

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 605 954**

51 Int. Cl.:

A01N 63/04 (2006.01)

A01H 17/00 (2006.01)

A01N 43/653 (2006.01)

A01P 3/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.08.2006 PCT/NZ2006/000202**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.02.2007 WO07021200**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.08.2006 E 06784009 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.09.2016 EP 1916890**

54 Título: **Atributos mejorados de endófitos de plantas herbáceas**

30 Prioridad:

16.08.2005 NZ 54160605

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

17.03.2017

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**ROLSTON, MAURICE PHILIP y
SIMPSON, WAYNE ROYDON**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 605 954 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

Atributos mejorados de endófitos de plantas herbáceas

5 Campo técnico

La invención se refiere a atributos mejorados de endófitos de plantas herbáceas. Más específicamente, la invención se refiere a un endófito con estabilidad y resistencia a fungicida mejoradas cuando está en combinación con una planta cultivada o parte de la misma.

10

Antecedentes de la técnica

15 Se sabe a partir de la memoria de patente nueva zelandesa 233.083 que se puede hacer que las combinaciones sintéticas de endófito/cultivares de herbaje sean resistentes a plagas y pueden ser menos tóxicas a animales que pastan que las combinaciones que se dan de manera natural. Estas propiedades seleccionadas se pueden alcanzar seleccionando combinaciones sintéticas que producen niveles relativamente altos de peramina y niveles relativamente bajos o no lolitrem B en raigrás.

20 El documento US 6.111.170 (la patente '170), describe descubrimientos de que endófitos seleccionados del género *Neotyphodium* forman combinaciones sintéticas estables con hospedadores de festuca alta (*Festuca arundinacea*). Las combinaciones descritas tienen resistencia mejorada a plagas de invertebrados en comparación con cultivares de festuca alta que no contiene tales endófitos. Las cepas particulares de endófito descritas en la patente '170 incluyen AR501, AR502, AR510, AR542, AR572, AR577 y AR584. Sin embargo, esta patente no describe, ni sugiere otros atributos de estos endófitos y sus combinaciones más allá de resistencia mejorada a plaga y toxicidad reducida.

25

30 El resumen de la patente rusa, RU2201678C2 describe un biopreparado para proteger las plantas frente a hongos y enfermedades bacterianas. El biopreparado se basa en células vivas y esporas de la bacteria endofítica *Bacillus subtilis*. La bacteria tiene una alta actividad antagonista a agentes de enfermedades fúngicas y bacterianas en cultivos de verduras, grano y fruta. No se hace descripción con respecto al uso de la bacteria en plantas herbáceas. Tampoco es obvio a partir de este resumen que la bacteria descrita sea resistente a fungicidas. La descripción meramente hace referencia a que la bacteria previene la infección fúngica de la planta a todos los efectos actuando como un fungicida de por sí.

35

Meriaux y col. describe la viabilidad de la semilla de raigrás (*Lolium perenne*) infectada con endófito de *Neotyphodium* después del tratamiento con fungicidas. Los fungicidas usados eran procloraze (procloraz), triticonazol, bitertanol y fluquinconazol administrados a dos dosis o tratados por calor (tratamiento por horno a 60 o 80 °C). Se describe que la germinación de la semilla se efectúa por el tratamiento con procloraz (1 g/kg), triticonazol (5 y 10 g/kg) y tratamiento por calor a 80 °C. No se hace referencia ni se sugiere para la viabilidad del endófito o viabilidad (semilla o endófito) cuando se combina con plantas herbáceas cultivadas. Según la experiencia del inventor la viabilidad de la semilla y la viabilidad del endófito son dos cuestiones muy diferentes con semillas que conservan con frecuencia la viabilidad durante más tiempo que los endófitos.

40

45 Rolston y col. describen los efectos del tratamiento con fungicida sobre combinaciones de endófito AR1 y raigrás. AR1 es un endófito de una especie de *Neotyphodium* que tiene un perfil alcaloide diferente a AR584 en que AR1 no produce alcaloides lolina y puede producir terpendoles de manera de diferente a AR584. La publicación indica que la viabilidad del endófito AR1 no estaba afectada por los tratamientos con fungicida incluyendo fungicidas triazol y estrobilurina. Según la experiencia del inventor no es obvio que una propiedad indicada para un endófito en un tipo de planta también presentará las mismas propiedades con otro endófito o planta. La evidencia anecdótica existe mostrando que la cepa de endófito y la especie vegetal pueden dar como resultado muy diferentes resultados. Una razón para la variación es que los diferentes endófitos dan diferentes atributos a combinaciones de planta herbácea endófito. Una razón para la variación es que diferentes endófitos tienen diferentes niveles y tipos de perfil de alcaloide. Como resultado diferentes endófitos en combinación con diferentes plantas herbáceas tienen propiedades variables. Además, diferentes especies de planta herbácea también influyen en las propiedades de las combinaciones con endófitos.

50

55

Saiga y col. describen los efectos de endófitos de *Neotyphodium* sobre las características de la planta incluyendo tratamientos de empapar con fungicida. El fungicida, benomil (grupo benzimidazol) se describe como eficaz en matar el endófito en tanto raigrás perenne como festuca alta. El fungicida triforina (grupo amida) era eficaz en festuca alta y eficaz en algunas plantas de raigrás perenne. Triofanato-metilo (fungicida precursor del benzimidazol) tenía poco efecto sobre el endófito en raigrás perenne y no tenía efecto sobre el endófito en festuca alta. El objetivo del método de la publicación es eliminar los endófitos juntos de la planta herbácea. Como resultado, se usan dosis particularmente fuertes de fungicidas y la planta herbácea se empapa en fungicida. No se realiza descripción para la identificación de endófitos con resistencia mayor a fungicidas, o descripción con respecto a la estabilidad.

60

65

Hill y col. describe cultivares de festuca alta que contienen endófitos que incluyen *Neotyphodium coenophialum*. El resumen discute cómo mantener el endófito viable en las plántulas al aplicar fungicidas cloroneb (fungicida aromático) y terrazole (grupo tiazol) durante los 7 a 21 primeros días después de la germinación. Hill y col. no identifica endófitos con resistencia a fungicidas ni identifica AR584 como que presenta cualquier resistencia particular. Además, el periodo de tiempo del análisis descrito es únicamente después de la germinación y únicamente en plántulas.

