hordei, Ascochyta

10 *humuli, Ascochyta pisi, Ascochyta prasadii, Ascochyta sorghi, Ascochyta spinaciae,*

Ascochyta tarda, Ascochyta tritici, Ascospora, Ascospora ruborum,

Aspergillus, Aspergillus aculeatus, Aspergillus scherianus, Aspergillus Niger,

Asperisporium, Asperisporium caricae,

Asteridiella,

15 *Asteroma, Asteroma caryae,*

Athelia, Athelia arachnoidea, Athelia rolfsii,

Aurantiporus, Aurantiporus ssilis,

Aureobasidium, Aureobasidium pullulons,

B)

20 *Bambusiomyces, Banana freckle,*

Bayoud disease,

Beniowskia, Beniowskia sphaeroidea,

Bionectria, Bionectria ochroleuca

Bipolaris, Bipolaris cactivora, Bipolaris cookei, Bipolaris incurvata, Bipolaris

25 *saccharication,*

- Biscogniauxia*, *Biscogniauxia capnodes*, *Biscogniauxia marginate*,
Bjerkandera, *Bjerkandera adusta*
Black sigatoka,
Blakeslea, *Blakeslea trispora*,
- 5 *Blumeria*, *Blumeria graminis*,
Botryodiplodia, *Botryodiplodia oncidii*, *Botryodiplodia ulmicola*,
Botryosphaeria, *Botryosphaeria cocogena*, *Botryosphaeria dothidea*, *Botryosphaeria marconii*, *Botryosphaeria obtusa*, *Botryosphaeria rhodina*, *Botryosphaeria ribis*, *Botryosphaeria stevensii*,
- 10 *Botryosporium*, *Botryosporium pulchrum*,
Botryotinia, *Botryotinia fuckeliana*, *Botryotinia polyblastis*
Botrytis, *Botrytis allii*, *Botrytis anthophila*, *Botrytis cinerea*, *Botrytis fabae*, *Botrytis narcissicola*,
Boxwood blight,
- 15 *Brachybasidiaceae*,
Brasiliomyces, *Brasiliomyces malachrae*,
Briosia, *Briosia ampelophaga*,
Brown ring patch, *Buckeye rot of tomato*,
Bulbomicrosphaera,
- 20 C)
Cadophora, *Cadophora malorum*
Caespitotheca,
Calonectria, *Calonectria ilicicola*, *Calonectria indusiata*, *Calonectria kyotensis*, *Calonectria pyrochroa*, *Calonectria quinquesepata*,
- 25 *Camarotella*, *Camarotella acrocomiae*, *Camarotella costaricensis*,

Canna rust,

Capitorostrum

Capnodium, Capnodium Footii, Capnodium mangiferum, Capnodium ramosum, Capnodium theae,

5 *Cephalosporium, Cephalosporium gramineum,*

Ceratobasidium, Ceratobasidium cereal, Ceratobasidium cornigerum, Ceratobasidium noxium, Ceratobasidium ramicola, Ceratobasidium setariae, Ceratobasidium stevensii,

Ceratocystis, Ceratocystis adiposa, Ceratocystis coerulescens, Ceratocystis mbriata, Ceratocystis moniliformis, Ceratocystis oblonga, Ceratocystis obpyriformis, Ceratocystis paradoxa Ceratocystis pilifera, Ceratocystis pluriannulata, Ceratocystis polyconidia,
10 *Ceratocystis tanganyicensis, Ceratocystis zombamontana,*

Ceratorhiza, Ceratorhiza hydrophila,

Ceratospermopsis,

Cercoseptoria, Cercoseptoria ocellata, Cercosporella, Cercosporella ruby,

15 *Cercospora Cercospora Cercospora apii, Cercospora apii f.sp. clerodendri, Cercospora apiicola, Cercospora arachidicola, Cercospora asparagi, Cercospora atroliformis, Cercospora beticola, Cercospora brachypus, Cercospora brassicicola, Cercospora brunckii, Cercospora cannabis, Cercospora cantuariensis, Cercospora capsici, Cercospora carotae, Cercospora corylina, Cercospora fuchsiae, Cercospora fusca, Cercospora fusimaculans,*
20 *Cercospora gerberae, Cercospora halstedii, Cercospora handelii, Cercospora hayi, Cercospora Hydrangeae, Cercospora kikuchii, Cercospora lentis, Cercospora liquidambaris, Cercospora longipes, Cercospora longissima, Cercospora mamaonis, Cercospora mangiferae, Cercospora medicaginis, Cercospora melongenae, Cercospora minuta Cercospora nicotianae, Cercospora odontoglossi Cercospora papayae, penniseti*
25 *Cercospora, Cercospora Pisa-sativae, Cercospora platanicola, Cercospora puderii, Cercospora pulcherrima, Cercospora rhapidicola, Cercospora rosicola, Cercospora sojina, Cercospora solani, Cercospora solani-tuberosi, Cercospora sor ghee, Cercospora theae, Cercospora tuberculans, Cercospora vexans, Cercospora vicosae, Cercospora zae-maydis, Cercospora zebrina, Cercospora zonata,*

30 *Ceriporia, Ceriporia spissa, Ceriporia xylostromatoides,*

Cerrena, Cerrena unicolor,

Ceuthospora, Ceuthospora lauri,

Choanephora, Choanephora cucurbitarum, Choanephora infundibulifera,

Chrysanthemum, Chrysanthemum white rust,

- 5 *Chrysomyxa, Chrysomyxa cassandrae, Chrysomyxa, Chrysomyxa himalensis, Chrysomyxa ledi, Chrysomyxa ledi var. rhododendri, Chrysomyxa ledicola, Chrysomyxa nagodhii, Chrysomyxa neoglandulosi, Chrysomyxa piperiana, Chrysomyxa pirolata, Chrysomyxa pyrolae, Chrysomyxa reticulata, Chrysomyxa roanensis, Chrysomyxa succinea,*

- 10 *Cladosporium, Cladosporium arthropodii, Cladosporium cladosporioides, Cladosporium cladosporioides f.sp. pisicola, Cladosporium cucumerinum, Cladosporium herbarum, Cladosporium musae, Cladosporium oncobae*

Claviceps purpurea

Climacodon, Climacodon pulcherrimus, Climacodon septentrionalis

Clitocybe, Clitocybe parasitica,

- 15 *Clonostachys roseaf. Rosea,*

Clypeoporthe, Clypeoporthe iliau,

- 20 *Cochliobolus, Cochliobolus, Cochliobolus carbonum, Cochliobolus cymbopogonis, Cochliobolus hawaiiensis, Cochliobolus heterostrophus, Cochliobolus lunatus, Cochliobolus miyabeanus, Cochliobolus ravenelii, Cochliobolus sativus, Cochliobolus setariae, Cochliobolus spicifer, Cochliobolus stenospilus, Cochliobolus tuberculatus, Cochliobolus victoriae,*

Coleosporium, Coleosporium helianthi, Coleosporium ipomoeae, Coleosporium madaiae, Coleosporium pacicum, Coleosporium tussilaginis,

- 25 *Colletotrichum, Colletotrichum acutatum, Colletotrichum arachidis, Colletotrichum capsici, Colletotrichum cereals, Colletotrichum coffeanum, Colletotrichum crassipes, Colletotrichum dematium, Colletotrichum dematium f. spinaciae, Colletotrichum derridis, Colletotrichum destructivum, Colletotrichum gloeosporioides, Colletotrichum wisteria, Colletotrichum gossypii, Colletotrichum graminicola, Colletotrichum higginsianum, Colletotrichum kahawae, Colletotrichum lindemuthianum, Colletotrichum Kingdom, Colletotrichum*

mangenotii, *Colletotrichum musae*, *Colletotrichum nigrum*, *Colletotrichum orbiculare*,
Colletotrichum pisi, *Colletotrichum sublineolum*, *Colletotrichum trichellum*, *Colletotrichum*
trifolii, *Colletotrichum truncatum*,

Conidiosporomyces,

5 *Coniella*, *Coniella castaneicola*, *Coniella diplodiella*, *Coniella fragariae*,

