

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 620 609**

51 Int. Cl.:

A01N 43/16	(2006.01)
A01H 3/04	(2006.01)
A01H 17/00	(2006.01)
A01N 63/04	(2006.01)
C07H 13/06	(2006.01)
C08B 37/08	(2006.01)
C12N 15/82	(2006.01)
C07H 5/04	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.10.2009 PCT/IB2009/007492**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **06.05.2010 WO2010049817**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.10.2009 E 09760299 (9)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.02.2017 EP 2358194**

54 Título: **Lipo-quito-oligosacáridos que estimulan la simbiosis micorrícica arbuscular**

30 Prioridad:
29.10.2008 WO PCT/IB2008/003484

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
29.06.2017

73 Titular/es:
**INSTITUTE NATIONAL DE LA RECHERCHE
AGRONOMIQUE (33.3%)
147, rue de l'Université
75007 Paris, FR;
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE (33.3%) y
UNIVERSITÉ PAUL SABATIER (TOULOUSE III)
(33.3%)**

72 Inventor/es:
**DENARIE, JEAN;
MAILLET, FABIENNE;
POINSOT, VÉRÉNA;
ANDRE, OLIVIER;
BECARD, GUILLAUME;
GUEUNIER, MONIQUE;
CROMER, LAURENCE;
HAOUY, ALEXANDRA y
GIRAUDET, DELPHINE**

74 Agente/Representante:
DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 620 609 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

Lipo-quito-oligosacáridos que estimulan la simbiosis micorrícica arbuscular

La invención se refiere a lipo-quito-oligosacáridos implicados en la simbiosis micorrícica arbuscular, y a sus aplicaciones.

5 Los hongos micorrícicos arbusculares (abreviadamente en lo sucesivo MA) han establecido asociaciones simbióticas con raíces de plantas durante más de 400 millones de años, desde la aparición de las primeras plantas terrestres, lo que sugiere que los hongos MA ayudaron a las plantas en su colonización del suelo terrestre (Remy et al., 1994). Este grupo de hongos, recientemente denominados Glomeromicota, es uno de los más ampliamente distribuidos y las asociaciones de MA están ampliamente distribuidas en todo el reino vegetal, incluyendo angiospermas, gimnospermas, pteridofitas y algunas briofitas (Smith and Read, 2008). Entre las angiospermas, al menos el 80% de las especies pueden formar simbiosis con hongos MA, siendo las únicas excepciones importantes las brasicáceas y las quenopodiáceas. Los hongos MA son capaces de transferir nutrientes minerales raros o poco solubles, tales como fósforo, zinc y cobre, desde el suelo a la planta, que a su vez proporciona carbohidratos al hongo. Este intercambio de nutrientes puede ser de importancia crítica cuando la fertilidad del suelo y la disponibilidad de agua son bajas, condiciones que limitan seriamente la producción agrícola en la mayor parte del mundo (Smith and Read, 2008).

Otra asociación simbiótica conocida entre plantas y microorganismos del suelo es la simbiosis rizobiana. En contraste con la simbiosis micorrícica arbuscular, que está ampliamente extendida entre las plantas, la simbiosis rizobiana está restringida a las leguminosas, y en lugar de hongos, están implicadas bacterias fijadoras de nitrógeno denominadas colectivamente rizobios, que pertenecen a varios géneros que incluyen *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium* y *Sinorhizobium*. La simbiosis rizobiana da como resultado la formación de estructuras específicas, los nódulos, en las raíces del hospedante leguminoso. Los nódulos proporcionan un ambiente apropiado para los rizobios, permitiéndoles fijar el nitrógeno molecular y proporcionar nitrógeno combinado al hospedante leguminoso. La iniciación de la asociación rizobio-leguminosa depende de señales simbióticas que son producidas por ambos socios simbióticos. Las señales liberadas por la planta son generalmente flavonoides excretados en exudados radiculares. Estos flavonoides interactúan con los factores de transcripción rizobianos de la familia NodD, que activan la transcripción de los genes de nodulación (*nod*) implicados en la producción de las moléculas de señalización bacteriana denominadas factores Nod (Dénarié et al., 1996). Los factores Nod comparten una estructura básica común que consiste en una cadena principal de quitina de cuatro o cinco residuos de N-acetilglucosamina unidos en beta-1,4, N-acilados en el extremo no reductor con un grupo de ácido graso de longitud y grado de insaturación variables. Esta estructura básica puede estar además N-metilada en el extremo no reductor, y también puede estar O-sustituida en el extremo no reductor y/o en el extremo reductor. Esta variedad de sustituyentes proporciona una amplia diversidad de factores Nod con diferentes estructuras (para la descripción de diversas estructuras de factores Nod véase Dénarié et al., 1996, D'Haese et al., 2002). La especificidad dentro de la interacción leguminosa/rizobio (es decir, una especie dada de rizobios forma nódulos en ciertas especies de leguminosas) es el resultado de esta diversidad.

35 La disección genética de la vía implicada en la señalización de los factores Nod en las raíces de la leguminosa modelo *Medicago truncatula* ha identificado varios genes implicados en esta vía (Stacey et al., 2006). Existe la evidencia creciente de que los receptores de los factores Nod son quinasas similares a receptores con dominios extracelulares LysM que están unidos a azúcares, tales como los codificados por los genes *NFP* y *LYK3* de *M. truncatula*. La interacción de un factor Nod con su receptor induce una cascada de señalización aguas abajo, que incluye la afluencia rápida de iones calcio, alcanzando el máximo de calcio, y la expresión de genes de nodulina específicos. Estos episodios aguas abajo implican en particular genes que codifican proteínas implicadas en la señalización del calcio, tales como *DMI1*, *DMI2* y *DMI3* de *M. truncatula* que codifican respectivamente un canal catiónico, una quinasa tipo receptor de repetición rica en leucina y una proteína quinasa dependiente de Ca^{2+} /calmodulina y genes que codifican proteínas implicadas en el control de la expresión génica, tales como *NSP1* y *NSP2* que codifican factores de transcripción.

Aunque los hongos MA son extremadamente importante tanto agrícola como ecológicamente, los mecanismos celulares y moleculares que controlan la formación de la simbiosis micorrícica son mucho menos conocidos que los implicados en la simbiosis rizobiana.

50 Se ha demostrado en *M. truncatula* que los programas de nodulación y micorrícicos comparten al menos tres componentes (Catoira et al., 2000), específicamente los productos de los genes *DMI1*, *DMI2* y *DMI3* implicados en la señalización del calcio.

Sin embargo, los episodios que tienen lugar aguas arriba y aguas abajo de esta señalización del calcio todavía están mal caracterizados en el caso de la simbiosis micorrícica arbuscular, en particular los implicados en la señalización temprana y que conducen al reconocimiento entre la planta y los socios fúngicos. El estudio de estos episodios se ha visto obstaculizado por los hechos de que el socio fúngico es un simbiote obligatorio que no puede crecer en cultivo puro en ausencia de plantas vivas y por la ausencia de herramientas genéticas disponibles para este grupo de hongos (Harrison, 2005). Sin embargo, se ha demostrado recientemente que las señales difundibles son intercambiadas entre los simbiotes antes de la interacción física. Por parte de la planta, los compuestos de la familia de los apocarotenoides, las estrigolactonas, pueden ser secretados en exudados radiculares y estimular ramificaciones en las hifas de las esporas germinantes de hongos MA, señalando un cambio fisiológico al crecimiento fúngico pre-

simbiótico activo (Akiyama et al., 2005; Besserer et al., 2006). Por parte del hongo, también se ha documentado la existencia de compuestos difundibles producidos por hongos MA y capaces de activar las respuestas de las plantas asociadas al programa de endomicorrización (Kosuta et al., 2003; Weidmann et al., 2004; Navazio et al., 2007). Más específicamente, una serie de experimentos realizados con *M. truncatula* han demostrado recientemente que los hongos MA producen compuestos difundibles que son capaces de estimular la expresión de diversas respuestas de las plantas. Tres especies de *Gigaspora* y una especie de *Glomus* podrían desencadenar a través de una membrana de celofán la inducción de la expresión del gen simbiótico *MtENOD11* en raíces de plántulas (Kosuta et al., 2003). Tres patógenos fúngicos no provocaron la misma respuesta, apoyando la hipótesis de que la respuesta fue inducida por una molécula de señal específica de los hongos MA. De manera similar, se demostró que un hongo MA, *Glomus intraradices*, activaba a través de una membrana la transcripción de genes de plantas cuya expresión dependía del gen simbiótico *DMI3* (Weidmann et al., 2004). Además, se encontró que una señal difundible de hongos MA provocaba una elevación transitoria del calcio citosólico en cultivos de células de soja y la sobre-regulación de genes relacionados con *DMI1*, *DMI2* y *DMI3* (Navazio et al., 2007).

Olah et al., (2005) documentaron que los factores Nod de *Sinorhizobium meliloti*, el simbiote rizobiano de *M. truncatula*, eran capaces de estimular la micorrización y la formación de raíces laterales en *M. truncatula*. La estimulación de la formación de raíces laterales se observó también con factores difundibles de hongos micorrícicos arbusculares (factores Myc), pero no con factores Nod de especies rizobianas (*Sinorhizobium fredii* y *Rhizobium leguminosarum*), que no pueden nodular la *Medicago* sp. Dichos autores documentaron también que todos los genes de la vía de señalización de los factores Nod actualmente identificados, incluyendo en particular el gen *NFP* que codifica el supuesto receptor de los factores Nod, así como los genes *DMI3* y *NSP1*, eran requeridos para la estimulación de la formación de raíces laterales por los factores Nod, pero no por los factores Myc, que sólo requerían los genes *DMI1* y *DMI2*. Basándose en estas observaciones, estos autores propusieron un modelo que explicara la estimulación de la micorrización y la formación de raíces laterales en las leguminosas tanto por factores Myc como por factores Nod. De acuerdo con este modelo, los factores Myc y los factores Nod, que eran reconocidos por diferentes receptores de la superficie celular, activaban una vía de señalización común de *DMI1/DMI2/DMI3*; en el caso de los factores Myc, *DMI1* y *DMI2* eran suficientes para la estimulación de la formación de raíces laterales, mientras que *DMI3* era requerido para la estimulación de la micorrización. Olah et al., estudiaron también la posible naturaleza química de los factores Myc. Plantearon la hipótesis de que era poco probable que fueran compuestos similares a la auxina, puesto que su efecto sobre el desarrollo de las raíces era diferente del observado con estos compuestos. También sugirieron que su estructura debería ser diferente de la estructura de los factores Nod, ya que parecían ser discriminados por el receptor NFP.

Por consiguiente, parece que aunque se reconoce en la técnica la existencia de "factores Myc" difundibles producidos por hongos MA y capaces de activar respuestas de las plantas, hasta ahora no se ha identificado la naturaleza química de estos factores.

Los inventores han logrado ahora purificar los factores Myc a partir de exudados tanto de raíces micorrizadas como de esporas germinantes del hongo MA, *Glomus intradices*. Además, han determinado su estructura química y han demostrado que estimulan eficazmente el desarrollo del sistema radicular y la colonización de las raíces por un hongo MA.

Los factores Myc purificados por los inventores son una mezcla de lipo-quito-oligosacáridos (abreviadamente LCO por su expresión en inglés *Lipo-chito-oligosaccharides*) sulfatados y no sulfatados; comparten con los factores Nod una cadena principal de quitina básica común de residuos de N-acetilglucosamina unidos en beta-1,4, N-acilados en el extremo no reductor con un grupo de ácido graso. Sin embargo, los factores Myc tienen estructuras más sencillas que los factores Nod. La única O-sustitución que se observa en los factores Myc es la O-sulfatación en el extremo reductor de la molécula. No se pudieron detectar otras O-sustituciones, tales como O-carbamoilo en el extremo no reductor u O-fucosilo en el extremo reductor. La única N-sustitución en el residuo GlcNAc terminal no reductor para los factores Myc purificados a partir de *Glomus intradices* es la acilación por ácidos grasos comunes, principalmente ácidos oleico (C18:1) y palmítico (C16:0). En contraste, la N-sustitución de los factores Nod es más compleja. Con frecuencia es una sustitución doble por un grupo N-metilo y un grupo N-acilo (frecuentemente ácido vacénico), como en las cepas rizobianas que nodulan la mayoría de las leguminosas tropicales y las leguminosas de la subfamilia *Mimosoideae*. La N-metilación está especificada por el gen rizobiano *nodS* generalizado (Dénarié et al., 1996). Alternativamente, la N-acilación por un ácido graso poliinsaturado específico es la regla entre los rizobios que nodulan las leguminosas templadas del clado *Galegoïd* (Dénarié et al., 1996). De hecho, no se observaron los LCO que tuvieran una estructura tan simple como los factores Myc caracterizados por los inventores entre los factores Nod sintetizados por las diversas cepas rizobianas estudiadas hasta ahora (Dénarié et al., 1996, D'Haese et al., 2002).

La presente invención es definida por las reivindicaciones.

Los inventores proporcionan un procedimiento para obtener factores Myc a partir de un hongo del grupo Glomeromycota, en donde dicho procedimiento comprende obtener exudados de raíces de plantas micorrizadas con dicho hongo, o de esporas germinantes de dicho hongo, extraer dichos exudados con butanol y recuperar el extracto de butanol que contiene dichos lipo-quito-oligosacáridos.

De acuerdo con una realización preferida, dicho procedimiento comprende las etapas adicionales de someter dicho extracto de butanol a extracción en fase sólida (abreviadamente en lo sucesivo EFS) en una columna C18 de fase

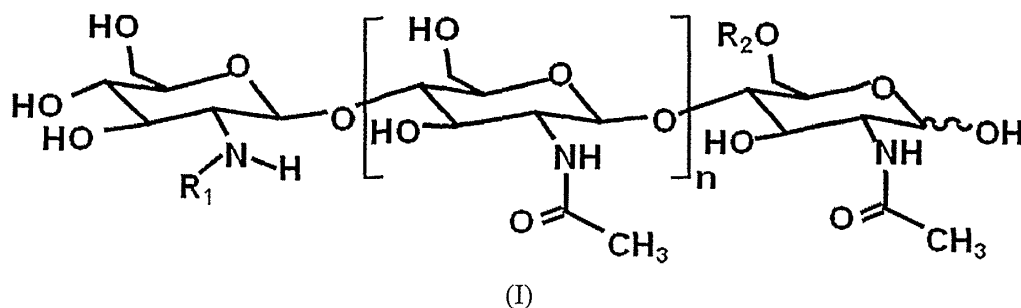
inversa, con lavados sucesivos con acetonitrilo al 20%, 50% y 100% y recuperar la fracción eluída con acetonitrilo al 50% que contiene dichos factores Myc.

Todavía más preferiblemente, dicho procedimiento comprende las etapas adicionales de someter dicha fracción eluída con acetonitrilo al 50% a cromatografía de líquidos de alta resolución en una columna C18 de fase inversa, usando un gradiente lineal de acetonitrilo al 20% a 100% y recuperar la fracción eluída con acetonitrilo al 30-48% que contiene lipo-quito-oligosacáridos sulfatados y/o la fracción eluída con acetonitrilo al 64-72% que contiene lipo-quito-oligosacáridos no sulfatados.

De acuerdo con una realización particular, dicho hongo del grupo Glomeromicota es *Glomus intraradices*.

Los factores Myc fúngicos pueden sin embargo ser extraídos también de otras especies de Glomeromicota que los producen, usando las etapas de extracción descritas anteriormente, o sus variantes.

Un "factor Myc" se define en la presente memoria como un lipo-quito-oligosacárido representado por la siguiente fórmula (I):



en donde $n = 0, 1, 2, 3, 4$ ó 5 , preferiblemente 2 ó 3 , R_1 representa un sustituyente lipídico, que contiene de 12 a 22 , preferiblemente de 14 a 20 átomos de carbono, que puede ser saturado o mono-, di-, tri-, tetra-, penta- o hexa-insaturado, y R_2 representa H o SO_3H .

El sustituyente lipídico R_1 es preferiblemente una cadena de ácido graso. R_1 puede representar también un análogo aromático de una cadena de ácido graso, como en los análogos de los factores Nod descritos por ejemplo por Grenouillat et al. (2004), o en el documento PCT WO/2005/063784.

Ventajosamente, R_1 representa una cadena de un ácido graso sintetizado por hongos micorrízicos arbusculares, en particular una cadena de ácido graso de $C16$ o $C18$, saturada o mono- o di-insaturada. Preferiblemente, cuando dicha cadena de ácido graso es insaturada, comprende al menos una insaturación cis (por ejemplo el ácido oleico $C18:1$). A modo de ejemplos no limitativos de cadenas de ácidos grasos preferidas, se pueden mencionar $C16:0$, $C18:0$, $C16:1\omega5$, $C16:1\omega7$, $C18:1\omega5$, $C18:1\omega7$, $C18:1\omega9$, $18:2\omega6,9$, $C20:0$ iso, $C20:1\omega9$ y $C20:4\omega6,9,12,15$.