Park y col. describe el desarrollo de un fungicida microbiano que utiliza bacterias endofíticas para el control de antracnosis de pepino y pimienta roja causada por *Colletotrichum orbiculare* y *C. coccodes* y *C. acutatum*. Entre 18 cepas aisladas, una cepa bacteriana EB215 aislada de raíces de pepino manifestó la actividad antifúngica más potente frente a especies de *Colletotrichum*. No se hace mención con respecto a la resistencia fungicida mejorada debido al endófito, ni se usa en términos de plantas herbáceas tales como festuca alta.

Bluett y col. describe una prueba que compara diversas propiedades entre raigrás (*Lolium perenne*) infectado con endófito tipo silvestre, endófito AR1 o no endófito. Se encontró que el raigrás infectado con AR1 produce rendimientos de pasto similares que el raigrás infectado con endófito silvestre, mientras que ofrece pequeños mejoramientos en la producción de leche sin incidencia de modorra indicada en los animales que pastan. No se hace ninguna discusión sobre el efecto del endófito con respecto al tratamiento con fungicida, la estabilidad del endófito ni al endófito AR584 ni cultivares de planta herbácea festuca alta.

Timer, P.; Gates, R.N.; Bouton J.H – “Response of Pratylenchus spp. In tall fescue infected with different strains of the fungal endophyte *Neotyphodium coenophialum*” *Nematology*, Vol. 7 No 1, Páginas 105-110 (2005) describen que una cepa de endófito no productora de cornezuelo de *Neotyphodium* AR584 mantiene alguna resistencia a plagas de nematodo. Timper y col. no dicen nada de ninguna relación entre la viabilidad del endófito y la resistencia fungicida de planta/endófito.

El documento US200515002 está en la entrada de la fase nacional US del documento WO2002013616. Este documento describe planta herbácea que tiene mejorada tolerancia al estrés y menor toxicidad animal cuando está infectada con ciertos aislados de hongos de *Neotyphodium*.

El documento WO2004106487 describe un endófito o cultivo de endófito de *Neotyphodium lolii* que en combinación con raigrás no causa síntomas típicos de toxicosis de raigrás en animales que pastan y que produce compuestos de epóxido jantitrem.

Un experto en la técnica debería apreciar que una combinación de endófito planta que ha incrementado la resistencia fungicida sería de beneficio para mejorar las prácticas de gestión del cultivo de semilla de pasto y forraje existentes. Además, la estabilidad incrementada durante el transporte también sería una ventaja.

Es un objetivo de la presente invención abordar los precedentes problemas o al menos proporcionar al público una opción útil.

Es conocido que el término “comprender” puede, bajo jurisdicciones variantes, ser atribuido con o bien un significado exclusivo o uno inclusivo. Para el fin de esta memoria, y si no se indica lo contrario, el término “comprender” tendrá un significado inclusivo – es decir, que se tomará que significa una inclusión de no solamente los componentes enumerados directamente citados, sino también otros componentes o elementos no especificados. Este fundamento también se usará cuando los términos “comprendido” o “que comprende” se usen en relación con una o más etapas en un método o proceso.

Aspectos y ventajas adicionales de la presente invención llegarán a ser aparentes a partir de la consiguiente descripción que únicamente se da a modo de ejemplo.

Descripción de la Invención

Para los fines de esta memoria, el término “endófito” o variaciones gramaticales del mismo se refiere a hongos de *Neotyphodium spp.* que viven dentro de plantas herbáceas cultivadas o medio de cultivo axénico.

El término “plantas herbáceas cultivadas” o variaciones gramaticales del mismo, se refieren a variedades de plantas herbáceas que se han creado o seleccionado intencionadamente y se han mantenido mediante cultivo.

El término “cultivar de planta herbácea sintética” se refiere al cultivar de planta herbácea que se produce a través de técnicas de reproducción selectiva que incluyen la selección y el desarrollo a partir de una población no cultivada. Por ejemplo, un cultivar de planta herbácea sintético se refiere a donde:

- las unidades reproducibles son de un cultivo polinizado de forma cruzada. Esto podría incluir, por ejemplo, clones o plantas herbáceas endogámicas;
- los materiales usados se seleccionan entre su comportamiento en ensayos de aptitud combinatoria o progenie;

- el cultivar está constituido por inter cruzamiento de las unidades;
- las unidades se mantienen de manera que se puede reconstituir el sintético.

5 El término "combinación", o sus variaciones gramaticales, se refieren a la combinación de un endófito y de variedades de plantas herbáceas mejoradas desde un punto de vista cultural, cada uno de los cuales se ha aislado de la naturaleza, pero cuya combinación no existe en la naturaleza.

El término "planta o parte de la misma" se refiere a toda la planta o a partes seleccionadas de la planta durante el ciclo vital de la planta, tal como las semillas, los brotes, las raíces, las flores, los tallos de la planta y similares.

10 El término "conservar" o variaciones gramaticales del mismo en relación a endófitos, se refiere a la capacidad del endófito de mantener un nivel de viabilidad en combinación con una planta hospedadora, o parte de la misma, a un nivel aceptable para una circunstancia dada o conjunto de circunstancias durante un periodo dado de tiempo y bajo un conjunto dado de condiciones. Los expertos en la técnica deberían apreciar que los porcentajes aceptables para la viabilidad pueden variar dependiendo de la generación o clase de semilla a la que se refiere, así como al variar los estándares industriales.

15 El término "viable" o variaciones gramaticales del mismo, se refiere al endófito que es capaz de vivir, desarrollarse o multiplicarse en condiciones favorables en relación simbiótica con una planta hospedadora o en cultivo axénico.

El término "tratamiento con fungicida" se refiere a la combinación que se rocía, se pulveriza, se infunde, o se administra por otros medios, con una composición que contiene fungicida.

20 El término "fungicida" se refiere a sustancias que destruyen o inhiben el crecimiento de los hongos.

De acuerdo con un aspecto adicional de la presente invención se ha proporcionado un método de conservación de la viabilidad de endófito en una planta o una parte de la misma después del tratamiento con fungicida, producida por una combinación una combinación de un cultivar de planta herbácea y endófito, en la que el endófito es endófito AR584 (depósito AGAL N° NM98/04676 con fecha del 12 de mayo de 1998).