Coniothecium, *Coniothecium chomatosporum*,

Coniothyrium, *Coniothyrium-celtidis australis*, *Coniothyrium henriquesii*, *Coniothyrium*
rosarum, *Coniothyrium wernsdorae*,

Coprinopsis, *Coprinopsis psychromorbida*,

10 *Cordana*, *Cordana johnstonii*, *Cordana musae*,

Corioloopsis occosa, *Corn gray leaf spot*,

Corticium, *Corticium invisum*, *Corticium penicillatum*, *Corticium theae*,

Coryneopsis, *Coryneopsis rubi*,

Corynespora, *Corynespora cassiicola*,

15 *Claviceps*, *Claviceps fusiformis*, *Claviceps purpurea*, *Claviceps sorghi*, *Claviceps zizaniae*,

Coryneum, *Coryneum rhododendri*,

Covered smut,

Crinipellis, *Crinipellis sarmentosa*,

Cronartium, *Cronartium ribicola*,

20 *Cryphonectriaceae*, *Cryptobasidiaceae*,

Cryptocline, *Cryptocline cyclaminis*

Cryptomeliola,

Cryptosporella, *Cryptosporella umbrina*,

Cryptosporiopsis, *Cryptosporiopsis tarraconensis*,

25 *Cryptosporium*, *Cryptosporium minimum*,

Curvularia, *Curvularia lunata*, *Curvularia caricae-papayae*, *Curvularia penniseti*,
Curvularia senegalensis, *Curvularia trifolii*,

Cyclaneusma needle cast,

5 *Cylindrocarpon*, *Cylindrocarpon ianthothele*, *Cylindrocarpon magnusianum*,
Cylindrocarpon musae,

Cylindrocladiella, *Cylindrocladiella camelliae*, *Cylindrocladiella parva*,

Cylindrocladium, *Cylindrocladium clavatum*, *Cylindrocladium lanceolatum*,
Cylindrocladium peruvianum, *Cylindrocladium pteridis*,

10 *Cylindrosporium*, *Cylindrosporium cannabinum*, *Cylindrosporium juglandis*,
Cylindrosporium ruby,

Cymadothea, *Cymadothea trifolii*

Cytospora, *Cytospora palmarum*, *Cytospora personata*, *Cytospora saccharication*,
Cytospora sacculus, *Cytospora terebinthi*,

Cytosporina, *Cytosporina ludibunda*,

15 D)

Dactuliophora, *Dactuliophora elongata*,

Davidiella, *Davidiella dianthi*, *Davidiella Tassiana*,

Deightoniella, *Deightoniella papuana*, *Deightoniella torulosa*,

Dendrophora, *Dendrophora marconii*, *Dendrophora erumpens*,

20 *Denticularia*, *Denticularia mangiferae*,

Dermea pseudotsugae, *diaporthaceae*,

Diaporthe, *Diaporthe arctii*, *Diaporthe dulcamarae*, *Diaporthe eres*, *Diaporthe helianthi*,

Diaporthe lagunensis, *Diaporthe lokoyae*, *Diaporthe melonis*, *Diaporthe orthoceras*,

Diaporthe pernicious, *Diaporthe phaseolorum* *Diaporthe phaseolorum*, *Diaporthe*

25 *phaseolorum*, *Diaporthe rudis*, *Diaporthe tanakae*, *Diaporthe toxica*,

Dicarpella, *Dicarpella dryina*,

Didymella, *Didymella applanata*, *Didymella bryoniae*, *Didymella fabae*, *Didymella lycopersici*, *Didymella rabiei*

Didymosphaeria, *Didymosphaeria arachidicola*, *Didymosphaeria taiwanensis*,

Dilophospora, *Dilophospora alopecuri*,

5 *Dimeriella*, *Dimeriella saccharication*

Diplocarpon, *Diplocarpon mespili*, *Diplocarpon rosae*,

Diplodia, *Diplodia allocellula*, *Diplodia laelio-cattleyae*, *Diplodia manihoti*, *Diplodia paraphysaria*, *Diplodia seriata*, *Diplodia theae-sinensis*,

Discosia, *Discosia artocreas*,

10 *Discostroma*, *Discostroma corticola*,

Distocercospora, *Distocercospora livistonae*

Dothiorella, *Dothiorella brevicollis*, *Dothiorella Dominicana*, *Dothiorella dulcispinae*,
Dothiorella gregaria,

Drechslera, *Drechslera avenacea*, *Drechslera campanulata*, *Drechslera dematioidea*,

15 *Drechslera gigantea*, *Drechslera wisteria*, *Drechslera musae-sapientium*, *Drechslera teresf. maculata*, *Drechslera wirreganensis*,

E)

Eballistra, *Eballistra lineata*, *Eballistra oryzae*,

Eballistraceae,

20 *Echinodontium*, *Echinodontium ryvardeenii*, *Echinodontium tinctorium*,

Ectendomeliola,

Elsinoë, *Elsinoë ampelina*, *Elsinoë batatas*, *Elsinoë brasiliensis*, *Elsinoë leucospila*, *Elsinoë randii*, *Elsinoë rosarum*, *Elsinoë saccharication*, *Elsinoë theae*, *Elsinoë Veneta*,

Endomeliola,

25 *Endothia*, *Endothia radicalis*,

Endothiella, *Endothiella gyrosa*,

Entorrhizomycetes,

Entyloma, Entyloma ageratinae, Entyloma dahlia, Entyloma ellisii,

Epicoccum, Epicoccum nigrum,

Eremothecium, Eremothecium coryli, Eremothecium gossypii

- 5 *Erysiphe, Erysiphe necator, Erysiphe betae, Erysiphe brunneopunctata, Erysiphe cichoracearum Erysiphe cruciferarum, Erysiphe graminisf. sp. Avenae, Erysiphe graminisf.sp. tritici, Erysiphe heraclei, Erysiphe pisi,*

Erysiphales, Exobasidiaceae,

Erysiphe, Erysiphe necator

- 10 *Exobasidium burtii, Exobasidium reticulatum Exobasidium vacinii var. japonicum, Exobasidium vacinii-uliginosi, Exobasidium vexans,*

Exophiala alcalophila, Exophiala, Exophiala angulospora, Exophiala attenuata, Exophiala calicioid, Exophiala castellanii, Exophiala dermatitidis, Exophiala dopicola, Exophiala exophialae, Exophiala heteromorpha, Exophiala hongkongensis, Exophiala jeanselmei,
 15 *Exophiala lecanii-corni, Exophiala mansonii, Exophiala mesophila, Exophiala moniliae, Exophiala negronii, Exophiala phaeomuriformis, Exophiala pisciphila, Exophiala psychrophila, Exophiala salmonis, Exophiala spinifera,*

F)

Fomes, Fomes lamaënsis, Fomitopsis, Fomitopsis rosea,

- 20 *Fusarium, Fusarium ane, Fusarium arthrosporioides, Fusarium avenaceum, Fusarium crookwellense, Fusarium culmorum, Fusarium graminearum, Fusarium jikuroï, Fusarium moniliforme, Fusarium incarnatum, Fusarium solani, Fusarium langsethiae, mangiferae Fusarium, Fusarium oxysporum f albedinis, Fusarium oxysporum f asparagi Fusarium oxysporum f batatas, Fusarium oxysporum f betae, Fusarium oxysporum f cannabis,*
 25 *Fusarium oxysporum f carthami, Fusarium oxysporum f cattleyae, Fusarium oxysporum f ciceris, Fusarium oxysporum f Coffea, Fusarium oxysporum f Cubense, Fusarium oxysporum f cyclaminis, Fusarium oxysporum f dianthi, Fusarium oxysporum f lentis, Fusarium oxysporum f Kingdom, Fusarium oxysporum f lycopersici, Fusarium oxysporum f medicaginis, Fusarium oxysporum f pisi, Fusarium oxysporum f radice-lycopersici,*

