

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 467 996**

51 Int. Cl.:

A01H 5/00 (2006.01)

A01H 5/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.06.2004 E 04748811 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.03.2014 EP 1667513**

54 Título: **Método para proteger pastos usando un endofito**

30 Prioridad:

03.06.2003 AU 2003902794

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

13.06.2014

73 Titular/es:

**GRASSLANZ TECHNOLOGY LIMITED (100.0%)
PRIVATE BAG 11008, TENNANT DRIVE
PALMERSTON NORTH, NZ**

72 Inventor/es:

**TAPPER, BRIAN, ANTHONY;
COOPER, BRUCE, MATHESON;
EASTON, HERRICK, SYDNEY;
FLETCHER, LESTER, RONALD;
HUME, DAVID, EDWARD;
LANE, GEOFFREY, ALEXANDER;
LATCH, GARRICK, CECIL, MORLAND;
PENNELL, CHRISTOPHER, GERALD, LEE;
POPAY, ALISON, JEAN y
CHRISTENSEN, MICHAEL, JOHN**

74 Agente/Representante:

PÉREZ BARQUÍN, Eliana

ES 2 467 996 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

Método para proteger pastos usando un endofito

5 **Campo técnico**

Esta invención se refiere a endofitos fúngicos y combinaciones de endofitos con plantas herbáceas. Más particularmente la invención se refiere a endofitos que forman combinaciones con raigrases perenne, anual e híbrido y algunos otros pastos relacionados. Aún más particularmente, la invención se refiere a combinaciones que tienen toxicidad reducida para el ganado de pastoreo en comparación con variedades cultivadas de combinaciones de endofito/raigrás de uso común, mientras siguen conservando resistencia contra plagas y/o estreses abióticos.

Técnica antecedente

15 Los endofitos fúngicos del género *Neotyphodium* (anteriormente *Acremonium*) infectan una serie de pastos de la subfamilia Pooideae de clima templado. Los endofitos de *Neotyphodium* pueden producir alcaloides que se considera que otorgan grados de protección contra plagas y posiblemente enfermedades a las plantas en las que aparecen de forma natural (Rowan y Latch, 1994; Blank y Gwinn, 1992). También se ha reivindicado resistencia a condiciones de sequía (Elberson y West, 1996). Los endofitos de *Neotyphodium* son transmitidos verticalmente a través de la semilla de los pastos y no se ha establecido ninguna transmisión horizontal natural (Leuchtmann, 1997).

Muchas de las infecciones por endofitos naturales predominantes de variedades cultivadas de pastos mejoradas usadas para la producción de agricultura de pastoreo también causan trastornos animales significativos, por ejemplo toxicosis por festuca (Stuedemann y Hoveland, 1988) y toxicosis por endofitos del raigrás (Fletcher y col., 1999). Estas pueden ser complejas reacciones tóxicas por parte de animales a alcaloides producidos en una serie de condiciones de crecimiento de la planta. Pueden producirse pérdidas económicas significativas en sistemas de agricultura de pastoreo debido a dichas toxicosis animales. Por otro lado, la presencia de al menos algunos endofitos puede ser esencial para la persistencia competitiva del pasto seleccionado en un pastizal (Elberson y West, 1996, Fletcher y Easton, 2000).

Se ha descubierto también que las líneas de pasto pueden infectarse artificialmente con endofitos seleccionados. Pueden usarse cultivos anéxicos de endofitos para infectar plantones de pasto, cultivadas inicialmente en condiciones estériles (Latch y Christensen, 1985), que pueden seleccionarse a continuación para cualidades deseables, y multiplicarse para uso comercial. Tres ejemplos significativos de esta tecnología han sido desarrollados por AgResearch Ltd: GREENSTONE™ raigrás híbrido tetraploide con endofito ENDOSAFE™ (Tapper y Latch, 1999, Patente NZ 233083); diversos raigrases perennes e híbridos con el endofito AR1 (Fletcher, 1999); y variedades cultivadas de festuca alta con MaxQ™ (Bouton y col., 2002, Patente de Estados Unidos 6.111.170).

Toxicosis por endofitos del raigrás

40 El raigrás perenne infectado con este endofito de tipo silvestre habitual, cultivado tanto para forraje como para césped, frecuentemente produce compuestos del subgrupo de lolitrem de indol diterpeno en concentraciones en hierba suficientes para causar el grave trastorno animal conocido como tembleque del raigrás. El lolitrem B se considera la sustancia activa más abundante y concentraciones que superen aproximadamente 2 ppm de materia seca de hierba pueden dar como resultado síntomas clínicos de tembleque del raigrás en ovejas, vacas, venados y caballos de pastoreo.

Las mismas asociaciones de raigrás-endofito también producen ergovalina y quizás otros alcaloides del cornezuelo del centeno que se cree que causan otros síntomas en ovejas, vacas, venados y caballos de pastoreo asociados habitualmente con el síndrome de toxicosis por endofitos del raigrás. Estos síntomas pueden incluir hipertermia en condiciones húmedas y cálidas tal como se demuestra mediante incremento de las temperaturas rectales y las frecuencias de respiración y reducción de los niveles basales de prolactina.

Es probable que estas respuestas se desencadenen a concentraciones de ergovalina en pastizales de raigrás por encima de 0,5 ppm. También se cree que la ergovalina es responsable de las tasas de crecimiento reducidas asociadas con el síndrome de toxicosis. La humedad fecal y encopresis fecal incrementadas en ovejas también están asociadas con toxicosis por endofitos del raigrás pero las causas no han sido atribuidas a toxina particular alguna.

60 Los síntomas de tembleque del raigrás y los efectos globales de lolitrems pueden potenciarse mediante la presencia en la hierba de otras toxinas tales como ergovalina.

Las concentraciones tanto de lolitrem B como de ergovalina tienden a ser mayores en la vaina de la hoja e inflorescencias de raigrás perenne que en las raíces o la lámina de la hoja. También experimentan variación estacional con máximos de verano a otoño.

Protección de plantas mejorada con toxicosis reducida

Los endofitos otorgan grados de protección a plantas huésped contra estrés biótico y abiótico. Se sabe que algunos alcaloides obtenidos de endofitos son tóxicos o disuasorios para plagas de insectos. La peramina es un disuasorio de alimentación para y lolitrem es tóxico para el gorgojo argentino del tallo, (*Listronotus bonariensis*) (Rowan y col., 1990; Prestidge y Gallagher 1985). La ergovalina es disuasoria para el escarabajo negro (*Heteronychus arator*) (Ball y col., 1997). Donde estos alcaloides están ausentes o a muy baja concentración en plantas, la infestación por dichas plagas se convierte en un problema. Por lo tanto, puede verse a partir de la anterior descripción que es deseable tener un raigrás que tenga baja toxicidad para mamíferos pero que también contenga compuestos disuasorios y/o insecticidas para evitar problemas con insectos u otras plagas.

Es un objeto de la presente invención proporcionar un endofito que produce compuestos alcaloides en hierba de una planta huésped de tal manera que las combinaciones y concentraciones habituales de alcaloides en hierba tal como son generalmente consumidas por animales de pastoreo en la práctica ganadera habitual no causan prácticamente síntomas de toxicosis. Es un objeto adicional de la presente invención proporcionar un endofito que produce compuestos alcaloides en hierba de una planta huésped que protege al pasto de plagas de pastizal y/o césped con respecto a un pasto sin endofito equivalente.