Los autores de la invención han encontrado inesperadamente que el endófito AR584 presenta una capacidad mejorada para resistir los tratamientos con fungicida. Se prevé que este atributo tendrá beneficio comercial significativo en la agricultura. A modo de ejemplo, la gestión de pasto de granja estándar o cultivo de semilla requiere de rociado de tratamientos con fungicida al pasto o cultivo de semilla para evitar las enfermedades fúngicas transmitidas por suelo y foliares. Un problema con las combinaciones existentes de plantas herbáceas y endófito de planta herbácea es que, los fungicidas comúnmente usados en la gestión del pasto y cultivo de semilla y el control de patógenos fúngicos indeseados también tienden a reducir significativamente la viabilidad del endófito. Como resultado, las propiedades favorables indicadas para las combinaciones de endófito y planta herbácea se pueden reducir o anular todas juntas. Sin embargo, los autores de la invención han indicado que AR584 tiene una resistencia a los fungicidas comerciales estándar hasta cierto punto que significa que un granjero puede rociar para evitar las enfermedades foliares y los patógenos fúngicos transmitidos por el suelo indeseados y aún conservar la viabilidad adecuada del endófito.

40 Preferiblemente, después del tratamiento con fungicida se conserva al menos un 50 % o más de la viabilidad del endófito.

Preferiblemente, los fungicidas usados en el tratamiento tienen características sistémicas.

45 Preferiblemente, los fungicidas usados en el tratamiento tienen características de control de enfermedad foliar.

Preferiblemente, el fungicida usado en el tratamiento tiene actividad frente a patógenos fúngicos transmitidos por el suelo.

50 Preferiblemente, los fungicidas usados en el tratamiento se seleccionan entre el grupo de triazoles, grupo de estrobilurinas o combinaciones de estos dos grupos de fungicidas.

Preferiblemente, después de someterse a tratamiento con fungicida basado en triazol, se conserva al menos el 60 % o más de la viabilidad del endófito.

55 Preferiblemente, la combinación conserva al menos el 65 % o más de la viabilidad del endófito, más preferiblemente, más del 80 % de viabilidad, cuando se somete a una combinación 50:50 p/p de fungicida basado en triazol y fungicida basado en estrobilurina.

60 Preferiblemente, el tratamiento con fungicida se aplica a la combinación de cultivar de planta herbácea y endófito a las tasas estándares que se usan en el control de enfermedades foliares.

Preferiblemente, el tratamiento con fungicida basado en triazol se aplica como un rociado a una tasa de 1.000 ml/ha. Se supone que esto equivale a 250 g de epoxiconazol/ha.

65

ES 2 605 954 T3

Preferiblemente, el tratamiento con fungicida basado en estrobilurina se aplica como un rociado a una tasa de 1.000 ml/ha. Se supone que esto equivale a 250 g de azoxistrobina/ha.

5 Preferiblemente, el tratamiento con fungicida se aplica en la floración temprana de la combinación del cultivar de planta herbácea y endófito.

Preferiblemente, el tratamiento con fungicida se aplica a la combinación en la floración temprana y se vuelve a aplicar de nuevo en la floración tardía de la combinación.

10 En realizaciones preferidas, el fungicida se aplica como un rociado aunque esto no debería ser visto como limitante ya que el fungicida se puede aplicar por otros métodos tales como inmersión, pulverizado, espolvoreado, geles o combinaciones de los mismos. Se prevé que esto se podría aplicar a la planta o a parte de la misma.

15 De acuerdo con un aspecto de la presente invención se ha proporcionado un método de conservación de la viabilidad del endófito en una plata o una parte de la misma después del tratamiento con fungicida, producida por una combinación de una combinación de cultivar de planta herbácea y endófito, en la que el endófito es endófito AR584 (depósito AGAL N° NM98/04676 con fecha del 12 de mayo de 1998) en el que la combinación conserva el endófito AR584 viable en la misma después de que la combinación se someta a temperaturas de entre 15 °C y 55 °C durante un periodo de tiempo de al menos 3 días.

20 Preferiblemente la combinación conserva al menos 60 % o más de la viabilidad del endófito cuando la combinación se somete a una temperatura de hasta 40 °C y una humedad relativa de hasta el 100 % durante al menos un periodo de tiempo de 3 días.

25 Preferiblemente, la planta o una parte de la misma producida por la combinación de la combinación de endófito y cultivar de planta herbácea como se describió anteriormente se caracteriza más conservando la viabilidad del endófito cuando la combinación de planta herbácea y endófito se somete a temperaturas por encima de 20 °C.

30 Preferiblemente, el endófito AR584 en la combinación conserva al menos un 50 % o más de la viabilidad del endófito.

Preferiblemente, la viabilidad del endófito se conserva cuando la combinación de endófito y planta o parte de la misma se somete a temperaturas de 35 °C a 45 °C.

35 Preferiblemente, la viabilidad del endófito se conserva cuando la combinación de endófito y planta o parte de la misma se somete a temperaturas de 40 °C.

40 Preferiblemente, la viabilidad del endófito se conserva cuando la combinación de endófito y planta o parte de la misma se somete a un incremento de temperatura como se describe sobre una base continua. Preferiblemente, la viabilidad del endófito se conserva cuando la temperatura se incrementa durante periodos de tiempo de al menos 3 días.

45 Preferiblemente, la planta o una parte de la misma producida por la combinación de endófito y cultivar de planta herbácea se caracteriza más conservando la viabilidad del endófito cuando la combinación de planta herbácea y endófito se somete a una humedad relativa del 70 % o superior.

Preferiblemente, la viabilidad del endófito se conserva cuando la combinación se somete a una humedad relativa del 70 % o más durante al menos 3 días.

50 Preferiblemente, la planta o una parte de la misma producida por la combinación de endófito y cultivar de planta herbácea es capaz de mantener la viabilidad cuando se somete a humedad relativa de hasta el 100 %. Preferiblemente, la viabilidad del endófito se conserva cuando la combinación de endófito y planta o parte de la misma se somete a un incremento de humedad como se describe sobre una base continua. Preferiblemente, la viabilidad del endófito se conserva cuando la humedad se incrementa durante periodos de tiempo de al menos 3 días.

55 Preferiblemente, se conserva al menos el 75 % o más de la viabilidad del endófito.

Preferiblemente, la combinación:

60 (a) conserva al menos el 60 % o más de la viabilidad del endófito cuando la combinación se somete a una temperatura de hasta 40 °C y una humedad relativa de hasta el 100 % durante al menos un periodo de tiempo de 3 días; y

(b) conserva al menos un 50 % o más de la viabilidad del endófito después del tratamiento con fungicida.