Fusarium oxysporum f Spinacia, Fusarium oxysporum, Fusarium pallidroseum, Fusarium patch, Fusarium poae, Fusarium proliferatum, Fusarium pseudograminearum, Fusarium redolens, Fusarium sacchari, Fusarium solani, Fusarium subglutinans, Fusarium sulphureum, Fusarium tricinctum, Fusarium verticillioides, Fusarium wilt,

5 *Fusicladium Fusicladium pisicola,*

Fusicoccum, Fusicoccum aesculi, Fusicoccum amygdali, Fusicoccum Quercus,

G)

Gaeumannomyces, Gaeumannomyces graminis,

Galactomyces, Galactomyces candidum,

10 *Ganoderma, Ganoderma brownii, Ganoderma lobatum, Ganoderma megaloma, Ganoderma meredithiae, Ganoderma orbiform, Ganoderma philippii, Ganoderma sessile, Ganoderma tornatum, Ganoderma zonatum,*

Geastrumia, Geastrumia polystigmatis,

Georgescheriaceae, Georgescheriales,

15 *Geosmithia, Geosmithia pallida,*

Geotrichum, Geotrichum candidum, Geotrichum klebahnii,

Gibberella, Gibberella acuminata, Gibberella avenacea, Gibberella baccata, Gibberella cyanogena, Gibberella fujikuroi, Gibberella intricans, Gibberella pulicaris, Gibberella stilboides, Gibberella tricincta, Gibberella xylarioides, Gibberella zeae,

20 *Gibellina Gibellina cerealis,*

Gilbertella, Gilbertella persicaria,

Gjaerumiaceae, Gliocladiopsis,

Gliocladiopsis, Gliocladiopsis tenuis,

Gliocladium, Gliocladium vermoeseni,

25 *Gloeocercospora, Gloeocercospora sorghi,*

Gloeocystidiellum, Gloeocystidiellum porosum,

- Gloeophyllum*, *Gloeophyllum mexicanum*, *Gloeophyllum trabeum*,
Gloeoporus, *Gloeoporus dichrous*,
Gloeosporium, *Gloeosporium cattleyae*, *Gloeosporium theae-sinensis*,
Glomerella, *Glomerella cingulata*, *Glomerella graminicola*, *Glomerella tucumanensis*,
5 *Gnomonia*, *Gnomonia caryae*, *Gnomonia comari*, *Gnomonia diaspora*, *Gnomonia iliau*,
Gnomonia ruby,
Golovinomyces, *Golovinomyces cichoracearum*,
Graphiola phoenicis,
Graphiolaceae, *Graphium*,
10 *Graphium rigidum*, *Graphium rubrum*,
Graphyllum, *Graphyllum pentamerum*,
Grovesinia, *Grovesinia pyramidalis*,
Guignardia, *Guignardia bidwelli*, *Guignardia camelliae*, *Guignardia fulvida*, *Guignardia*
mangiferae, *Guignardia musae*, *Guignardia philoprina*,
15 *Gymnoconia*, *Gymnoconia nitens* *Gymnopus*,
Gymnopus, *Gymnopus dryophilus*,
Gymnosporangium, *Gymnosporangium kernianum*, *Gymnosporangium libocedri*,
Gymnosporangium nelsonii, *Gymnosporangium yamadae*,
H)
20 *Haematonectria*, *Haematonectria haematococca*,
Hansenula, *Hansenula subpelliculosa*,
Hapalosphaeria, *Hapalosphaeria distort*,
Haplobasidion, *Haplobasidion musae*,
Helicobasidium, *Helicobasidium compactum*, *Helicobasidium longisporum*, *Helicobasidium*
25 *purpureum*,

Helicoma, Helicoma muelleri,

Helminthosporium, Helminthosporium cookei, Helminthosporium solani,

Hendersonia, Hendersonia creberrima, Hendersonia theicola,

Hericium, Hericium coralloides,

5 *Heterobasidion, Heterobasidion irregulare,*

Hexagonia, Hexagonia hydnoides,

Hymenula, Hymenula anis,

Hyphodermella, Hyphodermella corrugata,

Hyphodontia, Hyphodontia aspera, Hyphodontia sambuci,

10 *Hypoxylon, Hypoxylon Tinctor,*

I)

Inonotus, Inonotus arizonicus, Inonotus cuticularis, Inonotus dryophilus, Inonotus hispidus,

Inonotus ludovicianus,

Irpex, Irpex destruens, Irpex lacteus,

15 K)

Kabatiella, Kabatiella caulivora,

Karnal bunt,

Koa wilt,

Kretzschmaria, Kretzschmaria zonata,

20 *Kuehneola, Kuehneola uredinis,*

Kutilakesa, Kutilakesa pironii,

L)

Laetiporus, Laetiporus ailaoshanensis, Laetiporus baudonii, Laetiporus caribensis,

Laetiporus conifericola, Laetiporus cremeiporus, Laetiporus gilbertsonii, Laetiporus

25 *huroniensis, Laetiporus montanus, Laetiporus portentosus, Laetiporus zonatus,*

- Laxitextum*, *Laxitextum bicolor*,
- Leandria*, *Leandria momordicae*,
- Lentinus*, *Lentinus tigrinus*,
- Lenzites*, *Lenzites betulina*, *Lenzites elegans*,
- 5 *Leohumicola*, *Leohumicola atra*, *Leohumicola incrustata*, *Leohumicola levissima*,
- Leptodontidium*, *Leptodontidium elatius*, *Leptographium*, *Leptographium microsporium*,
- Leptosphaeria*, *Leptosphaeria nodorum*, *Leptosphaeria acuta*, *Leptosphaeria cannabina*,
Leptosphaeria coniothyrium, *Leptosphaeria libanotis*, *Leptosphaeria lindquistii*,
Leptosphaeria maculans *Leptosphaeria musarum*, *Leptosphaeria pratensis*, *Leptosphaeria*
10 *saccharication*, *Leptosphaeria woroninii*,
- Leptosphaerulina*, *Leptosphaerulina crassiasca*, *Leptosphaerulina trifolii*,
- Leptothyrium*, *Leptothyrium nervisedum*,
- Leptotrochila*, *Leptotrochila medicaginis*,
- Leucocytophora*, *Leucocytophora leucostoma*,
- 15 *Leucostoma*, *Leucostoma auerswaldii*, *Leucostoma canker*, *Leucostoma kunzei*, *Leucostoma*
persoonii,
- Leveillula*, *Leveillula compositarum*, *Leveillula leguminosarum*, *Leveillula taurica*,
- Limacinula*, *Limacinula tenuis*,
- Linochora*, *Linochora graminis*,
- 20 *Loose smut*,
- Lopharia*, *Lopharia crassa*,
- Lophodermium*, *Lophodermium aucupariae*, *Lophodermium schweinitzii*,
- M)
- Macrophoma*, *Macrophoma mangiferae*, *Macrophoma theicola*,
- 25 *Macrosporium*, *Macrosporium cocos*,

- Magnaporthe*, *Magnaporthe grisea*, *Magnaporthe oryzae*, *Magnaporthe salvinii*,
Magnaportheopsis,
Mamianiella, *Mamianiella coryli*,
Marasmiellus, *Marasmiellus cocophilus*, *Marasmiellus stenophyllus*,
5 *Marasmius*, *Marasmius Crinis-equi*, *Marasmius saccharication*, *Marasmius semiustus*,
Marasmius stenophyllus, *Marasmius tenuissimus*,
Massarina, *Massarina walkeri*,
Mauginiella, *Mauginiella scaettae*,
Melampsora, *Melampsora Kingdom*, *Melampsora occidentalis*,
10 *Melanconis*, *Melanconis carthusiana*,
Melanconium, *Melanconium juglandinum*,
Meliola, *Meliola mangiferae*, *Meliola zangii*,
Meruliopsis, *Meruliopsis ambigua*,
Microascus, *Microascus brevicaulis*,
15 *Microbotryum*, *Microbotryum Silenes-dioicae*, *Microbotryum violaceum*,
Microdochium, *Microdochium spp.*, *Microdochium bolleyi*, *Microdochium dimerum*,
Microdochium oryzae, *Microdochium panattonianum*, *Microdochium phragmitis*,
Microsphaera, *Microsphaera coryli*, *Microsphaera diffused*, *Microsphaera ellisii*,
Microsphaera euphorbiae, *Microsphaera hommae*, *Microsphaera penicillata*, *Microsphaera*
20 *vacinii*, *Microsphaera verruculosa*,
Microstroma, *Microstroma juglandis*,
Powdery mildew, *Powdery mildew arachidis*, *Mildew-caricae papayae*, *Mildew indicum*,
Powdery mildew mangiferae, *Wheat mildew*,
Miyabeanus Cochliobolus
25 *Moesziomyces*, *Moesziomyces bullatus*,
Monilia, *Monilia laxa*,

