



MINISTERO DELLO SVILUPPO ECONOMICO
DIREZIONE GENERALE PER LA LOTTA ALLA CONTRAFFAZIONE
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI

DOMANDA NUMERO	102007901504828
Data Deposito	19/03/2007
Data Pubblicazione	19/09/2008

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
C	12	N		

Titolo

COMPOSIZIONI, METODO E UTILIZZO DI COMPOSTI A BASE DI MICROROGANISMI PER IL CONTROLLO DI FUNGHI FITOPATOGENI E/O MICOTOSSIGENI E CONTENIMENTO DEI LIVELLI DI MICOTOSSINE

DESCRIZIONE dell'invenzione industriale

Titolo: "COMPOSIZIONI, METODO E UTILIZZO DI COMPOSTI A BASE DI MICROROGANISMI PER IL CONTROLLO DI FUNGHI FITOPATOGENI E/O MICOTOSSIGENI E CONTENIMENTO DEI LIVELLI DI MICOTOSSINE"

A nome di: Università degli Studi del Molise Campobasso.

Inventori: CASTORIA Raffaello, DE CICCIO Vincenzo, DE CURTIS Filippo, LIMA Giuseppe, tutti di nazionalità italiana.

Mandatario: Studio Ing. Aldo Perrotta via G. Marconi 32 Soverato

La presente invenzione si riferisce ad un metodo che utilizza composizioni a base di microrganismi per contrastare l'insorgenza e/o lo sviluppo delle infezioni dovute a microrganismi fitopatogeni e/o micotossigeni, provvedendo anche ad un contenimento dei livelli di micotossine presenti nelle parti edibili per la concomitante riduzione della presenza di microrganismi micotossigeni e delle stesse micotossine, anche già presenti al momento dell'applicazione.

Dall'arte nota si evince che ceppi di lieviti e funghi lievitiiformi sono noti poter essere vantaggiosamente applicati a derrate agricole in post-raccolta. L'impiego di microrganismi antagonisti aventi caratteristiche simili a detti lieviti e funghi lievitiiformi per la conservazione di derrate post-raccolta ha, di fatto, trovato applicazione industriale come provato dalla commercializzazione e da alcune registrazioni nazionali rilasciate per composizioni a base di detti funghi lievitiiformi. Non sono invece note vendite commerciali di detti funghi lievitiiformi e lieviti per il controllo di fitopatogeni responsabili di malattie del filloplano, con la sola eccezione di un ceppo di *Ampelomyces quisqualis* (commercializzato come AQ10), che è però noto antagonizzare soltanto oidii e necessitare della loro



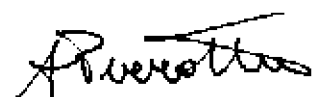
preesistente presenza per potersi insediare sulla superficie della coltura ed esplicare un'azione terapeutica, peraltro non sempre soddisfacente.

Detti lieviti e funghi lievitiforimi, infatti, sono risultati solitamente poco persistenti nell'ambiente di applicazione. Pertanto, il loro uso è stato proposto per la protezione di derrate in conservazione, dove è possibile un'applicazione in ambienti a clima controllato ed in assenza di radiazioni UV, mentre non sono stati raccomandati, e tanto meno commercializzati, per uso fogliare in condizioni di pieno campo.

In aggiunta, attraverso le applicazioni descritte nell'arte nota, si evince una generale selettività verso singoli bersagli fungini per ciascuna coltura e, quindi, la scarsa probabilità di poter disporre di soluzioni ad ampio spettro, con conseguente necessità di prevedere complicati programmi applicativi.

I ceppi della Richiedente hanno invece mostrato di possedere un ampio spettro d'azione contro diversi funghi fitopatogeni degli ortofrutticoli, dimostrando una sorprendente polivalenza anche nel controllo di patogeni fogliari responsabili di malattie su colture economicamente importanti. Tra i fitopatogeni controllati, che sono presenti su importanti derrate ortofrutticole, come mele, pere, fragole, kiwi, uva da tavola e da vino, e agrumi, vi sono ad esempio, *Aspergillus* spp., *Botrytis cinerea*, *Penicillium expansum*, *Penicillium digitatum*, *Penicillium italicum* e *Rhizopus stolonifer* (Lima et al., 1999 - J. Industr. Microbiol. Biotecnol.); tra questi, *Aspergillus niger*, *Aspergillus carbonarius* e *Penicillium expansum* sono anche funghi micotossigeni.

Alcuni ceppi della Richiedente hanno dimostrato di poter colonizzare efficacemente la superficie dei frutti, sopravvivendo e persistendo per mesi su di essa, garantendo così un'attività significativa anche contro microrganismi fitopatogeni persistenti nel tempo. Tali ceppi sono in grado di colonizzare



tempestivamente ed efficacemente le ferite dei frutti, prevenendo così l'attacco dei microrganismi fitopatogeni che penetrano proprio attraverso ferite, perchè in grado di resistere allo stress ossidativo causato dalle specie attive dell'ossigeno prodotte sia dal tessuto dei frutti feriti, sia da funghi fitopatogeni quali *Botrytis cinerea* (Castoria et al., 2003 - Phytopathology). La loro azione si esplica quindi attraverso la pre-colonizzazione delle superfici dei frutti e delle loro ferite, non attraverso la sintesi di sostanze antibiotiche, e con la sintesi di enzimi degradativi attivi contro i microrganismi fitopatogeni (Castoria et al., 1997 e 2001- Postharvest Biology and Technology). Per tali ceppi è stata riscontrata un'interessante attività contro *Botrytis cinerea* e *Penicillium expansum* nella conservazione refrigerata di mele in condizioni semi-commerciali, anche dopo avere effettuato l'applicazione in campo, prima della raccolta (Lima et al., 2003 - European Journal of Plant Pathology; Lima et al., 2006 - Postharvest Biol. Technol.).

Alcuni ceppi della Richiedente sono risultati efficaci nel prevenire attacchi da funghi fitopatogeni di pieno campo, con particolare riferimento all'oidio (*Sphaerotecha fusca*) su cucurbitacee (Lima et al., 2002 - IOBC Bull.). Su queste colture, dopo applicazioni fogliari, i ceppi microbici sono risultati in grado di sopravvivere a livelli elevati di popolazione anche in condizioni di andamento climatico caratterizzato da temperature elevate e bassa umidità relativa. In tali condizioni, l'efficacia antioidica dei ceppi microbici della Richiedente è risultata comparabile a quella di agrofarmaci di sintesi, in particolare triazolici, e sicuramente superiori al biofungicida AQ10 (Lima et al., 2002 - Journal of Plant Pathology).

I ceppi della Richiedente sono risultati efficaci anche nel prevenire la contaminazione con la micotossina Patulina in pomacee attaccate da *Penicillium*



expansum e capaci di trasformare/degradare la micotossina formando nuovi composti molto meno tossici (Castoria et al., 2005 - Phytopathology e dati non pubblicati).

Gli stessi ceppi microbici sono risultati efficaci nel prevenire attacchi da funghi fitopatogeni, con particolare riferimento a *Botrytis cinerea* e a *Penicillium expansum* su mele mostrando un incremento sinergico della loro efficacia quando combinati con sostanze coadiuvanti di origine naturale (Lima et al., 2005 - Journal of Food Protection).

La Richiedente ha ora verificato che alcuni ceppi proprietari consentono anche notevole protezione nei confronti del complesso di malattie dei cereali (quali, oidio, septoriosi ed elmintosporiosi) non solo in condizioni di serra, ma anche di campo, consentendo il controllo di detti fitopatogeni, mediante prevenzione delle infezioni (effetto profilattico o protettivo) oppure constrandolo le infezioni già in atto (effetto terapeutico o curativo).

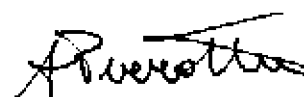
Analogamente, la Richiedente ha sperimentato con successo in prove di pieno campo e serra anche il controllo di complessi di malattie affliggenti numerose altre colture di interesse economico, tra cui, a solo titolo esemplificativo, ma non limitante la presente invenzione: la vite, le orticole (il melone e lo zucchini), il caffè, la soia e la barbabietola da zucchero.

Come già riportato per i fruttiferi, è stato anche ottenuto un sorprendente successo nel controllo di micotossigeni presenti nelle citate colture, produttori anche di micotossine diverse dalla Patulina, provvedendo una interessante soluzione ad un importante problema che affligge l'agricoltura mondiale ed a cui l'attuale tecnologia non è ancora in grado di fornire soluzioni pienamente soddisfacenti ed a basso impatto ambientale.



La Ocratossina A (OTA), in particolare, è un possibile cancerogeno per l'uomo, classificata dall'Agenzia Internazionale per la Ricerca sul Cancro (IARC) nel gruppo 2B. L'OTA si trova in prodotti vegetali come cereali, semi di caffè, fagioli e altri legumi (Kuiper-Goodman and Scott, 1989; Pohland *et al.*, 1992; Jørgensen, 1998) ed in bevande quali vino, succo d'uva e birra (Majerus, 1996; , Pietri, 2001; Zimmerli and Dick, 1996.). A livello comunitario, il vino è ritenuto la seconda fonte di OTA per l'uomo dopo i cereali (FAO/WHO, JECFA, 2001). L'uva essiccata può essere un'ulteriore fonte alimentare di OTA, che è presente in alta frequenza e con valori fino a 53.6 ppb (FAO/WHO, JECFA, 2001; Stefanaki *et al.*, 2003). Il limite massimo di contaminazione stabilito dalla Commissione Europea è 2 ppb per il vino ed il succo d'uva, 10 ppb per l'uva essiccata (REGOLAMENTO CE N. 123/2005, 26 gennaio 2005). La contaminazione da OTA è causata dall'attacco di *Aspergillus carbonarius* nel vigneto e dal suo sviluppo anche nelle fasi successive. Finora sono disponibili solo dati di prove preliminari *in vitro* sull'effetto dei fungicidi sulla produzione di OTA (Battilani *et al.*, 2003). Comunque, la riduzione della contaminazione delle derrate alimentari con fungicidi -e micotossine- sono esigenze scientifiche e sociali espresse dall'Unione Europea.

Pur avendo la stessa Richiedente dimostrato attraverso prove di laboratorio la possibilità di contenere la contaminazione di derrate da parte della micotossina Patulina, dette osservazioni non predisponavano all'ovvia estensione della tecnologia né al contenimento di altre micotossine, né ad applicazioni in condizioni di pratico impiego agronomico per la riduzione del livello di micotossine al raccolto. Questi test, infatti, erano stati condotti in condizioni modello, lontani dalla pratica agronomica. La stessa Patulina, inoltre, ha struttura chimica specifica e diversa da altre micotossine, ciascuna delle quali ha proprie



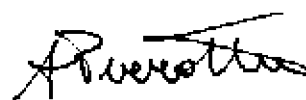
caratteristiche strutturali e proprietà chimiche, il che non porta ad ipotizzare vie cataboliche comuni a Patulina ed altre micotossine.

Pertanto, la Richiedente ha sorprendentemente trovato che ceppi di lieviti e/o funghi lievitiiformi in suo possesso sono stati in grado di contribuire, in situazioni di pratico impiego agronomico, a contenere le infezioni dovute a fitopatogeni delle colture, ma anche a ridurre significativamente i micotossigeni ed i livelli delle relative micotossine. In particolare, sono state constatate significative riduzioni di micotossine differenti dalla Patulina, in particolare dell'Ocratossina A.

I ceppi della richiedente sono lieviti e/o funghi lievitiiformi esenti da patogenicità verso l'uomo ed i mammiferi e rappresentano, quindi, una soluzione agronomica sostenibile per la protezione delle colture.

La presente invenzione, pertanto, si prefigge di risolvere il problema delle perdite di derrate agrarie a causa dell'attacco di funghi fitopatogeni, ma anche di limitare i livelli di micotossine. Questi fattori rappresentano un riconosciuto rischio per la salute dell'uomo e del bestiame, oltre a ridurre il valore commerciale dei raccolti contaminati e la conseguente remunerazione per l'agricoltore.

Pertanto, un primo aspetto della presente invenzione riguarda un metodo che utilizza composizioni a base di microrganismi per contrastare l'insorgenza e/o lo sviluppo delle infezioni dovute a microrganismi fitopatogeni e/o micotossigeni, provvedendo anche ad un contenimento dei livelli di micotossine, presenti nelle parti edibili per la concomitante riduzione della presenza di microrganismi micotossigeni e delle stesse micotossine, anche già presenti al momento dell'applicazione.

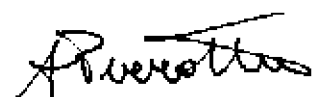


In particolare, la presente invenzione riguarda un metodo che utilizza composizioni a base di microrganismi per contrastare l'insorgenza e/o lo sviluppo delle infezioni dovute a microrganismi fitopatogeni e/o micotossigeni, provvedendo anche ad un contenimento dei livelli di micotossine, in particolare di quelle diverse dalla Patulina, presenti sulle parti edibili, mediante la concomitante riduzione della presenza di microrganismi micotossigeni e delle stesse micotossine, anche già presenti al momento dell'applicazione.

Ancor più in particolare, questo brevetto si riferisce ad un metodo che utilizza preparati a base di microrganismi e specifici coadiuvanti per contrastare l'insorgenza e/o lo sviluppo delle infezioni dovute a microrganismi fitopatogeni e micotossigeni in grado di produrre micotossine, provvedendo anche ad un contenimento dei livelli di ocratossine presenti sulle parti edibili per la concomitante riduzione della presenza dei microrganismi micotossigeni e per riduzione delle stesse ocratossine, anche già presenti al momento dell'applicazione.

Tra gli aspetti particolari della presente invenzione, elenchiamo un metodo che utilizza composti a base di lieviti e/o funghi lievitiforimi per contrastare l'insorgenza e/o lo sviluppo di infezioni su colture ortofrutticole, quali melo, pero, caffè, soia, fragole, kiwi, uva da tavola e da vino e agrumi, e dovute a funghi fitopatogeni e/o micotossigeni, quali *Aspergillus* spp., *Botrytis cinerea*, *Rhizopus stolonifer*, *Penicillium expansum*, *Penicillium italicum* e *Penicillium digitatum*, provvedendo anche ad un contenimento dei livelli della micotossina Ocratossina A presente nelle parti edibili, anche già presente al momento dell'applicazione.

