

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 828 223**

51 Int. Cl.:

A01N 63/30 (2010.01)

A01H 17/00 (2006.01)

C12R 1/645 (2006.01)

C12N 1/14 (2006.01)

A01P 3/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.03.2014** **PCT/IB2014/059479**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.09.2014** **WO14136070**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.03.2014** **E 14760058 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.08.2020** **EP 2964017**

54 Título: **Endófitos fúngicos**

30 Prioridad:

06.03.2013 US 201361773722 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
25.05.2021

73 Titular/es:

GRASSLANZ TECHNOLOGY LIMITED (50.0%)
10 Bisley Road
Hamilton 3240, NZ y
THE GRAINS RESEARCH AND DEVELOPMENT
CORPORATION (50.0%)

72 Inventor/es:

HUME, DAVID, EDWARD;
JOHNSON, RICHARD, DAVID;
SIMPSON, WAYNE, ROYDON y
CARD, STUART, DOUGLAS

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 828 223 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 fúngicos

Campo técnico

5 La presente invención se refiere en general a un endófito epichloae que forma una asociación simbiótica estable con el centeno (*Secale cereale*).

Antecedentes de la invención

10 *Secale cereale*, comúnmente conocido como centeno, se cultiva en todo el mundo, normalmente para la producción de grano. El grano se utiliza principalmente para hacer harina, pan y para consumo directo, particularmente en aquellos países que tienen una tradición de consumo de pan de centeno. Las porciones vegetativas de *S. cereale* se pueden utilizar como paja o convertir en ensilaje, para uso como forraje para animales, incluido el pastoreo *in situ*.

15 Como se ha señalado anteriormente, el centeno se cultiva principalmente para grano. Por lo tanto, se requiere una protección eficaz contra las plagas durante el cultivo para garantizar que se produce una cantidad adecuada de grano de calidad aceptable. El centeno se considera típicamente un cultivo otoñal con semillas que generalmente se siembran en otoño. La rotación de cultivos con otros cereales o campos de cultivo se pueden utilizar para reducir la acumulación de plagas y/o enfermedades fúngicas presentes en el suelo o que se desarrollan en los restos de los cultivos.

Las principales plagas del centeno incluyen, pero no se limitan a, pulgones; arañas; gusanos alambre y larvas blancas de Phyllophaga; larvas de tiúlidos (*Tipula* spp.); mosca del trigo (*Delia coarctata*); minadores de hojas (*Agromyza* spp.); mosca frit (*Oscinella frit*); zebro del cereal (*Zabrus tenebrioides*); mosca de las agallas (*Haplodiplosis marginata*); escarabajos de las hojas de cereales (*Oulema melanopus*, *O. gallaeciana*); nematodos; y babosas.

20 Los métodos conocidos para el control de plagas en el centeno incluyen algunos o todos los siguientes procedimientos: el uso de cultivares resistentes a las plagas, la optimización del momento de la siembra y la siembra con semillas sanas, la rotación efectiva de cultivos, la destrucción y/o el entierro o la eliminación de los restos de cultivos (rastros). Métodos adicionales para el control de plagas que pueden ser necesarios incluyen el uso de diversos pesticidas sobre las plantas y/o semillas. En ocasiones, puede ser necesaria una aplicación simultánea de dos o más sustancias activas para el control de plagas.

25 Sin embargo, el uso de muchos pesticidas puede resultar problemático debido a los problemas conocidos asociados con los productos químicos que se utilizan con frecuencia para tales fines. Muchos pesticidas son tóxicos y pueden ser peligrosos para los consumidores humanos y animales de cultivos agrícolas tratados (Casida y Quistad, 1998). En particular, una acumulación en humanos y en animales de plaguicidas tóxicos puede provocar graves problemas de salud en los individuos, especialmente durante un desarrollo temprano. Por ejemplo, la exposición a plaguicidas se ha relacionado con trastornos respiratorios, desarrollo de cánceres y se ha mostrado que tiene efectos duraderos sobre el desarrollo de las capacidades mentales. Zejda *et al.* (1993).

30 El uso de plaguicidas puede ser difícil de controlar en condiciones ambientales variables que conducen a una dispersión no deseada de compuestos tóxicos, por ejemplo, mediante el arrastre de aerosoles o por lixiviación en el suelo. Además, las plagas pueden desarrollar resistencia a los plaguicidas por diversas razones, incluida una práctica y un manejo incorrectos, que pueden representar una amenaza real para el rendimiento de los cultivos (cereales). Por consiguiente, existe una necesidad de medidas de control de plagas que no utilicen la aplicación de pesticidas.

El documento WO 02/13616 describe métodos para la inoculación de endófitos y pruebas para analizar una infección estable.

40 El documento WO 2008/100892 proporciona una lista de pastos de Triticeae en los que se pueden introducir endófitos.

Es un objeto de la presente invención proporcionar al menos una cepa de endófito fúngico epichloae que cuando se combina con al menos una especie de *Secale* spp., confiere al menos cierto nivel de protección contra las plagas a la planta de *Secale* spp. y/o proporciona a la sociedad una opción útil.

45 En esta memoria descriptiva, en la que se ha hecho referencia a memorias descriptivas de patentes, a otros documentos externos u otras fuentes de información, esto se realiza generalmente con el fin de proporcionar un contexto para analizar las características de la invención. A menos que se indique específicamente lo contrario, una referencia a esos documentos externos no debe interpretarse como una admisión de que tales documentos, o tales fuentes de información, en cualquier contexto, sean técnica anterior o formen parte del conocimiento general común en la técnica.

50 Compendio de la invención

En un primer aspecto, la presente invención se refiere a una cepa aislada de un endófito fúngico epichloae, seleccionada a partir del grupo que consiste en AR3039 (NRRL n° 50716), AR3046 (NRRL n° 50576), AR3049 (NRRL n° 50577), AR3050 (NRRL n° 50578), AR3064 (NRRL n° 50718), AR3067 (NRRL n° 50719), AR3068 (NRRL

nº 50720), AR3073 (NRRL nº 50721), AR3074 (NRRL nº 50722), AR3076 (NRRL nº 50723) y AR3078 (NRRL nº 50724) y combinaciones de las mismas. Preferiblemente, la invención se refiere a las cepas AR3039, AR3046, AR3050, AR3067, AR3068, AR3074 y AR3078, preferiblemente a AR3046, AR3050 o AR3068.

La cepa aislada puede ser biológicamente pura.

- 5 La invención también se refiere a una planta de *Secale* spp. infectada con un endófito fúngico de la invención. Opcionalmente el *Secale* spp. no es un hospedador natural del endófito, y la planta y el endófito forman una asociación simbiótica estable que permite que la planta se desarrolle durante un ciclo de vida normal.

10 En una realización, el endófito se transmite desde una primera generación de *Secale* spp. a una segunda generación de *Secale* spp. mediante transmisión vertical. Preferiblemente, la transmisión vertical desde una primera generación de la planta hospedadora a una segunda generación de la planta hospedadora es mediante semillas.

15 En una realización, el endófito es un endófito aislado a partir de *Elymus* spp. Preferiblemente, el endófito se aísla a partir de *Elymus mutabilis*. El endófito es un endófito epichloae. Preferiblemente, el endófito epichloae es una cepa de endófito epichloae seleccionada a partir del grupo que consiste en AR3039 (NRRL nº 50716), AR3046 (NRRL nº 50576), AR3049 (NRRL nº 50577), AR3050 (NRRL nº 50578), AR3064 (NRRL nº 50718), AR3067 (NRRL nº 50719), AR3068 (NRRL nº 50720), AR3073 (NRRL nº 50721), AR3074 (NRRL nº 50722), AR3076 (NRRL nº 50723) y AR3078 (NRRL nº 50724), o combinaciones de las mismas. Preferiblemente, la invención se refiere a las cepas de endófito AR3039, AR3046, AR3050, AR3067, AR3068, AR3074 y AR3078, preferiblemente a AR3046, AR3050 o AR3068.

En una realización, el *Secale* spp. infectado con el endófito fúngico no muestra síntomas externos de infección endófito.

En una realización, el *Secale* spp. infectado con el endófito fúngico muestra un fenotipo morfológico normal.

- 20 El *Secale* spp. infectado con el endófito fúngico puede producir los alcaloides de lolina y/o peramina.

En una realización, el *Secale* spp. infectado con el endófito fúngico tiene una mayor resistencia frente a una o más plagas o una mayor resistencia frente a enfermedades vegetales o frente a ambas, en comparación con *Secale* spp. que no está infectado con un endófito fúngico.

25 En una realización, *Secale* spp. infectado con el endófito fúngico tiene una mayor resistencia frente a una o más plagas, en donde una o más plagas se seleccionan a partir del grupo que consiste en: (1) especies de pulgones (Aphididae) representadas por *Rhopalosiphum padi*, *Schizaphis graminum*, *Rhopalosiphum maidis*, *Metopolophium dirhodum*, *Sitobion* spp., *Sitobion avenae*, *Sitobion fragariae*, *Diuraphis noxis*; (2) especies de moscas de pastos y de cereales (Agromyzidae; Anthomyiidae, Chloropidae, Cephidae y Cecidomyiidae) representadas por *Oscinella frit*, *Oscinella pusilla*, *Mayetiola destructor*, *Cerodontha* spp., *Cerodontha australis*, *Cerodontha angustipennis*, *Formia fumigata*, *Meromyza americana*, *Haplodiplosis marginata*, *Chlorops pumilionis*, *Tipula* spp. *Chromatomyia fuscata*, *Cephus pygmaeus*, *Chromatomyia fuscata*, *Contarinia tritici*; (3) especies de arañuelas (Thripidae) representadas por *Limothrips cerealeum*, *Limothrips denticornis*, *Aptinothrips rufus*, *Stenothrips graminum*; (4) especies de saltamontes y grillos (Acrididae y Gryllidae) representadas por *Locusta migratoria*, *Phaulacridium marginale*, *Phaulacridium vittatum*, *Melanoplus* spp., *Teleogryllus commodus*; (5) especies de chinches (Lygaeidae) representadas por *Nyssius huttoni*, *Blissus leucopertus leucopertus*; (6) especies de gorgojos (Curculionidae) representadas por *Sphenophorus* spp.; (7) especies de gusano cogollero y gusano cortador (Noctuidae) representadas por *Pseudaletia unipuncta*, *Spodoptera* spp., *Mythimna separata*, *Persectania aversa*, *Agrostis ipsilon*; (8) especies de escarabajos de las hojas (Chrysomelidae) representadas por *Oulema melanopus*; (9) especies de larvas blancas (Scarabaeidae) representadas por *Popillia japonica*, *Costelytra zealandica*, *Phyllopertha* spp., *Rhizotrogus majalis*, *Anisoplia segetum*; (10) especies de cochinillas (Pseudococcidae y Coccidae) representadas por *Phenacoccus hordei*, *Balanococcus poae*, *Ripersella rumicis*, *Porphyrophora tritici*; (11) especies de gusanos alambre (Elateridae) representadas por *Conoderus* spp., *Limonius* spp.; especies de escarabajos (Carabidae) representadas por *Zabrus tenebrioides*; (13) especies de ácaros (Eriophyidae y Penthaleidae) representadas por *Penthaleus* spp., *Halotydeus destructor*, *Aceria* spp.; (14) especies de plagas de alimentos almacenados (Curculionidae, Silvanidae, Pyralidae, Gelechiidae, Tenebrionidae, Bostrichidae) representadas por *Sitophilus oryzae*, *Sitophilus granarius*, *Sitotroga cerealella*, *Rhyzopertha dominica*, *Cryptolestes* spp., *Oryzaephilus surinamensis*, *Cadra cautella*, *Plodia interpunctella*, *Tribolium confusum*, *Tribolium castaneum*, *Lasioderma erraticum*; (15) especies de cigarras (Cercopoidea) representadas por *Philaenus spumarius* (16); especies de nematodos representadas por nematodos lesionadores de raíces (*Pratylenchus* spp., particularmente *P. thornei*, *P. crenatus*, *P. neglectus* y *P. penetrans*), nematodo del quiste de cereales (*Heterodera* spp. y *Punctodera* spp., particularmente *H. avenae*, *H. latipons*, *H. hordecalis*, *H. filipjevi*, *H. mani*, *H. bifenestra*, *H. pakistanensis* y *P. punctata*), nematodo agallador (*Meloidogyne* spp., particularmente *M. chitwoodi*, *M. naasi*, *M. artiellia*, *M. microtyla*, *M. ottersoni*, *M. graminicola*, *M. graminis*, *M. kikuyensis* y *M. spartinae*), nematodo del tallo (*Ditylenchus* spp., particularmente *D. dipsicai* y *D. radiculicola*); nematodo de agallas en la semilla (*Anguina tritici*); (17) especies de babosas (*Deroceras reticulatum*, y *Arion* spp. particularmente *A. hortensis* agg. y *A. subfuscus*). En una realización, las plagas son nematodos, preferiblemente nematodos lesionadores de raíces (*Pratylenchus* spp.), o moscas minadoras de hojas, *Cerodontha australis* (Diptera: Agromyzidae), también conocidas como minadoras de la vaina del trigo.

55

En una realización, el *Secale* spp. infectado con el endófito fúngico tiene una mayor resistencia frente a una

enfermedad vegetal, en donde la enfermedad vegetal está causada por un agente patógeno vegetal seleccionado a partir del grupo que consiste en el virus del enanismo amarillo de la cebada (Leteovirus), el virus del mosaico del trigo transmitido por el suelo (Furovirus) y el virus del mosaico estriado del trigo (Tritimovirus), *Xanthomonas campestris*, *Pseudomonas syringae*, *Colletotrichum graminicola*, *Glomerella graminicola* [teleomorfo], *Alternaria* spp., *Cladosporium herbarum*, *Mycosphaerella tassiana* [teleomorfo], *Epicoccum* spp., *Sporobolomyces* spp., *Stemphylium* spp., *Bipolaris sorokiniana*, *Cochliobolus sativus* [teleomorfo], *Fusarium* spp., *Tilletia caries*, *Tilletia tritici*, *Tilletia laevis*, *Tilletia foetida*, *Hymenula cerealis*, *Cephalosporium gramineum*, *Helminthosporium sativum*, *Cochliobolus sativus* [teleomorfo], *Coprinus sychromorbidus*, *Dilophospora alopecuri*, *Tilletia controversa*, *Claviceps purpurea*, *Sphacelia segetum* [anamorfo], *Fusarium culmorum*, *Pseudoseptoria donacis*, *Selenophoma donacis*, *Neovossia indica*, *Tilletia indica*, *Puccinia recondita*, *Aecidium clematidis* [anamorfo], *Cercosporidium graminis*, *Scolicotrichum graminis*, *Phaeosphaeria herpotrichoides*, *Leptosphaeria herpotrichoides*, *Ustilago tritici*, *Microdochium nivale*, *Fusarium nivale*, *Monographella nivalis* [teleomorfo], *Erysiphe graminis*, *Pythium aphanidermatum*, *Pythium arrhenomanes*, *Pythium debaryanum*, *Pythium graminicola*, *Pythium ultimum*, *Gibberella zeae*, *Fusarium graminearum* [anamorfo], *Septoria secalis*, *Septoria tritici*, *Mycosphaerella graminicola* [teleomorfo], *Rhizoctonia cerealis*, *Rhizoctonia solani*, *Rhizoctonia zeae*, *Blumeria* spp., *Ceratobasidium cereale* [teleomorfo], *Myriosclerotinia borealis*, *Sclerotinia borealis*, *Typhula idahoensis*, *Typhula incarnate*, *Typhula ishikariensis*, *Typhula ishikariensis* var. *canadensis*, *Stagonospora nodorum*, *Septoria nodorum*, *Phaeosphaeria nodorum* [teleomorfo], *Leptosphaeria nodorum*, *Urocystis occulta*, *Puccinia graminis*, *Aspergillus* spp., *Nigrospora* spp., *Penicillium* spp., *Rhizopus* spp., *Pseudocercospora herpotrichoides*, *Tapesia acuformis* [teleomorfo], *Uredo glumarum* [anamorfo], *Pyrenophora tritici-repentis*, *Drechslera tritici-repentis* [anamorfo], *Helminthosporium tritici-repentis*, *Puccinia triticina*, *Pythium* spp., *Rhynchosporium secalis*, *Puccinia striiformis*, *Gaeumannomyces graminis* y *Fusarium pseudograminearum*.

Preferiblemente, el agente patógeno vegetal es *Puccinia recondita*, *Puccinia triticina*, *Puccinia graminis*, *Fusarium* spp., *Pythium* spp., *Rhynchosporium secalis*, *Puccinia striiformis*, *Gaeumannomyces graminis*, *Rhizoctonia solani* o *Fusarium pseudograminearum*.

En una realización, el *Secale* spp. infectado con el endófito fúngico se selecciona a partir del grupo que consiste en *Secale cereale*, *Secale montanum*, *Secale strictum*, *Secale sylvestre* y *Secale vavilovii*. Preferiblemente el *Secale* spp. es *Secale cereale*.

La invención también se refiere a un método para preparar una combinación estable de planta hospedadora/endófito fúngico epichloae que comprende infectar artificialmente una planta de *Secale* spp. con al menos un endófito fúngico de la invención que forma una combinación estable con la planta inoculada, en donde la planta hospedadora no muestra síntomas externos de infección endófito.

En una realización, la combinación estable de planta/hongo es suficientemente estable para permitir una transmisión vertical del endófito. Una transmisión vertical puede ser mediante hijuelos, particularmente por hijuelos florales en la semilla, o mediante propágulos. Preferiblemente, la transmisión vertical desde una primera generación de una planta hospedadora a una segunda generación de una planta hospedadora es mediante semillas.

En una realización, la transmisión vertical del endófito da como resultado la transmisión vertical del endófito desde una primera generación a una segunda generación de plantas hospedadoras. Preferiblemente, la transmisión vertical desde una primera generación de una planta hospedadora a una segunda generación de una planta hospedadora es mediante semillas.

El método puede comprender la etapa de seleccionar una planta de *Secale* hospedadora que no muestra síntomas externos de infección endófito a partir de una población de plantas hospedadoras infectadas.

La descripción también se refiere a un método para conferir al menos algún nivel de protección contra plagas a una planta de *Secale* spp. hospedadora que comprende infectar artificialmente una planta de *Secale* spp. con al menos un endófito fúngico epichloae, en donde la combinación de endófito fúngico - planta de *Secale* produce al menos un alcaloide a un nivel suficiente para conferir al menos algún nivel de protección contra plagas a la planta hospedadora.

La descripción también se refiere a un método para conferir protección contra plagas a una planta de *Secale* spp. hospedadora que comprende infectar artificialmente una planta de *Secale* spp. con al menos un endófito fúngico epichloae, en donde la combinación de endófito fúngico - planta de *Secale* produce al menos un alcaloide que confiere dicha protección contra plagas a la planta hospedadora.

El al menos un alcaloide puede ser un alcaloide seleccionado a partir del grupo que consiste en peramina, *N*-acetilnorlolina, lolina, *N*-formil-lolina, *N*-acetil-lolina y *N*-metil-lolina.

El al menos un alcaloide puede ser belolina o peramina o ambas.

La lolina se puede producir a un nivel de al menos 25 ug/g.

La lolina se puede producir al nivel tal y como se muestra en la Tabla 7 para la lolina.

La lolina se puede producir en un intervalo desde al menos 25 ug/g a aproximadamente 3660 ug/g.

La peramina se puede producir a un nivel de al menos 1 ug/g.

La peramina se puede producir a un nivel tal y como se muestra en la Tabla 7 para la peramina.

La peramina se puede producir en un intervalo desde al menos 1 ug/g a aproximadamente 45 ug/g.

5 La descripción también se refiere a un método que comprende la etapa de seleccionar una combinación de endófito fúngico - planta de *Secale* que produce al menos un alcaloide a un nivel suficiente para conferir al menos cierto nivel de protección contra plagas a la planta hospedadora.

10 La descripción también se refiere a una semilla de *Secale* spp. infectada con un endófito fúngico epichloae. Preferiblemente la semilla de *Secale* spp. es una semilla de un *Secale* spp. seleccionado a partir del grupo que consiste en *Secale cereale*, *Secale montanum*, *Secale strictum*, *Secale sylvestre* y *Secale vavilovii*. Más preferiblemente, la semilla es una semilla de *Secale cereale*.

El *Secale* spp. se puede seleccionar a partir del grupo que consiste en *Secale cereale*, *Secale montanum*, *Secale strictum*, *Secale sylvestre* y *Secale vavilovii*. Preferiblemente, el *Secale* spp. es *Secale cereale*.

El al menos un endófito fúngico puede ser un endófito aislado a partir de *Elymus* spp.

15 Preferiblemente, el endófito fúngico se aísla a partir de *Elymus mutabilis*. El endófito fúngico es un endófito epichloae y se selecciona a partir del grupo que consiste en AR3039 (NRRL nº 50716), AR3046 (NRRL nº 50576), AR3049 (NRRL nº 50577), AR3050 (NRRL nº 50578), AR3064 (NRRL nº 50718), AR3067 (NRRL nº 50719), AR3068 (NRRL nº 50720), AR3073 (NRRL nº 50721), AR3074 (NRRL nº 50722), AR3076 (NRRL nº 50723) y AR3078 (NRRL nº 50724) y combinaciones de las mismas. Preferiblemente, la invención se refiere a las cepas AR3039, AR3046, AR3050, AR3067, AR3068, AR3074 y AR3078, preferiblemente a AR3046, AR3050 o AR3068.

20 **Breve descripción de los dibujos**

La invención y la descripción se describirán a continuación solo a modo de ejemplo y haciendo referencia a los dibujos en los que:

La Figura 1 muestra un dendrograma de relaciones filogenéticas basadas en los tamaños de los alelos SSR tal y como se indican en la tabla 2.

25 La Figura 2 muestra cuatro plantas del cultivar *Rahu* de *Secale cereale*; uno no infectado (E-); y tres infectados con AR3046. De izquierda a derecha: morfología normal, enana y atrofiada. Las plantas normales y enanas infectadas con E- y AR3046 muestran la aparición de floración, las atrofiadas no.

30 La Figura 3 muestra la cantidad de espuma o el número de cigarras espumadoras/planta observado en plantas del cultivar *Rahu* de *Secale cereale*, infectadas con el endófito AR3046 (*Rahu* AR3046), y en plantas no infectadas (*Rahu* Nil). También se muestra la cantidad de espuma o el número de cigarras espumadoras/planta observado en plantas de cañuela (*Festuca pratensis* syn. *Lolium pratense* syn. *Schedonorus pratensis*) infectadas con su endófito natural, *Neotyphodium uncinatum* (MF E+) y en plantas no infectadas (MF E-).

La Figura 4 muestra ciertas cepas endófitas que inhibían significativamente ($P \leq 0,05$) el crecimiento del micelio de *Fusarium graminearum* en un cultivo doble (datos de una investigación no publicada de Stuart Card, AgResearch Ltd).

35 La Figura 5 muestra cepas endófitas de cereales que inhibían significativamente ($P \leq 0,05$) el crecimiento del micelio de *Rhizoctonia solani* en un cultivo doble (datos de una investigación no publicada de Stuart Card, AgResearch Ltd).

Descripción detallada de la invención

Definiciones

40 Las siguientes definiciones se presentan para definir mejor la presente invención y la descripción y como una guía para los expertos en la técnica en la puesta en práctica de la presente invención.

A menos que se especifique lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en este documento deben entenderse como que tienen los mismos significados que como los entiende un experto en la técnica relevante a la que pertenece esta descripción. Se pueden encontrar ejemplos de definiciones de términos comunes en botánica, microbiología, biología molecular y bioquímica en Biology of Plants, Raven et al. (compiladores), W.H. Freeman and Company, (2005); Plant Physiology, Taiz et al. (compiladores), Sinauer Associates, Incorporated, (2010); Botany: An Introduction to Plant Biology, J.D. Mauseth, Jones & Bartlett Learning, (2003); Methods for General and Molecular Microbiology, 3ª edición, C. A. Reddy, et al. (compiladores), ASM Press, (2008); Encyclopedia of Microbiology, 2ª ed., Joshua Lederberg, (compilador), Academic Press, (2000); Microbiology By Cliffs Notes, I. Edward Alcamo, Wiley, (1996); Dictionary of Microbiology and Molecular Biology, Singleton et al. (2ª ed.) (1994); Biology of Microorganisms 11ª ed., Brock et al., Pearson Prentice Hall, (2006); Biodiversity of Fungi: Inventory and Monitoring Methods, Mueller et al., Academic Press, (2004); Genes IX, Benjamin Lewin, Jones & Bartlett Publishing, (2007); The

Encyclopedia of Molecular Biology, Kendrew et al. (compiladores), Blackwell Science Ltd., (1994); Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference, Robert A. Meyers (compilador), VCH Publishers, Inc., (1995); Symbioses of grasses with seedborne fungal endophytes. Schardl CL et al. (2004) Annual Review of Plant Biology 55: 315-340; y Chemotype diversity of epichloae, fungal symbionts of grasses, Schardl CL, Young CA, Faulkner JR, Florea S, Pan J (2012) Fungal Ecology 331-344 (Schardl et al., 2012).

También se cree que la puesta en práctica de la presente invención se puede realizar usando protocolos y procedimientos botánicos, microbiológicos, de biología molecular y bioquímica convencionales, tal y como se conocen en la técnica, y tal y como se describen, por ejemplo, en Methods of Studying Root Systems, vol. 33, Wolfgang Böhm, Springer-Verlag, (1979); Root methods: A Handbook, Albert L. Smit Springer, (2000); Biodiversity of Fungi: Inventory and Monitoring Methods, Mueller et al., Academic Press, (2004); Environmental Microbiology: Methods and Protocols, J. F. T. Spencer et al., Humana Press, (2004); Environmental Microbiology, P. D. Sharma, Alpha Science International, (2005); Environmental Microbiology, J.R. Leadbetter, Gulf Professional Publishing, (2005), Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Maniatis et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press, (1982); Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2ª ed.), Sambrook et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press, (1989); Guide to Molecular Cloning Techniques vol. 152, S. L. Berger y A. R. Kimmel (compiladores), Academic Press Inc., (1987); Biotechnology of Endophytic Fungi of Grasses. 1994 Bacon y White (compiladores), y otros materiales de referencia comúnmente disponibles, relevantes en la técnica a la que pertenece esta descripción.

El término "planta", tal y como se usa en este documento, incluye plantas completas y todas las partes de una planta procedentes de todas las etapas del ciclo de vida de una planta, incluyendo, entre otras, células y tejidos vegetativos y reproductores, propágulos, semillas, embriones, brotes, tallos, hojas, vainas de hojas y láminas, inflorescencias, raíces, anteras, lígulas, parénquima en empalizada, mesófilo, epidermis, aurículas, pálea, lema e hijuelos.

El término "epichloae", tal y como se usa en este documento se refiere a un grupo colectivo de endófitos fúngicos que contienen dos géneros de endófitos fúngicos: los miembros del género de forma anamórfica *Neotyphodium* y los miembros del género teleomórfico *Epichloë*.

La expresión "endófito epichloae", tal y como se usa en este documento se refiere a un endófito del grupo "epichloae" que es bien conocido en la técnica, o que se ha mostrado en el presente documento, por formar una asociación simbiótica con una planta hospedadora.

La expresión "conferir al menos algún nivel de protección contra plagas", tal y como se usa en este documento incluye una reducción medible de la incidencia, gravedad y/o duración de los efectos de una plaga sobre una planta de *Secale* spp. Preferiblemente, una reducción medible es una reducción estadísticamente significativa con un valor de P de 0,05 o menos.

La expresión "un nivel suficiente para conferir protección contra plagas", tal y como se usa en este documento haciendo referencia a los niveles de alcaloides, significa cualquier nivel de un alcaloide producido por la simbiosis de una planta-endófito que es suficiente para producir una reducción medible de la incidencia, gravedad o duración de una infección por una infestación con plagas o un efecto perjudicial sobre una planta de *Secale* spp. hospedadora que está infectada con un endófito fúngico de acuerdo con la invención. Preferiblemente, el alcaloide es peramina o lolina o un derivado de lolina. Preferiblemente, una reducción medible es una reducción estadísticamente significativa con un valor de P de 0,05 o menos.

La expresión "estadísticamente significativo", tal y como se usa en el presente documento, se refiere a la probabilidad de que un resultado o una relación esté causado por algo diferente al azar. Se puede encontrar que un resultado es estadísticamente significativo usando pruebas de hipótesis estadísticas tal y como se conocen y se usan en la técnica. Una prueba de hipótesis estadística proporciona un "valor de P" tal y como se conoce en la técnica, que representa la probabilidad de que el resultado medido se deba únicamente al azar. Se cree que está generalmente aceptado en la técnica que unos niveles de significación del 5% (0,05) o inferiores se consideran estadísticamente significativos.

La expresión "protección mejorada contra plagas", tal y como se usa en este documento, se refiere a un nivel de protección contra plagas conferido a una planta de *Secale* spp. en asociación simbiótica con un endófito fúngico epichloae que reduce la incidencia, la gravedad y/o la duración de una infestación, infección o efecto perjudicial de una plaga sobre la planta debido a la presencia y/o la actividad de una plaga determinada, en comparación con la incidencia, la gravedad y/o la duración de la misma infestación, infección y/o efecto perjudicial de una plaga sobre una planta de *Secale* spp. que carece de un endófito fúngico (una planta de control), y/o una planta de *Secale* spp. que tiene un endófito fúngico diferente.