Monilinia azaleae, *Monilinia fructicola*, *Monilinia fructigena*, *Monilinia laxa*, *Monilinia oxycocci*,

Moniliophthora,

Moniliophthora roreri,

5 *Monilochaetes*, *Monilochaetes infuscans*,

Monochaetia, *Monochaetia coryli*, *Monochaetia Mali*,

Monographella, *Monographella albescens*, *Monographella cucumerina*, *Monographella nivalis*,

Monosporascus, *Monosporascus cannonballus*, *Monosporascus eutypoides*,

10 *Monostichella*, *Monostichella coryli*,

Mucor, *Mucor circinelloides*, *Mucor hiemalis*, *Mucor paronychius*, *Mucor piriformis*, *Mucor racemosus*,

Mycena, *Mycena citricolor*,

Mycocentrospora, *Mycocentrospora acerina*,

15 *Mycoleptodiscus*, *Mycoleptodiscus terrestris*,

Mycosphaerella *Mycosphaerella arachidis* *Mycosphaerella areola*, *Mycosphaerella berkeleyi*, *Mycosphaerella bolleana*, *Mycosphaerella brassicicola*, *Mycosphaerella caricae*, *Mycosphaerella caryigena*, *Mycosphaerella Cerasella*, *Mycosphaerella coffeicola*, *Mycosphaerella confusa*, *Mycosphaerella bloody*, *Mycosphaerella dendroides*,

20 *Mycosphaerella eumusae*, *Mycosphaerella gossypina*, *Mycosphaerella graminicola*, *Mycosphaerella henningsii*, *Mycosphaerella juglandis*, *Mycosphaerella lageniformis*, *Mycosphaerella linicola*, *Mycosphaerella louisiana*, *Mycosphaerella musae*, *Mycosphaerella musicola*, *Mycosphaerella palmicola*, *Mycosphaerella pinodes*, *Mycosphaerella pistaciarum*, *Mycosphaerella pistacina*, *Mycosphaerella platanifolia*,

25 *Mycosphaerella polymorpha*, *Mycosphaerella pomi*, *Mycosphaerella punctiformis*, *Mycosphaerella pyri*, *Mycosphaerella recutita*, *Mycosphaerella rosicola*, *Mycosphaerella rubi*, *Mycosphaerella Stigmina-platani*, *Mycosphaerella striatiformans*,

Mycovellosiella, *Mycovellosiella concors*, *Mycovellosiella*, *Mycovellosiella koepkei*,

Mycovellosiella vaginae, *Myriogenospora*, *Myriogenospora aciculispora*,

Myrothecium, *Myrothecium roridum*, *Myrothecium verrucaria*,

N)

Naevala, *Naevala perexigua*,

5 *Naohidemyces*, *Naohidemyces vacinii*,

Nectria, *Nectria cinnabarina*, *Nectria ditissima*, *Nectria foliicola*, *Nectria mammoidea*,
Nectria mauritiicola, *Nectria Peziza*, *Nectria pseudotrichia*, *Nectria radicola*, *Nectria*
ramulariae,

Nectriella, *Nectriella pironii*,

10 *Nemania*, *Nemania diffused*, *Nemania serpents*,

Neocosmospora, *Neocosmospora vasinfecta*,

Neodeightonia, *Neodeightonia phoenicum*,

Neoerysiphe, *Neoerysiphe galeopsidis*,

Neofabraea, *Neofabraea perennans*,

15 *Neofusicoccum*, *Neofusicoccum mangiferae*,

O)

Oculimacula, *Oculimacula acuformis*, *Oculimacula yallundae*,

Oidiopsis, *Oidiopsis gossypii*,

Oidium manihotis,

20 *Olpidium*, *Olpidium brassicae*,

Omphalia, *Omphalia tralucida*

Ophiobolus, *Ophiobolus anguillidae*, *Ophiobolus cannabinus*,

Ophioirenina,

Ovulinia, *Ovulinia azaleae*,

25 *Oxyporus*, *Oxyporus corticola*,

Ozonium, Ozonium texanum,

P)

Passalora, Passalora fulva,

Peltaster, Peltaster fructicola,

5 *Penicillium, Penicillium expansum, Penicillium funiculosum,*

Peniophora,

Periconia, Periconia circinata,

Periconiella, Periconiella,

Peridermium, Peridermium californicum,

10 *Pestalosphaeria, Pestalosphaeria concentrica,*

Pestalotia, Pestalotia longiseta, Pestalotia rhododendri,

Pestalotiopsis, Pestalotiopsis adusta, Pestalotiopsis arachidis, Pestalotiopsis disseminata,

Pestalotiopsis guepini, Pestalotiopsis leprogena, Pestalotiopsis longiseta, Pestalotiopsis mangiferae, Pestalotiopsis palmarum, Pestalotiopsis sydowiana, Pestalotiopsis theae,

15 *Peyronellaea, Peyronellaea curtisii,*

Pezzicula, Pezzicula alba, Pezzicula malicorticis,

Phacidiopycnis, Phacidiopycnis padwickii,

Phaeochoropsis, Phaeochoropsis mucosa,

Phaeocytostroma, Phaeocytostroma iliau, Phaeocytostroma saccharication,

20 *Phaeoisariopsis, Phaeoisariopsis bataticola,*

Phaeoramularia, Phaeoramularia heterospora, Phaeoramularia indica, Phaeoramularia manihotis,

Phaeoseptoria, Phaeoseptoria musae,

Phaeosphaerella, Phaeosphaerella mangiferae, Phaeosphaerella theae,

Phaeosphaeria, *Phaeosphaeria avenaria*, *Phaeosphaeria herpotrichoides*, *Phaeosphaeria microscopica*, *Phaeosphaeria nodorum*,

Phaeosphaeriopsis, *Phaeosphaeriopsis obtusispora*,

Phaeotrichoconis, *Phaeotrichoconis crotalariae*,

5 *Phakospora*, *Phakospora pachyrhizi*, *Phakopsora gossypii*,

Phialophora, *Phialophora asteris*, *Phialophora cinerescens*, *Phialophora gregata*,
Phialophora tracheiphila,

Phoma, *Phoma clematidina*, *Phoma costaricensis*, *Phoma cucurbitacearum*, *Phoma destructive*,
10 *Phoma draconis*, *Phoma exigua*, *Phoma glomerata*, *Phoma glycinicola*, *Phoma herbarum*,
Phoma insidiosa, *Phoma medicaginis*, *Phoma microspora*, *Phoma narcissi*,
Phoma nebulosa, *Phoma oncidii-sphacelati*, *Phoma pinodella*, *Phoma sclerotioides*, *Phoma strasseri*,

Phomopsis, *Phomopsis asparagi*, *Phomopsis asparagicola*, *Phomopsis cannabina*,
Phomopsis coffeae *Phomopsis ganjae*, *Phomopsis javanica*, *Phomopsis longicolla*,
15 *Phomopsis mangiferae*, *Phomopsis prunorum*, *Phomopsis sclerotioides* *Phomopsis theae*,

Phragmidium, *Phragmidium mucronatum*, *Phragmidium rosae-Pimpinellifoliae*,
Phragmidium Rubicon idaei, *Phragmidium violaceum*,

Phyllachora, *Phyllachora banksiae*, *Phyllachora cannabis*, *Phyllachora graminis*,
Phyllachora Gratissima, *Phyllachora musicola*, *Phyllachora pomigena*, *Phyllachora*
20 *saccharication*,