Los factores Myc pueden caracterizarse adicionalmente y también diferenciarse de los lipo-quito-oligosacáridos de estructura relacionada, tales como los factores Nod, por sus propiedades biológicas. Estas propiedades biológicas se pueden analizar usando bioensayos apropiados. En particular, se pueden usar bioensayos basados en la capacidad de los factores Myc para estimular la formación de raíces laterales en la leguminosa modelo *M. truncatula*. Más específicamente, mientras que los factores Myc comparten con los factores Nod la capacidad de estimular la formación de raíces laterales en plantas de tipo silvestre pero no en los mutantes de simbiosis defectuosa *dmi1*, *dmi2* y *dmi3*, los factores Myc también son capaces, a diferencia de los factores Nod, de estimular la formación de raíces laterales en el mutante de simbiosis defectuosa *nsp1*.

Si se desea, también están disponibles bioensayos para diferenciar factores Myc no sulfatados de factores Myc sulfatados (por ejemplo, si se desea separar en un extracto fúngico, fracciones que contienen factores Myc no sulfatados de las que contienen factores Myc sulfatados): por ejemplo, los factores Myc sulfatados son capaces de inducir la expresión del gen *MtENOD11* en raíces en crecimiento de *M. truncatula*, mientras que los factores Myc no sulfatados son capaces de inducir la ramificación de los pelos radiculares en la algarroba.

Los factores Myc se pueden purificar a partir de hongos, como se ha descrito anteriormente. También se obtienen por síntesis química y/o se producen en células bacterianas modificadas genéticamente. Por ejemplo, una cadena principal de quito-oligosacárido, sulfatado o no, se puede sintetizar en bacterias recombinantes, como han descrito por ejemplo Samain et al. (1997, 1999) para la síntesis de precursores de factores Nod, y posteriormente acilar en el grupo amina libre de las bacterias no reductoras, como han descrito por ejemplo Samain et al. (1997, 1999) para la síntesis de precursores de factores Nod, y posteriormente acilar en el grupo amina libre del azúcar terminal no reductor, como han descrito, por ejemplo, Ohsten Rasmussen et al. (2004). También se puede utilizar una cepa mutante de una bacteria rizobícea que produzca factores Myc en lugar de factores Nod, por ejemplo una cepa genéticamente modificada con el fin de expresar, entre los genes estructurales de la vía biosintética de Nod, sólo los implicados en la síntesis de la cadena principal de los quito-oligosacáridos y los implicados en la N-acilación de la glucosamina terminal no reductora por un ácido graso $C16$ o $C18$ apropiado, y opcionalmente los implicados en la O-

sulfatación de la glucosamina terminal reductora, como han descrito por ejemplo Ardourel et al., (1994) o Lugtenberg et al., (1995).

Los inventores describen también mezclas de diferentes factores Myc de fórmula (I), y en particular mezclas de factores Myc sulfatados y no sulfatados, que comprenden uno o más lipo-quitto-oligosacáridos de fórmula (I) en la que R_2 representa H y uno o más lipo-quitto-oligosacáridos de fórmula (I) en la que R_2 representa SO_3H . Los lipo-quitto-oligosacáridos de dicha mezcla pueden diferir además entre sí en el número de residuos de N-acetilglucosamina y/o en la naturaleza del sustituyente R_1 (por ejemplo, la longitud y/o el grado de insaturación de la cadena de ácido graso).

Las mezclas de factores Myc de la invención se pueden obtener, por ejemplo, extrayendo factores Myc de hongos micorrícicos arbusculares, como se ha descrito anteriormente, y recuperando el extracto fúngico. También se pueden obtener produciendo por separado los diferentes factores Myc y mezclándolos.

Los lipo-quitto-oligosacáridos purificados o sintéticos y más específicamente los factores Myc purificados o sintéticos de fórmula (I), o sus mezclas, descritos en la presente memoria se pueden usar para estimular la micorrización y por tanto tienen una amplia gama de aplicaciones en agricultura, horticultura y silvicultura para la mayoría de las plantas cultivadas que pueden establecer micorrización, y por consiguiente poseen receptores de factores Myc.

Además de su uso para estimular la simbiosis micorrícica arbuscular, los factores Myc purificados o sintéticos o sus mezclas también se pueden usar:

- para estimular la germinación de semillas, que puede ser útil para el tratamiento de semillas con una amplia gama de aplicaciones en agricultura, horticultura y silvicultura;
- para estimular el desarrollo del sistema radicular, que es beneficioso para mejorar la nutrición con agua y minerales.

Dichos factores se pueden usar, por ejemplo, para tratar semillas, o ser añadidos a inoculantes que contienen hongos micorrícicos arbusculares, o ser añadidos al suelo o al sustrato de cultivo de la planta. Los factores Myc purificados o sintéticos de la invención se pueden utilizar con cualquier planta, principalmente con plantas que pueden establecer micorrización, incluyendo tanto leguminosas como plantas no leguminosas, e incluyendo tanto dicotiledóneas como monocotiledóneas, tales como cereales. Se pueden utilizar para plantas cultivadas bajo una cámara de cultivo, tanto en condiciones de invernadero como en el campo.

Dichos factores se pueden usar también para estimular la colonización micorrícica en la producción de inoculantes micorrícicos (es decir, esporas o hifas de hongos MA o fragmentos de raíces micorrizadas), como aditivo a los medios de cultivo que se utilizan para la producción de estos inoculantes por plantas cultivadas en suelo o en condiciones hidropónicas o aeropónicas, o por co-cultivo de hongos micorrícicos con raíces escindidas.

Los inventores describen también composiciones que contienen factores Myc purificados o sintéticos, o sus mezclas, y un vehículo adecuado en agricultura. Las composiciones de la invención pueden comprender también cepas mutantes de bacterias rizobiáceas modificadas genéticamente con el fin de producir factores Myc en lugar de factores Nod, como se ha descrito anteriormente. Las composiciones preferidas son las que contienen una mezcla de factores Myc sulfatados y no sulfatados.

Los factores Myc se pueden combinar opcionalmente con otros constituyentes activos, tales como flavonoides, apocarotenoides, tales como estrigolactonas o jasmonato, que son compuestos vegetales de los que se ha documentado que actúan como señales simbióticas (Harrison, 2005; Akiyama et al., 2005; Besserer et al., 2006).

La formulación de estas composiciones depende del modo de aplicación deseado (por ejemplo, recubriendo las semillas, añadiendo a un medio de cultivo para la producción de inoculantes micorrícicos, tratando la planta en el suelo). Dichas composiciones se pueden formular, por ejemplo, como sólidos dispersables en agua o solubles en agua, tales como polvos, gránulos, pelets o películas, en forma de soluciones, suspensiones o emulsiones acuosas líquidas, o como geles.

De acuerdo con una realización preferida, estas composiciones se asocian con material fúngico y/o vegetal, por ejemplo con un inoculante de un hongo micorrícico arbuscular, o con semillas de una planta capaz de establecer micorrización; ventajosamente, dichas semillas están recubiertas con la composición.

Ventajosamente, los factores Myc se usan en la composición a una concentración de 10^{-5} M a 10^{-12} M. Cuando se añaden a un medio de cultivo para la producción de esporas de hongos MA, se pueden usar a una concentración de 10^{-6} M a 10^{-10} M, preferiblemente a una concentración de 10^{-7} M a 10^{-9} M en el medio. Cuando se usan para el tratamiento de semillas o para estimular el desarrollo del sistema radicular, se pueden usar a una concentración de 10^{-6} M a 10^{-10} M, preferiblemente a una concentración de 10^{-7} M a 10^{-9} M. Cuando se usa una mezcla de factores Myc sulfatado y no sulfatados, se pueden usar concentraciones tan bajas como 10^{-8} M a 10^{-10} M.

La invención se entenderá más claramente con ayuda de la descripción adicional que se refiere a los ejemplos descritos más adelante y a los dibujos adjuntos. Sin embargo, se debe entender claramente que estos ejemplos y dibujos se proporcionan únicamente como ilustración del objeto de la invención y no constituyen en modo alguno una limitación de la misma.

Leyendas de los dibujos

Fig. 1. Ensayos biológicos utilizados para detectar señales simbióticas de hongos MA

a. El ensayo MtENOD11. Raíces de plántulas transgénicas Jemalong A17 de *M. truncatula* que llevan la construcción informadora *pMtENOD11-GUS*. Se detecta actividad de GUS por tinción histoquímica con ácido 5-bromo-4-cloro-3-indolil-b-glucurónico. (1) Raíces de control tratadas con acetonitrilo al 2,5%. (2) Fracción después de extracción en fase sólida (EFS) y elución con acetonitrilo al 50% diluido 40 veces. (3) La misma fracción con una dilución adicional de diez veces.

b. El ensayo VsHab. Pelos radiculares de la algarroba (*Vicia sativa* subsp. *nigra*) observados bajo microscopio óptico después de tinción con azul de metileno. (1) Los pelos radiculares tratados con una fracción inactiva están lineales. (2) Los pelos radiculares tratados con fracciones activas están claramente ramificados.

Fig. 2. Perfil de HPLC en fase inversa con C18 semipreparativa de extractos de exudados de raíces micorrizadas.

La fase isocrática inicial con acetonitrilo al 20% duró 10 minutos y fue seguida por un gradiente de acetonitrilo al 20-100% durante 20 minutos. El perfil revela la abundancia de material contaminante presente en los exudados de raíces micorrizadas. Las fracciones se recogieron cada dos minutos y se analizaron las actividades biológicas en MtENOD11 y VsHab. Las barras horizontales indican el tiempo de retención de los compuestos en la fracción A que son activos en MtENOD11, y de los compuestos en la fracción B, más hidrófobos, que son activos en VsHab.

Fig. 3. Perfil de HPLC en fase inversa con C18 semipreparativa de extractos de exudados de esporas germinantes.

Las condiciones cromatográficas son las mismas que en la Fig. 2. El perfil revela que los exudados de esporas contienen mucho menos material contaminante que los exudados de raíces micorrizadas. Las fracciones se recogieron cada dos minutos y se analizaron las actividades biológicas en MtENOD11 y VsHab. Las barras horizontales indican el tiempo de retención de los compuestos en la fracción A que son activos en MtENOD11, y los compuestos en la fracción B, más hidrófobos, que son activos en VsHab.

Fig. 4. Influencia de la hidrólisis metanólica suave sobre la actividad biológica de la fracción A.

Se ha documentado que la hidrólisis metanólica suave elimina el resto sulfato de los LCO sulfatados sin alterar otras características estructurales de estas moléculas. La fracción A recogida durante la cromatografía líquida de alta eficacia de alta presión (denominada en lo sucesivo HPLC por sus iniciales en inglés) semipreparativa de exudados de esporas germinantes (EEG) se hidrolizó suavemente y se analizaron las actividades biológicas en los ensayos MtENOD11 y VsHab. La actividad biológica está representada por barras verticales. Mientras que la fracción A no hidrolizada es activa en MtENOD11 e inactiva en VsHab, la fracción hidrolizada ha perdido actividad en MtENOD11 y ganado actividad en VsHab. Estos datos indican que la actividad biológica de la fracción A en el ensayo MtENOD11 es debida a la presencia de los LCO sulfatados.

Fig. 5. LCO sulfatados tetraméricos N-acilados por ácidos grasos C16.

Trazas por cromatografía líquida a ultra alta presión/espectrometría de masas (abreviadamente en lo sucesivo UPLC/MS por sus iniciales en inglés), en el modo negativo, de la fracción 4 aislada después de HPLC con C18 semipreparativa. Se dan las corrientes iónicas extraídas correspondientes a tetrámeros sulfatados y los espectros correspondientes. Esta figura indica que están efectivamente presentes en las muestras los compuestos que responden a m/z 1101,5, 1103,5 y 1105,5. Esta m/z corresponden a los LCO tetraméricos sulfatados N-acilados por C16:2, C16:1 y C16:0, respectivamente. En cuanto a las intensidades relativas de los tres, parece que 1105,5 (LCO-IV C16:0) es el más abundante, seguido por 1103,5 (LCO-IV C16:1).

Fig. 6. LCO sulfatados tetraméricos N-acilados por un ácido graso C18:1.

Trazas por UPLC/MS, en el modo negativo, de la fracción 5 aislada después de HPLC con C18 semipreparativa que muestra que el compuesto más abundante (m/z 1135,5) está N-acilado por un ácido graso C18:1.

Este perfil también indica que en esta fracción no está presente ningún LCO que lleve un ácido graso C18:0 (m/z 1133,5), ya que este ion es sólo el isótopo +2 del LCO que lleva la cadena C18:1. Como demuestra el segundo espectro de masas, el LCO C18 di-insaturado es un compuesto muy minoritario.

Fig. 7. LCO sulfatados pentaméricos N-acilados por ácido graso C18:1.

Este perfil muestra que también están presentes lipoquitopentámeros, pero en comparación con los tetrámeros correspondientes (véase la Fig. 5) son aproximadamente 30 veces menos abundantes. Se puede detectar el LCO-V C18:1.

Fig. 8. Comprobación de la presencia o ausencia de un compuesto dado.

Cuando la masa requerida no corresponde a iones presentes en la muestra, el perfil en lugar de dar un único pico da un gran número de picos de fondo. El perfil muy complejo obtenido con la corriente iónica de m/z 1332,6 demuestra la ausencia de un quitopentámero C18:2 en la muestra. Por el contrario, el pico único neto observado con la corriente iónica de m/z 1334,6 muestra claramente la presencia de un pentámero C18:1.

Fig. 9. Comparación del patrón de fragmentación por espectrometría de masas en tándem (abreviadamente MS/MS por sus iniciales en inglés) del factor Myc sulfatado principal y del factor Nod de *S. meliloti*

La demostración de la presencia de compuestos que tienen la masa adecuada en el tiempo de retención en HPLC esperado, no es suficiente para deducir su estructura. Por tanto, se realizó un análisis por MS/MS del compuesto Myc sulfatado principal. Esta figura presenta la comparación entre el factor Nod tetramérico sulfatado de *S. meliloti* N-acilado por C16:2 en el MS/MS en modo negativo y el registrado en el "factor Myc" tetramérico principal presente en la muestra. En ambos casos se detectan claramente los iones característicos del extremo reductor a m/z 503 (Y₂), 605 y 706 (Y₃) así como la pérdida neutra característica de 101 unidades de masa atómica (uma) (rotura intracíclica) a partir del ion molecular. El ajuste perfecto entre los dos patrones de fragmentación indica la afiliación estructural de las dos moléculas.

Fig. 10. Efecto de las fracciones del extracto de Myc sobre la formación de raíces laterales (FRL) en *M. truncatula*

(A) La señal del hongo MA que estimula la FRL es anfifílica.

Comparación del efecto de extractos acuoso (Aq), de butanol (BuOH) y de acetato de etilo (AE) de exudados de esporas germinantes (EEG24) sobre *M. truncatula* A17. El extracto de butanol estimula la FRL a partir del día 5 (significativa a P <0,05), mientras que los extractos acuoso y de acetato de acetilo no son activos.

(B) La estimulación de la FRL está mediada por la vía de señalización simbiótica DMI.

Comparación del efecto de los extractos de butanol del exudado de raíces micorrizadas (ERM-1), purificados adicionalmente por EFS eluido con acetonitrilo al 50%, sobre *M. truncatula* de tipo silvestre (A 17) y sobre un mutante *dmi1* (Y6). El extracto de Myc estimula la FRL en el tipo silvestre pero no en el mutante *dmi1*.

(C) Ambas fracciones A y B estimulan la FRL.

Las fracciones A y B se recogieron después de HPLC semipreparativa de exudados de raíces micorrizadas (ERM-1). La fracción ERM-1 A contenía LCO sulfatados y la fracción ERM-1 B contenía LCO no sulfatados. Ambas fracciones estimularon significativamente la FRL (P <0,05).

Fig. 11. Efecto de una mezcla de factores Myc sulfatados y no sulfatados sobre la micorrización de *Medicago truncatula*.

a. Micorrización en condiciones axénicas. Las plantas se cultivaron en tubos de ensayo en picos de flauta ge-lificados de medio M en donde los factores Myc se incorporaron a una concentración de 10⁻⁸ M. Se colocaron 50 esporas estériles (*Glomus intraradices*) cerca de las raíces de las plántulas. La extensión de la micorrización se midió contando el número de unidades de infección seis semanas después de la inoculación. Los resultados se analizaron por la prueba estadística de Kruskal-Wallis no paramétrica.

b. Micorrización en condiciones no estériles. Las plantas se cultivaron sobre un sustrato hecho de gránulos de arcilla carbonizada, inoculados con 50 esporas estériles de *G. intraradices*, añadiendo a la solución nutritiva factores Myc a una concentración de 10⁻⁸ M. Tres semanas después de la inoculación, se estimó la colonización de las raíces por el método de intersección con líneas de rejilla.

Fig. 12. Efecto de los factores Myc sobre la arquitectura radicular en *Medicago truncatula*.

a. Efecto sobre la formación de raíces laterales. Histograma que muestra el efecto de una mezcla de factores Myc tanto no sulfatados como sulfatados (NS + S), factores Myc sulfatados (S) y factores Myc no sulfatados (NS) a concentraciones de 10⁻⁸ M, 10⁻⁹ M y 10⁻¹⁰ M sobre la formación de raíces laterales de *M. truncatula* de tipo silvestre (A17), ocho días después del tratamiento. Se utilizaron 40 plantas por experimento y el análisis estadístico se realizó por la prueba t de Student entre las plantas de control y las tratadas.

b. Efecto sobre la longitud total de las raíces. Histograma que muestra el efecto de una mezcla de factores Myc sulfatados y no sulfatados sobre la longitud total de las raíces de plántulas. Se cultivaron plántulas durante ocho días, se cortaron las raíces y se escaneó y midió el sistema de raíces por el programa informático WinRhizo. Se analizaron los datos por la prueba de Kruskal-Wallis. (*) y (**) indican respectivamente una diferencia significativa (P <0,05) o altamente significativa (P <0,01) y las barras representan el error estándar de la media (abreviadamente SEM por la expresión inglesa *Standard Mean Error*).

