



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 322 141**

51 Int. Cl.:
C12N 1/14 (2006.01)
A01N 63/04 (2006.01)
A01H 5/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03748816 .0**
96 Fecha de presentación : **26.09.2003**
97 Número de publicación de la solicitud: **1560914**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **10.08.2005**

54 Título: **Endófitos de pastos.**

30 Prioridad: **27.09.2002 NZ 521653**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
17.06.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
17.06.2009

73 Titular/es: **Grasslanz Technology Limited**
Private Bag 11008, Tennent Drive
Palmerston North, NZ

72 Inventor/es: **Tapper, Brian, Anthony;**
Christensen, Michael, John;
Fletcher, Lester, Ronald;
Lane, Geoffrey, Alexander;
Latch, Garrick, Cecil, Morland;
Popay, Alison, Jean y
Easton, Herrick, Sydney

74 Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

ES 2 322 141 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

Endófitos de pastos.

5 **Campo técnico**

Esta invención se relaciona con endófitos fungosos y combinaciones de endófitos con plantas de pastos. Más particularmente la invención se relaciona con endófitos que forman combinaciones de cañuela alta (*Festuca arundinacea*) y algunos otros pastos relacionados. Aún más particularmente la invención se relaciona con combinaciones que tienen
10 toxicidad reducida a pastura de ganado comparado con los cultivares de combinaciones de endófito/cañuela alta en uso común.

Técnica anterior

15 Los endófitos fungosos del género *Neotyphodium* (anteriormente *Acremonium*) infectan un número de pastos Pooideae de clima moderado. Los endófitos *Neotyphodium* pueden producir alcaloides que se considera confieren grados de plaga y posiblemente protección de enfermedad a las plantas en las cuales ellos ocurren de manera natural. (Rowan y Latch, 1994; Blank and Gwinn, 1992). Los endófitos *Neotyphodium* se transmiten verticalmente a través de la semilla de los pastos y no se ha establecido transmisión horizontal natural (Leuchtmann, 1997).

20 Muchas de las infecciones de endófitos naturales predominantes de cultivares de pastos mejorados utilizados para producción agrícola pastoril también causan significativos trastornos en animales, por ejemplo las toxicosis de cañuela alta (Stuedemann y Hoveland, 1988) y tambaleos por pastos centeno (Fletcher *et al.*, 1999). Estas pueden ser reacciones tóxicas complejas de animales a los alcaloides producidos bajo un rango de condiciones de crecimiento de la
25 planta. Pérdidas económicas significativas en los sistemas agrícolas pastoriles pueden ocurrir debido a tales toxicosis en animales. De otra parte la presencia de por lo menos algunos endófitos puede ser esencial para la persistencia competitiva del pasto escogido en una pastura (Elberson y West, 1996; Fletcher y Easton, 2000).

30 Las líneas de pastos se pueden infectar artificialmente con endófitos seleccionados. Los cultivos axénicos de endófitos se pueden utilizar para infectar plántulas de pasto, crecidas inicialmente bajo condiciones estériles (Latch y Christensen, 1985), que se seleccionan entonces por cualidades deseables, y multiplicada para uso comercial. Se han desarrollado tres ejemplos significativos de esta tecnología por la división Grasslands de AgResearch Ltd: pasto centeno híbrido tetraploide GREENSTONE™ con endófitos ENDOSAFE™ (Tapper y Latch, 1999, Patente NZ 233083);
35 varios pastos centeno perennes e híbridos con endófito AR1 (Fletcher y Easton, 2000); y cultivares de cañuela alta con endófito MaxQ™ (Bouton *et al.*, 2000; Bouton *et al.*, 2002, Patente US 6,111,170).

Toxicosis de cañuela

40 La toxicosis de cañuela se ha asociado con la infección natural de la cañuela alta por cepas comunes de *Neotyphodium coenophialum*. Estas cepas producen típicamente el alcaloide ergopeptina, ergovalina, que es de una clase de ergopeptinas conocidas por ser tóxicas para los animales. La ergovalina se considera por ser la causa principal de la toxicidad de la cañuela. Otros compuestos, notablemente compuestos de ergolina y ergoleno, por ejemplo ácido lisérgico, posiblemente se agregan al síndrome (Oliver, 1997; Gadberry *et al.*, 1997; Hill *et al.*, 2001).

45 Los niveles de ergovalina tienden a ser mayores en vaina y cabezas de hoja de la cañuela alta que en la lámina de la hoja y sufren de variación estacional (Rottinghaus *et al.*, 1991). Existe poca ergovalina en las raíces. Típicamente una concentración de ergovalina en las hiervas o productos herbáceos tales como paja de heno, paja, semilla o ensilaje de más de un promedio de 0.4 ppm de materia seca se ha considerado como un riesgo de originar la toxicosis de cañuela (Tor-Agbidye *et al.*, 2001) especialmente cuando se combina con las condiciones climáticas que exacerban
50 los síntomas de la toxicosis de cañuela.

Otros compuestos reconocidos como mecanismos de defensa de planta-peramina, lolinas

55 La peramina se produce en pastos infectados con endófito (Rowan *et al.*, 1986) y probablemente movilizados dentro de la planta. Es un potente disuasor de la alimentación para un rango de insectos, por ejemplo, gorgojo del vástago argentino (*Listronotus bonariensis*), (Rowan y Latch 1994) y un factor significativo para proteger los pastos infectados con endófito de la predación de plagas de insectos.

60 Las lolinas (N-formillolina, N-acetillolina, N-acetilnorlolina y otros compuestos cercanamente relacionados) se producen por algunos endófitos *Neotyphodium* que incluyen *N. coenophialum* típico de la cañuela alta. Estos compuestos en pastos apropiados infectados con endófito tienen propiedades de disuadir o resistir un número de insectos, notablemente insectos chupadores, por ejemplo, *Rhopalosiphum padi* (Seigel *et al.*, 1990).

Efectos protectores en pasturas de cañuela alta-persistencia bajo condiciones de tensión

65 La infección con endófito se ha asociado con la persistencia mejorada de plantas de cañuela alta bajo condiciones de déficit de agua o sequía. Si este efecto se debe a la mejor resistencia de los factores de tensión biótica expresados en situaciones de déficit de agua; la salud general mejor de las plantas de cañuela alta infectadas con endófito (particular-

mente de los sistemas radiculares); o debido a respuestas fisiológicas diferenciales específicas de las plantas infectadas con endófito a la tensión con agua; no es claramente evidente. Sin embargo, el efecto total es la resistencia mejorada al déficit de agua.

