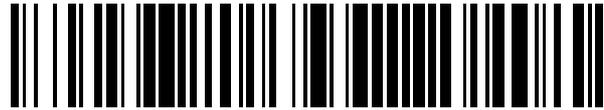


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 570 957**

51 Int. Cl.:

A01N 63/04 (2006.01)

C12R 1/645 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.07.2012 E 12751363 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.02.2016 EP 2731441**

54 Título: **Cepas de levadura nuevas y uso de las mismas para el control de hongos fitopatógenos**

30 Prioridad:

11.07.2011 IT MI20111292

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

23.05.2016

73 Titular/es:

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DEL MOLISE (100.0%)
Via F. de Sanctis S.N.C.
86100 Campobasso, IT**

72 Inventor/es:

**DE CURTIS, FILIPPO;
CASTORIA, RAFFAELLO;
LIMA, GIUSEPPE y
DE CICCIO, VINCENZO**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 570 957 T3

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

DESCRIPCIÓN

Cepas de levadura nuevas y uso de las mismas para el control de hongos fitopatógenos

La presente invención se refiere a cepas de levadura nuevas y a su uso, solas o en una mezcla sinérgica, para el control biológico de hongos fitopatógenos, también micotoxigénicos, de cultivos agrícolas de considerable interés económico, y a las composiciones fungicidas relacionadas.

El uso de levaduras que pertenecen a la especie *Aureobasidium*, *Rhodotorula*, *Cryptococcus*, *Metschnikowia*, *Candida*, etc., para el control de hongos fitopatógenos, en particular los responsables de la putrefacción de frutos tras la cosecha, ya se conoce y se ha descrito, por ejemplo, en las solicitudes de patentes WO96/25039 (*Rhodotorula*, *Cryptococcus*), US5244680 (*Cryptococcus*), US5843434 (*Candida*), WO02/072777 (*Metschnikowia*), WO2008/114304 (*Aureobasidium*, *Rhodotorula*, *Cryptococcus*), WO2009/040862 (*Metschnikowia*), así como en las referencias bibliográficas citadas en dichos documentos.

El documento WO2008/114304 describe, entre otras cepas, una cepa de *Rhodotorula glutinis* codificada como LS11, y una cepa de *Cryptococcus laurentii* codificada como LS28, que se pueden usar para el control de hongos fitopatógenos, entre los que también hay diversos productores de micotoxinas (hongos micotoxigénicos). Estas dos levaduras, sin embargo, cuando se aplican individualmente o en combinación en el tratamiento antifúngico de campos, antes de la cosecha, como tales o en formulaciones experimentales adecuadas, en condiciones ambientales favorables para el inicio y el desarrollo de la enfermedad, no siempre han proporcionado resultados satisfactorios, comparables a los obtenidos con formulaciones de productos sintéticos. Estos resultados, no siempre positivos, se pueden atribuir a los siguientes factores:

- a) tasa de supervivencia de los dos microorganismos sobre las superficies vegetales no siempre suficiente para oponerse de manera eficaz a la acción de los patógenos;
- b) escasa compatibilidad entre las dos cepas al aplicarlas en combinación;
- c) aptitud limitada de las dos cepas para el desarrollo de formulaciones con una duración de almacenamiento lo suficientemente larga.

El solicitante ha aislado dos cepas de levadura nuevas, una que pertenece a la especie *Rhodosporidium kratochvilovae* y la otra a la especie *Cryptococcus laurentii*. Las cepas de levadura *Rhodosporidium kratochvilovae* y *Cryptococcus laurentii* se depositaron para fines de patentes, según los procedimientos establecidos por el tratado de Budapest, en la Colección de Levaduras Industriales DBVPG del Departamento de Biología Aplicada, Universidad de Perugia, Borgo XX Giugno 74, I-06121 Perugia (Italia), el 20/12/2009 y 9/5/2011, con los números de depósito 26P y 31P, respectivamente.

Estas dos cepas de levadura nuevas, cuando se ensayaron contra diferentes patógenos fúngicos en diferentes cultivos, no solamente demostraron ser sumamente compatibles y sinérgicas entre sí, sino que también son sorprendentemente mucho más eficaces con respecto a la cepa *Rhodotorula glutinis* codificada LS11 y la cepa *Cryptococcus laurentii* codificada LS28, descritas previamente en el documento WO2008/114304.

La cepa nueva de *R. kratochvilovae* (DBVPG 26P) se aisló de aceitunas, mientras la cepa nueva de *C. laurentii* (DBVPG 31P) se aisló de manzanas.