Fig. 13. Análisis genético de la vía de señalización activada por el factor Myc que conduce a la estimulación de la formación de raíces laterales.

Histograma que muestra el efecto del factor Myc no sulfatado (10⁻⁸ M) sobre la formación de raíces laterales de *M. truncatula* de tipo silvestre (A17) y la vía de señalización simbiótica de los mutantes *dmi1*, *dmi2*, *dmi3* y *nsp1*. Los valores medios se representan como porcentaje del valor de control ocho días después del tratamiento.

Para cada genotipo, se reunieron los datos de al menos dos experimentos independientes con 40 plantas por experimento y se hicieron comparaciones estadísticas usando la prueba t de Student entre el control y cada tratamiento. (**) indica una diferencia altamente significativa (P <0,01) y las barras representan el error estándar de la media (SEM)

Fig. 14. Efecto de los factores Myc sobre la colonización micorrícica *in vitro* de raíces de zanahoria transformadas escindidas.

a. Efecto de una mezcla de factores Myc bacterianos sulfatados y no sulfatados. Las raíces se inocularon con esporas estériles de *G. intraradices* (10 esporas/mL de medio de cultivo) y se trataron una vez a la semana durante tres semanas con o sin una mezcla de factores Myc a 10^{-8} M. Después de seis semanas se observó la tasa de colonización micorrícica. (**) indica una diferencia altamente significativa con el control (prueba t de Student, valor P <0,01). Las barras verticales representan el error estándar de la media (SEM).

b. Efecto de una mezcla de factores Myc sintéticos sulfatados y no sulfatados. Las raíces se inocularon con esporas estériles de *G. intraradices* (100 esporas/mL de medio de cultivo) y se trataron una vez a la semana durante cuatro semanas con o sin una mezcla de factores Myc a 10^{-8} M. Después de ocho semanas se observó la tasa de colonización micorrícica. (*) indica una diferencia significativa con el control (prueba t de Student, valor P = 0,0119).

Fig. 15. Efecto de los factores Myc sobre la micorrización de *Tagetes patula*.

a. Efecto de una mezcla de factores Myc sulfatados y no sulfatados sobre el número de unidades de infección por planta (a1), la longitud de las raíces (a2) y la densidad de infección (a3). Las plantas se inocularon con aproximadamente 100 esporas estériles de *Glomus intraradices* y se trataron dos veces a la semana durante tres semanas con o sin factores Myc a 10^{-8} M. Después de cuatro semanas se determinaron el número de unidades de infección, la longitud de las raíces y la densidad de las unidades de infección. (**) indica una diferencia altamente significativa con el control (prueba t de Student, valor P = 0,004086).

b. Efecto de los factores Myc sulfatados (S), no sulfatados (NS) o una mezcla tanto de no sulfatados como de sulfatados (NS + S) sobre la colonización de raíces micorrícicas. Las plantas se inocularon con aproximadamente 100 esporas estériles de *G. intraradices* y se trataron dos veces a la semana durante tres semanas con o sin factores Myc a 10^{-8} M. Después de cuatro semanas se midió la tasa de colonización.

Fig. 16. Efecto de los factores Myc sobre la germinación de semillas de tomate.

a. Efecto de los factores Myc no sulfatados (NS), sulfatados (S) y una mezcla tanto de no sulfatados como de sulfatados (NS + S) sobre la germinación de semillas de tomate a 14°C. Los factores Myc se añadieron a placas de germinación a 10^{-8} M, 10^{-9} M y 10^{-10} M. Todos los días se puntuó la tasa de germinación. Los resultados se analizaron con la prueba de Kruskal-Wallis. (***) y (**) indican respectivamente una diferencia muy altamente significativa (valor P <0,001) y altamente significativa (P <0,01) con el control, y las barras verticales representan el error estándar de la media (SEM).

b. Efecto de una mezcla de factores Myc sulfatados y no sulfatados sobre la germinación de semillas a 14°C

b1. Cinética de la germinación. Se añadieron factores Myc a 10^{-10} M. Los resultados se analizaron con la prueba de Kruskal-Wallis no paramétrica. Después del día 6, las diferencias eran altamente significativas. Las barras verticales representan el error estándar de la media (SEM).

b2. Fotografía de placas representativas de la germinación con y sin factores Myc diez días después de la siembra.

Materiales y métodos

Fuentes naturales de factores Myc

El hongo MA de la cepa DAOM 197198 de *Glomus intraradices*, que se ha mantenido en co-cultivo con raíces escindidas durante muchos años (Chabot et al., 1992), está bien caracterizado y su genoma está siendo secuenciado. Esta cepa es utilizada por la empresa PREMIER TECH para la preparación industrial de inoculantes comerciales y para la producción de esporas purificadas con fines de investigación. Por ejemplo, estas esporas purificadas se utilizaron como fuente de DNA para el proyecto de secuenciación del genoma de *G. intraradices*. Los inventores utilizamos dos tipos de exudados, ambos preparados a partir de materiales adquiridos a PREMIER TECH BIOTECHNOLOGIES (Rivière-du-Loup, Québec, Canadá):

(i) Exudados de raíces micorrizadas (ERM). La producción de micorrizas se logró cultivando conjuntamente *G. intraradices* con raíces de zanahoria transformadas y escindidas. El medio de cultivo se solidificó con Phytigel. Después de un cultivo apropiado de las raíces micorrizadas, el gel se licuó añadiendo citrato de sodio como agente quelante y el ERM líquido se acondicionó en recipientes de 4 litros donde se conservó a 4°C.

(ii) Exudados de esporas germinantes (EEG). Las esporas estériles purificadas del hongo MA de *Glomus intraradices* se acondicionaron en frascos que contenían aproximadamente un millón de esporas. Los frascos se conservaron a 4°C. Las esporas germinaron a 30°C en una incubadora con CO₂ al 2% durante 10 días.

Bioensayos utilizados para la purificación de los factores Myc

Para detectar la presencia de señales simbióticas de hongos MA durante las diversas etapas de extracción y purificación, se utilizaron tres bioensayos. (i) Se demostró que la construcción *M. truncatula* ENOD11::GUS era inducida durante la formación de micorrizas y por un compuesto difundible de diversos hongos MA (Journet et al., 2001;

Kosuta et al., 2003) (= ensayo MtENOD11). (ii) Se demostró que la formación de raíces laterales en *M. truncatula* era estimulada por un compuesto difundible de diversos hongos MA y la respuesta requería la vía de señalización simbiótica DMI (Olah et al., 2005) (= ensayo MtLRF). (iii) Además, se utilizó un ensayo modificado de ramificación de pelos radiculares de *Vicia sativa* (algarroba) que permite la detección de varios LCO no sulfatados (= ensayo VsHab).

(i) *Inducción del gen MtENOD11 simbiótico en Medicago truncatula transgénica.*

Los inventores hemos demostrado anteriormente, por experimentos en los que el hongo MA se separó de la raíz de la planta por una membrana de celofán, que un compuesto del hongo MA difundible puede inducir la expresión de un transgen promotor *MtENOD11-gusA* en raíces laterales en crecimiento de *M. truncatula* (Kosuta et al., 2003). El protocolo utilizado fue como se ha descrito anteriormente (Andriakaja et al., 2007) con las siguientes modificaciones: no se insertó ningún disco de papel en la parte superior de la placa de agar-agar y el tratamiento se realizó por adición de 40 microlitros por plántula. Para comprobar si la respuesta a *ENOD11* fue inducida por la vía de señalización DMI, comparamos la respuesta observada en la línea A17 de tipo silvestre de *M. truncatula* y en una línea mutante que llevaba una mutación en el gen *DMI1* (mutación Y6).

(ii) *Ramificación de pelos radiculares de algarroba*

La algarroba (*Vicia sativa* subsp. *nigra*) es una pequeña leguminosa de siembra que es adecuada para la observación al microscopio de las deformaciones de los pelos radiculares. Las deformaciones de los pelos radiculares de la algarroba son provocadas no sólo por los factores Nod del simbionte bacteriano específico *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* sino también por una variedad de factores Nod no sulfatados (Roche et al., 1991, Price et al., 1992).

Este ensayo es, por tanto, apropiado para detectar la presencia de los LCO no sulfatados. En documentos anteriores, el ensayo se realizó en un medio líquido. Los inventores hemos ideado un ensayo sobre placa de agar-agar que es más sensible y reproducible. Las semillas se esterilizaron primero en ácido sulfúrico durante 20 minutos, se lavaron dos veces con agua estéril y luego se trataron durante 20 minutos con hipoclorito de calcio (5 g/150 mL después de filtración por papel) y se lavaron cinco veces con agua estéril. Las semillas se dejaron en agua durante una noche a 4°C, se transfirieron a placas blandas de agar-agar y se incubaron tres días a 4°C para aumentar la homogeneidad de la germinación. Las placas se dejaron entonces durante 36 horas a 22°C en la oscuridad para su germinación. Se sembraron cinco plántulas jóvenes (longitud de la raíz de aproximadamente 1 cm) en una placa de Petri, sobre placas de agar-agar de Fahraeus, rodeadas de parafilm, y se dejaron durante tres días, en posición vertical, en una cámara de cultivo a 22°C. Cuando las raíces se volvieron peludas, se depositaron suavemente 40 microlitros de la disolución de ensayo a lo largo de las raíces, y las plántulas se cultivaron durante 30 horas a 22°C. Para la observación de la ramificación de los pelos radiculares, se seccionaron las raíces, se insertaron entre un portaobjetos y un cubreobjetos en una solución al 0,02% de azul de metileno y se observaron bajo un microscopio óptico. Se observaron diez plantas por tratamiento.

Ensayos de micorrización

Las fuentes del inóculo del hongo MA para experimentos de micorrización fueron esporas estériles de *Glomus intraradices*, adquiridas a Premier Tech Biotechnologies Ltée (Rivière-du-loup, Québec, Canadá) o producidas en raíces de zanahoria transformadas y escindidas como ha sido descrito por Bécard y Fortin (1988). Las raíces de zanahoria transformadas micorrizadas se cultivaron como ha sido descrito por Chabot et al. (1992) y se subcultivaron cada diez semanas en medio M (Bécard y Fortin, 1988) gelificado con Phytigel (Sigma) al 0,4%. Después de solubilización en Phytigel con tampón de citrato (Doner y Bécard, 1991), se recogieron las esporas como se ha descrito en condiciones estériles y se conservaron a 4°C en agua ultrapura durante al menos cuatro semanas antes de su uso.

Los ensayos de micorrización se realizaron en tres especies de plantas, el modelo de planta leguminosa *M. truncatula* y dos plantas no leguminosas, zanahoria (*Daucus carota*, familia Úmbelíferas) y damasquina (*Tagetes patula*, familia Asteraceas).

Los factores Myc se disolvieron en agua/acetonitrilo (50/50) para preparar una disolución madre 10^{-3} M, que después se diluyó hasta la concentración apropiada con agua o medio de cultivo. A las placas de control se añadió la misma cantidad de trazas del disolvente acetonitrilo.

Micorrización in vitro de raíces de zanahoria transformadas y escindidas

Se cultivaron raíces de zanahoria transformadas, escindidas y estériles en medio M solidificado con Phytigel al 0,4%, a 24°C en la oscuridad, y se subcultivaron cada diez semanas (Chabot et al., 1992). Las raíces se recogieron por solubilización del Phytigel con tampón de citrato (Doner y Bécard, 1991) y se lavaron con agua desionizada estéril. Las placas para el ensayo de micorrización se prepararon como sigue: en placas Petri (Ø 90 mm) se vertió una primera capa de 20 mL de medio M que contenía Phytigel al 0,3% y se dejó solidificar. Después se vertió una segunda capa del mismo medio que contenía 20 o 200 esporas/mL y factores Myc a la concentración apropiada. En placas de control, la solución de los factores Myc se reemplazó por el mismo volumen del medio utilizado para preparar la solución de los factores Myc. Se colocaron fragmentos de raíces sobre la superficie del medio con aproximadamente la misma cantidad (número de fragmentos y longitud de las raíces) en las diferentes placas. Las placas se cerraron con cinta de parafilm y se incubaron en la oscuridad, en una sala de cultivo a 24°C y 50% de humedad,

durante seis u ocho semanas. Los factores Myc se añadieron una vez a la semana sobre la superficie de la placa durante las tres o cuatro primeras semanas para experimentos de seis u ocho semanas respectivamente. Para observar la colonización fúngica, se recogieron las raíces después de licuefacción del Phytigel por tampón de citrato, lavado y teñido por el método de tinta-vinagre (Vierheilig et al., 1988). La tasa de colonización se estimó por el método de intersección con líneas de rejilla (Giovannetti and Mosse, 1980).

Micorrización in vivo de Tagetes patula

Las semillas de *Tagetes patula*, var. Légion d'honneur, se obtuvieron de Caillard (84091 Avignon, Francia). Las plántulas se cultivaron cuatro semanas en tubos Falcon de 50 mL rellenos con un sustrato hecho de arcilla lavada y esterilizada en autoclave (montmorillonita granular carbonizada; ref. "Oil Dry US Special", Brenntag Bretagne, ZI de Tory, BP41, Avenue des Ferrancins, 71210 Montchanin). Para asegurar el riego de las plántulas, los tubos se perforaron con tres pequeños agujeros en la parte inferior y se colocaron individualmente en cajas de plástico de 120 mL (5,5 cm de diámetro/7 cm de altura), se cerraron con una tapa opaca perforada para recibir y fijar los tubos Falcon.

Las cajas se llenaron con 80 mL de agua y se envolvieron con papel de aluminio. El sustrato de arcilla de los tubos Falcon se hidrató con 20 mL de solución baja en fosfato Long Ashton (Hewitt et al., 1966). En cada tubo se colocó una semilla debajo de la superficie del sustrato y se dejó caer un centenar de esporas de hongos alrededor de la semilla, en 1 mL de factor Myc 10^{-7} M o solución de control. Cada planta recibió 1 mL de factor Myc 10^{-7} M, o 1 mL de solución de control, dos veces a la semana durante tres semanas. Los tiestos se colocaron en una cámara de cultivo, a 25°C, con un fotoperiodo de 16 horas y una intensidad de luz de 180 μ Einstein. $m^{-2}.s^{-1}$.

Se realizaron dos series de experimentos. En el primero, se analizó una mezcla de factores Myc sintéticos sulfatados y no sulfatados con 12 plántulas por tratamiento. En el segundo, se analizaron factores sulfatados, no sulfatados y una mezcla de ambos con 20 plántulas por tratamiento. Las plantas se recolectaron después de 4 semanas. El sistema radicular interior se tiñó con tinta negra Schaeffer (Vierheilig et al, 1998). La cuantificación de la colonización de las raíces por el hongo se realizó con una lupa binocular y se utilizaron dos métodos: (i) para el primer experimento, se contó para cada planta el número de unidades de infección (zonas que contienen arbusculos, vesículas y retículos de hifas internos), y (ii) para el segundo, se determinó el porcentaje de longitud de raíces colonizado por el hongo, es decir, que muestran arbusculos, vesículas o ambos, por el método de intersección con líneas de rejilla (Giovannetti et al, 1980).

Micorrización de Medicago truncatula en condiciones axénicas

Las plantas se cultivaron en tubos de ensayo en picos de flauta de 20 mL de medio MM gelificado (Olàh et al., 2005) como han descrito Ben Amor et al. (2003). Los factores Myc a la concentración de 10^{-8} M (o solución de control) se incorporaron directamente en el medio estéril. Cincuenta esporas estériles de *G. intraradices* se colocaron en la parte inferior de cada pico de flauta cerca de la raíz de la plántula. Los tubos de ensayo se colocaron en una cámara de cultivo a 25°C con un fotoperiodo de 16 horas y una intensidad de luz de 366 μ Einstein. $m^{-2}.s^{-1}$. Después de seis semanas, la arquitectura del sistema radicular fue analizada por el programa informático Winrhizo Scientific (Instruments Regent Inc, 2672 Chemin Ste Foy RD, Sainte Foy, Québec, Canadá). La cuantificación de la colonización radicular se realizó por recuento directo de las unidades de infección bajo una lupa binocular, después de la tinción de las raíces con el método de tinta-vinagre (Vierheilig et al, 1998).

Micorrización de Medicago truncatula sobre un sustrato de arcilla carbonizada

Las plántulas germinadas se cultivaron durante tres semanas en tubos Falcon de 50 mL como se ha descrito anteriormente para la micorrización de *Tagetes*. Se dejaron caer veinte esporas de *G. intraradices* alrededor de las raíces de las plántulas, en 1 mL de factor Myc 10^{-7} M o solución de control. A continuación, cada planta recibió 1 mL de factor Myc 10^{-7} M, o 1 mL de solución de control, dos veces a la semana durante dos semanas. Se realizaron dos series de experimentos con 12 plántulas por tratamiento. Los tiestos se colocaron en una cámara de cultivo, a 25°C, con un fotoperiodo de 16 horas y una intensidad de luz de 366 μ Einstein. $m^{-2}.s^{-1}$.