Ancor più in particolare, un aspetto della presente invenzione riguarda un metodo che utilizza composti a base di funghi lievitiforimi per contrastare l'insorgenza e/o lo sviluppo di infezioni su uva da vino e da tavola dovute al



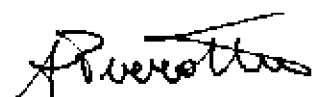
fungo micotossigeno *Aspergillus carbonarius* produttore di Ocratossina A, provvedendo anche ad un contenimento dei livelli della micotossina Ocratossina A presente nelle parti edibili, anche già presente al momento dell'applicazione

Un altro aspetto particolare della presente invenzione riguarda un metodo che utilizza composti a base di lieviti e/o funghi lievitiforimi per contrastare l'insorgenza e/o lo sviluppo delle malattie dei cereali, in particolare di oidio, septoriosi, elmintosporiosi e rincosporiosi, nonché di funghi micotossigeni infettanti detti cereali, quali microrganismi appartenenti ai generi *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium*, provvedendo anche ad un contenimento dei livelli di micotossine diverse dalla Patulina, ed in particolare dell'Ocratossina A eventualmente presente nelle parti edibili, anche già presente al momento dell'applicazione.

Esempi di cereali oggetto dell'utilizzo del metodo rivendicato in questo brevetto sono il frumento, il farro, l'orzo, la segale, il riso.

Esempi di funghi micotossigeni presenti su detti cereali sono *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus*, *Aspergillus ochraceus*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium crookwellense*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium proliferatum*, *Fusarium sporotrichioides*, *Fusarium Verticilloides* e *Penicillium verrucosum*.

Un altro aspetto particolare della presente invenzione riguarda un metodo che utilizza composti a base di lieviti e/o funghi lievitiforimi per contrastare l'insorgenza e/o lo sviluppo delle malattie del mais, quale ad esempio, il marciume verde causato da *Penicillium chrysogenum*, provvedendo anche ad un contenimento dei livelli di micotossine, diverse dalla Patulina, ed in particolare dell'Ocratossina A eventualmente presente nelle parti edibili, anche già presente al momento dell'applicazione.



La Richiedente ha anche trovato che i lieviti e/o funghi lievitiiformi applicati durante il ciclo di crescita delle colture in campo sono in grado di persistere sino al momento del raccolto, fornendo una significativa difesa delle derrate prodotte (in particolare, granaglie e frutti) anche durante la conservazione post-raccolta, producendo un concomitante effetto di contenimento di micotossigeni e delle micotossine prodotte o preesistenti. In particolare, questo effetto è stato rilevato sui cereali con il controllo di *Penicillium chrysogenum* e di *Penicillium verrucosum*, entrambi produttori di Ocratossina A, e sul mais.

Pertanto, un ulteriore aspetto della presente invenzione consiste in un metodo che utilizza composti a base di lieviti e/o funghi lievitiiformi per contrastare l'insorgenza e/o lo sviluppo di micotossigeni infettanti colture producenti granaglie o frutti nel periodo precedente e successivo il raccolto, quali i micotossigeni appartenenti al genere *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium*, provvedendo anche ad un contenimento dei livelli di micotossine prodotte nelle parti edibili, oppure già presenti al momento dell'applicazione, ed in particolare della Ocratossina A, attraverso un'applicazione pre-raccolta di detti funghi lievitiiformi ed i cui benefici si estendono successivamente alla raccolta stessa.

Nello spirito della presente invenzione, il metodo rivendicato consiste, quindi, in una o più applicazioni di composizioni di detti lieviti e/o funghi lievitiiformi sulle parti aeree della coltura, attraverso l'applicazione di dette composizioni opportunamente formulate nella forma di polveri o di soluzioni acquose, a loro volta opportunamente diluite in appropriati volumi d'acqua in modo da ottenene soluzioni o dispersioni, quando totalmente o parzialmente insolubili in acqua. In dette formulazioni, possono essere presenti uno o più lieviti e/o funghi lievitiiformi, intendendo che detti lieviti e/o funghi lievitiiformi siano



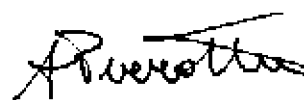
presenti nel formulato e quindi successivamente applicati sulla pianta, come un insieme di spore oppure come micelio, oppure come insieme di spore e micelio.

Dette composizioni possono essere convenientemente ottenute per essiccamento o liofilizzazione della biomassa proveniente da fermentazione dei ceppi oggetto della presente domanda, a sua volta ottenuta per filtrazione o sedimentazione o centrifugazione del brodo di fermentazione.

Esempi preferiti di lieviti e/o funghi lievitiforimi oggetto della presente domanda sono di seguito elencati a titolo esemplificativo, ma non limitativo della presente invenzione. In particolare, sono ceppi di *Aureobasidium*, *Rhodotorula*, *Cryptococcus*.

1. *Aureobasidium pullulans*, ed in particolare sono preferiti i seguenti ceppi collezionati dall'Università del Molise: AU14-3-1, AU18-3B, AU34-2 e LS30. Il ceppo LS30 è stato caratterizzato a livello molecolare (De Curtis *et al.*, 2004) ed anche depositato, in conformità con il trattato di Budapest sui brevetti, presso il Centraalbureau Voor Schimmelcultures (CBS, P.O. Box 85167-3508 AD UTRECHT, The Netherlands) con numero di riferimento CBS 110902.
2. *Rhodotorula glutinis*, ed in particolare è preferito il ceppo LS11 collezionato dall'Università del Molise:
3. *Cryptococcus laurentii*, ed in particolare è preferito il ceppo LS28 collezionato dall'Università del Molise:

Pertanto un altro aspetto della presente invenzione riguarda la preparazione di composizioni a base di uno o più ceppi di lieviti e/o funghi lievitiforimi,



compresi tra i generi sopra elencati, ottenuti per fermentazione, separazione ed essiccazione, con effetti sinergici di efficacia.

Miscele preferite sono:

- uno o più ceppi di *Aureobasidium pullulans*;
- uno o più ceppi di *Rhodotorula glutinis*;
- uno o più ceppi di *Cryptococcus laurentii*.
- uno o più ceppi di *Aureobasidium pullulans* ed uno o più ceppi di *Rhodotorula glutinis*;
- uno o più ceppi di *Aureobasidium pullulans* e uno o più ceppi di *Cryptococcus laurentii*
- uno o più ceppi di *Rhodotorula glutinis* ed uno o più ceppi di *Cryptococcus laurentii*.

I ceppi di lieviti e/o funghi lievitiiformi della Richiedente sono risultati compatibili con numerosi composti fungicidi più comunemente impiegati sulle colture agrarie, generando sorprendenti sinergie riguardanti non solo l'efficacia fungicida, che ha consentito l'applicazione di detti composti fungicidi a dosi sensibilmente ridotte con una vantaggiosa diminuzione dell'impatto ambientale, ma anche la riduzione del rischio di insorgenza di resistenze dei fitopatogeni verso i composti tradizionali. Anche i livelli di micotossigeni e di micotossine sono risultati sorprendentemente inferiori all'atteso, consentendo la riduzione delle dosi dei funghi lievitiiformi e/o del composto fungicida tradizionale.

La Richiedente ha trovato che composizioni a base di lieviti e/o funghi lievitiiformi, oggetto della presente invenzione, possono anche essere convenientemente utilizzati in miscela oppure in alternanza con altri prodotti ad attività biocida, dando luogo ad una inattesa attività sinergica, che riguarda sia il controllo di fitopatogeni sia il contenimento dei micotossigeni presenti su una



coltura, nonché dei livelli di micotossina presenti sulle porzioni edibili, anche precedentemente all'applicazione stessa.

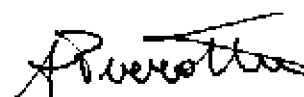
Dette miscele possono essere applicate, sia come miscele pronte per l'uso sia come miscele preparate estemporaneamente, dosando opportunamente ciascun componente (lieviti e/o funghi lieviformi e composti ad attività biocida). L'uso di dette composizioni produce sorprendenti sinergie che possono essere evidenziate, per esempio, applicando la formula di Abbott oppure quella di Colby.

La Richiedente ha anche trovato che anche composti dotati di nessuna o scarsa attività biocida, che la stessa Richiedente aveva già segnalato come sinergici nel controllo di muffe su derrate conservate post-raccolta, sono stati in grado di incrementare il controllo dei funghi fitopatogeni e/o micotossigeni, nonché del contenimento dei livelli di micotossine.

Pertanto, rappresenta un ulteriore aspetto della presente invenzione l'uso di composizioni a base di lieviti e/o funghi lieviformi in combinazione con principi attivi di sintesi e/o naturali, dotati oppure privi di attività biocida, ma che dimostrino compatibilità con i lieviti e/o funghi lieviformi oggetto della presente invenzione, che generino un sinergismo misurabile con una formula di Abbott o di Colby, relativo al controllo di fitopatogeni e/o al contenimento di micotossigeni e/o di micotossine presenti sulle porzioni edibili.

La Richiedente aveva già verificato e comunicato che sali inorganici o di acidi carbossilici erano in grado di sinergizzare l'efficacia di lieviti e/o funghi lieviformi applicati per contenere la botrite in pre- ed in post-raccolta.

La Richiedente ha trovato che alchil-poliglicosidi, quali, ad esempio, alcuni disaccaridi monofunzionalizzati con catene alchiliche C8-C18, commercializzati con il nome commerciale di GlucoPON o di Agnique dalla Cognis come surfattanti da incorporare nelle formulazioni di agrofarmaci, sono sorprendentemente in



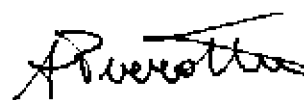
grado di incrementare l'efficacia delle composizioni a base di lieviti e/o funghi lievitiiformi, oggetto del presente brevetto, consentendo la loro applicazione a dosi significativamente ridotte, quando applicate da sole oppure in miscela con altri composti ad attività fungicida.

La Richiedente ha verificato che applicazioni di ceppi di *Aureobasidium* in miscela con Glucopon 650, nelle fasi fenologiche chiave (prechiusura grappolo, invaiatura e 20 giorni prima della raccolta) hanno evidenziato la sopravvivenza degli stessi ceppi microbici e, sorprendentemente, hanno consentito di raggiungere livelli di efficacia contro *Botrytis cinerea*, nonché contro agenti di marciumi secondari del grappolo, come *Aspergillus* spp. e *Penicillium* spp., ivi incluse alcune specie micotossigene, comparabili a quelli ottenuti con antibiotritici e agrofarmaci di sintesi a dose piena.

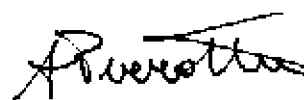
Analogamente, su frumento duro, trattamenti a base dei ceppi di funghi lievitiiformi da soli o combinati con agrofarmaci a dose ridotta e/o coadiuvanti di origine naturale e sempre in presenza di Glucopon 650, nella fase fenologica di inizio spigatura, hanno evidenziato l'elevata sopravvivenza degli stessi ceppi microbici e, sorprendentemente, hanno consentito di raggiungere significativi livelli di efficacia contro le principali malattie delle parti aeree della pianta.

Pertanto, rappresenta un altro aspetto della presente invenzione, l'uso di composizioni di lieviti e/o funghi lievitiiformi in miscela con un disaccaride monofunzionalizzato con catene alifatiche C8-C18, lineari oppure ramificate, opzionalmente in miscela con un composto ad azione fungicida, ottenendo miscele sinergiche per efficacia nei confronti di fitopatogeni e/o micotossigeni.

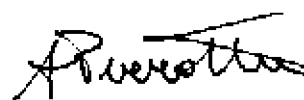
Come composti ad attività fungicida, o comunque in grado di sinergizzare con detti lieviti e/o funghi lievitiiformi, si intende uno o più dei principi attivi di seguito riportati:

A handwritten signature in black ink, appearing to read "P. Verotta", located at the bottom right of the page.

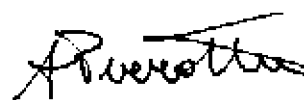
- (1) Acido alginico;
- (2) Amido di mais, additivo alimentare;
- (3) Calcio acetato, additivo alimentare;
- (4) Calcio ascorbato, additivo alimentare;
- (5) Calcio cloruro, additivo alimentare;
- (6) Calcio citrato, additivo alimentare;
- (7) Calcio propionato, additivo alimentare;
- (8) Calcio silicato, additivo alimentare;
- (9) Glucopon, (noto anche come Agnique), prodotto commercializzato da Cognis;
- (10) Gomma guar, additivo alimentare;
- (11) Gomma locust-bean, additivo alimentare;
- (12) Gomma xantan, additivo alimentare;
- (13) Olio di soia, prodotto alimentare, utilizzato anche come coadiuvante-insetticida;
- (14) Oli minerali leggeri, noti come coadiuvanti-insetticidi;
- (15) Potassio fosfato di-basico, additivo alimentare, noto anche come debole fungicida per il controllo dell'oidio;
- (16) Fenexamide, fungicida antibotritico commerciale;
- (17) Procymidone, fungicida antibotritico commerciale;
- (18) Tetraconazolo, fungicida triazolico commerciale;
- (19) Tiabendazolo, fungicida commerciale ad ampio spettro;
- (20) Trifloxystrobin, metossiacrilato fungicida commerciale;
- (21) Ziram, fungicida di copertura commerciale;
- (22) Zolfo, fungicida antioidico inorganico;



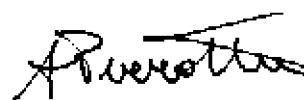
- (23) IR5885, composto dipeptidico corrispondente a miscele diastereoisomeriche di metil [S-(R,S)]-[3-(N-isoprossicarbonylvalinil)-ammino]-3-(4-clorofenil)propanoato in qualsivoglia proporzione, oppure ad una delle due forme diastereoisomeriche S-R od S-S prese singolarmente;
- (24) IR6141, corrispondente a N-(fenilacetil)-N-2,6-xilil-R-alaninato di metile;
- (25) tetraconazolo (nella sua forma racemica oppure come isomero R otticamente attivo);
- (26) acido salicilico (SA) oppure suoi derivati quali acido acetilsalicilico (ASA), sali di rame dell'acido salicilico (SA_2Cu) oppure (SACu) o dell'acido acetilsalicilico (ASA_2Cu);
- (27) un sale di rame (I) oppure di rame (II), quali l'ossicloruro di rame, l'idrossido di rame, la poltiglia bordolese, il solfato di rame, oppure la miscela di idrossido e ossicloruro di rame (Airone);
- (28) Benalaxyl corrispondente a N-(fenilacetil)-N-2,6-xilil-RS-alaninato di metile;
- (29) Metalaxyl corrispondente a N-(2-metossiacetil)-N-2,6-xilil-RS-alaninato di metile;
- (30) Metalaxyl-M corrispondente a N-(2-metossiacetil)-N-2,6-xilil-R-alaninato di metile;
- (31) Oxadixyl corrispondente a 2-metossi-N-(2-osso-1,3-ossazolidin-3-il)aceto-2',6'-xilidide;
- (32) Mandipropamid corrispondente a 2-(4-clorofenil)-N-[2-(3-metossi-4-prop-2-inilossi-fenil)etil]-2-prop-2-inilossi-acetamide;