Las expresiones "que infecta artificialmente" e "inoculación artificial", tal y como se usan en este documento incluyen cualquier inoculación de una planta, particularmente una planta de *Secale* spp., particularmente *Secale cereale*, con un endófito fúngico para formar una asociación simbiótica de planta/hongo que no se conoce en la naturaleza.

La expresión "in planta", tal y como se usa en este documento en el contexto de endófitos fúngicos, se refiere al endófito cuando vive simbióticamente dentro de una planta hospedadora.

La expresión "simbiosis estable de planta/hongo", tal y como se usa en este documento, se refiere a una asociación simbiótica que persiste a lo largo del ciclo vital de la planta, en donde la planta no muestra síntomas externos de infección endófito. En una "combinación simbiótica estable", la planta hospedadora se infecta con el endófito en una primera generación y produce semillas que, cuando germinan, se convierten en una segunda generación de plantas hospedadoras que también están infectadas con el endófito.

La expresión "ciclo vital normal", tal y como se usa en este documento, se refiere al ciclo reproductivo normal de *Secale* que incluye el crecimiento de una primera generación de plantas para producir semillas que, cuando germinan, se convierten en una segunda generación de plantas.

La expresión "no muestra síntomas externos de infección endófito", tal y como se usa en este documento haciendo referencia a una planta hospedadora que comprende un endófito fúngico, significa que la planta hospedadora tiene un fenotipo morfológico sustancialmente normal tal y como se conoce en la técnica para esa planta hospedadora. En donde un "fenotipo morfológico sustancialmente normal" de una planta hospedadora tal y como se usa en este documento, se refiere a la morfología típica de la planta hospedadora tal y como se conoce y se acepta generalmente en la técnica para esa planta hospedadora, con un conjunto dado de condiciones de crecimiento.

La expresión "fenotipo normal" de una planta hospedadora, tal y como se usa en este documento, se refiere a la morfología típica, el crecimiento y otras características fenotípicas de la planta hospedadora tal y como se muestran durante el ciclo vital de la planta hospedadora, incluyendo el ciclo reproductivo de la planta hospedadora y la semilla de la planta hospedadora, tal y como se conoce y se acepta en general en la técnica para esa planta hospedadora cuando no contiene un endófito.

La expresión "fenotipo anormal" haciendo referencia a una planta hospedadora tal y como se usa en este documento, se refiere a la morfología, el crecimiento u otras características fenotípicas de la planta hospedadora en cualquier etapa del ciclo vital de la planta hospedadora, incluyendo el ciclo reproductivo de la planta hospedadora y la semilla de la planta hospedadora que es diferente de lo que se conoce y se acepta en general en la técnica como normal o dentro de la variedad observada generalmente para esa planta hospedadora. La expresión "fenotipo anormal" haciendo referencia a una planta hospedadora tal y como se usa en este documento, puede incluir plantas atrofiadas o plantas enanas o plantas con una evidencia externa visual obvia de una infección endófito o plantas que no logran completar la reproducción normal a través de semillas, pero no se limita a las mismas.

La expresión "que comprende", tal y como se usa en esta memoria descriptiva, significa "que consiste al menos en parte en". Al interpretar expresiones en esta memoria descriptiva que incluyen ese término, las características, precedidas por ese término en cada expresión, deben estar todas presentes, pero también pueden estar presentes otras características. Los términos relacionados tales como "comprenden" y "comprendido" deben interpretarse de la misma manera.

Descripción detallada

Muchos pastos de la estación fría (Poaceae, subfam. Pooideae) poseen endófitos fúngicos epichloae transmitidos por semillas que son conocidos por sus propiedades bioprotectoras, y especialmente por la producción de alcaloides anti-plagas como las lolinas (Zhang et al., 2010) y la peramina (Koulman et al., 2007). Los epichloae asexuales (especies de *Neotyphodium*) se transmiten primaria o totalmente de forma vertical, mientras que las estructuras sexuales (estromatas) de las especies de *Epichloë* relacionadas pueden dar lugar a esporas de transmisión horizontal (ascosporas) (Zhang et al., 2010).

La mayoría de las especies de *Neotyphodium* se consideran estrechamente relacionadas con las especies del género *Epichloë*. Muchas especies de *Neotyphodium* pueden haber evolucionado a partir de *Epichloë* por procesos que implican una hibridación interespecífica (Tsai et al., 1994). Basándose en una evidencia filogenética molecular, algunos autores consideran que las especies asexuales de *Neotyphodium* se obtienen a partir de especies de *Epichloë* individuales, o a partir de híbridos que comparten al menos dos especies ancestrales de *Epichloë* (Tsai et al., 1994; Moon et al., 2004). La taxonomía actual considera que los miembros del género de forma anamórfica *Neotyphodium* son miembros estrechamente relacionados dentro del género teleomórfico *Epichloë* (Glenn y col., 1996). Siguiendo los códigos anteriores de la nomenclatura botánica, un género de forma anamórfica se refiere a una espora asexual o un estado vegetativo, y un género teleomórfico se refiere al estado sexual. Actualmente, el código de la nomenclatura botánica trata un solo hongo con un solo protocolo de denominación (Miller et al. 2011). Colectivamente, los dos géneros, *Neotyphodium* y *Epichloë*, se conocen en la técnica como endófitos "epichloae".

Las asociaciones simbióticas entre los hongos epichloae y los pastos hospedadores son comunes, y una evidencia filogenética molecular sugiere que la especificidad de especie observada en esas asociaciones simbióticas se debe a la evolución conjunta de esos grupos de plantas y endófitos fúngicos (Schardl et al., 2008).

Ningún cereal cultivado moderno está infectado de forma natural con endófitos epichloae, aunque algunos miembros de la familia de tipo silvestre pueden estarlo (Marshall et al., 1999). Sin desear ceñirse a la teoría, los inventores creen que durante la evolución de los cereales modernos, las prácticas agrícolas, tales como el almacenamiento de semillas, pueden haber llevado a una pérdida de asociaciones históricas si es que existieron (Welty et al., 1987).

El establecimiento de una simbiosis estable de planta/hongo entre un endófito fúngico epichloae y una planta hospedadora que no es un hospedador natural del hongo, es problemático e impredecible (Simpson y Mace, 2012).

Se cree que esto se debe al requisito, en la formación de tales simbiosis, de una integración exitosa de múltiples variables biológicas entre los asociados que pueden incluir incompatibilidades ecológicas, bioquímicas y/o moleculares (Christensen et al., 2000). La presente descripción detalla el gran volumen de investigación requerido, incluida una experimentación significativa de prueba y error, para desarrollar protocolos y procedimientos exitosos mediante los cuales se han establecido asociaciones simbióticas estables entre ciertas cepas de endófitos fúngicos epichloae y plantas de *Secale* spp. hospedadoras que no son hospedadoras naturales de tales hongos.

Sorprendentemente, los inventores han determinado que una inoculación artificial se puede usar para establecer simbiosis estables de planta/hongo entre algunos endófitos fúngicos epichloae y plantas de *Secale* spp. hospedadoras. Mediante el uso de los métodos inventivos descritos en el presente documento, los inventores pueden producir plantas de *Secale* spp. hospedadoras que forman una asociación simbiótica estable con el hongo infectante, lo que permite que la planta infectada se desarrolle a través de un ciclo de vida normal y/o en donde la planta infectada no muestra síntomas externos de infección endófito. Además, los inventores han descubierto que el establecimiento de tales asociaciones simbióticas puede proporcionar al menos algún nivel de beneficio a la planta hospedadora, en términos de producción en la planta de al menos un alcaloide de lolina, un derivado del alcaloide lolina o peramina, o una combinación de los mismos que puede conferir al menos algún nivel de protección contra las plagas a la planta hospedadora.

Los inventores han determinado sorprendentemente que cierto material aislado a partir de endófitos fúngicos extraídos a partir de parientes silvestres de cereales, son adecuados para establecer simbiosis estables entre plantas y hongos con plantas de *Secale* spp. hospedadoras, particularmente *Secale cereale*. En particular, los inventores han establecido asociaciones simbióticas que dan como resultado una combinación de endófito fúngico-planta de *Secale* spp. hospedadora que puede tener al menos algún nivel de protección mejorada contra las plagas, en comparación con plantas de control de *Secale* spp.; es decir, plantas de la misma *Secale* spp. que no están infectadas con la misma cepa fúngica epichloae simbiótica. Sin desear estar ligado a ninguna teoría, los inventores creen que es de esperar una protección mejorada contra las plagas en las combinaciones de endófito fúngico/planta hospedadora que producen ciertos alcaloides, particularmente lolina, derivados de lolina y/o peramina. Por consiguiente, los inventores creen que la producción de los alcaloides lolina y/o peramina a través del endófito fúngico epichloae o la combinación de endófito fúngico/planta hospedadora, proporciona al menos cierto nivel de protección mejorada contra las plagas a la planta hospedadora. En particular, a raíz del uso de las cepas endófitas de la invención y los métodos descritos en este documento, los inventores han establecido que las plantas de *Secale* spp. hospedadoras, particularmente las plantas de *Secale cereale* hospedadoras, infectadas con ciertas cepas de endófito fúngico epichloae, tienen una protección mejorada contra los nematodos en comparación con las plantas de control de *Secale*.

En términos generales, las asociaciones simbióticas que se forman entre las plantas hospedadoras y sus endófitos fúngicos epichloae se basan en interacciones biológicas complejas e íntimas que conducen a un alto grado de especificidad de especie tanto para el endófito como para el hospedador (Simpson y Mace, 2012).

Como resultado de un extenso programa de investigación, los solicitantes han identificado por primera vez hongos epichloae capaces de formar simbiosis estables entre plantas y hongos con plantas de *Secale* spp. hospedadoras. Los solicitantes han identificado además endófitos capaces de conferir a una planta hospedadora infectada, cuando es en simbiosis con plantas de *Secale* spp. hospedadoras, particularmente plantas de *Secale cereale* hospedadoras, la capacidad de producir uno o más alcaloides que se sabe que proporcionan a la planta al menos algún nivel de protección mejorada contra las plagas, en comparación con una planta de control no infectada. En particular, ese uno o varios alcaloides pueden ser alcaloides de lolina, derivados de lolina o peramina.

Por consiguiente, en un aspecto, la presente invención se refiere a una cepa aislada de endófito fúngico epichloae, seleccionada a partir del grupo que consiste en AR3039 (NRRL nº 50716), AR3046 (NRRL nº 50576), AR3049 (NRRL nº 50577), AR3050 (NRRL nº 50578), AR3064 (NRRL nº 50718), AR3067 (NRRL nº 50719), AR3068 (NRRL nº 50720), AR3073 (NRRL nº 50721), AR3074 (NRRL nº 50722), AR3076 (NRRL nº 50723) y AR3078 (NRRL nº 50724) y combinaciones de las mismas. En una realización, la cepa aislada es biológicamente pura. Preferiblemente, la invención se refiere a las cepas AR3039, AR3046, AR3050, AR3067, AR3068, AR3074 y AR3078, preferiblemente a AR3046.

Las cepas endófitas fúngicas anteriores se depositaron en el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos, Área del Medio Oeste del Servicio de Investigación Agrícola, Centro Nacional de Investigación de Utilización Agrícola, 1815 North University Street, Peoria, Illinois, 61604-3902, EE.UU. el 13 de octubre de 2011, para las cepas:

AR3046 (NRRL nº 50576), AR3049 (NRRL nº 50577) y AR3050 (NRRL nº 50578), y el 6 de marzo de 2012 para las cepas AR3039 (NRRL nº 50716), AR3064 (NRRL nº 50718), AR3067 (NRRL nº 50719), AR3068 (NRRL nº 50720), AR3073 (NRRL nº 50721), AR3074 (NRRL nº 50722), AR3076 (NRRL nº 50723) y AR3078 (NRRL nº 50724), de acuerdo con el Tratado de Budapest para fines de procedimiento de patente.

Los endófitos se aislaron a partir de *Elymus spp.*, incluyendo *E. mutabilis*, obtenido a partir de ubicaciones en Kirguistán, Kazajistán, la URSS y Rusia, como se muestra en la Tabla 6.

Los endófitos anteriores se aislaron a partir de plantas infectadas con el endófito *Elymus spp.*, incluyendo *E. mutabilis*, después de una esterilización superficial del tejido vegetal como se ha descrito (Christensen et al., 2002).

- 5 Una vez aislado, el endófito fúngico aislado y/o biológicamente puro se puede cultivar usando técnicas convencionales tal y como se conocen en la técnica y tal y como se describen en el presente documento, incluyendo los ejemplos.

En una realización, el endófito fúngico se cultiva sobre agar de dextrosa de patata con antibiótico (ABPDA) entre 20°C y 25°C, preferiblemente entre 21°C y 23°C. La temperatura óptima para el crecimiento del endófito fúngico es de 22°C. El crecimiento del endófito fúngico a temperaturas por encima o por debajo de ese intervalo puede ser posible, aunque el crecimiento puede reducirse o cesar por completo. En una realización, el endófito fúngico se cultiva en la oscuridad.

La invención también se refiere a un método para proteger una planta de *Secale spp.* contra plagas que comprende infectar artificialmente una planta de *Secale spp.* con al menos un endófito fúngico epichloae de la invención, en donde el endófito fúngico *in planta* produce al menos un alcaloide a un nivel suficiente para conferir al menos cierto nivel de protección contra las plagas a la planta hospedadora. En una realización, el al menos un alcaloide es un alcaloide seleccionado a partir del grupo que consiste en peramina, *N*-acetilnorlolina, lolina, *N*-formil-lolina, *N*-acetil-lolina y *N*-metil-lolina.

La inoculación se puede realizar utilizando plántulas de *Secale spp.* que han germinado durante aproximadamente dos semanas. Preferiblemente, las plántulas han germinado durante 4 a 9 días.

- 20 Fuera de este intervalo de tiempo, las plántulas aún pueden formar asociaciones eficaces, pero en algunos casos pueden ser demasiado jóvenes o demasiado viejas para establecer el endófito fúngico. Las semillas deben estar exentas de hongos y bacterias que no son dianas para garantizar que las plántulas no se vean afectadas por una contaminación microbiana.

En una realización, la inoculación artificial se puede llevar a cabo utilizando una inoculación basal de las plántulas de *Secale spp.* Para establecer eficazmente la asociación de simbionte fúngico/planta de *Secale spp.* hospedadora, la inoculación del endófito debe realizarse en el meristemo de la planta hospedadora mediante una incisión de la planta y la inserción del micelio fúngico cultivado.

Los que están familiarizados con las técnicas de resistencia natural a las plagas y la protección de pastos, saben que los endófitos epichloae que crecen simbióticamente con plantas herbáceas hospedadoras pueden conferir alguna protección contra las plagas después de la combinación. En particular, se sabe que los alcaloides de lolina y el alcaloide peramina confieren algo de esa protección sin una toxicidad marcada o conocida para los mamíferos o los seres humanos que consumen los pastos o productos obtenidos indirectamente a partir del consumo de los pastos.

Las lolinas son un grupo de productos naturales bioactivos relacionados que comparten características químicas y biológicas definidas. Las lolinas son alcaloides, es decir, compuestos orgánicos que contienen átomos de nitrógeno básicos y se definen químicamente como 1-aminopirrolizidinas saturadas con un puente de éter interno que une dos carbonos de un anillo (C-2 a C-7). El puente de éter interno, que es poco común en compuestos orgánicos, se considera una característica distintiva del grupo. Las lolinas específicas incluyen norlolina y derivados de su resto 1-amino que es una lolina (con un grupo metilo), *N*-metil-lolina (con dos grupos metilo, NML), *N*-acetilnorlolina (con un grupo acetilo, NANL), *N*-acetil-lolina (con un grupo metilo y un grupo acetilo, NAL) y *N*-formil-lolina (con un grupo formilo, NFL) (Schardl et al., 2007; Schardl et al., 2012).

Se sabe que las lolinas son compuestos generalmente pesticidas y que contienen las plagas, producidos en pastos infectados por simbiontes de hongos epichloae endofíticos (*Epichloë/Neotyphodium spp.*). Se ha mostrado que las lolinas aumentan la resistencia de las plantas hospedadoras de pastos frente a plagas de herbívoros (Bush et al., 1997). Las lolinas específicas pueden tener algunas variaciones en las bioactividades contra plagas específicas. También se ha sugerido que la presencia de lolinas puede proporcionar a una planta hospedadora cierto nivel de protección contra el estrés ambiental, incluida la sequía y la competencia espacial (Malinowski y Belesky, 2000).

Los alcaloides de lolina se podrían producir en combinación simbiótica por el endófito fúngico o la planta hospedadora. Lo que es importante es la producción de alcaloides de lolina a través de la combinación, en donde la producción se induce en la combinación por la presencia del endófito fúngico sobre o dentro de los tejidos vegetales, particularmente por la presencia de hifas fúngicas entre las células vegetales. Tradicionalmente, la reproducción de las condiciones experimentadas en una simbiosis para permitir la producción de alcaloides de lolina *in vitro* era extremadamente difícil (Porter 1994). Por lo tanto, hasta hace relativamente poco tiempo, se desconocía si los alcaloides de lolina que se había observado que se producían en esas asociaciones simbióticas, eran producidos por el propio endófito fúngico o si se sintetizaban en la planta como respuesta a una infección. Solo un trabajo relativamente reciente de Blankenship et al. (2001) ha demostrado que el endófito *Neotyphodium uncinatum* puede producir lolinas en medios de cultivo definidos químicamente. Ese trabajo sugiere que el endófito también es el productor de las lolinas en su pasto hospedador de origen natural (Blankenship et al., 2001). Un análisis químico

directo de epichloae naturales también muestra ese efecto (Schardl et al., 2007).

La peramina (un alcaloide de pirrolopirazina) es un alcaloide bioactivo producido por algunas combinaciones de endófitos y plantas (Schardl et al., 2012). Se ha mostrado que la producción de peramina depende del funcionamiento de al menos un gen de origen endófito (Tanaka et al., 2005). Se ha mostrado que la peramina frena la alimentación de algunos insectos que causan daño a las plantas y puede conferir una protección contra la infestación de plantas infectadas con endófitos por algunos insectos (Rowan y Latch, 1994).

La invención se refiere además a un método para preparar una combinación estable de planta hospedadora/endófito fúngico epichloae que comprende infectar artificialmente una planta de *Secale* spp. con al menos un endófito fúngico según se indica en la reivindicación 1 que forma una combinación estable con la planta inoculada, en donde la planta hospedadora no muestra síntomas externos de infección endófito. Esto significa que después del establecimiento de la combinación, la planta de *Secale* spp. hospedadora infectada muestra un fenotipo morfológico normal para *Secale* spp., tal y como se conoce en la técnica, y tal y como se esperaría para las condiciones de crecimiento en las que se encuentra la combinación.

En determinadas condiciones, los endófitos fúngicos que son simbiontes obligados de una especie o cepa de planta hospedadora, se pueden introducir en diferentes especies o cepas de plantas hospedadoras para formar una combinación que normalmente no se encuentra en la naturaleza. Sin embargo, tales combinaciones pueden ser inestables y dar como resultado plantas hospedadoras que tienen un fenotipo anormal, es decir, características morfológicas y/o fisiológicas anormales en comparación con plantas hospedadoras de la misma cepa o especie que no están infectadas o que comprenden un simbionte natural. Las características fenotípicas anormales pueden incluir plantas enanas (Simpson y Mace, 2012), plantas con crecimiento epífita conspicuo (Christensen et al., 2012), colonización de haces vasculares (Christensen et al., 2001) y muerte celular localizada (Christensen, 1995).

Se proporciona una combinación simbiótica estable entre plantas de *Secale* spp. hospedadoras y endófitos fúngicos epichloae que da como resultado una combinación estable de planta/hongo que no muestra los efectos anormales de una infección con endófitos. Las combinaciones simbióticas estables proporcionadas en este documento pueden mostrar un fenotipo morfológico normal y un ciclo reproductivo normal y completo.

En una realización, la combinación simbiótica estable es suficiente para permitir una transmisión vertical del endófito. En una realización, la transmisión vertical es a través de hijuelos florales y semillas producidas posteriormente. En una realización, la transmisión vertical del endófito es desde una primera generación a una segunda generación de plantas hospedadoras. Preferiblemente, la transmisión vertical desde una primera generación de planta hospedadora a una segunda generación de planta hospedadora es mediante semillas.

En una realización, la planta hospedadora es *Secale* spp. seleccionada a partir del grupo que consiste en *Secale cereale*, *Secale montanum*, *Secale strictum*, *Secale sylvestre* y *Secale vavilovii*. Preferiblemente, la planta hospedadora es *Secale cereale*.

La descripción también se refiere a endófitos capaces de conferir a una planta de *Secale* spp. hospedadora después de la infección, la capacidad para que la combinación de endófito/planta produzca uno o varios alcaloides de lolina, derivados de lolina y/o peramina.

La invención se refiere además a una semilla de una planta de *Secale* spp. que está infectada con al menos un endófito fúngico epichloae de la invención. El endófito epichloae se selecciona a partir del grupo que consiste en AR3039 (NRRL nº 50716), AR3046 (NRRL nº 50576), AR3049 (NRRL nº 50577), AR3050 (NRRL nº 50578), AR3064 (NRRL nº 50718), AR3067 (NRRL nº 50719), AR3068 (NRRL nº 50720), AR3073 (NRRL nº 50721), AR3074 (NRRL nº 50722), AR3076 (NRRL nº 50723) y AR3078 (NRRL nº 50724), y combinaciones de las mismas. Preferiblemente, la invención se refiere a las cepas AR3039, AR3046, AR3050, AR3067, AR3068, AR3074 y AR3078, preferiblemente a AR3046.

Preferiblemente la semilla de *Secale* spp. es una semilla de *Secale cereale*, *Secale montanum*, *Secale strictum*, *Secale sylvestre* o *Secale vavilovii*. Más preferiblemente, la semilla es una semilla de *Secale cereale*.

A continuación se ilustran varios aspectos de la invención de forma no limitativa, haciendo referencia a los siguientes ejemplos.

Ejemplos

Ejemplo 1

Detección de cepas endófitas fúngicas

Se obtuvieron más de 580 registros de semillas de *Elymus* spp. a partir de diversas fuentes y, cuando el número de semillas lo permitía, se examinaron hasta aproximadamente 50 semillas individuales o plántulas para detectar una infección con endófitos. El endófito vivo en las vainas de las hojas de las plántulas que crecían hasta la etapa de dos o más hijuelos, se determinó mediante el método de Simpson et al. (2012). Se mostró que aproximadamente el 6%

de los registros producían al menos una plántula que contenía un endófito vivo que se pudo examinar más a fondo como parte de los siguientes ejemplos.

Ejemplo 2

Detección de una variación genética de las cepas de endófitos fúngicos

Para centrarse en seleccionar cepas endófitas procedentes de aquellas de *Elymus* spp. que contenían endófitos vivos que podían ser de mayor interés, se caracterizaron parcialmente los endófitos de hasta 6 plantas de cada registro y se distinguieron en cuanto a una variación genética mediante la 'huella genética' del ADN, basándose en datos genotípicos obtenidos a partir de hasta 8 loci de marcadores de repeticiones de secuencia simple (SSR) seleccionados, utilizando las secuencias de cebadores de la Tabla 1. Se había mostrado previamente que esas secuencias de cebadores amplificaban generalmente las secuencias de ADN polimórfico del endófito epichloae de los endófitos *in planta*.

Se utilizaron muestras de aproximadamente 100 mg de peso fresco de hijuelo basal para extraer el ADN genómico total (planta + endófito), siguiendo el procedimiento de aislamiento del ADN vegetal del kit FastDNA recomendado por el fabricante (Bio 101, Vista, California).

La amplificación de las SSR se realizó con parejas de cebadores de oligonucleótidos, utilizando uno de los dos protocolos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Tabla 1). En ambos protocolos, la PCR se llevó a cabo utilizando un termociclador iCycler (BioRad, Hercules, California, EE.UU.).

El protocolo 1 era como el descrito (Moon et al., 1999), excepto que se usaba una temperatura de reasociación de 60°C. En ese protocolo, los cebadores directos se marcaron en el extremo 5' con el fluoróforo 6-FAM™ (Applied Biosystems, Foster City, California).

En el Protocolo 2, los cebadores directos se sintetizaron con una secuencia de la cola de M13 de 21 nucleótidos en el extremo 5' (5'-TGTAACACGACGGCCAGT-3') (SEQ ID NO: 1), para facilitar un etiquetado universal de los productos de la PCR mediante un cebador de M13 marcado con 6-FAM™ (Schuelke, 2000). Los cebadores inversos se sintetizaron con la secuencia 5'-GTTTCTT-3' (SEQ ID NO: 2) en el extremo 5'-terminal para favorecer una adenilación sin molde en el extremo 3'-terminal del producto de la PCR (Brownstein et al., 1996). Se utilizó un volumen de reacción de PCR de 10 µL, que contenía aproximadamente 10 ng del ADN genómico total, cloruro de magnesio 2,5 mM, tampón de PCR 1x, 0,05 mM de cada dNTP, cebador directo 0,0375 µM, cebador inverso 0,15 µM, 0,15 µM de cebador de M13 marcado con fluorescencia y 0,75 U de ADN polimerasa Taq Platinum (Invitrogen, Carlsbad, California). La PCR se llevó a cabo utilizando el siguiente perfil: (1) 94°C durante 4 minutos, (2) 30 ciclos de: 94°C durante 30 segundos, 55°C durante 30 segundos y 72°C durante 30 segundos, (3) 8 ciclos de: 94°C durante 30 segundos, 53°C durante 30 segundos y 72°C durante 30 segundos, (4) 72°C durante 30 minutos (según Schuelke 2000).

Los productos de la PCR se analizaron mediante electroforesis capilar en un analizador genético ABI 3100, usando una matriz capilar de 22 cm con polímero POP-7™ (Applied Biosystems). Se utilizó GS500 LIZ (Applied Biosystems) como patrón del tamaño interno. Los electroferogramas se analizaron utilizando un GeneScan de ABI Prism (v 3.7, Applied Biosystems) y los datos del genotipo se puntuaron utilizando un Genotyper de ABI Prism (v 3.7, Applied Biosystems).

Las plantas examinadas anteriormente se caracterizaron posteriormente mediante la realización de análisis químicos. Se examinaron adicionalmente seis plántulas infectadas para detectar la presencia de alcaloides, atribuible a la presencia de endófitos, tales como indol diterpenos, alcaloides del cornezuelo, peramina y lolinas. Se tomaron muestras de representantes de cada genotipo fúngico para realizar un genotipado más detallado utilizando cebadores seleccionados para loci de SSR polimórficos.

Los resultados de la tabla 2 y la figura 2 muestran que los endófitos de esta invención pertenecen a un solo clado denominado Grupo 1 en la tabla 2, y se pueden caracterizar por compartir al menos la mayoría de los tamaños de alelos de SSR para los loci de SSR indicados en la tabla 1 y la tabla 2. Otros endófitos de la tabla 2, la tabla 3 y la figura 2 son ejemplos con el fin de ilustrar la aparición y las relaciones entre diferentes tipos de endófitos que no cumplen los requisitos de esta invención.

Tabla 1. Secuencias de cebadores de las SSR

SSR		Secuencias de cebadores (5'- 3')	Protocolo de la PCR	SEQ ID NO:
B10	directo	CGCTCAGGGCTACATACACCATGG	1	3
	inverso	CTCATCGAGTAACGCAGGCGACG		4
ans019	directo	TACCTCTGCACGGTGTATTCC	2	5
	inverso	TGCATAACACTCACCTTATAGTCG		6
ans033	directo	GCGTTGAGGAGGCTAGATAGAA	2	7

SSR	Secuencias de cebadores (5'- 3')		Protocolo de la PCR	SEQ ID NO:
	inverso	TTCCAAGCTGAACAAAAGTCAA		8
egs027	directo	GATGACGTATCTTGATGCTACCAC	2	9
	inverso	CGTGTATAAAGTTCGGGATCCTAT		10
egs031	directo	GAGATATCCCGTCTCCTGATCTAA	2	11
	inverso	CACAGCGTTACACTATCAACTTCC		12
ces0004	directo	CACTAAACACACCCAAGAACAAGA	2	13
	inverso	AGACAGGTAAGAAGTTTTCCCCTT		14
ces0022	directo	AGCTTTCCAATGACGACATACATA	2	15
	inverso	TAATTTAGGGTAGCATTTTCTCCG		16
ces0041	directo	GGTCCCTATTCTAATGCAGGTATG	2	17
	inverso	CAGTGTACGGGACTTTGTCAATAC		18
ces0054	directo	TGTATAATAAACATGGCGTGCTCT	2	19
	inverso	GTGTTGAAAGTTGTTGGATCACTC		20
ces0060	directo	CGAAATTGTAGACTATGTTGGAGC	2	21
	inverso	GTAGATGTATTTTGAGCAGGGCTT		22
ces0061	directo	GAGTGAGACCCGGTGTAGTAAGTC	2	23
	inverso	GAGTCATTCTTCGTCCATTGTCTT		24
ces0067	directo	GAAATGAGGCGTCTATCTTAAAGC	2	25
	inverso	TTTCTTGATTTCCAAAGAACAACA		26
ces0093	directo	CTGCTAGACATACTTGGAACATGG	2	27
	inverso	CAGTCGAATAATTTAGGGAGCATT		28

Tabla 2. Tamaños de los alelos de las SSR

SSR	Tamaños de los productos de la PCR (pb) ^{1,2}					
	Grupo 1 ³	AR3001	Grupo 2 ⁴	AR3018	AR3075	AR3051
B10	159 185	188	188	171	181 195	193
ans019	204	255	204	204	198	196
ans033	176	179	181	176	183 193	193
egs027	345 359	359	359	362	346 351	354
egs031	259 283	259	259	280	308	308
ces0004	185	185	185	174	179 187	187
ces0022	204 209	209	209	211	204	206
ces0041	247 257	261	261	250	254	266
ces0054	261	261	261	267	255 280	280

SSR	Tamaños de los productos de la PCR (pb) ^{1,2}					
	Grupo 1 ³	AR3001	Grupo 2 ⁴	AR3018	AR3075	AR3051
ces0060	238 250	238	238	239	246 257	233 246
ces0061	154 177	154	162	154	164 221	152
ces0067	277 281	275	277	265	271 295	298
ces0093	143 145	145	145	149	143	143

¹ Tamaño del alelo +/- 0,5 pb

² Para todos los loci de SSR excepto B10, el tamaño del producto incluye aprox. 25 pb debido a las secuencias de M13 y 'pig tail'

³ Grupo 1 = AR3039, 3046, 3049, 3050, 3064, 3067, 3068, 3073, 3074, 3076 y 3078

⁴ Grupo 2 = AR3002, 3005, 3015, 3017 y 3020

Ejemplo 3

Aislamiento de cepas de endófitos fúngicos

5 El hongo se aisló a partir de un gran número de plantas infectadas con endófito después de una esterilización de la superficie del tejido vegetal como se conoce en general en la técnica, particularmente como se describe en Christensen et al. (2002). Los hijuelos se retiraron de las plantas cortándoles en la base y recortando hasta aproximadamente 5 cm antes de esterilizar la superficie. Los hijuelos seccionados se esterilizaron en superficie mediante un lavado rápido con etanol al 96% y poniendo a remojo 1 minuto en una solución de lejía al 10%, seguido de un lavado dos veces en agua estéril. Los hijuelos se dividieron transversalmente; los anillos de la vaina se separaron y se colocaron sobre agar de dextrosa de patata con antibiótico con 5 µg/ml de tetraciclina (ABPDA). Las placas de Petri se incubaron en la oscuridad a 22-25°C durante 3-5 semanas. Los cultivos se podían subcultivar en el mismo medio.