Las dos cepas de levadura nuevas se obtuvieron por medio del aislamiento selectivo en un medio agarizado artificial (caldo de nutrientes-extracto de levadura-agar dextrosa: NYDA) mediante el uso de la técnica descrita por Wilson [Wilson et al., *Scientia Hort.* (1993) 53: páginas 183-189]. Brevemente, esta técnica prevé la aplicación del agua de lavado obtenida directamente del fruto y/o las hojas *in vivo*, en lesiones artificiales de manzanas a las que posteriormente se les inocularon esporas de patógenos fúngicos. Con las lesiones que en los días posteriores no desarrollan ninguna infección evidente, se efectúa un reaislamiento y una purificación en cultivo de los microorganismos con una probable actividad antagonista y potencialmente responsables de la ausencia de desarrollo de la enfermedad. Los microorganismos potencialmente antagonistas seleccionados se ensayan y caracterizan después adicionalmente por su actividad antifúngica en diferentes especies de plantas de interés agrícola y contra diferentes patógenos. Las cepas consideradas potencialmente antagonistas se tipificaron desde un punto de vista genético-molecular.

Las dos cepas nuevas DBVPG 26P y DBVPG 31P, usadas solas o en una mezcla sinérgica, como tales o preferiblemente en forma de composiciones fitosanitarias adecuadas, han demostrado ser mucho más eficaces que las cepas descritas en la técnica conocida para el control de hongos fitopatógenos (también micotoxigénicos) de cultivos agrícolas importantes, no solamente en aplicaciones poscosecha, sino también en el tratamiento fungicida tradicional de campos durante el desarrollo de los cultivos y hasta antes de la cosecha.

Además, las dos cepas de levadura nuevas, solas o mezcladas, demuestran ser mucho más adecuadas, con respecto a las cepas previas, para obtener preparaciones nuevas que, además de garantizar niveles mayores de eficacia con respecto a los patógenos fúngicos, también micotoxigénicos, tienen una duración de almacenamiento

inusual y más larga.

5 Basándose en los límites de supervivencia no siempre satisfactorios sobre superficies vegetales y la actividad antifúngica mostrada por las cepas de levadura previamente indicadas en la técnica conocida, las cepas nuevas DBVPG 26P y DBVPG 31P sobreviven, y por lo tanto persisten, de manera más eficaz y durante un periodo más largo sobre superficies vegetales intactas o dañadas, y ejercen una actividad antifúngica mayor.

Además, debido a:

- i) la elevada compatibilidad y fuerte sinergia de las dos cepas nuevas cuando se mezclan;
- ii) la elevada compatibilidad de las dos cepas cuando se usan en combinación con diferentes adyuvantes;
- 10 iii) la elevada compatibilidad de las dos cepas cuando se usan en combinación con fungicidas usados habitualmente en agricultura biológica o integrada;
- iv) su duración de almacenamiento más prolongada cuando se formulan solas o mezcladas entre sí;

15 las dos cepas de levadura nuevas son capaces de proporcionar niveles de protección mucho mayores contra ataques fúngicos a campo abierto y durante la poscosecha en cultivos agrícolas diferentes e importantes, comparables con, y a veces mejores que, los que se pueden obtener mediante el uso de la protección química tradicional.

De manera más específica, la sinergia mostrada por las dos cepas nuevas cuando se aplican en una mezcla entre sí se debe a sus características biológicas diferentes y complementarias. Las dos cepas nuevas, de hecho, tienen mecanismos diferentes de acción y adaptación ambiental, y colonizan los vegetales de manera diferente.

20 Además, las cepas nuevas DBVPG 26P y DBVPG 31P producen actividades enzimáticas elevadas, capaces de impedir, por medio de la lisis de los polímeros de las paredes celulares fúngicas, el desarrollo de hongos fitopatógenos, con una actividad mayor por parte de la cepa DBVPG 31P.

Esta última también tiene una resistencia sorprendente al estrés oxidativo generado por sustancias producidas por el tejido vegetal dañado que representa el centro de la infección para muchos hongos fitopatógenos, por lo que tiene una capacidad de colonización mayor de dicho tejido dañado.

25 Incluso si las dos cepas son capaces de desarrollarse en condiciones ambientales diferentes, la cepa DBVPG 26P de *R. kratochvilovae*, con respecto a la cepa DBVPG 31P de *C. laurentii*, coloniza mejor las superficies vegetales intactas, tiene un mejor desarrollo a temperaturas bajas, que muestra una persistencia mayor también en frutos y vegetales almacenados con refrigeración, y tiene una capacidad sorprendente de degradar la micotoxina patulina, mucho más que otros ejemplos indicados en la técnica conocida. La cepa DBVPG 26P, además, representa el primer ejemplo de *Rhodospodium kratochvilovae* que se puede usar como biopesticida.

30 Como ya se ha mencionado, estas dos cepas de levadura nuevas han demostrado ser sorprendentemente más eficaces que las cepas conocidas en la técnica para el control de hongos fitopatógenos que atacan a los principales cultivos agrícolas.