Es un objeto adicional de la invención proporcionar un endofito que no produce niveles detectables de toxinas del grupo de lolitrem o el grupo de ergovalina.

Es un objeto adicional de la invención proporcionar un endofito del género *Neotyphodium* que, en combinación con un pasto huésped, proporciona una protección contra plagas superior para usos en forraje y/o césped en comparación con pasto sin endofito equivalente o pasto infectado con *Neotyphodium lolii* de tipo silvestre común.

Es un objeto adicional de la invención proporcionar un endofito que produce compuestos de la clase de epóxidos de janthitrem.

Es un objeto adicional más de la presente invención abordar los problemas anteriores o al menos proporcionar al público una elección útil.

Se ha reconocido que al término "comprenden" se le puede, en diversas jurisdicciones, atribuir un significado exclusivo o inclusivo. Para los fines de esta memoria descriptiva, y a menos que se indique lo contrario, el término "comprenden" tendrá un significado inclusivo - es decir que se asumirá que significa una inclusión de no solamente los componentes enumerados a los que hace referencia directa, sino también otros componentes o elementos no especificados. Esta lógica también se usará cuando se use el término "constituido" o "que comprende" en relación con una o más etapas en un método o procedimiento.

Aspectos y ventajas adicionales de la presente invención se volverán evidentes a partir de la siguiente descripción que se da a modo de ejemplo solamente.

Exposición de la invención

Según un aspecto de la presente invención, se proporciona un método de protección de un pasto huésped de estreses bióticos y abióticos inoculando artificialmente al pasto huésped con una cepa de endofito de la especie *Neotyphodium lolii*, caracterizado porque la cepa de endofito de *N. lolii* se selecciona entre: cultivos de AR37 y AR40 depositados el 23 de mayo de 2003 en los laboratorios *Australian Government Analytical Laboratories* (AGAL) número de registro NM03/35819 (AR37) y NM03/35820 (AR40) y combinaciones de los mismos, y produce al menos un compuesto de epóxido de janthitrem a un nivel suficiente para otorgar dicha protección al pasto huésped.

Cuando la especie *N. lolii* está en combinación con un pasto huésped, dicho endofito no producirá niveles suficientes de un compuesto o compuestos para afectar de forma adversa a la salud y el rendimiento en animales de pastoreo.

También se proporciona el uso de una cepa de endofito de la especie *N. lolii* seleccionado entre: cultivos de AR37 y AR40 depositados el 23 de mayo de 2003 en los laboratorios *Australian Government Analytical Laboratories* (AGAL) número de registro NM03/35819 (AR37) y NM03/35820 (AR40), y combinaciones de los mismos, en el que la cepa produce compuestos de epóxido de janthitrem, para otorgar protección abiótica y biótica incrementada a un pasto huésped, cuando se inocula artificialmente en el pasto huésped.

En la presente invención, los endofitos descritos anteriormente preferentemente no producen los, hasta la fecha, conocidos alcaloides tóxicos lolitrem B y ergovalina a niveles que superan 2 ppm de lolitrem B y 0,5 ppm de ergovalina. Preferentemente, los niveles de lolitrem B y ergovalina están por debajo de niveles de detección de menos de 0,1 ppm de materia seca.

Los endofitos descritos anteriormente producen, sin embargo, suficientes niveles de otras sustancias para proteger el pasto huésped de plagas o estreses abióticos (tales como déficit de agua) o ambos. En particular, el raigrás

infectado por endofito produce un grupo de derivados de indol diterpeno de la clase de compuestos de epóxido de janthitrem no observados anteriormente e identificados en pastos infectados por endofito. Es el conocimiento del solicitante que estos compuestos otorgan protección frente a depredación por plagas a las plantas del pasto huésped y el pastizal o césped dominante en el pasto en su conjunto sin causar toxicosis de importancia práctica.

5 Preferentemente, el pasto huésped es un raigrás perenne, anual o híbrido. De la forma más preferente, estos se seleccionan entre las especies: *Lolium perenne*; *Lolium multiflorum*; *Lolium x hybridum*.

10 Preferentemente, la toxicosis que se evita es toxicosis por endofitos del raigrás. De la forma más preferente, la toxicosis es causada por una toxina ergovalina o una toxina lolitrem o una combinación de toxinas ergovalina y lolitrem.

Preferentemente, el estrés abiótico es un déficit de agua.

15 Preferentemente, la cepa de endofito está en forma de un cultivo de endofito. Preferentemente, el cultivo de endofito es un cultivo axénico.

20 Preferentemente, el cultivo de endofito, si se usa, tiene las mismas características con respecto a clasificación taxonómica, infectividad de plantas, producción de alcaloides, rendimiento animal y propiedades de protección de plantas que el propio endofito.

El endofito tal como se ha descrito anteriormente puede combinarse con un pasto huésped.

25 El cultivo de endofito también puede combinarse con un pasto huésped.

Según otro aspecto de la presente invención, el método es tal como se ha descrito anteriormente y la infección se consigue modificando el pasto huésped usando técnicas seleccionadas entre obtención, cruzamiento, hibridación, selección o modificación genética y combinaciones de las mismas.

30 Las combinaciones del endofito y el pasto huésped producidas mediante métodos de la presente invención pueden dar como resultado que el pasto tenga un crecimiento radicular mejorado y más brotes en comparación con un pasto huésped sin infección por endofito.

35 En métodos de la presente invención, el pasto huésped puede ser un pasto de la subfamilia Pooideae. En dichos métodos, la combinación del endofito o cultivo de endofito tal como se ha descrito anteriormente, y un pasto de la subfamilia Pooideae puede producir compuestos de la clase de epóxidos de janthitrem en el pasto y no más de 0,1 ppm de ergovalina en la materia seca de toda la hierba. En dichos métodos, la combinación de un endofito tal como se ha descrito anteriormente y un pasto de la subfamilia Pooideae puede tener características seleccionadas entre el grupo constituido por: mejora de la protección contra plagas; resistencia a insectos; persistencia del pastizal; y combinaciones de las mismas.

45 En métodos de la presente invención, el pasto huésped puede ser un pasto de la subfamilia Pooideae y la combinación de un endofito tal como se ha descrito anteriormente y un pasto de la subfamilia Pooideae puede tener las características de mejora del crecimiento de animales de pastoreo, y productividad animal incrementada en comparación con un pasto infectado con endofitos conocidos capaces de inducir el trastorno conocido como toxicosis por endofitos del raigrás.

50 Según otro aspecto de la presente invención, se proporciona un método tal como se ha descrito anteriormente en el que el pasto huésped inoculado artificialmente tiene resistencia incrementada a una plaga seleccionada entre el grupo constituido por: pulgón del lentisco (*Aloneura lentisci*); cochinilla de los pastos (*Balanococcus poae*); gorgojo argentino del tallo (*Listronotus bonariensis*); escarabajo negro (*Heteronychus arator*); porina (*Wiseana cervinata*); y combinaciones de los mismos.

55 En métodos de la presente invención, el endofito descrito anteriormente puede combinarse con un pasto huésped para proporcionar semillas de un pasto huésped infectadas con el endofito, tal como se ha descrito anteriormente.

El pasto huésped infectado con el cultivo de endofito tal como se ha descrito anteriormente produce un compuesto de indol de la clase de epóxidos de janthitrem.