Phyllactinia,

Phyllosticta, *Phyllosticta alliariaefoliae*, *Phyllosticta arachidis-hypogaeae*, *Phyllosticta batatas*,
Phyllosticta capitalensis, *Phyllosticta carpogena*, *Phyllosticta coffeicola*,
Phyllosticta concentrica, *Phyllosticta coryli*, *Phyllosticta cucurbitacearum*, *Phyllosticta*
25 *cyclaminella*, *Phyllosticta Erratica*, *Phyllosticta hawaiiensis* *Phyllosticta lentisci*,
Phyllosticta manihotis, *Phyllosticta micropuncta*, *Phyllosticta mortonii*, *Phyllosticta nicotianae*,
Phyllosticta palmetto, *Phyllosticta penicillariae*, *Phyllosticta perseae*,
Phyllosticta pseudocapsici, *Phyllosticta sojaecola*, *Phyllosticta theae*, *Phyllosticta theicola*,

Phymatotrichopsis, *Phymatotrichopsis omnivora*,

- Physalospora, Physalospora disrupta, Physalospora perseae,*
Physoderma, Physoderma alfalfae, Physoderma leproides, Physoderma trifolii,
Physopella, Physopella ampelopsidis,
Phytophthora, Phytophthora infestans
- 5 *Pileolaria, Pileolaria terebinthi,*
Piricaudiopsis, Piricaudiopsis punicae, Piricaudiopsis raphidophorae, Piricaudiopsis rosae,
Plasmopara, Plasmopara viticola,
Plenodomus, Plenodomus destruens, Plenodomus meliloti,
- 10 *Pleosphaerulina, Pleosphaerulina sojicola,*
Pleospora, Pleospora alfalfae, Pleospora betae, Pleospora herbarum, Pleospora lycopersici, Pleospora soon, Pleospora theae,
Pleuroceras,
Podosphaera, Podosphaera fuliginea, Podosphaera fusca, Podosphaera leucotricha,
15 *Podosphaera macularis, Podosphaera pannosa,*
Polyscytalum, Polyscytalum pustulans,
Poria, Poria hypobrunnea,
Postia, Postia tephroleuca,
Pseudocercospora, Pseudocercospora areacearum, Pseudocercospora cannabina,
20 *Pseudocercospora fuligena, Pseudocercospora herpotrichoides, Pseudocercospora gunnerae, Pseudocercospora pandoreae, Pseudocercospora puderi, Pseudocercospora rhapsicola, Pseudocercospora theae, Pseudocercospora vitis,*
Pseudocercospora capsellae,
Pseudocochliobolus, Pseudocochliobolus eragrostidis,
- 25 *Pseudoepicoccum, Pseudoepicoccum cocos,*
Pseudopeziza, Pseudopeziza jonesii, Pseudopeziza medicaginis, Pseudopeziza trifolii,

Pseudoseptoria, Pseudoseptoria donacis,

Puccinia, Puccinia angustata, Puccinia arachidis, Puccinia aristidae, Puccinia asparagi, Puccinia cacabata, Puccinia campanulae, Puccinia carthami, Puccinia coronata, Puccinia dioicae, Puccinia erianthi, Puccinia extensicola, Puccinia helianthi, Puccinia hordei,
5 *Puccinia jaceae, Puccinia kuehnii, Puccinia malvacearum, Puccinia mariae-wilsoniae, Puccinia melanocephala, Puccinia menthae, Puccinia oxalidis, Puccinia pelargonii-zonalis, Puccinia pittieriana, Puccinia poarum, Puccinia purpurea, Puccinia recondita, Puccinia schedonnardii, Puccinia sessilis, Puccinia striiformis, Puccinia striiformis, Puccinia subnitens, Puccinia substriata, Puccinia verruca, Puccinia xanthii,*

10 *Pucciniaceae,*

Pucciniastrum, Pucciniastrum americanum, Pucciniastrum arcticum, Pucciniastrum epilobii, Pucciniastrum hydrangeae,

Pycnostysanus, Pycnostysanus azaleae,

Pyrenochaeta, Pyrenochaeta lycopersici, Pyrenochaeta terrestris,

15 *Pyrenopeziza, Pyrenopeziza brassicae amichloridium,*

Pyrenophora, Pyrenophora avenae, Pyrenophora chaetomioides, Pyrenophora graminea, Pyrenophora seminiperda, Pyrenophora teres, Pyrenophora teres f. maculata, Pyrenophora teres f. teres tritici, Pyrenophora tritici-repentis,

Pyricularia, Pyricularia oryzae,

20 *Pythium spp.,*

Phytophthora infestans

R)

Ramichloridium musae,

25 *Ramularia, Ramularia collo-cygni, Ramularia beticola, Ramularia coryli, Ramularia cyclaminicola, Ramularia macrospora, Ramularia menthicola, Ramularia necator, Ramularia primulae, Ramularia spinaciae, Ramularia subtilis, Ramularia tenella, Ramularia vallisumbrosae,*

Ramulispora, Ramulispora sorghi, Ramulispora sorghicola,

- Rhinocladium*, *Rhinocladium corticola*,
- Rhizoctonia*, *Rhizoctonia cerealis*, *Rhizoctonia leguminicola*, *Rhizoctonia oryzae*,
Rhizoctonia ruby, *Rhizoctonia solani*,
- Rhizophydium*, *Rhizophydium graminis*,
- 5 *Rhizopus*, *Rhizopus arrhizus*, *Rhizopus circinans*, *Rhizopus microsporus*, *Rhizopus oryzae*,
- Rhynchosporium*, *Rhynchosporium secalis*,
- Rhytisma*, *Rhytisma punctatum*, *Rhytisma vitis*,
- Rigidoporus*, *Rigidoporus vinctus*,
- Rosellinia*, *Rosellinia arcuata*, *Rosellinia Bunodes*, *Rosellinia necatrix*, *Rosellinia pepo*,
- 10 S)
- Saccharicola*, *Saccharicola taiwanensis*,
- Sarocladium*, *Sarocladium oryzae*,
- Schiffnerula*, *Schiffnerula cannabis*,
- Schizophyllum*, *Schizophyllum commune*,
- 15 *Schizopora*, *Schizopora avipora*,
- Schizothyrium*, *Schizothyrium pomi*,
- Sclerophthora*, *Sclerophthora macrospora*,
- Sclerotinia*, *Sclerotinia borealis*, *Sclerotinia Bulborum*, *Sclerotinia minor*, *Sclerotinia ricini*,
Sclerotinia sclerotiorum, *Sclerotinia spermophila*, *Sclerotinia trifoliorum*,
- 20 *Sclerotium*,
- Sclerotium cinnamomi*, *Sclerotium delphinii*,
- Scytinostroma*, *Scytinostroma galactinum*,
- Seimatosporium*, *Seimatosporium mariae*, *Seimatosporium rhododendri*,
- Selenophoma*, *Selenophoma linicola*,

Septobasidium, *Septobasidium bogoriense*, *Septobasidium euryae-groi*, *Septobasidium gaoligongense*, *Septobasidium pilosum*, *Septobasidium polygoni*, *Septobasidium pseudopedicellatum*, *Septobasidium theae*,

Septocyta, *Septocyta ruborum*,

- 5 *Septoria*, *Septoria ampelina*, *Septoria azaleae*, *Septoria bataticola*, *Septoria campanulae*, *Septoria cannabis*, *Septoria cucurbitacearum*, *Septoria darrowii*, *Septoria dianthi*, *Septoria eumusae*, *Septoria glycines*, *Septoria helianthi*, *Septoria humuli*, *Septoria hydrangeae*, *Septoria lactucae*, *Septoria lycopersici*, *Septoria lycopersici*, *Septoria menthae*, *Septoria passerinii*, *Septoria pisi*, *Septoria rhododendri*, *Septoria secalis*, *Septoria selenophomoides*,
10 *Septoria wisteria*