65

Los autores de la invención también han encontrado inesperadamente que el endófito AR584 tiene una tolerancia sorprendentemente alta a temperaturas y humedades elevadas permitiéndole mantenerse viable dentro de una planta o parte de la misma durante periodos prolongados de tiempo en tales condiciones. Este atributo es de beneficio comercial cuando las plantas o partes de las mismas se transportan ya que se requieren pocos tratamientos especiales tales como refrigeración, por lo tanto, reduciendo también el coste del transporte.

Preferiblemente, la planta o parte de la misma es la planta entera o partes seleccionadas de la planta. Se prevé que esto puede incluir semilla(s), brote(s), hojas, tallo(s), flore(s), raíz(raíces) de la planta y combinaciones de los mismos.

Preferiblemente, la planta o parte de la misma es una semilla o semillas.

Preferiblemente, el cultivar de planta herbácea se selecciona entre una o más variedades vegetales de festuca alta.

Preferiblemente, esto se puede seleccionar entre el grupo que incluye: Grasslands Flecha, Grasslands Advance, Kentucky 31, Georgia 5, Jesup, Jackal, Quantum y combinaciones de las mismas.

Preferiblemente, la combinación se produce por inoculación del cultivar de planta herbácea con un cultivo axénico del endófito.

Preferiblemente, la combinación se produce por cruzamiento de la combinación endófito/cultivar de planta herbácea con un cultivar de planta herbácea libre de endófito para formar un cultivar de planta herbácea infectado con endófito. Preferiblemente, el cultivar de planta herbácea es un cultivar de planta herbácea sintético.

Se debería apreciar a partir de la anterior descripción que se han proporcionado nuevos métodos para el endófito de cepa AR584. En particular, la planta o parte de la misma producida por la combinación de endófito AR584 y un cultivar de planta herbácea tiene ventajas nuevas e inesperadas significativas que incluyen un nivel aumentado de resistencia a fungicidas comúnmente usados para prevenir las enfermedades foliares en planta herbácea. Este atributo significa que un agricultor puede aplicar fungicidas estándares sin necesidad de manejo especial.

La planta o parte de la misma también tiene una estabilidad significativamente mejorada en comparación con otras combinaciones de endófito/cultivar de planta herbácea existentes con respecto a la conservación de la viabilidad del endófito cuando la planta o parte de la misma se somete a extremos de temperatura y humedad. Un beneficio importante de este atributo está en el transporte, por ejemplo, de semillas, donde la viabilidad se puede reducir usando combinaciones de endófito/planta herbácea existentes debido a las malas prácticas de manejo o extremos en la temperatura y humedad experimentados en ciertos climas y países. Uno de tal ejemplo puede ser cuando las cantidades de semilla se transportan en las bodegas de barcos a través de zonas climáticas variantes en ambientes de almacenamiento no controlados.

Breve descripción de los dibujos

Los aspectos adicionales de la presente invención llegarán a ser aparentes a partir de la siguiente descripción que se da únicamente a modo de ejemplo y en referencia a los dibujos adjuntos en los que:

la Figura 1 es una gráfica que compara los niveles de viabilidad de endófito de AR584, AR542 y AR505 en combinación con dos cultivares de planta herbácea diferentes con cinco tratamientos con fungicida diferentes;

la Figura 2 es una gráfica que compara los niveles de viabilidad de endófito de AR584, AR542 y AR505 en combinación con dos cultivares de planta herbácea diferentes con o bien 0 días o 3 días de envejecimiento acelerado (EA); y

la Figura 3 es una gráfica que compara los niveles de endófito viable para AR542 y AR584 en dos cultivares de planta herbácea diferentes tratados con tres tratamientos con fungicidas diferentes.

Mejores maneras para llevar a cabo la invención

Ahora se describen los métodos de la invención en referencia a pruebas llevadas a cabo por los autores de la invención.

Prueba 1

Introducción

La prueba se emprendió para determinar la tolerancia de tres endófitos (AR502, AR542 and AR584) a fungicidas comúnmente usados en la producción de semilla de planta herbácea para el control de enfermedades foliares.

Los fungicidas evaluados pertenecen a dos grupos químicos diferentes. El primer grupo se refiere a fungicidas triazol que incluyen:

- Opus® con ingrediente activo epoxiconazol y
- Folicur® con ingrediente activo tebuconazol.

El segundo grupo se refiere a los fungicidas de estrobilurina que incluyen Amistar® con agente activo azoxistrobina.

Según la experiencia del inventor los grupos químicos anteriores representan más del 90 % de los fungicidas usados en la producción y gestión de planta herbácea de festuca alta.

El proceso de envejecimiento acelerado (EA) es un tratamiento de alta temperatura (40 °C) y alta humedad relativa (HR) (HR al 100 %) de semilla para estimular los efectos de almacenamiento a largo plazo. En base a las pruebas anteriores, el envejecimiento acelerado es un indicador útil y exacto de la estabilidad del almacenamiento natural a largo plazo.

Métodos

Prueba de campo

Plantas de dos cultivares de festuca alta “Jesup” y “Georgia 5” se inocularon con endófito y se trasplantaron a parcelas de ensayo. Cada parcela consistía en 4 plantas de cada cultivar, en hileras de 1,0 de separación. Los tratamientos se reprodujeron exactamente tres veces en un diseño en bloque aleatorizado.

Fungicidas

Se evaluaron cinco tratamientos fungicidas como sigue:

1. Control

- nada de fungicida;

2. Opus®

- 250 g de ingrediente activo Epoxiconazol por litro, grupo triazol rociado a la tasa de etiqueta de 1.000 ml/ha;

3. Amistar®

- 250 g de ingrediente activo Azoxistrobina por hectárea, grupo de estrobilurina

4. Opus® y Amistar®

- Opus® a 500 ml/ha (mitad la tasa de etiqueta) y Amistar® a 500 ml/ha y se aplica como una mezcla de tanque;

5. Folicur®

- 1. 430 g de ingrediente activo Tebuconazol por litro; grupo de triazol a la tasa de etiqueta de 440 ml/ha.

Las dosis usadas eran aproximadamente las tasas de etiqueta recomendadas para el uso de los productos anteriores. Se debería indicar que los productores habitualmente usan menos tasa de etiqueta, particularmente si la intención es aplicar el fungicida más de una vez. Como resultado, las tasas de dosificación usadas en esta prueba presentan un reto significativo para la viabilidad del endófito.

Los fungicidas se aplicaron dos veces durante la prueba para reproducir exactamente la práctica de pasto normal. Las aplicaciones se realizaron en la puntuación de crecimiento de Zadocks (GS) 69 (floración temprana/antesis) y en la puntuación de crecimiento de Zadocks (GS) 71 (maduro por agua de cariósido). Este ritmo de aplicación era de acuerdo con lo recomendado a los productores y coincide con el periodo de mayor presión de enfermedad en los cultivos.

