

Titolo: PREPARAZIONE E APPLICAZIONE DI ESTRATTI DI COLTURE DELLA MICROALGA *DUNALIELLA* COME STIMOLATORI DELLA CRESCITA DELLE PIANTE

Riassunto: L'invenzione riguarda un metodo per preparare estratti da colture della microalga *Dunaliella*, che hanno un effetto sulla crescita e lo sviluppo delle piante in termini di induzione nell'aumento del numero di radici laterali. Questo effetto è dovuto ad un'attività auxino-simile degli estratti di colture di microalghe ed è utile nel settore industriale dell'agricoltura ed in particolare nella produzione di nuovi prodotti biostimolanti non sintetici. L'applicazione degli estratti è di grande impatto verso l'utente perché il prodotto finale non deriva da un processo di sintesi chimica e non richiede il trattamento con agenti chimici, ma solo un processo fisico.

15

20

25

30

5

10

25

30

Secondo la classificazione convenzionale, ci sono cinque gruppi di fitormoni: auxine, gibberelline, citochinine, etilene e acido abscissico (Dörffling, 1982).

Molti microrganismi associati alle piante sono essi stessi in grado di sintetizzare fitormoni, che sono necessari come mediatori nelle comunicazioni tra la pianta ospite e la sua microflora. La capacità
 5 dei microrganismi di sintetizzare fitormoni può essere vista, innanzitutto, come segnale della loro patogenicità, in quanto molti agenti patogeni producono regolatori della crescita in quantità superiore ai livelli necessari per le piante. L'iper-sintesi di fitormoni da parte dei microrganismi patogeni sconvolge l'equilibrio ormonale delle piante, provocando la comparsa di una varietà di malattie, tra cui la formazione di galle, la fumaggine, l'ernia e l'essiccamento vascolare (Shimada et
 10 al., 2000; Chung et al., 2003; Yürekli et al., 2003). D'altra parte, alcuni microrganismi a vita libera (cioè, quelli che non formano alcuna associazione con piante nel corso del loro ciclo di vita) sono anche capaci di sintetizzare fitormoni (Tien et al., 1979; Bianchi, 1987; Mishke, 1988; Cacciari et al., 1989; Kameneva e Muronets, 1999; Kravchenko et al., 2004).

Oltre ai fitormoni naturali, esistono sul mercato alcuni composti sintetici o analoghi chimici, simili
 15 ai fitormoni naturali in struttura e funzione, che vengono anch'essi utilizzati in agricoltura. Essi possono influire sui processi vitali delle piante, distruggere le parti indesiderate delle piante, o controllare o impedire la crescita indesiderata di alcuni organismi vegetali. Tuttavia, i fitormoni sintetici, oltre ad essere più costosi rispetto ai prodotti naturali, pongono seri problemi legati all'inquinamento ambientale se utilizzati in agricoltura. Nel corso degli anni la sempre maggiore
 20 attenzione all'inquinamento ambientale ha portato allo sviluppo di programmi di ricerca e sperimentazioni volti a limitare il significativo deterioramento dell'ecosistema causati dall'intervento umano e a sfruttare l'utilizzo pratico di microrganismi che producono stimolatori della crescita delle piante. Tra i microrganismi, una particolare attenzione è stata rivolta soprattutto alle microalghe. Tra gli eucarioti fototrofici, la capacità di sintetizzare acido indolo-3-acetico
 25 (IAA), cioè l'auxina che presenta la maggiore attività nelle piante, è stata trovata in rappresentanti dei generi *Chlorella*, *Dunaliella* (Nazarenko e Semenenko, 1992) e *Fucus* (Basu et al., 2002). La nostra attenzione è rivolta in particolar modo a microalghe del genere *Dunaliella*, che hanno già trovato un largo impiego nell'industria alimentare e dell'acquacoltura.