5 Tremorgenos

Algunos endófitos *Neotyphodium*, notablemente aquellos de derivación evolucionaria de cepas de *Epicholë festucae* tal como *N. lolii*, producen potentes tremorgenos que son tóxicos a las pasturas de los animales. Para asegurar que tales tremorgenos no se producen por un endófito introducido artificialmente en la cañuela alta o el pasto centeno de forraje, se verifica la presencia de los tremorgenos potentes conocidos típicos de los endófitos, que son los lolitremos. También se busca la actividad tremorgénica en animales de prueba para pastura.

Es un objetivo de la presente invención suministrar un endófito que pueda producir ergovalina y algunos compuestos de ergolina o ergoleno en la base de las vainas de hoja de cañuela alta y en la corona de la planta pero solamente de una manera tal que la concentración usual en la hierba que se consume en general por animales de pastura en las prácticas comunes en las fincas es menor que el nivel de umbral de toxicidad práctico.

Para el propósito de esta especificación “corona” se define como el área de la planta de pasto que está generalmente a menos de 2 cm por encima del nivel del suelo y excluye las raíces de los pastos, pero incluye la base de los retoños y los puntos de crecimiento del meristema lateral para nuevos retoños vegetativos.

Es un objetivo adicional de la invención suministrar un endófito que pueda producir lolinas en cantidades que se consideren por ser parcial o sustancialmente efectivas en disuadir la alimentación de algunas plagas de insectos sobre las plantas.

Es un objetivo adicional de la invención suministrar un endófito que no produzca niveles detectables de lolitremos y no sean observablemente tremorgénicos.

Es aún un objetivo adicional de la presente invención manejar los problemas anteriores o por lo menos suministrarle al público una elección útil.

Se reconoce que el término “comprende” puede, bajo varias jurisdicciones, ser considerado con un significado exclusivo o inclusivo. Para el propósito de esta especificación, y a menos que se anote de otra manera, el término “comprende” debe tener un significado inclusivo, es decir, que significará una inclusión de no solamente los componentes listados directamente de las referencias, sino también de otros componentes o elementos no especificados. Este raciocinio también se utilizará cuando el término “comprendido” o “que comprende” se utilizan en relación con una o más etapas en un método o proceso.

Aspectos y ventajas adicionales de la presente invención serán evidentes de la descripción siguiente que se da solamente por vía de ejemplo.

Descripción de la invención

De acuerdo con un aspecto de la presente invención se suministra un endófito de especies *Neotyphodium coenophialum*, seleccionado del grupo que consiste de: AR512; AR513; AR514; AR517; AR521; AR522; AR524; AR525; AR535; AR539; y combinaciones de éstos; AR512; AR513; AR514; AR517; AR521; AR522; AR524; AR525; AR535; AR539; que son cultivos depositados el 2 de octubre del 2002 en los Laboratorios Analíticos del Gobierno de Australia (AGAL) con números de acceso: NM02/31935; NM02/31936; NM02/31937; NM02/31938; NM02/19399; NM02/31940; NM02/31941; NM02/31942; NM02/31943; NM02/31944;

Caracterizados porque, en combinación con un pasto huésped, dichos endófitos no causan síntomas de toxicosis en animales y se caracterizan adicionalmente en que el endófito retiene suficientes niveles de por lo menos dos alcaloides seleccionados del grupo que consiste de: agroclavina; setoclavina; isosetoclavina; y combinaciones de éstos, que protegen el pasto huésped de las plagas o las tensiones abióticas o ambos.

y se caracteriza adicionalmente porque el pasto huésped es artificialmente inoculado con el endófito.

De acuerdo con un aspecto adicional de la presente invención se suministra un cultivo de endófito de las especies *Neotyphodium coenophialum*, seleccionado del grupo que consiste de: AR512; AR513; AR514; AR517; AR521; AR522; AR524; AR525; AR535; AR539; y combinaciones de éstos; AR512; AR513; AR514; AR517; AR521; AR522; AR524; AR525; AR535; AR539; son cultivos depositados el 2 de octubre del 2002 en los Laboratorios Analíticos del Gobierno de Australia (AGAL) con números de acceso: NM02/31935; NM02/31936; NM02/31937; NM02/31938; NM02/31939; NM02/31940; NM02/31941; NM02/31942; NM02/31943; NM02/31944; caracterizados porque, en combinación con un pasto huésped, dicho cultivo de endófitos no causan síntomas de toxicosis en animales:

y se caracterizan adicionalmente porque el cultivo de endófito retiene suficientes niveles de por lo menos dos alcaloides seleccionados del grupo que consiste de: agroclavina; setoclavina; isosetoclavina; y combinaciones de éstos, que protegen el pasto huésped de las plagas o las tensiones abióticas o ambos.

ES 2 322 141 T3

y se caracteriza adicionalmente porque el pasto huésped es artificialmente inoculado con el cultivo de endófito.

Preferiblemente, la toxicosis que se evita es la toxicosis de cañuela. Más preferiblemente la toxicosis se origina por una toxina ergovalina.

Preferiblemente, el nivel de ergovalina en la presente invención es de menos de 0.4 ppm en la materia seca en la hierba consumida por los animales de pastura. Más preferiblemente, el nivel de ergovalina es de menos de 0.4 ppm en la materia seca en las hierbas, diferentes de la corona de las plantas de pasto huésped, consumidas por los animales de pastura.

Preferiblemente, la tensión abiótica es un déficit de agua.

Preferiblemente, el cultivo de endófito, si se utiliza, es un cultivo axénico.

Preferiblemente, el endófito o el cultivo de endófito produce menos del 0.2 ppm de ergovalina en materia seca de las hierbas totales cuando se infecta en pasto huésped.

De acuerdo con un aspecto adicional de la presente invención se suministra una combinación del endófito como se describió anteriormente, y un pasto huésped.

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención se suministra una combinación del cultivo endófito como se describió anteriormente, y un pasto huésped.

Preferiblemente, la combinación, sustancialmente como se describió anteriormente, se logra mediante la modificación de pasto huésped infectado con el endófito o el cultivo de endófito por los métodos seleccionados del grupo que consiste de: crianza; cruce; hibridización; modificación genética; y combinaciones de ésta.

Preferiblemente, el pasto huésped utilizado en la combinación descrita anteriormente se selecciona del grupo que consiste de: cultivares de pasto cañuela alta, cultivar de pasto centeno, cultivar de cañuela de pradera, y combinaciones de éstos.

De acuerdo con un aspecto adicional de la presente invención el pasto huésped es un pasto Pooideae.

De acuerdo con un aspecto adicional de la presente invención se suministra una combinación de endófito o cultivo de endófito, como se describió anteriormente, y un pasto huésped en donde la combinación produce isosetoclavina y setoclavina a una velocidad mayor de 0.5 ppm en cada una de la materia seca en las coronas de plantas de pasto huésped. Preferiblemente también, la combinación produce menos de 0.2 ppm de materia seca de ergovalina en las hierbas totales.