Las plantas se recolectaron después de 3 semanas. El sistema radicular interior se tiñó con tinta negra Schaeffer (Vierheilig et al., 1998). El porcentaje de longitud de la raíz colonizada por el hongo, es decir, que muestra arbusculos, vesículas o ambos, se determinó por el método de intersección con líneas de rejilla (Giovannetti et al., 1980).

Bioensayos utilizados para analizar la actividad de desarrollo de los factores Myc

Se idearon bioensayos para estudiar la actividad de desarrollo de los factores Myc purificados o sintéticos.

(i) Estimulación del desarrollo del sistema radicular en la leguminosa modelo M. truncatula.

Los inventores hemos demostrado previamente que un factor difundible de hongos MA estimula la formación de raíces laterales (FRL) en *M. truncatula* por la vía de DMI (Olah et al., 2005). Los inventores hemos utilizado este bioensayo para analizar la actividad de desarrollo de los factores Myc purificados. El protocolo utilizado fue como se ha descrito anteriormente, excepto que no se añadieron vitaminas al medio M.

Se realizó en *M. truncatula* la identificación de los genes de plantas implicados en la señalización de los factores Myc, utilizando el análisis genético de la respuesta de FRL ya descrito (Olah et al., 2005). Las respuestas de FRL a

los factores Myc se estudiaron en la línea Jemalong A17 de tipo silvestre de *M. truncatula*, como un control, y en los mutantes defectuosos de simbiosis *dmi1* (Y6), *dmi2* (TR25), *dmi3* (TRV25) y *nsp1* (B85).

(ii) *Germinación de semillas de tomate*

5 Las semillas de tomate variedad Heinz 1706 procedían de la colección Core de semillas de tomate de INRA. Fueron amablemente proporcionadas por René Damidaux del laboratorio "Génétique et Amélioration des Fruits et Légumes" del INRA 84143 Montfavet cedex (Francia). A partir de esta muestra de la colección Core, las semillas se multiplicaron en LIPM (INRA-CNRS, Toulouse). Las semillas se conservaron a 4°C. Las semillas se esterilizaron durante 45 minutos en una solución filtrada de hipoclorito de calcio 0,262 M (2,5 g de CaOCl₂ en 75 mL de agua), a la que se habían añadido dos gotas de Tween 20. Se retiró la solución de hipoclorito y las semillas se lavaron tres veces con agua destilada estéril. Se prepararon placas de agar-agar de germinación disolviendo 9,375 g de Difco Agar Granulated (Becton-Dickinson) en un litro de agua destilada. Se preparó una solución de factor Myc 10⁻³ M en agua/acetónitrilo 50/50, y después se diluyó con agua hasta las diluciones apropiadas. A las placas de control se añadió la misma cantidad de trazas del disolvente acetónitrilo. Se sembraron 15 semillas por placa, con seis u ocho repeticiones por tratamiento. Las placas se incubaron en la oscuridad a 14°C, 20°C y 28°C. Todos los días se puntuó la tasa de germinación.

Análisis estadístico de los datos.

Los datos de los ensayos biológicos se analizaron estadísticamente con la prueba t de Student o el análisis de varianza para datos que siguen una distribución normal y que tienen varianzas homogéneas, y las pruebas no paramétricas de Kruskal-Wallis o Wilcoxon para distribuciones no normales. El programa informático estadístico era del sistema R (R Development Core Team, 2009).

Análisis bioquímico

Extracción líquido/líquido para exudados de raíces micorrizadas:

En un matraz redondo de dos litros se extrajeron 1,6 litros de exudados de raíces micorrizadas una primera vez con 400 mL (1/4 del volumen) de butanol (1-butanol o 2-metil-1-propanol) y la mezcla se dejó decantar hasta obtener una fase transparente de butanol con una interfase delgada, que permite una buena separación de las fases acuosas y de butanol (al menos seis horas). La fase acuosa se extrajo luego una segunda vez con 350 mL (aproximadamente 1/5 del volumen) de butanol y se dejó reposar durante una noche. Después de esta segunda extracción, la fase total de butanol (extracción 1 y extracción 2) se evaporó hasta un volumen de aproximadamente 0,5 litros, que se lavó por una extracción líquido/líquido con el mismo volumen de agua bidestilada. La fase de butanol lavada se evaporó, se transfirió a un pequeño matraz de fondo redondo y se secó usando un evaporador rotatorio. El extracto seco se redisolvió luego en 5 mL de agua/acetónitrilo (1/1) y se filtró sobre algodón (lavado preliminarmente con cloroformo) en un tubo de vidrio de 8 mL y luego se secó bajo una corriente de nitrógeno.

Extracción líquido/líquido para exudados de esporas germinantes:

Los exudados de un millón de esporas germinantes (aproximadamente 150 mL) se extrajeron primeramente con 1/3 del volumen de acetato de etilo. La mezcla se dejó decantar para obtener una interfase delgada y una buena separación de las fases acuosa y de acetato de etilo (al menos seis horas). La fase acuosa se extrajo una segunda vez con 1/3 del volumen de acetato de etilo durante una noche. La fase acuosa se extrajo luego con butanol (1-butanol o 2-metil-1-propanol) siguiendo las mismas etapas que para la extracción con acetato de etilo. Los volúmenes de las fases de butanol y de acetato de etilo se redujeron hasta unos cuantos mL usando un evaporador rotario. Cada fase se transfirió a un tubo de 5 mL y se secó bajo una corriente de nitrógeno.

Purificación por extracción en fase sólida (EFS):

Preparación de la columna: El sistema de EFS estaba constituido por una columna de vidrio Chromabond de 3 mL rellena con fase inversa C18 (SUPELCO Discovery DSC-18). Se introdujo un primer filtro de fibra de vidrio en el fondo de la columna. La fase sólida se añadió a la columna hasta representar una altura de 3,5 cm en la columna. Un segundo filtro de fibra de vidrio se colocó en la parte superior de la fase sólida y se empujó para comprimir la fase sólida. Antes de su uso la columna se lavó con acetónitrilo (ACN) y con agua, y luego se acondicionó con acetónitrilo (ACN) al 20% en agua.

Pre-filtración: El extracto se disolvió en 1 mL de ACN al 20%. El extracto se filtró por algodón en una pipeta Pasteur (preliminarmente lavada con cloroformo) y se depositó en la columna C18. El tubo y los filtros se lavaron con 1,5 mL of ACN al 20%.

Cromatografía: Usando una jeringa, el extracto se inyectó a través de la fase C18. El líquido saliente de la columna se recogió en un tubo de vidrio de 8 mL. Para deshacerse de los compuestos no adsorbidos, la fase se lavó abundantemente (equivalente a 5 veces el volumen de la fase sólida con ACN al 20% en agua). Este volumen se recuperó en el mismo tubo. Luego las moléculas retenidas en la columna se eluyeron con una solución al 50% de ACN en agua. El volumen de elución que es equivalente a 5 veces el volumen de la fase sólida se recuperó en un segundo tubo de vidrio. Finalmente las moléculas fuertemente adsorbidas se eluyeron de la columna con ACN al 100%. El volumen de disolvente (aproximadamente 6 mL) se recuperó en un tercer tubo. Las tres soluciones (20%, 50% y

100% de ACN) se evaporaron bajo corriente de nitrógeno, con el fin obtener los residuos secos. Cada residuo podría a disolverse luego en el volumen apropiado para realizar la HPLC semipreparativa. Se usó una columna de EFS para purificar aproximadamente 5 litros de exudados de raíces micorrizadas.

HPLC semipreparativa:

5 La purificación se realizó en un módulo de separación de cromatografía de líquidos de alto rendimiento Shimadzu LC10 (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japón) con una columna de fase inversa C18 semipreparativa (8 mm x 250 mm; 5 μ m, Equisorb, CIL-Cluzeau). El circuito de inyección tenía un volumen de 100 microlitros. El método cromatográfico fue el siguiente: durante 10 minutos en modo isocrático con el disolvente A (acetonitrilo al 20% en agua), seguido por un gradiente lineal durante 20 minutos desde disolvente A hasta disolvente B (acetonitrilo al 100%) y otra etapa isocrática con acetonitrilo al 100% durante 5 minutos. Son necesarios dos minutos para volver a las condiciones iniciales (ACN al 20%). El caudal fue 2 mL \cdot min⁻¹ y se monitorizó la absorción de UV a 206 nm. La recogida de muestras a lo largo del gradiente se hizo cada minuto (2 mL) dando como resultado 14 fracciones.

HPLC analítica suplementaria para la detección de los LCO no sulfatados.

15 La purificación se realizó en un módulo de separación de cromatografía de líquidos de alto rendimiento (Shimadzu LC10 (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japón) con una columna de fase C8 (Zorbax XDB-C8 HP-Eclipse (Hewlett Packard) 5 μ m, 4,6 x 150 mm) durante 5 minutos en modo isocrático con metanol al 30% en agua como disolvente, seguido por un gradiente lineal durante 20 minutos hasta metanol al 100% como disolvente, seguido por otra etapa isocrática con metanol al 100% durante 5 minutos. Fueron necesarios 2 minutos para volver a las condiciones iniciales. El caudal fue 1 mL \cdot min⁻¹ y se monitorizó la absorción de UV a 206 nm. La recogida de muestras ocurrió a lo largo del gradiente y la etapa isocrática con metanol al 100% cada minuto (aproximadamente 1 mL) desde 15 a 23 minutos que produjo 8 fracciones.

Análisis por cromatografía líquida a ultra alta presión acoplada a espectrometría de masas de tiempo de vuelo (UPLC-ToF-MS)

25 Cada fracción recogida de la HPLC semipreparativa se sometió a análisis por UPLC-MS en un UPLC Acquity acoplado a un espectrómetro de masas Q-ToF Premier (Waters Corporation). La columna de UPLC era una columna Acquity (2,1 mm x 10 cm, 1,7 μ m) (Waters, EE.UU.) y el caudal era 0,45 mL/min. Para los compuestos más hidrófilos (fracciones 1 a 9 de la HPLC semipreparativa) el programa fue un gradiente lineal que variaba desde ACN al 10% (en ácido acético al 1%/agua) hasta ACN al 100% en 7 minutos, seguido por una etapa isocrática con ACN al 100% durante 2 minutos y luego una vuelta a las condiciones iniciales (2 minutos) y finalmente una etapa de reacondicionamiento de 1 minuto con ACN al 10% (en ácido acético al 1%/agua). Para obtener una mejor resolución de los compuestos más hidrófobos (fracciones 6 a 11 de la HPLC semipreparativa) el gradiente de la UPLC fue más ampliado: gradiente lineal partiendo de ACN al 25% en ácido acético al 0,1%/agua y alcanzando ACN al 100% en 7 minutos. Para el espectrómetro de masas, el capilar se ajustó a 3,2 kV y el cono a 10 V. Se realizó un método de bloqueo de masa interno (*internal lock mass*) por introducción continua en la fuente de una solución de leucina-encefalina. El espectrómetro se calibró antes de cada experimento. Se analizaron los compuestos más hidrófilos (fracciones 1 a 9 de la HPLC semipreparativa) tanto en el modo negativo como positivo para facilitar respectivamente la detección de los compuestos aniónicos (sulfatados) y catiónicos (no sulfatados).

Para la fragmentación de las moléculas, se seleccionaron iones específicos y se sometieron a análisis por MS/MS usando una energía de colisión de 15 V.

40 Hidrólisis suave:

Este método se usa para eliminar el resto de sulfato de los LCO sulfatados sin afectar al resto de las moléculas (Roche et al., 1991b). La fracción A, que eluye entre 15 y 16 minutos en HPLC semipreparativa se transfirió a un vial de vidrio con rosca y se secó bajo corriente de nitrógeno. Se redisolvió dos veces en metanol anhidro y se secó de nuevo para eliminar el agua residual. Se añadieron a la muestra seca 250 μ L de HCl 0,05 M en metanol. La reacción se llevó a cabo durante una noche a temperatura ambiente. La muestra se secó de nuevo bajo corriente de nitrógeno y se lavó dos veces con metanol anhidro para eliminar todo el ácido.

Producción de cantidades en miligramos de factores Myc

50 La purificación los factores Myc de exudados de esporas germinantes de *Glomus intraradices* y de raíces micorrizadas da como resultado rendimientos extremadamente bajos. Se han usado dos estrategias para producir grandes cantidades de estas moléculas, haciendo uso de ingeniería genética bacteriana.

(i) Producción de factores Myc por mutantes de *Rizobios*.

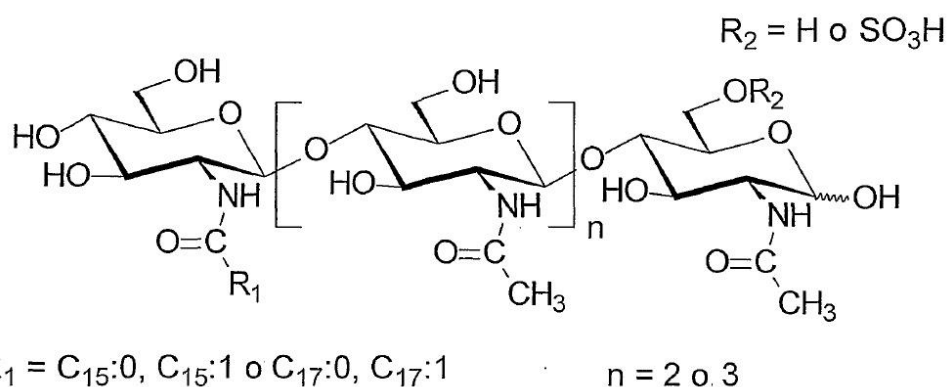
Los rizobios producen factores Nod que son LCO sustituidos que comparten algunas similitudes estructurales con los factores Myc. La principal diferencia es que los factores Myc son LCO muy sencillos con un número muy limitado de sustituciones, esencialmente restringidas a una posible O-sulfatación del residuo reductor N-acetil-glucosamina. Nuestra estrategia fue usar mutantes rizobianos alterados en los genes que codifican las enzimas responsables de las sustituciones de los precursores de los factores Nod y por tanto segregan LCO muy sencillos similares a los factores Myc. Los inventores elegimos usar cepas mutantes derivadas de especies rizobianas que producen una mayo-

ría de LCO tetraméricos y una minoría (aproximadamente 10%) de LCO pentaméricos, como en el caso de los factores Myc fúngicos.

Para la producción de los factores Myc sulfatados los inventores usamos un mutante doble de *Sinorhizobium meliloti nodFEnodL*. La mutación *nodL* suprime la O-acetilación residuo terminal no reductor GlucNAc, y la mutación *nodFE* bloquea la síntesis del ácido graso 16:2 insaturado, dando como resultado la N-acilación con ácidos grasos C18:1 (vacénico) o C16:0 (palmítico) (Ardourel *et al.*, 1994). Para aumentar la producción de los LCO, se introdujo en la cepa mutante un plásmido multicopia (pMH682) que lleva genes *nod* reguladores. La cepa superproductora resultante, GMI 6629, se cultivó en un medio de cultivo líquido que contenía 5 µg/mL de tetraciclina para mantener la presencia del plásmido pMH682 y luteolina (10 µM) como agente inductor del gen *nod* (Ardourel *et al.*, 1994). Cuando el cultivo bacteriano alcanzó una densidad celular de aproximadamente 10⁹ células por mL, se extrajeron los factores Nod por extracción líquido/líquido con butanol y acetato de etilo (Roche *et al.*, 1991). Los LCO se purificaron luego por HPLC en una columna de fase inversa C18 como se ha descrito previamente (Demont *et al.*, 1993), con la modificación del gradiente agua-acetonitrilo siguiente: una fase isocrática de 10 minutos con acetonitrilo al 20% fue seguida por un gradiente lineal que va de acetonitrilo al 20 a 65% durante 30 minutos a un caudal de 2 mL/min. Los picos que contenían los LCO sulfatados se recogieron entre acetonitrilo al 32 y 35%, y se analizaron por espectrometría de masas. Una mayoría de los LCO era tetraméricos y una minoría pentamérica, como en el caso de los factores Myc. Los LCO estaban O-sulfatados en el extremo reductor y N-acilados con los ácidos grasos C18:1 y C16:0 en el extremo no reductor. No pudieron detectar sustituciones O-acetilo.

Para la producción de los factores Myc no sulfatados se usó la cepa LPR5045 (pMP247). Es una derivada de la cepa RCR5 de *R. leguminosarum* bv. *trifolii*, curada del plásmido Sym, en la cual se introdujo un plásmido multicopia que contenía los genes comunes *nodABCIJ* (= pMP247) (Lugtenberg *et al.*, 1995). Esta cepa superproductora se cultivó en un medio de cultivo B con 5 µg/mL de tetraciclina para mantener el plásmido pMP247 y naringenina 10 µM como agente inductor del gen *nod* (Spaink *et al.*, 1994). Los LCO se extrajeron del medio de cultivo como se ha descrito antes. La purificación por HPLC se realizó con la misma columna C18 de fase inversa igual que para los LCO sulfatados, con una fase isocrática de 20 minutos con acetonitrilo al 26,5% seguida por un gradiente lineal de acetonitrilo-agua desde acetonitrilo al 26,5% hasta 100% durante 40 minutos a un caudal de 2 mL/min. Los picos correspondientes a los LCO no sulfatados se recogieron con acetonitrilo aproximadamente al 50% y se analizaron por espectrometría de masas. Una mayoría de los LCO eran tetraméricos y una minoría pentaméricos, como en el caso de los factores Myc. La N-acilación era con los ácidos grasos C18:1 y C16:0. No pudieron detectarse sustituciones O-acetilo ni O-sulfato.