15 Se examinaron los cultivos para determinar las tasas de crecimiento de las colonias, la morfología de las colonias, la capacidad para producir conidios, el intervalo de tamaño de los conidios, la secuencia de los genes de β -tubulina (*tub2*) (Moon et al. 2004) y otras características descriptivas, en donde todas ellas se tuvieron en cuenta para la selección de endófitos para un examen más detallado.

Se utilizaron cultivos seleccionados preparados y a veces subcultivados como en este ejemplo para someter a ensayo la inoculación y una posible infección duradera de las plántulas de *Secale cereale* como se describe a continuación.

Ejemplo 4

20 Descripciones de endófitos

25 Las características *in vitro* cuando se cultivaban sobre PDA eran consistentes con las descripciones de *Neotyphodium* (Christensen et al., 1993; Glenn et al., 1996), teniendo un crecimiento de lento a moderadamente lento, que variaba después de 4 semanas sobre PDA. Las colonias se elevaban sobre el agar, blancas, algodonosas, de ligera a fuertemente enrolladas, afelpadas, con abundantes hifas aéreas. Las colonias invertían el color tostado a crema en el margen. Las células conidiógenas eran solitarias, surgían perpendicularmente de las hifas, eran más anchas en la base y se estrechaban en la punta. Los conidios fialídicos eran hialinos, lisos, de naviculares a semilunares, de 2,05-14,96 µm de largo x 1,37-8,19 µm de ancho. Ninguno de los materiales aislados era estéril. Las características individuales de cada cepa se indican en la tabla 3.

Tabla 3. Dimensiones conidiales y de la colonia

			Conidios (µm)								Colonia			
Hospedador	Endófito		Longi- tud media		Ancho medio		Longi- tud mín.	Longi- tud máx.		Ancho mín.	Ancho máx.		Diámetro de la colonia (mm)	STDE V
<i>Elymus dahuricus</i>	A R	3001	5.41	×	2.24		4.09	7.49		1.57	2.93		15.2	1.0
<i>Elymus dahuricus</i>	A R	3002	4.64	×	2.36		2.92	5.68		1.70	3.30		20.7	0.7
<i>Elymus sp.</i>	A R	3005	4.30	×	2.49		3.59	5.41		2.05	3.18		24.0	2.7
<i>Elymus sp.</i>	A R	3015	4.87	×	2.18		3.50	6.51		1.61	3.06		26.8	0.7
<i>Elymus sp.</i>	A R	3017	4.28	×	1.88		2.05	5.95		1.20	2.54		22.1	1.0
<i>Elymus sp.</i>	A R	3018	4.05	×	2.67		3.35	5.17		1.68	5.07		36.9	2.3
<i>Elymus sp.</i>	A R	3020	5.18	×	2.76		3.97	6.80		1.90	3.61		24.2	1.3
<i>Elymus caninus</i>	A R	3039	6.46	×	3.30		4.42	8.60		1.77	4.95		23.8	2.1
<i>Elymus mutabilis</i>	A R	3046	5.24	×	2.78		3.50	7.21		1.83	5.07		41.2	1.2
<i>Elymus mutabilis</i>	A R	3049	5.76	×	3.33		3.57	7.72		2.10	4.37		41.4	1.4
<i>Elymus mutabilis</i>	A R	3050	5.80	×	3.42		3.57	8.36		2.31	4.29		42.5	2.7
<i>Elymus virginicus</i>	A R	3051	3.91	×	2.40		2.74	5.10		1.37	3.16		93.2	4.8
<i>Elymus mutabilis</i>	A R	3064	12.1 8	x	6.54		8.11	14.9 6		4.54	8.19		23.0	5.4
<i>Elymus uralensis</i>	A R	3067	6.70	x	4.24		5.00	8.88		3.30	4.96		12.5	2.1
<i>Elymus mutabilis</i>	A R	3068	6.09	x	3.34		4.67	7.91		2.36	4.08		36.7	1.8
<i>Elymus caninus</i>	A R	3073	6.36	x	3.41		5.24	9.39		2.81	4.45		16.0	0.6
<i>Elymus caninus</i>	A R	3074	6.24	x	3.54		5.20	7.31		2.64	4.22		32.8	1.5
<i>Elymus elymoides ssp. brevifolius</i>	A R	3075	6.02	x	3.63		2.81	7.47		3.01	4.89		34.5	1.1
<i>Elymus mutabilis var. oschensis</i>	A R	3076	6.00	x	3.33		4.49	7.31		2.51	4.54		51.6	0.7

Ejemplo 5

Uso de la secuencia del gen de la β -tubulina para determinar las relaciones de los endófitos con especies de *Epichloë* conocidas

5 Los endófitos fúngicos de los pastos pueden ser de la especie *Epichloë* o de la especie *Neotyphodium*. Algunas, pero no todas las especies de *Neotyphodium* son aparentemente híbridos derivados de dos o más especies de *Epichloë* como se describe principalmente mediante una comparación de secuencias de genes seleccionados (Moon et al., 2004).

La presencia de múltiples alelos para algunos de los loci usados para el análisis de las SSR de los endófitos (como en el Ejemplo 2 anterior) podía indicar que los clados a los que pertenecen probablemente eran de origen híbrido.

10 Se examinaron secuencias de genes de productos de *tub2* de tres ejemplos de los endófitos, AR3039, AR3046 y AR3064 de esta solicitud utilizando ligeras variaciones del método de Moon et al. (2004) para determinar la probabilidad de que los endófitos se hubieran derivado de una o más especies reconocibles de *Epichloë*. También se examinaron de manera similar otros cuatro endófitos de clados aparentemente diferentes, para indicar su relación con especies de *Epichloë* conocidas.

15 Los cebadores y las condiciones utilizadas para las amplificaciones con PCR se modificaron para asegurar mejor que se podían observar múltiples alelos de *tub2* en todas las muestras para las que se consideró probable o posible un origen híbrido. Las secuencias de los cebadores seleccionados eran el cebador directo TCG GCC TCA CGA CGC ACA AC (RJ251-F) (SEQ ID NO: 29) y el cebador inverso CCC ATA CAT TAC ACC TTT CTG GCG (RJ252-R) (SEQ ID NO: 30), seleccionados para obtener productos de PCR de endófitos procedentes de *Elymus* spp. que correspondían sustancialmente e incluían las secuencias correspondientes indicadas y utilizadas para la determinación de relaciones entre endófitos de *Epichloë* y *Neotyphodium* y sus híbridos (Moon et al., 2004). La PCR se realizó con una etapa inicial a 95° (3 minutos); 35 ciclos a 95° (30 segundos), 62° (30 segundos), 72° (45 segundos); una etapa final a 72° (5 minutos).

25 Los productos de la PCR se secuenciaron por el método de Sanger (1997) en un analizador de ADN ABI PRISM 3700 (Applied Biosystems). Se consideró que las secuencias que contenían múltiples picos superpuestos provenían de híbridos, mientras que las no se consideraron que los tenían, no provenían de híbridos.

30 Se realizó una clonación de los amplicones de la PCR cuando se indicaba más de una secuencia, utilizando el kit TOPO® TA Cloning® (con el vector pCR®2.1-TOPO®) (Invitrogen). Se secuenciaron hasta 10 clones, como se ha descrito anteriormente, y se alinearon usando el módulo Align X de Vector NTI Advance 11 (Invitrogen), con secuencias de alelos de *tub2* individuales.

35 Los alelos de *tub2* individuales se asignaron a las especies no híbridas de *Epichloë* más cercanas de la siguiente manera: las secuencias se alinearon usando Dialign-TX (Subramanian et al., 2008), y los árboles con una probabilidad máxima se construyeron a partir de esa alineación usando el paquete del programa informático Phylip (Felsenstein, 2005). Para crear el árbol final, se ejecutó el programa DNAML, usando 1.000 cargas de arranque y tres aleatorizaciones de entrada de secuencia por conjunto, y se condensó en un solo árbol de consenso usando el enfoque mayoritario. Se preparó un árbol utilizando un dendroscopio (Huson et al., 2007) para las atribuciones más cercanas de especies de *Epichloë* conocidas para los endófitos seleccionados.

40 Los endófitos AR3039, AR3046 y AR3064 de esta solicitud producen dos secuencias *tub2* lo que es compatible con los endófitos que son híbridos de *E. bromicola* y *E. amarillans*. Este es un híbrido no descrito hasta ahora y se puede considerar una nueva especie que por el momento se denomina *E. bromicola* x *amarillans*.

45 Las cepas endófitas AR3049, AR3050, AR3067, AR3068, AR3073, AR3074 y AR3078 se agrupan estrechamente con AR3039, AR3046 y AR3064 según el análisis de las SSR (Figura 1) y también se pueden considerar con gran probabilidad que son de *E. bromicola* x *amarillans*. En las pruebas comparativas se consideró que tres de los otros endófitos se agrupaban solo con *E. bromicola* y otro endófito con *E. yangzii*, siendo estos representativos de otros grupos de endófitos con patrones compartidos de genotipos de las SSR, observados a partir de fuentes de *Elymus* spp.

50 Resumiendo, los datos de SSR y β -tubulina sugieren que las cepas de endófitos AR3039, AR3046, AR3049, AR3050, AR3064, AR3067, AR3068, AR3073, AR3074 y AR3078 forman un grupo representativo de endófitos recientemente caracterizados que se pueden considerar un clado funcional que se puede transferir desde su planta hospedadora natural al hospedador alternativo, *Secale*, dando lugar a una combinación simbiótica estable, creada artificialmente de *Secale*/endófito, en la que el hospedador *Secale* infectado presenta un crecimiento normal y tiene un ciclo de vida normal.

Ejemplo 6

Inoculación de endófitos fúngicos *epichloae* en *Secale cereale*

Semillas de *Secale cereale*, cultivares *Rahu*, *Amilo* y "KWS", y selecciones de cultivares de *S. cereale* obtenidos

- gracias al Dr. Mark Newell, The Samuel Roberts Noble Foundation (NF95307A, NF95319B, 97326, Bates RS4 o MATON2) se esterilizaron en superficie y se inocularon tal y como describen Latch y Christensen (1985). Las semillas se esterilizaron en superficie por inmersión en una solución de ácido sulfúrico al 50% durante 15 minutos, seguido de un lavado cinco veces con agua corriente y una inmersión en una solución de lejía doméstica al 10% (Janola) durante 15 minutos, seguido de dos lavados con agua estéril. Las semillas se secaron en una cabina de flujo laminar sobre papel de filtro Whatmann estéril antes de disponerlas sobre placas Petri con agar y agua al 4%. Las semillas sobre las placas germinaron en la oscuridad a 22-25°C durante 4-9 días y las plántulas etioladas resultantes se inocularon antes de devolverlas a la incubadora en la oscuridad durante 7 días. Después de esa incubación, las placas se colocaron bajo luces fluorescentes blancas durante al menos 7 días antes de retirar las plántulas y plantarlas en una mezcla comercial para macetas y cultivarlas en un invernadero. Las plantas se cultivaron durante aprox. 6 semanas antes de identificar los individuos infectados. Las plantas infectadas se identificaron mediante el método de Simpson et al. (2012). Las plantas se cultivaron adicionalmente en un invernadero para examinar el fenotipo vegetal de las plantas infectadas, en comparación con las plantas normales no infectadas y, en particular, para determinar si se iban a formar inflorescencias y capítulos de semillas.
- En la Tabla 4 se incluye un resumen de las inoculaciones exitosas marcadas con "sí" para aquellas cepas de endófitos en las que al menos algunas de las plantas inoculadas tenían un fenotipo sustancialmente normal que era capaz de desarrollarse con un ciclo de vida normal (Figura 2). Las semillas se recogieron de las plantas tal y como se indica en la Tabla 4.

Tabla 4. Cepas inoculadas dentro de *S. cereale* y que lo infectaban y ejemplos de producción de semillas.

Endófito	Intento de inoculación de <i>Secale</i>	Plantas de <i>Secale</i> infectadas obtenidas	Plantas de <i>Secale</i> infectadas que producían semillas	Semilla de <i>Secale</i> infectada con endófito	Semilla infectada con endófito viable
AR3039 *	sí	sí	sí	sí	sí
AR3046 *	sí	sí	sí	sí	sí
AR3039 **	sí	sí	sí	TBD	TBD
AR3046/**	sí	sí	sí	TBD	TBD
AR3046/NF95307A ***	sí	sí	sí	TBD	TBD
AR3046/NF95319B ***	sí	sí	sí	TBD	TBD
AR3046/97326 ***	sí	sí	sí	TBD	TBD
AR3046/Bates RS4 ***	sí	sí	sí	TBD	TBD
AR3046/MATON2 ***	sí	sí	sí	TBD	TBD
AR3049 *	sí	sí	sí	sí	sí
AR3050 *	sí	sí	sí	sí	sí
AR3064 *	sí	sí	sí	sí	sí
AR3067 *	sí	sí	sí	sí	sí
AR3068 *	sí	sí	sí	sí	sí
AR3068 ****	sí ¹	sí ¹	sí ¹	TBD	TBD
AR3073 *	sí	sí	sí	sí	sí
AR3074 *	sí	sí	sí	sí	sí
AR3076 *	sí	sí	sí	sí	sí
AR3078 *	sí	sí	sí	sí	sí

* inoculado en *S. cereale* var. Rahu

** inoculado en *S. cereale* var. Amilo

*** selecciones de centeno inoculadas (*Secale cereale*) ex Dr. Mark Newell, Fundación Samuel Roberts Noble. Variante como se indica: NF95307A, NF95319B, 97326, Bates RS4 o MATON2.

TBD = por determinar

si¹ = resultado anticipado

Ejemplo 7

Producción de alcaloides en plantas progenitoras naturales infectadas con endófito

Láminas foliares y pseudotallos de plantas de *Elymus mutabilis*, *Elymus caninus*, *Elymus uralensis*, *Elymus nevskii* y *Elymus mutabilis* var. *oschensis* infectadas con cepas de endófitos particulares, se analizaron en busca de alcaloides de lolina y peramina mediante ligeras modificaciones de métodos establecidos (Kennedy y Bush, 1983; Yates et al., 1989) y peramina (Rasmussen et al., 2012). Los resultados se muestran en la Tabla 5. La cantidad total de alcaloides de lolina era mayor en las hojas de las plantas examinadas que en los pseudotallos. Sin desear estar ligado a una teoría, los inventores creen que las cantidades totales de alcaloides presentes en las plantas examinadas son representativas de un intervalo que es suficiente para proporcionar al menos alguna protección contra plagas a la planta hospedadora (Wilkinson et al., 2000). Estos resultados muestran que una serie de cepas de endófitos dentro del clado definido por los datos de las SSR y β -tubulina presentados en otra parte del presente documento, cuando están *in planta*, pueden conferir a través de la combinación simbiótica una capacidad para producir cantidades medibles de alcaloides de lolina o peramina o de ambas.

Tabla 5. Lolinas totales y alcaloides de peramina para plantas progenitoras de *Elymus* infectadas con endófito

Endófito	Parte de la planta	Lolinas ¹ (µg/g)	Peramina ² (µg/g)
AR3039	Lámina de la hoja	56	55,6
	Seudotallo	34	26,1
AR3046	Lámina de la hoja	461	78,4
	Seudotallo	240	45,2
AR3049	Lámina de la hoja	437	83,4
	Seudotallo	242	45,5
AR3050	Lámina de la hoja	532	84,7
	Seudotallo	379	59,2
AR3064	Lámina de la hoja	465	66,0
	Seudotallo	342	39,0
AR3067	Lámina de la hoja	205	27,5
	Seudotallo	107	16,3
AR3068	Lámina de la hoja	372	59,4
	Seudotallo	151	31,1
AR3073	Lámina de la hoja	43	65,8
	Seudotallo	34	24,8
AR3074	Lámina de la hoja	257	47,5
	Seudotallo	169	32,9
AR3076	Lámina de la hoja	312	53,2
	Seudotallo	151	28,3
AR3078	Lámina de la hoja	466	32,7
	Seudotallo	273	30,9

Nota: ¹ analizada mediante GC-FID, ² analizada mediante LC-MS

Ejemplo 8

Fuente y origen geográfico de endófitos seleccionados procedentes de *Elymus* spp.

La Tabla 6 enumera una serie de cepas de endófitos aisladas, descritas en el presente documento, los números de registro de la fuente a partir de la que se obtuvieron, las especies putativas del registro de la planta hospedadora original y la fuente regional del registro. Las plantas de *Elymus* spp. hospedadoras se obtuvieron generalmente de

Asia central.

Tabla 6. Cepas de endófitos aislados por número de código AR, especie hospedadora putativa original, fuente regional y número de registro de la fuente.

Endófito	Hospedador <i>Elymus</i>	Región	Fuente del registro	
AR3039	<i>E. caninus</i>	no conocida	RBG ¹	0006334
AR3046	<i>E. mutabilis</i>	Lago Issyk Kul, Kirguistán	PI ²	564954
AR3049	<i>E. mutabilis</i>	Lago Issyk Kul, Kirguistán	PI	564954
AR3050	<i>E. mutabilis</i>	Lago Issyk Kul, Kirguistán	PI	564954
AR3064	<i>E. mutabilis</i>	Gorno Altay, Rusia	PI	564949
AR3067	<i>E. uralensis</i>	Amla Ata, Kazajistán	PI	547365
AR3068	<i>E. mutabilis</i>	URSS	NGB ³	90498
AR3073	<i>E. caninus</i>	no conocida	RBG	0006334
AR3074	<i>E. caninus</i>	Paso Cheketeman, Gorno Altay, Rusia	PI	564915
AR3076	<i>E. mutabilis</i> var. <i>oschensis</i>	Montañas Khigiz-Alatau, Kirguistán	PI	531640
AR3078	<i>E. nevskii</i>	Novosibirsk, Rusia	PI	564925
Notas				
1. Royal Botanic Gardens, Departamento de Conservación de Semillas, Ardingly, Reino Unido				
2. Instituto Pullman, Universidad Estatal de Washington, Pullman, WA., EE.UU.				
3. Centro Nórdico de Recursos Genéticos (NordGen), Alnarp, Suecia				

5 Ejemplo 9

Producción de alcaloides en plantas de *Secale cereale*

Las plántulas de *Secale cereale*, cultivar *Rahu*, se inocularon con los endófitos indicados en la Tabla 7, se cultivaron en un invernadero y se confirmó que contenían endófito con un fenotipo vegetal sustancialmente normal. Las láminas de las hojas y los tallos se analizaron por separado en busca de alcaloides de lolina (Kennedy y Bush, 1983; Yates et al., 1989) o peramina (Garthwaite et al., 1994). Los resultados en la Tabla 7 muestran intervalos de concentración tanto para los alcaloides de lolina como para la peramina. Sin desear estar ligado a una teoría, los inventores creen que las cantidades totales de alcaloides de lolina y peramina presentes en las plantas examinadas son representativas de un intervalo que es suficiente para proporcionar al menos cierta protección contra las plagas a la planta hospedadora (Rowan 1993; Wilkinson et al. al., 2000; Bacetty et al., 2009a 2009b).

15 Tabla 7. Observaciones de los análisis de alcaloides en plantas de *S. cereale* (hasta 3 plantas) infectadas con endófitos.

Endófito	Parte de la planta	Lolinas ¹ (µg/g)			Peramina ² (µg/g)		
		n	Media	Intervalo	n	Media	Intervalo
AR3039	Lámina de la hoja	6	97	54-193	6	23,3	18,1-33,0
	Tallo	6	87	65-110	6	16,7	11,6-21,1
AR3046	Lámina de la hoja	5	1487	911-3285	3	18,7	14,1-23,2
	Tallo	4	250	167-280	3	15,6	15,1-16,0
AR3049	Lámina de la hoja	6	1765	642-3660	4	25,2	17,0-30,1
	Tallo	6	362	250-669	2	16,2	12,1-20,3
AR3050	Lámina de la hoja	1	1607	-	1	16,8	-
	Tallo	1	342	-	5	6,8	4,3-12,4
AR3064	Lámina de la hoja	4	358	140-490	3	7,3	1,6-11,4
	Tallo	4	103	32-172	2	4,0	1,2-6,9
AR3067	Lámina de la hoja	4	111	101-119	1	47,7	-

Endófito	Parte de la planta	Lolinas ¹ (µg/g)			Peramina ² (µg/g)		
		n	Media	Intervalo	n	Media	Intervalo
	Rahu						
	Tallo	2	136	136-136	1	36,3	-
AR3068	Lámina de la hoja	6	1108	895-1696	5	21,0	11,6-30,2
	Tallo	6	276	122-488	2	15,2	5,8-24,5
AR3073	Lámina de la hoja	6	86	56-112	6	20,8	11,1-38,3
	Tallo	5	62	40-82	3	25,0	16,9-36,1
AR3074	Lámina de la hoja	2	599	275-922	2	14,4	8,0-20,7
	Tallo	2	431	392-470	4	3,5	2,5-5,2
AR3076	Lámina de la hoja	3	310	164-588	4	14,9	7,3-18,7
	Tallo	3	230	92-437	3	13,7	11,4-16,4
AR3078	Lámina de la hoja	5	489	54-1646	5	15,8	1,4-43,4
	Tallo	5	219	39-607	4	11,5	3,6-24,0

Nota: ¹ analizadas mediante GC-FID, ² analizada mediante ELISA

Ejemplo 10

Combinaciones de *Elymus mutabilis* / endófitos que tienen bioactividad contra plagas de cereales

- 5 En ausencia de controles de *E. mutabilis* exentos de endófito, se utilizó cañuela con y sin su endófito natural (*Neotyphodium uncinatum*) porque se sabe que produce alcaloides de lolina y tiene una actividad conocida contra los pulgones.

Efecto sobre los pulgones

El pulgón *Rhopalosiphum padi* es una plaga importante de las plantas de cereales porque transmite el virus del enanismo amarillo de la cebada.

- 10 En un bioensayo de opciones realizado empleando hijuelos en placas de Petri, el número de *Rhopalosiphum padi* en *Elymus mutabilis* infectado con AR3050 era similar al número en cañuela infectada con su endófito natural *Neotyphodium uncinatum* y significativamente menor que el número de pulgones en el control de cañuela exenta de endófito (Tabla 8).

- 15 Tabla 8. Número de pulgones *R. padi* encontrados en hijuelos de *E. mutabilis* infectado con AR3050 y cañuela con (MF E+) y sin (MF E-) su endófito natural *N. uncinatum* en una prueba de opciones durante 3 días.

Tratamiento con endófito	Nº de pulgones/hijuelo		
	Día 1	Día 2	Día 3
AR3050	2,8	1	1,5
MF E+	0	0	0,8
MF E-	5,2	7,5	15,3
Valor de P	0,003	<0,001	<0,001

Los resultados de este ensayo sugieren que los alcaloides de lolina producidos como resultado de la asociación simbiótica formada entre *E. mutabilis* y AR3050, pueden evitar que los pulgones se coman la hierba como se observa en la hierba de pastos (Wilkinson et al., 2000).

- 20 *Efecto sobre los ácaros Aceria*

Aceria spp., en particular *A. tosichella*, son ácaros que transmiten el virus del mosaico estriado del trigo en Australia. El ácaro utilizado en estos ensayos se ha identificado por pertenecer a *Aceria* spp., provisionalmente a *A. tosichella*.

Debido a la falta de controles de *E. mutabilis* sin endófito y al efecto desconocido del genotipo vegetal con la aparición de ácaros *Aceria*, los efectos de los alcaloides de lolina sobre los ácaros se evaluaron en seis plantas de

cañuela infectadas con endófito y seis exentas de endófito. Se hizo un recuento de los ácaros *Aceria* en tres hijuelos de cada planta. Se encontraron significativamente más ácaros en plantas exentas de endófito que en plantas infectadas con endófito (Nº/hijuelo: 74 para E+ cf 454 para E-. $P < 0,001$). Los resultados se proporcionan a continuación en la Tabla 9.

- 5 Tabla 9. Número promedio de ácaros *Aceria* en dos hojas de tres hijuelos en seis plantas de cañuela con (E+) y sin (E-) el endófito *N. uncinatum*.

	E+	E-	SED	Significación
Hijuelo 1	65	417	70,6	<0,001
Hijuelo 2	101	543	97,5	0,001
Hijuelo 3	59	403	57,1	<0,001
Todos	224	1363	134,2	<0,001

- 10 Como se muestra más arriba en la prueba aplicada, los resultados de esta prueba de ácaros sugieren que los alcaloides de lolina son responsables de evitar que los ácaros coman la hierba, similar a los efectos sobre los pulgones que se han mostrado en la hierba de pastos (Wilkinson et al., 2000).

Efecto sobre la polilla de la manzana de color marrón claro

Este insecto tiene una sensibilidad conocida frente a agentes bioactivos producidos por endófitos en el raigrás. Se ha utilizado en este documento para indicar la presencia de agentes bioactivos en plantas de *E. mutabilis* infectadas con AR3046.

- 15 Se encontró un efecto grave de AR3046 cuando el material vegetal de *E. mutabilis* tomado de plantas infectadas con AR3046, se incorporaba a una dieta artificial y se alimentaba a la polilla de la manzana de color marrón claro. El porcentaje promedio de larvas a las que se impuso la dieta y comenzaron a alimentarse al cabo de las primeras 24 horas desde la aplicación de la dieta a las larvas recién nacidas sometidas a ensayo era: 88% para el promedio de otras tres especies de *Elymus* no infectadas con endófitos, en comparación con el 4% de las larvas cuya dieta contenía *E. mutabilis* infectado con AR3046. El día 10 de la prueba, el 60% de las larvas alimentadas con material vegetal exento de endófito habían mudado hasta la etapa de ninfa primaria, en comparación con solo el 13% que mudaron a ninfa primaria de las que habían sido alimentadas con AR3046. Los resultados de este ensayo se proporcionan a continuación en la Tabla 10.

- 25 Tabla 10. Proporción de polillas de la manzana de color marrón claro a las que se habían impuesto dietas después de 24 horas y comenzaron a alimentarse después de 24 y 48 horas, y el tiempo promedio hasta la primera muda cuando se sometieron a dietas que incorporaban material vegetal liofilizado procedente de *Elymus* sin endófito o infectado con el endófito productor de lolina AR3046.

Planta	Endófito	Proporción establecida	Proporción de alimentación		Tiempo hasta la 1ª muda
		24 h	24 h	48 h	En días
<i>Elymus</i> sp.	Nil	0,91	0,83	0,87	2,176
<i>Elymus mutabilis</i>	AR3046	0,05	0,05	0,00	2,716
SED		0,153	0,102	0,129	0,1079
P		<0,001	<0,001	<0,001	<0,001

- 30 Los resultados de esta prueba con polillas sugieren firmemente que AR3046 produce alcaloides de lolina que son responsables de evitar que la polilla de la manzana de color marrón claro coma la hierba.