- (33) Iprovalicarb corrispondente a O-(1-metil-etil)-N-[2-metil-1-[[[1-(4-metil-fenil)-etil]ammino]carbonil]propil]carbammato;
- (34) Benthiavalicarb-isopropil corrispondente a O-isopropil [(S)-1-{{[(1R)-1-(6-fluoro-1,3-benzotiazol-2-il)etil]-carbamoil-2-metilpropil]carbammato};
- (35) Cymoxanil corrispondente a 1-(2-ciano-2-metossimmino-acetil)-3-etilurea;
- (36) Azoxystrobin corrispondente a (E)-2-[2-[6-(2-cianofenossi)-pirimidin-4-ilossi]fenil-3-metossiacrilato di metile;
- (37) Metominofen corrispondente a N-metil-(E)-metossimmino-(2-fenossifenil)acetammide;
- (38) Pyraclostrobin corrispondente a metil N-(2-[1-(4-clorofenil)pirazol-3-ilossimetil]-fenil)-N-metossicarbammato;
- (39) Acibenzolar-S-methyl corrispondente al methyl benzo(1,2,3)tiadiazolo-7-tiocarbos-silato;
- (40) Famoxadone corrispondente a 5-metil-5-(4-fenossifenil)-3-(fenilammino)ossazolidin-2,4-dione;
- (41) Fenamidone corrispondente a 4-metil-4-fenil-1-(fenilammino)-2-metiltioimidazoli-din-5-one;
- (42) Cyazofamide, corrispondente a 2-ciano-4-cloro-5-(4-metilfenil)-1-(N,N-dimetilammino-sulfamoil)imidazolo;
- (43) Fluazinam corrispondente a 3-cloro-N-(3-cloro-5-trifluorometil-2-piridil)- α,α,α -trifluoro-2,6-dinitro-*p*-toluidina;
- (44) Dimethomorph corrispondente a (E,Z)-4-[3-(4-clorofenil)-3-(3,4-dimetossifenil)-acriloil]morfolina; oppure il Flumorph (SYP-L190)



- corrispondente a (E,Z)-4-[3-(4-fluorofenil)-3-(3,4-dimetossifenil)-acriloil]morfolina;
- (45) Flumetover corrispondente a N,N-dietilammide dell'acido 4-trifluorometil-6-3,4-dimetossifenil)-benzoico
- (46) Chlorothalonil corrispondente a 1,3-diciano-2,4,5,6-tetraclorobenzene;
- (47) Mancozeb corrispondente al sale di manganese e zinco del etilen*bis*(ditio-carbammato) (polimero);
- (48) Tolyfluanide corrispondente a N-diclorofluorometiltio-N',N'-dimetil-N-p-tolilsulfammide;
- (49) Folpet corrispondente a N-(triclorome-tiltio)ftalimmide;
- (50) Etridiazolo corrispondente a etil-3-triclorometil-1,2,4-tiadiazolil etere;
- (51) Hymexanol corrispondente a 5-metilisossazol-3-olo;
- (52) Propamocarb corrispondente a propil-(3-dimetilamminopropil)carbammato;
- (53) acido R-3-amminobutanoico oppure acido RS-3-amminobutanoico;
- (54) Zoxamide, corrispondente a 3,5-dicloro-N-(3-cloro-1-etil-1-metil-2-oxopropil)-p-toluammide;
- (55) Ethaboxam, corrispondente a (RS)-(-ciano-2-tienil)-4-etil-2(etilammino)-5-tiazolcarbrossiammide;
- (56) Fluopicolide, corrispondente a 2,6-dicloro-N-[3-cloro-5-(trifluorometil)-2-piridilmetil]benzammide;
- (57) Fosetyl, corrispondente a idrogenofosfonato di etile;



- (58) Fosetyl-Al, corrispondente al sale di alluminio dell'idrogenofosfonato di etile, maggiormente noto con il nome commerciale di Aliette;
- (59) metominostrobil, metossiacrilato commerciale;
- (60) Iprodione, procymidone, cyprodinil e pyrimethanil, antibotritici commerciali;
- (61) epoxyconazole, propiconazole, tebuconazole, fungicidi triazolici commerciali inibitori della biosintesi degli steroli;
- (62) kresoxim-methyl, picoxystrobin, pyraclostrobin, fluoxastrobin, metominostrobin, orysastrobin, dimoxystrobin e enestroburin, fungicidi commerciali agenti per inibizione della respirazione mitocondriale.

I composti (23) sono descritti nella domanda di brevetto italiana N. MI98A002583.

Il composto (24) è descritto nella domanda di brevetto WO 98/26654 A2.

Il composto (25) è descritto in "The Pesticide Manual", 1997, XI^a edizione, British Crop Protection Council Ed., pag. 1174.

I composti (26) sono prodotti commerciali ed i loro sali di rame sono descritti nella domanda di brevetto italiana N. MI 2001A002430.

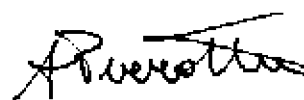
I composti (27) sono facilmente reperibili in commercio.

Il composto (28) è descritto in "The Pesticide Manual", 1983, VII^a edizione, British Crop Protection Council Ed., pag. 32.

Il composto (29) è descritto nel brevetto inglese GB 1,500,581.

Il composto (30) è descritto nella domanda di brevetto WO 96/01559 A1.

Il composto (31) è descritto nel brevetto inglese GB 2,058,059.



Il composto (32) è descritto nella domanda di brevetto WO 01/87822.

Il composto (33) è descritto nella domanda di brevetto EP 550,788 ed EP 775,696.

Il composto (34) è descritto nella domanda di brevetto EP 775,696.

Il composto (35) è descritto in "The Pesticide Manual", 1983, VII^a edizione, British Crop Protection Council Ed., pag. 148.

Il composto (36) è descritto nella domanda di brevetto europeo EP 382,375.

Il composto (37), corrispondente alla sigla sperimentale SSF-126, è descritto nella domanda di brevetto americano US 5,185,242.

Il composto (38) è descritto nella domanda di brevetto WO 96/01258.

Il composto (39) è descritto nella domanda di brevetto americano US 4,931,581.

Il composto (40) è descritto in "Brighton Crop Protection Conference - Pests and Diseases" 1996, Atti del Congresso.

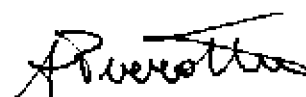
Il composto (41) è descritto nella domanda di brevetto europeo EP 629,616.

Il composto (42), denominato anche IKF916, è descritto nella domanda di brevetto europeo EP 705,823.

Il composto (43) è descritto nella domanda di brevetto europeo EP 31,257.

I composti (44) sono descritti rispettivamente nella domanda di brevetto europeo EP 219,756 ed in "Brighton Crop protection Conference - Pests and Diseases" 2000, Atti del Congresso.

Il composto (45) è descritto nelle domande di brevetto europeo EP 360,701 ed EP 611,232.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'P. Verotta'.

Il composto (46) è descritto in “The Pesticide Manual”, 1983, VII^a edizione, British Crop Protection Council Ed., pag. 120.

Il composto (47) è descritto in “The Pesticide Manual”, 1983, VII^a edizione, British Crop Protection Council Ed., pag. 339.

Il composto (48) è descritto in “The Pesticide Manual”, 1983, VII^a edizione, British Crop Protection Council Ed., pag. 537.

Il composto (49) è descritto in “The Pesticide Manual”, 1983, VII^a edizione, British Crop Protection Council Ed., pag. 599.

Il composto (50) è descritto in “The Pesticide Manual”, 1983, VII^a edizione, British Crop Protection Council Ed., pag. 252.

Il composto (51) è descritto in “The Pesticide Manual”, 1983, VII^a edizione, British Crop Protection Council Ed., pag. 314.

Il composto (52) è descritto in “The Pesticide Manual”, 1983, VII^a edizione, British Crop Protection Council Ed., pag. 471.

I composti (53) sono descritti nella domanda di brevetto europeo EP 753,258.

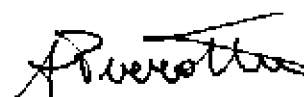
Il composto (54) è descritto in "Brighton Crop Protection Conference - Pests and Diseases 1998" Atti del Congresso.

Il composto (55) è descritto in “The e- Pesticide Manual”, 2003, XIII^a edizione, British Crop Protection Council Ed.

Il composto (56) è descritto nella domanda di brevetto WO 200111966.

I composti (57) e (58) sono descritti in “The Pesticide Manual”, 1994, X^a edizione, British Crop Protection Council Ed., pag. 530.

Bibliografia



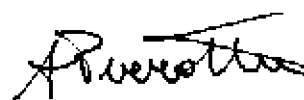
- Arras G, De Cicco V, Arru S and Lima G, 1998. Biocontrol by yeasts of blue mould of citrus fruits and the mode of action of an isolate of *Pichia guilliermondii*. J. Hort. Sci. Biotechnol. 73:413-418.
- Battilani P, Pietri A, Bertuzzi T, Formenti S, Barbano C, Languasco L, 2003. Effect of fungicides on ochratoxin producing black Aspergilli. Journal of Plant Pathology 85: 285.
- Castoria R, De Curtis F, Lima G, Caputo L, Pacifico S and De Cicco V, 2001. *Aureobasidium pullulans* (LS30) an antagonist of postharvest pathogens of fruits: study on its modes of action. Postharvest Biol. Technol. 22: 7-17.
- Castoria R, Caputo L, De Curtis F and De Cicco V, 2003. Resistance to oxidative stress of postharvest biocontrol yeast: a possible new mechanism of action. Phytopathology 93: 564-572.
- Castoria R, Morena V, Caputo L, Panfili G, De Curtis F and De Cicco V, 2005. Effect of the biocontrol yeast *Rhodotorula glutinis* strain LS11 on patulin accumulation in stored apples. Phytopathology 95: 1271-1278.
- De Curtis F, Caputo L, Castoria R, Lima G, Stea G and De Cicco V, 2004. Use of Fluorescent Amplified Fragment Length Polymorphism (fAFLP) for Molecular Characterization of the Biocontrol Agent *Aureobasidium pullulans* strain LS30. Posth. Biol. Technol. 34: 179-186.
- FAO/WHO, JECFA, 2001. - Safety evaluation of certain mycotoxins in food, WHO Food Additives Series 47, FAO Food and Nutrition Paper 74; 56th meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, Geneve, Switzerland, 6-15 February 2001, 281-415.
- Ippolito A and Nigro F, 2000. Impact of preharvest application of biological control agents on postharvest diseases of fresh fruits and vegetables. Crop. Prot. 19:715-723.
- Janisiewicz WJ, Korsten L, 2002. Biological control of postharvest diseases of fruits. Annu. Rev. Phytopathol. 40, 411-441.
- Jørgensen K, 1998. Survey of pork, poultry, coffee, beer and pulses for ochratoxin A. Food Additives and Contaminants 15: 550-554.
- Kuiper-Goodman T and Scott PM, 1989. Risk assessment of the micotoxin ochratoxin A. Biomedical and Environmental Science 2: 179-248.
- Lima G, De Curtis F, Castoria R and De Cicco V, 1998. Activity of the yeasts *Cryptococcus laurentii* and *Rhodotorula glutinis* against postharvest rots on different fruits. Biocontr. Sci. Technol. 8: 257-267.
- Lima G, De Curtis F, Spina AM and De Cicco V, 2002. Survival and activity of biocontrol yeasts against powdery mildew of cucurbits in the field. In: "Biological Control of Fungal and Bacterial Plant Pathogens", IOBC wprs Bulletin Vol. 25 (10) 2002 ED.: Y Elad, et al. pp: 187-190.
- Majerus P and Otteneider H 1996. Detection and occurrence of ochratoxin A in wine and grape juice. Deutsche Lebensmittel-Rundschau 92: 388-390.
- Pietri A, Bertuzzi T, Pallaroni L and Piva G, 2001. Occurrence of ochratoxin A in Italian wines, Food Addit. Contam. 18:647-654.
- Pohland AE, Nesheim S and Friedman L, 1992. Ochratoxin A: a review. Pure and Applied Chemistry 64: 1029-1046.
- Stefanaki I, Foufa E, Tsatsou-Dritsa A and Photis Dais, 2003. Ochratoxin A concentrations in Greek domestic wines and dried vine fruits, Food Addit. Contam. 20: 74-83.

- Zimmerli B and Dick R, 1996. Ochratoxin A in table wine and grape-juice: occurrence and risk assessment', Food Addit. Contam. 13: 655-668.
- Lima G, Arru S, De Curtis F and Arras G, 1999. Influence of Antagonist, Host Fruit and Pathogen on the Biological Control of Postharvest Fungal Diseases by Yeasts. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 23: 223-229.
- Lima G, De Curtis F, Piedimonte D, Spina AM and De Cicco V, 2002. Activity of antagonists and natural compounds against powdery mildew of cucurbits: laboratory and field trials. Journal of Plant Pathology 84: 185.
- Lima G, De Curtis F, Castoria R, De Cicco V, 2003. Integrated control of apple postharvest pathogens and survival of biocontrol yeasts in semi-commercial conditions. European Journal of Plant Pathology 109(4): 341-349.
- Lima G, Spina AM, Castoria R, De Curtis F, and De Cicco V, 2005. Integration of Biocontrol Agents and Food-grade Additives for Enhancing Protection of Apples from *Penicillium expansum* During Storage. Journal of Food Protection 68: 2100–2106.
- Lima G, De Curtis F, Piedimonte D Spina AM and De Cicco V, 2006. Integration of biocontrol yeast and thiabendazole protects stored apples from fungicide sensitive and resistant isolates of *Botrytis cinerea*. Postharvest Biology and Technology 40: 301–307.

A titolo esemplificativo e non limitante lo spirito dell'invenzione vengono riportati alcuni esempi a dimostrazione dell'efficacia in condizioni di laboratorio e di campo dell'invenzione oggetto del presente brevetto.

ESEMPIO 1. Verifica dell'efficacia di ceppi di *Aureobasidium pullulans* nel controllo di *Aspergillus carbonarius* e dei livelli di Ocratossina A (OTA) su uva

La applicazione di ceppi del fungo lievitifforme *Aureobasidium pullulans* come agenti di biocontrollo su bacche staccate dal grappolo e artificialmente ferite, quindi nelle condizioni di massima suscettibilità all'attacco dei funghi fitopatogeni e micotossigeni, prima della conseguente inoculazione di tali bacche col fungo fitopatogeno e micotossigeno *Aspergillus carbonarius*, determina un'altissima protezione dalle infezioni e, nella pur bassa percentuale di bacche infettate, la concentrazione di Ocratossina A è molto inferiore rispetto a bacche infettate non pretrattate coi ceppi di funghi lievitifformi. Il sensibile decremento



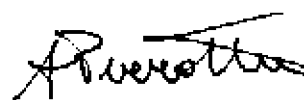
registrato si può far risalire a) alla detossificazione dell'Ocratossina A ad Ocratossina α da parte di ceppi di funghi lievitiiformi verificata *in vitro*; b) all'interferenza di tali ceppi col processo biosintetico dell'Ocratossina A operato dal fungo micotossigeno.