60 Los compuestos de la clase de epóxidos de janthitrem, tal como se ha descrito anteriormente, pueden usarse como plaguicida o insecticida.

Los endofitos del grupo de AR37 y AR40 pueden identificarse mediante un método que incluye las etapas de:

65 (a) cultivar una semilla, preferentemente de colecciones de semillas de pasto;

(b) recoger y secar muestras de hierba;

(c) obtener un extracto en disolvente de la hierba seca;

5 (d) examinar dichos extractos en disolvente para los fines de determinar la presencia de compuestos de la clase del
 10 janthitrem de indol diterpenos (tal como se ha descrito anteriormente) y la ausencia de compuestos de la clase de
 lotitrem de indol diterpenos y la ausencia de ergovalina a niveles de detección de 0,1 ppm de materia seca mediante
 procedimientos seleccionados entre las técnicas de cromatografía de líquidos de alta presión; cromatografía de fase
 inversa; cromatografía ultrarrápida; absorción de luz UV; fluorescencia; resonancia magnética nuclear; y
 espectrometría de masas.

Los endofitos del grupo de AR37 y AR40 pueden caracterizarse mediante la aplicación de amplificación por reacción
 en cadena de la polimerasa de microsátélites y análisis del tamaño del producto aplicado a extractos de ADN de
 endofito *in planta*; endofito; endofito en un cultivo; y combinaciones de los mismos.

15 La combinación de ejemplos de una clase de endofito de *N. lolii* y variedades cultivadas vegetales mejoradas
 mediante inoculación artificial produce pasto que no causa síntomas de toxicosis por medio de la toxina ergovalina
 pero que contienen compuestos de indol diterpeno que siguen protegiendo al pasto huésped frente a plagas o
 estreses abióticos (tales como déficit de agua) o ambos.

20 Los endofitos de la clase de esta invención pueden caracterizarse mediante el examen de las propiedades de los
 endofitos en cultivo y en asociación con huéspedes herbáceos.

25 La invención se ha conseguido entendiendo la biología de endofitos de pastos de clima templado, aislando endofitos
 de interés seleccionados, inoculando los endofitos en plántones de pastos esterilizados en superficie, reevaluando la
 producción de alcaloides, multiplicando la semilla, evaluando en busca de factores agrónomos, realizando pruebas
 para la producción animal, evaluando en busca de cualquier prueba de trastornos animales tales como toxicosis por
 raigrás, hipertermia, o descenso de la hormona prolactina.

30 Esta invención puede describirse adicionalmente en referencia a las reivindicaciones adjuntas.

La invención está constituida por lo anterior y también prevé construcciones, de las cuales son ejemplos las
 siguientes.

35 **Mejores modos para llevar a cabo la invención**

Condiciones y descripción del cultivo

40 Los endofitos de esta invención son cepas de colecciones de semillas de raigrás perenne originalmente procedentes
 de Francia. Se examinaron semillas de muchas y diversas colecciones de raigrás de muchos países en busca de la
 presencia de endofito mediante la técnica del aplastamiento de semillas. Unas pocas plantas para cada muestra de
 semillas, donde el endofito demostró estar presente, se cultivaron durante varias semanas en condiciones de
 invernadero y se volvieron a poner a prueba en busca de la presencia de endofito en las vainas de sus hojas.

45 Los endofitos de plantas con quimiotipos de interés, principalmente aquellos que no producen lolitrem B o ergovalina
 se aislaron y se hicieron crecer en cultivo según el método de Latch y Christensen (1985). Los endofitos de esta
 invención se conservan en reservas de semillas, una colección de cultivo, o en plantas clonadas en las instalaciones
 de AgResearch Ltd en Palmerston North, Nueva Zelanda. Los cultivos también son depositados en los laboratorios
Australian Government Analytical laboratories en Sydney, Australia.

50 Todas las cepas de endofito de esta invención pueden estar alojadas dentro de un único sub-agrupamiento de la
 especie *Neotyphodium lolii*. Los aislados cuando se cultivan en agar de dextrosa y patata a 22° C son típicamente de
 crecimiento lento (crecimiento radial de aproximadamente 0,1-0,3 mm al día) con colonias típicamente blancas y
 algodonosas, que se vuelven de color beige con la edad. No se han observado conidios.

55 Inoculaciones

60 Cultivos axénicos del endofito AR37 como ejemplo de esta invención fueron inoculados con éxito (Latch y
 Christensen, 1985) en plántones cultivados a partir de semillas esterilizadas en superficie de variedades cultivadas
 de raigrás perenne *Lolium perenne*, por ejemplo Grasslands Nui y diversas líneas experimentales, generalmente con
 una tasa de éxito satisfactoria habitualmente superior al 5% de los intentos. De forma similar raigrases anuales
Lolium multiflorum, por ejemplo Grasslands Moata, y Corvette, y raigrases híbridos *Lolium x hybridum* han sido
 inoculados con éxito para un examen adicional con las características del quimiotipo de las combinaciones
 sustancialmente iguales que para raigrases perennes.

65 Identificación del quimiotipo

Las partes basales de brotes infectados con endofito se liofilizaron, algunas veces se trituraron y se extrajeron y analizaron cualitativamente en busca de la presencia o ausencia de peramina, lolitrems y ergovalina mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) usando modificaciones secundarias de los métodos de Barker y col., (1993) y Spiering y col., 2002. Algunos endofitos de dichas selecciones que carecía de lolitrems y ergovalina se aislaron, se clasificaron por atributos del cultivo y generalmente se volvieron a inocular en plantones de raigrás perenne sin endofito, variedad cultivada Grasslands Nui, como huésped de pastizal mejorado típico para fines comparativos. Las muestras de dichas plantas en diversas fases del crecimiento se analizaron con más detalle en busca de la producción de alcaloides. Después de la multiplicación de semillas, dos grupos de combinaciones de endofito-pasto (con y sin peramina por encima de 5 ppm) se pusieron a prueba en ensayos de campo para determinar adicionalmente sus cualidades agrónomas generales, persistencia, y resistencia práctica a depredación por insectos. Algunos endofitos, no de esta invención, producen peramina pero no lolitrems ni ergovalina y son el asunto de la Patente de Estados Unidos 6.072.107.

Los endofitos de esta invención son de una clase que no produce lolitrem B (u otros lolitrems estrechamente relacionados de propiedades cromatográficas y de fluorescencia similares) o ergovalina a niveles de detección de 0,1 ppm de materia seca de hierba. Tampoco producen normalmente peramina a un nivel de detección de 1 ppm de materia seca de hierba.

Identificación de nuevos alcaloides

Los endofitos de esta invención producen indol diterpenos que no se han visto anteriormente a partir de cualquier pasto infectado con endofitos. Típicamente partes de 50 mg de hierba liofilizada y triturada de plantas infectadas con estos endofitos se extrajeron durante 1 hora con 1 ml de dicloroetano-metanol 9:1 en volumen, y el extracto se recogió mediante centrifugado o filtración. Los extractos se examinaron en busca de la presencia o ausencia de lolitrems mediante HPLC de fase normal, por ejemplo con columnas de sílice Alltima de 150 x 4,6 mm (Alltech Associates, Deerfield, Il) y diclorometano-acetonitrilo, 7:1 en volumen a 1 ml/minuto usando detección de fluorescencia (excitación 265 nm, emisión 440 nm). Se observaron dos picos fluorescentes con los endofitos de esta invención que no son característicos de los endofitos de *N. lolii* que normalmente producen lolitrems. Uno de los picos (A) estaba menos retenido que lolitrem B mientras que el otro pico (B) estaba más retenido. Se observó el mismo patrón general de picos para extractos de hierba que contiene los endofitos AR37 y AR40.