Ejemplo 11

Protección contra plagas en *Secale* infectado con endófito

- 35 Se realizó un experimento para someter a ensayo la capacidad de un endófito para proteger *Secale* de nematodos que causan lesiones en las raíces (*Pratylenchus* spp.) utilizando hijuelos de *Secale cereale*, cultivar *Rahu*, con o sin el endófito AR3046. Once hijuelos individuales de E+ y E- *Rahu*, seleccionados a partir de 4 plantas parentales independientes por tratamiento (2-3 clones por planta parental), se trasplantaron a recipientes que dirigen las raíces (root trainer) en profundidad de 5 x 5 x 12 cm que contenían 100 g de suelo recogido en el campo con una infestación natural de 30 *Pratylenchus* spp. por 100 g. Se añadieron 30 *Pratylenchus penetrans* criados en

laboratorio a cada recipiente entrenador de raíces, de manera que cada planta estaba expuesta a 60 nematodos. Las plantas se incubaron en una cabina de cultivo iluminada a 20°C durante 30 días. A continuación, se retiraron las plantas del suelo, se lavaron las raíces y luego se aclararon con cloruro de sodio al 1,5% durante 3 minutos. Los nematodos dentro de las raíces se tiñeron con azul de anilina en glicerol. A continuación se examinaron las raíces con un microscopio y se contó la cantidad de nematodos dentro de los sistemas radiculares. Una infección con endófito no influía en el peso de la raíz.

La presencia de endófito AR3046 provocaba una reducción significativa ($P < 0,05$) de la cantidad de nematodos por sistema radicular (Tabla 11).

Tal y como se muestra en los ensayos para evitar insectos descritos anteriormente, los resultados de este ensayo con nematodos sugieren firmemente que los alcaloides de lolina producidos por AR3046 son responsables de conferir al menos algún nivel de protección contra las plagas a las plantas de *Secale* infectadas, al impedir a los nematodos colonizar las raíces de las plantas de *Secale* infectadas con endófito. Esto es compatible con las lolinas que han mostrado tener efectos disuasorios y pesticidas con los nematodos (Bacetty et al., 2009a 2009b).

Tabla 11. Cantidad de nematodos que lesionan la raíz (*Pratylenchus* spp.) en raíces de plantas de *Secale cereale* cultivar *Rahu* con endófito (AR3046) y sin endófito (E-) ($P = 0,013$).

Endófito	Número de nematodos por planta
AR3046	3,4
E-	8,1

Ejemplo 12

Efectos de *Secale cereale* var. "Rahu" infectado con el endófito AR3046 sobre *Cerodontha australis*

Los pastos y cereales en Nueva Zelanda y Australia están infestados frecuentemente con larvas de la mosca minadora de hojas, *Cerodontha australis* (Diptera: Agromyzidae), también conocida como minadora de la vaina del trigo. Las larvas de esa mosca se alimentan internamente de los tejidos de una variedad de pastos y cereales, causando daños que pueden dar lugar a la muerte del hijuelo. Las minadoras dejan un rastro visible en las hojas.

En este experimento, plantas de *S. cereale* cv. Rahu infectadas con un endófito productor de lolina, AR3046, o no infectadas (Nil), fueron expuestas a infestaciones con *C. australis*. Se incluyó en el experimento cañuela infectada con su endófito natural *Neotyphodium uncinatum* porque este endófito también produce alcaloides de lolina.

Seis plantas de *Secale* "Rahu" infectado con AR3046 y cañuela infectada con *N. uncinatum*, con sus equivalentes sin endófito (Nil), se compararon por sus efectos sobre las infestaciones con *C. australis*. Las plantas se organizaron aleatoriamente dentro de grupos duplicados compuestos por una sola planta de cada tratamiento y se colocaron cuatro pupas de mosca minadora extraídas de plantas perennes de raigrás que crecían en un invernadero de cribado, en la base de cada planta (entre los hijuelos). Además, una mosca adulta hembra y un macho que ya habían emergido de las pupas recogidas, se liberaron en los grupos duplicados 1-5 y un macho en el grupo duplicado 6. Cada grupo duplicado de cuatro plantas se cubrió con una tela de red fina colocada sobre una jaula de alambre. Las jaulas se retiraron de las plantas 2 semanas después de su instalación. El experimento se llevó a cabo en un invernadero con una temperatura máxima diaria de 22°C y las plantas se regaron a mano según fue necesario.

El número de hijuelos y la cantidad y la longitud de las minadoras larvarias en cada hoja se registraron 4 y 6 semanas después de colocar las pupas y los adultos sobre las plantas y la presencia de daño larvario o de pupas en cada tallo a las 6 semanas.

Los datos del recuento se transformaron logarítmicamente ($\ln$) y la raíz cuadrada de los datos proporcionales se transformó antes del análisis en Genstat v16 mediante ANOVA bloqueada por duplicado.

Resultados

Solo una de las seis plantas Rahu infectadas con AR3046 estaba infestada con moscas en comparación con las seis plantas Rahu Nil. Había significativamente menos hijuelos/planta ($P < 0,001$) y una menor proporción de hijuelos ($P < 0,002$) infestados por *C. australis* sobre las Rahu infectadas con AR3046 que sobre las Rahu Nil en las revisiones a las 4 y 6 semanas (Tabla 12). Además, AR3046 reducía el número de minas/planta ($P < 0,001$) (las minas son rastros verticales que dejan las larvas mientras se alimentan dentro de los tejidos de la planta) y el número de tallos de hijuelos (es decir, la parte inferior de cada hijuelo) que resultaron dañados por o que contenían larvas o pupas.

Generalmente, las plantas de cañuela estaban más fuertemente infestadas por las moscas, que habían atacado todas las plantas. Una infección con *N. uncinatum* de la cañuela reducía la proporción de hijuelos infestados con *C. australis* a las 4 ($P < 0,007$) y a las 6 semanas ($P < 0,002$) (Tabla 12). Además, había significativamente menos

($P < 0,05$) tallos de hijuelos dañados o que contenían larvas en la cañuela infectada con endófito que en la cañuela exenta de endófito.

Tabla 12. El número medio de hijuelos vivos, el número de hijuelos dañados, la proporción de hijuelos dañados y el número de minas/planta causadas por *Cerodontha australis*, 4 y 6 semanas después de la liberación de las pupas y adultos en plantas de *Secale cereale* var. "Rahu" y cañuela con endófito (MF *N. unc.*) y sin (MF Nil) endófito, están tabulados a continuación. El número medio de hijuelos con daños y/o pupas en el tallo de los hijuelos se proporciona para la revisión a las 6 semanas. Los datos de los números medios se transforman en logaritmo (ln) y los datos proporcionales se transforman en raíz cuadrada.

	Rahu AR3046	Rahu Nil	MF <i>N. unc.</i>	MF Nil	SED ¹	Rahu ² Valor de P	MF ² Valor de P
4 Semanas							
Nº de hijuelos vivos/planta	4,04	3,01	3,89	3,35	0,309	0,005	0,103
Nº de hijuelos dañados/planta	-0,33	1,43	2,37	2,73	0,365	<,001	0,349
Propn. de hijuelos dañados	0,04	0,45	0,58	0,93	0,113	0,002	0,007
Nº de minas/planta	-0,33	1,64	2,56	3,26	0,370	<,001	0,077
6 Semanas							
Nº de hijuelos vivos/planta	3,67	3,15	3,88	3,33	0,309	0,114	0,092
Nº de hijuelos dañados/planta	-0,69	1,82	2,50	2,92	0,332	<,001	0,222
Propn. de hijuelos dañados	0,00	0,53	0,62	1,03	0,106	<,001	0,002
Nº de minas/planta	-0,69	2,24	2,71	3,35	0,330	<,001	0,075
Nº de hijuelos vivos/planta	-0,69	1,55	1,66	2,52	0,396	<,001	0,046
¹ SED = error estándar de la diferencia para las comparaciones de los cuatro tratamientos							
² Los valores de P son para comparaciones entre plantas infectadas y exentas de endófitos dentro de una especie							

Conclusión

Una infección de *Secale* cv. Rahu infectado con el endófito productor de lolina, AR3046, reducía significativamente las infestaciones de la mosca minadora de hojas *Cerodontha australis*. Otra especie de endófito que produce lolina en la cañuela también reducía la proporción de hijuelos dañados por las larvas de las moscas y el número de hijuelos con daños en el tallo.

Los resultados de este ensayo sugieren firmemente que los alcaloides de lolina producidos por AR3046 son responsables de conferir al menos cierto nivel de protección contra las plagas a *Secale* spp. infectado, reduciendo las infestaciones de *C. australis* sobre plantas de *Secale* spp. infectadas con el endófito. Esto es consistente con las lolinas que han mostrado tener efectos de contención y pesticidas con otros insectos y plagas de plantas (Schardl et. Al., 2007; Bacetty et al., 2009a 2009b).

Ejemplo 13

Efectos de *Secale* "Rahu" infectado con el endófito AR3046 sobre cigarras espumadoras

Se llevó a cabo un experimento comparando los efectos de *Secale cereale* var. Rahu infectado con AR3046 y cañuela infectada con su endófito natural productor de lolina *N. uncinatum*, junto con los respectivos controles no infectados, sobre una plaga de insectos que se alimentan del xilema *Philaenus spumarius* (cigarra espumadora) que se cree que son sensibles a los alcaloides de lolina. Las plantas se clonaron de modo que para cada experimento con los diferentes insectos, se utilizaron seis plantas genéticamente idénticas de Rahu infectado y de cañuela infectada y no infectada, pero solo tres de las seis plantas exentas de endófitos de Rahu eran iguales.

Se llevaron a cabo dos experimentos, el primero con ninfas maduras de cigarra espumadora que se desarrollaron hasta convertirse en adultos con bastante rapidez y el segundo con ninfas más jóvenes. En ambos casos se soltaron tres cigarras espumadoras en cada planta. En el primer experimento, las plantas se cubrieron con jaulas de acetato que no eran completamente a prueba de insectos, mientras que en el segundo experimento se utilizaron cubiertas de nailon a prueba de insectos. El número de cigarras espumadoras presentes y el número de pequeñas, medianas y grandes 'gotas' de espuma, que las cigarras espumadoras excretan mientras que se alimentan, se contó regularmente durante cada experimento. *Secale* Rahu infectado con AR3046 reducía tanto el número como la cantidad de espuma producida por las cigarras espumadoras en comparación con los exentos de endófito (Figura 3).

En el primer experimento, había una cantidad significativamente menor de cigarras espumadoras en las plantas AR3046 que en comparación con las plantas sin endófitos durante todo el experimento, mientras que en el segundo experimento la reducción del número era significativa solo al comienzo del experimento. En contraste con estos resultados, la cañuela infectada con endófito no tenía ningún efecto sobre el número o la alimentación de la cigarra espumadora.

Los resultados de este ensayo sugieren firmemente que los alcaloides de lolina producidos por AR3046 son responsables de conferir al menos cierto nivel de protección contra las plagas a *Secale* infectado, reduciéndose las infestaciones de cigarras espumadoras en las plantas de *Secale* infectadas con endófito. Esto es consistente con las lolinas que han mostrado tener efectos de contención y pesticidas con otros insectos y plagas de plantas (Schardl et. Al., 2007; Bacetty et al., 2009a 2009b).

Ejemplo 13

Ensayos de enfermedades vegetales

Los siguientes resultados *in vitro* muestran el impacto de los endófitos seleccionados sobre agentes patógenos fúngicos de cereales, incluyendo la inhibición del desarrollo de una variedad de hongos patógenos y saprotróficos. Por ejemplo, varias cepas endófitas han inhibido significativamente ($P \leq 0,05$) el crecimiento micelial de *Fusarium graminearum* y *Rhizoctonia solani* (Fig. 4 y Fig. 5). Estos dos agentes patógenos son los agentes causantes de la fusariosis de la espiga y la putrefacción de la raíz, respectivamente, ambas enfermedades devastadoras de los cultivos de cereales. Estos endófitos tienen el potencial de brindar protección contra muchas enfermedades de los cereales. Sin desear estar limitados por ninguna teoría, los inventores creen que, aunque hasta la fecha no se ha identificado ningún mecanismo de acción que explique esta inhibición, una antibiosis a través de la producción de metabolitos secundarios desconocidos es un mecanismo probable.

Los resultados del ensayo demostraban que varias cepas endófitas inhibían significativamente ($P \leq 0,05$) el crecimiento micelial de *Fusarium graminearum* (Fig.4) y de *Rhizoctonia solani* (Figura 5).

Aplicación industrial

Las cepas de endófito epichloae, las simbiosis de plantas/hongos, las semillas producidas a partir de tales simbiosis y los métodos para preparar tales simbiosis de acuerdo con la invención, tal y como se describen en este documento, todos ellos tienen una aplicación industrial para la producción de plantas que se usan para consumo humano o animal.

Referencias

- Bacetty AA, Snook ME, Glenn AE, Noe JP, Hill N, Culbreath A, Timper P, Bacon CW (2009a) Toxicity of endophyte-infected tall fescue alkaloids and grass metabolites on *Pratylenchus scribneri*. *Phytopathology* 99: 1336-1345
- Bacetty AA, Snook ME, Glenn AE, Noe JP, Nagabhyru P, Bacon CW (2009b) Chemotaxis disruption in *Pratylenchus Scribneri* by tall fescue root extracts and alkaloids. *Journal of Chemical Ecology* 35: 844-850
- Blankenship JD, Spiering MJ, Wilkinson HH, Fannin FF, Bush LP, Schardl CL (2001). Production of loline alkaloids by the grass endophyte, *Neotyphodium uncinatum*, in defined media. *Phytochemistry* 58: 395-401
- Brownstein MJ, Carpten JD, Smith JR (1996) Modulation of non-templated nucleotide addition by Taq DNA polymerase: Primer modifications that facilitate genotyping. *BioTechniques* 20: 1004-1010
- Bush LP, Wilkinson HH, Schardl CL (1997) Bioprotective Alkaloids of Grass-Fungal Endophyte Symbioses. *Plant Physiology* 114: 1-7
- Casida JE, Quistad GB (1998) Golden Age of Insecticide Research: Past, Present, or Future? *Annual Review of Entomology* 43: 1-16.
- Christensen MJ (1995) Variation in the ability of *Acremonium* endophytes of *Lolium perenne*, *Festuca arundinacea* and *F. pratensis* to form compatible associations in the 3 grasses. *Mycological Research* 99: 466-470
- Christensen MJ, Bennett RJ, Schmid J (2002) Growth of *Epichloë/Neotyphodium* and p-endophytes in leaves of *Lolium* and *Festuca* grasses. *Mycological Research* 106: 93-106
- Christensen MJ, Bennett RJ, Schmid J (2001) Vascular bundle colonisation by *Neotyphodium* endophytes in natural and novel associations with grasses. *Mycological Research* 105: 1239-1245
- Christensen MJ, Leuchtman A, Rowan DD, Tapper BA (1993) Taxonomy of *Acremonium* Endophytes of Tall Fescue (*Festuca- Arundinacea*), Meadow Fescue (*F-Pratensis*) and Perennial Rye- Grass (*Lolium-Perenne*). *Mycological Research* 97: 1083-1092

- Christensen MJ, Simpson WR, Al Samarrai T (2000) Infection of tall fescue and perennial ryegrass plants by combinations of different *Neotyphodium* endophytes. *Mycological Research* 104: 974-978
- Christensen MJ, Saulsbury K, Simpson WR (2012) Conspicuous epiphytic growth of an interspecific hybrid *Neotyphodium* sp. endophyte on distorted host inflorescences. *Fungal Biology* 116: 42-48
- 5 Felsenstein, J. (2005) PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.6. Distribuida por el autor. Department of Genome Sciences, University of Washington, Seattle
- Garthwaite I, Sprosen J, Briggs L, Collin R, Towers N (1994) Food quality on the farm: Immunological detection of mycotoxins in New Zealand pastoral agriculture. *Food & Agricultural Immunology* 6: 123-129
- 10 Glenn AE, Bacon CW, Price R, Hanlin RT (1996) Molecular phylogeny of *Acremonium* and its taxonomic implications. *Mycologia* 88: 369-383
- Huson D, Richter D, Rausch C, DeZulian T, Franz M, Rupp R (2007) Dendroscope: An interactive viewer for large phylogenetic trees. *BMC bioinformatics* 8: 460
- Kennedy CW, Bush LP (1983) Effect of environment and management factors on the accumulation of N-acetyl and N-formyl loline alkaloids in tall fescue. *Crop Science* 23: 547-552
- 15 Koulman A, Lane GA, Christensen MJ, Fraser K, Tapper BA (2007) Peramine and other fungal alkaloids are exuded in the guttation fluid of endophyte-infected grasses. *Phytochemistry* 68: 355-360
- Latch GCM, Christensen MJ (1985) Artificial Infection of Grasses with Endophytes. *Annals of Applied Biology* 107: 17-24
- 20 Malinowski DP, Belesky DP (2000) Adaptations of endophyte-infected cool-season grasses to environmental stresses: Mechanisms of drought and mineral stress tolerance. *Crop Science*: 40: 923-940
- Marshall D, Tunali B, Nelson LR (1999) Occurrence of fungal endophytes in species of wild triticum. *Crop Science* 39: 1507-1512
- Miller JS, Funk VA, Wagner WL, Barrie F, Hoch PC, Herendeen P (2011) Outcomes of the 2011 botanical nomenclature section at the XVIII International Botanical Congress. *PhytoKeys* 5: 1-3
- 25 Moon CD, Tapper BA, Scott B (1999) Identification of *Epichloë* endophytes in planta by a microsatellite-based PCR fingerprinting assay with automated analysis. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 1268-1279
- Moon CD, Craven KD, Leuchtman A, Clements SL, Schardl CL (2004). Prevalence of interspecific hybrids amongst asexual fungal endophytes of grasses. *Molecular Ecology* 13 (6): 1455-1467
- 30 Porter JK (1994). Chemical constituents of grass endophytes. In: Bacon, C.W., White Jr., J.F (Eds), *Biotechnology of Endophytic Fungi of Grasses*. CRC, Boca Raton, FL, pp. 103-123
- Rasmussen S, Lane GA, Mace W, Parsons AJ, Fraser K, Xue H (2012) The use of genomics and metabolomics methods to quantify fungal endosymbionts and alkaloids in grasses. *Methods in Molecular Biology* 860: 213-226
- Rowan DD (1993) Lolitrems, peramine and paxilline: mycotoxins of the ryegrass/endophyte interaction. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 44: 103-122
- 35 Rowan DD, Latch GCM (1994) Utilization of endophyte-infected perennial ryegrasses for increased insect resistance. In: Bacon CW, White Jr. JF (compiladores), *Biotechnology of Endophyte Fungi of Grasses*. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 169-183
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977), DNA sequencing with chain-terminating inhibitors, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 74 (12): 5463-5467
- 40 Schardl CL, Craven KD, Speakman S, Stromberg A, Lindstrom A, Yoshida R (2008). A novel test for host-symbiont codivergence indicates ancient origin of fungal endophytes in grasses. *Syst Biol.* 57: 483-498
- Schardl CL, Grossman RB, Nagabhyru P, Faulkner JR, Mallik UP (2007) Loline alkaloids: Currencies of mutualism. *Phytochemistry* 68: 980-996
- 45 Schardl CL, Young CA, Faulkner JR, Florea S, Pan J (2012) Chemotypic diversity of *epichloae* fungal symbionts of grasses. *Fungal Ecology* 5: 331-344
- Schuelke M (2000) An economic method for the fluorescent labelling of PCR fragments. *Nature Biotechnology* 18: 233-234

Simpson WR, Mace WJ (2012) Novel associations between epichloae endophytes and grasses: Possibilities and outcomes. In 'Epichloae, endophytes of cool season grasses: Implications, utilization and biology.' (Compiladores CA Young, GE Aiken, RL McCulley, JR Strickland, CL Schardl.) pp. 35-39. (The Samuel Roberts Noble Foundation: Ardmore, Oklahoma)

- 5 Simpson WR, Schmid J, Singh J, Faville MJ, Johnson RD (2012) A morphological change in the fungal symbiont *Neotyphodium lolii* induces dwarfing in its host plant *Lolium perenne*. *Fungal Biology* 116: 234-240

Subramanian AR, Kaufmann M, Morgenstern B (2008) DIALIGN-TX: greedy and progressive approaches for segment-based multiple sequence alignment. *Algorithms for Molecular Biology* 3: article 6

- 10 Tanaka A, Tapper BA, Popay A, Parker EJ, Scott B (2005) A symbiosis expressed non-ribosomal peptide synthetase from a mutualistic fungal endophyte of perennial ryegrass confers protection to the symbiotum from insect herbivory. *Molecular Microbiology* 57: 1036-1050

Tsai HF, Liu JS, Staben C, Christensen MJ, Latch GC, Siegel MR, Schardl CL (1994). Evolutionary diversification of fungal endophytes of tall fescue grass by hybridization with *Epichloë* species. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91 (7): 2542-2546

- 15 Welty RE, Azevedo MD, Cooper TM (1987) Influence of moisture content, temperature, and length of storage on seed germination and survival of endophytic fungi in seeds of tall fescue and perennial ryegrass. *Phytopathology* 77: 893-900

- 20 Wilkinson HH, Siegel MR, Blankenship JD, Mallory AC, Bush LP, Schardl CL (2000). Contribution of fungal loline alkaloids to protection from aphids in a grass-endophyte mutualism. *Molecular Plant Microbe Interactions* 13: 1027-1033

Yates SG, Fenster JC, Bartelt RJ (1989) Assay of tall fescue seed extracts, fractions and alkaloids using the large milkweed bug. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 37: 354-357

Zeida JE, McDuffie HH, Dosman JA (1993) Epidemiology of health and safety risks in agriculture and related industries - Practical applications for rural physicians. *Western Journal of Medicine* 158: 56-63

- 25 Zhang, DX, Nagabhyru P, Blankenship JD, Schardl CL (2010) Are loline alkaloid levels regulated in grass endophytes by gene expression or substrate availability? *Plant Signaling and Behavior* 5 (11): 1419-22

Descripción de los depósitos de microorganismos realizados bajo el Tratado de Budapest

- 30 Los siguientes depósitos biológicos se han realizado según los términos del Tratado de Budapest sobre el reconocimiento internacional del depósito de microorganismos para los fines del procedimiento en materia de patentes

Referencia de identificación del depósito	Designación del depositario internacional	Fecha del depósito
AR 3039	NRRL 50716	6 Marzo de 2012
AR 3046	NRRL 50576	13 Octubre de 2011
AR 3049	NRRL 50577	13 Octubre de 2011
AR 3050	NRRL 50578	13 Octubre de 2011
AR 3064	NRRL 50718	6 Marzo de 2012
AR 3067	NRRL 50719	6 Marzo de 2012
AR 3068	NRRL 50720	6 Marzo de 2012
AR 3073	NRRL 50721	6 Marzo de 2012
AR 3074	NRRL 50722	6 Marzo de 2012
AR 3076	NRRL 50723	6 Marzo de 2012
AR 3078	NRRL 50724	6 Marzo de 2012

Los certificados de depósito y las declaraciones de viabilidad para los microorganismos depositados anteriores se adjuntan a continuación.

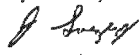
BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS
FOR THE PURPOSE OF PATENT PROCEDURES

INTERNATIONAL FORM

TO
Patent Dept.
AgResearch Limited
Grasslands Research Center
Tennent Dr., Private Bag 11008
Palmerston North, New Zealand

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT
issued pursuant to Rule 7.1 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified at the bottom of this page

NAME AND ADDRESS OF DEPOSITOR

I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM	
Identification reference given by the DEPOSITOR: <i>Epichloa/Neotyphodium sp.</i> AR 3039	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY: NRRL 50716
II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION	
The microorganism identified under I. above was accompanied by:	
☐ ¹ a scientific description ☒ ¹ a proposed taxonomic designation	
III. RECEIPT AND ACCEPTANCE	
This International Depositary Authority accepts the microorganism identified under I. above, which was received by it on March 6, 2012 (date of the original deposit) ²	
IV. RECEIPT OF REQUEST FOR CONVERSION	
The microorganism identified under I. above, was received by this International Depositary Authority on _____ (date of the original deposit) and a request to convert the original deposit to a deposit under the Budapest Treaty was received by it on _____ (date of receipt of request for conversion).	
V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY	
Name: Agricultural Research Culture Collection (NRRL) International Depositary Authority Address: 1815 N. University Street Peoria, Illinois 61604 U.S.A.	Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depositary Authority or of authorized official(s):  Date: 4-27-12

¹ Mark with a cross the applicable box.

² Where Rule 6.4(d) applies, such date is the date on which the status of international depositary authority was acquired.

(Traducción al español en página siguiente)

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS
FOR THE PURPOSE OF PATENT PROCEDURES

INTERNATIONAL FORM

TO
Patent Dept.
AgResearch limited
Grasslands Research Center
Tennent Drive, Private Bag 11008
Palmerston North, New Zealand
NAME AND ADDRESS OF DEPOSITOR

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT
issued pursuant to Rule 7.1 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified at the bottom of this page

I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM	
Identification reference given by the DEPOSITOR: <i>Epichloe/Neotyphodium spp.</i> AR 3046	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY: NRRL 50576
II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION	
The microorganism identified under I. above was accompanied by:	
☐ ¹ a scientific description ☒ ¹ a proposed taxonomic designation	
III. RECEIPT AND ACCEPTANCE	
This International Depositary Authority accepts the microorganism identified under I. above, which was received by it on October 13, 2011 (date of the original deposit) ²	
IV. RECEIPT OF REQUEST FOR CONVERSION	
The microorganism identified under I. above, was received by this International Depositary Authority on _____ (date of the original deposit) and a request to convert the original deposit to a deposit under the Budapest Treaty was received by it on _____ (date of receipt of request for conversion).	
V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY	
Name: Agricultural Research Culture Collection (NRRL) International Depositary Authority Address: 1815 N. University Street Peoria, Illinois 61604 U.S.A.	Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depositary Authority or of authorized official(s):  Date: 6-26-12

¹ Mark with a cross the applicable box.

² Where Rule 6.4(d) applies, such date is the date on which the status of international depositary authority was acquired.

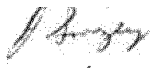
(Traducción al español en página siguiente)

TRATADO DE BUDAPEST SOBRE EL RECONOCIMIENTO
INTERNACIONAL DEL DEPÓSITO DE MICROORGANISMOS
A LOS FINES DE LOS PROCEDIMIENTOS DE PATENTES

FORMULARIO INTERNACIONAL

Dirigido Al	RECIBO EN CASO DE UN DEPÓSITO ORIGINAL
Dpto. de patentes	emitido de conformidad con la Regla 7.1 por la
AgResearch Limited	AUTORIDAD INTERNACIONAL DE DEPÓSITO
Grasslands Research Center	identificada al final de esta página
Tennent Dr., Private Bag 11008	
Palmerston North, Nueva Zelanda	

NOMBRE Y DIRECCIÓN DEL DEPOSITANTE

I. IDENTIFICACIÓN DEL MICROORGANISMO	
Referencia de identificación proporcionada por el DEPOSITANTE: Epichloe / Neotyphodium spp. AR 3046	Número de acceso proporcionado por la AUTORIDAD INTERNACIONAL DE DEPÓSITO: NRRL 50576
II. DESCRIPCIÓN CIENTÍFICA Y/O DESIGNACIÓN TAXONÓMICA PROPUESTA	
El microorganismo identificado en I. más arriba fue acompañado de: ☐ ¹ una descripción científica ☒ ¹ una designación taxonómica propuesta	
III. RECIBO Y ACEPTACIÓN	
Esta Autoridad de Depósito Internacional acepta el microorganismo identificado en I. más arriba, que fue recibido por ella el 13 de octubre de 2011 (fecha del depósito original) ²	
IV. RECIBO DE LA PETICIÓN DE CONVERSIÓN	
Esta Autoridad de Depósito Internacional recibió en fecha _____ (fecha del depósito original) el microorganismo identificado en I. más arriba, y recibió una petición para convertir el depósito original en un depósito bajo el Tratado de Budapest en fecha _____ (fecha de recibo de la petición de conversión).	
V. AUTORIDAD DE DEPÓSITO INTERNACIONAL	
Nombre: Agricultural Research Culture Collection (NRRL) Autoridad de depósito internacional Dirección: 1815 N. University Street Peoria, Illinois 61604 EE.UU.	Firma(s) de la(s) persona(s) que tienen el poder de representar a la Autoridad de Depósito Internacional o del funcionario autorizado:  6-20-12 Fecha:

¹Marcar con una cruz la casilla aplicable

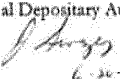
²Cuando se aplica la Regla 6.4(d), dicha fecha es aquella en la que se adquirió el estado de autoridad de depósito internacional

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS
FOR THE PURPOSE OF PATENT PROCEDURES

INTERNATIONAL FORM

TO
Patent Dept.
AgResearch limited
Grasslands Research Center
Tennent Drive, Private Bag 11008
Palmerston North, New Zealand
NAME AND ADDRESS OF DEPOSITOR

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT
issued pursuant to Rule 7.1 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified at the bottom of this page

I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM	
Identification reference given by the DEPOSITOR: <i>Epichloe/Neotyphodium spp.</i> AR 3049	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY: NRRL 50577
II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION	
The microorganism identified under I. above was accompanied by: ☐ ¹a scientific description ☒ ¹a proposed taxonomic designation	
III. RECEIPT AND ACCEPTANCE	
This International Depositary Authority accepts the microorganism identified under I. above, which was received by it on October 13, 2011 (date of the original deposit) ²	
IV. RECEIPT OF REQUEST FOR CONVERSION	
The microorganism identified under I. above, was received by this International Depositary Authority on _____ (date of the original deposit) and a request to convert the original deposit to a deposit under the Budapest Treaty was received by it on _____ (date of receipt of request for conversion).	
V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY	
Name: Agricultural Research Culture Collection (NRRL) International Depositary Authority Address: 1815 N. University Street Peoria, Illinois 61604 U.S.A.	Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depositary Authority or of authorized official(s):  Date: 6-20-12

¹ Mark with a cross the applicable box.