La estructura de los LCO sulfatados y no sulfatados principales producidos por las cepas rizobianas mutantes GMI 6629 de *Sinorhizobium meliloti* y LPR5045 (pMP247) de *Rhizobium leguminosarum* bv. *Trifolii*, respectivamente, se representa a continuación. Son perfectos imitadores de los factores Myc producidos por el hongo MA *Glomus intraradices* (véase el Ejemplo 2).



En estos factores Myc, preparados a partir de cultivos de mutantes rizobianos se analizó su actividad biológica. El Ejemplo 7 muestra que una mezcla de estos factores Myc sulfatados y no sulfatado estimula fuertemente la formación de micorrizas (Figura 14A), lo que demuestra que estas moléculas actúan como señales micorrícicas genuinas.

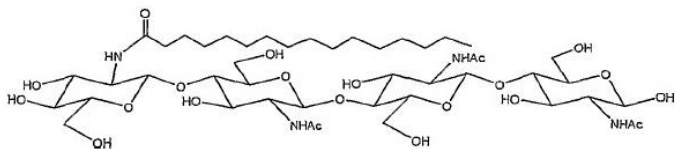
(ii) Producción de factores Myc por el método de la factoría celular.

Estos factores Myc sintéticos fueron proporcionados amablemente por Eduardo Andrés Martínez y Hugues Driguez del laboratorio CERMAV CNRS de Grenoble, Francia. El método que usaron era esencialmente el descrito en la bibliografía (Samain *et al.*, 1999): el cultivo de alta densidad celular de cepas recombinantes de *E. coli* que alojan los genes *nodBC* o *nodBCH* de *Sinorhizobium meliloti* proporcionó N^{1,3,5}-triacetil-quintintetraosa y 6O'-sulfatado-N^{1,3,5}-triacetil-quintintetraosa como compuestos principales junto con pequeñas cantidades de sus pentámeros correspondientes.

Después de la extracción y purificación de estos compuestos, se realizó la N-acilación selectiva usando cloruros de ácidos hexadecanoico u oleico en diversos disolventes hidro-orgánicos o usando los ácidos libres, y el método de N-acilación desarrollado previamente para la preparación de los factores de nodulación de lipo-quito-oligosacáridicos (Ohsten Rasmussen et al., 2004).

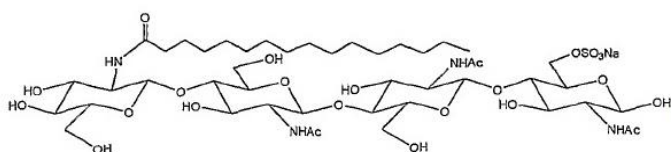
5 Se prepararon los cuatro siguientes lipo-quito-sacáridos:

LCO IV (contaminado con \approx 10% de LCO V) C16:0



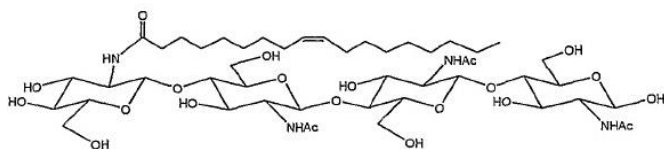
LCO-IV(C16:0)
 $C_{46}H_{82}N_4O_{21}$
 Masa exacta: 1026,5
 Peso molecular: 1027,2
 m/e: 1026,5

LCO IV (contaminado con \approx 10% de LCO V) S C16:0



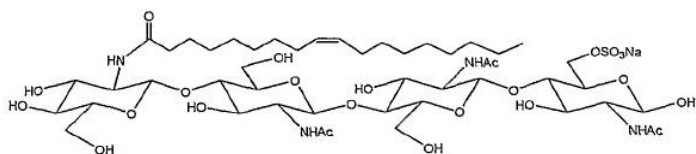
LCO-IV(S,C16:0)
 $C_{46}H_{81}N_4NaO_{24}S$
 Masa exacta: 1128,5
 Peso molecular :1129,2
 m/e: 1128,5

10 LCO IV (contaminado con \approx 10% de LCO V) C18:1



LCO-IV(C18:1)
 $C_{48}H_{84}N_4O_{21}$
 Masa exacta: 1052,6
 Peso molecular: 1053,2
 m/e: 1052,6

LCO IV (contaminado con \approx 10% de LCO V) S C18:1



LCO-IV(S,C18:1)
 $C_{48}H_{83}N_4NaO_{24}S$
 Masa exacta: 1154,5
 Peso molecular: 1155,2
 e/m: 1154,5

15 Resultados

Ejemplo 1: Purificación de factores Myc de exudados de raíces micorrizadas y de exudados de esporas germinantes.

Estrategia general.

20 Como fuente de los factores Myc se usó la cepa DAOM 197198 de *Glomus intraradices* debido a que esta cepa tiene una amplia gama de hospedantes y se usa para la producción industrial a gran escala de inoculantes de hongos MA. Esta cepa está bien caracterizada y su genoma está siendo secuenciado. Se usaron dos fuentes de factores Myc de una manera complementaria. Los exudados de las raíces micorrizadas tienen la ventaja de permitir la extracción de grandes volúmenes con la posibilidad de obtener cantidades significativas de factores Myc. La desventaja de esta fuente es que los exudados contienen una mezcla de compuestos de origen tanto de plantas como de hongos. Esto es por lo que los inventores usamos otra fuente, exudados de esporas germinantes purificadas, que contienen sólo compuestos de origen de hongos MA, pero tienen la desventaja de producir concentraciones extremadamente bajas de factores Myc.

Los compuestos biológicamente activos presentes en exudados de hongos MA son anfílicos.

30 Primeramente se extrajeron exudados de raíces micorrizadas por un método de extracción líquido-líquido, con butanol y acetato de etilo. Las fases acuosas de butanol y de acetato de etilo se analizaron para determinar su actividad biológica con los bioensayos MtENOD11 y VsHab: se encontró actividad en la fracción de butanol que indicó que los factores Myc son compuestos anfílicos. Como se muestra en la Fig. 1, pudo ser detectado un compuesto activo con

el ensayo MtENOD11 por una mancha azul que aparecía en las raíces en crecimiento, y con el ensayo VsHab por la aparición de ramas nítidas próximas a la punta de los pelos radiculares de algarroba.

A continuación el extracto de butanol se sometió a una extracción en fase sólida (EFS) con una columna C18 de fase inversa y se eluyó sucesivamente con disolvente acetonitrilo al 20%, 50% y 100%. Se encontró actividad biológica en la fracción eluída por acetonitrilo al 50% en los ensayos MtENOD11 y VsHab confirmando que el (los) compuesto(s) activo(s) es(son) anfífilo(s). Se obtuvieron resultados similares con más de cinco muestras independientes de exudados de raíces micorrizadas. En el ensayo VsHab se pudo observar también algunas veces una actividad muy ligera en el eluato con acetonitrilo al 100%, lo que sugiere que los diferentes compuestos podrían ser responsables de las respuestas en los ensayos MtENOD11 y VsHab, siendo los compuestos que actúan en el ensayo VsHab ligeramente más hidrófobos que el compuesto que actúa en el ensayo MtENOD11.

Los exudados de esporas germinantes se extrajeron por el mismo método de extracción líquido-líquido con butanol y acetato de etilo. La actividad en ambos ensayos MtENOD11 y VsHab estaba presente sólo en la fase de butanol. Se obtuvieron los mismos resultados con cinco muestras independientes de esporas germinantes. Los inventores podemos por tanto llegar a la conclusión de que el(los) compuesto(s) anfífilo(s) activo(s) en los ensayos MtENOD11 y VsHab procede(n) de hongos MA.

Dos tipos de compuestos activos en exudados de raíces micorrizadas

Para resolver adicionalmente los compuestos activos en los ensayos MtENOD11 y VsHab y obtener información sobre sus propiedades cromatográficas, la fracción de butanol tuvo que ser analizada por HPLC. Sin embargo, los exudados de raíces micorrizadas que estaban altamente contaminados por compuestos de las raíces de las plantas y por *Phytigel*, la fracción de butanol se pre-trató por EFS antes de la etapa de HPLC, como se ha descrito en párrafo precedente. La fracción de EFS eluída por acetonitrilo al 50%, y activa en los dos bioensayos, se analizó luego en una HPLC semipreparativa con una columna C18 de fase inversa y un gradiente de acetonitrilo-agua. Cada dos minutos se recogieron catorce fracciones. En la Fig. 2 se da un perfil típico. Cada fracción se analizó para determinar su actividad en los bioensayos MtENOD11 y VsHab. Se encontró que las fracciones eluídas con acetonitrilo (ACN) al 30-48% (fracción A) eran activas en MtENOD11, y las fracciones eluídas con ACN al 64-72% (fracción B) eran activas en el bioensayo VsHab. Estos datos muestran que no es el mismo compuesto el que es activo en ambos bioensayos. El(los) compuesto(s) activo(s) en MtENOD11 es(son) más hidrófilo(s) que el(los) activo(s) en VsHab.

Es interesante advertir que las características de elución de la fracción activa en MtENOD11 corresponden bien con las observadas con los factores Nod sulfatados de *Sinorhizobium meliloti* y *Rhizobium tropici* (33-45%), que pueden presentar también actividad con el bioensayo MtENOD11. Por otra parte, las características de elución de la fracción activa en VsHab corresponden bien a las observadas con el factor Nod no sulfatado de *R. leguminosarum* bv. *viciae* (67%) y los factores Nod no acetilados de *Rhizobium meliloti nodHnodL* (66%) que pueden presentar también actividad con el bioensayo de algarroba. Estos datos son compatibles con la hipótesis de que los exudados de raíces micorrizadas contienen una mezcla de LCO sulfatados y no sulfatados.

Dos tipos de compuestos activos en exudados de esporas germinantes

Los extractos de butanol de exudados de esporas germinantes se analizaron por una HPLC semipreparativa en las mismas condiciones que se han descrito antes. Como se ve en la Fig. 3, los exudados de esporas contenían también dos tipos de compuestos activos, uno más hidrófilo activo en MtENOD11 (fracción A) y uno más hidrófobo activo en VsHab (fracción B). Las características de elución de los dos compuestos son idénticas a las observadas con los dos compuestos activos de los exudados de raíces micorrizadas. Estos resultados indican que los dos compuestos activos presentes en los exudados de raíces micorrizadas proceden de hongos MA. Su comportamiento cromatográfico y sus actividades biológicas son compatibles con la hipótesis de que podrían corresponder a LCO sulfatados y no sulfatados.

Modificación de la actividad asociada a la desulfatación de la fracción A

Se ha demostrado que una hidrólisis metanólica suave de los LCO sulfatados, como los factores Nod de *S. meliloti*, elimina el grupo sulfato sin causar otras modificaciones estructurales (Roche et al., 1991b). Para comprobar si la actividad biológica en MtENOD11 de la fracción A recogida después de la HPLC de los extractos de butanol procedentes de los exudados de esporas germinantes podría ser debido a un LCO sulfatado, una muestra de la fracción A se sometió a un tratamiento de hidrólisis suave. La fracción tratada pierde totalmente actividad en MtENOD11 (véase la Fig. 4). Interesantemente, mientras la fracción A no era originalmente activa en el bioensayo VsHab, la fracción tratada presentaba una clara actividad en VsHab (Fig. 4). Esa fracción A puede después de la hidrólisis suave ganar una función, la actividad en VsHab, lo que muestra que esta hidrólisis metanólica muy suave no ha degradado drásticamente el compuesto activo de la fracción A, sino que lo ha modificado simplemente, probablemente por la eliminación del resto sulfato que es una O-sustitución muy lábil en los LCO. Estos datos indican que la actividad de la fracción A en MtENOD11 podría ser debida al LCO o los LCO sulfatados y que la actividad de la fracción B más hidrófoba en VsHab podría ser debida al LCO o los LCO no sulfatados .

Ejemplo 2: Caracterización bioquímica de los factores Myc.

Cromatografía de líquidos/espectrometría de masas (LC/MS) y cromatografía de líquidos a ultra-alta presión/espectrometría de masas (UPLC/MS).

5 Las diferentes fracciones obtenidas después de la HPLC en fase inversa semipreparativa de extractos de raíces micorrizadas fueron cromatografiadas individualmente en una columna analítica de fase inversa bajo a ultra-alta presión (UPLC). La defección se realizó por espectrometría de masas con ionización por electropulverización (ESI-MS).

10 Los resultados se muestran en las Figuras 5 a 8. Estas figuras presentan las corrientes iónicas correspondientes a los LCO que se supone están presentes en las muestras, de acuerdo con los tiempos de retención en HPLC y UPLC y la actividad biológica. Si hay compuestos que presentan la masa requerida dentro de su distribución isotópica, entonces aparecerán como picos en el cromatograma. Como los picos obtenidos de este modo podrían ser artificiales (los picos podrían corresponder a un compuesto minoritario del perfil isotópico), los espectros correspondientes se dan también en la parte inferior de cada figura.

15 Las primeras ocho fracciones de HPLC, para las que el comportamiento cromatográfico y las actividades biológicas sugerían la presencia de LCO sulfatados, fueron analizadas en el modo negativo. De acuerdo con los tiempos de retención medidos en UPLC usando los LCO tetraméricos (DP4) y pentaméricos (DP5) estándares, las masas exactas (error menor que 10 ppm) correspondientes a las entidades DP4 y DP5 sulfatadas fueron buscadas en la fracción 4 que mostró la actividad más alta en el ensayo MtENOD11. En esta fracción, se podían detectar fácilmente las masas correspondientes a DP4 sulfatado que llevan acilos de C16 (Fig. 5). De acuerdo con sus tiempos de retención respectivos en HPLC, los inventores fuimos capaces de detectar en la fracción previa (fracción 3) los DP5 correspondientes (Fig. 7) y en la siguiente (fracción 5) el DP4 sulfatado que lleva cadenas de C18 (Fig. 6). En las siguientes fracciones (6 a 8) se han buscado sin éxito las entidades DP3. Los compuestos han sido caracterizados primeramente usando diferentes corrientes iónicas (ajuste entre las llamadas masas exactas y los tiempos de retención esperados) y en segundo lugar considerando el perfil isotópico de los espectros correspondientes. La Fig. 8 ilustra la eficacia del método para detectar la presencia o ausencia de un compuesto dado, que tenga una masa específica. La corriente iónica de m/z 1332,6, que corresponde a un supuesto LCO(V,C18:2,S) produjo solo amplificación del ruido de fondo (no hubo pico individual bien definido), mientras que la corriente iónica de m/z 1334,6 correspondiente a un supuesto LCO(V,C18:1,S) demostró claramente la presencia de un pico en UPLC que contenía un compuesto que presentaba la masa esperada (datos confirmados por el espectro de masas registrado). Por tanto, los extractos de Myc contienen el LCO sulfatado pentamérico a N-acilado por C18:1, pero no el derivado acilado por C18:2.

20 Usando ese método no fue posible detectar entidades DP4 o DP5 sulfatadas que lleven O-sustituciones como grupos acetilo, carbamoilo o fucosilo o N-sustitución como un grupo metilo, que se encuentran muy frecuentemente en los factores Nod lipo-quito-oligosacáridicos producidos por diversas cepas rizobianas.

25 Las fracciones 7 a 11 han sido analizadas luego por UPLC, pero la detección ocurrió en el modo ESI-MS positivo. Se aplicó la misma estrategia: la llamada iónica seguida por análisis de los espectros correspondientes.

30 Los extractos de raíces micorrizadas se analizaron también por LC/MS. Las fracciones que eluían entre 20 y 23 minutos en la HPLC semipreparativa se reunieron, se secaron bajo corriente de nitrógeno y se redisolviéron en 150 μ L de ACN al 50% en agua y ácido acético al 1%. Las soluciones se infundieron directamente en la fuente de ESI de un espectrómetro Q-ToF Ultima (Waters, EE.UU.). El capilar se ajustó a 3 kV, el voltaje del cono a 70 V, la lente Rf at 35 V. En el modo positivo pudieron ser detectados los iones moleculares de los dos compuestos minoritarios a m/z 1045,5 y 1047,5 correspondientes a los LCO tetraméricos cationizados con sodio que llevan un acilo C16:1 o C16:2 y ninguna O-sustitución. Las masas y los perfiles isotópicos confirmaron las estructuras propuestas.

35 Puesto que cantidades importantes de contaminantes (por ejemplo, PEG) que co-eluyen con los compuestos LCO no sulfatados buscados en las fracciones 9-11 impidieron su detección por MS, se realizó una purificación suplementaria por HPLC. Las fracciones 9 y 10 de la HPLC semipreparativa se reunieron e inyectaron en una columna C8 analítica y se eluyeron usando un gradiente que comenzaba con MeOH al 30% en agua y que terminaba con MeOH al 100%. Los contaminantes se eluyeron desde 1 a 15 minutos. Los compuestos LCO esperados tardaron alrededor de 20 minutos. Las fracciones recogidas entre 15 y 23 minutos se analizaron separadamente en UPLC-MS y la detección de iones específicos se realizó basándose en las especies sulfatadas correspondientes observadas (DP4 y DP5; cadenas de acilo C16:0 y C18:1). La llamada iónica de la masa exacta de m/z 1027,56 (DP4, C16:1) dio una respuesta en la fracción que eluye entre 18 y 19 minutos. El tiempo de retención comparado con los patrones sintéticos y la masa exacta y el perfil isotópico correspondieron al compuesto buscado. La estructura fue confirmada definitivamente por el espectro de masas registrado, que presentaba la clásica fragmentación B a m/z 400,2, 603,3 y 806,4.