De acuerdo con un aspecto adicional de la presente invención se suministra una combinación de endófito como se describió anteriormente y un pasto huésped, en donde la combinación tiene las características seleccionadas del grupo que consiste de: mejoramiento de la protección a las plagas, resistencia a los insectos, resistencia a la pastura, y combinaciones de éstos.

De acuerdo con un aspecto adicional de la presente invención se suministra una combinación como se describió anteriormente y un pasto huésped, en donde la combinación tiene las características de mejoramiento de crecimiento de los animales de pastura y una productividad creciente de los animales con relación al pasto infectado con los endófitos conocidos capaces de inducir toxicosis de cañuela.

De acuerdo con un aspecto adicional de la presente invención se suministra una combinación como se describió anteriormente y un pasto huésped en donde la plaga a la cual se le confiere resistencia creciente sobre el pasto huésped se selecciona del grupo que consiste de: nematodo de lesión, áfidos de raíz, escarabajo pulga del maíz, y combinaciones de éstos.

De acuerdo con un aspecto adicional de la presente invención se suministran semillas de un pasto huésped infectado con el endófito sustancialmente como se describió anteriormente.

De acuerdo con un aspecto adicional de la presente invención se suministran semillas de un pasto huésped infectado con el cultivo de endófito como se describió anteriormente.

La invención es la combinación de ejemplos de una clase de endófito *Neotyphodium coenophialum* y cultivares de pasto mejorado mediante la inoculación artificial para producir pastos huéspedes que no originan síntomas de toxicosis por vía de la toxina ergovalina, pero que retienen suficientes niveles de otros alcaloides (por ejemplo: agroclavina, setoclavina y/o isosetoclavina) para continuar individualmente o en combinación la protección de pastos huéspedes de plagas o tensiones abióticas (tales como déficit de agua) o ambos.

La invención se ha logrado al entender la biología de los endófitos de pastos de climas moderados, aislar los endófitos de interés seleccionados, inocular los endófitos en las plántulas de pastos esterilizadas en la superficie, ejem-

plificadas por la cañuela alta mejorada o las líneas de cultivares de pasto centeno perenne, re-evaluar la producción de alcaloide, multiplicar la semilla, evaluar los factores agronómicos, probar la producción animal, evaluar por cualquier evidencia de trastornos de animal tales como la toxicosis de cañuela, tembladeras, hipertermia, o depresión de la hormona prolactina y probar la protección de plagas en invertebrados.

5

La invención consiste de lo anterior y también visualiza construcciones de las cuales las siguientes son ejemplos.

Mejores modos para llevar a cabo la invención

10 *Condiciones de cultivo y descripción*

Todos los endófitos de esta invención son cepas de colecciones de semillas de cañuela alta originalmente conseguidas de la clase Claviplus. La semilla de varias colecciones de cañuela alta se examinaron para la presencia del endófito mediante la técnica de calabaza de semilla. Una selección de plantas para cada una de las muestras de semilla, donde
15 un endófito se mostró por estar presente, creció durante pocas semanas en condiciones de invernadero y se reprobaron para presencia de endófitos en sus vainas de hojas.

Los endófitos de las plantas con quimiotipos de interés se aislaron y se hicieron crecer en cultivo de acuerdo con el método de Latch y Christensen (1985). Los endófitos de esta invención se mantienen en una colección de cultivo o en
20 plantas clonadas en el sitio Grasslands de AgResearch Ltd en Palmerston North, Nueva Zelanda. Los cultivos también se depositaron en los Laboratorios Analíticos del Gobierno de Australia en Sydney, Australia.

Los números de acceso son: NM02/31935; NM02/31936; NM02/31937; NM02/31938; NM02/31939; NM02/31940; NM02/31941; NM02/31942; NM02/31943; NM02/31944; depositados el 2 de octubre del 2002. Todas las
25 cepas de endófito de esta invención se acomodan dentro de un subgrupo único de especies *Neotyphodium coenophialum*. Los aislados, cuando crecen en agar de dextrosa de papa a 22°C, crecen lentamente (crecimiento radial aproximadamente 0.1-0.3 mm por día) con colonias típicamente blancas y algonodosas. Los coridios se han observado a velocidades variables de producción cerca al margen de las colonias.

30 *Inoculaciones*

Los cultivos axénicos de los endófitos AR512, AR513, AR514, AR517, AR521, AR522, AR524, AR525, AR535 y AR539 como ejemplos de esta invención, se inocularon exitosamente (Latch y Christensen, 1985) en plántulas crecidas de semillas esterilizadas en la superficie del cultivar de cañuela alta Kentucky 31. Los endófitos AR514, AR524, y
35 AR525 también se infectaron en otros cultivares tales como, por ejemplo Grasslands Flecha, Jesup Improved, Georgia 5 y varias líneas experimentales, generalmente con una tasa de éxito satisfactoria mayor del 5% de intentos. No se observaron fallas completas al infectar la cañuela alta con los endófitos de esta invención.

Un cultivar de cañuela de pradera típico (Ensign) se inoculó exitosamente con el endófito AR512. De manera
40 similar una línea de prueba de pasto centeno perenne típica (GA66) se inoculó exitosamente con los endófitos AR514 y AR525 para examen adicional con las características de los quimiotipos de las combinaciones similares a cuando se infecta la cañuela alta, pero generalmente con niveles inferiores de acumulación de alcaloide, y con velocidades de infección del orden del 1% al 5% de intentos.

La semilla se ha producido exitosamente de plantas infectadas que contienen los endófitos de esta invención bajo
45 condiciones de producción de semilla de rutina con velocidades relativamente altas y útiles de infección de endófito.

Identificación de quimiotipo

Las partes basales de los retoños infectados con endófito se secaron por congelamiento, algunas veces molidas, y
50 extraídas y analizadas cualitativamente para la presencia de ergovalina con cromatografía líquida de alto desempeño (HPLC) como se establece adelante. Aquellos que indican una ergovalina menor de aproximadamente 0.2 ppm de materia seca se analizaron adicionalmente para la producción de peramina a velocidades mayores de aproximadamente 2 ppm de materia seca. Los endófitos de tales selecciones se aislaron, clasificados mediante los atributos de cultivo, y
55 generalmente re-inoculados en plántulas de cañuela alta libre de endófito, cultivar Kentucky 31, como un huésped de pastura mejorada típica para propósitos comparativos. Las muestras de tales plantas en varias etapas de crecimiento se analizaron con más detalle para producción de alcaloide, incluyendo la producción de lolitrems tremorgénicos típicos de la infección con *N. lolii* y lolinas típicas de *N. coenophialum*.