Risultati

La figura 1 dimostra che gli agenti di biocontrollo *Aureobasidium pullulans* AU14-3-1, AU18-3B e LS30 hanno un'elevata attività protettiva pur in condizioni di saggio estremamente favorevoli al patogeno micotossigeno, rappresentate dal fatto che le bacche uva erano staccate dal grappolo e ulteriormente ferite.

La figura 1 mostra l'attività protettiva di biocontrollo dei ceppi di *Aureobasidium pullulans* AU14-3-1, AU18-3B e LS30 su bacche di uva da vino (cv Montepulciano) inoculate con *Aspergillus carbonarius* ceppo A1102. L'Attività protettiva di biocontrollo è stata espressa come percentuali di ferite infette che sono state registrate a 3 (A), 4 (B) e 6 (C) giorni di incubazione. Il controllo è consistito in bacche non pretrattate coi ceppi di *Aureobasidium pullulans*, prima dell'inoculazione col patogeno fungino micotossigeno. I dati sono stati raggruppati da tre differenti esperimenti. I valori percentuali sono stati convertiti in valori angolari di Bliss prima dell'analisi statistica. I valori con le stesse lettere non sono significativamente differenti per $P=0,01$ secondo il test di Duncan.

La figura 2 dimostra che la contaminazione da Ocratossina A è significativamente abbassata dal trattamento con gli agenti di biocontrollo *Aureobasidium pullulans* AU14-3-1, AU18-3B, LS30, nonostante le condizioni di saggio estremamente favorevoli al patogeno.

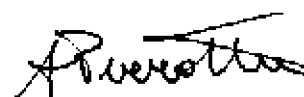


Nella figura 2. sono mostrate le concentrazioni di Ocratossina A (OTA) ed Ocratossina α (OT α) in bacche inoculate col fungo patogeno micotossigeno *Aspergillus carbonarius* ceppo A1102 e pretrattate, alternativamente, coi ceppi di *Aureobasidium pullulans* AU14-3-1, AU18-3B, LS30. Ciascuna colonna rappresenta la media di tre esperimenti raggruppati. I valori con le stesse lettere non sono significativamente differenti per $P=0,01$ secondo il test di Duncan. Le lettere all'interno ed al di sopra delle colonne si riferiscono ad OTA ed OT α , rispettivamente.

La tabella 1 mostra che il rapporto tra la concentrazione di Ocratossina α e quella di Ocratossina A nei trattamenti con gli agenti di biocontrollo è più elevato, in particolare il doppio per AU18-3B e più del doppio per AU14-3-1. Ciò deriva dal fatto che la meno tossica Ocratossina α è costante nei diversi trattamenti, anche quando l'Ocratossina A è molto inferiore al controllo (vedi Figura 2). Questo dato indica interferenza degli agenti di biocontrollo con la sintesi di Ocratossina A operata dal fungo micotossigeno e degradazione-detossificazione della micotossina Ocratossina A ad Ocratossina α da parte degli stessi agenti di biocontrollo.

Tabella 1. Rapporto tra le concentrazioni di Ocratossina α (OT α) e Ocratossina A (OTA) rilevate dopo 6 giorni di incubazione in bacche di uva da vino infettate con *Aspergillus carbonarius*, pretrattate con gli agenti di biocontrollo *Aureobasidium pullulans* AU14-3-1, AU18-3B, LS30.

<i>Agente di biocontrollo</i>	<i>[OTα]/[OTA] *</i>
-------------------------------	--



AU14-3-1	0.14
AU18-3B	0.12
LS30	0.07
Controllo non pretrattato	0.06

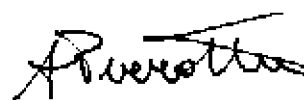
* Il rapporto si riferisce a concentrazioni espresse come nmol/g di bacca infetta.

La figura 3 dimostra che la sorprendente diminuzione della contaminazione delle bacche di uva con l'Ocratossina A causata dagli agenti di biocontrollo e dimostrata in figura 2 è possibile poiché l'Ocratossina A non è tossica per gli agenti di biocontrollo *Aureobasidium pullulans* AU14-3-1, AU18-3B e LS30, nonostante l'elevata concentrazione a cui questi vengono sottoposti.

Nella figura 3 è mostrata la crescita *in vitro* dei ceppi di *Aureobasidium pullulans* AU14-3-1 (A), AU18-3B (B) and LS30 (C) per 6 giorni a 23°C in terreno culturale Lilly-Barnett in presenza (quadrati neri) ed in assenza (quadrati bianchi) di Ocratossina A 2.5 µM. I dati sono stati raggruppati da tre differenti esperimenti. I valori sono espressi come CFU/ml e sono le medie ± deviazione standard dalla media (n=6).

I cromatogrammi esemplificativi delle analisi HPLC (figura 4) di AU14-3-1 mostrano che gli agenti di biocontrollo *Aureobasidium pullulans* AU14-3-1, AU18-3B e LS30 determinano *in vitro* un chiaro decremento di Ocratossina A e la progressiva formazione della meno tossica Ocratossina α.

Nella figura 4 sono mostrati i cromatogrammi HPLC esemplificativi del filtrato culturale di *Aureobasidium pullulans* AU14-3-1 incubato per 6 giorni a 23°C in terreno culturale Lilly-Barnett in presenza di Ocratossina A 2.5 µM



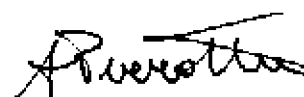
(OTA). (OT α) a 0 (A), 4 (B) e 6 (C) giorni dall'inizio dell'incubazione. Gli esperimenti sono stato eseguiti 3 volte.

La figura 5 dimostra che gli agenti di biocontrollo *Aureobasidium pullulans* AU14-3-1, AU18-3B e LS30 degradano completamente l'Ocratossina A ad Ocratossina α , QUINDI DETOSSIFICANDOLA, poiché l'Ocratossina α ha un'attività tossica molto inferiore. Inoltre, l'attività degradativa è completa, nonostante l'elevata concentrazione iniziale di Ocratossina A pari a 2,5 μ M, corrispondente ad 1 μ g/ml.

Figura 5 - Time-course delle concentrazioni *in vitro* di Ocratossina A (OTA, quadrati bianchi) and Ocratossina α (OT α , quadrati neri) analizzate durante 6 giorni di incubazione in terreno colturale Lilly-Barnett in assenza (A) ed in presenza dei ceppi di *Aureobasidium pullulans* AU14-3-1 (B), AU18-3B (C), e LS30 (D). La concentrazione iniziale di OTA era 2.5 μ M. I valori sono espressi come concentrazione μ molare dei due composti. I dati sono stati raggruppati da tre differenti esperimenti. I valori sono le medie $\pm$ deviazione standard dalla media (n=6).

Conclusioni

Gli agenti di biocontrollo *Aureobasidium pullulans* AU14-3-1, AU18-3B e LS30 hanno un'elevata attività protettiva pur in condizioni di saggio estremamente favorevoli al patogeno micotossigeno *Aspergillus carbonarius*, rappresentate dal fatto che le bacche uva erano staccate dal grappolo ed anche ferite.



La contaminazione da Ocratossina A è significativamente abbassata dal trattamento con gli agenti di biocontrollo, nonostante le condizioni di saggio estremamente favorevoli al patogeno.

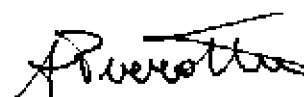
Il rapporto Ocratossina α / Ocratossina A nei trattamenti con gli agenti di biocontrollo è molto più elevato perché la meno tossica Ocratossina α è costante nei diversi trattamenti, anche quando l'Ocratossina A è molto inferiore al controllo, come nel caso dei trattamenti con gli agenti di biocontrollo. Ciò indica interferenza di tali agenti con la sintesi di Ocratossina A operata dal fungo micotossigeno e degradazione-detossificazione della micotossina Ocratossina A ad Ocratossina α da parte degli stessi agenti di biocontrollo.

L'Ocratossina A non è tossica per gli agenti di biocontrollo *Aureobasidium pullulans* AU14-3-1, AU18-3B e LS30, nonostante la elevata concentrazione di micotossina a cui tali agenti sono stati incubati, e ciò li mette in condizioni di degradare l'Ocratossina A formando la meno tossica α . L'Ocratossina A, infatti, è completamente degradata e DETOSSIFICATA ad Ocratossina α dagli agenti di biocontrollo *Aureobasidium pullulans* AU14-3-1, AU18-3B e LS30, nonostante la elevata concentrazione iniziale a cui tali agenti sono stati incubati.

Procedura sperimentale

Controllo di *Aspergillus carbonarius* produttore di ocratossina A mediante ceppi di *Aureobasidium pullulans* su uva da vino

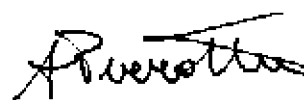
Bacche mature di uva da vino sono state sterilizzate per 2 minuti in soluzione 1% di ipoclorito di sodio (pH 11,5), lavate due volte con acqua sterile e



asciugate su carta assorbente. Le bacche sono state ferite in tre punti equidistanti sul piano equatoriale e trattate per immersione in sospensioni cellulari (10^8 cellule/ml) per 5 minuti a 80 gpm (giri per minuto), alternativamente, dei ceppi AU14-3-1, AU18-3B e LS30 di *Aureobasidium pullulans*. Campioni costituiti da 5 repliche, ciascuna consistente di 10 bacche, sono stati sottoposti a *spray* con una sospensione di conidi di *Aspergillus carbonarius* A1102 (5×10^4 UFC/ml). Le bacche così trattate sono state incubate a $24 \pm 1^\circ\text{C}$ e 100% di umidità relativa (UR) fino a 6 giorni. La percentuale di ferite infette è stata rilevata a 4, 5 e 6 giorni. Gli esperimenti sono stati eseguiti due volte.

Misurazione di Ocratossina A e α in bacche di uva da vino

Le stesse bacche usate negli esperimenti di controllo su riportati sono state analizzate per misurare l'accumulo di Ocratossina A (OTA) e α (OT α). Al termine delle prove di controllo di cui sopra, le bacche dai differenti trattamenti sono state omogeneizzate con Ultra-Turrax a 14.000 gpm. Campioni da 5 grammi sono stati addizionati con 10 ml of PEG 1% and NaHCO₃ 5% (p/v) e mescolati per 3 minuti. Le bacche estratte sono state centrifugate a 4000 gpm per 10 minuti ed i sovrantanti filtrati su filtri in microfibre di vetro Whatman GF/A. Tre ml di tali estratti sono stati caricati su colonnine C₁₈ Sep-Pak RC da 500 mg (Waters, Milford, MA) condizionate con metanolo (4 ml), acqua (4 ml) e NaHCO₃ 5% (2 ml). Le colonnine C₁₈ sono state lavate con 2 ml di H₃PO₄ 0.1 M e 2 ml di acqua. OT α and OTA sono state eluite con 4 ml of etilacetato/metanolo/acido acetico (95:5:0,5) e 2 ml of acetonitrile/acido acetico (98:2), rispettivamente. Dopo evaporazione dei solventi sotto flusso di azoto, tutti gli estratti sono stato ridisciolti in 3 ml of CH₃CN/H₂O/CH₃COOH (99:99:2). Aliquote di 50 μl degli

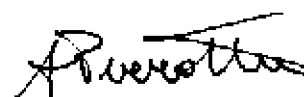


estratti purificati sono state iniettate nell'apparato cromatografico per le analisi HPLC. Le analisi sono state eseguite con un *Agilent 1100 series LC System* (Agilent Technologies, Santa Clara, CA). Tutti i campioni sono stati analizzati con una colonna Waters Xterra C₁₈ (150×4.6 mm – 5 µm) ed una fase mobile continua di CH₃CN/H₂O/CH₃OOH (99:99:2) ad un flusso di 1,0 ml/min. OTA and OTα sono state rilevate monitorando la fluorescenza a 460 nm (λ_{em}) (λ_{ex} =333 nm). Soluzioni seriali standard di OTA commerciale e di OTα prodotta mediante digestione enzimatica di OTA con carbossipeptidasi A da pancreas bovino (EC 3.4.17.1) (Sigma-Aldrich) sono state iniettate per determinare le aree dei picchi e generare una curva standard per le analisi quantitative.

Detossificazione di Ocratossina A ad Ocratossina α mediante ceppi del fungo lievitoforme *Aureobasidium pullulans*

Beute contenenti terreno colturale NYDB (*Nutrient Broth* 8 g/l, estratto di lievito 5 g/l e Destrosio 10 g/l) sono state innestate con una concentrazione di 1×10^5 CFU/ml dei ceppi AU14-3-1, AU18-3B e LS30 di *Aureobasidium pullulans*. Le colture sono state allevate *overnight* a 23 °C e poi trasferite in beute con 50 ml di terreno colturale Lilly-Barnett (Lilly and Barnett, 1951) emendato con OTA in CH₃CN/H₂O/CH₃COOH (99:99:2), (concentrazione finale di OTA 1 µg/ml, corrispondente a 2.5 µM) per 6 giorni a 23°C su agitatore rotante a 160 rpm. Il controllo è consistito in terreno colturale Lilly–Barnett contenente OTA 1 µg/ml in assenza dei microrganismi.

Le colture dei quattro ceppi ed il controllo sono stati analizzati per quantificare OTA ed OTα mediante HPLC dopo 0, 1, 2, 3, 4, 5, e 6 giorni, iniettando aliquote filtro-sterilizzate delle colture stesse. Aliquote opportunamente



diluite di ciascuna coltura sono state piastrate su piastre Petri agli stessi intervalli di tempo per valutare la crescita dei ceppi microbici in presenza di OTA. Gli esperimenti sono stati eseguiti tre volte.

Esempio 2: Impiego di preparati a base di ceppi di *Aureobasidium pullulans* con coadiuvanti o fungicidi a basso dosaggio per la prevenzione/riduzione delle infezioni da *Botrytis cinerea* di uva da tavola e da vino

Prove di compatibilità tra ceppi del fungo lieviforme *Aureobasidium pullulans*, coadiuvanti di varia natura e/o dosi ridotte di agrofarmaci di sintesi, hanno evidenziato come generalmente queste sostanze non influenzano la crescita *in vitro* del microrganismo (es. figura 6). Esperimenti condotti su singole bacche di uva da tavola e su altri frutti in postraccolta, in ferite artificiali pretrattate con preparati a base di *Aureobasidium pullulans* e inoculate con *Botrytis cinerea*, hanno evidenziato come l'efficacia dell'agente di lotta biologica (BCA) risulta spesso sorprendentemente incrementata dall'aggiunta di coadiuvanti e/o dosi ridotte di agrofarmaci diversi (Esempi figure 7-8).