Ci sono diversi processi attualmente utilizzati che coinvolgono biomasse microalgali per il
 30 trattamento di colture agricole. Ad esempio, il brevetto RO Pat. No. 128888 di Sanda et al. (2012) descrive una composizione per il trattamento di colture agricole, che stimola la crescita delle piante, migliora la resistenza delle piante allo stress, in particolare allo stress idrico e, nel caso di aggiunta di amminoacidi chelati in selenio, migliora la risposta agli stress abiotici e/o bio-fortifica il raccolto. Inoltre, il brevetto in questione descrive un procedimento per preparare la suddetta composizione da

biomasse microalgali con l'aggiunta di un composto di selenio. La composizione rivendicata comprende 79.3 ... 83.4 parti di idrolizzato proteico di alghe contenenti 5.9 ... 6.3 parti di prolina o 55.8 ... 58.7 parti di idrolizzato proteico di alghe, rispettivamente, contenente 4.2 ... 4.4 parti di prolina e 23.5 ... 24.7 parti di idrolizzato proteico di alghe, in cui il selenio è chelato, per contenere, quando è integrato con il selenio chelato, 1.2 ... 1.25 parti di selenio, 2 ... 2.1 parti di betaine totali, 0.1 ... 0.11 parti di citochinine, un'equivalente attività chinetina, 8.2 ... 8.7 parti di carboidrati e acqua per il resto fino a 100 unità. Il procedimento rivendicato consiste nella lisi della biomassa microalgale mediante un trattamento combinato, mescolando idrolasi microbiche e sottoponendo a trattamento ad ultrasuoni, concentrando osmo-protettori e fitormoni dall'estratto mediante ultrafiltrazione tangenziale, idrolizzando le proteine con proteasi, chelando il selenio in una parte dell'idrolizzato proteico, quando è integrato con il selenio, miscelando il concentrato di osmo-protettori e fitormoni con l'idrolizzato proteico, eventualmente anche con il selenio integrato idrolizzato, ed essiccando la miscela da spruzzare.

Il brevetto CN Pat. No. 101805743 di Li et al. (2010) descrive un metodo di preparazione di *Dunaliella salina* transgenica per migliorare l'efficienza della fotosintesi, caratterizzato dal fatto di comprendere le seguenti fasi: colonizzazione o ri-formazione di geni legati alla fissazione del carbonio e alla fotosintesi in un organismo autotrofo fotosintetico; trasferimento dei geni in un genoma cloroplastico o nucleare di *D. salina* per l'espressione; coltura successiva e selettiva; e infine, ottenimento di un ceppo transgenico stabile di *D. salina*. Introducendo un'espressione indipendente o combinata di geni ad alta efficienza relativi alla fissazione del carbonio e alla fotosintesi, l'invenzione migliora la concentrazione e la velocità di trasferimento di CO₂ in *D. salina* transgenica e assicura che la capacità di *D. salina* transgenica nell'utilizzare la CO₂ per la fotosintesi può essere migliorata, promuovendo così la crescita autotrofica di *D. salina* transgenica, accelerando e aumentando l'accumulo di biomassa come peso vivo di cellule di *D. salina* e soddisfacendo il requisito sulla produzione in scala di biodiesel e loro metaboliti nonché di prodotti di ingegneria genetica.

Il brevetto GB Pat. No. 8728044 di Mark (1987) saggia potenziali composti agrochimici attraverso l'esposizione ad una coltura biologica *in vitro* in grado di produrre un materiale indicatore rilevabile in risposta ad un cambiamento nel metabolismo della coltura biologica. Tipicamente, effetti rilevabili sarebbero la produzione di metaboliti secondari rilevabili nel mezzo di crescita, ma possono comprendere anche morte delle colture a causa di interferenze fatali con il metabolismo. La coltura può essere costituita, ad esempio, da una coltura algale, da una sospensione di cellule vegetali o da una coltura di tessuti vegetali. Sono particolarmente preferite alcune specie carotenogeniche, che sono normalmente di colore verde ma producono metaboliti secondari di

colore giallo, arancione o rosso in determinate circostanze e si trasformano in colore bianco alla loro morte: tra queste le alghe come le specie di *Dunaliella*.

DESCRIZIONE DETTAGLIATA DELL'INVENZIONE

5

La presente invenzione descrive un metodo per la preparazione di estratti di alghe unicellulari autotrofiche con proprietà stimolanti sulla crescita e lo sviluppo delle piante. Un diagramma schematico del processo è mostrato nella Figura 1. Il materiale di partenza del processo è costituito da una coltura di microalghe in cui il microrganismo è tenuto vivo e in attiva proliferazione. Le
 10 colture di alghe unicellulari sono mantenute in acqua di mare artificiale preparata secondo la Formula di Allen (Tabella 1).

Tabella 1. Formula di Allen.