La expresión de la producción de alcaloide de la cañuela alta infectada con endófito, que utiliza los endófitos
60 seleccionados de fuentes de cañuela alta, se observó que caía ampliamente en los tres grupos. El grupo más numeroso produce tanto ergovalina como peramina a niveles a menudo mayores de 1 ppmen el material de los retoños basales. Tales endófitos están probablemente asociados con la toxicosis de cañuela de los animales de pastura si están presentes a tasas altas de infección en el forraje.

Un segundo grupo de quimiotipo produjo peramina y lolinas, pero no trazas detectables de ergovalina. Los endófitos
65 típicos de este grupos se han desarrollado para aplicación comercial (Bouton, 2000; Bouton *et al.*, 2002, Patente US 6,111,170).

Un tercer grupo, de esta invención, que tiene bajos niveles y una característica de distribución dentro de las plantas de ergovalina, se discute adelante. Ellos se caracterizan adicionalmente por la presencia de peramina en hierbas generalmente de más de 1 ppm, y la presencia de lolinas en hierbas en cantidades dentro de rangos típicos de infección de *N. coenophialum*. En el curso de los análisis cromatográficos para ergovalina se observaron la presencia de otros compuestos con UV y propiedades espectrales de fluorescencia típicas de los derivados de ergoleno (es decir, “alcaloides ergot” fluorescentes), notablemente en las porciones basales de los retoños, coronas, y semillas de las plantas de cañuela alta infectada con este grupo de endófitos. Estos compuestos también se discuten adelante.

Las lolinas (N-formillolina, N-acetillolina, y N-acetilnorlolina, en orden de la abundancia usual observada) se detectaron mediante cromatografía de gas capilar en extractos de planta de cañuela alta y de cañuela de pradera infectada con los endófitos de esta invención en cantidades más o menos comparables con aquellas observadas en las plantas de cañuela alta comparables infectadas con *N. coenophialum* común. Los métodos utilizados fueron modificaciones menores del método de Yates *et al.*, (1990).

Los lolitremos no se detectaron mediante análisis cromatográfico en ninguna de las cañuelas altas infectadas con los endófitos de esta invención. Los efectos posibles de los lolitremos no se consideraron adicionalmente de manera directa, diferente de las observaciones en pasturas de ovejas que contienen el endófito AR514 para signos de temblores.

Niveles del alcaloide Ergot e identificación de nuevos alcaloides

La concentración de ergovalina se midió mediante HPLC con detección de fluorescencia. Típicamente, una muestra de aproximadamente 50 mg de tejido infectado por endófito, secado por congelamiento molido (1 mm malla) de menos de 3 a 5 cm de los retoños provenientes de plantas vegetativas maduras (material de retoño basal que consisten predominantemente de vainas de hojas) se extrajo con 1 ml de una mezcla de partes iguales de propan-2-ol y agua que contiene también 1% de ácido láctico. La extracción continuó durante una hora a temperatura ambiente con una mezcla suave. Se utilizó un estándar interno de tartrato de ergotamina agregada (c. 1 μ g por muestra) para comparaciones cuantitativas.

Luego de una centrifugación breve, se tomó una muestra de solución de extracto clarificado por HPLC utilizando una columna de fase inversa (típicamente Prodigy 150 x 4.6 mm, 5 μ m de silica ODS), Phenomenex, CA, USA); con elusión a 1 ml por minuto y un gradiente de disolvente de acetonitrilo y 100 mM de acetato de amonio acuoso por volumen que inicia a 27.5% de acetonitrilo y que progresa en etapas lineales a 35% a 20 min, 50% a 35 min, 60% a 40 min y 75% a 50 min.

Los compuestos de ergoleno naturalmente fluorescentes que incluyen ergovalina (y su isómero ergovalinina), la ergotamina estándar interna (y su isómero ergotaminina parcialmente formado durante la extracción) y los compuestos observados en la sección anterior de los cromatogramas se detectaron al utilizar excitación UV a 310 nm y emisión a 410 nm. La ergovalina su isómero ergovalinina, el estándar interno de ergotamina agregada y su isómero ergotaminina se eluyeron a aproximadamente 22, 36, 30 y 42 minutos respectivamente. El nivel de detección mínimo para análisis de rutina de ergovalina (cantidades combinadas con el isómero de ergovalinina) es de aproximadamente 0.05 ppm de materia seca.

Durante el curso de los ejemplos de examen de la cañuela alta infectada con endófitos de esta invención para ergovalina, se observaron otros derivados de ergoleno por estar presentes en un patrón no previo reconocido. Los compuestos que eluyen a aproximadamente 6.5 minutos (compuesto A) y 8.0 minutos (compuesto B) ambos están presentes característicamente en retoños basales infectados con endófitos y los materiales corona de esta invención. Estos compuestos se han identificado como isetoclavina y setoclavina respectivamente, como sigue.

Las fracciones enriquecidas en los compuestos A y B se prepararon de metanol-1% de ácido acético acuoso (4:1) extracto de vainas inferiores molidas y secadas por congelamiento de retoños que contienen los endófitos AR514 y AR524 (pre-extraídos con hexano). El extracto se fraccionó mediante cromatografía flash de fase inversa secuencial sobre silica gel funcionalizado con octadecilo (Aldrich) con gradientes de etapas ácidas (metanol-1% de ácido acético acuoso) y neutro (metanol-agua), y cromatografía flash de fase normal sobre silica gel (silica gel 60, 40-63 μ , Merck) con un gradiente de etapa de etil acetato-metanol.

La fluorescencia característica y el espectro de absorción UV y los datos de masa espectral de la ionización de electropulverizado (ESI) para los compuestos A y B obtenidos mediante análisis HPLC de fracciones enriquecidas que utilizan variaciones de condiciones y detectores de separación HPLC (instrumento Shimadzu LC-MS QP-5050 con una disposición de diodo SPD-10AVP UV y detectores espectrales de fluorescencia RF-10A), junto con los datos comparativos con los estándares que establecen estos compuestos como setoclavinas (isetoclavina y setoclavina respectivamente). Ambos compuestos muestran picos de fluorescencia fuertes en el HPLC (λ_{EX} 310 nm λ_{EX} 410 nm). Los espectros UV se caracterizan por las absorbancias máximas a 307 nm y 312 nm respectivamente y para ambos compuestos el espectro de masa ESI de ión positivo muestra un pico base a $m/z = 237$ ($MH^+ - H_2O$) y un ión MH^+ a $m/z = 255$. El compuesto B co-eluido con una muestra de setoclavina de referencia suministrado por el Dr. Miroslav Flieger, Instituto de la Academia de Microbiología de Ciencias de la República Checa. Los compuestos A y B fueron idénticos mediante HPLC, y las propiedades espectrales de la isetoclavina (compuesto A) y la setoclavina (compuesto B) obtenidas mediante oxidación química de agroclavina mediante un procedimiento estándar. La presencia de isetoclavina y setoclavina no se ha reportado previamente en pastos infectados con endófitos aunque

ES 2 322 141 T3

ellos se han reportado como productos de oxidación de agroclavina en otros sistemas de plantas (revisión de Kren, 1999).