Prove biennali di campo su uva da vino hanno dimostrato come l'impiego combinato di ceppi del BCA e coadiuvanti e/o agrofarmaci a basso dosaggio è in grado di esaltare sorprendentemente l'efficacia del BCA. In particolare, trattamenti con BCA e coadiuvanti e/o dose ridotta di agrofarmaci, nelle fasi fenologiche chiave (prechiusura grappolo, invaiatura e 20 gg. prima della raccolta) hanno evidenziato l'elevata sopravvivenza degli isolati di *Aureobasidium pullulans* e, sorprendentemente, hanno mostrato livelli di efficacia contro *Botrytis cinerea*, e verosimilmente anche contro agenti di marciumi secondari del grappolo, (*Aspergillus* spp., *Penicillium* spp., etc.) comparabili con quelli ottenuti con antibiotritici di sintesi a dose piena (Esempi figure 9-10).



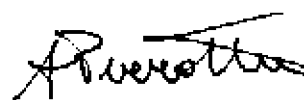
Preparati a base di *Aureobasidium pullulans*, sembrano pertanto idonei ad essere impiegati per la prevenzione/riduzione dell'incidenza del marciume botritico sia in campo sia in post-raccolta. In campo, in particolare i trattamenti a base di ceppi di *Aureobasidium pullulans* sono di facile applicazione e ben si inseriscono nei più comuni piani/strategie di difesa della vite e dell'uva. Infine, l'utilizzo di preparati a base di ceppi di *Aureobasidium pullulans*, microrganismo saprofita normalmente presente nel vigneto, oltre a garantire elevata efficacia, sicurezza per gli operatori e per l'ambiente può verosimilmente (come dimostrato da prove di laboratorio) garantire un contemporaneo controllo dei ceppi di *Botrytis cinerea* fungicida-sensibili e fungicida-resistenti normalmente diffusi nel vigneto.

Nella figura 6 è mostrata la compatibilità *in vitro*, su Basal Yeast Agar (BYA), tra il ceppo LS30 di *Aureobasidium pullulans* e il coadiuvante sperimentale Glucopon (pH 7) a differenti concentrazioni.

Nella figura 7 è mostrato l'andamento delle infezioni botritiche su bacche di uva da tavola (cv. Italia) sottoposte a trattamenti con *Aureobasidium pullulans* LS30 (**A**) o *Aureobasidium pullulans* Au34/2 (**B**) da soli o combinati con fungicida (Procilex: s.a. procimidone) a dose ridotta (DR= 15 g/hl) o a dose piena (DP= 150 g/hl). LS30_C1= 10^6 Unità formanti colonie (Ufc)/ml; C2= 10^8 Ufc/ml).

Nella figura 8 è mostrato l'andamento delle infezioni botritiche su bacche di uva da tavola (cv. Italia) sottoposte a trattamenti con *Aureobasidium pullulans* LS30 da solo o combinato con calcio propionato (**A**) o calcio propionato+olio di soia (OS, 0,25%) (**B**). LS30_C1= 10^6 Unità formanti colonie (Ufc)/ml; C2= 10^8 Ufc/ml).

Nella figura 9 è mostrata l'attività antibotritica (**A**) in campo (anno 2005) (indice di McKinney) e sopravvivenza (**B**) su uva da vino di *Aureobasidium pullulans* (ceppi LS30 e Au34-2) da soli o in combinazione con coadiuvante (Add= calcio



propionato 0,5%+olio di soia 0,5%) a confronto con il ceppo LS16 di *Metschnikowia pulcherrima* e di un fungicida antibotritico commerciale.

Nella figura 10 è mostrata l'attività antibotritica su uva da vino (anno 2006) in campo (**A** e **B**) di *Aureobasidium pullulans* (ceppo LS30) e sopravvivenza dell'antagonista (**C**) sulle bacche. L'antagonista (BCA) è stato inserito in strategie di difesa del vigneto come da schema seguente:

TESI	STRATEGIA DI DIFESA	Prechiusura grappolo	Invaiaitura	20 gg prima della raccolta
A	Biologico 1	BCA	BCA	BCA
B	Biologico 2	Rame+zolfo	BCA	BCA
C	Integrato alternato (fenexamide a dose piena: DP)	Fenexamide DP	BCA	BCA
D	Integrato combinato (fenexamide a dose ridotta: DR)	Fenexamide DR + BCA	Fenexamide DR + BCA	Fenexamide DR + BCA
E	Test_1: Antibotritico di sintesi	Fenexamide DP	Fenexamide DP	Nessun trattamento
F	Test_2: Antibotritici di sintesi	SCALA (Pyrimetamil)	SWITCH (Cyprodinil+Fluidioxanil)	Nessun tratt.
G	Test_3: Aziendale	Nessun tratt. antibotritico	Nessun tratt. antibotritico	Nessun trattamento antibotritico

*BCA: applicato alla concentrazione di circa 10^7 cellule fresche/ml in combinazione con Glucopon 0,1% (pH 7).

Esempio 3: Impiego di preparati a base di ceppi di agenti di biocontrollo (BCA) coadiuvanti, o fungicidi a basso dosaggio per la prevenzione/riduzione di mal bianco e septoriosi su cereali in campo

Arreola

Prove preliminari di compatibilità *in vitro* tra il fungo lievitifforme *Aureobasidium pullulans* LS30, coadiuvanti di varia natura e/o dosi ridotte di agrofarmaci di sintesi, hanno evidenziato come queste sostanze generalmente non influenzano significativamente la crescita del microrganismo.

In prove di campo condotte su frumento duro nel corso di due anni di ricerca (2004 e 2005) è stato valutato il livello di efficacia di mal bianco e di septoriosi, in seguito ad applicazioni di preparati a base dei BCA nelle fasi fenologiche emissione foglia a bandiera e prefioritura. I risultati di entrambi gli anni hanno evidenziato come l'efficacia dell'agente di lotta biologica risulta significativamente incrementata dall'aggiunta di coadiuvanti e/o dosi ridotte di agrofarmaci. Inoltre, trattamenti a base di *Aureobasidium pullulans* e dosi ridotte di fungicidi sono stati quelli più efficaci nel ridurre le malattie in oggetto con attività comparabile a quella fornita dall'applicazione di fungicidi a dose piena. Inoltre, specifiche indagini ecologiche hanno evidenziato la capacità di *Aureobasidium pullulans* e degli altri BCA di sopravvivere a livelli elevati di popolazione sulle superfici aeree del frumento consentendo di raggiungere nel contempo livelli di efficacia contro mal bianco e septoriosi comparabili con quelli ottenuti con agrofarmaci a dose piena.

A titolo esemplificativo nelle figure 11A e 11B (efficacia) e figura 12 (sopravvivenza dei BCA) sono riportati i risultati relativi all'anno 2005.

Nella figura 11, in particolare, è mostrata l'attività (Indice di infezione di McKinney, %) contro mal bianco (**A**) e contro septoriosi (**B**) su piante di grano duro trattate in campo con *Rhodotorula glutinis* (LS11), *Cryptococcus laurentii* (LS28) o *Aureobasidium pullulans* (LS30) combinati con fungicidi a dose ridotta (DR) o con additivi: cloruro di calcio, calcio propionato (Ca-prop) o acidi umici



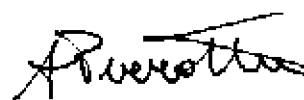
(Ac.U.), od olio di soia (OS). Come controllo sono stati utilizzati: fungicidi a dose piena (DP) e testimone trattato solo con acqua.

Nella figura 12 è mostrata la dinamica di popolazione di LS30, espressa in cfu/cm² di superficie fogliare di piante di grano sottoposte ad alcuni trattamenti di cui alle figure 1A e 1B. Sull'ascissa è riportato il tempo, mentre le due frecce indicano il momento di esecuzione dei trattamenti.



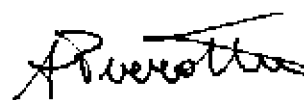
RIVENDICAZIONI

1. Composizioni a base di microrganismi in grado di contrastare l'insorgenza e/o lo sviluppo di infezioni dovute a microrganismi fitopatogeni e/o micotossigeni e per contenere i livelli di micotossine, presenti sulle parti edibili per la concomitante riduzione della presenza di microrganismi micotossigeni e delle stesse micotossine, anche già presenti al momento dell'applicazione caratterizzate dal fatto che i microrganismi sono composti a base di lieviti e/o funghi lievitiiformi, nonché di specifici coadiuvanti;
2. Composizioni a base di microrganismi secondo la rivendicazione 1 caratterizzate dal fatto che almeno uno dei lieviti e funghi lievitiiformi utilizzati è un ceppo di *Aureobasidium*;
3. Composizioni a base di microrganismi secondo la rivendicazione 2 caratterizzate dal fatto che almeno uno dei lieviti e funghi lievitiiformi utilizzati è un ceppo di *Aureobasidium pullulans*;
4. Composizioni a base di microrganismi secondo la rivendicazione 3 caratterizzate dal fatto che almeno uno dei lieviti e funghi lievitiiformi utilizzati è un ceppo di *Aureobasidium pullulans* codificato AU14-3-1;
5. Composizioni a base di microrganismi secondo la rivendicazione 3 caratterizzate dal fatto che almeno uno dei lieviti e funghi lievitiiformi utilizzati è un ceppo di *Aureobasidium pullulans* codificato AU18-3B;
6. Composizioni a base di microrganismi secondo la rivendicazione 3 caratterizzate dal fatto che almeno uno dei lieviti e funghi



lievitiformi utilizzati è un ceppo di *Aureobasidium pullulans* codificato AU34-2;

7. Composizioni a base di microrganismi secondo la rivendicazione 3 caratterizzate dal fatto che almeno uno dei lieviti e funghi lievitiformi utilizzati è un ceppo di *Aureobasidium pullulans* codificato LS30 (CBS 110902);
8. Composizioni a base di microrganismi secondo la rivendicazione 1 caratterizzate dal fatto che almeno uno dei lieviti e funghi lievitiformi utilizzati è un ceppo di *Rhodotorula*;
9. Composizioni a base di microrganismi secondo la rivendicazione 8 caratterizzate dal fatto che almeno uno dei lieviti e funghi lievitiformi utilizzati è un ceppo di *Rhodotorula glutinis*;
10. Composizioni a base di microrganismi secondo la rivendicazione 1 caratterizzate dal fatto che almeno uno dei lieviti e funghi lievitiformi utilizzati è un ceppo di *Cryptococcus*;
11. Composizioni a base di microrganismi secondo la rivendicazione 10 caratterizzate dal fatto che almeno uno dei lieviti e funghi lievitiformi utilizzati è un ceppo di *Cryptococcus laurentii*;
12. Composizioni a base di microrganismi secondo la rivendicazione 1 caratterizzate dal fatto che almeno due dei lieviti e funghi lievitiformi utilizzati sono ceppi di *Aureobasidium pullulans*;
13. Composizioni a base di microrganismi secondo la rivendicazione 12 caratterizzate dal fatto che almeno uno dei lieviti e funghi lievitiformi utilizzati è un ceppo di *Aureobasidium pullulans* ed un altro è un ceppo di *Rhodotorula glutinis*;



14. Composizioni a base di microrganismi una delle rivendicazioni 3, 4, 5, 6, 7 o 11 caratterizzate dal fatto che almeno uno dei lieviti e funghi lievitiiformi utilizzati è un ceppo di *Aureobasidium pullulans* ed un altro è un ceppo di *Cryptococcus laurentii*
15. Composizioni a base di microrganismi secondo una delle rivendicazioni 8 o 10 caratterizzate dal fatto che almeno uno dei lieviti utilizzati è un ceppo di *Cryptococcus* ed un altro è un ceppo di *Rhodotorula*;
16. Composizioni a base di microrganismi secondo una delle rivendicazioni 9 o 11 caratterizzate dal fatto che almeno uno dei lieviti utilizzati è un ceppo di *Cryptococcus laurentii* ed un altro è un ceppo di *Rhodotorula glutinis*;
17. Composizioni a base di microrganismi secondo una qualsiasi rivendicazione precedente caratterizzate dal fatto che i coadiuvanti sono principi attivi di sintesi e/o naturali, dotati oppure privi di attività biocida, ma che dimostrino compatibilità con detti lieviti e/o funghi lievitiiformi oggetto, utilizzati in composizioni oppure in alternanza, dando luogo ad una inattesa attività sinergica, che riguarda sia il controllo di fitopatogeni sia il contenimento dei micotossigeni presenti su una coltura, nonché dei livelli di micotossina presenti sulle porzioni edibili, anche precedentemente all'applicazione stessa;
18. Composizioni a base di microrganismi secondo la rivendicazione 17 caratterizzate dal fatto che detta attività sinergica è misurabile con una formula di Abbott o di Colby, relativo al controllo di

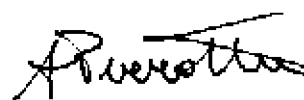


fitopatogeni e/o al contenimento di micotossigeni e/o di micotossine
presenti sulle porzioni edibili;

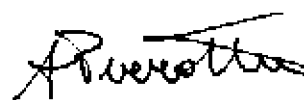
19. Composizioni a base di microrganismi secondo la rivendicazione 18 caratterizzate dal fatto che detti principi attivi sono uno o più prodotti selezionati tra quelli qui elencati: acido alginico, amido di mais, calcio acetato, calcio ascorbato, calcio cloruro, calcio citrato, calcio propionato, calcio silicato, gomma guar, gomma locust-bean, gomma xantan, olio di soia, oli minerali leggeri, potassio fosfato di basico, fenexamide, procymidone, tetraconazolo, tiabendazolo, trifloxystrobin, ziram, zolfo, IR5885, acido salicilico, acido acetilsalicilico, sali di rame dell'acido salicilico (SA_2Cu) oppure ($SACu$) o dell'acido acetilsalicilico (ASA_2Cu), un sale di rame (i) oppure di rame (ii), quali l'ossicloruro di rame, l'idrossido di rame, la poltiglia bordolese, il solfato di rame, oppure la miscela di idrossido e ossicloruro di rame (airone), benalaxyl, kyalaxyl, metalaxyl, metalaxyl-M, mandipropamid, iprovalicarb, bentiavalicarb-isopropil, cymoxanil, metominofen, pyraclostrobin, acibenzolar-s-methyl, famoxadone, fenamidone, cyazofamide, fluazinam, dimethomorph, flumorph, flumetover, chlorothalonil, mancozeb, tolylfluanide, folpet, etridiazolo, hymexanol, propamocarb, zoxamide, ethaboxam, fluopicolide, fosetyl, fosetyl-al, metominostrobin, iprodione, procymidone, cyprodinil, pyrimethanil, epoxyconazole, propiconazole, tebuconazole, kresoxim-methyl, picoxystrobin, pyraclostrobin, fluoxastrobin, metominostrobin, orysastrobin, dimoxystrobin, enestroburin;