Envejecimiento acelerado

Las semillas se suspendieron sobre una malla fina por encima del agua medida en recipientes sellados de plástico y colocados en una incubadora fijada para mantener una temperatura de aproximadamente 40 °C y con la cámara de semilla controlada a una humedad relativa del 100 %.

Valoración del endófito por el ensayo de crecimiento (grow-out)

Se cultivaron seis réplicas (cada una de 48 plántulas) que consistían en duplicados de cada tratamiento, en bandejas de turba y se dejaron crecer en un invernadero durante al menos 6 semanas antes de la transferencia.

Detección del endófito

Se sometieron a transferencia brotes cortados de las plántulas después de 6 semanas de crecimiento sobre papel de nitrocelulosa y se desarrolló usando una reacción anticuerpo/antígeno.

El proceso de desarrollo se completa por inmersión de las láminas de membrana de nitrocelulosa en solución de bloqueo durante al menos dos horas a temperatura ambiente. La solución de bloqueo está compuesta de 2,42 g de Tris (hidroximetil) metilamina, 2,92 g de NaCl, 5 g de polvo de leche sin grasa y 10 ml de HCl (1 M) en 1 l de agua que se ha pasado a través de un sistema de osmosis inversa (OI). El pH de la solución es de 7,5. Durante la inmersión, se bloquea cualquier sitio no unido antes de la aplicación del anticuerpo primario.

Después de la eliminación de la solución de bloqueo, se añade 25 ml de solución de bloqueo fresca por lámina junto con 25 µl de anticuerpo primario por lámina. Las láminas se sumergen durante la noche a 4 °C y se agitan para mantener la solución en movimiento sobre las láminas. Al día siguiente, la solución de bloqueo y el anticuerpo primario se eliminan y las láminas se enjuagan varias veces con solución de bloqueo fresca. Más tarde, las láminas se sumergen y se agitan durante dos horas a temperatura ambiente en 25 ml de solución de bloqueo fresca con 12,5 µl de anticuerpo secundario añadido. Se conjuga una enzima a este anticuerpo secundario. Posteriormente, la solución de bloqueo y el anticuerpo secundario se decantan fuera y las láminas se enjuagan con solución de bloqueo fresca.

Para desarrollar el color que permite la identificación del endófito, las membranas de nitrocelulosa se sumergen en cromógeno. Este producto se prepara disolviendo 75 mg de Rojo Rápido en 12,5 ml de tampón Tris (para un litro de agua de OI, el tampón Tris está compuesto de 24,2 g de Tris (hidroximetil) metilamina (pH: 8,2)) por lámina y disolviendo por separado 12,5 mg de naftol fosfato as-mx en 12,5 ml de tampón Tris por lámina y estas soluciones se combinan. Las láminas se incuban sobre el agitador durante 15 minutos. Al final de los 15 minutos, el cromógeno se elimina y las láminas se enjuagan en agua que se ha pasado a través de un sistema de osmosis inversa. Entonces, estas láminas están listas para ser leídas.

Análisis estadístico

El análisis de los datos se emprende usando un paquete estadístico – GenStat Versión 7.

Resultados*Efecto del endófito*

El nivel de endófito viable promedio del endófito AR584 era significativamente mayor ($P < 0,001$) que AR542 y AR502 durante tanto el tratamiento con fungicida como los experimentos de envejecimiento acelerado. El promedio para AR584 era de 81 % de endófito viable después de todos los tratamientos, mientras que el promedio para AR542 y AR502 era de 60 y 56 % respectivamente (Tabla 1).

También se indicó que los tres endófitos se comportan de manera diferente entre las principales variables del tratamiento: endófito x cultivar; endófito x envejecimiento acelerado (EA) y endófito x fungicida (Tabla 1).

Tabla 1. Comparación de endófito viable de tres cepas de endófito (AR584; AR542 y AR502). Se hace el promedio de cada valor de dos cultivares, dos tratamientos de envejecimiento acelerado, cinco fungicidas y seis repeticiones).

Endófito	E+ %
AR584	81
AR542	60
AR502	56
LSD 5%	5,1
Probabilidad F	
Endófito	<0,001
Endófito x cultivar	0,005
Endófito x envejecimiento acelerado	<0,001
Endófito x fungicida	<0,001

Efecto del fungicida

Los dos fungicidas redujeron significativamente el nivel de endófito viable (medias de todos los otros tratamientos) dese el 92 % en el tratamiento sin nada de fungicida al 61 % para la mezcla de Opus® y Amistar®, y 38 % para el

tratamiento con solamente Opus® (Tabla 2).

Los datos apuntan a que epoxiconazol es el componente más significativamente reductor de los niveles de endófito viable.

5

Tabla 2. Efecto de fungicidas sobre endófitos viables (promedio de las medias de datos de dos endófitos, dos cultivares y seis repeticiones).

Fungicida	E+ %
nada	81
Amistar®	76
Folicur®	70
Opus® + Amistar®	61
Opus®	45
LSD 5%	6,6
Probabilidad F	
Fungicida	<0,001
Fungicida x endófito	<0,001

Interacción endófito y fungicida

10

La interacción endófito y fungicida, como se muestra en la Tabla 1, se analiza más en la Tabla 3 indicada más adelante.

15

Según los descubrimientos inesperados de los autores de la invención, la interacción parece que se surge porque AR584 es significativamente el más tolerante de los dos fungicidas en comparación con el control y con otras combinaciones de endófito ensayadas.

20

Con el tratamiento con la mezcla Opus® y Amistar®, AR584 tenía al menos un 50 % de mayor viabilidad de endófito en comparación con otros endófitos (73 % de endófito viable en comparación con el 49 % en AR542). Para los tratamientos solamente con Opus®, AR584 tenía más de tres veces el nivel de endófito viable en comparación con AR542. La interacción se muestra a más detalles en la Figura 1.

Tabla 3. Endófito viable AR584 y AR542 para los tratamientos con fungicida (medias de dos tratamientos de envejecimiento acelerado de cultivares y seis repeticiones).