Componente	Concentrazione (g/L)	
NaCl	28.13	15
KCl	0.77	
CaCl ₂	1.20	
MgCl ₂	2.55	
MgSO ₄	3.50	
NaHCO ₃	0.11	

Soluzione A *

20

Componente	Concentrazione (g/100 mL)
KNO ₃	20.20

Soluzione B *

Componente	Concentrazione (g o mL/100 mL)	
Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	4.00	25
CaCl ₂ · 12H ₂ O	4.00	
FeCl ₃	2.00	
HCl	2.00	

* Per un litro di acqua di mare artificiale preparata secondo la Formula di Allen, aggiungere 2 mL di soluzione A e 1 mL di soluzione B.

30

Una volta preparata l'acqua di mare artificiale, portarla ad ebollizione e lasciare depositare il precipitato, poi filtrare con carta da filtro. Infine, concludere la preparazione dell'acqua di mare
 35 artificiale mediante sterilizzazione con un ciclo di autoclave per 15 minuti a 121 °C.

Successivamente, l'acqua di mare artificiale preparata secondo la Formula di Allen viene arricchita con la Formula di Walne (1966) (Tabella 2).

Tabella 2. Formula di Walne.

Stock A *	
Componente	Concentrazione (g/L)
FeCl ₃ · 6H ₂ O	1.30
MnCl ₂ · 4H ₂ O	0.36
H ₃ BO ₃	33.60
EDTA	45.00
NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	20.00
NaNO ₃	100.00

* Per un litro di Stock A aggiungere 1 mL di una soluzione di metalli (Trace metal solution) preparata come descritto di seguito.

Trace metal solution	
Componente	Concentrazione g/100 mL
ZnCl ₂	2.10
CoCl ₂ · 6H ₂ O	2.00
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ · 4H ₂ O	0.90
CuSO ₄ · 5H ₂ O	2.00

Stock B	
Componente	Concentrazione (mg/100mL)
Cyanocobalamina (B ₁₂)	10.00
Thiamina (B ₁)	200.00

In particolare, per ogni litro di acqua di mare artificiale aggiungere 1 mL di Stock A e 0.1 mL di Stock B.

Le colture sono mantenute ad una temperatura costante tra 15 e 30 °C in un regime di luce/buio di 12 ore all'interno di sistema incubatore a luce diurna (lampada Osram Daylight, 36W/10, Osram, Germania) e luce fluorescente (lampada Osram Fluora, 40W/77, Osram).

Il metodo per preparare estratti da colture microalgali coinvolge un primo passo volto ad ottenere un pellet cellulare. Più in dettaglio, la raccolta della biomassa algale avviene tramite centrifugazione della coltura (1.0×10^9 cellule per litro) ad una velocità compresa tra 400 e 900 gravità per un tempo compreso tra 1 minuto e 30 secondi e 3 minuti e 30 secondi. Il pellet cellulare viene quindi trasferito con una pipetta Pasteur in un tubo Falcon. Se non vi è la possibilità di trattare immediatamente la biomassa cellulare, questa può essere conservata fino al momento dell'uso ad una temperatura compresa tra - 30 e - 80 °C. Al momento dell'uso, la biomassa raccolta viene

trasferita in un mortaio e frantumata con l'ausilio di un pestello e l'aggiunta di 2 - 20 ml di azoto liquido. Si continua a frantumare la biomassa cellulare fino ad ottenere uno stato liquido; sulla superficie della biomassa liquida dovrebbe apparire uno strato di schiuma di colore verde chiaro. Con l'ausilio di una pipetta Pasteur la biomassa cellulare viene trasferita in una provetta Eppendorf
 5 da 2 mL e centrifugata ad una velocità compresa tra 2000 e 13000 gravità per un tempo compreso tra 3 e 7 minuti. Raccogliere il supernatante di colore chiaro e trasferirlo in una provetta sterile. Il supernatante raccolto dalla centrifuga può essere conservato a temperature comprese tra - 30 e - 80 °C. Prima dell'uso, il supernatante deve essere lasciato scongelare in ghiaccio. Il supernatante risultante dalla centrifugazione può seguire due diversi percorsi alternativi: una fase di filtrazione
 10 (procedura A) o una fase di estrazione liquido-liquido (procedura B) .

- Procedura A.