Serpula, *Serpula lacrymans*,

Setosphaeria, *Setosphaeria rostrata*, *Setosphaeria turcica*,

Spencermartinsia, *Spencermartinsia pretoriensis*,

- Sphaceloma*, *Sphaceloma arachidis*, *Sphaceloma menthae*, *Sphaceloma perseae*, *Sphaceloma*
15 *poinsettiae*, *Sphaceloma saccharication*, *Sphaceloma theae*,

Sphacelotheca, *Sphacelotheca reiliana*, *Sphaerotheca castagnei*,

Sphaerulina, *Sphaerulina oryzina*, *Sphaerulina rehmiana*, *Sphaerulina ruby*,

Sphenospora, *Sphenospora kevorkianii*,

Spilocaea, *Spilocaea oleaginea*,

- 20 *Sporisorium*, *Sporisorium cruentum*, *Sporisorium ehrenbergii*, *Sporisorium scitamineum*,
Sporisorium sorghi,

Sporonema, *Sporonema phacidioides*,

Stagonospora, *Stagonospora avenae*, *Stagonospora meliloti*, *Stagonospora recedens*,
Stagonospora saccharication, *Stagonospora tainanensis*,

- 25 *Stagonosporopsis*,

Stegocintractia, *Stegocintractia junci*,

- Stemphylium*, *Stemphylium alfalfae*, *Stemphylium bolickii*, *Stemphylium cannabinum*,
Stemphylium globuliferum, *Stemphylium lycopersici*, *Stemphylium sarciniforme*, *Stemphylium solani*, *Stemphylium vesicarium*,
- Stenella*, *Stenella anthuriicola*,
- 5 *Stigmatomycosis*,
- Stigmina*, *Stigmina carpophila*, *Stigmina palmivora*, *Stigmina platani-racemosae*,
- Stromatinia*, *Stromatinia cepivora*,
- Sydowiella*, *Sydowiella depressula*,
- Sydowiellaceae*,
- 10 *Synchytrium*, *Synchytrium endobioticum*,
- T)
- Tapesia*, *Tapesia aciformis*, *Tapesia yallundae*,
- Taphrina*, *Taphrina coryli*, *Taphrina potentillae*,
- Thanatephorus*, *Thanatephorus cucumeris*,
- 15 *Thecaphora*, *Thecaphora solani*,
- Thielaviopsis*, *Thielaviopsis basicola*, *Thielaviopsis ceramica*,
- Thyrostroma*, *Thyrostroma compactum*,
- Tiarosporella*, *Tiarosporella Urbis-rosarum*,
- Tilletia*, *Tilletia barclayana*, *Tilletia caries*, *Tilletia controversa*, *Tilletia laevis*, *Tilletia*
20 *tritici*, *Tilletia walkeri*,
- Tilletiariaceae*, *Togniniaceae*,
- Tranzschelia*, *Tranzschelia pruni-spinosae*,
- Trichoderma* *Trichoderma koningii*, *Trichoderma paucisporum*, *Trichoderma Songyi*,
Trichoderma theobromicola, *Trichoderma viride*,
- 25 *Tubercularia*, *Tubercularia lateritia*,

Tunstallia, Tunstallia aculeata,

Typhula, Typhula blight, Typhula idahoensis, Typhula incarnata, Typhula ishikariensis, Typhula variabilis,

U)

5 *Ulocladium, Ulocladium syndicated,*

Uncinula,

Uredo, Uredo behnickiana, Uredo kriegleriana, Uredo musae, Uredo nigropuncta, Uredo rangellii,

Urocystis, Urocystis agropyri, Urocystis brassicae Urocystis occulta,

10 *Uromyces, Uromyces apiosporus, Uromyces appendiculatus, Uromyces beticola, Uromyces ciceris- arietini, Uromyces dianthi, Uromyces euphorbiae, Uromyces graminis, Uromyces inconspicuus, Uromyces lineolatus, Uromyces musae, Uromyces oblongus, Uromyces pisi-sativi, Uromyces proëminens, Uromyces medicaginis, Uromyces trifolii-repentis, Uromyces viciae-fabae,*

15 *Urophlyctis, Urophlyctis leproides, Urophlyctis trifolii smuts,*

Ustilaginoides, Ustilaginoides virens,

Ustilago, Ustilago avenae, Ustilago esculenta, Ustilago hordei, Ustilago maydis Ustilago nigra, Ustilago nuda, Ustilago scitaminea, Ustilago tritici,

V)

20 *Vankya, Vankya ornithogali,*

Velvet blight,

Venturia Venturia inaequalis. Venturia carpophila,

Veronaea, Veronaea musae,

25 *Verticillium Verticillium albo-atrum, Verticillium alfalfae, Verticillium dahliae, Verticillium isaacii, Verticillium klebahnii, Verticillium longisporum, Verticillium nonalfalfae, Verticillium theobromae, Verticillium wilt, Verticillium zaregamsianum,*

W)

Waitea, Waitea circinata,

Westea,

Wheat leaf rust,

Wuestneiopsis, Wuestneiopsis georgiana,

5 X)

Xeromphalina, Xeromphalina fraxinophila

Z)

Zopa, Zopa rhizophila,

Zygosaccharomyces, Zygosaccharomyces bailii, Zygosaccharomyces Florentinus,

10 *Zythiostroma,*

Zymoseptoria, Zymoseptoria tritici.

En un aspecto preferido el alga utilizada para obtener el sobrenadante es *Amphidinium carterae*, pudiéndose utilizar otros miembros del género *Amphidinium* como, por ejemplo:

- 15 *Amphidinium achromaticum, Amphidinium aculeatum, Amphidinium acutissimum, Amphidinium acutum, Amphidinium alinii, Amphidinium aloxalocium, Amphidinium amphidinioides, Amphidinium asymmetricum, Amphidinium aureum, Amphidinium belauense, Amphidinium bidentatum, Amphidinium beeps, Amphidinium boekhoutensis, Amphidinium boggayum, Amphidinium caerulescens, Amphidinium carbunculus,*
- 20 *Amphidinium carterae, Amphidinium celestinum, Amphidinium chattonii, Amphidinium coeruleum, Amphidinium conradii, Amphidinium conus, Amphidinium coprosum, Amphidinium corallinum, Amphidinium corpulentum, Amphidinium crassum, Amphidinium cristatum, Amphidinium cucurbita, Amphidinium cucurbitella, Amphidinium cupulatisquama, Amphidinium curvatum, Amphidinium cyaneoturbo, Amphidinium dentatum Amphidinium*
- 25 *discoidal, Amphidinium dubium, Amphidinium eilatiensis, Amphidinium emarginatum, Amphidinium fastigium, Amphidinium lum Bohm, Amphidinium a gellons, Amphidinium exum, Amphidinium galbanum, Amphidinium gibbosum, Amphidinium glaucovirescens, Amphidinium glaucum, Amphidinium globosum, Amphidinium hadai, Amphidinium herdmanii, Amphidinium incoloratum, Amphidinium inatum, Amphidinium kesselitzii,*

Amphidinium kesslitzii, *Amphidinium klebsii*, *Amphidinium lacunarum*, *Amphidinium lanceolatum*, *Amphidinium lefevrei*, *Amphidinium lilloense*, *Amphidinium lissae*, *Amphidinium longum* *Amphidinium luteum*, *Amphidinium machapungarum*, *Amphidinium macrocephalum*, *Amphidinium mammillatum*, *Amphidinium manannini*, *Amphidinium mananninii*, *Amphidinium massartii*, *Amphidinium mootonorum*, *Amphidinium mucicola*, *Amphidinium nasutum*, *Amphidinium obliquum*, *Amphidinium obrae*, *Amphidinium oceanicum*, *Amphidinium oculatum*, *Amphidinium operculatum*, *Amphidinium operculatum var. steinii*, *Amphidinium ornithocephalum*, *Amphidinium ovoideum*, *Amphidinium ovum*, *Amphidinium pacicum*, *Amphidinium pelagicum*, *Amphidinium phthartum*, *Amphidinium psammophila*, *Amphidinium psittacus*, *Amphidinium purpureum*, *Amphidinium pusillum*, *Amphidinium rhynchocephalum*, *Amphidinium roseolum*, *Amphidinium ruttneri*, *Amphidinium salinum*, *Amphidinium schilleri*, *Amphidinium schroederi*, *Amphidinium scissum*, *Amphidinium sphagnicola*, *Amphidinium sphenoid*, *Amphidinium steinii*, *Amphidinium stellatum*, *Amphidinium stigmatum*, *Amphidinium sulcatum*, *Amphidinium Tortum*, *Amphidinium trochodinioides*, *Amphidinium trochodinoides*, *Amphidinium trulla*, *Amphidinium truncatum*, *Amphidinium turbo*, *Amphidinium vernal*, *Amphidinium vigrense*, *Amphidinium vitreum*, *Amphidinium vittatum*, *Amphidinium wigrense*, *Amphidinium yoorugurum* o *Amphidinium yuroogurum*.