Fungicida	Endófito		
	AR584	AR542	AR502
	Viabilidad del endófito [%]		
nada	93	91	58
Amistar	93	73	63
Folicur	89	70	51
Opus + Amistar	73	49	46
Opus	60	17	61
LSD 5%		11,3	

25

Efecto del cultivar

30

Había un pequeño efecto del cultivar, con el cultivar Georgia 5 que tenía mayores niveles de endófito que el cultivar Jesup después de los tratamientos con fungicida (Tabla 4). La interacción de cultivar y endófito era estadísticamente significativa.

Tabla 4. Endófito viable para dos cultivares (promedio de medias para tres endófitos, cinco fungicidas y seis repeticiones).

Cultivar	Viabilidad de endófito [%]
Georgia 5	68
Jesup	63
LSD 5%	5
Probabilidad F	
Cultivar	0,02
Cultivar x endófito	0,005

35

Envejecimiento acelerado

Se ensayaron tres días de envejecimiento acelerado para determinar los niveles de viabilidad de endófito para AR584, AR542 y AR502 (Tabla 5).

Los resultados encontrados muestran que AR502 parece ser muy sensible al tratamiento de envejecimiento acelerado (Tabla 5 y Figura 2) y AR584 tiene una resistencia significativamente mejorada a la temperatura y humedad elevada.

5 Tabla 5. Efecto de 0 o 3 días de envejecimiento acelerado (EA) sobre endófito viable (medias de dos cultivares, cinco fungicidas y 6 repeticiones).

Endófito	Días envejecimiento acelerado	
	0 EA	3 EA
AR584	89	74
AR542	61	60
AR502	79	33
LSD 5%	10	

También se ensayaron periodos de tiempo de más de 3 días y dieron resultados proporcionalmente similares como los anteriores, sin embargo, con tasas reducidas de viabilidad de endófito.

10 Conclusión

Los datos fuertemente soportan el argumento de que AR584 tiene propiedades únicas en comparación con otros endófitos en la conservación de características de viabilidad de semilla cuando las plantas se tratan con fungicidas durante el desarrollo de la semilla. Se encontró que AR584 es más resistente a fungicidas de diferentes actividades químicas, especialmente al fungicida "Opus®".

También se encontró que AR584 había incrementado la resistencia a extremos en calor y humedad cuando se comparaba con otros endófitos.

20 Prueba 2

Introducción

25 Esta prueba se hizo para complementar los resultados mostrados en la prueba uno. Se ensayó la tolerancia de dos endófitos, AR584 y AR542 en dos cultivares de festuca alta, "Jesup" y "Georgia" cuando se trataban con tres tratamientos con fungicida diferentes.

Los tratamientos con fungicida ensayados incluían:

1. tratamiento sin nada;
2. solamente Opus aplicado a 1,0 l/ha; y
3. una mezcla de Opus® y Amistar® aplicada a 0,5 + 0,5 l/ha.

35 También se adaptó el proceso de envejecimiento acelerado (EA). Tal como se discutió anteriormente en la prueba 1, el EA se emprendió incubando semillas a una temperatura alta de 40 °C y Humedad Relativa (HR) del 100 %.

Método

40 *Prueba de campo*

Se condujo una prueba de campo sobre dos cultivares de festuca alta, "Jesup" y "Georgia 5" que se inocularon con dos endófitos AR584 y AR542. La prueba de campo se llevó a cabo como se describió anteriormente en la Prueba uno, en la que las plantas se inoculaban con endófito y, a continuación, se trasplantaban en parcelas de ensayo. Cada parcela consistía en 4 plantas de cada cultivar, en hileras de 1,0 m de separación. Los tratamientos se reprodujeron exactamente tres veces en un diseño en bloque aleatorizado.

Fungicidas

50 Tres tratamientos fungicidas que se pusieron a prueba como se resumen a continuación:

1. tratamiento sin nada;
2. solamente Opus® (O), aplicado a 1,0 l/ha; y
3. una mezcla de Opus® aplicada a 0,5 l/ha y Amistar® (O+A) aplicada a 0,5 l/ha.

55 De nuevo, las dosis usadas eran aproximadamente las tasas de etiqueta recomendadas para el uso de los productos anteriores. El ritmo de aplicación del fungicida era de acuerdo con lo recomendado a los productores y coincide con el periodo de más presión de enfermedad en los cultivos.

El envejecimiento acelerado, la valoración del endófito por el ensayo de crecimiento (*grow-out*), la detección del endófito y el análisis estadístico también se llevaron a cabo como se resumió anteriormente en la Prueba 1.

Resultados

5

Efecto del Endófito y del fungicida

La Figura 3 y la Tabla 6 muestran la viabilidad de cada endófito cuando se trata con los diversos tratamientos con fungicida. Tal como se muestra, AR584 tenía el 81 % de viabilidad cuando se trató con una mezcla de Opus® y Amistar® (O+A) y 64 % de viabilidad cuando se trató con Opus® (O) solamente en el cultivar Georgia 5. La viabilidad del endófito para el cultivar Jesup era del 70 % y 69 % para los respectivos tratamientos. En comparación, AR542 tenía 63 % y 24 % de viabilidad en el cultivar de Georgia 5 y 35 % y 11 % de viabilidad en el cultivar de Jesup.

15 Estos resultados muestran que había una clara diferencia en la viabilidad de endófito de ambos endófitos después del tratamiento de los diversos fungicidas.

Tabla 6. El porcentaje de endófito viable para AR542 y AR584 en dos cultivares (Georgia 5 y Jesup) cuando se trataron con: no fungicida, fungicida Opus® + Amistar® (O+A) o fungicida Opus® (O) solo.

Cultivar	Endófito	Tratamiento con fungicida		
		nada	O+A	Opus
Georgia 5	AR542	91	63	24
Georgia 5	AR584	92	81	64
Jesup	AR542	90	35	11
Jesup	AR584	93	70	69
LSD 5%			11,6	

20

Cuando los promedios de la viabilidad de porcentaje de los diferentes endófitos se compararon a través de los tratamientos y cultivares, la diferencia entre AR584 y AR542 como se muestra en la Tabla 7, es altamente significativa. Los datos muestran que el endófito AR584 tiene una viabilidad mayor del 76 % en comparación con AR542, el cual tenía 54 % de viabilidad a través de los diferentes tratamientos de cultivar y fungicida.

25

Tabla 7. Endófito para los promedios de los datos de diferente cultivar, fungicida y envejecimiento acelerado.