Collocare un filtro da 0.2 µm sul beccuccio di una siringa senza ago con un volume compreso tra 10 e 20 ml. Poi trasferire un volume appropriato del supernatante nella siringa e con l'aiuto dello stantuffo della siringa far passare il supernatante attraverso il filtro. Il filtrato viene conservato a
 15 temperature comprese tra - 30 e - 80 °C.

- Procedura B.

La fase di estrazione liquido-liquido rappresenta il passaggio di un soluto da un solvente ad un solvente differente. Si tratta di un metodo di laboratorio utilizzato per ottenere composti puri da fonti vegetali o animali o semplicemente per purificare sostanze impure. Vengono utilizzati due tipi
 20 di solventi con diversi livelli di polarità e miscibilità reciproca: quelli più densi, quindi più pesanti dell'acqua, come il diclorometano, il tetracloruro di carbonio ed il cloroformio, e quelli meno densi e quindi più leggeri dell'acqua, come l'etere di petrolio, l'acetato di etile, il benzene ed il dietil etere. Quando i due liquidi sono inseriti in un imbuto o in un pallone separatore, le due fasi vengono separate mediante agitazione manuale (una fase acquosa ed una fase organica contenente la
 25 sostanza estratta) e raggiungono un equilibrio tra la concentrazione del soluto nel primo solvente e quella nel secondo solvente. Distillando la fase pura contenente il soluto desiderato, la fase solida rimarrà sul fondo mentre il solvente distillato può essere riciclato.

Nella procedura usata in questo processo, procedere come descritto di seguito. Misurare il pH del supernatante e aggiungere HCl 37% per portare il pH a valori compresi tra 2.0 e 4.0. Quindi
 30 trasferire il supernatante in un pallone separatore e aggiungere un volume in rapporto 1:1 di etere o acetato di etile. Rimuovere la fase inferiore che si è formata e trasferire il supernatante in tubi che devono essere centrifugati ad una velocità compresa tra 8000 e 13000 gravità per un tempo compreso tra 30 secondi e 3 minuti. Raccogliere il supernatante e trasferirlo in una ampolla di vetro che deve essere immersa in un bagno termostato ad una temperatura compresa tra 15 e 30 °C.

Collegare l'ampolla di vetro ad un rotore in modo da farla ruotare ad una velocità compresa tra 30 e 60 giri/minuto. Attraverso l'uso di una pompa a vuoto collegata all'ampolla di vetro, assicurarsi che il liquido all'interno evapori completamente, lasciando un deposito di materiale sul fondo e sui bordi dell'ampolla di vetro. Diluire il sedimento presente nell'ampolla di vetro con una quantità di metanolo compresa tra 2 e 5% del volume del supernatante e conservare a temperature comprese tra - 30 e - 80 °C.

ESEMPIO 1. APPLICAZIONE DI ESTRATTI DI COLTURE DELLA MICROALGA *DUNALIELLA* IN PIANTINE DI *ARABIDOPSIS THALIANA*

10 Seguendo la procedura generale per la preparazione degli estratti di microalghe descritta nella sezione precedente, questo esempio descrive un'applicazione degli estratti ottenuti sulla crescita e lo sviluppo di piantine di *Arabidopsis thaliana*. Le microalghe selezionate in questo esempio applicativo appartengono alle specie *D. salina* e *D. tertiolecta*. Partendo da semi sterili, le piante
15 vengono coltivate su un terreno di crescita appropriato, come descritto di seguito, distribuito in piastre Petri. L'esempio riguarda l'uso di estratti derivati sia dalla procedura di filtrazione (procedura A) che dalla procedura di estrazione liquido-liquido (procedura B). Per la preparazione del mezzo di crescita, pesare e sciogliere in 500 mL di acqua deionizzata 4.5 g di agar, 2.15 g di mezzo Murashige e Skoog (MS) e 2.5 g di saccarosio. Sterilizzare la soluzione mediante un ciclo di
20 autoclave per 15 minuti a 121 °C. Suddividere il terreno di coltura così preparato in aliquote da 20 mL. Aggiungere a ciascuna aliquota di 20 ml di terreno di coltura così preparato un appropriato volume dell'estratto e distribuire uniformemente in piastre Petri. Nel caso in cui l'estratto utilizzato sia derivato dalla procedura A (fase di filtrazione) aggiungere 2 - 5% del prodotto, mentre nel caso in cui l'estratto utilizzato sia derivato dalla procedura B (fase di estrazione liquido - liquido)
25 aggiungere 0.002 - 0.010% del prodotto. Una volta che il mezzo di crescita si è solidificato, trasferire i semi sterili delle piantine lungo il diametro di ogni capsula Petri lasciando tra un seme e l'altro adiacente uno spazio variabile tra 0.5 e 1.5 cm. Chiudere ogni capsula Petri con un coperchio e sigillare con parafilm. Quindi mettere le capsule Petri in posizione verticale all'interno di un incubatore a temperatura compresa tra 18 e 25 °C con cicli di luce/buio di 12 ore per 21 giorni .
30 Come si può vedere dai risultati mostrati nella Figura 2, le piantine di *A. thaliana* cresciute in terreno trattato con estratti di colture della microalga *Dunaliella* (Fig. 2A) hanno mostrato un fenotipo marcatamente differente rispetto al controllo (piantine coltivate su terreno non addizionato con estratti di microalghe) (Fig. 2B). La differenza principale e più evidente è rappresentata da un considerevole e chiaramente rilevabile aumento del numero di radici laterali.