Espectrometría de masas en tándem (MS/MS)

40 Demostrar la presencia de compuestos que tiene la masa adecuada en el tiempo de retención esperado de la HPLC o UPLC no es suficiente para autentificar su estructura. Por tanto, los inventores realizamos un análisis por MS/MS de uno de los supuestos compuestos LCO. La Fig. 9 presenta la comparación entre el factor Nod sulfatado de *S. meliloti* DP4 C16:2 en MS/MS en modo negativo y el registrado en el "factor Myc" candidato presente en la muestra, LCO(IV,C16:0,S). Los iones característicos del extremo reductor a m/z 503 (Y_2), 605 y 706 (Y_3) son claramente detectados en ambos casos, así como la pérdida neutra característica de 101 unidades de masa atómica

(uma) (ruptura intracíclica) partiendo del ion molecular. El ajuste perfecto entre los dos modelos de fragmentación indica la afiliación estructural de las dos moléculas e indica que el grupo sulfato está localizado en el residuo de glucosamina reductor, mientras que la sustitución del acilo graso está localizada en el residuo terminal de glucosamina no reductor. Puesto que la fragmentación no produce iones por beta-eliminación (iones de ácidos grasos) es muy probable que la sustitución de acilo graso sea una amida en el átomo N del residuo de glucosamina.

Ejemplo 3: Estimulación de la formación de raíces laterales por los factores Myc.

el extracto de butanol de exudados de raíces micorrizadas, después de más purificación por extracción en fase sólida (EFS) y elución por acetonitrilo al 50% se incorporó en placas M y se analizó para determinar el crecimiento de plántulas de *M. truncatula* A17. Este extracto de Myc purificado indujo una estimulación significativa de formación de raíces laterales ($P = 0,05$). Cuando se analizó en un mutante de *dmi1* (Y6) *M. truncatula* este extracto de Myc no estimuló la formación de raíces laterales, lo que indica que este extracto semipurificado contenía una señal de Myc que activa la formación de raíces laterales (FRL) por la vía de la señalización simbiótica de DMI (Fig. 10A).

Se extrajeron exudados de esporas germinantes con acetato de etilo y butanol. Los tres extractos (acuoso, de acetato de etilo y de butanol) se analizaron para comprobar la estimulación de FRL en plántulas A17 de *M. truncatula*. El extracto de butanol estimuló significativamente la FRL ($P = 0,05$), mientras que los extractos acuoso y de acetato de etilo no fueron activos (Fig. 10B). Este experimento confirma el origen de hongos MA del (de los) compuesto(s) anfifílico(s) que provocan la estimulación de FRL.

El extracto de butanol de exudados de raíces micorrizadas, después de la EFS fue purificado adicionalmente por HPLC semipreparativa y las fracciones correspondientes a los LCO sulfatados (fracción A, activa en el ensayo MtENOD11) y los LCO no sulfatados (fracción B, activa en el ensayo VsHab) fueron recogidas por separado y analizadas en plántulas A17 de *M. truncatula*. Se encontró que las dos fracciones estimulaban significativamente la FRL (Fig. 10C). Estos datos indican que los factores Myc están constituidos por una mezcla de LCO sencillos sulfatados y no sulfatados que son ambos capaces de estimular la formación de raíces laterales en plantas.

Ejemplo 4: Efecto de los factores Myc sobre la formación micorrícica arbuscular (MA) en la legumbre modelo *M. Truncatula*

Los factores Myc sintéticos producidos por el método de la factoría celular, como se ha descrito en Materiales y Métodos, se usaron para estudiar la posible influencia de los factores Myc sobre la micorrización de raíces de la legumbre modelo *Medicago truncatula* por el hongo MA *Glomus intraradices*.

En una primera serie de experimentos plántulas de *M. truncatula* se cultivaron en condiciones axénicas en tubos de ensayo sobre un medio gelificado en pico de flauta pobre en fósforo y nitrógeno en el que se añadieron factores Myc a una concentración de 10^{-8} M. Cada plántula se inoculó con 500 esporas fúngicas estériles (Olah et al., 2005). El número de unidades de infección (zonas que contienen arbuscúlos, vesículas y retículos de hifas internos) por planta se contó bajo una lupa binocular seis semanas después de la inoculación. El tratamiento por factores Myc aumentó el número de unidades de infección por planta en 148% (véase la Fig. 11a).

En una segunda serie de experimentos plántulas de *M. truncatula* se cultivaron sobre un sustrato hecho de granulados de arcilla carbonizada en condiciones no estériles y cada planta se inoculó con 50 esporas fúngicas. Se añadieron al medio factores Myc a una concentración de 10^{-8} M. El porcentaje de colonización de las raíces se midió por el método de intersección con líneas de rejilla tres semanas después de la inoculación. El porcentaje de raíces micorrizadas en las plantas tratadas por los factores Myc fue 28,5% mayor que en las plantas de control (Fig. 11b).

Conclusiones: A baja concentración (10^{-8} M) los factores Myc sintéticos estimulan la MICO MA en la legumbre modelo *M. truncatula*, proporcionando una prueba adicional de que los factores Myc que los inventores hemos identificado son señales micorrícicas genuinas.

El hecho de que los factores Myc estimulen eficazmente la formación MA en legumbres abre el camino a amplias aplicaciones en horticultura (por ejemplo, judías, garbanzos, lentejas), agricultura (por ejemplo, soja, guisantes, habas, alfalfa, cacahuetes) y silvicultura (por ejemplo, falsa acacia).

Ejemplo 5: Efecto de los factores Myc sobre el desarrollo de las raíces de legumbres.

Los hongos MA segregan compuestos difundibles que estimulan la formación de raíces laterales (FRL) en la legumbre modelo *Medicago truncatula* (Olah et al., 2005). Los inventores han demostrado (véase el Ejemplo 3) que las fracciones de HPLC que contienen LCO fúngicos sulfatados y no sulfatados provocan esta estimulación de FRL. Para demostrar que esta estimulación de FRL se debe realmente a los LCO y no a compuestos fúngicos contaminantes presentes posiblemente en estas fracciones de HPLC, los inventores usamos los LCO sintéticos sulfatados y no sulfatados, que tenían la misma estructura que las detectadas en exudados fúngicos (véase el Ejemplo 4 y Materiales y Métodos).

A 10^{-8} M los factores Myc sulfatados sintéticos puros, o los factores no sulfatados puros, así como una mezcla de ambos factores Myc sulfatados y no sulfatados, fueron todos claramente estimulantes de la FRL (véase la Fig. 12a) que muestra que ambos tipos de compuestos actúan como reguladores del crecimiento de plantas. En contraste, a 10^{-10} M la mezcla de factores Myc sulfatados y no sulfatados era todavía extremadamente activa, mientras que los

compuestos puros, sulfatados o no, no eran activos. Estos datos muestran que una mezcla de factores Myc sulfatados y no sulfatados es claramente más activa que los factores Myc puros sulfatados o no sulfatados.

Por tanto, los factores Myc no son solamente señales simbióticas que activan el programa simbiótico de la planta hospedante durante las etapas tempranas de micorrización, también pueden actuar como reguladores genuinos de plantas, estimular la formación de raíces laterales e influir sobre la arquitectura radicular.

Desde un punto de vista agrícola fue importante abordar el problema de la posible influencia de los factores Myc no solamente sobre la ramificación de las raíces, sino también sobre el desarrollo global del sistema radicular. Después de cultivar las plántulas durante 8 días en el medio de cultivo que contenía o no una mezcla de factores Myc sulfatados y no sulfatados, se cortaron las raíces, se escanearon y se analizó el sistema radicular con el programa informático *WinRhizo*. El tratamiento con los factores Myc dio como resultado un aumento de 13,16% de la longitud total de las raíces (Fig. 12b). El tratamiento con los factores Myc es capaz por tanto de estimular el desarrollo de todo el sistema radicular.

Conclusiones: Los factores Myc tanto sulfatados como no sulfatados son señales activas que actúan a una baja concentración (10^{-8} M), pero una mezcla de factores Myc sulfatados y no sulfatados es claramente más activa (hasta 10^{-10} M).

Dichos factores estimulan eficazmente la formación de raíces laterales y el desarrollo del sistema radicular y por lo tanto no son solamente señales simbióticas sino también potentes reguladores del crecimiento de las plantas.

Estos hallazgos abren el camino al uso de estas moléculas en horticultura, agricultura y silvicultura para estimular el desarrollo de las raíces de las plantas y el crecimiento de las plantas.

Ejemplo 6: Los factores Myc provocan respuestas de las plantas por la vía de señalización simbiótica DMI.

Se ha identificado una vía de señalización simbiótica en *M. truncatula* con genes que codifican la percepción del factor Nod (*NFP*), para la señalización del calcio (*DMI1*, *DMI2* y *DMI3*) y un activador de la transcripción específico de la nodulación (*NSP1*) (Catoira et al., 2000; Smit et al., 2005). Las mutaciones en los genes *DMI1*, *DMI2* y *DMI3* dan como resultado la alteración de la formación de nódulos, pero también la formación de micorrizas, lo que indica que estos tres genes *DMI* están implicados en una vía de señalización común a la nodulación y la micorrización (Catoira et al., 2000). En contraste, las mutaciones en el gen *NSP1* dan como resultado un defecto en la nodulación, pero no afectan a la micorrización (Catoira et al., 2000). Este hallazgo ha conducido a la hipótesis de que las señales simbióticas micorrícicas, los factores Myc, están activando el programa micorrícico de las plantas por la vía de los DMI (Catoira et al., 2000). Es imposible determinar si los genes *DMI* están implicados en la estimulación de la formación de MA por los factores Myc porque los mutantes *dmi* son defectuosos para la formación de micorrizas. Para abordar la cuestión de la posible implicación de genes simbióticos de plantas en la respuesta a los factores Myc, los inventores hemos usado por tanto el ensayo de formación de raíces laterales (FRL) en *M. truncatula* descrito los Ejemplos 3 y 5.

Los factores Myc sulfatados exhiben algunas similitudes estructurales con los factores Nod de *Sinorhizobium meliloti*. Para evitar la posible interacción entre la señalización por el factor Nod y el factor Myc los inventores usamos factores Myc sintéticos no sulfatados. Los inventores estudiamos la respuesta de la estimulación de la FRL en la línea A17 de *M. truncatula* de tipo silvestre como control, y los mutantes *dmi1* (Y6), *dmi2* (TR25), *dmi3* (TRV25) y *nsp1* (B85).

Como ya se ha descrito en el Ejemplo 5, el tratamiento de la línea de tipo silvestre con factores Myc no sulfatados a 10^{-8} M dio como resultado una clara estimulación de la formación de raíces laterales. En contraste, en los mutantes *dmi1*, *dmi2* y *dmi3* defectuosos de micorriza, los factores Myc no desencadenaron la estimulación de la FRL (véase la Fig. 13). En el mutante *nsp1* que es defectuoso en nodulación pero tiene un fenotipo micorrícico normal, y en el que los factores Nod son incapaces de estimular la FRL, los factores Myc desencadenaron una estimulación muy clara de la FRL (Fig. 13). Estos datos muestran que los factores Myc provocan respuestas en plantas aguas abajo de los genes *DMI* por una vía de señalización específica de micorrizas, distinta de la vía de señalización por el factor Nod (*NSP1*).

Conclusiones: La capacidad de los factores Myc para estimular la FRL está abolida en los mutantes *dmi1*, *dmi2* y *dmi3*. Esto muestra que las respuestas en el desarrollo inducidas por los factores Myc son provocadas por la vía simbiótica de los DMI, demostrando además que los factores Myc son señales simbióticas genuinas.

El gen *NSP1* específico de la nodulación no es requerido para la respuesta de la estimulación de FRL, lo que indica que los factores Myc desencadenan esta respuesta en el desarrollo por una vía específica de los factores Myc que actúa a través y aguas debajo de los genes *DMI* e independiente de la vía específica de la nodulación (*NSP1*). Esto es una prueba más de que los factores Myc que los inventores hemos identificado son señales micorrícicas genuinas.

Ejemplo 7: Estimulación de la formación de MA en raíces de zanahoria transformadas y escindidas, un sistema usado para la producción de inoculantes micorrícicos industriales

Los hongos MA son simbioses obligados: no pueden propagarse ni formar esporas en cultivo puro. Para su crecimiento necesitan colonizar raíces de plantas hospedantes. Este estricto requerimiento ha dificultado tanto la investigación básica sobre simbiosis MA como la posibilidad de producir inoculantes de hongos MA a gran escala para fines de horticultura y agricultura. Se consiguió un importante descubrimiento usando cultivos de raíces transformadas y escindidas para cultivar hongos MA haciendo posible la producción de grandes cantidades de esporas fúngicas estériles (Bécard y Fortin, 1988). Un sistema que se ha usado durante muchos años (Chabot et al., 1992) es el cultivo conjunto de la cepa DAOM 197198 del hongo AM *Glomus intraradices* con un clon de raíz de escindida de zanahoria transformado por *Agrobacterium rhizogenes*. Este sistema de cultivo conjunto es usado principalmente por la compañía de biotecnología PremierTech (Québec) para la producción de inoculantes fúngicos MA comerciales. Los inventores hemos abordado la cuestión de si el uso de los factores Myc a bajas concentraciones, como aditivo en los medios de cultivo, podría estimular la micorrización de las raíces escindidas.

Los inventores usamos primeramente una mezcla de factores Myc sulfatados y no sulfatados producidos por mutantes rizobianos apropiados (véase Materiales y Métodos), que se añadieron al medio de cultivo a una concentración de 10^{-8} M. Se inocularon raíces de zanahoria escindidas axénicas con esporas estériles de *G. intraradices*. El porcentaje de longitud de raíz colonizado por los hongos MA se estimó por el método de intercesión con líneas de rejilla (Giovannetti y Mosse (1980)). Se usaron cinco repeticiones. La lectura se realizó con una lupa binocular después de ocho semanas, en modo doble ciego.

En la Fig. 14a se puede ver que la adición de una mezcla de factores Myc sulfatados y no sulfatados a 10^{-8} M al medio de cultivo dio como resultado un aumento muy grande en el porcentaje de colonización (+ 68,6%).

En un segundo experimento se añadió al medio de crecimiento a 10^{-8} M una mezcla de factores Myc sintéticos sulfatados y no sulfatados. Se usaron quince repeticiones. Como se muestra en la Fig. 14b después de ocho semanas el efecto de los factores Myc sobre la estimulación de la formación MA fue bastante significativo (+ 20,5%)

Conclusiones: Una mezcla de factores Myc sulfatados y no sulfatados estimula activamente la formación de MA en las raíces de la planta no leguminosa zanahoria. Esto es una prueba más de que los factores Myc que los inventores hemos identificado y que hemos sintetizado son señales micorrícicas genuinas.

Tanto los factores Myc sintéticos preparados por un método bioquímico como los factores Myc preparados a partir de cepas rizobianas mutantes son eficaces para estimular la formación de micorrizas mostrando que estos dos tipos de estrategias son adecuadas para la producción a gran escala de factores Myc.

Estos datos abren el camino a usar los factores Myc como aditivos en los medios de cultivo utilizados para la producción de inoculantes MA por la industria biotecnológica, usando raíces transformadas y escindidas.

Ejemplo 8: Efecto de los factores Myc sobre la formación MA en la planta no leguminosa *Tagetes Patula*

Se eligió *Tagetes patula*, miembro de la familia *Asteráceas* como planta hospedante no leguminosa. *T. patula* (damasquina) es una planta de jardín muy popular. Esta especie se usa como plantación acompañante para muchas cosechas vegetales. Se ha descrito que las secreciones de sus raíces matan los nemátodos del suelo y se dice que repelen los insectos perjudiciales, tales como la mosca blanca entre los tomates. La planta completa puede ser recolectada cuando alcanza la floración y se destila por su aceite esencial que se usa en perfumería. La *T. patula* se usa para analizar la micorrización debido a que es una planta pequeña, fácil de manejar y que presenta una rápida colonización de sus raíces por hongos MA. Se usó la variedad "*Legión d'honneur*". Los ensayos de micorrización se realizaron cultivando plántulas sobre un sustrato hecho de partículas de arcilla carbonizada. Las plantas se inocularon con esporas estériles de *G. intraradices*, y se añadieron factores Myc a la concentración de 10^{-8} M.

En una primera serie de experimentos se usó una mezcla de factores Myc sintéticos sulfatados y no sulfatados. Se estimó el grado de micorrización cuatro semanas después de la inoculación contando el número de unidades de infección. Las plántulas tratadas con el factor Myc tenían un aumento del 153,5% altamente significativo del número de unidades de infección por planta (Fig. 15a1). Los factores Myc pudieron aumentar el número de sitios infectados bien sea estimulando el desarrollo del sistema radicular o bien sea aumentando la densidad de infección. Ciertamente el tratamiento con los factores Myc dio como resultado tanto un aumento de 49,1% en la longitud de las raíces (Fig. 15a2), como un aumento del 30,9% en la densidad de infección (Fig. 15a3).