Un objetivo de la presente invención, por lo tanto, se refiere a:

35 - la cepa de levadura *Rhodospodium kratochvilovae* depositada el 20/12/2009 en la Colección de Levaduras Industriales DBVPG, del Dipartimento di Biologia Applicata (Departamento de Biología Aplicada), Universidad de Perugia, Borgo XX Giugno, 74, I-06121 Perugia (Italia) con el número de depósito 26P;

40 - la cepa de levadura *Cryptococcus laurentii* depositada el 09/05/2011 en la Colección de Levaduras Industriales DBVPG, del Dipartimento di Biologia Applicata (Departamento de Biología Aplicada), Universidad de Perugia, Borgo XX Giugno, 74, I-06121 Perugia (Italia) con el número de depósito 31P;

45 Un objetivo adicional de la presente invención se refiere a una mezcla de las dos cepas de levadura *Rhodospodium kratochvilovae* DBVPG 26P y *Cryptococcus laurentii* DBVPG 31P. La aplicación de los dos microorganismos en una mezcla ha demostrado ser, de hecho, especialmente ventajosa para el fin de controlar los hongos fitopatógenos, también micotoxigénicos, de cultivos agrícolas, ya que se ha hallado un efecto sinérgico extremadamente elevado, que se ejerce con una eficacia antifúngica sorprendentemente elevada, mayor que la esperada basándose en la eficacia de las dos levaduras usadas por separado y calculada mediante el uso de las fórmulas de Colby [Colby, "Weeds", 15 (1967), páginas 20-22] y Abbott [Levy et al., "EPPO Bull." 16 (1986), 8, páginas 651-657].

50 Como se mencionó anteriormente, para el uso práctico es preferible utilizar los dos microorganismos, solos o mezclados entre sí, en forma de composiciones fungicidas fitosanitarias adecuadas, lo que representa un aspecto adicional de la presente invención.

Se pueden obtener mediante el secado o la liofilización de la biomasa obtenida de la fermentación de las dos cepas

de levadura, a su vez obtenidas mediante filtración, sedimentación o centrifugación de los caldos de fermentación respectivos.

5 La presente invención, por lo tanto, se refiere además a una composición fungicida caracterizada porque comprende una de las dos cepas de levadura según la presente invención o una mezcla de las mismas, como principio activo, junto con otros adyuvantes y/o excipientes fitofarmacológicamente aceptables.

10 En una realización preferida de la invención, dicha composición fungicida comprende una mezcla sinérgica obtenida mediante la asociación de *Rhodosporidium kratochvilovae*, codificada DBVPG 26P, con *Cryptococcus laurentii*, codificada DBVPG 31P, en proporciones que varían de 80/20 (4:1) a 20/80 (1:4) en cuanto a Unidades Formadoras de Colonias (UFC). La proporción en porcentaje más adecuada entre las dos cepas en la mezcla depende del patógeno a controlar, el ecosistema en el que se tiene que aplicar la mezcla (especie vegetal del cultivo a tratar), el medio en el que se va a usar la mezcla (campo abierto o almacenamiento con refrigeración), además de la fase fenológica del cultivo a tratar.

15 En las composiciones anteriores, la concentración de *Rhodosporidium kratochvilovae* DBVPG 26P, y/o de *Cryptococcus laurentii* codificada DBVPG 31P, puede variar de 5×10^6 UFC/ml (Unidades Formadoras de Colonias = número de células por 1 mililitro de la suspensión de la mezcla) a 1×10^8 UFC/ml; en general oscila de 5×10^7 UFC/ml a 1×10^8 UFC/ml.

Según una realización adicional, dicha composición fungicida se caracteriza porque incluye al menos un ingrediente activo adicional seleccionado de fungicidas, fitorreguladores, antibióticos, herbicidas, acaricidas, insecticidas, fertilizantes, aditivos alimentarios, antioxidantes y/o mezclas de los mismos.