Il fenotipo osservato dopo il trattamento delle piantine di *A. thaliana* con estratti di *Dunaliella* è compatibile con effetti dovuti a fitormoni appartenenti alla classe delle auxine. Sulla base di questa ipotesi, allora, può essere suggerita una possibile presenza di molecole auxino-simili negli estratti di *Dunaliella*. Al fine di confermare o meno questa ipotesi, è stata condotta un'analisi molecolare per determinare una possibile induzione di specifici geni coinvolti nella via metabolica delle auxine dopo trattamento delle piantine di *A. thaliana* con estratti di *Dunaliella*. A questo scopo, è stato utilizzata la tecnica della Real-Time PCR. Il gene bersaglio che è stato scelto è quello dell'acido indolo-3-acetico (IAA), l'auxina che presenta la maggiore attività nelle piante, utilizzando come gene "house-keeping" il gene codificante per l'ubiquitina.

Come si può vedere dalla Figura 3, si osserva un livello soddisfacente di induzione del gene IAA nei confronti del controllo in piantine trattate con estratti di entrambe le microalghe.

DESCRIZIONE DELLE FIGURE

Figura 1. Rappresentazione schematica del processo per preparare estratti da colture di microalga *Dunaliella*, per uso come stimolatori della crescita delle piante.

Figura 2. Piantine di *Arabidopsis thaliana* cresciute su terreno in piastre Petri. **A.** Terreno di crescita addizionato con estratti di colture microalgali di *Dunaliella*. **B.** Controllo (terreno di crescita non addizionato con estratti di microalghe).

Figura 3. livelli di espressione del gene IAA in piantine di *Arabidopsis thaliana* dopo trattamento con estratti di colture microalgali di *Dunaliella*.

RIVENDICAZIONI

1. Un metodo comprendente:

- Il mantenimento in coltura delle microalghe in un mezzo appropriato;
- Il mantenimento in coltura delle microalghe in condizioni adeguate di temperatura e di luce;
- La centrifugazione delle biomasse microalgali liquide per aumentare il contenuto solido delle biomasse algali liquide tra circa il 10 e il 40%, per ottenere una biomassa algale centrifugata;
- Lo stoccaggio della biomassa algale;
- La lisi cellulare mediante frantumazione meccanica della biomassa algale, al fine di ottenere gli estratti cellulari grezzi;