Los extractos también se analizaron mediante HPLC de fase inversa, típicamente con una columna Prodigy de 150 x 4,6 mm (Phenomenex, Torrance, CA, Estados Unidos) y con una mezcla de disolventes de típicamente 5,6:1 (v/v) tampón de acetonitrilo:acetato de amonio acuoso (0,005 M) ajustado a pH 6 con ácido acético. El caudal de disolvente era de 1 ml/minuto, y los picos eluidos se detectaron mediante fluorescencia (excitación 265 nm, emisión 440 nm o excitación 333 nm, emisión 385). El orden de elución se invirtió y la resolución mejoró en comparación con la separación de fase normal anterior. Los picos fluorescentes identificados en este caso como los componentes I, II, III y IV tenían tiempos de retención de 7,7, 21,5, 24,2 y 25,1 minutos respectivamente para las condiciones de separación típicas anteriores. El pico B de fase normal correspondía al componente I de fase inversa, mientras que el pico A de fase normal se resolvía en tres componentes II, III y IV. La identidad química de estos componentes se investigó adicionalmente.

Los espectros de UV y de fluorescencia de los componentes I, II, III y IV se obtuvieron mediante HPLC de fase inversa usando técnicas de matriz de diodos y flujo detenido por fluorescencia (detectores Shimadzu SPD-M10A y RF-10A) con máximos espectrales como en la tabla 1. Estos datos se comparan sustancialmente con los espectros presentados para la clase de indol diterpeno de janthitrems (Gallagher, 1980; de Jesus y col., 1984) o shearininas relacionadas (Belofsky, 1995).

Tabla 1: absorción UV y picos espectrales de fluorescencia

Componente	UV	Fluorescencia
	λ_{Max} nm	$\lambda_{Em Max\xi}$ nm (λ_{Ex} 260 nm)
I	259, 333	381
II	259, 333	383
III	259, 333	387
IV	259, 333	384

Se realizó HPLC con espectrometría de masas (LC-MS) usando cromatografía de fase inversa con ionización por electropulverización (ESI) (detector Shimadzu QP-8000 α detector) y con variaciones del rango de barrido y el voltaje del deflector para inducir y explorar fragmentación iónica. La tabla 2 enumera el m/z de los iones MH⁺ indicados junto con iones de fragmento mayor. La pérdida de un fragmento de masa 58 (asignada en este caso como una pérdida de Me₂CO) se ha descrito para El MS de janthitrem C (Penn y col., 1993) y shearinina B (Belofsky, 1995).

Tabla 2: Picos espectrales de masa de ESI LC-MS

Componente	Atribuciones de pico espectral de masa de ESI				
	MH ⁺ m/z	MH ⁺ -H ₂ O	MH ⁺ -Me	MH ⁺ -Me ₂ CO	MH ⁺ -C ₅ H ₉
I	646,5	628,4	-	588,3	-
II	670,5	-	655,1	612,4	600,95
III	672,5	-	-	614,6	-
IV	714,5	-	-	656,3	-

5 El aislamiento y la caracterización adicionales del componente I se consiguieron extrayendo 715 g de semilla de raigrás perenne infectada con el endofito AR37 con 3 litros de diclorometano (DCM) a temperatura ambiente con agitación durante 1,5 - 2 h seguida por 2 litros adicionales de DCM tratado análogamente. El extracto combinado se concentró a presión reducida y se disolvió de nuevo en hexano durante un ciclo de cromatografía ultrarrápida (Merck Silica Gel 60 0,040 - 0,063 mm, 170 g, 85 mm de diámetro interno) con elución por etapas de 500 ml de volumen de hexano:DCM, DCM, DCM:acetonitrilo (en proporciones 19:1, 9:1, 4:1 y 1:1) y acetonitrilo (MeCN). La fracción que se eluye con DCM:MeCN (4:1) se enriqueció con I y se evaporó a sequedad (0,04 g), se disolvió de nuevo en un pequeño volumen de DCM:MeCN (4:1) y se aplicó sobre gel de sílice C-18 (2 g). Esto se colocó en la parte superior de una columna ultrarrápida de gel de sílice de fase inversa (Alltech recubierta con octadecilo, 32 g, 28 mm de diámetro interno) y las fracciones se eluyeron con volúmenes de 70 ml de MeCN:H₂O en etapas (1:1, 7:3, 4:1, 4:1, 9:1), MeCN, y DCM. La segunda fracción de MeCN:H₂O 4:1 enriquecida en I se concentró y se usó en dos partes para cromatografía ultrarrápida en sílice aminada (*Analytichem Sepralyte Primary Secondary Amine*, 2,1 g, 11 mm diámetro interno). Las fracciones se eluyeron con volúmenes de 5 ml de MeCN:H₂O (1:1) y MeCN:H₂O (7:3). Las fracciones de MeCN:H₂O (1:1) se concentraron para reducir el volumen, se absorbieron en una columna C-18 SPE (2 g, 11 mm diámetro interno), se eluyeron con MeCN y se concentraron para examen mediante espectrometría de masas de alta resolución y ¹H y ¹³C RMN.

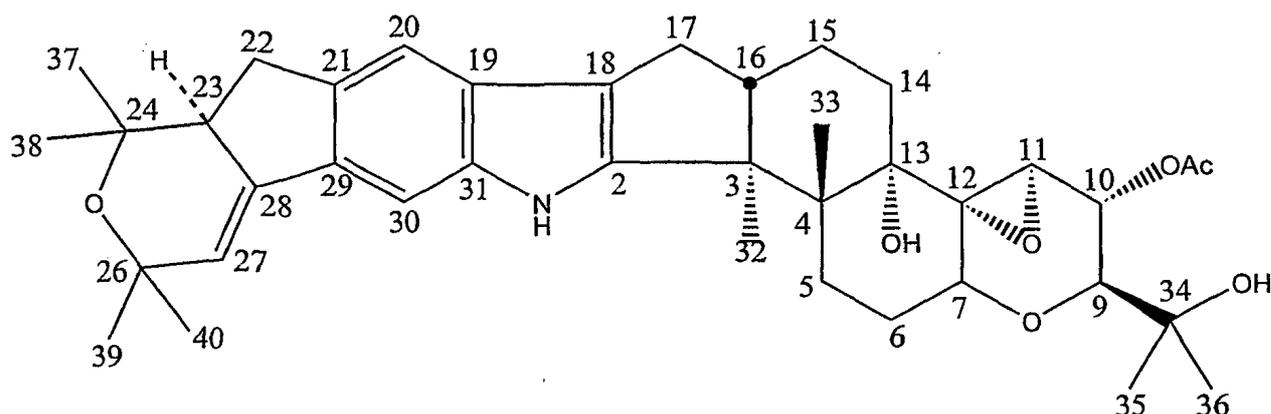
20 El espectro de masa de alta resolución obtenido en un espectrómetro de masas VG 70-250S con una sonda DCI produjo iones de caracterización con m/z 645,3647 (M⁺) (calculado para C₃₉H₅₁NO₇: 645,3665) y m/z 630,3451 (M⁺-Me) (calculado para C₃₈H₄₈NO₇: 630,3431).