En un segundo experimento, las plantas inoculadas se trataron con factores Myc puros sulfatados o no sulfatados o con una mezcla de ambos. Cuatro semanas después de la inoculación se estimó la tasa de colonización por el método de intersección con líneas de rejilla. Los resultados se representan en la Fig. 15b. El tratamiento con una mezcla de factores Myc sulfatados y no sulfatados provocó una duplicación significativa de la tasa de colonización radicular (+104,5%), mientras que los factores Myc puros sulfatados y puros no sulfatados dieron como resultado aumentos de 42,3% y 75,4% respectivamente.

Conclusiones: Los factores Myc estimulan la formación MA en una planta no leguminosa, prueba adicional de que los factores Myc que los inventores hemos identificado son señales micorrícicas genuinas.

Tanto los factores Myc sulfatados como no sulfatados son activos, pero la mezcla de ambos es claramente más activa.

El hecho de que los factores Myc estimulen eficazmente la formación MA y el desarrollo radicular en plantas no leguminosas abre el camino a aplicaciones extremadamente amplias en horticultura, agricultura y silvicultura.

Ejemplo 9: Efecto de los factores Myc sobre la germinación de semillas de una planta no leguminosa, el tomate.

5 En los Ejemplos previos los inventores hemos mostrado que los factores Myc no solo son señales simbióticas que activan el programa micorrícico de la planta, sino que pueden actuar también como reguladores del crecimiento de las plantas y estimular el desarrollo del sistema radicular en una etapa muy temprana del desarrollo de la plántula. Los inventores hemos investigado por tanto la posible influencia de los factores Myc sobre la germinación de las semillas en una planta no leguminosa. Se ha elegido la variedad de tomate Heinz 1706 debido a que esta línea está bien caracterizada y se seleccionó para el proyecto de secuenciación del genoma del tomate en EE.UU. Además, con esta línea de tomates están disponibles microchips de Affymetrix® que hacen posible estudios de perfiles de expresión de genes.

10 Para estos estudios se usaron factores Myc sintéticos purificados, tanto sulfatados como no sulfatados o una mezcla de ambos. Los factores Myc se añadieron al medio de agar-agar para germinación y se vertieron en placas Petri. Las semillas se extendieron en la superficie de las placas de agar-agar y se incubaron en la oscuridad a 14°C, 20°C y 28°C. Cada día se puntuó el porcentaje de germinación.

15 Los experimentos se realizaron con semillas que había sido vernalizadas por conservación a 4°C durante al menos ocho semanas. La presencia de los factores Myc en el medio de germinación, en el intervalo de 10^{-8} M a 10^{-10} M dio como resultado una estimulación muy clara de la germinación a 14°C y 20°C (véase la Fig. 16). Cada uno de los tipos de factores Myc, sulfatado o no sulfatado, fue activo, pero de manera interesante la mezcla de ambos tipos fue claramente más activa. No se pudo detectar ningún efecto significativo de los factores Myc sobre la germinación a la temperatura más alta, 28°C (datos no mostrados). Estos datos sugieren que este efecto de estimulación es operativo a temperaturas que corresponden al intervalo de temperatura común de los suelos. Los inventores mantenemos la hipótesis de que las plantas y su simbiontes fúngicos MA han evolucionado conjuntamente no solo para la formación de micorrizas en las raíces en desarrollo, sino también en una etapa muy temprana de sus interacciones, la germinación. Ambos socios podrían tener la ventaja de asociar la eficacia de la germinación de las semillas y el desarrollo temprano de las raíces a la presencia del socio fúngico. La estimulación de la germinación fue asociada a un mejor y subsiguiente desarrollo de las plántulas como se muestra en la Fig. 16b.

20 El hecho de que las semillas respondan a los factores Myc muestra que los componentes de las plantas requeridos para la percepción de los factores Myc (receptores) y la transducción están presentes y son funcionales en la semillas. Este hallazgo abre el camino al tratamiento de semillas de cosechas con factores Myc en condiciones agrícolas. La observación de que los factores Myc son activos en la germinación de las semillas a concentraciones extremadamente bajas (10^{-10} M) abre el camino a la tecnología del tratamiento de semillas con bajo coste (bajo requerimiento de material activo) y respeto al medio ambiente (uso de concentraciones extremadamente bajas de compuestos naturales).

25 Conclusiones: Tanto los factores Myc sulfatados como los no sulfatados estimulan la germinación de las semillas del tomate, una planta no leguminosa, pero la mezcla de ambos es claramente más activa. Estos dos tipos de factores Myc son por tanto no solo señales simbióticas, sino también potentes reguladores del crecimiento de las plantas que actúan tanto en leguminosas como en no leguminosas.

30 Desde un punto de vista agrícola, estos resultados abren el camino a importantes aplicaciones en horticultura, agricultura y silvicultura: los tratamiento de semillas por factores Myc, preferiblemente una mezcla de ambos tanto sulfatados como no sulfatados, podrían mejorar el porcentaje y la tasa de germinación y estimular el desarrollo de plántulas jóvenes para la mayoría de las plantas cultivadas, la mayoría de las cuales son capaces de establecer esta simbiosis endomicorrícica.

45 **Referencias**

Akiyama K, Matsuzaki K, Hayashi H (2005) Plant sesquiterpenes induce hyphal branching in arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature*, 435: 824-827.

Andriakaja A, Boisson-Dernier A, Frances L, Sauviac L, Jauneau A, Barker DG, Carvalho-Niebel F (2007) AP2-ERF transcription factors mediate Nod factor dependent Mt ENOD11 activation in root hairs via a novel cis-regulatory motif. *Plant Cell*, 19:2866-2885.

Ardourel M, Demont N, Debellé F, Maillet F, de Billy F, Promé JC, Dénarié J, Truchet G (1994) Rhizobium meliloti lipooligosaccharide nodulation factors: Different structural requirements for bacterial entry into target root hair cells and induction of plant symbiotic developmental responses. *Plant Cell*, 6:1357-1374.

Bécard G, Fortin JA (1988) Early events of vesicular-arbuscular mycorrhiza formation in Ri T-DNA transformed roots. *New Phytol.*, 108:211-218.

Benamor B, Shaw S, Oldroyd G, Maillet F, Penmetsa RV, Cook D, Long S, Dénarié J, Gough C (2003). The NFP locus of *Medicago truncatula* controls an early step of Nod factor signal transduction upstream of a rapid calcium flux and root hair deformation. *Plant J.*, 34: 495-506.

Besserer A, Puech-Pagès V, Kiefer P, Gomez-Roldan V, Jauneau A, Roy S, Portais JC, Roux C, Bécard G, Séjalon-Delmas N (2006) Strigolactones stimulate arbuscular mycorrhizal fungi by activating mitochondria. *PLoS Biol.*, 4(7):e226.

- Catoira R, Galera C, De Billy F, Penmetsa RV, Journet EP, Maillet F, Rosenberg C, Cook D, Gough C, Dénarié J (2000) Four genes of *Medicago truncatula* controlling components of a Nod factor transduction pathway. *Plant Cell*, 12: 1647-1666.
- Chabot S, Bécard G, Piché Y (1992) The life cycle of *Glomus intraradices* in root organ culture. *Mycologia*, 84: 315-321.
- Demont N, Debelle F, Aurelle H, Dénarié J, Promé JC (1993) Role of the *Rhizobium meliloti* nodF and nodE genes in the biosynthesis of lipo-oligosaccharidic nodulation factors. *J. Biol. Chem.*, 268 : 20134-20142.
- Dénarié J, Debelle F, Promé JC (1996) *Rhizobium* lipo-chitooligosaccharide nodulation factors: signaling molecules mediating recognition and morphogenesis. *Annu. Rev. Biochem.*, 65: 503-535.
- D'Haese W, Holsters M (2002) Nod factor structures, responses, and perception during initiation of nodule development. *Glycobiology*, 12: 79R-105R.
- Doner LW, Bécard G (1991) Solubilization of gellan gels by chelation of cations. *Biotechnol Tech.*, 1991; 5:25-28.
- Giovanetti M, Mosse B (1980) An evaluation of techniques for measuring vesicular-arbuscular mycorrhizal infection in roots. *New Phytologist*, 84:489-500.
- Grenouillat N, Vauzeilles B, Bono JJ, Samain E, Beau JM. (2004) Simple synthesis of nodulation-factor analogues exhibiting high affinity towards a specific binding protein. *Angew Chem Int Ed Engl.*, 43:4644-4646.
- Harrison M (2005) Signaling in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Annu. Rev. Microbiol.*, 59: 19-42.
- Hewitt, E.J (1966) Sand and water culture methods used in the study of plant nutrition. Technical Communication No. 22 (revised 2nd edn). Com. Bur. of Horticult. and Plant Crops East Malling, Maidstone, Kent, UK.
- Journet EP, El-Gachtouli N, Vernoud V, de Billy F, Pichon M, Dedieu A, Arnould C, Morandi D, Barker D, Gianinazzi-Pearson V (2001) *Medicago truncatula*. ENOD11: a novel RPRP-encoding early nodulin gene expressed during mycorrhization in arbuscule-containing cells. *Mol. Plant Microbe Interact.*, 14: 737-748.
- Kosuta S, Chabaud M, Lougnon G, Gough C, Dénarié J, Barker DG, Bécard G (2003) A diffusible factor from arbuscular mycorrhizal fungi induces symbiosis-specific MtENOD11 expression in roots of *Medicago truncatula*. *Plant Physiol.*, 131: 952-962.
- Navazio L, Moscatiello R, Genre A, Novero M, Baldan B, Bonfante P, Mariani P (2007) A diffusible signal from arbuscular mycorrhizal fungi elicits a transient cytosolic calcium elevation in host plant cells. *Plant Physiol.* 144: 673-681.
- Olah B, Brière C, Bécard G, Dénarié J, Gough C (2005) Nod factors and a diffusible factor from arbuscular mycorrhizal fungi stimulate lateral root formation in *Medicago truncatula* via the DMI1/DMI2 signalling pathway. *Plant J.*, 44: 195-207.
- Ohsten Rasmussen M, Hogg B, Bono JJ, Samain E, Driguez H (2004) New access to lipo-chitooligosaccharide nodulation factors. *Org. Biomol. Chem.*, 2: 1908-1910.
- Price NPJ, Relic B, Talmont F, Lewin A, Promé D, Pueppke SG, Maillet F, Dénarié J, Promé JC, Broughton WJ (1992) Broad-host-range *Rhizobium* species strain NGR234 secretes a family of carbamoylated, and fucosylated, nodulation signals that are O-acetylated or sulphated. *Mol. Microbiol.*, 23: 3575-3584.

R Development Core Team (2009) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>.

Remy W, Taylor TN, Hass H, Kerp H (1994) Four hundred-million-year-old vesicular arbuscular mycorrhizae. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91: 11841-43.

Roche P, Debelle F, Maillet F, Lerouge P, Faucher C, Truchet G, Dénarié J, Promé JC (1991a) Molecular basis of symbiotic host specificity in *Rhizobium meliloti*: nodH and nodPQ genes encode the sulfation of lipo-oligosaccharide signals. *Cell*, 67: 1131-1143.

Roche P, Lerouge P, Ponthus C, Promé JC (1991b) Structural determination of bacterial nodulation factors involved in the *Rhizobium meliloti*-alfalfa symbiosis. *J. Biol. Chem.*, 266: 10933-10940.

Samain E, Drouillard S, Heyraud A, Driguez H, Gram-scale synthesis of recombinant chitooligosaccharides in *Escherichia coli*. *Carbohydrate Research*, 302: 35-42.

Samain E, Chazalet V, Geremia RA (1999). Production of O-acetylated and sulphated chitooligosaccharides by recombinant *Escherichia coli* strains harboring different combinations of nod genes. *Journal of Biotechnology*, 72: 33-47.

Smit P, Raedts J, Portyanko V, Debelle F, Gough C, Bisseling T, Geurts R (2005) NSP1 of the GRAS protein family is essential for rhizobial Nod factor-induced transcription. *Science*, 308:1789-91.

Smith SE, Read DJ (2008) *Mycorrhizal symbiosis*. 787 pp., Academic Press.

Stacey G, Libault M, Brechenmacher L, Wan J, May G (2006) Genetics and functional genomics of legume nodulation. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 9:110-121.

Spaink HP, Wijffes AHM, van der Drift KGM, Haverkamp J, Thomas-Oates JE, Lugtenberg BJJ (1994) Structural identification of metabolites produced by the NodB and NodC proteins of *Rhizobium leguminosarum*. *Mol. Microbiol.*, 13:821-831.

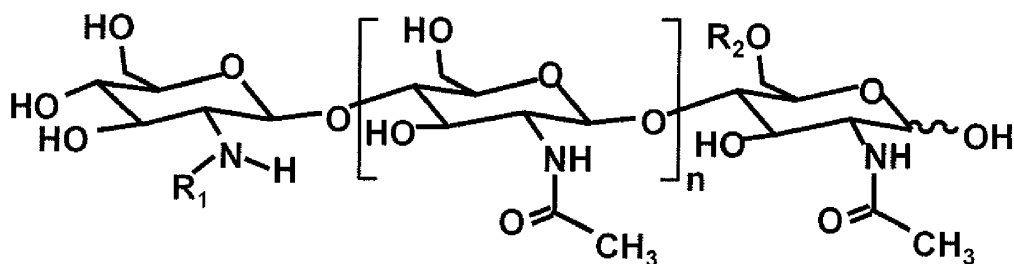
Spaink HP, Wijffes AHM, Lugtenberg BJJ (1995) *Rhizobium* NodI and NodJ proteins play a role in the efficiency of secretion of lipochitin oligosaccharides. *J. Bacteriol.*, 177: 6276-6281.

Vierheilig H, Coughlan AP, Wyss U, Piché Y (1998) Ink and vinegar, a simple staining technique for arbuscular-mycorrhizal fungi. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64:5004-5007.

Weidmann S, Sanchez L, Descomin J, Chatagnier O, Gianinazzi S, Gianinazzi-Pearson V (2004) Fungal elicitation of signal transduction-related plant genes precedes mycorrhiza establishment and requires the *dmi3* gene in *Medicago truncatula*. *Mol. Plant Microbe Interact.*, 17: 1385-1393.

REIVINDICACIONES

1. Una mezcla de lipo-quito-oligosacáridos definidos por la fórmula (I) siguiente:



(I)

5

en donde dicha fórmula comprende:

- un lipo-quito-oligosacárido de fórmula (I) en donde $n = 2$, R_1 representa una cadena de ácido graso saturado que contiene 16 átomos de carbono y R_2 representa H;
- un lipo-quito-oligosacárido de fórmula (I) en donde $n = 2$, R_1 representa una cadena de ácido graso saturado que contiene 16 átomos de carbono y R_2 representa SO_3H ;
- un lipo-quito-oligosacárido de fórmula (I) en donde $n = 2$, R_1 representa una cadena de ácido graso monoinsaturado que contiene 18 átomos de carbono y R_2 representa H; y
- un lipo-quito-oligosacárido de fórmula (I) en donde $n = 2$, R_1 representa una cadena de ácido graso monoinsaturado que contiene 18 átomos de carbono y R_2 representa SO_3H .

15

2. La mezcla de la reivindicación 1, caracterizada por que comprende además:

- un lipo-quito-oligosacárido de fórmula (I) en donde $n = 3$, R_1 representa una cadena de ácido graso saturado que contiene 16 átomos de carbono y R_2 representa H, que representa 10% del lipo-quito-oligosacárido total de fórmula (I) en donde $n = 2$ o 3, R_1 representa una cadena de ácido graso saturado que contiene 16 átomos de carbono y R_2 representa H;
- un lipo-quito-oligosacárido de fórmula (I) en donde $n = 3$, R_1 representa una cadena de ácido graso saturado que contiene 16 átomos de carbono y R_2 representa SO_3H , que representa 10% del lipo-quito-oligosacárido total de fórmula (I) en donde $n = 2$ o 3, R_1 representa una cadena de ácido graso saturado que contiene 16 átomos de carbono y R_2 representa SO_3H ;
- un lipo-quito-oligosacárido de fórmula (I) en donde $n = 3$, R_1 representa una cadena de ácido graso monoinsaturado que contiene 18 átomos de carbono y R_2 representa H, que representa 10% del lipo-quito-oligosacárido total de fórmula (I) en donde $n = 2$ o 3, R_1 representa una cadena de ácido graso monoinsaturado que contiene 18 átomos de carbono, y R_2 representa H; y
- un lipo-quito-oligosacárido de fórmula (I) en donde $n = 3$, R_1 representa una cadena de ácido graso monoinsaturado que contiene 18 átomos de carbono y R_2 representa SO_3H , que representa 10% del lipo-quito-oligosacárido total de fórmula (I) en donde $n = 2$ o 3, R_1 representa una cadena de ácido graso monoinsaturado que contiene 18 átomos de carbono y R_2 representa SO_3H .

20

25

30

35

3. El uso de una mezcla de lipo-quito-oligosacáridos de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, para estimular la micorrización de una planta.

4. El uso de una mezcla de lipo-quito-oligosacáridos de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, para estimular el desarrollo del sistema radicular de una planta.

5. El uso de una mezcla de lipo-quito-oligosacáridos de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, como aditivo para la producción de un inoculante micorrízico arbuscular.