Pueraria

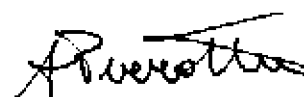
20. Metodo in grado di contrastare l'insorgenza e/o lo sviluppo di infezioni dovute a microrganismi fitopatogeni e/o micotossigeni e per contenere i livelli di micotossine, presenti sulle parti edibili per la concomitante riduzione della presenza di microrganismi micotossigeni e delle stesse micotossine, anche già presenti al momento dell'applicazione che utilizza composizioni secondo una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti caratterizzato dal fatto che dette composizioni sono applicate pre-raccolta e i benefici si estendono successivamente alla raccolta stessa;
21. Metodo secondo la rivendicazione 20 caratterizzato dal fatto che consiste in una o più applicazioni di composizioni di detti lieviti e/o funghi lievitiiformi sulle parti aeree della coltura, attraverso l'applicazione di dette composizioni opportunamente formulate ed utilizzate secondo la rivendicazione 11, nella forma di polveri o di soluzioni acquose, a loro volta opportunamente diluite in appropriati volumi d'acqua in modo da ottenere soluzioni o dispersioni, totalmente o parzialmente insolubili in acqua;
22. Metodo secondo la rivendicazione 21 caratterizzato dal fatto che nel formulato possono essere presenti uno o più lieviti e/o funghi lievitiiformi, che sono successivamente applicati alla pianta, come un insieme di spore oppure come micelio, oppure come insieme di spore e micelio;
23. Metodo secondo la rivendicazione 22 caratterizzato dal fatto che dette composizioni opportunamente formulate sono ottenute per essiccamento o liofilizzazione di biomassa proveniente da fermentazione di ceppi di *Aureobasidium*;



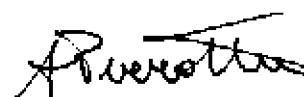
24. Metodo secondo la rivendicazione 23 caratterizzato dal fatto che detta biomassa è ottenuta per filtrazione o sedimentazione o centrifugazione del brodo di fermentazione di detti ceppi di *Aureobasidium*;
25. Metodo secondo la rivendicazione 20 caratterizzato dal fatto che dette composizioni sono applicate in presenza di un disaccaride monofunzionalizzato con catene alifatiche C8-C18, lineari oppure ramificate, ed, opzionalmente, in miscela con un composto ad azione fungicida, ottenendo miscele sinergiche per efficacia nei confronti di fitopatogeni e/o micotossigeni;
26. Metodo secondo la rivendicazione 20 caratterizzato dal fatto che dette composizioni sono applicate in presenza di un disaccaride monofunzionalizzato con catene alifatiche C8-C18, denominato Glucopon 650, opzionalmente in miscela con un composto ad azione fungicida, ottenendo miscele sinergiche per efficacia nei confronti di fitopatogeni e/o micotossigeni;
27. Metodo che utilizza composizioni a base di composti a base di lieviti e/o funghi lievitiiformi, nonché di specifici coadiuvanti, in grado di contrastare l'insorgenza e/o lo sviluppo delle infezioni dovute a microrganismi fitopatogeni e/o micotossigeni, caratterizzato dal contenimento dei livelli di micotossine, in particolare di quelle diverse dalla Patulina, presenti sulle parti edibili, mediante la concomitante riduzione della presenza di microrganismi micotossigeni e delle stesse micotossine, anche già presenti al momento dell'applicazione;



28. Metodo secondo la rivendicazione 20 caratterizzato dal fatto che viene eseguito in condizioni di pieno campo oppure di serra, consistente in una o più applicazioni su piante o porzioni di pianta, per il contenimento di fitopatogeni e micotossigeni, in grado anche di ridurre il livello di micotossine, eventualmente presenti prima delle applicazioni;
29. Metodo secondo la rivendicazione 27 caratterizzato dal fatto che viene eseguito in condizioni di pieno campo oppure di serra, consistente in una o più applicazioni su piante o porzioni di pianta, per il contenimento di fitopatogeni e micotossigeni, in grado anche di ridurre il livello di Ocratossina, eventualmente presenti prima delle applicazioni. un metodo che utilizza composizioni a base di composti a base di lieviti e/o funghi lievitiforimi, nonché di specifici coadiuvanti, in grado di contrastare l'insorgenza e/o lo sviluppo delle infezioni dovute a microrganismi fitopatogeni e/o micotossigeni, caratterizzato, in particolare, dal contenimento dei livelli di ocratossine presenti sulle parti edibili per la concomitante riduzione della presenza dei microrganismi micotossigeni e per riduzione delle stesse ocratossine, anche già presenti al momento dell'applicazione.
30. Uso di composizioni secondo una delle rivendicazioni 1-19 caratterizzato dal contenimento dei livelli di micotossine, in particolare di quelle diverse dalla Patulina, presenti sulle parti edibili, mediante la concomitante riduzione della presenza di microrganismi micotossigeni e delle stesse micotossine, anche già presenti al momento dell'applicazione;



31. Uso di composizioni secondo una delle rivendicazioni 1-19 caratterizzato, in particolare, dal contenimento dei livelli di ocratossine presenti sulle parti edibili per la concomitante riduzione della presenza dei microrganismi micotossigeni e per riduzione delle stesse ocratossine, anche già presenti al momento dell'applicazione.
32. Uso di composizioni secondo la rivendicazione 30 caratterizzato dall'utilizzo di composti a base di lieviti e/o funghi lievitiiformi per contrastare l'insorgenza e/o lo sviluppo di infezioni su colture ortofrutticole, quali melo, pero, caffè, soia, fragola, kiwi, uva da tavola e da vino e agrumi, e dovute a funghi fitopatogeni e/o micotossigeni, quali *Aspergillus* spp., *Botrytis cinerea*, *Rhizopus stolonifer*, *Penicillium expansum*, *Penicillium italicum* e *Penicillium digitatum*, determinando anche un contenimento dei livelli della micotossina Ocratossina A presente nelle parti edibili, anche se già presente al momento dell'applicazione;
33. Uso di composizioni secondo la rivendicazione 30 caratterizzato dall'utilizzo di composti a base di lieviti e/o funghi lievitiiformi per contrastare l'insorgenza e/o lo sviluppo di infezioni su uva da vino e da tavola dovute al fungo micotossigeno *Aspergillus carbonarius* produttore di Ocratossina A, determinando anche un contenimento dei livelli della micotossina Ocratossina A presente nelle parti edibili, anche se già presente al momento dell'applicazione;
34. Uso di composizioni secondo la rivendicazione 30 caratterizzato dall'utilizzo di composti a base di lieviti e/o funghi lievitiiformi per contrastare l'insorgenza e/o lo sviluppo delle malattie dei cereali, in particolare di oidio, septoriosi, elmintosporiosi e rincosporiosi,



nonché di micotossigeni infettanti detti cereali, quali microrganismi appartenenti ai generi *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium*, determinando anche un contenimento dei livelli di micotossine diverse dalla Patulina, ed in particolare dell'Ocratossina A eventualmente presente nelle parti edibili, anche se già presente al momento dell'applicazione;

35. Uso di composizioni secondo la rivendicazione 33 caratterizzato dal fatto che detti cereali sono il frumento, il farro, l'orzo, la segale, il riso;
36. Uso di composizioni secondo la rivendicazione 33 caratterizzato dal fatto che i micotossigeni presenti su detti cereali sono *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus*, *Aspergillus ochraceus*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium crookwellense*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium proliferatum*, *Fusarium sporotrichioides*, *Fusarium verticilloides*, *Penicillium verrucosum*;
37. Uso di composizioni secondo la rivendicazione 35, caratterizzato dall'utilizzo di composti a base di lieviti e/o funghi lievitiiformi per contrastare l'insorgenza e/o lo sviluppo delle malattie del mais, quale ad esempio, il marciume verde causato dal *Penicillium chrysogenum*, provvedendo anche ad un contenimento dei livelli di micotossine, diverse dalla Patulina, ed in particolare dell'Ocratossina A eventualmente presente nelle parti edibili, anche già presente al momento dell'applicazione;
38. Uso di composizioni secondo la rivendicazione 36 caratterizzato dal fatto che utilizza composti a base di lieviti e/o funghi lievitiiformi per contrastare l'insorgenza e/o lo sviluppo di micotossigeni



infettanti colture producenti granaglie o frutti nel periodo precedente e successivo il raccolto, quali i micotossigeni appartenenti ai generi *Aspergillus*, *Fusarium* o *Penicillium*.

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Pueretto", located in the bottom right corner of the page.