² Where Rule 6.4(d) applies, such date is the date on which the status of international depositary authority was acquired.

(Traducción al español en página siguiente)

TRATADO DE BUDAPEST SOBRE EL RECONOCIMIENTO
INTERNACIONAL DEL DEPÓSITO DE MICROORGANISMOS
A LOS FINES DE LOS PROCEDIMIENTOS DE PATENTES

FORMULARIO INTERNACIONAL

Dirigido Al	RECIBO EN CASO DE UN DEPÓSITO ORIGINAL
Dpto. de patentes	emitido de conformidad con la Regla 7.1 por la
AgResearch Limited	AUTORIDAD INTERNACIONAL DE DEPÓSITO
Grasslands Research Center	identificada al final de esta página
Tennent Dr., Private Bag 11008	
Palmerston North, Nueva Zelanda	

NOMBRE Y DIRECCIÓN DEL DEPOSITANTE

I. IDENTIFICACIÓN DEL MICROORGANISMO	
Referencia de identificación proporcionada por el DEPOSITANTE: Epichloe / Neotyphodium spp. AR 3049	Número de acceso proporcionado por la AUTORIDAD INTERNACIONAL DE DEPÓSITO: NRRL 50577
II. DESCRIPCIÓN CIENTÍFICA Y/O DESIGNACIÓN TAXONÓMICA PROPUESTA	
El microorganismo identificado en I. más arriba fue acompañado de: ☐ ¹ una descripción científica ☒ ¹ una designación taxonómica propuesta	
III. RECIBO Y ACEPTACIÓN	
Esta Autoridad de Depósito Internacional acepta el microorganismo identificado en I. más arriba, que fue recibido por ella el 13 de octubre de 2011 (fecha del depósito original) ²	
IV. RECIBO DE LA PETICIÓN DE CONVERSIÓN	
Esta Autoridad de Depósito Internacional recibió en fecha _____ (fecha del depósito original) el microorganismo identificado en I. más arriba, y recibió una petición para convertir el depósito original en un depósito bajo el Tratado de Budapest en fecha _____ (fecha de recibo de la petición de conversión).	
V. AUTORIDAD DE DEPÓSITO INTERNACIONAL	
Nombre: Agricultural Research Culture Collection (NRRL) Autoridad de depósito internacional Dirección: 1815 N. University Street Peoria, Illinois 61604 EE.UU.	Firma(s) de la(s) persona(s) que tienen el poder de representar a la Autoridad de Depósito Internacional o del funcionario autorizado:  Fecha:

¹Marcar con una cruz la casilla aplicable

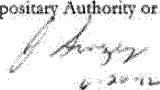
²Cuando se aplica la Regla 6.4(d), dicha fecha es aquella en la que se adquirió el estado de autoridad de depósito internacional

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS
FOR THE PURPOSE OF PATENT PROCEDURES

INTERNATIONAL FORM

TO
Patent Dept.
AgResearch limited
Grasslands Research Center
Tennent Drive, Private Bag 11008
Palmerston North, New Zealand
NAME AND ADDRESS OF DEPOSITOR

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT
issued pursuant to Rule 7.1 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified at the bottom of this page

I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM	
Identification reference given by the DEPOSITOR: <i>Epichloe/Neotyphodium spp.</i> AR 3050	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY: NRRL 50578
II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION	
The microorganism identified under I. above was accompanied by: ☐ ¹a scientific description ☒ ¹a proposed taxonomic designation	
III. RECEIPT AND ACCEPTANCE	
This International Depositary Authority accepts the microorganism identified under I. above, which was received by it on October 13, 2011 (date of the original deposit) ²	
IV. RECEIPT OF REQUEST FOR CONVERSION	
The microorganism identified under I. above, was received by this International Depositary Authority on _____ (date of the original deposit) and a request to convert the original deposit to a deposit under the Budapest Treaty was received by it on _____ (date of receipt of request for conversion).	
V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY	
Name: Agricultural Research Culture Collection (NRRL) International Depositary Authority Address: 1815 N. University Street Peoria, Illinois 61604 U.S.A.	Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depositary Authority or of authorized official(s):  Date: 6-20-12

¹ Mark with a cross the applicable box.

² Where Rule 6.4(d) applies, such date is the date on which the status of international depositary authority was acquired.

(Traducción al español en página siguiente)

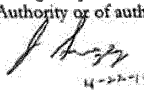
BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS
FOR THE PURPOSE OF PATENT PROCEDURES

INTERNATIONAL FORM

TO
Patent Dept.
AgResearch Limited
Grasslands Research Center
Tennent Dr., Private Bag 11008
Palmerston North, New Zealand

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT
issued pursuant to Rule 7.1 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified at the bottom of this page

NAME AND ADDRESS OF DEPOSITOR

I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM	
Identification reference given by the DEPOSITOR: <i>Epichloa/Neotyphodium</i> sp. AR 3064	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY: NRRL 50718
II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION	
The microorganism identified under I. above was accompanied by:	
☐ ¹ a scientific description ☒ ¹ a proposed taxonomic designation	
III. RECEIPT AND ACCEPTANCE	
This International Depositary Authority accepts the microorganism identified under I. above, which was received by it on March 6, 2012 (date of the original deposit) ²	
IV. RECEIPT OF REQUEST FOR CONVERSION	
The microorganism identified under I. above, was received by this International Depositary Authority on _____ (date of the original deposit) and a request to convert the original deposit to a deposit under the Budapest Treaty was received by it on _____ (date of receipt of request for conversion).	
V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY	
Name: Agricultural Research Culture Collection (NRRL) International Depositary Authority Address: 1815 N. University Street Peoria, Illinois 61604 U.S.A.	Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depositary Authority or of authorized official(s):  Date: 14-2-2012

¹ Mark with a cross the applicable box.

² Where Rule 6.4(d) applies, such date is the date on which the status of international depositary authority was acquired.

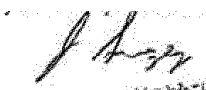
(Traducción al español en página siguiente)

TRATADO DE BUDAPEST SOBRE EL RECONOCIMIENTO
INTERNACIONAL DEL DEPÓSITO DE MICROORGANISMOS
A LOS FINES DE LOS PROCEDIMIENTOS DE PATENTES

FORMULARIO INTERNACIONAL

Dirigido Al	RECIBO EN CASO DE UN DEPÓSITO ORIGINAL
Dpto. de patentes	emitido de conformidad con la Regla 7.1 por la
AgResearch Limited	AUTORIDAD INTERNACIONAL DE DEPÓSITO
Grasslands Research Center	identificada al final de esta página
Tennent Dr., Private Bag 11008	
Palmerston North, Nueva Zelanda	

NOMBRE Y DIRECCIÓN DEL DEPOSITANTE

I. IDENTIFICACIÓN DEL MICROORGANISMO	
Referencia de identificación proporcionada por el DEPOSITANTE: Epichloe / Neotyphodium sp. AR 3064	Número de acceso proporcionado por la AUTORIDAD INTERNACIONAL DE DEPÓSITO: NRRL 50718
II. DESCRIPCIÓN CIENTÍFICA Y/O DESIGNACIÓN TAXONÓMICA PROPUESTA	
El microorganismo identificado en I. más arriba fue acompañado de: ☐ ¹ una descripción científica ☒ ¹ una designación taxonómica propuesta	
III. RECIBO Y ACEPTACIÓN	
Esta Autoridad de Depósito Internacional acepta el microorganismo identificado en I. más arriba, que fue recibido por ella el 6 de marzo de 2012 (fecha del depósito original) ²	
IV. RECIBO DE LA PETICIÓN DE CONVERSIÓN	
Esta Autoridad de Depósito Internacional recibió en fecha _____ (fecha del depósito original) el microorganismo identificado en I. más arriba, y recibió una petición para convertir el depósito original en un depósito bajo el Tratado de Budapest en fecha _____ (fecha de recibo de la petición de conversión).	
V. AUTORIDAD DE DEPÓSITO INTERNACIONAL	
Nombre: Agricultural Research Culture Collection (NRRL) Autoridad de depósito internacional Dirección: 1815 N. University Street Peoria, Illinois 61604 EE.UU.	Firma(s) de la(s) persona(s) que tienen el poder de representar a la Autoridad de Depósito Internacional o del funcionario autorizado:  Fecha:

¹Marcar con una cruz la casilla aplicable

²Cuando se aplica la Regla 6.4(d), dicha fecha es aquella en la que se adquirió el estado de autoridad de depósito internacional

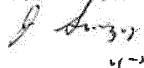
BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS
FOR THE PURPOSE OF PATENT PROCEDURES

INTERNATIONAL FORM

TO
Patent Dept.
AgResearch Limited
Grasslands Research Center
Tennent Dr., Private Bag 11008
Palmerston North, New Zealand

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT
issued pursuant to Rule 7.1 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified at the bottom of this page

NAME AND ADDRESS OF DEPOSITOR

I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM	
Identification reference given by the DEPOSITOR: <i>Epichloa/Neotyphodium sp.</i> AR 3067	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY: NRRL 50719
II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION	
The microorganism identified under I. above was accompanied by:	
☐ ¹ a scientific description ☒ ¹ a proposed taxonomic designation	
III. RECEIPT AND ACCEPTANCE	
This International Depositary Authority accepts the microorganism identified under I. above, which was received by it on March 6, 2012 (date of the original deposit) ²	
IV. RECEIPT OF REQUEST FOR CONVERSION	
The microorganism identified under I. above, was received by this International Depositary Authority on _____ (date of the original deposit) and a request to convert the original deposit to a deposit under the Budapest Treaty was received by it on _____ (date of receipt of request for conversion).	
V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY	
Name: Agricultural Research Culture Collection (NRRL) International Depositary Authority Address: 1815 N. University Street Peoria, Illinois 61604 U.S.A.	Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depositary Authority or of authorized official(s):  Date: 6/11/12

¹ Mark with a cross the applicable box.

² Where Rule 6.4(d) applies, such date is the date on which the status of international depositary authority was acquired.

(Traducción al español en página siguiente)

TRATADO DE BUDAPEST SOBRE EL RECONOCIMIENTO
INTERNACIONAL DEL DEPÓSITO DE MICROORGANISMOS
A LOS FINES DE LOS PROCEDIMIENTOS DE PATENTES

FORMULARIO INTERNACIONAL

Dirigido Al	RECIBO EN CASO DE UN DEPÓSITO ORIGINAL
Dpto. de patentes	emitido de conformidad con la Regla 7.1 por la
AgResearch Limited	AUTORIDAD INTERNACIONAL DE DEPÓSITO
Grasslands Research Center	identificada al final de esta página
Tennent Dr., Private Bag 11008	
Palmerston North, Nueva Zelanda	

NOMBRE Y DIRECCIÓN DEL DEPOSITANTE

I. IDENTIFICACIÓN DEL MICROORGANISMO	
Referencia de identificación proporcionada por el DEPOSITANTE: Epichloe / Neotyphodium sp. AR 3067	Número de acceso proporcionado por la AUTORIDAD INTERNACIONAL DE DEPÓSITO: NRRL 50719
II. DESCRIPCIÓN CIENTÍFICA Y/O DESIGNACIÓN TAXONÓMICA PROPUESTA	
El microorganismo identificado en I. más arriba fue acompañado de: ☐ ¹ una descripción científica ☒ ¹ una designación taxonómica propuesta	
III. RECIBO Y ACEPTACIÓN	
Esta Autoridad de Depósito Internacional acepta el microorganismo identificado en I. más arriba, que fue recibido por ella el 6 de marzo de 2012 (fecha del depósito original) ²	
IV. RECIBO DE LA PETICIÓN DE CONVERSIÓN	
Esta Autoridad de Depósito Internacional recibió en fecha _____ (fecha del depósito original) el microorganismo identificado en I. más arriba, y recibió una petición para convertir el depósito original en un depósito bajo el Tratado de Budapest en fecha _____ (fecha de recibo de la petición de conversión).	
V. AUTORIDAD DE DEPÓSITO INTERNACIONAL	
Nombre: Agricultural Research Culture Collection (NRRL) Autoridad de depósito internacional Dirección: 1815 N. University Street Peoria, Illinois 61604 EE.UU.	Firma(s) de la(s) persona(s) que tienen el poder de representar a la Autoridad de Depósito Internacional o del funcionario autorizado:  21-2-12 Fecha:

¹Marcar con una cruz la casilla aplicable

²Cuando se aplica la Regla 6.4(d), dicha fecha es aquella en la que se adquirió el estado de autoridad de depósito internacional

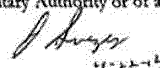
BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS
FOR THE PURPOSE OF PATENT PROCEDURES

INTERNATIONAL FORM

TO
Patent Dept.
AgResearch Limited
Grasslands Research Center
Tennent Dr., Private Bag 11008
Palmerston North, New Zealand

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT
issued pursuant to Rule 7.1 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified at the bottom of this page

NAME AND ADDRESS OF DEPOSITOR

I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM	
Identification reference given by the DEPOSITOR: <i>Epichloa/Neotyphodium sp.</i> AR 3068	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY: NRRL 50720
II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION	
The microorganism identified under I. above was accompanied by:	
☐ ¹ a scientific description ☒ ¹ a proposed taxonomic designation	
III. RECEIPT AND ACCEPTANCE	
This International Depositary Authority accepts the microorganism identified under I. above, which was received by it on March 6, 2012 (date of the original deposit) ²	
IV. RECEIPT OF REQUEST FOR CONVERSION	
The microorganism identified under I. above, was received by this International Depositary Authority on _____ (date of the original deposit) and a request to convert the original deposit to a deposit under the Budapest Treaty was received by it on _____ (date of receipt of request for conversion).	
V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY	
Name: Agricultural Research Culture Collection (NRRL) International Depositary Authority Address: 1815 N. University Street Peoria, Illinois 61604 U.S.A.	Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depositary Authority or of authorized official(s):  Date: 11-22-12

¹ Mark with a cross the applicable box.

² Where Rule 6.4(d) applies, such date is the date on which the status of international depositary authority was acquired.

(Traducción al español en página siguiente)

TRATADO DE BUDAPEST SOBRE EL RECONOCIMIENTO
INTERNACIONAL DEL DEPÓSITO DE MICROORGANISMOS
A LOS FINES DE LOS PROCEDIMIENTOS DE PATENTES

FORMULARIO INTERNACIONAL

Dirigido Al	RECIBO EN CASO DE UN DEPÓSITO ORIGINAL
Dpto. de patentes	emitido de conformidad con la Regla 7.1 por la
AgResearch Limited	AUTORIDAD INTERNACIONAL DE DEPÓSITO
Grasslands Research Center	identificada al final de esta página
Tennent Dr., Private Bag 11008	
Palmerston North, Nueva Zelanda	

NOMBRE Y DIRECCIÓN DEL DEPOSITANTE

I. IDENTIFICACIÓN DEL MICROORGANISMO	
Referencia de identificación proporcionada por el DEPOSITANTE: Epichloe / Neotyphodium sp. AR 3068	Número de acceso proporcionado por la AUTORIDAD INTERNACIONAL DE DEPÓSITO: NRRL 50720
II. DESCRIPCIÓN CIENTÍFICA Y/O DESIGNACIÓN TAXONÓMICA PROPUESTA	
El microorganismo identificado en I. más arriba fue acompañado de: ☐ ¹ una descripción científica ☒ ¹ una designación taxonómica propuesta	
III. RECIBO Y ACEPTACIÓN	
Esta Autoridad de Depósito Internacional acepta el microorganismo identificado en I. más arriba, que fue recibido por ella el 6 de marzo de 2012 (fecha del depósito original) ²	
IV. RECIBO DE LA PETICIÓN DE CONVERSIÓN	
Esta Autoridad de Depósito Internacional recibió en fecha _____ (fecha del depósito original) el microorganismo identificado en I. más arriba, y recibió una petición para convertir el depósito original en un depósito bajo el Tratado de Budapest en fecha _____ (fecha de recibo de la petición de conversión).	
V. AUTORIDAD DE DEPÓSITO INTERNACIONAL	
Nombre: Agricultural Research Culture Collection (NRRL) Autoridad de depósito internacional Dirección: 1815 N. University Street Peoria, Illinois 61604 EE.UU.	Firma(s) de la(s) persona(s) que tienen el poder de representar a la Autoridad de Depósito Internacional o del funcionario autorizado: Fecha:

¹Marcar con una cruz la casilla aplicable

²Cuando se aplica la Regla 6.4(d), dicha fecha es aquella en la que se adquirió el estado de autoridad de depósito internacional

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS
FOR THE PURPOSE OF PATENT PROCEDURES

INTERNATIONAL FORM

TO
Patent Dept.
AgResearch Limited
Grasslands Research Center
Tennent Dr., Private Bag 11008
Palmerston North, New Zealand

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT
issued pursuant to Rule 7.1 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified at the bottom of this page

NAME AND ADDRESS OF DEPOSITOR

I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM	
Identification reference given by the DEPOSITOR: <i>Epichloa/Neotyphodium sp.</i> AR 3073	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY: NRRL 50721
II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION	
The microorganism identified under I. above was accompanied by:	
☐ ¹ a scientific description ☒ ¹ a proposed taxonomic designation	
III. RECEIPT AND ACCEPTANCE	
This International Depositary Authority accepts the microorganism identified under I. above, which was received by it on March 6, 2012 (date of the original deposit) ²	
IV. RECEIPT OF REQUEST FOR CONVERSION	
The microorganism identified under I. above, was received by this International Depositary Authority on _____ (date of the original deposit) and a request to convert the original deposit to a deposit under the Budapest Treaty was received by it on _____ (date of receipt of request for conversion).	
V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY	
Name: Agricultural Research Culture Collection (NRRL) International Depositary Authority Address: 1815 N. University Street Peoria, Illinois 61604 U.S.A.	Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depositary Authority or of authorized official(s): Date:  2012

¹ Mark with a cross the applicable box.

² Where Rule 6.4(d) applies, such date is the date on which the status of international depositary authority was acquired.

(Traducción al español en página siguiente)

TRATADO DE BUDAPEST SOBRE EL RECONOCIMIENTO
INTERNACIONAL DEL DEPÓSITO DE MICROORGANISMOS
A LOS FINES DE LOS PROCEDIMIENTOS DE PATENTES

FORMULARIO INTERNACIONAL

Dirigido Al	RECIBO EN CASO DE UN DEPÓSITO ORIGINAL
Dpto. de patentes	emitido de conformidad con la Regla 7.1 por la
AgResearch Limited	AUTORIDAD INTERNACIONAL DE DEPÓSITO
Grasslands Research Center	identificada al final de esta página
Tennent Dr., Private Bag 11008	
Palmerston North, Nueva Zelanda	

NOMBRE Y DIRECCIÓN DEL DEPOSITANTE

I. IDENTIFICACIÓN DEL MICROORGANISMO	
Referencia de identificación proporcionada por el DEPOSITANTE: Epichloe / Neotyphodium sp. AR 3073	Número de acceso proporcionado por la AUTORIDAD INTERNACIONAL DE DEPÓSITO: NRRL 50721
II. DESCRIPCIÓN CIENTÍFICA Y/O DESIGNACIÓN TAXONÓMICA PROPUESTA	
El microorganismo identificado en I. más arriba fue acompañado de: O ¹ una descripción científica Ø ¹ una designación taxonómica propuesta	
III. RECIBO Y ACEPTACIÓN	
Esta Autoridad de Depósito Internacional acepta el microorganismo identificado en I. más arriba, que fue recibido por ella el 6 de marzo de 2012 (fecha del depósito original) ²	
IV. RECIBO DE LA PETICIÓN DE CONVERSIÓN	
Esta Autoridad de Depósito Internacional recibió en fecha _____ (fecha del depósito original) el microorganismo identificado en I. más arriba, y recibió una petición para convertir el depósito original en un depósito bajo el Tratado de Budapest en fecha _____ (fecha de recibo de la petición de conversión).	
V. AUTORIDAD DE DEPÓSITO INTERNACIONAL	
Nombre: Agricultural Research Culture Collection (NRRL) Autoridad de depósito internacional Dirección: 1815 N. University Street Peoria, Illinois 61604 EE.UU.	Firma(s) de la(s) persona(s) que tienen el poder de representar a la Autoridad de Depósito Internacional o del funcionario autorizado: Fecha:

¹Marcar con una cruz la casilla aplicable

²Cuando se aplica la Regla 6.4(d), dicha fecha es aquella en la que se adquirió el estado de autoridad de depósito internacional

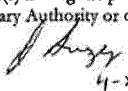
BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS
FOR THE PURPOSE OF PATENT PROCEDURES

INTERNATIONAL FORM

TO
Patent Dept.
AgResearch Limited
Grasslands Research Center
Tennent Dr., Private Bag 11008
Palmerston North, New Zealand

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT
issued pursuant to Rule 7.1 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified at the bottom of this page

NAME AND ADDRESS OF DEPOSITOR

I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM	
Identification reference given by the DEPOSITOR: <i>Epichloa/Neotyphodium sp.</i> AR 3074	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY: NRRL 50722
II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION	
The microorganism identified under I. above was accompanied by: ☐ a scientific description ☒ a proposed taxonomic designation	
III. RECEIPT AND ACCEPTANCE	
This International Depositary Authority accepts the microorganism identified under I. above, which was received by it on March 6, 2012 (date of the original deposit) ¹	
IV. RECEIPT OF REQUEST FOR CONVERSION	
The microorganism identified under I. above, was received by this International Depositary Authority on _____ (date of the original deposit) and a request to convert the original deposit to a deposit under the Budapest Treaty was received by it on _____ (date of receipt of request for conversion).	
V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY	
Name: Agricultural Research Culture Collection (NRRL) International Depositary Authority Address: 1815 N. University Street Peoria, Illinois 61604 U.S.A.	Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depositary Authority or of authorized official(s):  Date: 4-22-12

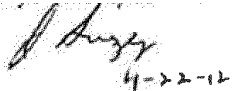
¹ Mark with a cross the applicable box.

² Where Rule 6.4(d) applies, such date is the date on which the status of international depositary authority was acquired.

(Traducción al español en página siguiente)

TRATADO DE BUDAPEST SOBRE EL RECONOCIMIENTO
INTERNACIONAL DEL DEPÓSITO DE MICROORGANISMOS
A LOS FINES DE LOS PROCEDIMIENTOS DE PATENTES
FORMULARIO INTERNACIONAL

Dirigido Al	RECIBO EN CASO DE UN DEPÓSITO ORIGINAL
Dpto. de patentes	emitido de conformidad con la Regla 7.1 por la
AgResearch Limited	AUTORIDAD INTERNACIONAL DE DEPÓSITO
Grasslands Research Center	identificada al final de esta página
Tennent Dr., Private Bag 11008	
Palmerston North, Nueva Zelanda	
NOMBRE Y DIRECCIÓN DEL DEPOSITANTE	

I. IDENTIFICACIÓN DEL MICROORGANISMO	
Referencia de identificación proporcionada por el DEPOSITANTE: Epichloe / Neotyphodium sp. AR 3074	Número de acceso proporcionado por la AUTORIDAD INTERNACIONAL DE DEPÓSITO: NRRL 50722
II. DESCRIPCIÓN CIENTÍFICA Y/O DESIGNACIÓN TAXONÓMICA PROPUESTA	
El microorganismo identificado en I. más arriba fue acompañado de: ☐ ¹ una descripción científica ☒ ¹ una designación taxonómica propuesta	
III. RECIBO Y ACEPTACIÓN	
Esta Autoridad de Depósito Internacional acepta el microorganismo identificado en I. más arriba, que fue recibido por ella el 6 de marzo de 2012 (fecha del depósito original) ²	
IV. RECIBO DE LA PETICIÓN DE CONVERSIÓN	
Esta Autoridad de Depósito Internacional recibió en fecha _____ (fecha del depósito original) el microorganismo identificado en I. más arriba, y recibió una petición para convertir el depósito original en un depósito bajo el Tratado de Budapest en fecha _____ (fecha de recibo de la petición de conversión).	
V. AUTORIDAD DE DEPÓSITO INTERNACIONAL	
Nombre: Agricultural Research Culture Collection (NRRL) Autoridad de depósito internacional Dirección: 1815 N. University Street Peoria, Illinois 61604 EE.UU.	Firma(s) de la(s) persona(s) que tienen el poder de representar a la Autoridad de Depósito Internacional o del funcionario autorizado:  4-22-12 Fecha:

¹Marcar con una cruz la casilla aplicable

²Cuando se aplica la Regla 6.4(d), dicha fecha es aquella en la que se adquirió el estado de autoridad de depósito internacional

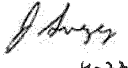
BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS
FOR THE PURPOSE OF PATENT PROCEDURES

INTERNATIONAL FORM

TO
Patent Dept.
AgResearch Limited
Grasslands Research Center
Tennent Dr., Private Bag 11008
Palmerston North, New Zealand

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT
issued pursuant to Rule 7.1 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified at the bottom of this page

NAME AND ADDRESS OF DEPOSITOR

I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM	
Identification reference given by the DEPOSITOR: <i>Epiblastus/Neotyphodium sp.</i> AR 3076	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY: NRRL 50723
II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION	
The microorganism identified under I. above was accompanied by: ☐ ¹ a scientific description ☒ ¹ a proposed taxonomic designation	
III. RECEIPT AND ACCEPTANCE	
This International Depositary Authority accepts the microorganism identified under I. above, which was received by it on March 6, 2012 (date of the original deposit) ²	
IV. RECEIPT OF REQUEST FOR CONVERSION	
The microorganism identified under I. above, was received by this International Depositary Authority on _____ (date of the original deposit) and a request to convert the original deposit to a deposit under the Budapest Treaty was received by it on _____ (date of receipt of request for conversion).	
V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY	
Name: Agricultural Research Culture Collection (NRRL) International Depositary Authority Address: 1815 N. University Street Peoria, Illinois 61604 U.S.A.	Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depositary Authority or of authorized official(s):  Date: 4-22-12

¹ Mark with a cross the applicable box.

² Where Rule 6.4(d) applies, such date is the date on which the status of international depositary authority was acquired.

(Traducción al español en página siguiente)

TRATADO DE BUDAPEST SOBRE EL RECONOCIMIENTO
INTERNACIONAL DEL DEPÓSITO DE MICROORGANISMOS
A LOS FINES DE LOS PROCEDIMIENTOS DE PATENTES

FORMULARIO INTERNACIONAL

Dirigido Al	RECIBO EN CASO DE UN DEPÓSITO ORIGINAL
Dpto. de patentes	emitido de conformidad con la Regla 7.1 por la
AgResearch Limited	AUTORIDAD INTERNACIONAL DE DEPÓSITO
Grasslands Research Center	identificada al final de esta página
Tennent Dr., Private Bag 11008	
Palmerston North, Nueva Zelanda	

NOMBRE Y DIRECCIÓN DEL DEPOSITANTE

I. IDENTIFICACIÓN DEL MICROORGANISMO	
Referencia de identificación proporcionada por el DEPOSITANTE: Epichloe / Neotyphodium sp. AR 3076	Número de acceso proporcionado por la AUTORIDAD INTERNACIONAL DE DEPÓSITO: NRRL 50723
II. DESCRIPCIÓN CIENTÍFICA Y/O DESIGNACIÓN TAXONÓMICA PROPUESTA	
El microorganismo identificado en I. más arriba fue acompañado de: ☐ ¹ una descripción científica ☒ ¹ una designación taxonómica propuesta	
III. RECIBO Y ACEPTACIÓN	
Esta Autoridad de Depósito Internacional acepta el microorganismo identificado en I. más arriba, que fue recibido por ella el 6 de marzo de 2012 (fecha del depósito original) ²	
IV. RECIBO DE LA PETICIÓN DE CONVERSIÓN	
Esta Autoridad de Depósito Internacional recibió en fecha _____ (fecha del depósito original) el microorganismo identificado en I. más arriba, y recibió una petición para convertir el depósito original en un depósito bajo el Tratado de Budapest en fecha _____ (fecha de recibo de la petición de conversión).	
V. AUTORIDAD DE DEPÓSITO INTERNACIONAL	
Nombre: Agricultural Research Culture Collection (NRRL) Autoridad de depósito internacional Dirección: 1815 N. University Street Peoria, Illinois 61604 EE.UU.	Firma(s) de la(s) persona(s) que tienen el poder de representar a la Autoridad de Depósito Internacional o del funcionario autorizado:  4-22-12 Fecha:

¹Marcar con una cruz la casilla aplicable

²Cuando se aplica la Regla 6.4(d), dicha fecha es aquella en la que se adquirió el estado de autoridad de depósito internacional

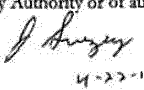
BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS
FOR THE PURPOSE OF PATENT PROCEDURES

INTERNATIONAL FORM

TO
Patent Dept.
AgResearch Limited
Grasslands Research Center
Tennent Dr., Private Bag 11008
Palmerston North, New Zealand

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT
issued pursuant to Rule 7.1 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified at the bottom of this page

NAME AND ADDRESS OF DEPOSITOR

I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM	
Identification reference given by the DEPOSITOR: <i>Epichloa/Neotyphodium sp.</i> AR 3078	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY: NRRL 50724
II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION	
The microorganism identified under I. above was accompanied by: ☐ ¹ a scientific description ☒ ¹ a proposed taxonomic designation	
III. RECEIPT AND ACCEPTANCE	
This International Depositary Authority accepts the microorganism identified under I. above, which was received by it on March 6, 2012 (date of the original deposit) ²	
IV. RECEIPT OF REQUEST FOR CONVERSION	
The microorganism identified under I. above, was received by this International Depositary Authority on _____ (date of the original deposit) and a request to convert the original deposit to a deposit under the Budapest Treaty was received by it on _____ (date of receipt of request for conversion).	
V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY	
Name: Agricultural Research Culture Collection (NRRL) International Depositary Authority Address: 1815 N. University Street Peoria, Illinois 61604 U.S.A.	Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depositary Authority or of authorized official(s):  Date: 4-22-12

¹ Mark with a cross the applicable box.