Los mismos extractos también se mostraron por contener agroclavina mediante LC-MS de electropulverizado, con un ión de espectro de masa ESI atribuido a MH^+ a $m/z = 239$ que eluye al mismo tiempo con esencialmente el mismo espectro UV como la agroclavina auténtica.

La Tabla 1 resume los resultados de análisis de alcaloide de las partes de plantas especificadas de cañuela alta infectada con endófitos y que usualmente crecen bajo condiciones estacionales de verano moderado, en general en el cultivar de prueba comparativo Kentucky 31. Por consideración de la producción del alcaloide ergot en la corona y la parte basal de los retoños, también se hizo comparación con la cañuela alta infectada con los endófitos AR501 y AR542 que consistentemente no parecen producir ninguna ergovalina o setoclavinas.

TABLA 1

Ejemplos y rangos típicos o calificaciones de los alcaloides observados en partes específicas de plantas

Muestra (cultivar & endófito)	Parte de planta	Ergovalina (ppm DM)	Compuesto A & B
Jesup EI	Hierba completa	0.4 – 1.2	ND
Jesup EI	Vaina	2.5	
Manawatu RS EI	Vaina	7.1 – 15.7	
Kentucky 31 EI	Hierba completa	1.8 – 3.0	ND
Kentucky 31 EI	Lámina de hoja	0.3 – 1.8	ND
Kentucky 31 EI	Vaina	2.9 – 16.2	
Kentucky 31 AR501	Corona	< 0.1 ND	*
Kentucky 31 AR514	Hierba completa	< 0.1	*
Kentucky 31 AR514	Corona	0.1 – 0.6	**
Kentucky 31 AR514	Cabezas inmaduras	< 0.1 – 0.2	*
Kentucky 31 AR522	Tallo & vaina	0.1 – 0.2	*
Kentucky 31 AR522	Corona	3.4 – 6.1	***
Kentucky 31 AR524	Corona	0.3 – 0.6	**

	Kentucky 31 AR524	Cabezas inmaduras	< 0.1	*
5	Kentucky 31 AR525	Hierba completa	< 0.1	ND
	Muestra (cultivar & endofito)	Parte de planta	Ergovalina (ppm DM)	Compuesto A & B
10	Kentucky 31 AR525	Corona	0.7 – 1.0	***
	Kentucky 31 AR525	Cabezas inmaduras	< 0.1	*
15	Kentucky 31 AR525	Tallo, vaina & cabezas	< 0.1	*
	Kentucky 31 AR535	Corona	0.4 – 0.7	***
20	Kentucky 31 AR535	Tallo, vaina & cabezas	< 0.1	**
	Kentucky 31 AR542	Corona	< 0.1	ND
25	Kentucky 31 AR542	vaina	< 0.1	ND
	Compuesto A = isosetoclavina			
30	Compuesto B = setoclavina			
	ND = no detectado, límite de detección de 0.1 ppm DM para ergovalina			
35	* = posible traza o nivel bajo			
	** y *** = calificación de abundancia relativa observada			
40	EI = infectado con tóxico común o endófito tipo silvestre			

45 Caracterización genotípica del endófito

Todos los endófitos discutidos anteriormente se caracterizan por una “huella” de ADN (locus microsatelital polimórfico seleccionado y/o Técnica de Polimorfismos Longitudinales de Fragmento Arbitrario (AFLP)) como perteneciendo a un subgrupo de *Neotyphodium coenophialum*.

50 Las muestras de aproximadamente 50 mg frescas o 15 mg de retoños basales secos se utilizaron para la extracción de ADN que utiliza un kit FastDNA para plantas (Bio 101, Vista, California) mediante los procedimientos recomendados con el kit. Se extrajo el ADN alternativamente genómico del endófito cultivado (Moon *et al.*, 1999). La amplificación PCR de microsatélite se desarrolló utilizando pares iniciadores marcados con tintes fluorescentes, B10.1 (5'-TET)/B10.2 y B11.1 (5'-HEX)/B11.4, como se describió por Moon *et al.*, (1999). El tamaño aparente de los productos marcados fluorescentes PCR microsatélites se midió relativamente para estar dentro de un estimado de 0.3 unidades de nucleótido por electroforesis de capilar utilizando un Analizador Genético ABI 3100 con una química de polímero POP6 en unas disposiciones de capilar de 50 cm y estándares de GeneScan-400HD (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA). Los tamaños aparentes de los productos PCR mediante esta técnica (ajustada al sustraer una unidad donde 60 un nucleótido de adenina parece haber sido agregado terminalmente) se establecen en la Tabla 2.

La Tabla 2 muestra que los endófitos de esta invención se pueden distinguir de los otros grupos de los endófitos *Neotyphodium* por el número de alelos observados y los tamaños aparentes de tales alelos. Así todas las cepas de esta invención comparten un alelo B11 de un tamaño c. de 128 pares base y un segundo alelo B11 dentro del rango de 65 tamaño c. de 192 a 200 bp. Ellos también comparten con otras cepas de *N. coenophialum* hasta los tres alelos B10 dentro del rango c. 154 a 185 bp.

ES 2 322 141 T3

La presencia de tres alelos para los endófitos de esta invención para el locus B10 es consistente con la evidencia para el *N. coenophialum* como un endófito híbrido derivado de tres diferentes especies fuente de *Epichloë* (Tsai *et al.*, 1994).