20 Los ejemplos de los fungicidas que se pueden incluir en las composiciones, objetivo de la presente invención, son: acibenzolar, ametocradina, amisulbrom, ampropilfos, anilazina, azaconazol, azoxistrobina, benalaxilo, benalaxilo-M, benomilo, bentiavalicarb, bitertanol, bixafeno, blasticidina-S, boscalid, bromuconazol, bupirinato, butiobato, captafol, captano, carbendazima, carboxina, carpropamida, quinometionato, cloroneb, clorotalonilo, clozolinato, ciazofamida, ciflufenamida, cimoxanilo, ciproconazol, ciprodinilo, debacarb, diclofluanida, diclona, diclobutrazol, diclomezina, dicloran, diclocimet, dietofencarb, difenoconazol, diflumetorim, dimetirimol, dimetomorf, dimoxistrobina, diniconazol, dinocap, dipiritiona, ditalimfos, ditanona, dodemorf, dodina, edifenfos, epoxiconazol, etaconazol, etaboxam, etirimol, etoxiquina, etridiazol, famoxadona, fenamidona, fenaminosulf, fenapanil, fenarimol, fenbuconazol, fenfuram, fenhexamida, fenoxanilo, fenpiclonilo, fenpropidina, fenpropimorf, fentina, ferbam, ferimzona, fluazinam, fludioxonilo, flumetover, flumorf, fluopicolida, fluopiram, fluoroimida, fluotrimazol, fluoxastrobina, fluquinconazol, flusilazol, flusulfamida, flutianilo, flutolanilo, flutriafol, folpet, fosetilo-aluminio, fuberidazol, furalaxilo, furametpir, furconazol, furconazol-cis, guazatina, hexaconazol, himexazol, sulfato de hidroxiquinolona, imazalilo, imibenconazol, iminotadina, ipconazol, iprobenfos, iprodiona, isoprotioloano, iprovalicarb, isopirazam, isotianilo, kasugamicina, kresoxim-metilo, mancopper, mancozeb, mandipropamida, maneb, mebenilo, mepanipirim, mepronilo, meptil, 35 dinocap, metalaxilo, metalaxilo-M, metconazol, metfuroxam, metiram, metominostrobina, metrafenona, metsulfovax, miclobutanilo, natamicina, nicobifeno, nitrotalisopropilo, nuarimol, ofurace, orisastrobina, oxadixilo, oxpoconazol, oxicarboxina, pefurazoato, penconazol, pencicuron, penflufeno, pentaclorofenol y sus sales, pentiopirad, ftalida, picoxistrobina, piperalina, mezcla de Bordeaux, polioxinas, probenazol, procloraz, procimidona, propamocarb, propiconazol, propineb, proquinazid, protiocarb, protioconazol, piracarbolid, piraclostrobina, pirametostrobina, piraoxistrobina, pirazofos, piribencarb, pirifenox, pirimetanilo, piroquilon, piroxifur, quinacetol, quinazamida, 40 piraconazol, quinoxifeno, quintozeno, rabenzazol, hidróxido de cobre, oxiclورو de cobre, óxido cuproso, sulfato de cobre, sedaxano, siltiofam, simeconazol, espiroxamina, estreptomycin, tebuconazol, tetraconazol, tiabendazol, tiadifluor, ticiofeno, tifulzamida, tiofanato, tiofanato-metilo, tiram, tiadinilo, tioximida, tolclofos-metilo, toliifluanida, triadimefon, triadimenol, triarimol, triazbutilo, triazóxido, triciclazol, tridemorf, trifloxistrobina, triflumizol, triforina, triticonazol, uniconazol, uniconazol-P, validamicina, valifenalato, vinclozolina, zineb, ziram, azufre, zoxamida.

45 Las composiciones fungicidas según la presente invención pueden estar en forma de polvos o disoluciones acuosas que, a su vez, se diluyen con cantidades adecuadas de agua para obtener dispersiones que son parcialmente o totalmente insolubles en agua, o disoluciones más diluidas.

Como ya se ha mencionado, las composiciones anteriores se pueden usar de manera eficaz en el tratamiento fungicida, en campo abierto, hasta la cosecha, y también en la poscosecha.

50 En particular, las composiciones que comprenden las cepas de levadura según la invención han demostrado ser extremadamente adecuadas para el control de *Plasmopara viticola* en vides, *Phytophthora infestans* y *Botrytis cinerea* en tomates, *Puccinia recondita*, *Erysiphe (=Blumeria) graminis*, *Helminthosporium teres*, *Septoria nodorum* y género *Fusarium* en cereales, en el control de *Phakopsora pachyrhizi* en soja, para controlar *Uromyces appendiculatus* en judías, para controlar *Venturia inaequalis* en manzanos, en el control de *Sphaeroteca fuliginea* en pepinos.

Un aspecto adicional de la presente invención, por lo tanto, se refiere al uso de las cepas individuales o una mezcla de las mismas o composiciones fungicidas que comprenden la cepa *Rhodosporidium kratochvilovae* codificada DBVPG 26P, y/o la cepa *Cryptococcus laurentii* codificada DBVPG 31P, para el control de hongos fitopatógenos,

también micotoxigénicos, de cultivos agrícolas.

La mayor eficacia obtenida con la mezcla de las dos cepas (uso de las cepas en una combinación), como ya se ha especificado, procede de la naturaleza complementaria de:

- i) los mecanismos de acción de las dos cepas;
- 5 ii) las diferentes capacidades de superar las condiciones climatológicas desfavorables (temperaturas altas y bajas con niveles de humedad bajos y altos);
- iii) la capacidad de colonizar superficies vegetales intactas y dañadas.