- La centrifugazione del lisato cellulare per ottenere nel supernatante gli estratti finali contenenti l'attività biologica;
 - La fase di filtrazione degli estratti;
 - La miscelazione della biomassa algale centrifugata con un solvente per ottenere una miscela;
 - 5 - La separazione del solvente dalla miscela in modo da ottenere un deposito di materiale;
 - La diluizione del sedimento con un solvente anfifilico;
 - L'applicazione di prodotti di microalghe in piantine di *Arabidopsis thaliana*.
- 2.** Il procedimento secondo la rivendicazione **1**, in cui le microalghe sono autotrofiche.
- 3.** Il procedimento secondo la rivendicazione **1**, in cui le microalghe sono scelte nel genere
- 10 *Dunaliella* e in particolare nelle specie *D. salina* e *D. tertiolecta*.
- 4.** Il procedimento secondo la rivendicazione **1**, in cui il mezzo di coltura delle microalghe è costituita da acqua di mare artificiale preparata secondo la Formula di Allen (Tabella 1) e arricchita con la Formula di Walne (1966) (Tabella 2).
- 5.** Il procedimento secondo la rivendicazione **1**, in cui la temperatura delle colture microalgali è
- 15 compresa tra 15 e 30 °C.
- 6.** Il procedimento secondo la rivendicazione **1**, in cui le colture di microalghe vengono mantenute in un regime di luce/buio di 12 ore all'interno di un sistema incubatore a luce diurna (lampada Osram Daylight, 36W/10, Osram, Germania) e fluorescente (lampada Osram Fluora, 40W/77, Osram).
- 20 **7.** Il procedimento secondo la rivendicazione **1**, in cui la biomassa algale liquida viene centrifugata, per aumentare il contenuto dei solidi a circa il 30%, ad una velocità compresa tra 400 e 900 gravità per un tempo compreso tra 1 minuto e 30 secondi e 3 minuti e 30 secondi.
- 8.** Il procedimento secondo la rivendicazione **1**, in cui la biomassa viene conservata fino al suo utilizzo ad una temperatura compresa tra - 30 e - 80 °C.
- 25 **9.** Il procedimento secondo la rivendicazione **1**, in cui la lisi cellulare mediante frantumazione meccanica della biomassa algale viene eseguita trasferendo la biomassa algale in un mortaio e frantumata con un pestello aggiungendo da 2 a 20 mL di azoto liquido.
- 10.** Il procedimento secondo la rivendicazione **1**, in cui il lisato cellulare viene centrifugato, per ottenere nel supernatante gli estratti finali contenenti l'attività biologica, ad una velocità compresa
- 30 tra 2000 e 13000 gravità per un tempo compreso tra 3 e 7 minuti.
- 11.** Il procedimento secondo la rivendicazione **10**, in cui il supernatante raccolto dalla centrifuga viene conservato a temperature comprese tra - 30 e - 80 °C.

- 12.** Il procedimento secondo la rivendicazione **1**, in cui la fase di filtrazione degli estratti viene eseguita per mezzo di filtri da 0.2 μm (Sartolab P20 18052) e con una siringa senza ago con un volume compreso tra 10 e 20 mL.
- 13.** Il procedimento secondo la rivendicazione **12**, in cui il filtrato viene conservato a temperature comprese tra - 30 e - 80 °C.
- 14.** Il procedimento secondo la rivendicazione **10**, in cui il pH del supernatante raccolto dalla centrifuga viene portato a valori compresi tra 2.0 e 4.0 con HCl 37%.
- 15.** Il procedimento secondo la rivendicazione **1**, in cui il solvente utilizzato per la miscelazione della biomassa algale centrifugata in modo da ottenere una miscela viene scelto tra acetato di etere e acetato di etile.
- 16.** Il procedimento secondo la rivendicazione **15**, in cui la biomassa algale centrifugata viene miscelata al solvente in un rapporto volumetrico di 1:1.
- 17.** Il procedimento secondo la rivendicazione **1**, in cui il solvente viene separato dalla miscela tramite centrifugazione ad una velocità compresa tra 8000 e 13000 gravità per un tempo compreso tra 30 secondi e 3 minuti.
- 18.** Il procedimento secondo la rivendicazione **17**, in cui il supernatante viene trasferito in una ampolla di vetro immersa in un bagno termostato ad una temperatura compresa tra 15 e 30 °C.
- 19.** Il procedimento secondo la rivendicazione **17**, in cui l'ampolla di vetro viene collegata ad un rotore in modo da farla ruotare ad una velocità compresa tra 30 e 60 giri/minuto.
- 20.** Il procedimento secondo la rivendicazione **17**, in cui il liquido all'interno dell'ampolla di vetro viene fatto evaporare completamente, lasciando un deposito di materiale sul fondo e sui bordi dell'ampolla di vetro, attraverso l'uso di una pompa a vuoto collegata all'ampolla di vetro.
- 21.** Il procedimento secondo la rivendicazione **1**, in cui il solvente anfifilico utilizzato per diluire il sedimento presente nell'ampolla di vetro è il metanolo.
- 22.** Il procedimento secondo la rivendicazione **21**, in cui la quantità di solvente è compresa tra il 2 e il 5% del volume del supernatante.
- 23.** Il procedimento secondo la rivendicazione **21**, in cui il sedimento diluito è conservato a temperature comprese tra - 30 e - 80 °C.
- 24.** Il procedimento secondo la rivendicazione **1**, in cui l'applicazione dei prodotti di microalghe in piantine di *Arabidopsis thaliana* viene effettuata utilizzando semi sterili della pianta.
- 25.** Il procedimento secondo la rivendicazione **24**, in cui il terreno di crescita (500 mL) per piantine di *A. thaliana* è composto da 4.5 g di agar, 2.15 g di mezzo Murashige e Skoog (MS) e 2.5 g di saccarosio.