25 Las muestras de I se examinaron en experimentos de resonancia magnética nuclear (RMN) para apoyar una estructura propuesta de I que también es coherente con las masas de alta resolución.

30 Los espectros de RMN se registraron en disolvente deuterioacetona ((CD₃)₂CO) en un espectrómetro Bruker AC400. Se presentan desplazamientos químicos con respecto a TMS. Los experimentos incluían espectros de ¹³C (100,62 MHz) y ¹H (400,13 MHz) unidimensionales junto con espectros (HMBC y HMQC) de acoplamiento por correlación de protón-protón (COSY) y protón-carbono de corto-alcance y largo alcance. Las señales se asignaron por comparación con datos de RMN publicados para janthitrem G (de Jesus y col., 1984; Wilkins y col., 1992; Penn y col., 1993) y shearininas (Belofsky y col., 1995), apoyados por los datos de correlación.

35 La estructura propuesta puede considerarse un epóxido del conocido janthitrem G (de Jesus y col., 1984) y, por lo tanto, denominado de forma trivial 11,12-epoxi-janthitrem G (Figura 1).

La estructura y el sistema de numeración para I es:



40

Los datos de desplazamiento químico de apoyo están en la tabla 3.

Tabla 3: desplazamientos químicos de RMN

Átomo	¹³ C	¹ H	Átomo	¹³ C	¹ H
2	154,3		23	49,3	2,82
3	51,1		24	74,2	
4	42,6		26	72,4	
5	26,4	1,62, 2,60	27	119,1	5,90
6	28,2	1,80, 2,21	28	140,8	
7	71,8	4,17	29	133,0	
9	76,0	3,45	30	103,5	7,36
10	68,2	5,14	31	140,4	
11	61,8	3,52	32	16,0	1,35
12	70,8		33	18,3	1,16
13	77,4		34	69,9	
14	29,7	1,58	35	26,1	1,13
15	21,0	1,50, 1,90	36	26,3	1,12
16	50,3	2,70	37	22,0	1,05
17	27,2	2,31, 2,60	38	30,1	1,25
18	116,3		39	31,8	1,32
19	127,2		40	29,9	1,27
20	113,8	7,13	Acetato Me	20,8	2,09
21	136,4		Acetato CO	170,0	
22	32,0	2,63, 3,06			

5 Mediante comparación y análisis de los espectros de UV, fluorescencia y masa, se proponen estructuras para II - IV:

II: El derivado de 10-deacetil-10,34-(3-metilbut-2-enil acetal) de I.

III: El derivado de 10-deacetil-34-O-(3-metilbut-2-enilo) de I.

10

IV: El derivado de 34-O-(3-metilbut-2-enilo) de I.

Caracterización del genotipo del endofito

15 Todos los endofitos de esta invención puestos a prueba hasta la fecha se caracterizan mediante identificación genética (loci de microsatélite polimórficos seleccionados y/o técnica de AFLP) como pertenecientes a un subgrupo de *Neotyphodium lolii*.

20 Muestras de aproximadamente 50 mg de brote basal fresco o 15 mg de brote basal seco se usaron para la extracción de ADN usando el kit FastDNA para plantas (Bio 101, Vista, California) usando procedimientos recomendados con el kit. Como alternativa, se extrajo ADN genómico del endofito cultivado (Moon y col., 1999). Se realizó amplificación por PCR de microsatélites usando pares de cebadores marcados con colorantes fluorescentes, B10.1 (5'-TET) / B10.2 y B11.1 (5'-HEX) / B11.4, tal como lo describen Moon y col., (1999). El tamaño aparente de los productos marcados fluorescentes de PCR de microsatélites se midió con respecto a dentro de 0,3 unidades de nucleótidos estimadas mediante electroforesis capilar usando un analizador genético ABI 3100 Genetic Analyzer con química de polímero POP6 en matrices de capilares de 50 cm y estándares de GeneScan-400HD (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA).

30 Los tamaños aparentes de los productos de PCR mediante esta técnica (ajustados restando una unidad donde parece haber sido añadido de forma terminal un nucleótido de adenina) están en la tabla 4 y muestran que los endofitos de esta invención pueden distinguirse de otros grupos de endofitos de *N. lolii* mediante los tamaños aparentes de los alelos. De este modo, las cepas de esta invención pueden caracterizarse mediante el alelo B10 de tamaño aparente de aproximadamente 160,6 y un alelo B11 de tamaño aparente de aproximadamente 132,0. Otras

cepas de *N. lolii* y algunas de *Epichloë festucae* han demostrado tener generalmente un único alelo B10 con tamaño aparente de aproximadamente 175,6 y un alelo B11 de tamaño aparente variable único aunque el tamaño 132,0 no se observó en ningún endofito aparte de los endofitos de esta invención. Un único alelo para cada locus es típico de *N. lolii* y *Epichloë festucae*.

5

Tabla 4. Tamaño aparente de productos de PCR de microsatélites B10 y B11

Material fuente	Tamaño del alelo B10	Tamaño del alelo B11
Cepa Lp19 de <i>N. lolii</i>	175,7	180,3
Cepa Lp7 de <i>N. lolii</i>	175,6	188,3
AR29 (cepa de <i>N. lolii</i> de raigrás Grasslands Nui)	175,7	176,2
AR5 (una cepa que carece de lolitrem B)	175,6	240,7
AR1 (una cepa que carece tanto de lolitrem B como de ergovalina)	175,7	147,8
Fl1 (<i>Epichloë festucae</i> de <i>Festuca longifolia</i>)	175,6	115,6
AR37	160,6	132,0
AR40	160,7	132,0

El descubrimiento de tamaños de alelos únicos (B10 = aprox. 160,6 y B11 = aprox. 132,0) para endofitos de esta invención no excluye una posibilidad de que endofitos relacionados estrechamente con las mismas propiedades funcionales pudieran tener alelos diferentes.

10

El análisis mediante AFLP (Griffiths y col., 1999) también confirmó que los ejemplos de endofito AR37 y AR40 de esta invención son de un subgrupo que puede distinguirse de otros endofitos de *N. lolii* fuera de este subgrupo mediante una o más diferencias polimórficas de dentro de más de 200 bandas de AFLP que se observó que son polimórficos para el género *Neotyphodium*.

15

Endofito y crecimiento del pastizal

El crecimiento de la variedad cultivada Grasslands Nui infectada con AR37 y tipo silvestre, y sin endofito se evaluó en una serie de ensayos de campo, tanto pastado como segado, en cuatro regiones de Nueva Zelanda durante un periodo de más de 3 años a partir de 1996.

20

Las parcelas infectadas con AR37 generalmente produjeron más hierba de raigrás que las parcelas de tipo silvestre. En 11 ensayos sembrados en 1996 y 1997 los rendimientos anuales medidos de las parcelas con AR37 fueron de promedio un 11% mayores durante 3 años. Las mayores diferencias se producían desde finales del verano hasta el otoño.

25

Por ejemplo, en el Sitio 1, donde las condiciones son favorables para el buen crecimiento del raigrás (por ejemplo, el tipo silvestre produce 15000 kg DM/ha/año), las parcelas con AR37 produjeron un 6% más de hierba anual ($P < 0,05$) con los mayores promedios de rendimiento en el otoño (tabla 5). En otro sitio, el Sitio 2, menos favorable para el crecimiento y la persistencia del raigrás (por ejemplo, el tipo silvestre produce 8700 kg DM/ha/año), las parcelas con AR37 tenían rendimientos más llevados en todas las estaciones y esto significativamente durante 3 estaciones y para rendimientos anuales totales (tabla 5).