Para la interpretación de la presente invención se disponen las siguientes definiciones:

- 20 • El término "comprende" significa que incluye, pero no se limita a lo que sigue a la palabra "comprende". Por tanto, el uso del término "comprende" indica que los elementos enumerados son obligatorios, pero que otros elementos añadidos pueden estar presentes.
- 25 • La expresión "consiste en" significa que incluye y se limita a lo que sigue a la expresión "consiste en". Por lo tanto, la expresión "consiste en" indica que los elementos enumerados son obligatorios y que otros elementos añadidos no estarían incluidos.
- 30 • Formulación "fitosanitaria" o "biopesticida" hace referencia a una formulación que incluye sustancias activas obtenidas a partir de organismos vivos y que son utilizados para prevenir, repeler, destruir o mitigar cualquier plaga o agente que causa daño a cultivos de plantas, humanos u otros animales. Las plagas pueden ser insectos, animales, plantas no deseadas, microorganismos (bacterias, hongos, virus) y priones (proteínas que pueden actuar como agentes infecciosos).

Breve descripción de las figuras

Figura 1. Esquema del proceso propuesto para la obtención de la formulación fitosanitaria de la invención a partir del sobrenadante procedente del cultivo de la especie *Amphidinium carterae*.

- 5 **Figura 2.** Representación del % de inhibición sobre la especie *Fusarium oxysporum* para las muestras ensayadas.

Descripción detallada de la invención

A continuación, se muestran Ejemplos de realización de la invención con el objetivo de ilustrar la misma.

10 **Ejemplo 1. Proceso de obtención de la formulación fitosanitaria de la invención**

El proceso propuesto en la presente invención puede ser llevado a cabo empleando diversos equipos y condiciones. Los dinoflagelados del género *Amphidinium* pueden ser cultivados en un fotobiorreactor al menos en modo discontinuo durante un número de días lo suficientemente grande como acumular sustancias con actividad fitosanitaria en
 15 concentración suficiente en el sobrenadante del cultivo: en el ejemplo fueron 14 días a 18 °C usando una iluminación que aporte $120 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ y como medio de cultivo el medio F/2 (N/P=5), correspondiente a una fase estacionaria tardía. No se excluye cualquier otro método de cultivo y condiciones medioambientales.

Posteriormente se separan las células del sobrenadante, por ejemplo, por centrifugación a
 20 4000 rpm (2723 g) durante 5 minutos, aunque no se excluyen otros métodos de separación que permitan el mismo fin. El sobrenadante se destina al proceso de obtención del producto fitosanitario o biopesticida y la biomasa a la extracción de otros productos de interés. A continuación, se eliminarán bacterias y fragmentos celulares, por ejemplo, filtrando el sobrenadante obtenido haciéndolo pasar por filtros de tamaño de un poro de $0,22 \mu\text{m}$ (no se
 25 excluye cualquier otro tamaño de poro). La siguiente etapa del proceso consiste en una extracción sólido-líquido mediante cromatografía de adsorción en lecho fijo en la que el sobrenadante se debe hacer pasar a través de columnas sep-pack C-18® donde, a través de una serie de etapas, se eliminan el medio de cultivo y se retiran las sales presentes de forma que se obtienen las biomoléculas activas disueltas en metanol, tal y como se muestra en la

- 30 **Figura 1.** Finalmente, se evapora el metanol que puede ser recuperado y reutilizado en una nueva extracción y se añade agua hasta la concentración deseada.

Una realización preferente de la invención se muestra en la **Figura 1**. En la misma, una vez que se estima que el cultivo de *Amphidinium carterae* está envejecido, y por lo tanto la excreción de biomoléculas activas al medio es elevada, se procede al cosechado del cultivo por centrifugación (antes descrito), de forma que se recolecta el sobrenadante y se guarda la biomasa para la obtención de otros productos. El siguiente paso comprende la filtración del sobrenadante (antes descrito) para eliminar las células o restos celulares que pudieran quedar suspendidos en el sobrenadante. A continuación, se realiza una extracción sólido-líquido mediante cromatografía de adsorción en lecho fijo haciendo pasar el sobrenadante a través de columnas C-18 con el fin de eliminar el medio de cultivo y retirar las sales, de forma que se obtengan las biomoléculas activas con mayor pureza. Para llevar a cabo este proceso se acondiciona primero la columna haciendo pasar 5 mL de una mezcla metanol: agua en proporción 1:1. En la siguiente se cargan en la columna 200 mL del sobrenadante previamente filtrado de forma que las biomoléculas activas van quedando retenidas en la columna y pasa a través el medio de cultivo que es finalmente desechado. A continuación, se lava el sep-pack con 5 mL de agua destilada para retirar las sales que hayan quedado retenidas y finalmente, se descargan los metabolitos lavando con 10 mL de metanol. Una vez que el producto de interés está suspendido en metanol, se procede a evaporar este usando un rotavapor a vacío para, finalmente, resuspender la materia seca en agua destilada. Este extracto seco es analizado por RMN para cuantificar su contenido en metabolitos. La **Tabla 1** muestra el contenido de metabolitos en el extracto seco del sobrenadante correspondientes a un cultivo con una concentración de biomasa de 0.2 g/L.

Tabla 1

Metabolito	mg/L	% Metabolitos totales
Acetato	0.044 ±0.002	5.022 ±0.251
Etanol	0.028 ±0.001	3.220 ±0.161
Colina	0.001 ±0.00006	0.143 ±0.007
Glicerol	0.224 ±0.011	25.572 ±1.278
Anfidinoles	0.325 ±0.0163	37.222 ±1.861
Fenilalanina	0.008 ±0.0004	0.894 ±0.045
Formiato	0.030 ±0.0015	3.415 ±0.171
Alanina	0.054 ±0.003	6.165 ±0.308
Lactato	0.160 ±0.008	18.346 ±0.917

Ejemplo 2. Inhibición de la especie *Fusarium oxysporum sp. Melonis* (FOM)

Con el objetivo de ensayar la formulación fitosanitaria obtenida, se llevó el producto a una concentración final de entre 1 g/L y 5 g/L. Así, se realizó un ensayo para la determinación del porcentaje de inhibición del hongo FOM en contacto con el extracto obtenido del cultivo de *Amphidinium carterae*. En una de las placas Petri se dispuso el control, donde se deja crecer el hongo sobre el agar de la placa Petri, y a continuación se dispusieron otras dos placas en las que se situó en el centro el hongo y en el interior de los 4 pocillos el extracto obtenido de *Amphidinium* a 1 y 5 g/L respectivamente. Se observó un halo de inhibición del hongo FOM al poner en la placa Petri el extracto obtenido a partir del sobrenadante del cultivo de *A. carterae* a 1 y 5 g/L. Para descartar que el efecto antifúngico observado en los extractos de *Amphidinium* pudiera proceder del agua de mar en el que cultivaron, se dispuso un control introduciendo en los pocillos de la placa agua de mar después de haberla tratado de igual forma que a los extractos, es decir, siguiendo el procedimiento experimental de la **Figura 1**.