26. Il procedimento secondo la rivendicazione **24**, in cui il terreno di crescita per piantine di *A. thaliana* viene sterilizzato mediante un ciclo di autoclave per 15 minuti a 121 °C.

27. Il procedimento secondo la rivendicazione **24**, in cui le quantità dei prodotti di microalghe da aggiungere al terreno di crescita per piantine di *A. thaliana* sono 2 - 5% e 0.002 - 0.010%, a seconda che gli estratti utilizzati siano derivati dalla procedura A (fase di filtrazione) o dalla procedura B (fase di estrazione liquido-liquido), rispettivamente.

28. Il procedimento secondo la rivendicazione **24**, in cui la semina dei semi sterili viene eseguita nel terreno di crescita solidificato all'interno di capsule Petri, lasciando tra un seme e l'altro adiacente uno spazio variabile tra 0.5 e 1.5 cm.

29. Il procedimento secondo la rivendicazione **24**, in cui la crescita delle piantine viene eseguita disponendo le capsule Petri in posizione verticale all'interno di un incubatore ad una temperatura compresa tra 18 e 25 °C con cicli di luce/buio di 12 ore per 21 giorni.

15

20

25

30

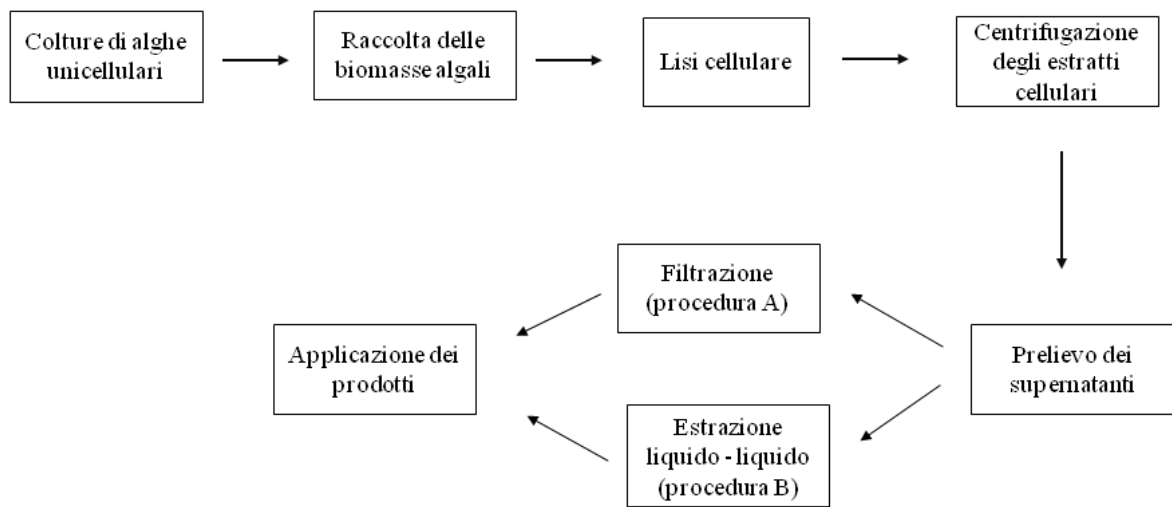
FIG. 1

FIG. 2

5

A.



10

B.