TABLA 2

Tamaño aparente de los productos PCR microsatélite B10 y B11

Material fuente	Locus B10		Locus B11	
	No de alelos	Tamaño de alelos (bp)	No de alelos	Tamaño de alelos (bp)
N. coenophialum, tipo silvestre, isozimas Australianas C1, coB	3	160.4, 169.6, 184.2	2	147.9, 192.2
N. coenophialum, tipo silvestre, isozimas de Tindall NZ coB	2	160.4, 169.4	2	147.9, 192.2
N. coenophialum, tipo silvestre, NZ RS2 & NZ RS6	3	160.3, 169.3, 184.2	2	147.8, 192.0
N. coenophialum, AR542	2	160.5, 169.6	2	180.4, 192.2
Neotyphodium sp., cepa FaTG-3 AR501	2	169.5, 178.7	1	127.9
Neotyphodium sp., cepa FaTG-3 AR506	2	169.6, 178.7	1	127.8
AR539	3	154.6, 172.5, 178.3	2	127.9, 192.2
AR513	3	157.7, 160.5, 178.4	2	128.0, 192.2
AR525	3	157.7, 160.4, 178.3	2	128.0, 192.2
AR517	3	163.4, 172.5, 178.2	2	128.0, 192.1
AR521	3	163.3, 172.5, 178.2	2	127.9, 192.1
AR512	3	172.6, 178.5, 181.5	2	128.0, 192.2
AR514	3	157.8, 160.6, 178.4	2	128.0, 196.2
AR522	3	157.7, 160.5, 178.3	2	128.0, 200.1
AR524	3	157.7, 160.5, 178.3	2	127.9, 200.2
AR535	3	157.7, 160.5, 178.3	2	128.0, 200.1

Análisis mediante AFLP (Griffiths *et al.*, 1999) también confirmaron que los ejemplos de los endófitos AR514, AR525 y AR535 de esta invención son de un subgrupo que se puede distinguir de otros endófitos de *N. coenophialum* por fuera de esta subgrupo mediante una o más diferencias polimórficas, pero no muchas diferencias, desde más de 200 bandas de AFLP observadas por ser polimórficas para el género *Neotyphodium* y *Epichloë*.

Pasturas seguras con endófito en cultivares de cañuela alta Kentucky 31

Las pasturas de cañuela alta infectadas con ejemplos de los endófitos de esta invención no inducen toxicosis típica de cañuela en animales de pastura. La Tabla 3 muestra las velocidades de crecimiento de ovejas en ensayos conducidos en Eatonton, GA, USA para dos estaciones (21 de abril-30 de junio 1997, 2 de abril-2 de julio 1998). El crecimiento de las ovejas sobre las pasturas de cañuela alta Kentucky 31 infectada con la cepa de endófito AR514 fue esencialmente el mismo crecimiento que sobre pasturas libres de endófito equivalente y significativamente mejor que el crecimiento en pasturas naturalmente infectadas con endófito utilizando el cultivar Jesup comparable. La infección de endófito tipo silvestre redujo significativamente la ganancia de peso vivo ($P < 0.05$) y la temperatura del cuerpo medio creciente (rectal).

La depresión neta de la prolactina en la sangre es otro síntoma de la toxicosis de cañuela. La cepa de endófito AR514 no originó una depresión de prolactina mientras que con la prolactina de endófito tipo silvestre se redujo de manera neta.

En total, el desempeño de la pastura de ovejas sobre la pastura AR514 fue similar a aquella de la pastura libre de endófito. No se observaron síntomas de temblores o “tembladera de pasto centeno”.

TABLA 3

Desempeño del endófito de pastura de ovejas infectado y de pastura libre de endófito

	Año	Tratamiento de endófito		
		AR514 (en Kentucky 31)	Jesup EF*	Jesup EF*
Ganancia de peso vivo (g/hd/d)	1997	103 a**	102 a	67 b
	1998	93 a	102 a	57 b
Temperatura del cuerpo (°C)	1997	39.8 a	39.8 a	40.1 b
Prolactina en la sangre (ng/ml)	1997	414 a	400 a	No detectable
	1998	550 a	150 a	< 0.5 b
*EF = libre de endófito; EI = infectado con tóxico común o con endófito tipo silvestre.				
**Tratamiento sin letra en común son significativamente diferentes ($P < 0.05$).				

Endófitos y resistencia a nemátodos de lesión

En algunos ambientes, notablemente los suelos arenosos con climas relativamente calientes y húmedos, los nemátodos pueden originar daño significativo a los sistemas radiculares de cañuela alta afectando así la persistencia del pasto en la pastura. Un ensayo de invernadero con tres plantas y nueve replicas por tratamiento ha demostrado que la infección con endófito puede conferir resistencia a los nemátodos de lesión, *Pratylenchus spp.* En un experimento de invernadero se investigó la reproducción de nemátodo con dos cultivares de cañuela alta infectadas con varios endófitos o libres de endófito.

La Tabla 4 indica que un endófito de esta invención, el AR514, confiere resistencia parcial a nemátodos de lesión a un grado mayor que las plantas libres de endófito (EF) o dos endófitos a los que les falta la producción de ergovalina (AR542 & AR584) aunque no el mismo grado que el endófito común (EI) de los cultivares.

TABLA 4

Efecto del endófito sobre los números de nemátodos de lesión

Cultivar de cañuela	Endófito				
	EF*	AR542	AR584	AR514	EI*
GA 5	146	149	101	-	19
Jesup	147	88	120	69	30
Media	146 a**	118 ab	111 ab	69 b	24 c
Relativo a EF = 100	100 a	81 ab	76 ab	47 b	16 c
* EF = libre de endófito; EI = infectado con endófito tóxico común o tipo silvestre.					
** Tratamientos sin letra en común son significativamente diferentes (P<0.05)					

Endófitos que confieren resistencia al áfido de raíz

La infección de endófito se conoce por afectar la infestación de pastos por áfidos. La Tabla 5 compara los tratamientos de catorce plantas cada una del cultivar de cañuela alta Kentucky 31 para los números medios de áfidos de raíz en donde la infección de AR514 se muestra por conferir una protección considerable en comparación con otros conjuntos de plantas infectados con endófito o plantas libres de endófito.

TABLA 5

Número log de áfido de raíz por 10 ml de sub-muestra en la cañuela alta Kentucky 31

Tratamiento de endófito	No. de áfido de raíz	No. de áfido de raíz/gm raíz
Libre de endófito	4.043 a*	2.055 a
AR542	1.710 b	0.473 b
AR514	0.765 c	0.095 c
* tratamientos sin letra en común son significativamente diferentes (P<0.01)		

Endófitos que confieren disuasión para el escarabajo pulga del maíz

Las hojas de cañuela alta Kentucky 31 infectadas con los ejemplos de los endófitos de esta invención (E+) y también las hojas infectadas con el endófito tóxico tipo silvestre se compararon con el material libre de endófito (EF) utilizando el escarabajo pulga del maíz *Chaetocnema pulicaria* en un experimento de prueba de preferencia de alimentación. Los endófitos AR512, AR513, AR514, AR524 y AR525 confieren todos resistencia o abstinencia de alimentación similar a aquella de las hojas infectadas con el endófito tóxico tipo silvestre. La media de las calificaciones de alimentación para los ejemplos de esta invención fueron E+ = 0.4 como contra EF = 2.8 (P < 0.001) sobre una escala de 0 a 3 (donde 0 es ninguna alimentación y 3 es alimentación extensiva). Conteos de calificación de cicatrices de alimentación (E+ = 2.2, EF = 27.8, media del número total de cicatrices a través de 3 transectos por lámina de hoja) y de glóbulos fecales (E+ = 9.2, EF = 75.8, número medio de glóbulos fecales sobre cada lámina) también fueron diferentes altamente significativos con aquellos de E+ cercanamente comparables con aquellos del endófito tipo silvestre tóxico de Kentucky 31.