El resultado de este ensayo se ilustra en la **Figura 2** donde se representa el % de inhibición sobre la especie *Fusarium oxysporum* para las muestras ensayadas. El % de inhibición se calcula respecto al control en función de las áreas de crecimiento del hongo según la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Inhibición vs FOM} = 100 - \left(\frac{AP}{AC} * 100 \right)$$

Donde:

- AP: Área de crecimiento del hongo en la placa problema.
- AC: Área de crecimiento del hongo en la placa control.

REIVINDICACIONES

1. Método para la obtención de una formulación fitosanitaria que comprende:
 - a. Disponer microalgas del género *Amphidinium* en un medio de cultivo
5 adecuado para su crecimiento,
 - b. Obtener el sobrenadante una vez procesado el cultivo, y
 - c. Aislar los componentes activos presentes en el sobrenadante.

2. Método, según la reivindicación 1, para la obtención de una formulación fitosanitaria
10 antifúngica.

3. Método, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, para la obtención de una
formulación fitosanitaria antifúngica frente a hongos del género *Fusarium*,
preferentemente *Fusarium oxysporum*.
15

4. Método, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, para la obtención de una
formulación fitosanitaria, donde el paso a) comprende disponer el alga *Amphidinium*
carterae en un medio de cultivo adecuado para su crecimiento.

- 20 5. Uso del sobrenadante obtenido de un cultivo de algas del género *Amphidinium* para la
obtención de una formulación fitosanitaria.

6. Uso, según la reivindicación 5, del sobrenadante obtenido de un cultivo de algas del
género *Amphidinium* para la obtención de una formulación fitosanitaria antifúngica.
25

7. Uso, según las reivindicaciones 5 o 6, del sobrenadante obtenido de un cultivo de
algas del género *Amphidinium* para la obtención de una formulación fitosanitaria
antifúngica frente a hongos del género *Fusarium*, preferentemente *Fusarium*
oxysporum.
30

8. Uso, según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, del sobrenadante obtenido de un
cultivo de algas del alga *Amphidinium carterae*.

9. Formulación obtenible a través del método de las reivindicaciones 1 a 4.
10. Formulación, según la reivindicación 9, caracterizada por comprender al menos uno de los siguientes componentes: acetato, etanol, colina, glicerol, anfidiol, fenilalanina, formiato, alanina y/o lactato.
11. Uso de la formulación, según cualquiera de las reivindicaciones 9 o 10, como fitosanitario.
12. Uso de la formulación, según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, como antifúngico.
13. Uso de la formulación, según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12, como antifúngico frente a hongos del género *Fusarium*, preferentemente *Fusarium oxysporum*.

Figura 1

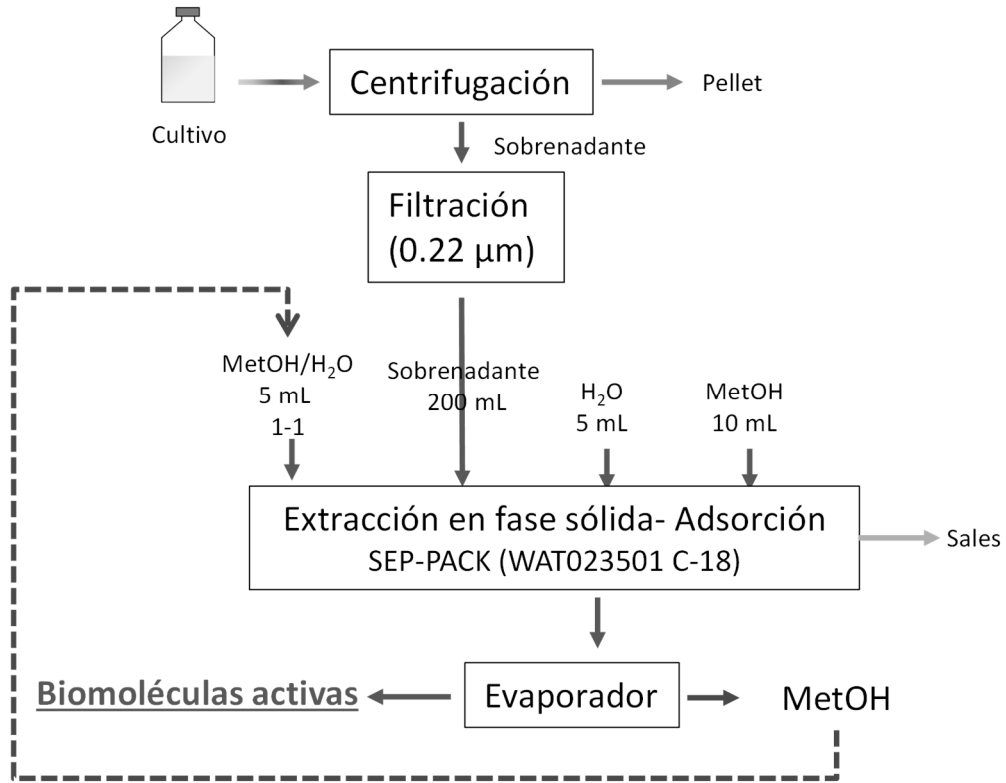
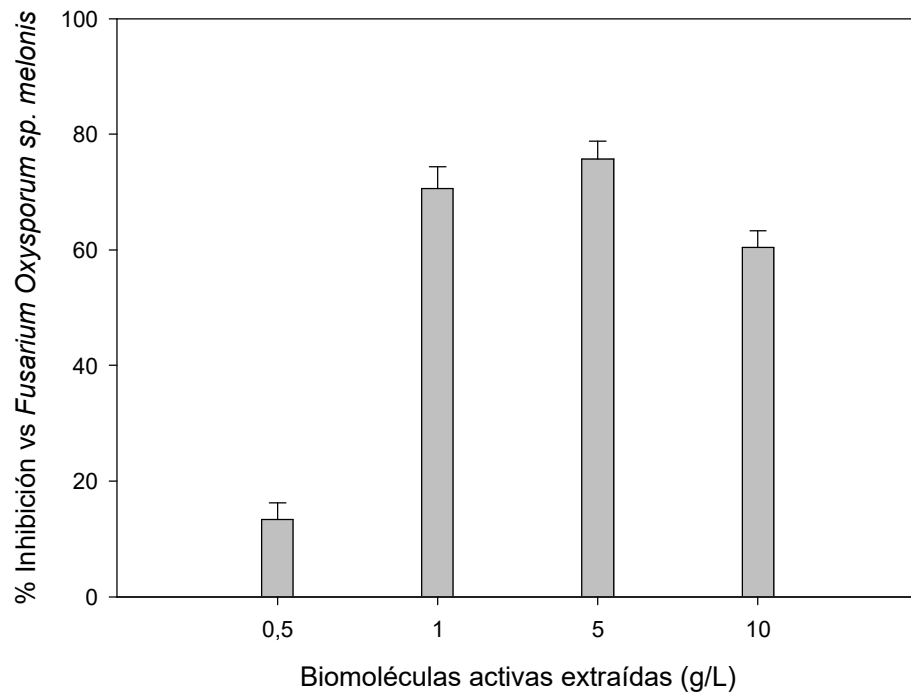


Figura 2





②¹ N.º solicitud: 202130585

②² Fecha de presentación de la solicitud: 22.06.2021

③² Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤¹ Int. Cl.: **A01N65/03** (2009.01)
A01P3/00 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤ ⁶ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
Y	US 2019174768 A1 (THIEBEAULD DE LA CROUEE ODON et al.) 13/06/2019, reivindicaciones	1-13
Y	MOLINA-MIRAS, A et al. A pilot-scale bioprocess to produce amphidinols from the marine microalga <i>Amphidinium carterae</i> : Isolation of a novel analogue. Algal Research, 2018, Vol. 31, Páginas 87-98. página 96	1-13
A	US 2020100499 A1 (THOMAS YANN et al.) 02/04/2020, reivindicaciones	1-13

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
01.08.2021

Examinador
I. Rueda Molíns

Página
1/2

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

A01N, A01P

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

INVENES, EPODOC,WPI, TXT, INTERNET