30

Tabla 5. Rendimientos de raigrás de Grasslands Nui infectada con AR37 con respecto a rendimientos de Nui con endofito de tipo silvestre (=100) para parcelas de campo en dos ubicaciones opuestas. Promedio de rendimientos durante 3 años para ensayos sembrados en otoño de 1996

Sitio	Invierno	Primavera	Verano	Otoño	Anual
Sitio 1	108	100	107	120*	106*
Sitio 2	113	114*	117*	123*	116*

* Indica que el valor en el sitio es significativamente diferente del tipo silvestre ($P < 0,05$)

En el Sitio 2, otro ensayo sembrado en 1998 con raigrás Nui y una selección de raigrás conocida como "GA66" dio como resultado rendimientos anuales más elevados para parcelas con AR37 para ambos raigrases (+15% y +14%) ($P < 0,05$) en comparación con las parcelas con tipo silvestre.

40

Las diferencias en el número de brotes eran evidentes desde mediados del verano hasta principios del invierno, siendo del 22% al 64% mayores para AR37 en comparación con el tipo silvestre ($P < 0,05$) (tabla 6).

45

Tabla 6. Número de brotes de raigrás Nui en las praderas en otoño (por metro de hilera en el Sitio 3, por m² en el sitio 1)

Sitio	AR37	Tipo silvestre	Sin endofito
Sitio 3, Área 1	1340 ^a	1100 ^b	1120 ^b
Sitio 3, Área 2	1680 ^a	1300 ^b	1030 ^b
Sitio 1	7200 ^a	4400 ^b	4100 ^b

Para cada sitio, los números sin una letra en común son significativamente diferentes (P<0,05)

La materia orgánica radicular total se examinó en un ensayo en el Sitio 3 después de que las hileras de Grasslands Nui se segaron ocasionalmente para simular el pastoreo rotacional. Los núcleos, 25 mm de diámetro por 300 mm de profundidad en el suelo se evaluaron y el pasto infectado con AR37 mostró tener significativamente más masa radicular que el pasto sin endofito o el infectado con el tipo silvestre (tabla 7).

Tabla 7. Masa radicular (gramos de materia orgánica seca por núcleo)

	AR37	Tipo silvestre	Sin endofito
Materia orgánica radicular total	2,05 ^a	1,39 ^b	1,42 ^b

Los números sin una letra en común son significativamente diferentes (P<0,05)

Por lo tanto, se demostró que la infección de variedades cultivadas de raigrás perenne con AR37 da como resultado un crecimiento del pastizal y potencial productividad del pastizal generalmente superiores especialmente a finales de verano y en otoño.

Endofito y crecimiento del césped

El raigrás perenne se usa frecuentemente como componente principal de césped de servicio para fines estéticos y recreativos. Una observación de que la variedad cultivada Grasslands Nui infectada con AR37 tenía persistencia y color verde en comparación con otras infecciones por endofito de Grasslands Nui durante una estación veraniega seca en un sitio adicional, el Sitio 4, estimuló una comparación de ensayo en parcela pequeña de Grasslands Nui infectada con su propio nivel elevado natural de endofito de tipo silvestre o infectado artificialmente con AR37. Los ensayos se realizaron en el Sitio 4 y en el Sitio 1.

Las parcelas se gestionaron para simular condiciones de crecimiento del césped y la gestión del césped típica con segado regular a 2 cm de altura cuando se estimaba que la altura había crecido hasta los 3 cm. Se aplicó fertilizante a 30 unidades de nitrógeno por mes generalmente en la época lluviosa y se interrumpió durante periodos secos. Se aplicó agua solamente para evitar la muerte de la planta por deshidratación.

Las mediciones realizadas incluían densidad de brotes, producción de pasto (segado), observaciones sobre enfermedad y plagas, humedad del suelo y densidad aparente, masa radicular y masa apical (debajo de la altura del cortacésped) y mediciones de la morfología de la planta incluyendo dimensiones de la hoja y de la vaina.

Aunque había poca diferencia de rendimiento por encima de la altura del cortacésped, había diferencias en la masa del pasto por debajo de la altura del cortacésped, particularmente en el Sitio 1 donde la parcela AR37 era aproximadamente el doble del tratamiento de tipo silvestre (P<0,001).

La densidad de brotes por unidad de superficie tanto en el Sitio 1 como en el Sitio 4 era significativamente mayor para las parcelas con AR37 (P<0,005). Análogamente, la masa radicular era sistemáticamente mayor con parcelas con AR37 en aproximadamente el 25% o más (P<0,02) en ambos sitios. Las anchuras de la hoja (P<0,03) y la vaina (P<0,02), medidas en la base de cada parte, eran sistemáticamente menores para parcelas con AR37 medidas justamente en el Sitio 4. La materia seca de brotes media para AR37 era aproximadamente el 40% menor que para el tipo silvestre (P<0,014) en el Sitio 4, sin embargo el número medio de hojas por brote era prácticamente tres para ambas parcelas con endofito y no era significativamente diferente.

Por lo tanto, se demostró que la infección con AR37 de Grasslands Nui da como resultado un prado más denso de brotes más pequeños cuando se gestiona como un césped. Estos prados tienen una mayor masa radicular y más hierba por debajo de la altura de corte en comparación con el endofito de tipo silvestre. Estas características tienen mucha utilidad para mejorar la cobertura del suelo y la resistencia al corte lateral de los sistemas de césped.

Endofito y protección frente a plagas

Los endofitos de esta invención proporcionan a su raigrás perenne huésped resistencia a una serie de plagas de

insectos incluyendo el gorgojo argentino del tallo, el escarabajo negro, la cochinilla de los pastos y el pulgón del lentisco. En una combinación de ensayos de campo y maceta, el grado de protección proporcionado por el endofito AR37 cuando se comparaba con raigrás sin endofito es equivalente al proporcionado por el endofito de tipo silvestre de origen natural para todas estas plagas, excepto el pulgón del lentisco contra el que el endofito de tipo silvestre proporciona poca o ninguna protección (tabla 8).

Para el gorgojo argentino del tallo (*Listronotus bonariensis*) el modo de resistencia proporcionado por el endofito difiere entre AR37 y el tipo silvestre. En AR37 la alimentación del adulto y la ovoposición son iguales que en plantas sin endofitos mientras que en el tipo silvestre, la defensa contra el gorgojo está mediada principalmente mediante la disuasión del adulto de alimentación y ovoposición por el alcaloide peramina. Las observaciones indican que AR37 reduce el daño larvario a los brotes, dado que es tóxico para las larvas. AR37 ha sido probado contra el gorgojo argentino del tallo exhaustivamente en ensayos en campo y en maceta y ha reducido sistemáticamente el daño por esta plaga a niveles bajos cuando se compara con el daño en raigrás sin endofito.