Endófito	E+ %
AR584	76
AR542	54
LSD 5%	13
Prob F	<0,001

30

No había diferencia en el nivel de endófito viable para tanto los endófitos AR584 como AR542 para el tratamiento sin nada de fungicida. Sin embargo, cuando se aplicó el fungicida Opus®, había una interacción significativa de $P < 0,001$. Tal como se muestra en la Tabla 8 de a continuación, cuando plantas inoculadas con endófito AR584 se trataban con Opus®, el nivel de endófito viable (promedio de cero y 3 días de EA) cayó a 60 %. Por el contrario, AR542 para el mismo tratamiento era del 17 %.

Tabla 8. Viabilidad en porcentaje del endófito para endófito AR584 y AR542 y tratamiento de fungicida Opus®.

	nada	Opus
AR584	93	60
AR542	91	17
LSD 5%		9,2
Prob F		<0,001

35

Efecto del cultivar

40

La Tabla 9 de a continuación muestra que también había una interacción significativa ($P=0,045$) entre el endófito, cultivar y fungicida. Esta interacción es el resultado del tratamiento con fungicida Opus®, el cual considerablemente hizo caer el nivel de endófito viable. El resultado en porcentaje de esto era menor en el cultivar Georgia en comparación con el cultivar Jesup.

45

Sin embargo, esta diferencia entre el endófito AR584 y el endófito AR542 en comparación con el tipo de cultivar era comparable durante ambos tratamientos.

ES 2 605 954 T3

Tabla 9. Muestra la interacción entre los diversos Endófitos, Cultivares y Fungicidas.

	Fungicida	AR584 nada	Opus	AR542 nada	Opus
Cultivar	Georgia5	93	64	91	24
	Jesup	93	55	91	11
	LSD 5%			18,4	
	Prob F			0,045	

Conclusión

- 5 Esta prueba mostró que el endófito AR584 era más resistente que el endófito AR542 cuando se trataba con diversos tratamientos con fungicida. Tal como se muestra, el endófito AR584 tenía una tolerancia mejorada a los diversos tratamientos con fungicida, cuando se compara con el endófito AR542. Esta relación era la misma en ambos cultivares de festuca alta ensayados.
- 10 Esta resistencia es particularmente evidente cuando la festuca alta combinada con el endófito AR584 se expuso a Opus®, un fungicida control de roya de triazol.

PRUEBA 3

- 15 Para ensayar si los endófitos se pueden transferir o no a otras especies de planta herbácea además de Jesup y Georgia 5, los resultados ahora se incluyen para un endófito diferente, AR1 que muestra que este endófito se puede inocular en cultivares de planta herbácea tipo "Grasslands Advance" y festuca alta Kentucky 31.

- 20 Los datos de inoculación para la inoculación interespecies de AR1 (*Neotyphodium lolii*) en festuca alta *(*Schedonorus phoenix*) y hospedadores de festuca de prado (*Festuca pratensis*). (*anteriormente *Festuca arundinacea*)

Festuca alta:

Planta	Hongo	Pos	Neg	Muerte	% positiva viva
949	AR1	19	24	20	44
K31	AR1	26	53	37	33
949 = cuatro réplicas de 10 a 18 plantas K31 = siete réplicas de 10 a 19 plantas					

25

Festuca de prado:

Planta	Hongo	Pos	Neg	Muerte	% positiva viva
J103	AR1	2	5	13	29
J110	AR1	3	27	37	10
J103 = una réplica de 20 plantas J110 = seis réplicas de 4 a 2 plantas					

30

Se debería apreciar a partir de lo anterior que se ha proporcionado un endófito mejorado que, en combinación con un cultivar vegetal, aborda los problemas asociados con la práctica actual de gestión de pasto y cuestiones de transporte.

Se han descrito aspectos de la presente invención solo como ejemplo y debería apreciarse que se pueden realizar a la misma, modificaciones y adiciones sin apartarse de su alcance.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método de conservación de la viabilidad de endófitos en una planta o en una parte de la misma producida por una combinación de un cultivar de planta herbácea y una combinación de endófito, en la que el endófito es el endófito AR584 (depósito AGAL N° NM98/04676 con fecha del 12 de mayo de 1998), que comprende el tratamiento de la combinación con un fungicida.
- 10 2. El método según la reivindicación 1 en el que el endófito AR584 en la combinación conserva al menos un 50 % o más de la viabilidad del endófito después del tratamiento con un fungicida.
- 15 3. El método según la reivindicación 1 o la reivindicación 2 en el que el fungicida usado en el tratamiento tiene características sistémicas, características de control de enfermedades foliares, o actividad frente a patógenos fúngicos transmitidos por el suelo.
- 20 4. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en el que el fungicida usado en el tratamiento se selecciona entre: el grupo de triazoles, el grupo de estrobilurinas o combinaciones de estos dos grupos fungicidas.
- 25 5. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 en el que al menos se conserva el 65 % o más de la viabilidad del endófito cuando la combinación se trata con una combinación de 50:50 p/p de fungicida basado en triazol y fungicida basado en estrobilurina.
- 30 6. El método según las reivindicaciones 1 a 5 en el que el fungicida usado en el tratamiento está basado en triazol y se aplica a la combinación como un rociado a una tasa de 1.000 ml/ha.
- 35 7. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 en el que el fungicida usado en el tratamiento está basado en estrobilurina y se aplica como un rociado a una tasa de 1.000 ml/ha.
- 40 8. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 en el que el fungicida usado en el tratamiento se aplica a la combinación en la floración temprana de la combinación, o se aplica en la floración temprana y se vuelve a aplicar de nuevo en la floración tardía a la combinación.
- 45 9. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 en el que el fungicida se aplica a la combinación en la forma seleccionada entre: un rociado, una inmersión, un polvo, un gel y combinaciones de los mismos.
- 50 10. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 que comprende someter la combinación a temperaturas de entre 15 °C y 55 °C durante un periodo de tiempo de al menos 3 días.
- 55 11. Un método según la reivindicación 10, en el que la combinación se produce inoculando el cultivar de planta herbácea con un cultivo axénico del endófito.
- 60 12. El método según la reivindicación 10 u 11 en el que el endófito AR584 en la combinación conserva al menos un 50 % o más de la viabilidad del endófito.
- 65 13. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12 en el que la viabilidad del endófito se conserva cuando la combinación del endófito y la planta o parte de la misma se somete a temperaturas de 35 °C a 45 °C.
14. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 13 en el que la viabilidad del endófito se conserva cuando la combinación se somete a una humedad relativa de 70 % o más durante al menos 3 días.
15. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que la combinación conserva al menos el 60 % o más de la viabilidad del endófito cuando la combinación se somete a una temperatura de hasta 40 °C y una humedad relativa de hasta 100 % durante al menos un periodo de tiempo de 3 días.
16. El método según la reivindicación 15 en el que se conserva al menos el 75 % o más de la viabilidad del endófito.
17. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, que comprende someter la combinación a una temperatura de hasta 40 °C y a una humedad relativa de hasta 100 % durante al menos un periodo de tiempo de 3 días, en el que la combinación conserva al menos el 60 % o más de la viabilidad del endófito, cuando la combinación se somete a la temperatura de hasta 40 °C y a la humedad relativa de hasta 100 % durante al menos un periodo de tiempo de 3 días, en el que la combinación conserva al menos un 50 % o más de la viabilidad del endófito después del tratamiento con un fungicida.
18. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17 en el que la planta o parte de la misma se selecciona entre: semilla(s), brote(s), tallo(s), flore(s) o raíz(raíces) y combinaciones de los mismos.

19. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18 en el que el cultivar de planta herbácea es una variedad vegetal de festuca alta.

5 20. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19 en el que el cultivar de planta herbácea es un cultivar de planta herbácea sintético.

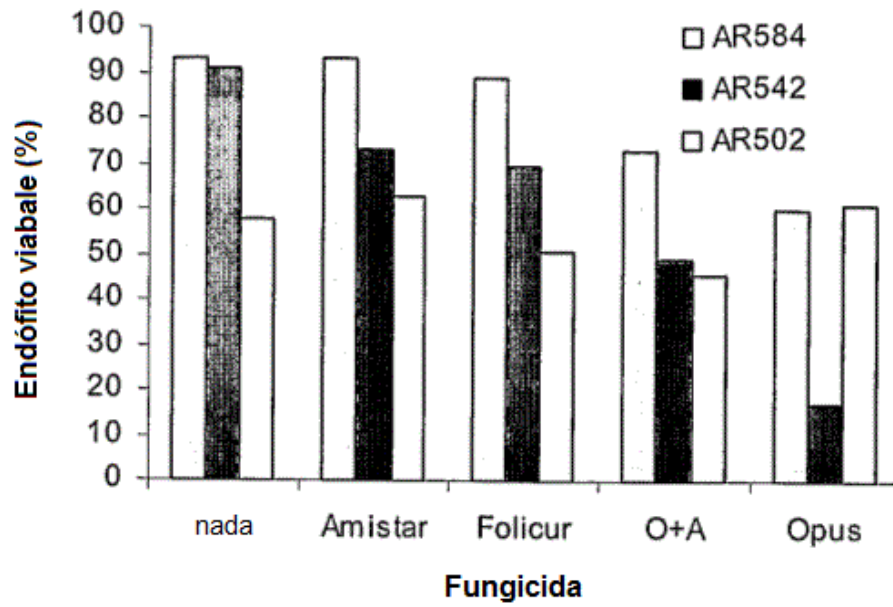


FIGURA 1

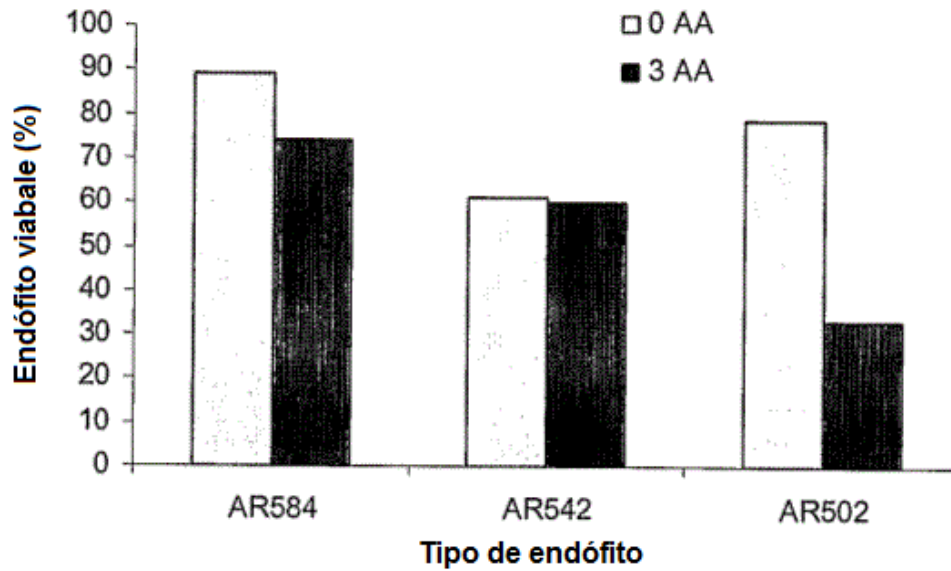


FIGURA 2

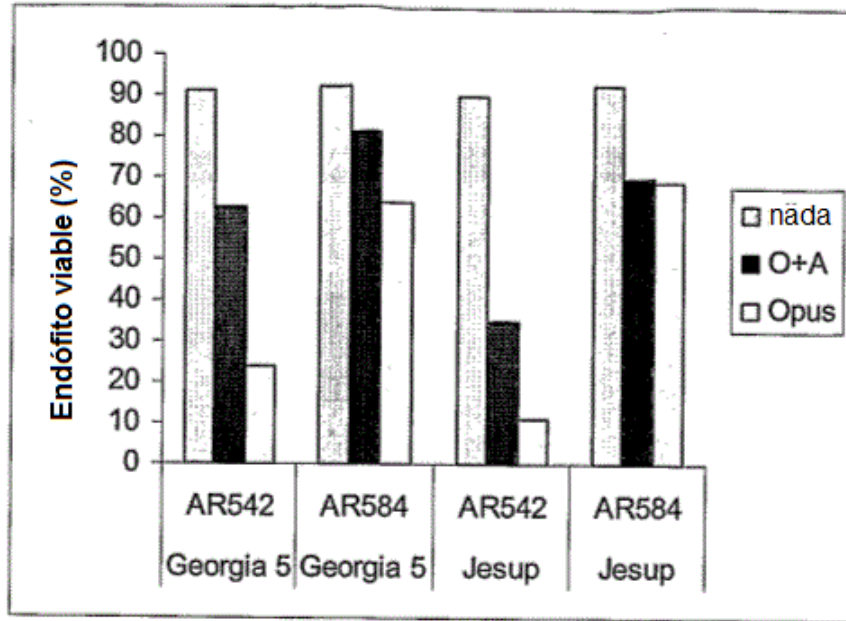


FIGURA 3