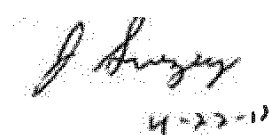
² Where Rule 6.4(d) applies, such date is the date on which the status of international depositary authority was acquired.

(Traducción al español en página siguiente)

TRATADO DE BUDAPEST SOBRE EL RECONOCIMIENTO
INTERNACIONAL DEL DEPÓSITO DE MICROORGANISMOS
A LOS FINES DE LOS PROCEDIMIENTOS DE PATENTES

FORMULARIO INTERNACIONAL

Dirigido Al	RECIBO EN CASO DE UN DEPÓSITO ORIGINAL
Dpto. de patentes	emitido de conformidad con la Regla 7.1 por la
AgResearch Limited	AUTORIDAD INTERNACIONAL DE DEPÓSITO
Grasslands Research Center	identificada al final de esta página
Tennent Dr., Private Bag 11008	
Palmerston North, Nueva Zelanda	
NOMBRE Y DIRECCIÓN DEL DEPOSITANTE	

I. IDENTIFICACIÓN DEL MICROORGANISMO	
Referencia de identificación proporcionada por el DEPOSITANTE: Epichloe / Neotyphodium sp. AR 3078	Número de acceso proporcionado por la AUTORIDAD INTERNACIONAL DE DEPÓSITO: NRRL 50724
II. DESCRIPCIÓN CIENTÍFICA Y/O DESIGNACIÓN TAXONÓMICA PROPUESTA	
El microorganismo identificado en I. más arriba fue acompañado de: ☐ ¹ una descripción científica ☒ ¹ una designación taxonómica propuesta	
III. RECIBO Y ACEPTACIÓN	
Esta Autoridad de Depósito Internacional acepta el microorganismo identificado en I. más arriba, que fue recibido por ella el 6 de marzo de 2012 (fecha del depósito original) ²	
IV. RECIBO DE LA PETICIÓN DE CONVERSIÓN	
Esta Autoridad de Depósito Internacional recibió en fecha _____ (fecha del depósito original) el microorganismo identificado en I. más arriba, y recibió una petición para convertir el depósito original en un depósito bajo el Tratado de Budapest en fecha _____ (fecha de recibo de la petición de conversión).	
V. AUTORIDAD DE DEPÓSITO INTERNACIONAL	
Nombre: Agricultural Research Culture Collection (NRRL) Autoridad de depósito internacional Dirección: 1815 N. University Street Peoria, Illinois 61604 EE.UU.	Firma(s) de la(s) persona(s) que tienen el poder de representar a la Autoridad de Depósito Internacional o del funcionario autorizado:  4-22-12 Fecha:

¹Marcar con una cruz la casilla aplicable

²Cuando se aplica la Regla 6.4(d), dicha fecha es aquella en la que se adquirió el estado de autoridad de depósito internacional

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL RECOGNITION OF THE DEPOSIT
OF MICROORGANISMS FOR THE PURPOSE OF PATENT PROCEDURES

INTERNATIONAL FORM

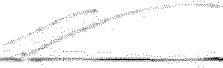
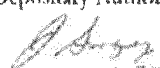
TO

Patent Dept.
AgResearch Limited
Grasslands Research Center
Tennent Dr., Private Bag 11008
Palmerston North, New Zealand

VIABILITY STATEMENT

issued pursuant to Rule 10.2 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified at the bottom of this page

NAME AND ADDRESS OF THE PARTY TO WHOM
THE VIABILITY STATEMENT IS ISSUED

I. DEPOSITOR	II. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM
Name: Dr. Wayne Simpson AgResearch Limited Grasslands Research Center Address: Tennent Dr., Private Bag 11008 Palmerston North, New Zealand	Depositor's taxonomic designation and accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY <i>Epichloa Neotyphodium</i> sp. NRRL 50716 Date of: March 6, 2012 ☒ Original Deposit ☐ New Deposit ☐ Repropagation of Original Deposit
III. (a) VIABILITY STATEMENT	
Deposit was found: ☒ Viable ☐ Nonviable on <u>March 10, 2012</u> (Date) International Depository Authority's preparation was found viable on <u>March 20, 2012</u> (Date)¹	
III. (b) DEPOSITOR'S EQUIVALENCY DECLARATION	
Depositor determined the International Depository Authority's preparation was ☒ Equivalent ☐ Not equivalent to deposit on <u>July 5, 2012</u> (Date)	
Signature of Depositor 	
IV. CONDITIONS UNDER WHICH THE VIABILITY TEST WAS PERFORMED (Depositors/Depository) ²	
V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY	
Name: Agricultural Research Culture Collection (NRRL) International Depository Authority Address: 1815 N. University Street Peoria, Illinois 61604 U.S.A.	Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depository Authority or of authorized official(s):  Date: <u>6-24-11</u>

¹ Indicate the date of the original deposit or when a new deposit has been made.

² Mark with a cross the applicable box.

³ In the cases referred to in Rule 10.2(a) and (b), refer to the most recent viability test.

⁴ Fill in if the information has been requested.

(Traducción al español en página siguiente)

**TRATADO DE BUDAPEST SOBRE EL RECONOCIMIENTO INTERNACIONAL DEL DEPÓSITO DE
MICROORGANISMOS A LOS FINES DE LOS PROCEDIMIENTOS DE PATENTES**

FORMULARIO INTERNACIONAL

DECLARACIÓN DE VIABILIDAD

Dirigido al

Dpto. de patentes

emitido de conformidad con la Regla 10.2 por la

AgResearch Limited

AUTORIDAD INTERNACIONAL DE DEPÓSITO

Grasslands Research Center

identificada al final de esta página

Tennent Dr., Private Bag 11008

Palmerston North, Nueva Zelanda

NOMBRE Y DIRECCIÓN DE LA PARTE A LA QUE

SE EXPIDE LA DECLARACIÓN DE VIABILIDAD

I. DEPOSITANTE	II. IDENTIFICACIÓN DEL MICROORGANISMO
Nombre: Dr. Wayne Simpson AgResearch Limited Grasslands Research Center Dirección: Tennent Dr., Private Bag 11008 Palmerston North, Nueva Zelanda	Designación taxonómica y número de acceso del depositante proporcionado por la AUTORIDAD DE DEPÓSITO INTERNACIONAL Epichloe / Neotyphodium sp. NRRL 50716 Fecha: 6 de marzo de 2012 ☒ Depósito original ☐ Nuevo depósito ☐ Repropagación del depósito original
III. (a) DECLARACIÓN DE VIABILIDAD	
El depósito resultó ser: ☒ ²Viable ☐ ²No viable a fecha <u>10 de marzo de 2012</u> La preparación de la Autoridad Internacional de Depósito resultó ser viable a fecha¹ <u>20 de marzo de 2012</u>	
III. (b) DECLARACIÓN DE EQUIVALENCIA DEL SOLICITANTE	
☒ ²Equivalente ☐ ²No equivalente al depósito en fecha 5 de julio de 2012 Firma del Depositante 	
IV. CONDICIONES EN LAS QUE SE HA REALIZADO LA PRUEBA DE VIABILIDAD (Depositante/Depositorio) ⁴	
V. AUTORIDAD INTERNACIONAL DE DEPÓSITO	
Nombre: Agricultural Research Culture Collection (NRRL) Autoridad de Depósito Internacional Dirección: 1815 N, University Street Peoria, Illinois 61604 EE.UU.	Firma(s) de la(s) persona(s) que tienen el poder de representar a la Autoridad de Depósito Internacional o del funcionario autorizado:  Fecha: <u>6-24-12</u>

¹ Indique la fecha del depósito original o cuando se ha realizado un nuevo depósito

² Marque con una cruz la casilla correspondiente.

³ En los casos mencionados en la Regla 10.2 (a) (ii) y (iii), haga referencia a la prueba de viabilidad más reciente.

⁴ Complete si se ha pedido esta información

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL RECOGNITION OF THE DEPOSIT
OF MICROORGANISMS FOR THE PURPOSE OF PATENT PROCEDURES

INTERNATIONAL FORM

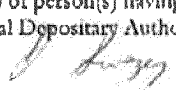
TO

Patent Dept.
AgResearch limited
Grasslands Research Center
Tennent Drive, Private Bag 11008
Palmerston North, New Zealand

VIABILITY STATEMENT

issued pursuant to Rule 10.2 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified at the bottom of this page

NAME AND ADDRESS OF THE PARTY TO WHOM
THE VIABILITY STATEMENT IS ISSUED

I. DEPOSITOR	II. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM
Name: Dr. Wayne Simpson AgResearch Limited Grasslands Research Center Address: Tennent Drive, Private Bag 11008 Palmerston North, New Zealand	Depositor's taxonomic designation and accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY <i>Epichloe/Neotyphodium spp.</i> NRRL 50576 Date of: October 13, 2011 ☒ Original Deposit ☐ New Deposit ☐ Repropagation of Original Deposit
III. (a) VIABILITY STATEMENT	
Deposit was found: ☒ ¹Viable ☐ ²Nonviable on <u>October 17, 2011</u> (Date) International Depositary Authority's preparation was found viable on <u>October 25, 2011</u> (Date)³	
III. (b) DEPOSITOR'S EQUIVALENCY DECLARATION	
Depositor determined the International Depositary Authority's preparation was ☒ ²Equivalent ☐ ²Not equivalent to deposit on <u>July 5, 2012</u> (Date) Signature of Depositor 	
IV. CONDITIONS UNDER WHICH THE VIABILITY TEST WAS PERFORMED (Depositors/Depositary) ⁴	
V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY	
Name: Agricultural Research Culture Collection (NRRL) International Depositary Authority Address: 1815 N. University Street Peoria, Illinois 61604 U.S.A.	Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depositary Authority or of authorized official(s):  Date: <u>6-2-11</u>

¹ Indicate the date of the original deposit or when a new deposit has been made.

² Mark with a cross the applicable box.

³ In the cases referred to in Rule 10.2(a)(ii) and (iii), refer to the most recent viability test.

⁴ Fill in if the information has been requested.

(Traducción al español en página siguiente)

**TRATADO DE BUDAPEST SOBRE EL RECONOCIMIENTO INTERNACIONAL DEL DEPÓSITO DE
MICROORGANISMOS A LOS FINES DE LOS PROCEDIMIENTOS DE PATENTES**

FORMULARIO INTERNACIONAL

DECLARACIÓN DE VIABILIDAD

Dirigido al

Dpto. de patentes

emitido de conformidad con la Regla 10.2 por la

AgResearch Limited

AUTORIDAD INTERNACIONAL DE DEPÓSITO

Grasslands Research Center

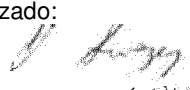
identificada al final de esta página

Tennent Dr., Private Bag 11008

Palmerston North, Nueva Zelanda

NOMBRE Y DIRECCIÓN DE LA PARTE A LA QUE

SE EXPIDE LA DECLARACIÓN DE VIABILIDAD

I. DEPOSITANTE		II. IDENTIFICACIÓN DEL MICROORGANISMO	
Nombre: Dr. Wayne Simpson AgResearch Limited Grasslands Research Center Dirección: Tennent Dr., Private Bag 11008 Palmerston North, Nueva Zelanda		Designación taxonómica y número de acceso del depositante proporcionado por la AUTORIDAD DE DEPÓSITO INTERNACIONAL Epichloe / Neotyphodium sp. NRRL 50576 Fecha: 13 de octubre de 2011 ☒ Depósito original ☐ Nuevo depósito ☐ Repropagación del depósito original	
III. (a) DECLARACIÓN DE VIABILIDAD			
El depósito resultó ser: ☒ ² Viable ☐ ² No viable a fecha <u>17 de octubre de 2011</u> La preparación de la Autoridad Internacional de Depósito resultó ser viable a fecha ¹ <u>25 de octubre de 2011</u>			
III. (b) DECLARACIÓN DE EQUIVALENCIA DEL SOLICITANTE			
☒ ² Equivalente ☐ ² No equivalente al depósito en fecha 5 de julio de 2012 Firma del Depositante 			
IV. CONDICIONES EN LAS QUE SE HA REALIZADO LA PRUEBA DE VIABILIDAD (Depositante/Depositorio) ⁴			
V. AUTORIDAD INTERNACIONAL DE DEPÓSITO			
Nombre: Agricultural Research Culture Collection (NRRL) Autoridad de Depósito Internacional Dirección: 1815 N, University Street Peoria, Illinois 61604 EE.UU.		Firma(s) de la(s) persona(s) que tienen el poder de representar a la Autoridad de Depósito Internacional o del funcionario autorizado:  Fecha: <u>6-10-12</u>	

¹ Indique la fecha del depósito original o cuando se ha realizado un nuevo depósito

² Marque con una cruz la casilla correspondiente.

³ En los casos mencionados en la Regla 10.2 (a) (ii) y (iii), haga referencia a la prueba de viabilidad más reciente.

⁴ Complete si se ha pedido esta información

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL RECOGNITION OF THE DEPOSIT
OF MICROORGANISMS FOR THE PURPOSE OF PATENT PROCEDURES

INTERNATIONAL FORM

TO

Patent Dept.
AgResearch limited
Grasslands Research Center
Tennent Drive, Private Bag 11008
Palmerston North, New Zealand

VIABILITY STATEMENT

issued pursuant to Rule 10.2 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified at the bottom of this page

NAME AND ADDRESS OF THE PARTY TO WHOM
THE VIABILITY STATEMENT IS ISSUED

I. DEPOSITOR	II. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM
Name: Dr. Wayne Simpson AgResearch Limited Grasslands Research Center Address: Tennent Drive, Private Bag 11008 Palmerston North, New Zealand	Depositor's taxonomic designation and accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY <i>Epichloe/Neotyphodium spp.</i> NRRL 50577 Date of: October 13, 2011 ☒ Original Deposit ☐ New Deposit ☐ Repropagation of Original Deposit
III. (a) VIABILITY STATEMENT	
Deposit was found: ☒ ² Viable ☐ ² Nonviable on <u>October 17, 2011</u> (Date) International Depositary Authority's preparation was found viable on <u>October 25, 2011</u> (Date) ¹	
III. (b) DEPOSITOR'S EQUIVALENCY DECLARATION	
Depositor determined the International Depositary Authority's preparation was ☒ ² Equivalent ☐ ² Not equivalent to deposit on <u>July 5, 2012</u> (Date)	
Signature of Depositor 	
IV. CONDITIONS UNDER WHICH THE VIABILITY TEST WAS PERFORMED (Depositors/Depository)⁴	
V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY	
Name: Agricultural Research Culture Collection (NRRI) International Depositary Authority Address: 1815 N. University Street Peoria, Illinois 61604 U.S.A.	Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depositary Authority or of authorized official(s):  Date: <u>6-20-12</u>

² Indicate the date of the original deposit or when a new deposit has been made.

¹ Mark with a cross the applicable box.

³ In the case referred to in Rule 10.2(a)(ii) and (iii), refer to the most recent viability test

⁴ Fill in if the information has been requested

(Traducción al español en página siguiente)

TRATADO DE BUDAPEST SOBRE EL RECONOCIMIENTO INTERNACIONAL DEL DEPÓSITO DE MICROORGANISMOS A LOS FINES DE LOS PROCEDIMIENTOS DE PATENTES

FORMULARIO INTERNACIONAL

DECLARACIÓN DE VIABILIDAD

Dirigido al

Dpto. de patentes

emitido de conformidad con la Regla 10.2 por la

AgResearch Limited

AUTORIDAD INTERNACIONAL DE DEPÓSITO

Grasslands Research Center

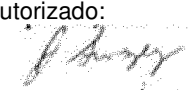
identificada al final de esta página

Tennent Dr., Private Bag 11008

Palmerston North, Nueva Zelanda

NOMBRE Y DIRECCIÓN DE LA PARTE A LA QUE

SE EXPIDE LA DECLARACIÓN DE VIABILIDAD

I. DEPOSITANTE	II. IDENTIFICACIÓN DEL MICROORGANISMO
Nombre: Dr. Wayne Simpson AgResearch Limited Grasslands Research Center Dirección: Tennent Dr., Private Bag 11008 Palmerston North, Nueva Zelanda	Designación taxonómica y número de acceso del depositante proporcionado por la AUTORIDAD DE DEPÓSITO INTERNACIONAL Epichloe / Neotyphodium sp. NRRL 50577 Fecha: 13 de octubre de 2011 ☒ Depósito original ☐ Nuevo depósito ☐ Repropagación del depósito original
III. (a) DECLARACIÓN DE VIABILIDAD	
El depósito resultó ser: ☒ ²Viable ☐ ²No viable a fecha <u>17 de octubre de 2011</u> La preparación de la Autoridad Internacional de Depósito resultó ser viable a fecha¹ <u>25 de octubre de 2011</u>	
III. (b) DECLARACIÓN DE EQUIVALENCIA DEL SOLICITANTE	
☒ ²Equivalente ☐ ²No equivalente al depósito en fecha <u>5 de julio de 2012</u> Firma del Depositante 	
IV. CONDICIONES EN LAS QUE SE HA REALIZADO LA PRUEBA DE VIABILIDAD (Depositante/Depositorio) ⁴	
V. AUTORIDAD INTERNACIONAL DE DEPÓSITO	
Nombre: Agricultural Research Culture Collection (NRRL) Autoridad de Depósito Internacional Dirección: 1815 N, University Street Peoria, Illinois 61604 EE.UU.	Firma(s) de la(s) persona(s) que tienen el poder de representar a la Autoridad de Depósito Internacional o del funcionario autorizado:  Fecha: <u>6-10-12</u>

¹ Indique la fecha del depósito original o cuando se ha realizado un nuevo depósito

² Marque con una cruz la casilla correspondiente.

³ En los casos mencionados en la Regla 10.2 (a) (ii) y (iii), haga referencia a la prueba de viabilidad más reciente.

⁴ Complete si se ha pedido esta información

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL RECOGNITION OF THE DEPOSIT
OF MICROORGANISMS FOR THE PURPOSE OF PATENT PROCEDURES

INTERNATIONAL FORM

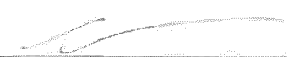
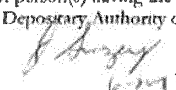
TO

Patent Dept.
AgResearch limited
Grasslands Research Center
Tennent Drive, Private Bag 11008
Palmerston North, New Zealand

VIABILITY STATEMENT

issued pursuant to Rule 10.2 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified at the bottom of this page

NAME AND ADDRESS OF THE PARTY TO WHOM
THE VIABILITY STATEMENT IS ISSUED

I. DEPOSITOR Name: Dr. Wayne Simpson AgResearch Limited Grasslands Research Center Address: Tennent Drive, Private Bag 11008 Palmerston North, New Zealand	II. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM Depositor's taxonomic designation and accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY <i>Epichloe/Neotyphodium spp.</i> NRRL 50578 Date of: October 13, 2011 ☒ Original Deposit ☐ New Deposit ☐ Repropagation of Original Deposit
III. (a) VIABILITY STATEMENT¹	
Deposit was found: ☒ ² Viable ☐ ² Nonviable on <u>October 17, 2011</u> (Date) International Depositary Authority's preparation was found viable on <u>October 25, 2011</u> (Date) ³	
III. (b) DEPOSITOR'S EQUIVALENCY DECLARATION	
Depositor determined the International Depositary Authority's preparation was ☒ ² Equivalent ☐ ² Not equivalent to deposit on <u>July 5, 2012</u> (Date) Signature of Depositor 	
IV. CONDITIONS UNDER WHICH THE VIABILITY TEST WAS PERFORMED (Depositors/Depositary)⁴	
V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY	
Name: Agricultural Research Culture Collection (NRRL) International Depositary Authority Address: 1815 N. University Street Peoria, Illinois 61604 U.S.A.	Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depositary Authority or of authorized official(s):  Date: <u>6/11/12</u>

¹ Indicates the date of the original deposit or when a new deposit has been made.

² Mark with a cross the applicable box.

³ In the cases referred to in Rule 10.2(a)(ii) and (iii), refer to the most recent viability test.

⁴ Fill in if the information has been requested.

(Traducción al español en página siguiente)

TRATADO DE BUDAPEST SOBRE EL RECONOCIMIENTO INTERNACIONAL DEL DEPÓSITO DE MICROORGANISMOS A LOS FINES DE LOS PROCEDIMIENTOS DE PATENTES

FORMULARIO INTERNACIONAL

DECLARACIÓN DE VIABILIDAD

Dirigido al

Dpto. de patentes

emitido de conformidad con la Regla 10.2 por la

AgResearch Limited

AUTORIDAD INTERNACIONAL DE DEPÓSITO

Grasslands Research Center

identificada al final de esta página

Tennent Dr., Private Bag 11008

Palmerston North, Nueva Zelanda

NOMBRE Y DIRECCIÓN DE LA PARTE A LA QUE

SE EXPIDE LA DECLARACIÓN DE VIABILIDAD

I. DEPOSITANTE	II. IDENTIFICACIÓN DEL MICROORGANISMO
Nombre: Dr. Wayne Simpson AgResearch Limited Grasslands Research Center Dirección: Tennent Dr., Private Bag 11008 Palmerston North, Nueva Zelanda	Designación taxonómica y número de acceso del depositante proporcionado por la AUTORIDAD DE DEPÓSITO INTERNACIONAL Epichloe / Neotyphodium sp. NRRL 50578 Fecha: 13 de octubre de 2011 ☒ Depósito original ☐ Nuevo depósito ☐ Repropagación del depósito original
III. (a) DECLARACIÓN DE VIABILIDAD	
El depósito resultó ser: ☒ ²Viable ☐ ²No viable a fecha <u>17 de octubre de 2011</u> La preparación de la Autoridad Internacional de Depósito resultó ser viable a fecha¹ <u>25 de octubre de 2011</u>	
III. (b) DECLARACIÓN DE EQUIVALENCIA DEL SOLICITANTE	
☒ ²Equivalente ☐ ²No equivalente al depósito en fecha 5 de julio de 2012 Firma del Depositante 	
IV. CONDICIONES EN LAS QUE SE HA REALIZADO LA PRUEBA DE VIABILIDAD (Depositante/Depositorio) ⁴	
V. AUTORIDAD INTERNACIONAL DE DEPÓSITO	
Nombre: Agricultural Research Culture Collection (NRRL) Autoridad de Depósito Internacional Dirección: 1815 N, University Street Peoria, Illinois 61604 EE.UU.	Firma(s) de la(s) persona(s) que tienen el poder de representar a la Autoridad de Depósito Internacional o del funcionario autorizado:  Fecha:

¹ Indique la fecha del depósito original o cuando se ha realizado un nuevo depósito

² Marque con una cruz la casilla correspondiente.

³ En los casos mencionados en la Regla 10.2 (a) (ii) y (iii), haga referencia a la prueba de viabilidad más reciente.

⁴ Complete si se ha pedido esta información

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL RECOGNITION OF THE DEPOSIT
OF MICROORGANISMS FOR THE PURPOSE OF PATENT PROCEDURES

INTERNATIONAL FORM

TO

Patent Dept.
AgResearch Limited
Grasslands Research Center
Tennent Dr., Private Bag 11008
Palmerston North, New Zealand

VIABILITY STATEMENT

issued pursuant to Rule 10.2 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified at the bottom of this page

NAME AND ADDRESS OF THE PARTY TO WHOM
THE VIABILITY STATEMENT IS ISSUED

I. DEPOSITOR Name: Dr. Wayne Simpson AgResearch Limited Grasslands Research Center Address: Tennent Dr., Private Bag 11008 Palmerston North, New Zealand	II. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM Depositor's taxonomic designation and accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY <i>Epichloe/Neotyphodium sp.</i> NRRL 50718 Date of : March 6, 2012 ☒ Original Deposit ☐ New Deposit ☐ Repropagation of Original Deposit		
III. (a) VIABILITY STATEMENT Deposit was found: ☒ Viable ☐ Nonviable on <u>March 10, 2012</u> (Date) International Depository Authority's preparation was found viable on <u>March 20, 2012</u> (Date) ¹			
III. (b) DEPOSITOR'S EQUIVALENCY DECLARATION Depositor determined the International Depository Authority's preparation was ☒ Equivalent ☐ Not equivalent to deposit on <u>July 5, 2012</u> (Date) Signature of Depositor: 			
IV. CONDITIONS UNDER WHICH THE VIABILITY TEST WAS PERFORMED (Depositors/Depository)⁴ 			
V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY <table border="1"> <tr> <td data-bbox="229 1377 710 1507"> Name: Agricultural Research Culture Collection (NRRL) International Depository Authority Address: 1815 N. University Street Peoria, Illinois 61604 U.S.A. </td> <td data-bbox="710 1377 1212 1507"> Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depository Authority or of authorized official(s):  Date: <u>4-24-12</u> </td> </tr> </table>		Name: Agricultural Research Culture Collection (NRRL) International Depository Authority Address: 1815 N. University Street Peoria, Illinois 61604 U.S.A.	Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depository Authority or of authorized official(s):  Date: <u>4-24-12</u>
Name: Agricultural Research Culture Collection (NRRL) International Depository Authority Address: 1815 N. University Street Peoria, Illinois 61604 U.S.A.	Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depository Authority or of authorized official(s):  Date: <u>4-24-12</u>		

¹ Indicate the date of the original deposit or when a new deposit has been made.² Mark with a cross the applicable box.³ In the cases referred to in Rule 10.2(a)(ii) and (iii), refer to the most recent viability test.⁴ Fill in if the information has been requested.

(Traducción al español en página siguiente)

TRATADO DE BUDAPEST SOBRE EL RECONOCIMIENTO INTERNACIONAL DEL DEPÓSITO DE MICROORGANISMOS A LOS FINES DE LOS PROCEDIMIENTOS DE PATENTES

FORMULARIO INTERNACIONAL

DECLARACIÓN DE VIABILIDAD

Dirigido al

Dpto. de patentes

emitido de conformidad con la Regla 10.2 por la

AgResearch Limited

AUTORIDAD INTERNACIONAL DE DEPÓSITO

Grasslands Research Center

identificada al final de esta página

Tennent Dr., Private Bag 11008

Palmerston North, Nueva Zelanda

NOMBRE Y DIRECCIÓN DE LA PARTE A LA QUE

SE EXPIDE LA DECLARACIÓN DE VIABILIDAD

I. DEPOSITANTE	II. IDENTIFICACIÓN DEL MICROORGANISMO
Nombre: Dr. Wayne Simpson AgResearch Limited Grasslands Research Center Dirección: Tennent Dr., Private Bag 11008 Palmerston North, Nueva Zelanda	Designación taxonómica y número de acceso del depositante proporcionado por la AUTORIDAD DE DEPÓSITO INTERNACIONAL Epichloe / Neotyphodium sp. NRRL 50718 Fecha: 06 de marzo de 2012 ☐ Depósito original ☐ Nuevo depósito ☐ Repropagación del depósito original
III. (a) DECLARACIÓN DE VIABILIDAD	
El depósito resultó ser: ☒ ²Viable ☐ ²No viable a fecha <u>10 de marzo de 2012</u> La preparación de la Autoridad Internacional de Depósito resultó ser viable a fecha¹ <u>20 de marzo de 2012</u>	
III. (b) DECLARACIÓN DE EQUIVALENCIA DEL SOLICITANTE	
☒ ²Equivalente ☐ ²No equivalente al depósito en fecha 5 de julio de 2012 Firma del Depositante 	
IV. CONDICIONES EN LAS QUE SE HA REALIZADO LA PRUEBA DE VIABILIDAD (Depositante/Depositorio) ⁴	
V. AUTORIDAD INTERNACIONAL DE DEPÓSITO	
Nombre: Agricultural Research Culture Collection (NRRL) Autoridad de Depósito Internacional Dirección: 1815 N, University Street Peoria, Illinois 61604 EE.UU.	Firma(s) de la(s) persona(s) que tienen el poder de representar a la Autoridad de Depósito Internacional o del funcionario autorizado:  Fecha: <u>4-21-12</u>

¹ Indique la fecha del depósito original o cuando se ha realizado un nuevo depósito

² Marque con una cruz la casilla correspondiente.

³ En los casos mencionados en la Regla 10.2 (a) (ii) y (iii), haga referencia a la prueba de viabilidad más reciente.

⁴ Complete si se ha pedido esta información

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL RECOGNITION OF THE DEPOSIT
OF MICROORGANISMS FOR THE PURPOSE OF PATENT PROCEDURES

INTERNATIONAL FORM

TO

Patent Dept.