Los ejemplos de hongos fitopatógenos que se pueden controlar de manera eficaz con las dos cepas descritas, usadas solas o en una mezcla sinérgica, son las que pertenecen al grupo de *Basidiomycetos*, *Ascomycetos*,
 10 *Deuteromycetos* u hongos imperfectos, *Oomicetos*: género *Puccinia*, género *Ustilago*, género *Tilletia*, género *Uromyces*, *Claviceps purpurea*, género *Phakopsora*, género *Rhizoctonia*, *Sclerotium rolfsii*, *Sclerotium cepivorum*,
 15 género *Erysiphe*, género *Sphaerotheca*, género *Podosphaera*, género *Uncinula*, género *Helminthosporium*, género *Rhynchosporium*, género *Pyrenophora*, género *Aspergillus*, género *Botrytis*, género *Monilinia*, género *Sclerotinia*,
 género *Rhizopus*, género *Mucor*, género *Septoria* (género *Mycosphaerella*), género *Phaeosphaeria*, género *Venturia*,
 género *Alternaria*, género *Fusarium*, género *Cercospora*, género *Cladosporium*, género *Phoma*, *Cercospora herpotrichoides*, género *Colletotrichum*, *Pyrenochaeta lycopersici*, *Pyricularia oryzae*, género *Sclerotium*, género *Ascochyta*,
 género *Albugo*, género *Phytophthora*, género *Pythium*, *Plasmopara viticola*, *Thielaviopsis basicola*,
 género *Diaporthe*, género *Peronospora*, *Pseudoperonospora cubensis*, *Bremia lactucae*, género *Penicillium*, género *Cladosporium*,
 género *Stemphylium*, *Leveillula taurica*.

Los cultivos principales que se pueden proteger con los microorganismos de la presente invención comprenden cereales (trigo, cebada, centeno, avena, arroz, maíz, sorgo, etc.), árboles frutales (olivos, manzanos, perales,
 20 albaricoqueros, perales nashi, ciruelos, melocotoneros, almendros, cerezos, caqui, plátanos, vides, fresas, frambuesas, zarzamoras, etc.) cítricos (naranjos, limoneros, mandarinos, mandarinos clementinos, pomelos, etc.)
 25 legumbres (judías, guisantes, lentejas, soja, etc.) cultivos hortícolas (espinaca, lechuga, espárrago, alcachofas, repollo, zanahorias, cebollas, ajo, tomates, patatas, berenjenas, pimientos, hinojo, etc.) cucurbitáceas (calabazas,
 calabacines, pepinos, melones, sandías, etc.), plantas oleaginosas (sojas, girasoles, colzas, cacahuetes, aceite de ricino, cocos, etc.), tabaco, café, té, cacao, remolacha azucarera, caña de azúcar, algodón.

En particular, las cepas de levadura según la invención han demostrado ser extremadamente eficaces en el control de *Plasmopara viticola* en vides, *Phytophthora infestans* y *Botrytis cinerea* en tomates, *Puccinia recondita*, *Erysiphe*
 30 (= *Blumeria*) *graminis*, *Helminthosporium teres*, *Septoria nodorum* y el género *Fusarium* en cereales, en el control de *Phakopsora pachyrhizi* en soja, en el control de *Uromyces appendiculatus* en judías, en el control de *Venturia inaequalis* en manzanos, en el control de *Sphaerotheca fuliginea* en pepinos.

En una realización preferida, dichas cepas se usan en estado seco, liofilizado, congelado, líquido.

La mezcla de levaduras o la composición fungicida que comprende las levaduras según la invención, solas o en
 35 combinación, se formula preferiblemente en forma de un polvo seco, polvo humectable, disolución, dispersión o suspensión.

Un objetivo adicional de la presente invención se refiere a un método para el control de hongos fitopatógenos, también micotoxigénicos, en cultivos agrícolas que consiste en la aplicación precosecha o poscosecha de dosis
 40 eficaces de *Rhodosporidium kratochvilovae* codificada DBVPG 26P, y/o *Cryptococcus laurentii* codificada DBVPG 31P, usadas como tales o formuladas en composiciones fungicidas como se describió anteriormente.

Los ejemplos de hongos fitopatógenos que se pueden controlar y de los cultivos que se pueden proteger con las composiciones anteriores son los indicados anteriormente.

La aplicación de las dos cepas de levadura nuevas, como tales o en forma de composiciones adecuadas, se pueden
 45 efectuar sobre cualquier superficie intacta o dañada de la planta, por ejemplo sobre las hojas, flores, frutos, tallos, yemas, ramas y raíces, o en las semillas antes de la siembra o en la tierra en la que crece la planta.

Los tratamientos en campo abierto, sobre las hojas, flores, frutos, tallos y ramas, en las raíces o en la tierra se pueden llevar a cabo distribuyendo los microorganismos como tales, o las composiciones de los mismos, con los
 medios mecánicos habituales adecuados para la distribución de productos plaguicidas.