Una prueba de preferencia única similar con el endófito AR512 infectado con el cultivar de cañuela de pradera Ensign demostró un efecto de preferencia aún más extremo con calificaciones de alimentación de E+ = 0.0, EF = 3.0, conteos de calificación de cicatrices de alimentación E+ = 0, EF = 33, y glóbulos fecales E+ = 3, EF = 50.

Los aspectos de la presente invención se han descrito por vía solamente de ejemplo y se debe apreciar que se pueden hacer modificaciones y adiciones a ésta.

Referencias

- Blank, C.A., Gwinn, K.D.** 1992: Soilborne seedling diseases of tall fescue: influence of the endophyte *Acremonium coenophialum*. *Phytopathology* 82: 1089.
- Bouton, J.H.** 2000: The use of endophyte fungi for pasture improvement in the USA. In Proceedings of The Grassland Conference 2000, 4th International Neotyphodium/Grass Interactions Symposium. Eds. Paul, V.H.; Dapprich, P.D. Universat, Paderborn, pp 163-168.
- Bouton, J.H.; Latch, G.C.M.; Hill, N.S.; Hoveland, C.S.; McCann, M.A.; Watson, R.H.; Parixh, J.H.; Hawkins, L.L.; Thompson, F.N.** 2002: Re-infection of tall fescue cultivars with non-ergot alkaloid-producing endophytes. *Agronomy Journal* 94: 567-574.
- Elbertson, H.W.; West, C.P.** 1996: Growth and water relations of field grown tall fescue as influenced by drought and endophyte. *Grass and Forage Science* 51:333-342.
- Fletcher, L.R.; Eastn, H.S.** 2000: Using Endophytes for Pasture Improvement in New Zealand. In Proceedings of The Grassland Conference 2000, 4th International Neotyphodium/Grass Interactions Symposium. Eds. Paul, V.H.; Dapprich, P.D. Universat, Paderborn, pp 149-162.
- Fletcher, L.R.; Sutherland, B.L.; Fletcher, C.G.** 1999: The impact of endophyte on the health and productivity of sheep grazing ryegrass-based pastures. In Ryegrass endophyte: an essential New Zealand symbiosis. *Grassland Research and Practice Series No. 7*, pp 11-17.
- Gadberry, M.S.; Denard, T.M.; Spiers, D.E.; Piper, E.L.** 1997: Ovis airies: A model for studying the effects of fescue toxins on animal performance in a heat-stress environment. In Neotyphodium/Grass Interactions, Eds, Bacon, C.W.; Hill, N.S. *Plenum Press*, New York, pp 429-431.
- Griffiths, A.; Moon, C.; Tapper, B.; Christensen, M.** 1999: Non-radioactive AFLP fingerprinting for detection of genetic variation in Epichloë/Neotyphodium endophytes. Proceedings of the 11th Australian Plant Breeding Conference.
- Hill, N.S.; Thompson, F.N.; Studemann, J.A.; Rottinghaus, G.W.; Ju, H.J.; Dawe, D.L.; Hiatt, E.E.** 2001: Ergot alkaloid transport across ruminant gastric tissues. *Journal of Animal Science* 79: 542-549.
- Kren, V.** 1999: Biotransformations of ergot alkaloids. In Ergot the genus Claviceps. Eds. Kren, V.; Cvak, L. *Harwood Academic*, Amsterdam, p. 230.
- Latch, G.C.M.; Christensen, M.J.** 1985: Artificial infection of grasses with endophytes. *Annals of Applied Biology* 107: 17-24.
- Leuchtmann, A.** 1997: Ecological diversity in Neotyphodium-infected grasses as influenced by host and fungus characteristics. In Neotyphodium/Grass Interactions, Eds. Bacon, C.W.; Hill, N.S. *Plenum Press*, New York, pp 93-108.
- Moon, C.D.; Tapper, B.A.; Scott, D.B.** 1999: Identification of Epichloë endophytes in plant by a microsatellite-based PCR fingerprinting assay with automated analysis. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 1268-1279.
- Oliver, J.W.** 1997: Physiological manifestations of endophyte toxicosis in ruminant and laboratory species. In Neotyphodium/Grass Interactions, Eds. Bacon, C.W.; Hill, N.S. *Plenum Press*, New York, pp 311-346.
- Rottinghaus, G.E.; Garner, G.B.; Cornell, C.N.; Ellis, J.L.** 1991: HPLC method of quantitating ergovaline in endophyte-infected tall fescue: Seasonal variation of ergovaline levels in stems with leaf sheaths, leaf blades and seed heads. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 191: 112-115.
- Rowan, D.D.; Hunt, M.B.; Gaynor, D.L.** 1986: Peramine, a novel insect feeding deterrent from ryegrass infected with the endophyte *Acremonium loliae*. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1986. 935-936.
- Rowan, D.D.; Latch, G.C.M.** 1994: Utilization of endophyte-infected perennial ryegrasses for increased insect resistance. In *Biotechnology of endophyte fungi in grasses*. Eds. Bacon, C.W. White, J. CRC Press, pp 169-183.
- Siegel, M.R.; Latch, G.C.M.; Brush, L.P.; Fannin, F.F.; Rowan, D.D.; Tapper, B.A.; Bacon, C.W.; Johnson, M.C.** 1990: Fungal endophyte-infected grasses: alkaloid accumulation and aphid response. *Journal of Chemical Ecology* 16: 3301-3315.
- Studemann, J.A.; Hoveland, C.** 1988: Fescue endophyte: History and impact on animal agriculture. *Journal of Production Agriculture* 1: 39-44.

Tapper, B.A.; Latch, G.C.M. 1999: Selection against toxin production in endophyte-infected perennial ryegrass. In Ryegrass endophyte: an essential New Zealand symbiosis. *Grassland Research and Practice Series* No. 7, pp 107-111.

5 **Tor-Agbidye, J.; Blythe, L.L.; Craig, A.M.** 2001: Correlation of endophyte toxins (ergovaline and lolitrem B) with clinical disease: fescue foot and perennial ryegrass staggers. *Veterinary and Human Toxicology* 43: 140-146.