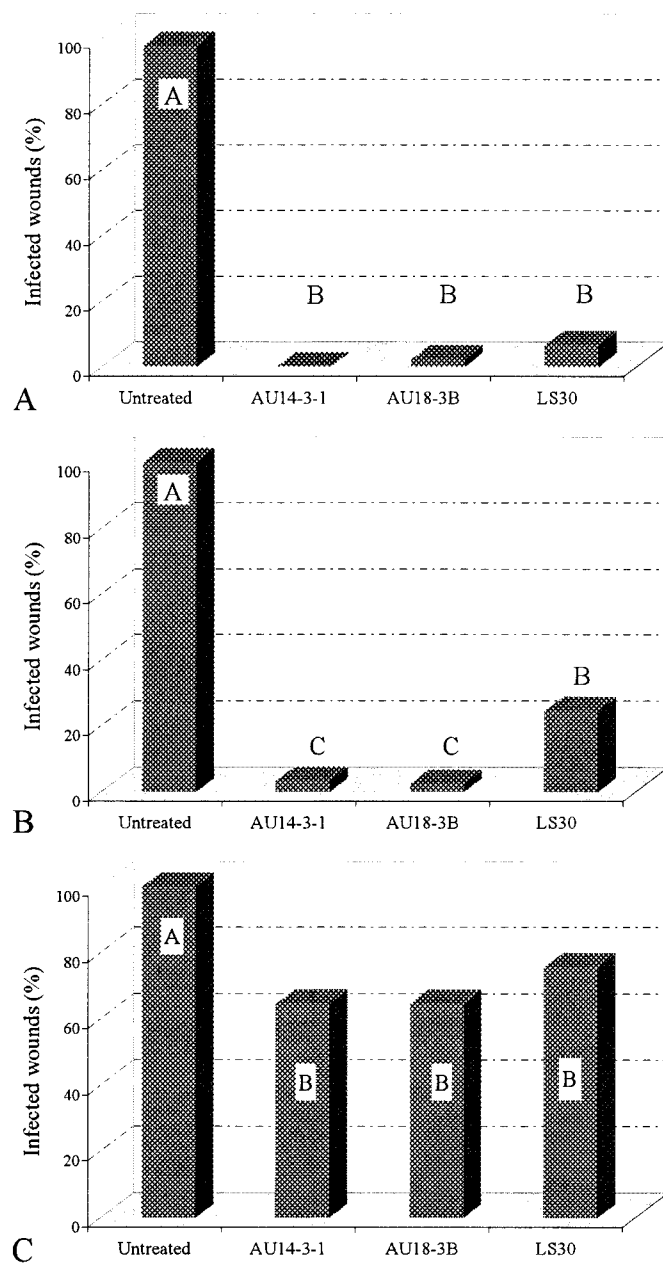


Fig. 1

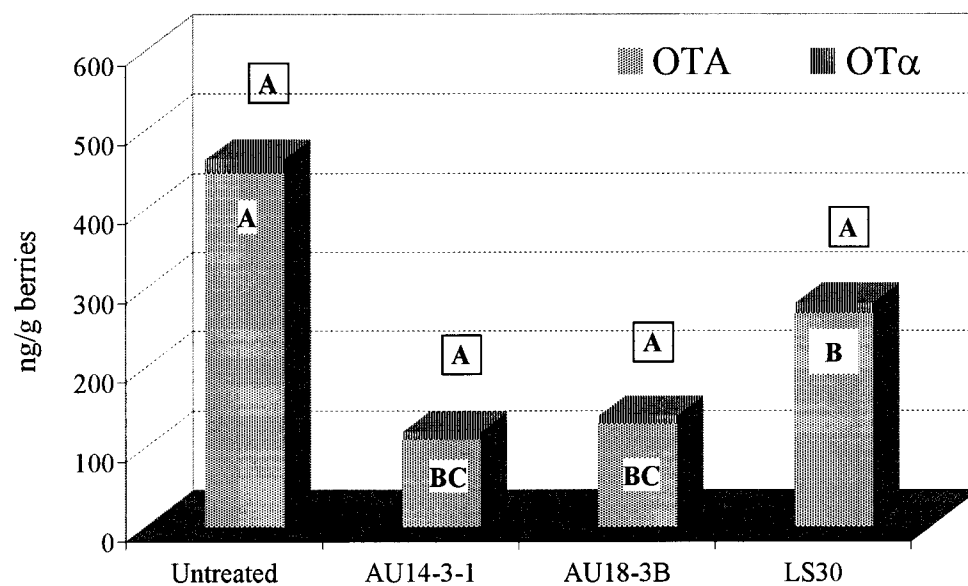


Fig. 2

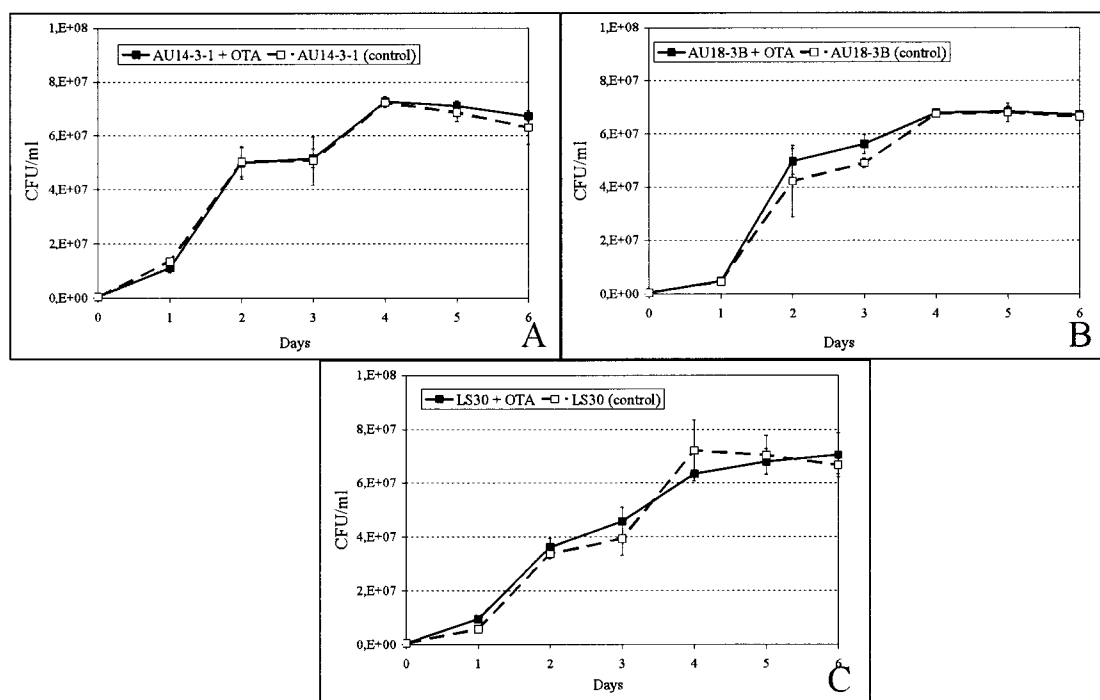


Fig. 3

A. Ferretti

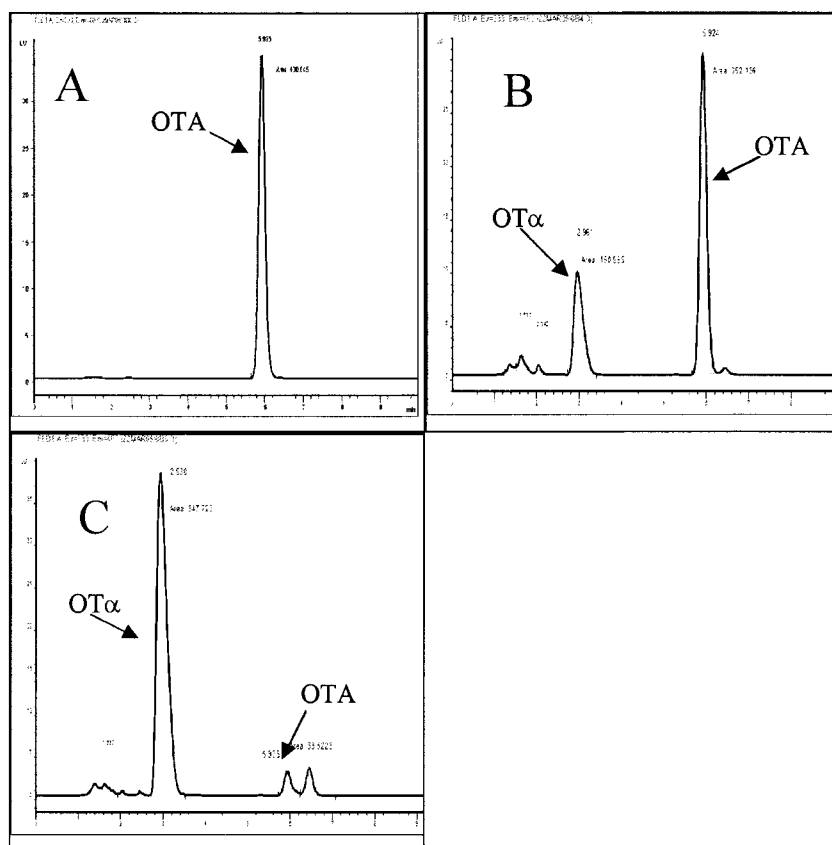


Fig. 4

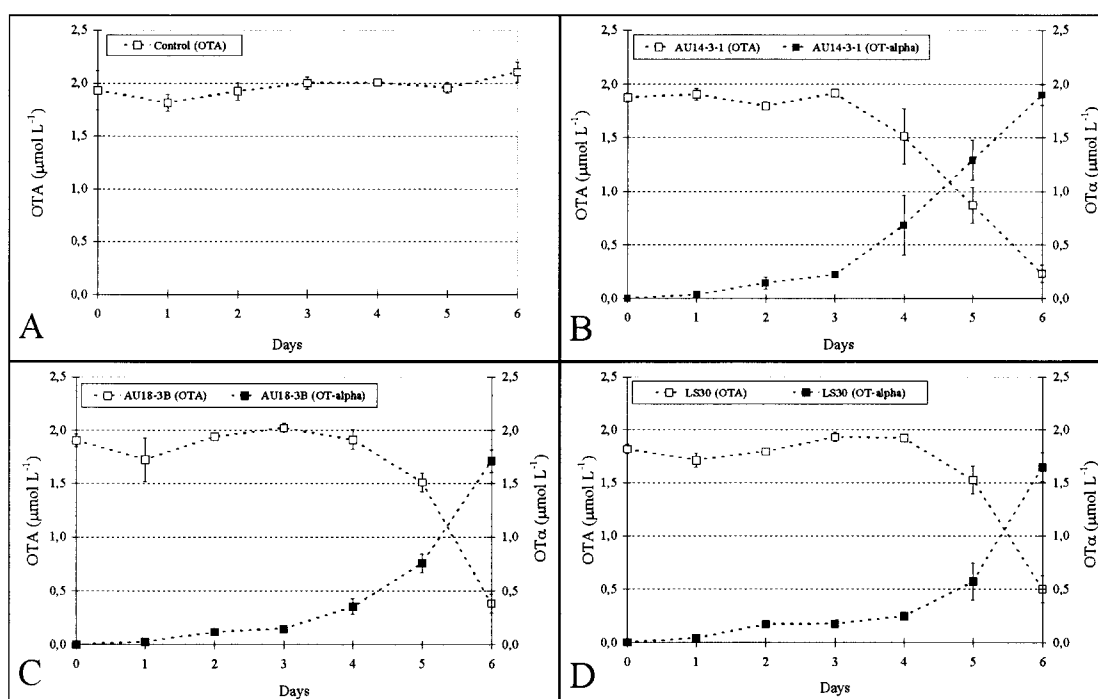


Fig. 5

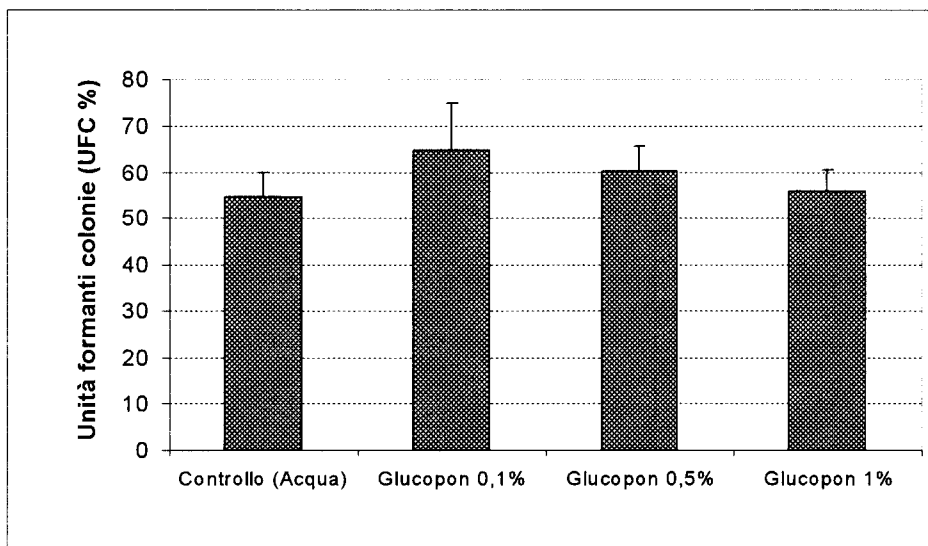


Fig. 6

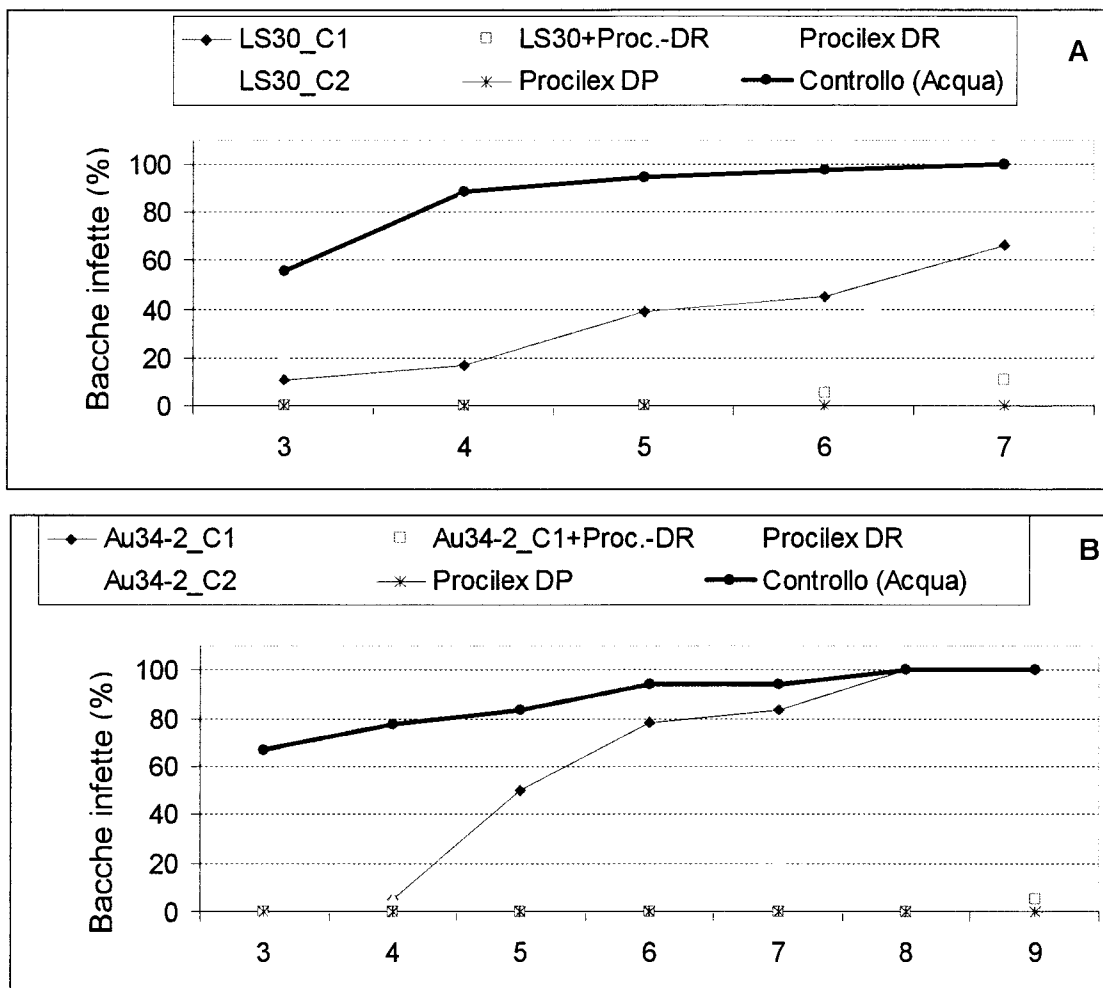


Fig. 7

Giorni di conservazione a 21°C

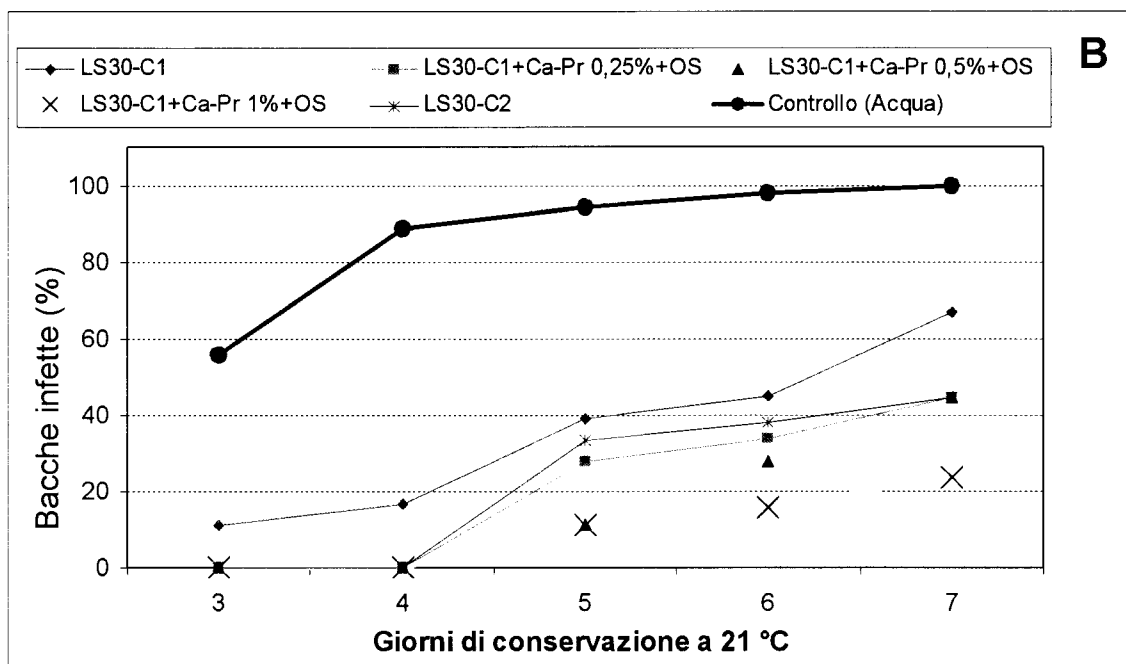
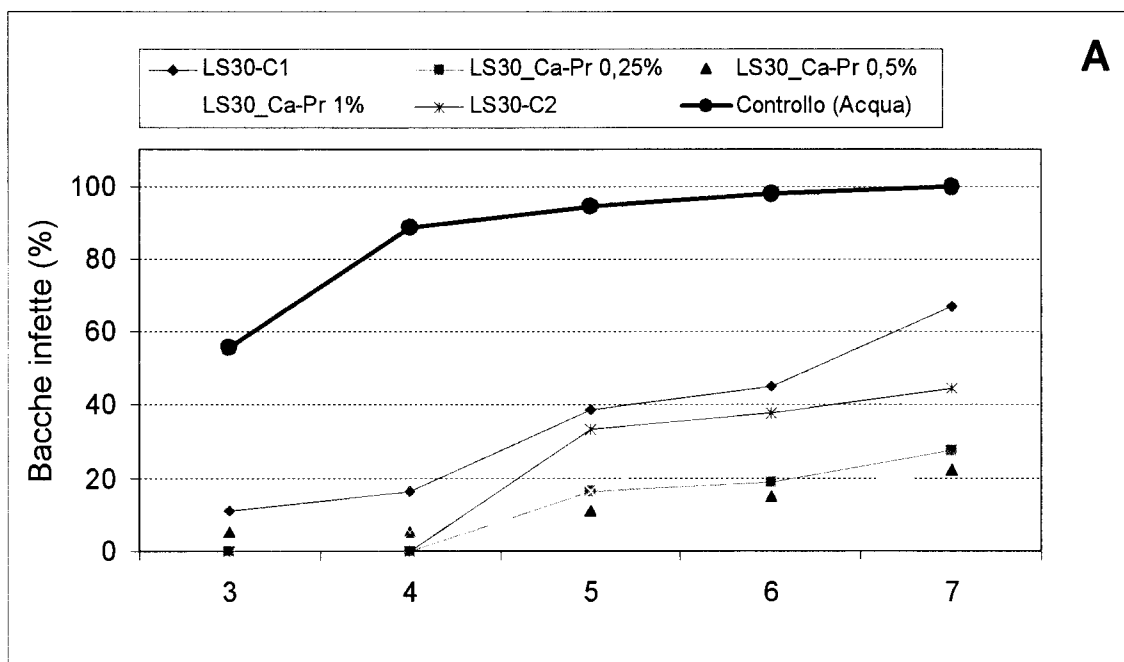