AgResearch Limited
Grasslands Research Center
Tennent Dr., Private Bag 11008
Palmerston North, New Zealand

VIABILITY STATEMENT

issued pursuant to Rule 10.2 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified at the bottom of this pageNAME AND ADDRESS OF THE PARTY TO WHOM
THE VIABILITY STATEMENT IS ISSUED

I. DEPOSITOR Name: Dr. Wayne Simpson AgResearch Limited Grasslands Research Center Address: Tennent Dr., Private Bag 11008 Palmerston North, New Zealand	II. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM Depositor's taxonomic designation and accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY <i>Epichloa/Neotyphodium sp.</i> NRRL 50719 Date of: March 6, 2012 ☒ Original Deposit ☐ New Deposit ☐ Repropagation of Original Deposit
III. (a) VIABILITY STATEMENT	
Deposit was found: ☒ Viable ☐ Nonviable on <u>March 10, 2012</u> (Date) International Depositary Authority's preparation was found viable on <u>March 20, 2012</u> (Date) ¹	
III. (b) DEPOSITOR'S EQUIVALENCY DECLARATION	
Depositor determined the International Depositary Authority's preparation was ☒ Equivalent ☐ Not equivalent to deposit on <u>July 5, 2012</u> (Date) Signature of Depositor: 	
IV. CONDITIONS UNDER WHICH THE VIABILITY TEST WAS PERFORMED (Depositors/Depository)⁴ 	
V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY	
Name: Agricultural Research Culture Collection (NRRL) International Depositary Authority Address: 1815 N. University Street Peoria, Illinois 61604 U.S.A.	Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depositary Authority or of authorized official(s):  Date: <u>4-24-12</u>

¹ Indicate the date of the original deposit or when a new deposit has been made.² Mark with a cross the applicable box.³ In the cases referred to in Rule 10.2.(b)(i) and (ii), refer to the most recent viability test.⁴ Fill in if the information has been requested.

(Traducción al español en página siguiente)

TRATADO DE BUDAPEST SOBRE EL RECONOCIMIENTO INTERNACIONAL DEL DEPÓSITO DE MICROORGANISMOS A LOS FINES DE LOS PROCEDIMIENTOS DE PATENTES

FORMULARIO INTERNACIONAL

DECLARACIÓN DE VIABILIDAD

Dirigido al

Dpto. de patentes

emitido de conformidad con la Regla 10.2 por la

AgResearch Limited

AUTORIDAD INTERNACIONAL DE DEPÓSITO

Grasslands Research Center

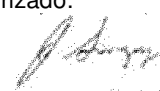
identificada al final de esta página

Tennent Dr., Private Bag 11008

Palmerston North, Nueva Zelanda

NOMBRE Y DIRECCIÓN DE LA PARTE A LA QUE

SE EXPIDE LA DECLARACIÓN DE VIABILIDAD

I. DEPOSITANTE	II. IDENTIFICACIÓN DEL MICROORGANISMO
Nombre: Dr. Wayne Simpson AgResearch Limited Grasslands Research Center Dirección: Tennent Dr., Private Bag 11008 Palmerston North, Nueva Zelanda	Designación taxonómica y número de acceso del depositante proporcionado por la AUTORIDAD DE DEPÓSITO INTERNACIONAL Epichloe / Neotyphodium sp. NRRL 50719 Fecha: 06 de marzo de 2012 ☒ Depósito original ☐ Nuevo depósito ☐ Repropagación del depósito original
III. (a) DECLARACIÓN DE VIABILIDAD	
El depósito resultó ser: ☒ ² Viable ☐ ² No viable a fecha <u>10 de marzo de 2012</u> La preparación de la Autoridad Internacional de Depósito resultó ser viable a fecha ¹ <u>20 de marzo de 2012</u>	
III. (b) DECLARACIÓN DE EQUIVALENCIA DEL SOLICITANTE	
☒ ² Equivalente ☐ ² No equivalente al depósito en fecha 5 de julio de 2012 Firma del Depositante 	
IV. CONDICIONES EN LAS QUE SE HA REALIZADO LA PRUEBA DE VIABILIDAD (Depositante/Depositorio) ⁴	
V. AUTORIDAD INTERNACIONAL DE DEPÓSITO	
Nombre: Agricultural Research Culture Collection (NRRL) Autoridad de Depósito Internacional Dirección: 1815 N, University Street Peoria, Illinois 61604 EE.UU.	Firma(s) de la(s) persona(s) que tienen el poder de representar a la Autoridad de Depósito Internacional o del funcionario autorizado:  Fecha: <u>4-24-12</u>

¹ Indique la fecha del depósito original o cuando se ha realizado un nuevo depósito

² Marque con una cruz la casilla correspondiente.

³ En los casos mencionados en la Regla 10.2 (a) (ii) y (iii), haga referencia a la prueba de viabilidad más reciente.

⁴ Complete si se ha pedido esta información

**BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL RECOGNITION OF THE DEPOSIT
OF MICROORGANISMS FOR THE PURPOSE OF PATENT PROCEDURES**

INTERNATIONAL FORM

TO

Patent Dept.
AgResearch Limited
Grasslands Research Center
Tennent Dr., Private Bag 11008
Palmerston North, New Zealand

VIABILITY STATEMENT

issued pursuant to Rule 10.2 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified at the bottom of this page

NAME AND ADDRESS OF THE PARTY TO WHOM
THE VIABILITY STATEMENT IS ISSUED

I. DEPOSITOR Name: Dr. Wayne Simpson AgResearch Limited Grasslands Research Center Address: Tennent Dr., Private Bag 11008 Palmerston North, New Zealand	II. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM Depositor's taxonomic designation and accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY <i>Epichloa Neotyphodium sp.</i> NRRL 50720 Date of: March 6, 2012 ☒ Original Deposit ☐ New Deposit ☐ Repropagation of Original Deposit		
III. (a) VIABILITY STATEMENT Deposit was found: ☒ Viable ☐ Nonviable on <u>March 10, 2012</u> (Date) International Depositary Authority's preparation was found viable on <u>March 20, 2012</u> (Date) ¹			
III. (b) DEPOSITOR'S EQUIVALENCY DECLARATION Depositor determined the International Depositary Authority's preparation was ☒ Equivalent ☐ Not equivalent to deposit on <u>July 5, 2012</u> (Date) Signature of Depositor: 			
IV. CONDITIONS UNDER WHICH THE VIABILITY TEST WAS PERFORMED (Depositors/Depository)⁴ 			
V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY <table border="1"> <tr> <td data-bbox="229 1305 699 1442"> Name: Agricultural Research Culture Collection (NRRL) International Depositary Authority Address: 1815 N. University Street Peoria, Illinois 61604 U.S.A. </td> <td data-bbox="699 1305 1208 1442"> Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depositary Authority or of authorized official(s):  Date: <u>4-24-12</u> </td> </tr> </table>		Name: Agricultural Research Culture Collection (NRRL) International Depositary Authority Address: 1815 N. University Street Peoria, Illinois 61604 U.S.A.	Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depositary Authority or of authorized official(s):  Date: <u>4-24-12</u>
Name: Agricultural Research Culture Collection (NRRL) International Depositary Authority Address: 1815 N. University Street Peoria, Illinois 61604 U.S.A.	Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depositary Authority or of authorized official(s):  Date: <u>4-24-12</u>		

¹ Indicate the date of the original deposit or when a new deposit has been made.

² Mark with a cross the applicable box.

³ In the cases referred to in Rule 10.2(a)(ii) and (iii), refer to the most recent viability test.

⁴ Fill in if the information has been requested.

(Traducción al español en página siguiente)

TRATADO DE BUDAPEST SOBRE EL RECONOCIMIENTO INTERNACIONAL DEL DEPÓSITO DE MICROORGANISMOS A LOS FINES DE LOS PROCEDIMIENTOS DE PATENTES

FORMULARIO INTERNACIONAL

DECLARACIÓN DE VIABILIDAD

Dirigido al

Dpto. de patentes

emitido de conformidad con la Regla 10.2 por la

AgResearch Limited

AUTORIDAD INTERNACIONAL DE DEPÓSITO

Grasslands Research Center

identificada al final de esta página

Tennent Dr., Private Bag 11008

Palmerston North, Nueva Zelanda

NOMBRE Y DIRECCIÓN DE LA PARTE A LA QUE

SE EXPIDE LA DECLARACIÓN DE VIABILIDAD

I. DEPOSITANTE	II. IDENTIFICACIÓN DEL MICROORGANISMO
Nombre: Dr. Wayne Simpson AgResearch Limited Grasslands Research Center Dirección: Tennent Dr., Private Bag 11008 Palmerston North, Nueva Zelanda	Designación taxonómica y número de acceso del depositante proporcionado por la AUTORIDAD DE DEPÓSITO INTERNACIONAL Epichloe / Neotyphodium sp. NRRL 50720 Fecha: 06 de marzo de 2012 ☒ Depósito original ☐ Nuevo depósito ☐ Repropagación del depósito original
III. (a) DECLARACIÓN DE VIABILIDAD	
El depósito resultó ser: ☒ ²Viable ☐ ²No viable a fecha <u>10 de marzo de 2012</u> La preparación de la Autoridad Internacional de Depósito resultó ser viable a fecha¹ <u>20 de marzo de 2012</u>	
III. (b) DECLARACIÓN DE EQUIVALENCIA DEL SOLICITANTE	
☒ ²Equivalente ☐ ²No equivalente al depósito en fecha <u>5 de julio de 2012</u>	
Firma del Depositante 	
IV. CONDICIONES EN LAS QUE SE HA REALIZADO LA PRUEBA DE VIABILIDAD (Depositante/Depositorio) ⁴	
V. AUTORIDAD INTERNACIONAL DE DEPÓSITO	
Nombre: Agricultural Research Culture Collection (NRRL) Autoridad de Depósito Internacional Dirección: 1815 N, University Street Peoria, Illinois 61604 EE.UU.	Firma(s) de la(s) persona(s) que tienen el poder de representar a la Autoridad de Depósito Internacional o del funcionario autorizado:  Fecha: <u>4-24-12</u>

¹ Indique la fecha del depósito original o cuando se ha realizado un nuevo depósito

² Marque con una cruz la casilla correspondiente.

³ En los casos mencionados en la Regla 10.2 (a) (ii) y (iii), haga referencia a la prueba de viabilidad más reciente.

⁴ Complete si se ha pedido esta información

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL RECOGNITION OF THE DEPOSIT
OF MICROORGANISMS FOR THE PURPOSE OF PATENT PROCEDURES

INTERNATIONAL FORM

TO

Patent Dept.
AgResearch Limited
Grasslands Research Center
Tennent Dr., Private Bag 11008
Palmerston North, New Zealand

VIABILITY STATEMENT

issued pursuant to Rule 10.2 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified at the bottom of this page

NAME AND ADDRESS OF THE PARTY TO WHOM
THE VIABILITY STATEMENT IS ISSUED

I. DEPOSITOR Name: Dr. Wayne Simpson AgResearch Limited Grasslands Research Center Address: Tennent Dr., Private Bag 11008 Palmerston North, New Zealand	II. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM Depositor's taxonomic designation and accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY <i>Epichloe/Nectophodium sp.</i> NRRL 50721 Date of: March 6, 2012 ☒ Original Deposit ☐ New Deposit ☐ Repropagation of Original Deposit
III. (a) VIABILITY STATEMENT	
Deposit was found: ☒ ¹ Viable ☐ ² Nonviable on <u>March 10, 2012</u> (Date) International Depositary Authority's preparation was found viable on <u>March 20, 2012</u> (Date) ³	
III. (b) DEPOSITOR'S EQUIVALENCY DECLARATION	
Depositor determined the International Depositary Authority's preparation was ☒ ⁴ Equivalent ☐ ⁴ Not equivalent to deposit on <u>July 5, 2012</u> (Date) Signature of Depositor: 	
IV. CONDITIONS UNDER WHICH THE VIABILITY TEST WAS PERFORMED (Depositors/Depositary)⁴	
V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY	
Name: Agricultural Research Culture Collection (NRRI) International Depositary Authority Address: 1815 N. University Street Peoria, Illinois 61604 U.S.A.	Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depositary Authority or of authorized official(s):  Date: <u>14-10-12</u>

¹ Indicate the date of the original deposit or when a new deposit has been made.

² Mark with a cross the applicable box.

³ In the cases referred to in Rule 50.2(a)(ii) and (iii), refer to the most recent viability test.

⁴ Fill in if the information has been requested.

(Traducción al español en página siguiente)

TRATADO DE BUDAPEST SOBRE EL RECONOCIMIENTO INTERNACIONAL DEL DEPÓSITO DE MICROORGANISMOS A LOS FINES DE LOS PROCEDIMIENTOS DE PATENTES

FORMULARIO INTERNACIONAL

DECLARACIÓN DE VIABILIDAD

Dirigido al

Dpto. de patentes

emitido de conformidad con la Regla 10.2 por la

AgResearch Limited

AUTORIDAD INTERNACIONAL DE DEPÓSITO

Grasslands Research Center

identificada al final de esta página

Tennent Dr., Private Bag 11008

Palmerston North, Nueva Zelanda

NOMBRE Y DIRECCIÓN DE LA PARTE A LA QUE

SE EXPIDE LA DECLARACIÓN DE VIABILIDAD

I. DEPOSITANTE	II. IDENTIFICACIÓN DEL MICROORGANISMO
Nombre: Dr. Wayne Simpson AgResearch Limited Grasslands Research Center Dirección: Tennent Dr., Private Bag 11008 Palmerston North, Nueva Zelanda	Designación taxonómica y número de acceso del depositante proporcionado por la AUTORIDAD DE DEPÓSITO INTERNACIONAL Epichloe / Neotyphodium sp. NRRL 50721 Fecha: 06 de marzo de 2012 ☒ Depósito original ☐ Nuevo depósito ☐ Repropagación del depósito original
III. (a) DECLARACIÓN DE VIABILIDAD	
El depósito resultó ser: ☒ ²Viable ☐ ²No viable a fecha <u>10 de marzo de 2012</u> La preparación de la Autoridad Internacional de Depósito resultó ser viable a fecha¹ <u>20 de marzo de 2012</u>	
III. (b) DECLARACIÓN DE EQUIVALENCIA DEL SOLICITANTE	
☒ ²Equivalente ☐ ²No equivalente al depósito en fecha 5 de julio de 2012 Firma del Depositante 	
IV. CONDICIONES EN LAS QUE SE HA REALIZADO LA PRUEBA DE VIABILIDAD (Depositante/Depositorio) ⁴	
V. AUTORIDAD INTERNACIONAL DE DEPÓSITO	
Nombre: Agricultural Research Culture Collection (NRRL) Autoridad de Depósito Internacional Dirección: 1815 N, University Street Peoria, Illinois 61604 EE.UU.	Firma(s) de la(s) persona(s) que tienen el poder de representar a la Autoridad de Depósito Internacional o del funcionario autorizado:  Fecha: <u>14-2-2012</u>

¹ Indique la fecha del depósito original o cuando se ha realizado un nuevo depósito

² Marque con una cruz la casilla correspondiente.

³ En los casos mencionados en la Regla 10.2 (a) (ii) y (iii), haga referencia a la prueba de viabilidad más reciente.

⁴ Complete si se ha pedido esta información

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL RECOGNITION OF THE DEPOSIT
OF MICROORGANISMS FOR THE PURPOSE OF PATENT PROCEDURES

INTERNATIONAL FORM

TO

Patent Dept.
AgResearch Limited
Grasslands Research Center
Tennent Dr., Private Bag 11008
Palmerston North, New Zealand

VIABILITY STATEMENT

issued pursuant to Rule 10.2 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified at the bottom of this page

NAME AND ADDRESS OF THE PARTY TO WHOM
THE VIABILITY STATEMENT IS ISSUED

I. DEPOSITOR Name: Dr. Wayne Simpson AgResearch Limited Grasslands Research Center Address: Tennent Dr., Private Bag 11008 Palmerston North, New Zealand	II. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM Depositor's taxonomic designation and accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY <i>Epichloe/Neotyphodium sp.</i> NRRL 50722 Date of : March 6, 2012 ☒ Original Deposit ☐ New Deposit ☐ Repropagation of Original Deposit
III. (a) VIABILITY STATEMENT	
Deposit was found: ☒ Viable ☐ Nonviable on <u>March 10, 2012</u> (Date) International Depositary Authority's preparation was found viable on <u>March 20, 2012</u> (Date) ¹	
III. (b) DEPOSITOR'S EQUIVALENCY DECLARATION	
Depositor determined the International Depositary Authority's preparation was ☒ Equivalent ☐ Not equivalent to deposit on <u>July 5, 2012</u> (Date) Signature of Depositor 	
IV. CONDITIONS UNDER WHICH THE VIABILITY TEST WAS PERFORMED (Depositors/Depository)⁴	
V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY	
Name: Agricultural Research Culture Collection (NRRL) International Depositary Authority Address: 1815 N. University Street Peoria, Illinois 61604 U.S.A.	Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depositary Authority or of authorized official(s):  Date: <u>4.27.12</u>

¹ Indicate the date of the original deposit or when a new deposit has been made.

² Mark with a cross the applicable box.

³ In the cases referred to in Rule 10.2(a)(ii) and (iii), refer to the most recent viability test.

⁴ Fill in if the information has been requested.

(Traducción al español en página siguiente)

TRATADO DE BUDAPEST SOBRE EL RECONOCIMIENTO INTERNACIONAL DEL DEPÓSITO DE MICROORGANISMOS A LOS FINES DE LOS PROCEDIMIENTOS DE PATENTES

FORMULARIO INTERNACIONAL

DECLARACIÓN DE VIABILIDAD

Dirigido al

Dpto. de patentes

emitido de conformidad con la Regla 10.2 por la

AgResearch Limited

AUTORIDAD INTERNACIONAL DE DEPÓSITO

Grasslands Research Center

identificada al final de esta página

Tennent Dr., Private Bag 11008

Palmerston North, Nueva Zelanda

NOMBRE Y DIRECCIÓN DE LA PARTE A LA QUE

SE EXPIDE LA DECLARACIÓN DE VIABILIDAD

I. DEPOSITANTE	II. IDENTIFICACIÓN DEL MICROORGANISMO
Nombre: Dr. Wayne Simpson AgResearch Limited Grasslands Research Center Dirección: Tennent Dr., Private Bag 11008 Palmerston North, Nueva Zelanda	Designación taxonómica y número de acceso del depositante proporcionado por la AUTORIDAD DE DEPÓSITO INTERNACIONAL Epichloe / Neotyphodium sp. NRRL 50722 Fecha: 06 de marzo de 2012 ☒ Depósito original ☐ Nuevo depósito ☐ Repropagación del depósito original
III. (a) DECLARACIÓN DE VIABILIDAD	
El depósito resultó ser: ☒ ²Viable ☐ ²No viable a fecha <u>10 de marzo de 2012</u> La preparación de la Autoridad Internacional de Depósito resultó ser viable a fecha¹ <u>20 de marzo de 2012</u>	
III. (b) DECLARACIÓN DE EQUIVALENCIA DEL SOLICITANTE	
☒ ²Equivalente ☐ ²No equivalente al depósito en fecha 5 de julio de 2012 Firma del Depositante 	
IV. CONDICIONES EN LAS QUE SE HA REALIZADO LA PRUEBA DE VIABILIDAD (Depositante/Depositorio) ⁴	
V. AUTORIDAD INTERNACIONAL DE DEPÓSITO	
Nombre: Agricultural Research Culture Collection (NRRL) Autoridad de Depósito Internacional Dirección: 1815 N, University Street Peoria, Illinois 61604 EE.UU.	Firma(s) de la(s) persona(s) que tienen el poder de representar a la Autoridad de Depósito Internacional o del funcionario autorizado:  Fecha: <u>4.17.12</u>

¹ Indique la fecha del depósito original o cuando se ha realizado un nuevo depósito

² Marque con una cruz la casilla correspondiente.

³ En los casos mencionados en la Regla 10.2 (a) (ii) y (iii), haga referencia a la prueba de viabilidad más reciente.

⁴ Complete si se ha pedido esta información

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL RECOGNITION OF THE DEPOSIT
OF MICROORGANISMS FOR THE PURPOSE OF PATENT PROCEDURES

INTERNATIONAL FORM

TO

Patent Dept.
AgResearch Limited
Grasslands Research Center
Tennent Dr., Private Bag 11008
Palmerston North, New Zealand

VIABILITY STATEMENT

issued pursuant to Rule 10.2 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified at the bottom of this page

NAME AND ADDRESS OF THE PARTY TO WHOM
THE VIABILITY STATEMENT IS ISSUED

I. DEPOSITOR	II. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM
Name: Dr. Wayne Simpson AgResearch Limited Grasslands Research Center Address: Tennent Dr., Private Bag 11008 Palmerston North, New Zealand	Depositor's taxonomic designation and accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY <i>Epicloa/Neotyphodium sp.</i> NRRL 50723 Date of : March 6, 2012 ☒ Original Deposit ☐ New Deposit ☐ Repropagation of Original Deposit
III. (a) VIABILITY STATEMENT	
Deposit was found: ☒ ¹ Viable ☐ ² Nonviable on <u>March 10, 2012</u> (Date) International Depositary Authority's preparation was found viable on <u>March 20, 2012</u> (Date) ³	
III. (b) DEPOSITOR'S EQUIVALENCY DECLARATION	
Depositor determined the International Depositary Authority's preparation was ☒ ² Equivalent ☐ ² Not equivalent to deposit on <u>July 5, 2012</u> (Date) Signature of Depositor: 	
IV. CONDITIONS UNDER WHICH THE VIABILITY TEST WAS PERFORMED (Depositors/Depositary)⁴	
V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY	
Name: Agricultural Research Culture Collection (NRRI) International Depositary Authority Address: 1815 N. University Street Peoria, Illinois 61604 U.S.A.	Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depositary Authority or of authorized official(s):  Date: <u>4-24-12</u>

¹ Indicate the date of the original deposit or when a new deposit has been made.

² Mark with a cross the applicable box.

³ In the cases referred to in Rule 10.2(a)(i) and (ii), refer to the most recent viability test.

⁴ Fill in if the information has been requested.

(Traducción al español en página siguiente)

TRATADO DE BUDAPEST SOBRE EL RECONOCIMIENTO INTERNACIONAL DEL DEPÓSITO DE MICROORGANISMOS A LOS FINES DE LOS PROCEDIMIENTOS DE PATENTES

FORMULARIO INTERNACIONAL

DECLARACIÓN DE VIABILIDAD

Dirigido al

Dpto. de patentes

emitido de conformidad con la Regla 10.2 por la

AgResearch Limited

AUTORIDAD INTERNACIONAL DE DEPÓSITO

Grasslands Research Center

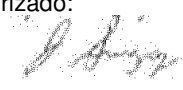
identificada al final de esta página

Tennent Dr., Private Bag 11008

Palmerston North, Nueva Zelanda

NOMBRE Y DIRECCIÓN DE LA PARTE A LA QUE

SE EXPIDE LA DECLARACIÓN DE VIABILIDAD

I. DEPOSITANTE	II. IDENTIFICACIÓN DEL MICROORGANISMO
Nombre: Dr. Wayne Simpson AgResearch Limited Grasslands Research Center Dirección: Tennent Dr., Private Bag 11008 Palmerston North, Nueva Zelanda	Designación taxonómica y número de acceso del depositante proporcionado por la AUTORIDAD DE DEPÓSITO INTERNACIONAL Epichloe / Neotyphodium sp. NRRL 50723 Fecha: 06 de marzo de 2012 ☒ Depósito original ☐ Nuevo depósito ☐ Repropagación del depósito original
III. (a) DECLARACIÓN DE VIABILIDAD	
El depósito resultó ser: ☒ ²Viable ☐ ²No viable a fecha <u>10 de marzo de 2012</u> La preparación de la Autoridad Internacional de Depósito resultó ser viable a fecha¹ <u>20 de marzo de 2012</u>	
III. (b) DECLARACIÓN DE EQUIVALENCIA DEL SOLICITANTE	
☒ ²Equivalente ☐ ²No equivalente al depósito en fecha 5 de julio de 2012 Firma del Depositante 	
IV. CONDICIONES EN LAS QUE SE HA REALIZADO LA PRUEBA DE VIABILIDAD (Depositante/Depositorio) ⁴	
V. AUTORIDAD INTERNACIONAL DE DEPÓSITO	
Nombre: Agricultural Research Culture Collection (NRRL) Autoridad de Depósito Internacional Dirección: 1815 N, University Street Peoria, Illinois 61604 EE.UU.	Firma(s) de la(s) persona(s) que tienen el poder de representar a la Autoridad de Depósito Internacional o del funcionario autorizado:  Fecha: <u>4-21-12</u>

¹ Indique la fecha del depósito original o cuando se ha realizado un nuevo depósito

² Marque con una cruz la casilla correspondiente.

³ En los casos mencionados en la Regla 10.2 (a) (ii) y (iii), haga referencia a la prueba de viabilidad más reciente.

⁴ Complete si se ha pedido esta información

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL RECOGNITION OF THE DEPOSIT
OF MICROORGANISMS FOR THE PURPOSE OF PATENT PROCEDURES

INTERNATIONAL FORM

TO

Patent Dept.
AgResearch Limited
Grasslands Research Center
Tennent Dr., Private Bag 11008
Palmerston North, New Zealand

VIABILITY STATEMENT

issued pursuant to Rule 10.2 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified at the bottom of this page

NAME AND ADDRESS OF THE PARTY TO WHOM
THE VIABILITY STATEMENT IS ISSUED

I. DEPOSITOR Name: Dr. Wayne Simpson AgResearch Limited Grasslands Research Center Address: Tennent Dr., Private Bag 11008 Palmerston North, New Zealand	II. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM Depositor's taxonomic designation and accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY <i>Epichloe/Neotyphodium sp.</i> NRRL 50724 Date of: March 6, 2012 ☒ Original Deposit ☐ New Deposit ☐ Repropagation of Original Deposit
III. (a) VIABILITY STATEMENT	
Deposit was found: ☒ Viable ☐ Nonviable on <u>March 10, 2012</u> (Date) International Depositary Authority's preparation was found viable on <u>March 20, 2012</u> (Date) ⁴	
III. (b) DEPOSITOR'S EQUIVALENCY DECLARATION	
Depositor determined the International Depositary Authority's preparation was ☒ Equivalent ☐ Not equivalent to deposit on <u>July 5, 2012</u> (Date) Signature of Depositor: 	
IV. CONDITIONS UNDER WHICH THE VIABILITY TEST WAS PERFORMED (Depositor's/Depository)⁴	
V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY	
Name: Agricultural Research Culture Collection (NRRL) International Depositary Authority Address: 1815 N. University Street Peoria, Illinois 61604 U.S.A.	Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depositary Authority or of authorized official(s):  Date: <u>11-24-12</u>

¹ Indicate the date of the original deposit or when a new deposit has been made.

² Mark with a cross the applicable box.

³ In the cases referred to in Rule 10.2(a)(ii) and (iii), refer to the most recent viability test.

⁴ Fill in if the information has been requested.

(Traducción al español en página siguiente)

TRATADO DE BUDAPEST SOBRE EL RECONOCIMIENTO INTERNACIONAL DEL DEPÓSITO DE MICROORGANISMOS A LOS FINES DE LOS PROCEDIMIENTOS DE PATENTES

FORMULARIO INTERNACIONAL

DECLARACIÓN DE VIABILIDAD

Dirigido al

Dpto. de patentes

emitido de conformidad con la Regla 10.2 por la

AgResearch Limited

AUTORIDAD INTERNACIONAL DE DEPÓSITO

Grasslands Research Center

identificada al final de esta página

Tennent Dr., Private Bag 11008

Palmerston North, Nueva Zelanda

NOMBRE Y DIRECCIÓN DE LA PARTE A LA QUE

SE EXPIDE LA DECLARACIÓN DE VIABILIDAD

I. DEPOSITANTE	II. IDENTIFICACIÓN DEL MICROORGANISMO
Nombre: Dr. Wayne Simpson AgResearch Limited Grasslands Research Center Dirección: Tennent Dr., Private Bag 11008 Palmerston North, Nueva Zelanda	Designación taxonómica y número de acceso del depositante proporcionado por la AUTORIDAD DE DEPÓSITO INTERNACIONAL Epichloe / Neotyphodium sp. NRRL 50724 Fecha: 06 de marzo de 2012 ☒ Depósito original ☐ Nuevo depósito ☐ Repropagación del depósito original
III. (a) DECLARACIÓN DE VIABILIDAD	
El depósito resultó ser: ☒ ²Viable ☐ ²No viable a fecha <u>10 de marzo de 2012</u> La preparación de la Autoridad Internacional de Depósito resultó ser viable a fecha¹ <u>20 de marzo de 2012</u>	
III. (b) DECLARACIÓN DE EQUIVALENCIA DEL SOLICITANTE	
☒ ²Equivalente ☐ ²No equivalente al depósito en fecha <u>5 de julio de 2012</u> Firma del Depositante 	
IV. CONDICIONES EN LAS QUE SE HA REALIZADO LA PRUEBA DE VIABILIDAD (Depositante/Depositorio) ⁴	
V. AUTORIDAD INTERNACIONAL DE DEPÓSITO	
Nombre: Agricultural Research Culture Collection (NRRL) Autoridad de Depósito Internacional Dirección: 1815 N, University Street Peoria, Illinois 61604 EE.UU.	Firma(s) de la(s) persona(s) que tienen el poder de representar a la Autoridad de Depósito Internacional o del funcionario autorizado:  Fecha: <u>04-24-12</u>

¹ Indique la fecha del depósito original o cuando se ha realizado un nuevo depósito

² Marque con una cruz la casilla correspondiente.

³ En los casos mencionados en la Regla 10.2 (a) (ii) y (iii), haga referencia a la prueba de viabilidad más reciente.