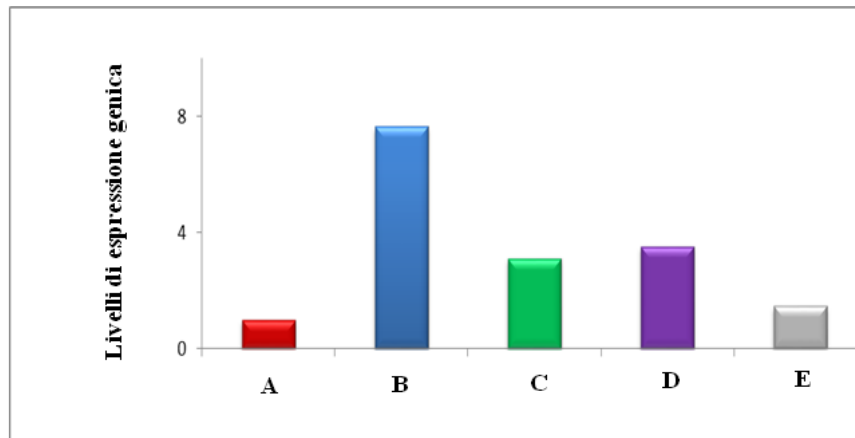


15

20

FIG. 3

5



- A:** Controllo (piantine di *Arabidopsis thaliana*).
B: Piante di *Arabidopsis thaliana* trattate con auxina sintetica (acido 2,4-diclorofenossiacetico).
C: Piante di *Arabidopsis thaliana* trattate con estratti di *Dunaliella salina*.
D: Piante di *Arabidopsis thaliana* trattate con estratti di *Dunaliella tertiolecta*.
E: Mezzo di coltura delle microalghe.

10

BIBLIOGRAFIA

- Basu, S., Sun, H., Brian, L., Quatrano, R., and Muday, G., *Plant Physiol.*, 2002, vol. 130, pp. 292-302.
- 5 Cacciari, I., Lippi, D., Pietrosanti, T., and Pietrosanti, W., *Plant Soil*, 1989, vol. 115, pp. 151-153.
- Chung, K., Shilts, T., Erturk, U., Timmer, L., and Ueng, P., *FEMS Microbiol. Letts.*, 2003, vol. 226, pp. 23-30.
- 10 Dörffling, K., *Das Hormonsystem der Pflanzen*, Stuttgart: Thieme, 1982.
- Kameneva, S.V. and Muronets, E.M., *Genetika*, 1999, vol. 35, pp. 1480-1494.
- 15 Kravchenko, L.V., Azarova, T.S., Makarova, N.M., and Tikhonovich, I.A., *Mikrobiologiya*, 2004, vol. 73, pp. 195-198.
- Kulaeva, O.N. and Kuznetsov, V.V., *Fiziol. Rastenii*, 2002, vol. 49, no. 4, pp. 626–640.
- 20 Li, J., Pan, W., and Xue, L. Preparation method of transgenic *dunaliella salina* for improving photosynthesis efficiency. Pat. No. CN101805743, 2010.
- Mark, K.T. Agrochemical screening. Pat. No. GB8728044, 1987.
- 25 Mishke, I.V., *Mikrobnye fitogormony v rastenievodstve (Microbial Phytohormones in Plant Cultivation)*, Riga: Zinatne, 1988.
- Nazarenko, L. and Semenenko, V., *Physiol. Plant.*, 1992, vol. 85, pp. 52-64.
- 30 Sanda, V., Florin, O., and Marius, V.C., Composition for treating agricultural crops and process for preparing the same. Pat. No. RO128888, 2012.
- Shimada, A., Takeuchi, S., Nakajima, A., Tanaka, S., Kawano, T., and Kimura, Y., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 2000, vol. 64, pp. 187-189.

Tien, T., Gaskina, M., and Hubbell, D., *Appl. Envir. Microbiol.*, 1979, vol. 37, pp. 1016-1024.

Walne, P.R. *Fish. Invest. London, Ser. 2*, 1966, vol. 25, pp. 1-10.

5 White, R., *J. Bacteriol.*, 1987, vol. 169, pp. 5859-5860.

Yurekli, F., Geckil, H., and Topcuoglu, F., *Mycol. Res.*, 2003, vol. 107, pp. 305-309.

10 Zakharychev, V.V., *Fitogormony, ikh analogi i antagonisty v kachestve gerbitsidov i regulyatorov rosta rastenii* (Phytohormones, Their Analogues and Antagonists As Herbicides and Regulators of Plant Growth), Moscow: RKhTU Im. D.I. Mendeleeva, 1999.