Fig. 8

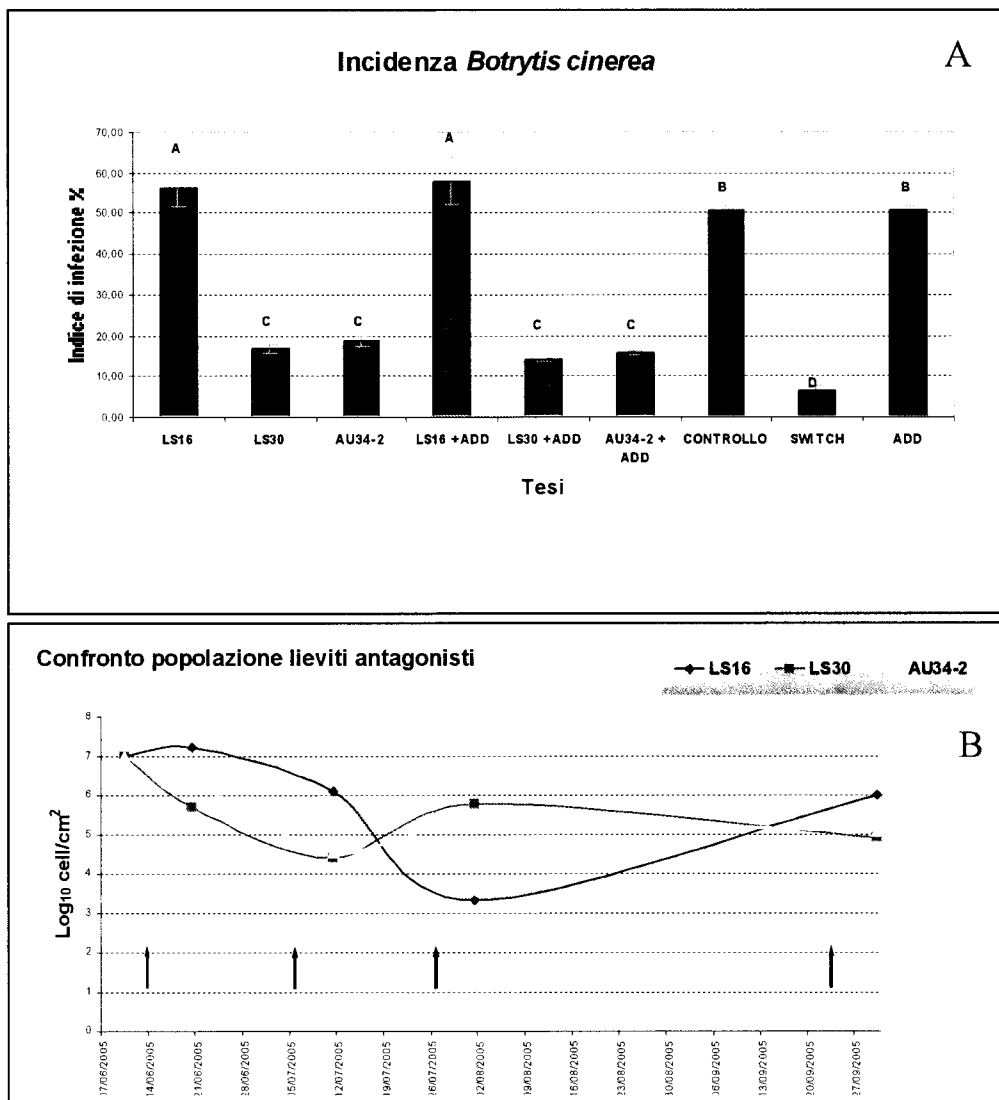


Fig. 9

Perrotto

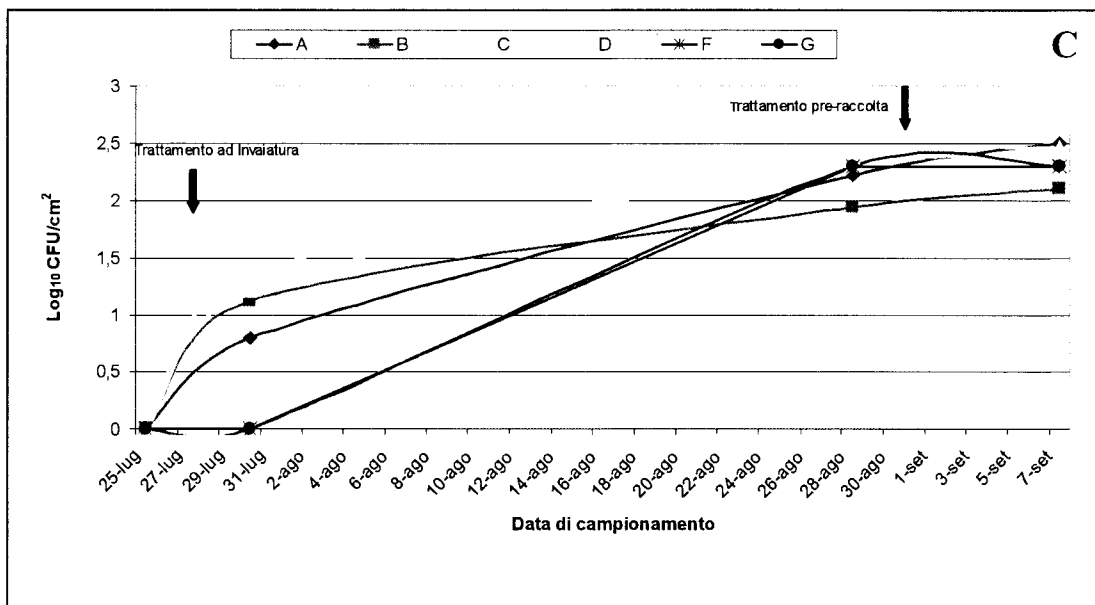
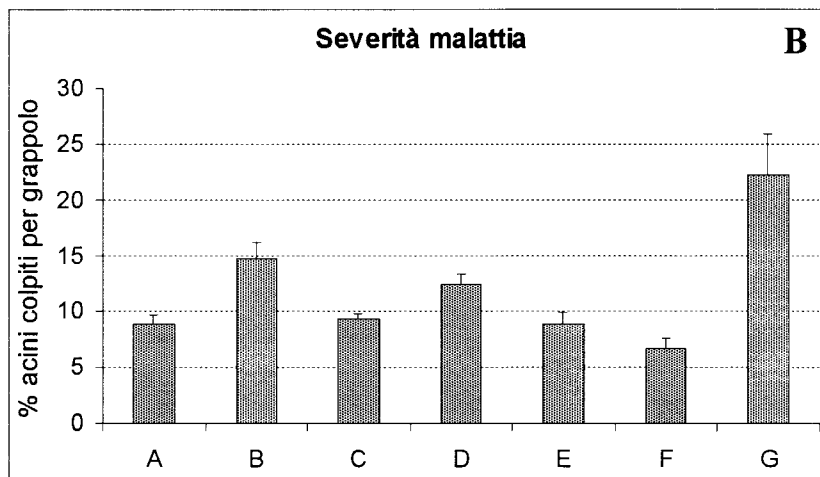
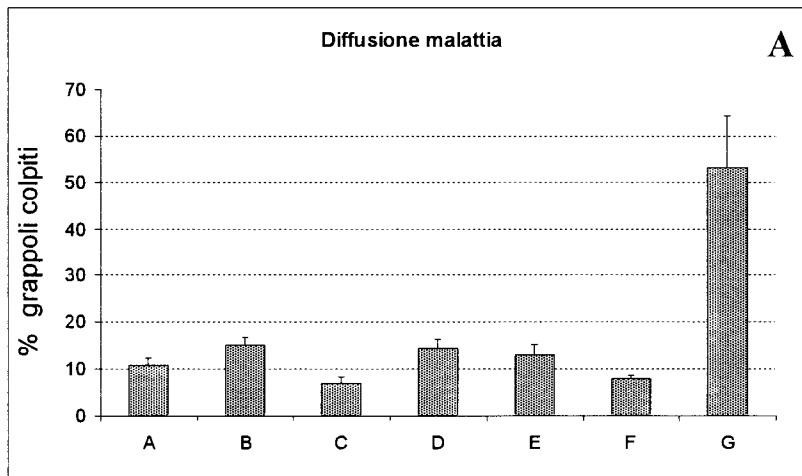


Fig. 10

Abbate

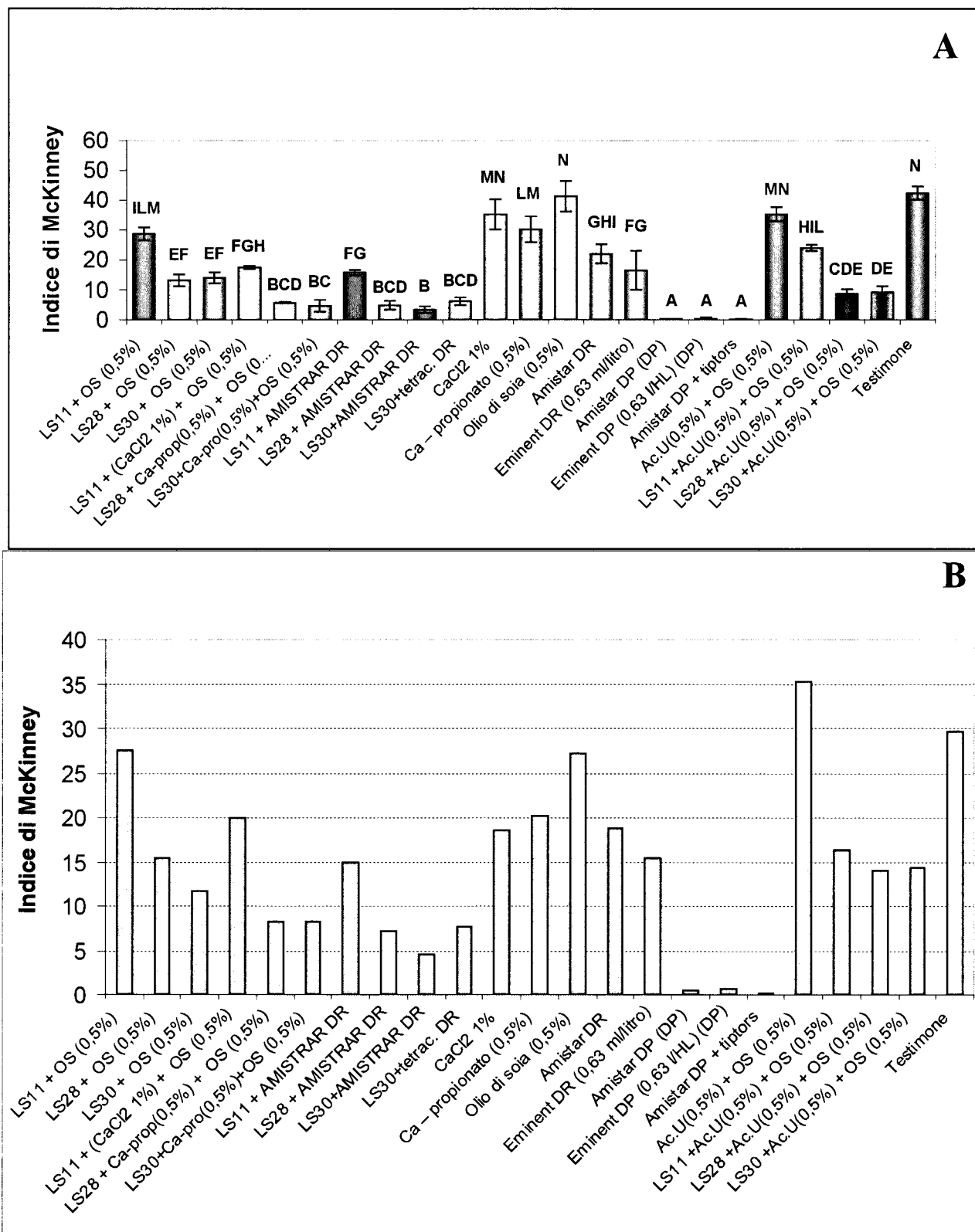


Fig. 11

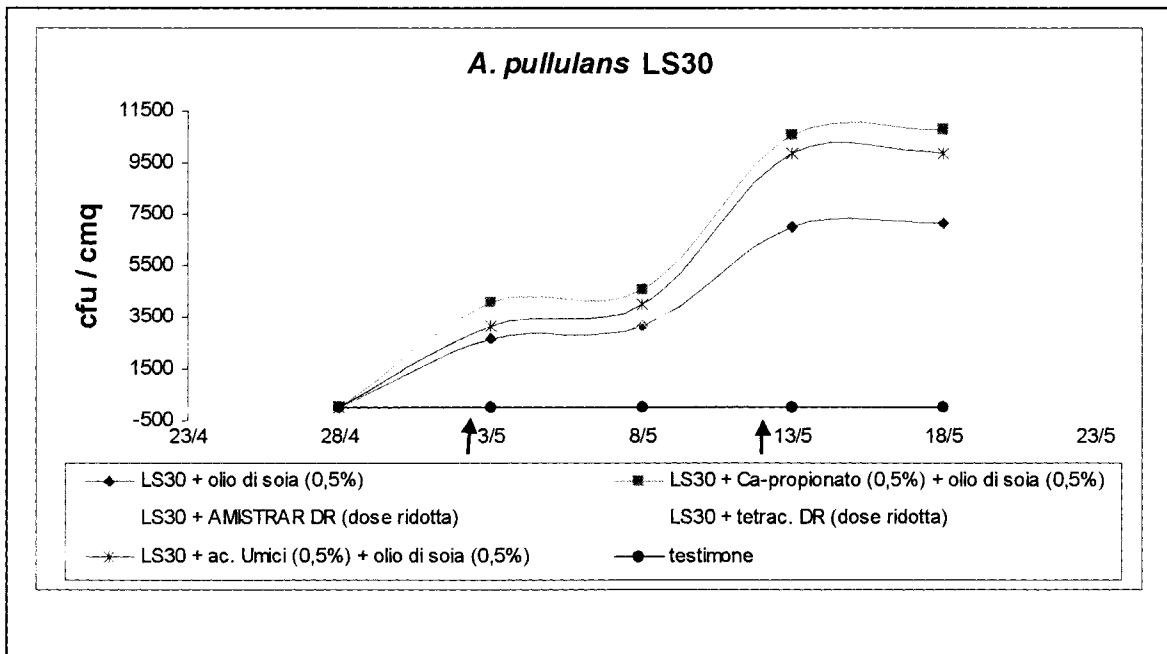


Fig. 12

A. Ferretti