AR37 también reduce el daño por larvas de escarabajo negro (*Heteronychus arator*) en el campo, principalmente a través de disuasión del adulto. El daño del escarabajo negro adulto a los brotes de raigrás infectados con AR37 era del 17,3% mientras que el 46% de los brotes sin endofito resultaban dañados. La supervivencia del pulgón del lentisco (*Aploneura lentisci*), la cochinilla de los pastos (*Balanococcus poae*) y porina (*Wiseana cervinata*) también son menores en raigrás con AR37 que en raigrás sin endofito.

Tabla 8. Ejemplos del efecto de AR37 sobre diferentes plagas de insectos

Insecto	Parámetro	AR37	Tipo silvestre	Sin endofito
Gorgojo argentino del tallo	% de brotes con daño larvario	13 ^a	17 ^a	36 ^b
Escarabajo negro	No. de larvas/m ²	13,8 ^a	13,8 ^a	60,0 ^b
Pulgón del lentisco	Log (n + 1)/planta	0,27 ^a	1,61 ^b	2,13 ^b
Cochinilla de los pastos	No./10 núcleos	0,3 ^a	0,6 ^a	16,8 ^b
Porina	% de supervivencia	50,2 ^a	60,0 ^{ab}	89,5 ^b

Para cada insecto, los números sin una letra en común son significativamente diferentes (P<0,05)

Endofito y rendimiento animal

Ovejas que pastaban variedades cultivadas de raigrás con endofito de tipo silvestre en verano y otoño pueden mostrar uno o todos los síntomas de toxicosis por endofitos del raigrás. Estos incluyen aumento de peso vivo reducido, tembleque del raigrás, temperaturas rectales y frecuencias respiratorias incrementadas, especialmente en condiciones húmedas y cálidas, incidencia incrementada de encopresis fecal (acumulaciones perianales) y picadura de mosca y niveles de prolactina basal reducidos. Usando estos parámetros, se compararon la salud y las respuestas de producción de ovejas que pastaban la misma variedad cultivada de raigrás sin endofito, con su endofito de tipo silvestre o con endofito AR37 en verano y otoño durante 3 años (tabla 9).

Tabla 9: Respuestas medias (3 años) de ovejas pastando raigrás con AR37 en comparación con el mismo raigrás sin endofito o con su endofito de tipo silvestre

	Sin endofito	Tipo silvestre	AR37
Cambio de peso vivo (g/día)	62	-12	47
Tembleque del raigrás (0-5 escala ascendente)	0	2,7	1,8
Temperatura rectal (°C)	40,4	40,7	40,5
Frecuencia respiratoria (respiraciones/minuto)	85	109	95
Prolactina en plasma (ng/ml)	208	110	210

Las ovejas pastando raigrás sin endofito no mostraban ninguna de las respuestas adversas típicamente asociadas con toxicosis por endofitos del raigrás. Aquellas que pastaban raigrás con AR37 presentaban tembleque del raigrás leve pero la incidencia y la gravedad era significativamente menores que para aquellas ovejas que pastaban raigrás con su endofito de tipo silvestre. El cambio de peso vivo medio era ligeramente inferior que para aquellas que pastaban sin endofito pero significativamente mejor que las tasas de crecimiento negativo de aquellas que pastaban raigrás con endofito de tipo silvestre. Para todos los demás parámetros (temperatura rectal, frecuencia respiratoria y niveles de prolactina en plasma) medidos no había ninguna diferencia significativa entre ovejas que pastaban raigrás sin endofito y aquellas que pastaban raigrás con AR37. Sin embargo, las frecuencias respiratorias y las temperaturas rectales eran significativamente superiores para ovejas que pastaban raigrás con su endofito de tipo silvestre que para aquellas que pastaban AR37, mientras que los niveles de prolactina en plasma eran

significativamente menores para raigrás con endofitos de tipo silvestre.

5 En otro ensayo replicado, no había ninguna prueba de tembleque del raigrás en ovejas que pastaban variedades cultivadas de raigrás sin endofitos con AR37 mientras que, en las mismas variedades cultivadas de raigrás con endofito de tipo silvestre, la oveja presentaba tembleque del raigrás grave. Los aumentos de peso vivo medios en ovejas que pastaban tratamientos con AR37 eran de 130 g/día mientras que aquellas que pastaban el mismo raigrás con su endofito de tipo silvestre crecían a solamente 90 g/día.

10 En un ensayo de pastoreo en granja mayor donde el raigrás se sembró con trébol, las respuestas eran similares en ovejas que pastaban tratamientos con AR37 que en aquellas con tratamientos sin endofito sin tembleque del raigrás en tratamientos con AR37.

Referencias:

15 Ball, O.J-P.; Miles, C.O.; Prestidge, R.A. 1997: Ergopeptine alkaloids and Neotyphodium lolii-mediated resistance in perennial ryegrass against *Heteronychus arator* (Coleoptera: Scarabaeidae). *Journal of Economic Entomology* 90: 1383-1391.

20 Barker, D.J.; Davies, E.; Lane, G.A.; Latch, G.C.M.; Nott, H.M.; Tapper, B.A. 1993: Effect of water deficit on alkaloid concentrations in perennial ryegrass endophyte associations. In *Proceedings of the Second International Symposium on Acremonium/Grass Interactions*. Eds. Hume, D.E.; Latch, G.C.M.; Easton, H.S. AgResearch, New Zealand, pp. 67-71.

25 Belofsky, G. N.; Gloer, J.B.; Wicklow, D.T.; Dowd, P.D. 1995: Antiinsectan alkaloids: shearinines A-C and a new paxilline derivative from the ascostromata of *Eupenicillium shearii*. *Tetrahedron*, 51: 14, 3959-3968.

Blank, C.A.; Gwinn, K.D. 1992: Soilborne seedlings diseases of tall fescue: influence of the endophyte *Acremonium coenophialum*. *Phytopathology* 82: 1089.

30 Bouton, J.H.; Latch, G.C.M.; Hill, N.S.; Hoveland, C.S.; McCann, M.A.; Watson, R.H.; Parish, J.H.; Hawkins, L.L.; Thompson, F.N. 2002: Re-infection of tall fescue cultivars with non-ergot alkaloid-producing endophytes. *Agronomy Journal* 94: 567-574.

35 de Jesus, A.E.; Steyn, P.S.; van Heerden, F.R.; Vleggaar, R. 1984: Structure elucidation of the janthitrems, novel tremorgenic mycotoxins from *Penicillium janthinellum*. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions I*, 4, 697-701.

40 Elberson, H.W.; West, C.P. 1996: Growth and water relations of field grown tall fescue as influenced by drought and endophyte. *Grass and Forage Science* 51: 333-342.

Fletcher, L.R. 1999: "Non-toxic" endophytes in ryegrass and their effect on livestock health and production. In *Ryegrass endophyte: an essential New Zealand symbiosis*. Grassland Research and Practice Series No. 7, pp 133-139.

45 Fletcher, L.R.; Easton, H.S. 2000: Using Endophytes for Pasture Improvement in New Zealand. In *Proceedings of The Grassland Conference 2000, 4th International Neotyphodium/Grass Interactions Symposium*. Eds. Paul, V.H.; Dapprich, P.D. Universtät, Paderborn, pp 149-162.

50 Fletcher, L.R.; Sutherland, B.L.; Fletcher, C.G. 1999: The impact of endophyte on the health and productivity of sheep grazing ryegrass-based pastures. In *Ryegrass endophyte: an essential New Zealand symbiosis*. Grassland Research and Practice Series No. 7, pp 11-17.