⁴ Complete si se ha pedido esta información

Listado de secuencias

<110> GRASSLANZ TECHNOLOGY LIMITED
 <120> COMBINACIONES DE ENDOFITOS DE CEREALES
 <130> 640964 JBA

5 <160> 30
 <170> PatentIn versión 3.5

 <210> 1
 <211> 18
 <212> ADN
 10 <213> Cebador artificial

 <400> 1
 tgtaaaacga cggccagt 18

 <210> 2
 <211> 7
 15 <212> ADN
 <213> Cebador artificial

 <400> 2
 gtttctt 7

 <210> 3
 <211> 24
 <212> ADN
 20 <213> Cebador artificial

 <400> 3
 cgctcagggc tacatacacc atgg 24

 <210> 4
 <211> 23
 <212> ADN
 25 <213> Cebador artificial

 <400> 4
 30 ctcatcgagt aacgcaggcg acg 23

 <210> 5
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Cebador artificial

 <400> 5
 35 tacctctgca cgggtgattc c 21

 <210> 6
 <211> 24
 <212> ADN
 40 <213> Cebador artificial

 <400> 6
 tgcataacac tcacctata gtcg 24

 <210> 7
 <211> 22
 45 <212> ADN
 <213> Cebador artificial

 <400> 7
 gcgttgagga ggctagatag aa 22

 <210> 8
 50 <211> 22

<212> ADN
 <213> Cebador artificial

 <400> 8
 ttccaagctg aacaaaagtc aa 22

 5 <210> 9
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Cebador artificial

 <400> 9
 10 gatgacgtat cttgatgcta ccac 24

 <210> 10
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Cebador artificial

 <400> 10
 15 cgtgtataaa gttcgggatc ctat 24

 <210> 11
 <211> 24
 <212> ADN
 20 <213> Cebador artificial

 <400> 11
 gagatatccc gtctcctgat ctaa 24

 <210> 12
 <211> 24
 <212> ADN
 25 <213> Cebador artificial

 <400> 12
 cacagcgta cactatcaac ttcc 24

 <210> 13
 <211> 24
 <212> ADN
 30 <213> Cebador artificial

 <400> 13
 cacagcgta cactatcaac ttcc 24

 <210> 14
 <211> 24
 <212> ADN
 35 <213> Cebador artificial

 <400> 14
 40 agacaggtaa gaagtttcc cctt 24

 <210> 15
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Cebador artificial

 <400> 15
 45 agctttcaa tgacgacata cata 24

 <210> 16
 <211> 24
 <212> ADN
 50 <213> Cebador artificial

 <400> 16
 taatttaggg tagcatttc tccg 24

<210> 17
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Cebador artificial
 5 <400> 17
 ggtccctatt ctaatgcagg tatg 24
 <210> 18
 <211> 24
 <212> ADN
 10 <213> Cebador artificial
 <400> 18
 cagtgtacgg gacttgtca atac 24
 <210> 19
 <211> 24
 <212> ADN
 15 <213> Cebador artificial
 <400> 19
 tgtataataa acatggcgtg ctct 24
 <210> 20
 <211> 24
 <212> ADN
 20 <213> Cebador artificial
 <400> 20
 gtgttgaaag ttgttgatc actc 24
 <210> 21
 <211> 24
 <212> ADN
 25 <213> Cebador artificial
 <400> 21
 30 cgaaattgta gactatgttg gagc 24
 <210> 22
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Cebador artificial
 35 <400> 22
 gtagatgtat ttgagcagg gctt 24
 <210> 23
 <211> 24
 <212> ADN
 40 <213> Cebador artificial
 <400> 23
 gagttagacc cgggttagta agtc 24
 <210> 24
 <211> 24
 <212> ADN
 45 <213> Cebador artificial
 <400> 24
 gagtcattct tcgtccattg tctt 24
 <210> 25
 <211> 24
 <212> ADN
 50 <213> Cebador artificial

<400> 25
 gaaatgaggc gtctatctta aagc 24

 <210> 26
 <211> 24
 5 <212> ADN
 <213> Cebador artificial

 <400> 26
 tttcttgatt tccaaagaac aaca 24

 <210> 27
 10 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Cebador artificial

 <400> 27
 ctgctagaca tacttggaac atgg 24

 <210> 28
 15 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Cebador artificial

 <400> 28
 20 cagtcgaata atttagggag catt 24

 <210> 29
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Cebador artificial

 <400> 29
 25 tcggcctcac gacgcacaac 20

 <210> 30
 <211> 24
 <212> ADN
 30 <213> Cebador artificial

 <400> 30
 cccatacatt acacctttct ggcg 24

REIVINDICACIONES

1. Una cepa aislada de endófito fúngico epichloae seleccionada a partir del grupo que consiste en AR3039 (NRRL n° 50716), AR3046 (NRRL n° 50576), AR3049 (NRRL n° 50577), AR3050 (NRRL n° 50578), AR3064 (NRRL n° 50718), AR3067 (NRRL n° 50719), AR3068 (NRRL n° 50720), AR3073 (NRRL n° 50721), AR3074 (NRRL n° 50722), AR3076 (NRRL n° 50723) y AR3078 (NRRL n° 50724) y combinaciones de las mismas.
2. Una planta de *Secale* spp. infectada con un endófito fúngico según se define en la reivindicación 1.
3. Una planta de *Secale* spp. según la reivindicación 2, en donde *Secale* spp. no es un hospedador natural del endófito, y en donde la planta y el endófito forman una asociación simbiótica estable que permite que la planta se desarrolle durante un ciclo de vida normal, y en donde el endófito fúngico es un endófito epichloae.
4. Una planta de *Secale* spp. según la reivindicación 2 o la reivindicación 3, en donde el endófito se transmite desde una primera generación de una planta de *Secale* spp. a una segunda generación de una planta de *Secale* spp. mediante transmisión vertical, preferiblemente en donde la transmisión vertical desde la primera generación de una planta de *Secale* spp. a la segunda generación de una planta de *Secale* spp. es por semillas.
5. Una planta de *Secale* spp. según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, en donde el endófito es un endófito aislado a partir de *Elymus* spp., preferiblemente a partir de *Elymus mutabilis*.
6. Una planta de *Secale* spp. según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5, en donde la planta de *Secale* spp. infectada con el endófito fúngico muestra un fenotipo morfológico normal.
7. Una planta de *Secale* spp. según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6, en donde la planta de *Secale* spp. infectada con el endófito fúngico produce alcaloides de lolina y/o peramina.
8. Una planta de *Secale* spp. según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 7, en donde la planta de *Secale* spp. infectada con el endófito fúngico tiene una resistencia incrementada frente a una o varias plagas o una resistencia incrementada frente al menos una enfermedad vegetal o a ambas, en comparación con una planta de *Secale* spp. que no está infectada con un endófito fúngico, preferiblemente en donde las plagas se seleccionan a partir del grupo que consiste en: (1) especies de pulgones (Aphididae) preferiblemente *Rhopalosiphum padi*, *Schizaphis graminum*, *Rhopalosiphum maidis*, *Metopolophium dirhodum*, *Sitobion* spp., *Sitobion avenae*, *Sitobion fragariae*, *Diuraphis noxis*; (2) especies de moscas de pastos y de cereales (Agromyzidae; Anthomyiidae, Chloropidae, Cephidae y Cecidomyiidae) preferiblemente *Oscinella frit*, *Oscinella pusilla*, *Mayetiola destructor*, *Cerodontha* spp., *Cerodontha australis*, *Cerodontha angustipennis*, *Formia fumigata*, *Meromyza americana*, *Haplodiplosis marginata*, *Chlorops pumilionis*, *Tipula* spp. *Chromatomyia fuscata*, *Cephus pygmaeus*, *Chromatomyia fuscata*, *Contarinia tritici*; (3) especies de arañuelas (Thripidae) preferiblemente *Limothrips cerealium*, *Limothrips denticornis*, *Aptinothrips rufus*, *Stenothrips graminum*; (4) especies de saltamontes y grillos (Acrididae y Gryllidae) preferiblemente *Locusta migratoria*, *Phaulacridium marginale*, *Phaulacridium vittatum*, *Melanoplus* spp., *Teleogryllus commodus*; (5) especies de chinches (Lygaeidae) preferiblemente *Nyssius huttoni*, *Blissus leucopertus leucopertus*; (6) especies de gorgojos (Curculionidae) preferiblemente *Sphenophorus* spp.; (7) especies de gusano cogollero y gusano cortador (Noctuidae) preferiblemente *Pseudaletia unipuncta*, *Spodoptera* spp., *Mythimna separata*; *Persectania aversa*, *Agrostis ipsilon*; (8) especies de escarabajos de las hojas (Chrysomelidae) preferiblemente *Oulema melanopus*; (9) especies de larvas blancas (Scarabaeidae) preferiblemente *Popillia japonica*, *Costelytra zealandica*, *Phyllopertha* spp., *Rhizotrogus majalis*, *Anisoplia segetum*; (10) especies de cochinillas (Pseudococcidae y Coccidae) preferiblemente *Phenacoccus hordei*, *Balanococcus poae*, *Ripersella rumicis*, *Porphyrphora tritici*; (11) especies de gusanos alambre (Elateridae) preferiblemente *Conoderus* spp., *Limoniuss* spp.; especies de escarabajos (Carabidae) preferiblemente *Zabrus tenebrioides*; (13) especies de ácaros (Eriophyidae y Penthaleidae) preferiblemente *Penthaleus* spp., *Halotydeus destructor*, *Aceria* spp.; (14) especies de plagas de alimentos almacenados (Curculionidae, Silvanidae, Pyralidae, Gelechiidae, Tenebrionidae, Bostrichidae) preferiblemente *Sitophilus oryzae*, *Sitophilus granarius*, *Sitotroga cerealella*, *Rhyzopertha dominica*, *Cryptolestes* spp., *Oryzaephilus surinamensis*, *Cadra cautella*, *Plodia interpunctella*, *Tribolium confusum*, *Tribolium castaneum*, *Lasioderma erricorne*; (15) especies de cigarras (Cercopoidea) preferiblemente *Philaenus spumarius* (16) especies de nematodos, preferiblemente nematodo lesionado de raíces (*Pratylenchus* spp., particularmente *P. thornei*, *P. crenatus*, *P. neglectus* y *P. penetrans*), nematodo del quiste de cereales (*Heterodera* spp. y *Punctodera* spp., particularmente *H. avenae*, *H. latipons*, *H. hordecalis*, *H. filipjevi*, *H. mani*, *H. bifenestra*, *H. pakistanensis* y *P. punctata*), nematodo agallador (*Meloidogyne* spp., particularmente *M. chitwoodi*, *M. naasi*, *M. artiellia*, *M. microtyla*, *M. ottersoni*, *M. graminicola*, *M. graminis*, *M. kikuyensis* y *M. spartinae*), nematodo del tallo (*Ditylenchus* spp., particularmente *D. dipsicai* y *D. radicola*); nematodo de agallas de la semilla (*Anguina tritici*); (17) especies de babosas (*Deroceras reticulatum* y *Arion* spp. particularmente *A. hortensis* agg. y *A. subfuscus*), preferiblemente las plagas son nematodos, preferentemente nematodos lesionadores de raíces (*Pratylenchus* spp.) o moscas minadoras de hojas, *Cerodontha australis* (Diptera: Agromyzidae), también conocidas como minadoras de la vaina del trigo, y preferentemente en donde la enfermedad vegetal está causada por un agente patógeno vegetal seleccionado a partir del grupo que consiste en el virus del enanismo amarillo de la cebada (Luteovirus), el virus del mosaico del trigo transmitido por el suelo (Furovirus) y el virus del mosaico estriado del trigo (Tritimovirus), *Xanthomonas campestris*, *Pseudomonas syringae*, *Colletotrichum graminicola*, *Glomerella graminicola* [teleomorfo], *Alternaria* spp., *Cladosporium herbarum*,

- 5 *Mycosphaerella tassiana* [teleomorfo], *Epicoccum* spp., *Sporobolomyces* spp., *Stemphylium* spp., *Bipolaris sorokiniana*, *Cochliobolus sativus* [teleomorfo], *Fusarium* spp., *Tilletia caries*, *Tilletia tritici*, *Tilletia laevis*, *Tilletia foetida*, *Hymenula cerealis*, *Cephalosporium gramineum*, *Helminthosporium sativum*, *Cochliobolus sativus* [teleomorfo], *Coprinus sychromorbidus*, *Dilophospora alopecuri*, *Tilletia controversa*, *Claviceps purpurea*, *Sphacelia segetum* [anamorfo], *Fusarium culmorum*, *Pseudoseptoria donacis*, *Selenophoma donacis*, *Neovossia indica*, *Tilletia indica*, *Puccinia recondita*, *Aecidium clematidis* [anamorfo], *Cercosporidium graminis*, *Scolicotrichum graminis*, *Phaeosphaeria herpotrichoides*, *Leptosphaeria herpotrichoides*, *Ustilago tritici*, *Microdochium nivale*, *Fusarium nivale*, *Monographella nivalis* [teleomorfo], *Erysiphe graminis*, *Pythium aphanidermatum*, *Pythium arrhenomanes*, *Pythium debaryanum*, *Pythium graminicola*, *Pythium ultimum*, *Gibberella zeae*, *Fusarium graminearum* [anamorfo], *Septoria secalis*, *Septoria tritici*, *Mycosphaerella graminicola* [teleomorfo], *Rhizoctonia cerealis*, *Rhizoctonia solani*, *Rhizoctonia zeae*, *Blumeria* spp., *Ceratobasidium cereale* [teleomorfo], *Myriosclerotinia borealis*, *Sclerotinia borealis*, *Typhula idahoensis*, *Typhula incarnate*, *Typhula ishkariensis*, *Typhula ishkariensis* var. *canadensis*, *Stagonospora nodorum*, *Septoria nodorum*, *Phaeosphaeria nodorum* [teleomorfo], *Leptosphaeria nodorum*, *Urocystis occulta*, *Puccinia graminis*, *Aspergillus* spp., *Nigrospora* spp., *Penicillium* spp., *Rhizopus* spp., *Pseudocercospora herpotrichoides*, *Tapesia acuformis* [teleomorfo], *Uredo glumarum* [anamorfo], *Pyrenophora tritici-repentis*, *Drechslera tritici-repentis* [anamorfo], *Helminthosporium tritici-repentis*, *Puccinia triticina*, *Pythium* spp., *Rhynchosporium secalis*, *Puccinia striiformis*, *Gaeumannomyces graminis* y *Fusarium pseudograminearum*, preferiblemente en donde el agente patógeno vegetal es *Puccinia recondita*, *Puccinia triticina*, *Puccinia graminis*, *Fusarium* spp., *Pythium* spp., *Rhynchosporium secalis*, *Puccinia striiformis*, *Gaeumannomyces graminis*, *Rhizoctonia solani* o *Fusarium pseudograminearum*.
9. Una planta de *Secale* spp. según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 8, en donde el *Secale* spp. se selecciona a partir del grupo que consiste en *Secale cereale*, *Secale montanum*, *Secale strictum*, *Secale sylvestre* y *Secale vavilovii*, preferiblemente *Secale cereale*.
- 25 10. Un método para preparar una combinación estable de planta hospedadora/endófito fúngico epichloae que comprende infectar artificialmente una planta de *Secale* spp. con al menos un endófito fúngico según se define en la reivindicación 1, que forma una combinación simbiótica estable con la planta inoculada, en donde la planta hospedadora no muestra síntomas externos de infección endófito.
- 30 11. Un método para conferir al menos algún nivel de protección contra plagas a una planta de *Secale* spp. hospedadora que comprende infectar artificialmente una planta de *Secale* spp. para formar una combinación simbiótica estable con al menos un endófito fúngico epichloae según se define en la reivindicación 1, en donde la combinación de endófito fúngico/planta de *Secale* produce al menos un alcaloide a un nivel suficiente para conferir al menos algún nivel de protección contra las plagas a la planta hospedadora.
12. Una semilla de *Secale* spp. infectada con un endófito fúngico epichloae según se define en la reivindicación 1.
- 35 13. Una semilla de *Secale* spp. según la reivindicación 12, en donde la semilla es una semilla de un *Secale* spp. seleccionado a partir del grupo que consiste en *Secale cereale*, *Secale montanum*, *Secale strictum*, *Secale sylvestre* y *Secale vavilovii*, preferiblemente una semilla de *Secale cereale*.
14. Una semilla de *Secale* spp. según la reivindicación 12 o la reivindicación 13, en donde el al menos un endófito fúngico es un endófito aislado a partir de *Elymus* spp, preferiblemente a partir de *Elymus mutabilis*.
- 40 15. Una cepa aislada de endófito fúngico epichloae seleccionada a partir del grupo que consiste en AR3039, AR3046, AR3050, AR3067, AR3068, AR3074 y AR3078, preferiblemente en donde el endófito es AR3046, AR3050 o AR3068.

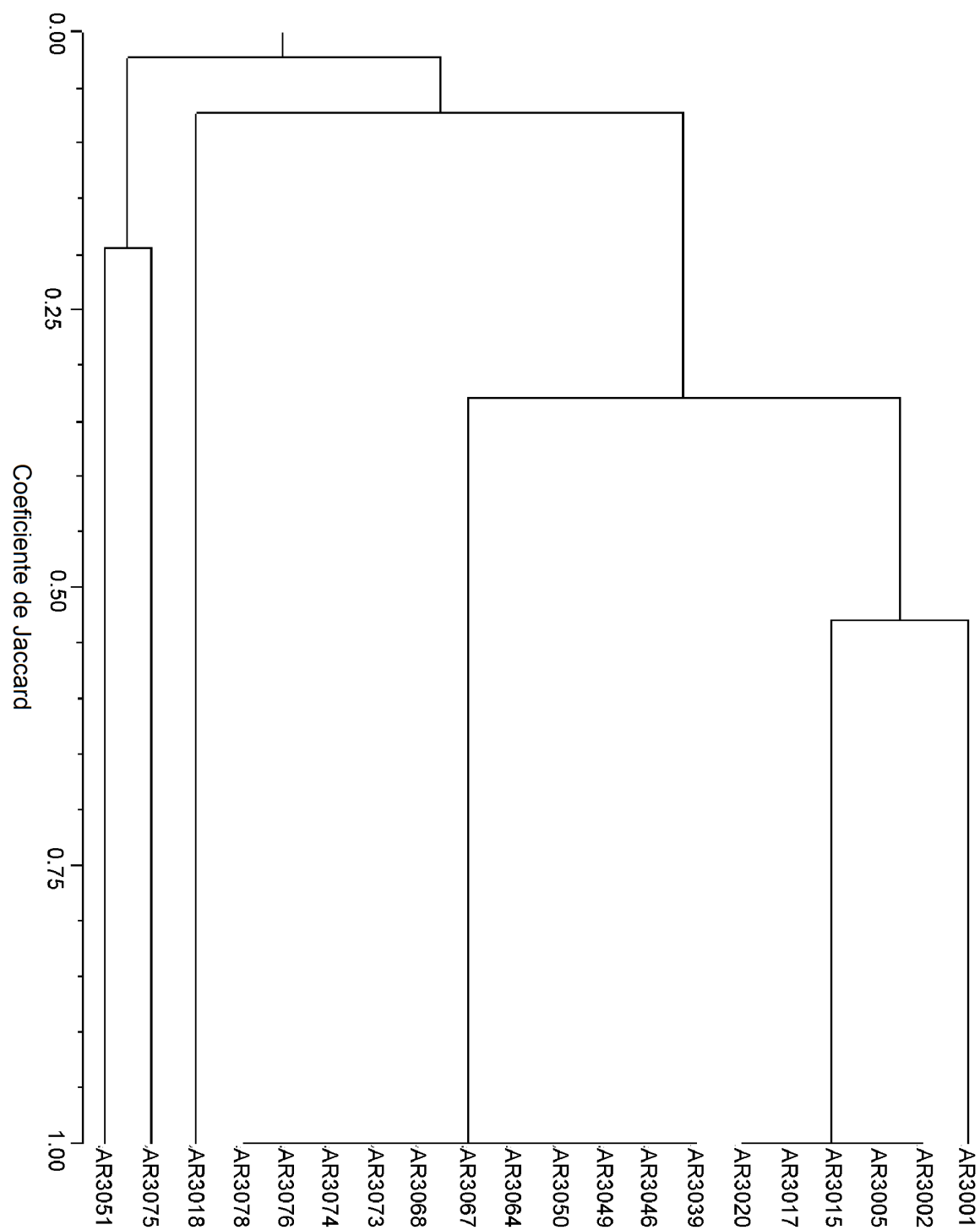


FIGURA 1



FIGURA 2

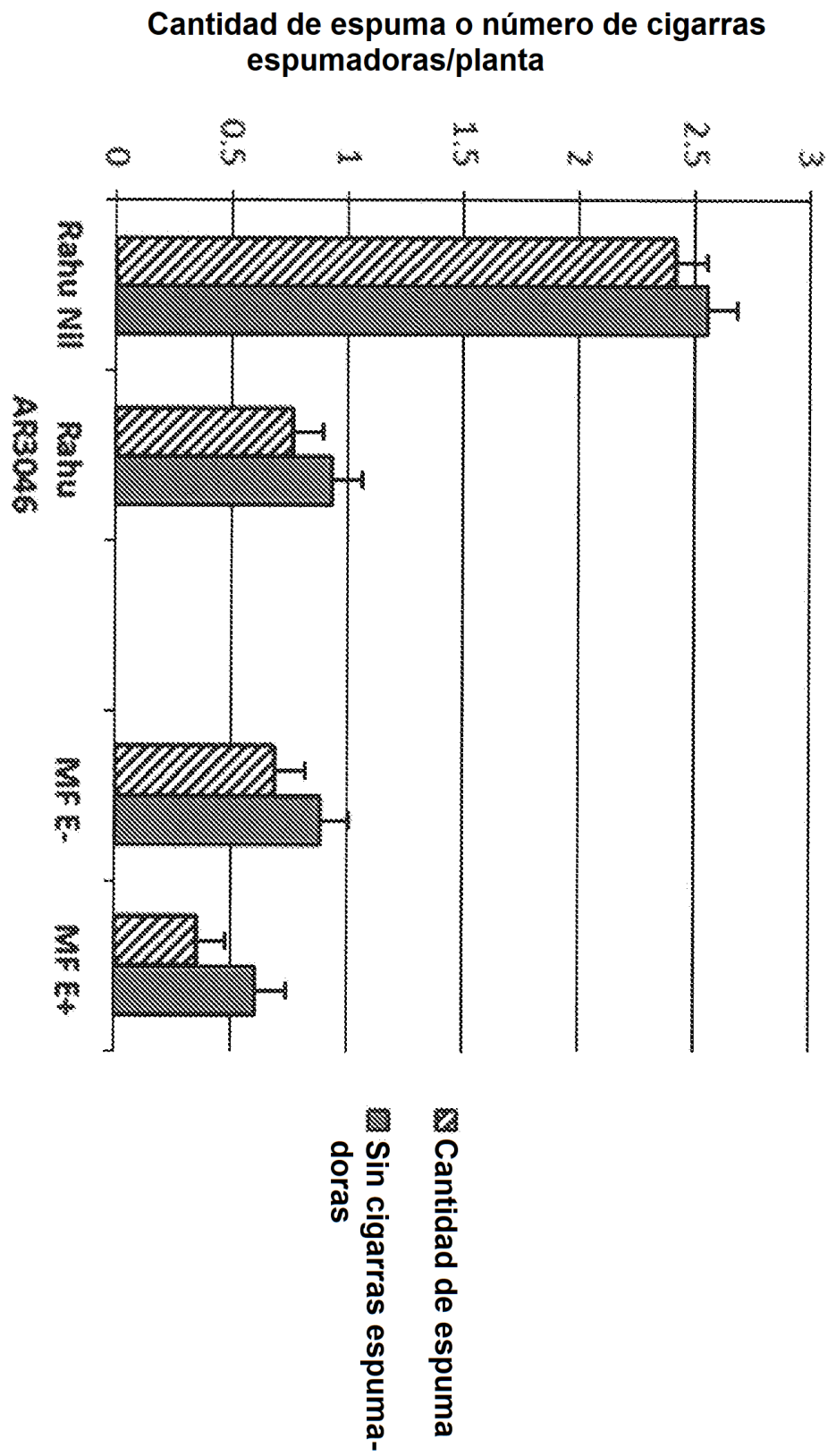


FIGURA 3

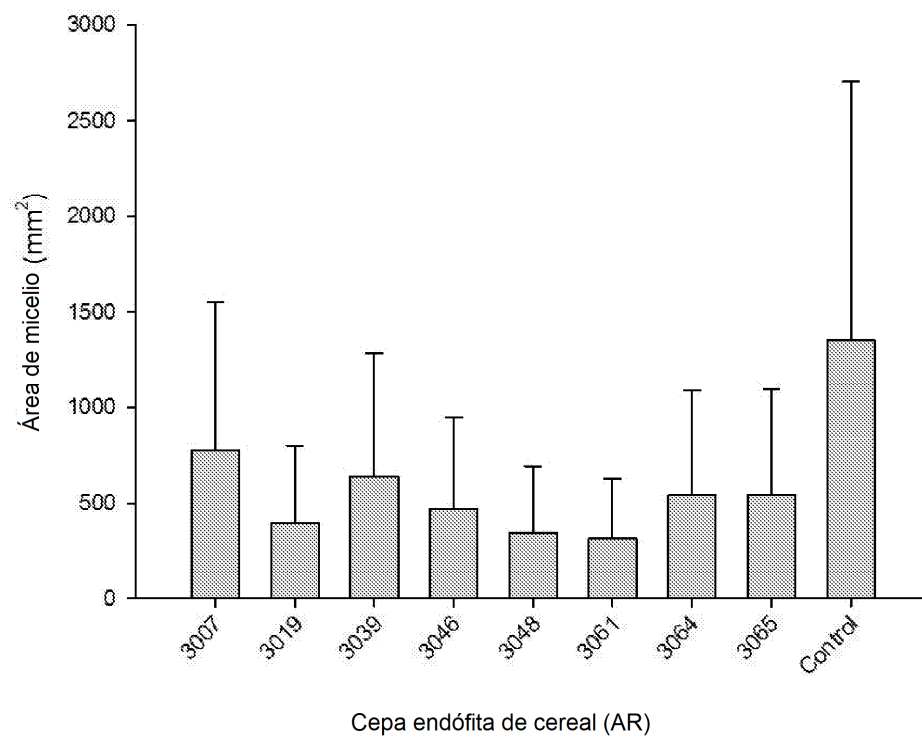


FIGURA 4

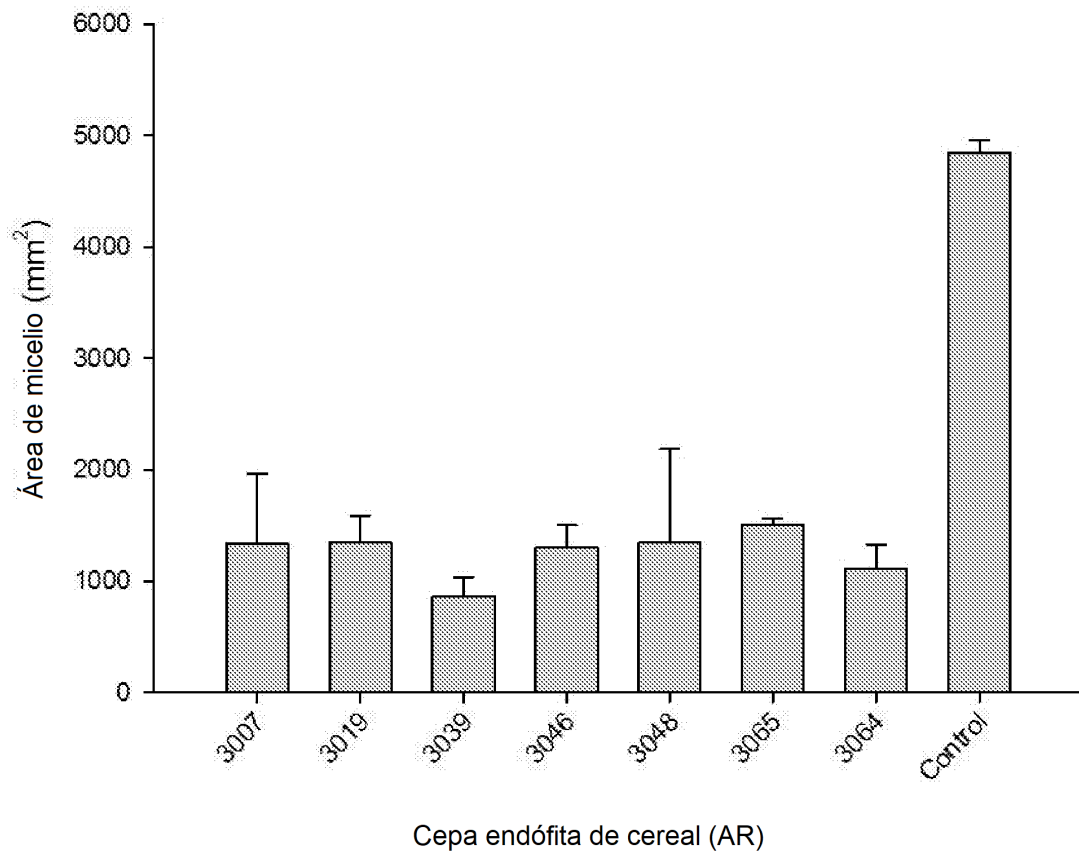


FIGURA 5