Los tratamientos sobre frutos durante la fase poscosecha en almacenes con refrigeración se pueden llevar a cabo
 50 aplicando los microorganismos o las composiciones de los mismos con equipos de distribución usados en la actualidad por los expertos en el campo.

Preferiblemente, la dosis usada en las aplicaciones según el método para el tratamiento fungicida de plantas de la presente invención oscila de 1 a 20 kg por hectárea de composición que contiene la(s) cepa(s) de levadura(s).

Este tratamiento puede ser de naturaleza preventiva, curativa o erradicante.

La cantidad de levadura a aplicar para obtener el efecto deseado puede variar con respecto a diferentes factores tales como: el cultivo a proteger, la etapa fenológica del cultivo, el tipo de patógeno/enfermedad, el grado de infección, las condiciones climáticas, el método de aplicación, la formulación seleccionada.

- 5 Las concentraciones de levadura(s) a usar oscilan preferiblemente de 1×10^6 a 1×10^8 UFC/ml. La concentración depende del cultivo a proteger, el periodo fenológico, el tipo de patógeno/enfermedad a controlar, el grado de infección, las condiciones climáticas, el método de aplicación, la formulación seleccionada.

- 10 La concentración de células de levadura a utilizar es inferior, con respecto a la técnica conocida, cuando se usan las dos levaduras nuevas en una mezcla, gracias a la naturaleza complementaria y a la sinergia que se obtiene de su combinación. Además, la concentración de células de las dos levaduras nuevas a utilizar en la mezcla es inferior con respecto a la técnica conocida, cuando se usan en una combinación con aditivos y/o sustancias activas sintéticas, por lo que se produce, con la misma eficacia fungicida, un ahorro de costes considerable en la producción de la biomasa mediante fermentación.

- 15 La presente invención se describirá a continuación con fines ilustrativos pero no limitantes, según dos realizaciones preferidas, con referencia particular a los ejemplos siguientes.

EJEMPLO 1: *Aislamiento y fermentación de la cepa de Rhodosporidium kratochvilovae DBVPG 26P.*

- 20 La cepa de *Rhodosporidium kratochvilovae* DBVPG 26P se aisló de aceitunas según la técnica descrita por Wilson et al., 1993. Las muestras (50 gr) de aceitunas tomadas de olivos cultivados ecológicamente, cv. Salegna, se introdujeron con tal propósito en matraces de 1000 ml que contenían 500 ml de agua destilada estéril en un agitador rotatorio a 23 °C. Después de 30 minutos, se aplicaron 100 µl de agua de lavado directamente a lesiones artificiales del fruto, que se inocularon posteriormente con esporas de patógenos fúngicos.

- 25 Los días posteriores, a partir de las lesiones en las que no hubo desarrollo de infecciones evidentes, se llevó a cabo el reaislamiento y la purificación en el medio de los microorganismos que tenían una actividad antagonista probable y potencialmente responsable de la ausencia de desarrollo de la enfermedad. Los microorganismos antagonistas potenciales seleccionados se ensayaron adicionalmente después y se caracterizó la actividad antifúngica.

- 30 Para obtener la suspensión del cultivo de la cepa DBVPG 26P de *Rhodosporidium kratochvilovae*, se inocularon matraces de 5 litros que contenían el medio de cultivo NYDB (8 g/l de caldo de nutrientes, 5 g/l de extracto de levadura y 10 g/l de dextrosa) con 100 ml de una suspensión de un cultivo de una noche de la cepa que tenía una concentración conocida (1×10^5 UFC/ml). Los matraces así inoculados se colocaron en un agitador rotatorio a 150 rpm (rev. por minuto) y se incubaron a 23 °C durante 48 horas. Finalmente, los cultivos se centrifugaron y el sedimento del antagonista se resuspendió en una alícuota adecuada de agua destilada estéril para obtener una concentración suficiente del antagonista para fines de aplicación.

EJEMPLO 2: *Aislamiento y fermentación de la cepa de Cryptococcus laurentii codificada DBVPG 31P.*

- 35 La cepa *Cryptococcus laurentii* codificada DBVPG 31P se aisló a partir del fruto de manzanos de cv. Limongella, según la técnica descrita por Wilson et al., 1993, de manera análoga a la que se describe en el Ejemplo 1.