55 Gallagher, R.T.; Latch, G.C.M.; Keogh, R.G. 1980: The janthitrems: fluorescent tremorgenic toxins produced by *Penicillium janthinellum* isolates from ryegrass pastures. *Applied and Environmental Microbiology*, 39:1, 272-273.

Griffiths, A.; Moon, C.; Tapper, B.; Christensen, M. 1999: Non-radioactive AFLP fingerprinting for detection of genetic variation in *Epichloë/Neotyphodium* endophytes. *Proceedings of the 11th Australian Plant Breeding Conference*.

60 Latch, G.C.M.; Christensen, M.J. 1985: Artificial infection of grasses with endophytes. *Annals of Applied Biology* 107: 17-24.

Leuchtmann, A. 1997: Ecological diversity in *Neotyphodium*-infected grasses as influenced by host and fungus characteristics. In *Neotyphodium/Grass Interactions*, Eds. Bacon, C.W.; Hill, N.S. Plenum Press, New York, pp 93-108.

65 Moon, C.D.; Tapper, B.A.; Scott, D.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.

- 5 Penn, J., Swift, R.; Wigley, L.J.; Mantle, P.G.; Bilton, J.N.; Sheppard, R. N. 1993: Janthitrems B and C, two principal indole-diterpenoids produced by *Penicillium janthinellum*. *Phytochemistry*, 32: 6, 1431-1434.
- Prestidge, R. A.; Gallagher, R. T. 1985: Lolitrem B - a stem weevil toxin isolated from *Acremonium*-infected ryegrass. Proceedings 38th New Zealand weed and pest control conference: 38-40.
- 10 Rowan, D. D.; Dymock, J. J.; Brimble, M. A. 1990: Effect of fungal metabolite peramine and analogs on feeding and development of Argentine stem weevil (*Listronotus bonariensis*). *Journal of Chemical Ecology* 16: 1683-1695.
- 15 Rowan, D.D.; Hunt, M.B.; Gaynor, D.L. 1986: Peramine, a novel insect feeding deterrent from ryegrass infected with the endophyte *Acremonium loliae*. *Journal of the Chemical Society. Chem. Commun.* 1986. 935-936.
- Rowan, D.D.; Latch, G.C.M. 1994: Utilization of endophyte-infected perennial ryegrasses for increased insect resistance. In *Biotechnology of endophyte fungi in grasses*. Eds. Bacon, C.W. White, J. CRC Press, pp 169-183.
- 20 Siegel, M.R.; Latch, G.C.M.; Bush, L.P.; Fannin, F.F.; Rowan, D.D.; Tapper, B.A.; Bacon, C.W.; Johnson, M.C. 1990: Fungal endophyte-infected grasses: alkaloid accumulation and aphid response. *Journal of Chemical Ecology* 16: 3301-3315.
- 25 Spiering, M.J.; Davies, E.; Tapper, B.A.; Schmid, J.; Lane, G.A. 2002: Simplified extraction of ergovaline and peramine for analysis of tissue distribution in endophyte-infected grass tillers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 5856-5862.
- Stuedemann, J.A.; Hoveland. C.. 1988: Fescue endophyte: History and impact on animal agriculture. *Journal of Production Agriculture* 1: 39-44.
- 30 Tapper, B.A.; Latch, G.C.M. 1999: Selection against toxin production in endophyte-infected perennial ryegrass. In *Ryegrass endophyte: an essential New Zealand symbiosis*. Grassland Research and Practice Series No. 7, pp 107-111.
- 35 Wilkins, A.L.; Miles, C.O.; Ede R.M.; Gallagher, R.T.; Munday, S.C. 1992: Structure elucidation of janthitrem B, a tremorgenic metabolite of *Penicillium janthinellum*, and relative configuration of the A and B rings of janthitrems B, E, and F. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40: 8, 1307-1309.

REIVINDICACIONES

1. Un método de protección de un pasto huésped frente a estreses bióticos y abióticos inoculando artificialmente el pasto huésped con una cepa de endofito de la especie *Neotyphodium lolii*, caracterizado porque la cepa de endofito de *N. lolii* se selecciona entre: cultivos de AR37 y AR40 depositados el 23 de mayo de 2003 en los laboratorios *Australian Government Analytical Laboratories* (AGAL) número de registro NM03/35819 (AR37) y NM03/35820 (AR40), y combinaciones de los mismos, y produce al menos un compuesto de epóxido de janthitrem a un nivel suficiente para otorgar dicha protección al pasto huésped.
2. El método según la reivindicación 1, en el que el pasto huésped inoculado artificialmente tiene un crecimiento radicular mejorado y más brotes en comparación con un pasto sin infección por endofito.
3. El método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que los estreses bióticos son causados por plagas que incluyen insectos.
4. El método según la reivindicación 3, en el que las plagas a las que se otorga resistencia mejorada en el pasto huésped se seleccionan entre el grupo constituido por: pulgón del lentisco (*Aploneura lentisci*); cochinilla de los pastos (*Balanococcus poae*); escarabajo negro (*Heteronychus arator*); porina (*Wiseana cervinata*); y combinaciones de los mismos.
5. El método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la cepa de endofito otorga las características de mejora del crecimiento del animal de pastoreo y productividad animal incrementada en comparación con pasto infectado con endofitos que se sabe que inducen toxicosis por endofitos del raigrás.
6. El método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el estrés abiótico es un déficit de agua.
7. El método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el pasto huésped es un raigrás perenne, anual o híbrido.
8. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el pasto huésped es un pasto de la subfamilia Pooideae.
9. El método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el pasto huésped se selecciona entre las especies: *Lolium perenne*; *Lolium multiflorum*; *Lolium x hybridum*.
10. El método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la cepa de endofito no produce, además, niveles suficientes de un compuesto o compuestos para causar toxicosis en animales de pastoreo.
11. El método según la reivindicación 10, en el que la toxicosis es toxicosis por endofitos del raigrás.
12. El método según la reivindicación 10 o la reivindicación 11, en el que la toxicosis evitada es causada por: toxina ergovalina, toxina lolitrem, o una combinación de las mismas.
13. El método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la cepa de endofito produce alcaloides tóxicos lolitrem B y ergovalina a niveles de menos de 2 ppm de materia seca de lolitrem B y 0,5 ppm de materia seca de ergovalina.
14. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que la cepa de endofito produce alcaloides tóxicos lolitrem B y ergovalina a niveles de detección de menos de 0,1 ppm de materia seca.
15. El método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la cepa de endofito está en forma de un cultivo de endofitos.
16. El método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la infección se consigue modificando el pasto huésped usando técnicas seleccionadas entre el grupo constituido por: obtención, cruzamiento, hibridación, selección, modificación genética y combinaciones de las mismas.
17. El método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que las cepas de endofitos tienen tamaños de alelo de 160,6 ó 160,7 pares de bases en el alelo B10 y 132,0 pares de bases en el alelo B11.
18. El uso de una cepa de endofito de la especie *N. lolii* seleccionada entre: cultivos de AR37 y AR40 depositados el 23 de mayo de 2003 en los laboratorios *Australian Government Analytical Laboratories* (AGAL) número de registro NM03/35819 (AR37) y NM03/35820 (AR40), y combinaciones de los mismos, en el que la cepa produce compuestos de epóxido de janthitrem, para otorgar protección abiótica y biótica incrementada a un pasto huésped, cuando es inoculada artificialmente en el pasto huésped.