Tsai, H.F.; Liu, J.S.; Staben, C.; Christensen, M.J.; Latch, G.C.; Siegel, M.R.; Schardl, C.L. 1994: Evolutionary diversification of fungal endophytes of tall fescue grass by hybridization with *Epichloë* species. *Proceedings of the*
10 *National Academy of Science USA* 91: 2542-2546.

Yates, S.G.; Petroski, R.J.; Powell, R.G. 1990: Analysis of loline alkaloids in endophyte-infected tall fescue by capillary gas chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 38: 182-185.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Un endófito de las especies *Neotyphodium coenophialum*, seleccionado del grupo que consiste de: AR512; AR513; AR514; AR517; AR521; AR522; AR524; AR525; AR535; AR539; y combinaciones de éstos; AR512; AR513; AR514; AR517; AR521; AR522; AR524; AR525; AR535; AR539 que son cultivos depositados el 2 de octubre del 2002 en los Laboratorios Analíticos del Gobierno de Australia (AGAL) con números de acceso: NM02/31935; NM02/31936; NM02/31937; NM02/31938; NM02/31939; NM02/31940; NM02/31941; NM02/31942; NM02/31943; NM02/31944;
- 5 **Caracterizados** porque, en combinación con un pasto huésped, dicho endófito no causan síntomas de toxicosis en animales;
- 10 en donde: el endófito retiene los niveles de protección de por lo menos dos alcaloides seleccionados del grupo que consiste de: agroclavina; setoclavina; isosetoclavina; y combinaciones de éstos, para proteger de esta manera el pasto huésped de las plagas o las tensiones abióticas o ambos.
- 15 y el pasto huésped es artificialmente inoculado con el endófito.
- 20 2. Un endófito de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la toxicosis es toxicosis de cañuela.
3. Un endófito de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde la toxicosis se origina por ergovalina.
4. Un endófito de acuerdo con la reivindicación 2 o 3, en donde el nivel de ergovalina es de menos de 0.4 ppm en materia seca en hierba consumida por animales de pastura.
- 25 5. Un endófito de acuerdo a la reivindicación 3 o 4, en donde el nivel de ergovalina es de menos de 0.4 ppm en materia seca en hierbas, diferentes de la corona de la planta de pasto huésped, consumida por los animales de pastura.
- 30 6. Un endófito de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en donde la tensión abiótica es un déficit de agua.
- 35 7. Un cultivo endófito de las especies *Neotyphodium coenophialum*, seleccionado del grupo que consiste de: AR512; AR513; AR514; AR517; AR521; AR522; AR524; AR525; AR535; AR539; y combinaciones de éstos; AR512; AR513; AR514; AR517; AR521; AR522; AR524; AR525; AR535; AR539 que son cultivos depositados el 2 de octubre del 2002 en los Laboratorios Analíticos del Gobierno de Australia (AGAL) con números de acceso: NM02/31935; NM02/31936; NM02/31937; NM02/31938; NM02/31939; NM02/31940; NM02/31941; NM02/31942; NM02/31943; NM02/31944; **caracterizados** porque, en combinación con un pasto huésped, dicho cultivo de endófito no causa síntomas de toxicosis en animales de pastura;
- 40 en donde: dicho cultivo de endófito retiene los niveles protectores de por lo menos dos alcaloides seleccionados del grupo que consiste de: agroclavina; setoclavina; isosetoclavina; y combinaciones de éstos, para proteger de esta manera el pasto huésped de las plagas o las tensiones abióticas o ambos.
- 45 y el pasto huésped es artificialmente inoculado con el endófito.
8. Un cultivo de endófito de acuerdo a la reivindicación 7, en donde el cultivo de endófito es un cultivo axénico.
9. Un cultivo de endófito de acuerdo a la reivindicación 7 u 8, en donde la toxicosis es toxicosis de cañuela.
- 50 10. Un cultivo de endófito de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, en donde la toxicosis se origina por ergovalina.
- 55 11. Un cultivo de endófito de acuerdo a la reivindicación 9 o 10, en donde el nivel de ergovalina es de menos de 0.4 ppm en materia seca en hierba consumida por animales de pastura.
12. Un cultivo de endófito de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, en donde el nivel de ergovalina es de menos de 0.4 ppm en materia seca en hierba, diferente de la corona de la planta de pasto huésped, consumida por animales de pastura.
- 60 13. Un cultivo de endófito de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 7 a 12, en donde la tensión abiótica es un déficit de agua.
14. Una combinación de un endófito de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, y un pasto huésped.
- 65 15. Una combinación de un cultivo de endófito de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 7 a 13, y un pasto huésped.

ES 2 322 141 T3

16. Una combinación de acuerdo a la reivindicación 14 o 15, en donde dicha combinación se logra mediante la modificación de pasto huésped infectado con el endófito o el cultivo de endófito mediante los métodos seleccionados del grupo que consiste de: crianza; cruce; hibridización; modificación genética; y combinaciones de éstos.

5 17. Una combinación de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 14 a 16, en donde dicho pasto huésped se selecciona del grupo que consiste de: cultivar de pasto cañuela alto; cultivar de pasto centeno; cultivar de cañuela de pradera; y combinaciones de éstos.

10 18. Una combinación de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 14 a 16, en donde dicho pasto huésped es un pasto Pooideae.

15 19. Una combinación de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 14 a 18, en donde la combinación produce isosetoclavina y setoclavina a una tasa mayor de 0.5 ppm cada una de la materia seca en las coronas de la planta de pasto huésped.

20 20. Una combinación de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 14 a 19, en donde la combinación produce menos de 0.2 ppm de materia seca de ergovalina en hierba completa.

25 21. Una combinación de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 14 a 20, en donde la combinación tiene por lo menos una característica seleccionada del grupo que consiste de: mejoramiento de protección de plaga; resistencia a insectos; persistencia a la pastura; y una combinación de ésta.

30 22. Una combinación de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 14 a 21, en donde la combinación tiene las características de mejoramiento de crecimiento de animal de pastura y/o productividad mejorada de animal relativa al pasto infectado con endófitos conocidos capaces de inducir toxicosis de cañuela.

35 23. Una combinación de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 14 a 22, en donde la plaga, a la cual se le confiere resistencia mejorada sobre el pasto huésped, se selecciona del grupo que consiste de: nematodo de lesión; áfido de raíz; escarabajo pulga de maíz; y combinaciones de éstos.

40 24. Semilla de un pasto huésped **caracterizada** porque las semillas son de un pasto huésped, la semilla y el pasto huésped se infectan con un endófito de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.

45 25. Semilla de un pasto huésped **caracterizada** porque las semillas provienen de un pasto, la semilla y el pasto se infectan con un cultivo de endófito de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 7 a 13.

50

55

60

65

70

75