EJEMPLO 3: *Ensayos de eficacia de las cepas de Rhodosporidium kratochvilovae codificada DBVPG 26P y Cryptococcus laurentii codificada DBVPG 31P en el control de Blumeria (Erysiphae) graminis (mildíu polvoriento) en trigo candeal.*

- 40 Para obtener la suspensión de cultivo de las dos cepas DBVPG 26P de *Rhodosporidium kratochvilovae* y DBVPG 31P de *Cryptococcus laurentii*, se inocularon matraces de 5 litros que contenían el medio de cultivo NYDB con 100 ml de un cultivo de una noche de una suspensión de la cepa que tenía una concentración conocida (1×10^5 UFC/ml) preparada previamente. Los matraces así inoculados se colocaron en un agitador rotatorio a 150 rpm (rev. por minuto) y se incubaron a 23 °C durante 48 horas. Finalmente, los cultivos se centrifugaron para recuperar las células antagonistas que se resuspendieron en un volumen adecuado de agua destilada estéril para obtener una concentración de antagonista igual a $1,5-5 \times 10^6$ UFC/ml.

- 45 Los dos microorganismos se ensayaron en un cultivo de trigo candeal contra *Blumeria graminis* y se aplicaron individualmente y en combinación, usando como comparación (con las mismas concentraciones) las cepas LS11 y LS28 descritas en el documento WO2008/114304.

- 50 Las suspensiones de los antagonistas se aplicaron sobre la superficie foliar del trigo con un atomizador de precisión (presión de funcionamiento de 4 bares), pulverizando el equivalente de 400 l/ha. Los experimentos se llevaron a cabo según un esquema de bloques totalmente aleatorizados en los que cada hipótesis previó 5 réplicas, y cada réplica estuvo representada por parcelas de 100 m² (10 x 10 m). Los resultados de actividad, expresada como el % de reducción de mildíu polvoriento de trigo candeal con respecto a la referencia sin tratar (aplicación de agua

solamente), se informan en la Tabla 1. Esta tabla indica la actividad de las dos cepas de levadura usadas solas o combinadas entre sí (DBVPG 26P + DBVPG 31P; LS11 + LS28).

Para estudiar los efectos sinérgicos, se ha usado:

a) la fórmula de Colby: $A_t = A_A + A_B - A_A \times A_B / 100$, en la que:

5 A_t es la actividad teóricamente esperada para la mezcla de los dos componentes A + B a una dosis $D_A + D_B$;

A_A es la actividad detectada para el componente A a la dosis D_A ;

A_B es la actividad detectada para el componente B a la dosis D_B ;

b) la actividad aditiva: $A_{ad} = A_A + A_B$.

10 Si la actividad detectada para la mezcla (A_{AB}) es mayor que la actividad teórica calculada según Colby, y la actividad aditiva, definitivamente existe un efecto sinérgico, que se hace más intenso con un incremento del factor de sinergia $SF = A_{AB} : A_t$.

Tabla 1. - Actividad de las cepas de levadura DBVPG 26P, DBVPG 31P, LS11, LS28 y las combinaciones de las mismas en el control de *Blumeria graminis*

Levadura	Actividad a las dosis: 5x10 ⁶ UFC/ml 1,5x10 ⁶ UFC/ml	Actividad teórica A_t (SF)	Actividad aditiva A_{ad}
DBVPG 26P	80	-	-
	33	-	-
LS11	50	-	-
	15	-	-
DBVPG 31P	90	-	-
	40	-	-
LS28	65	-	-
	22	-	-
DBVPG 26P+ DBVPG 31P (1,5+1,5)x10 ⁶ UFC/ml	90	59,8 (1,50)	73
LS11+LS28 (1,5+1,5)x10 ⁶ UFC/ml	40	33,7 (1,18)	37

15 Brevemente, los resultados demostraron lo siguiente:

- la cepa DBVPG 26P de *Rhodosporidium kratochvilovae* es mucho más eficaz que la cepa de *Rhodotorula glutinis* codificada LS11;

- la cepa DBVPG 31P de *Cryptococcus laurentii* es más eficaz que la cepa codificada LS28;

20 - la combinación de las dos cepas DBVPG 26P + DBVPG 31P, ambas a una dosis de 1,5x10⁶ UFC/ml, es más eficaz y tiene un efecto sinérgico significativamente mayor con respecto a la combinación LS11 + LS28 (descrita en el documento WO2008/114304), ambas a una dosis de 1,5x10⁶ UFC/ml.

25 Además, los resultados relacionados con los experimentos efectuados para verificar la tasa de degradación de la micotoxina patulina provocada por los agentes de control biológico, revelaron sorprendentemente que la cepa aislada nueva DBVPG 26P de *Rhodosporidium kratochvilovae* funciona a nivel de la degradación de micotoxinas igual a aproximadamente el doble con respecto a la observada para la cepa aislada LS11 de *Rhodotorula glutinis* indicada en el documento WO2008/114304.

REIVINDICACIONES

1. Una cepa de levadura que pertenece a la especie *Rhodosporidium kratochvilovae* que tiene el número de depósito DBVPG 26P.
- 5 2. Una cepa de levadura que pertenece a la especie *Cryptococcus laurentii* que tiene el número de depósito DBVPG 31P.
3. Una mezcla que comprende o que consiste en las cepas de levadura definidas según las reivindicaciones 1 y 2.
4. Una composición fungicida caracterizada porque comprende una cepa de levadura según la reivindicación 1 ó 2 o una mezcla de las mismas como se definió en la reivindicación 3 como ingrediente activo, junto con otros adyuvantes y/o excipientes fitofarmacéuticamente aceptables.
- 10 5. Una composición fungicida según la reivindicación 4, en la que dichas cepas, cuando están presentes en una mezcla, están en una proporción mutua que comprende entre 4:1 y 1:4 en cuanto a Unidades Formadoras de Colonias (UFC).
- 15 6. Una composición fungicida según cualquiera de las reivindicaciones 4-5, en la que dichas cepas están presentes a una concentración comprendida entre 5×10^6 UFC/ml y 1×10^8 UFC/ml, preferiblemente comprendida entre 5×10^7 UFC/ml y 1×10^8 UFC/ml.
7. Una composición según cualquiera de las reivindicaciones 4-6, caracterizada porque comprende al menos un principio activo adicional seleccionado de fungicida, fitoregulator, antibiótico, herbicida, insecticida, acaricida, fertilizante, aditivo alimentario, antioxidante y/o mezclas de los mismos.
- 20 8. El uso de una cepa de levadura según la reivindicación 1 ó 2 o de la mezcla según la reivindicación 3, o la composición según cualquiera de las reivindicaciones 4-7, como fungicida para controlar hongos fitopatógenos, también micotoxigénicos, en cultivos agrícolas.
- 25 9. El uso según la reivindicación 8, en el que dichos hongos fitopatógenos, también micotoxigénicos, se seleccionan del grupo que consiste en *Basidiomycetos*, *Ascomycetos*, *Deuteromycetos* u hongos imperfectos, *Oomicetos* tales como el género *Puccinia*, género *Ustilago*, género *Tilletia*, género *Uromyces*, *Claviceps purpurea*, género *Phakopsora*, género *Rhizoctonia*, *Sclerotium rolfisii*, *Sclerotium cepivorum*, género *Erysiphe*, género *Sphaerotheca*, género *Podosphaera*, género *Uncinula*, género *Helminthosporium*, género *Rhynchosporium*, género *Pyrenophora*, género *Aspergillus*, género *Botrytis*, género *Monilinia*, género *Sclerotinia*, género *Rhizopus*, género *Mucor*, género *Septoria* (genero *Mycosphaerella*), género *Phaeosphaeria*, género *Venturia*, género *Alternaria*, género *Fusarium*, género *Cercospora*, género *Cladosporium*, género *Phoma*, *Cercospora herpotrichoides*, género *Colletotrichum*, *Pyrenochaeta lycopersici*, *Pyricularia oryzae*, género *Sclerotium*, género *Ascochyta*, género *Albugo*, género *Phytophthora*, género *Pythium*, *Plasmopara viticola*, *Thielaviopsis basicola*, género *Diaporthe*, género *Peronospora*, *Pseudoperonospora cubensis*, *Bremia lactucae*, género *Penicillium*, género *Cladosporium*, género *Stemphylium*, *Leveillula taurica*.
- 30 10. El uso según cualquiera de las reivindicaciones 8-9, en el que dichos cultivos agrícolas se seleccionan del grupo que consiste en cereales, frutos, cítricos, leguminosas, cultivos hortícolas, cucurbitáceas, plantas oleaginosas, tabaco, café, té, cacao, remolacha azucarera, caña de azúcar, algodón.
- 35 11. El uso según cualquiera de las reivindicaciones 8-10, caracterizado porque las cepas están en estado seco, liofilizado, congelado, líquido.
- 40 12. El uso según cualquiera de las reivindicaciones 8-11, caracterizado porque la mezcla o la composición se formula en forma de polvo seco, polvo humectable, disolución, dispersión o suspensión.
- 45 13. Un método para el control de hongos fitopatógenos en cultivos agrícolas mediante la aplicación precosecha o poscosecha de una cepa de levadura como se definió según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, o de una mezcla de las mismas como se definió según la reivindicación 3, o una composición como se definió según cualquiera de las reivindicaciones 4-7, como fungicida para el control de hongos fitopatógenos, también micotoxigénicos, en cultivos agrícolas.
- 50 14. Un método según la reivindicación 13, caracterizado porque dicha aplicación se lleva a cabo sobre una superficie dañada o intacta de la planta seleccionada de frutos, hojas, flores, tallos, yemas, ramas y raíces, en las semillas antes de la siembra, o en la tierra en la que está creciendo la planta.
15. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 13-14, en el que la dosis empleada está comprendida entre 1 y 20 kg por hectárea de composición que contiene la cepa de levadura o las cepas de levadura.