40

6. El uso de una mezcla de cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, caracterizado por que dicha mezcla de lipo-quito-oligosacáridos se usa a una concentración de 10^{-5} a 10^{-12} M.

7. El uso de una mezcla de la reivindicación 6, caracterizado por que dicha mezcla de lipo-quito-oligosacáridos se usa a una concentración de 10^{-7} a 10^{-10} M.

8. El uso de una mezcla de la reivindicación 7, caracterizado por que dicha mezcla de lipo-quitto-oligosacáridos se usa a una concentración de 10^{-8} a 10^{-10} M.

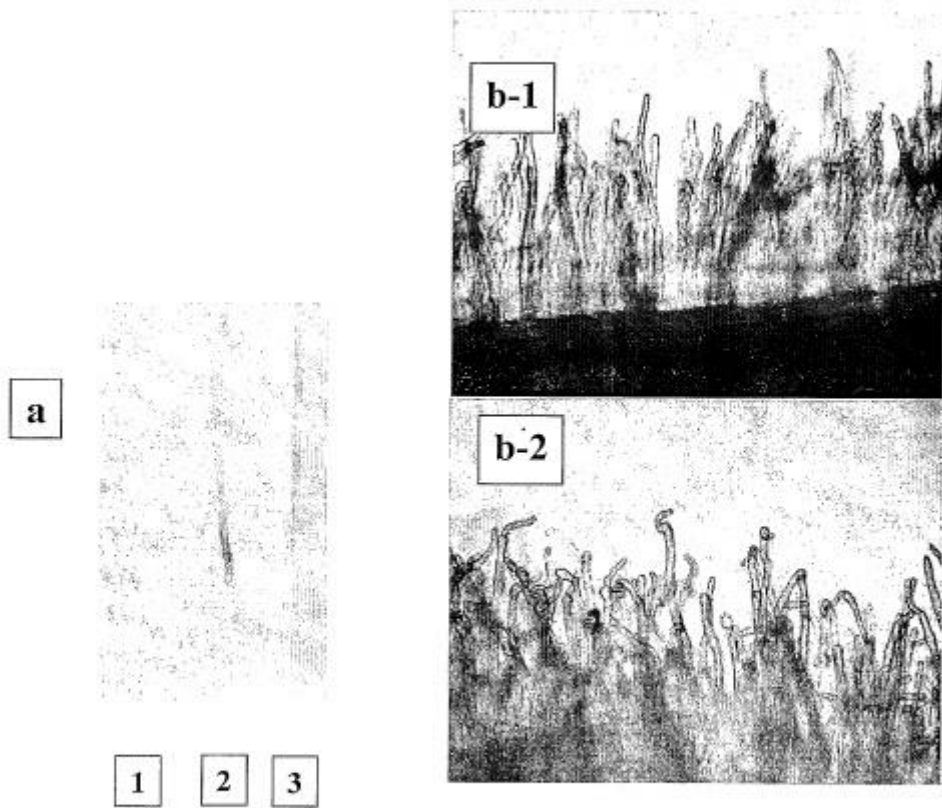


FIGURA 1

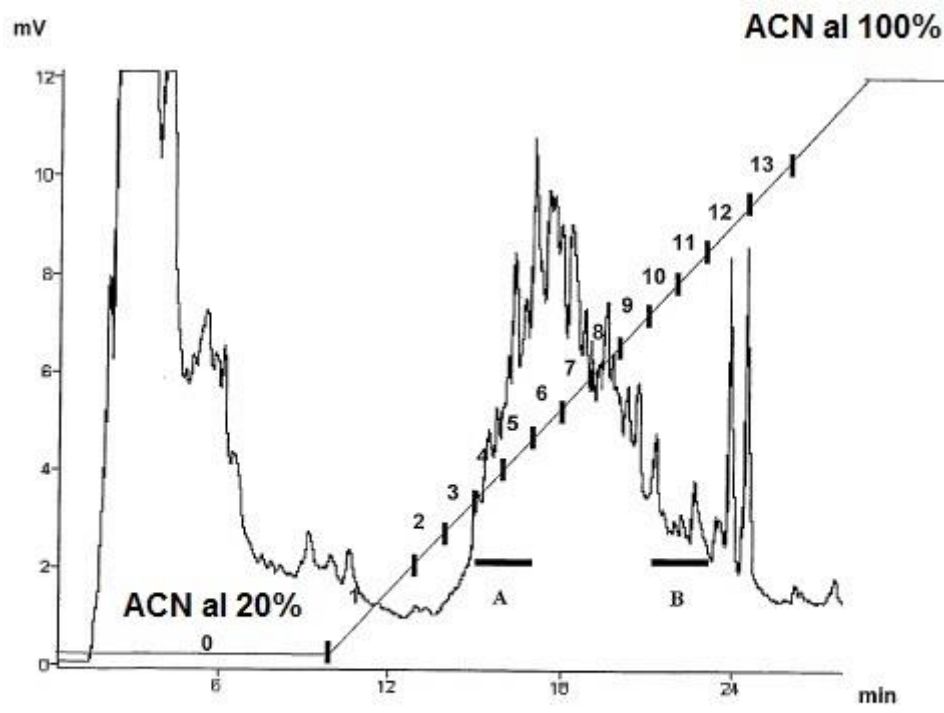


FIGURA 2

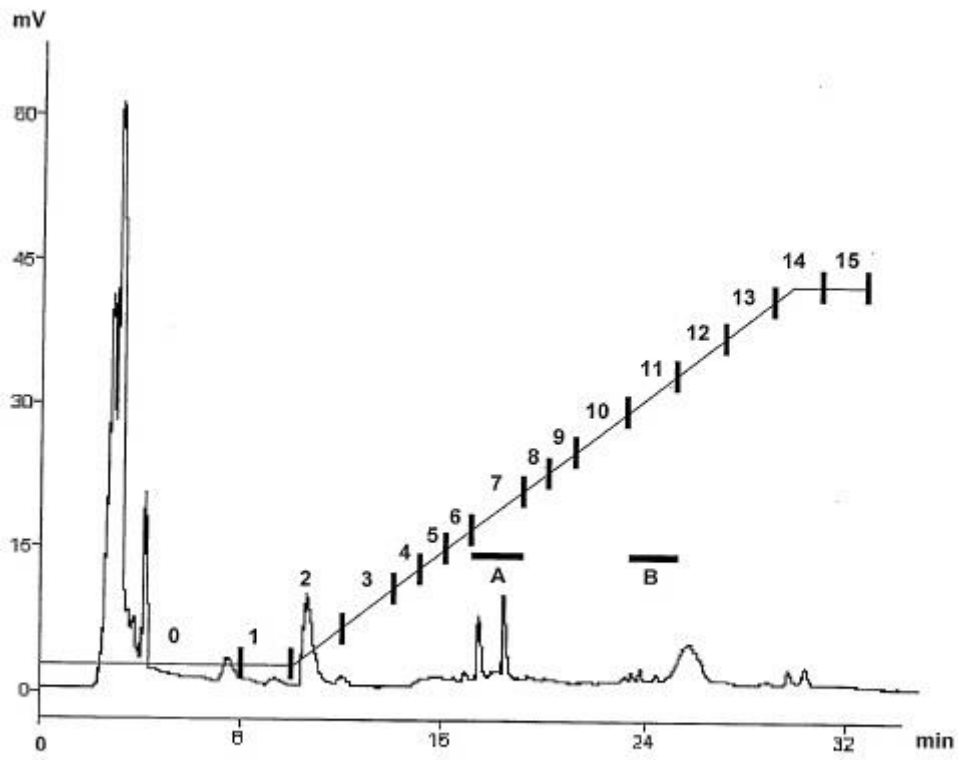


FIGURA 3

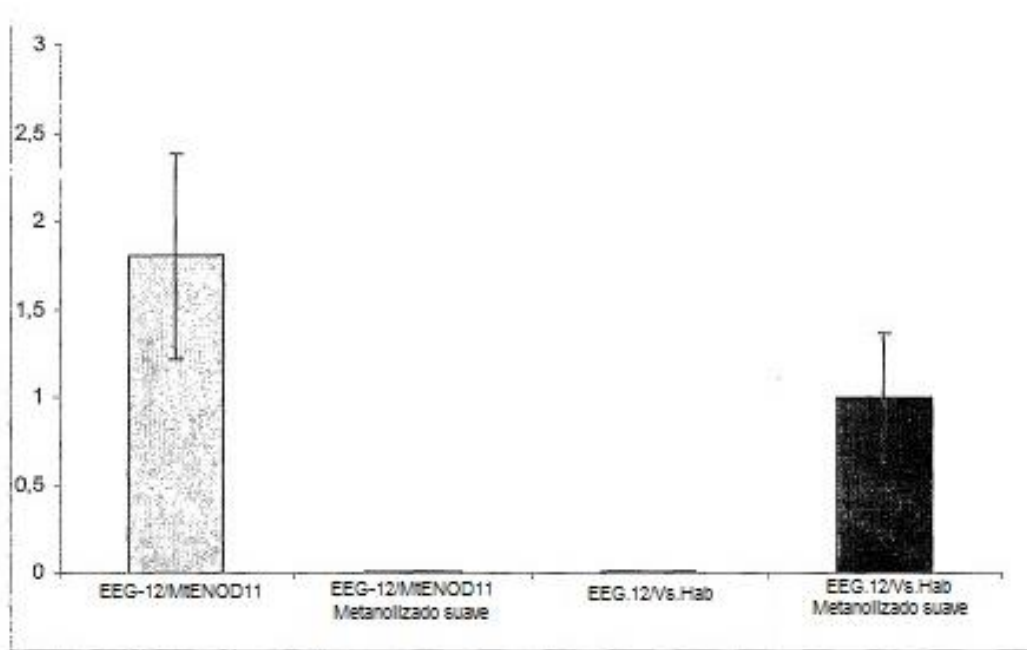


FIGURA 4

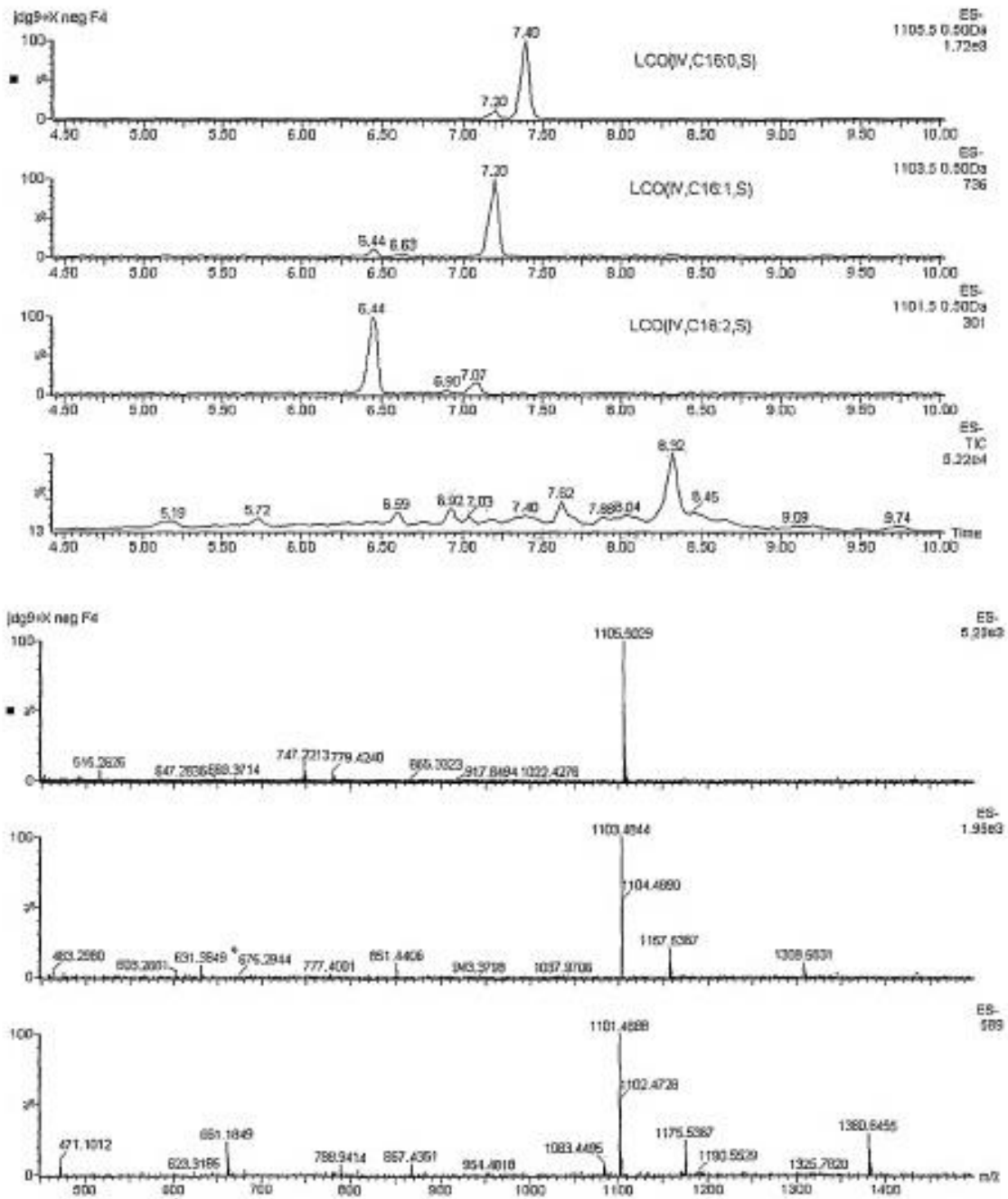


FIGURA 5

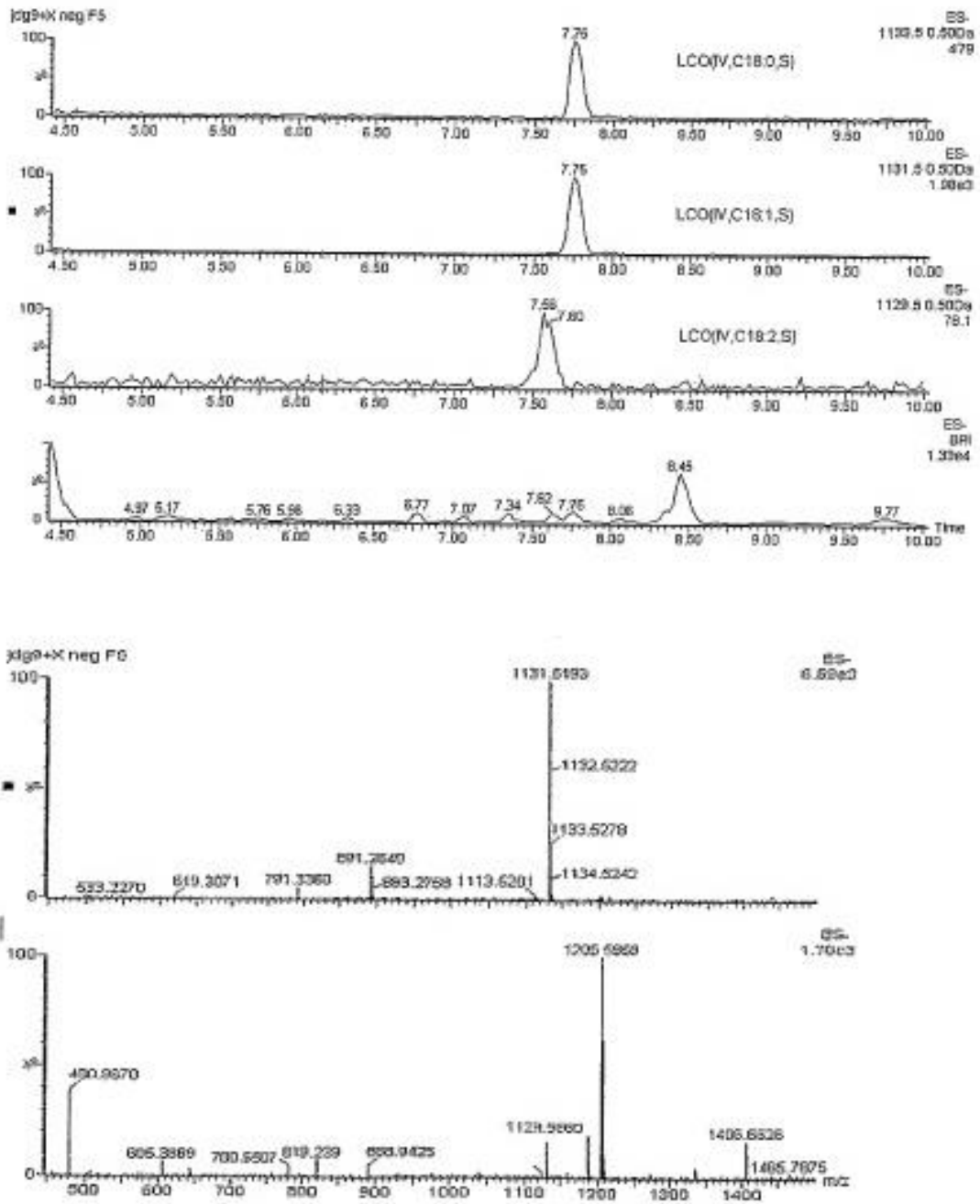


FIGURA 6

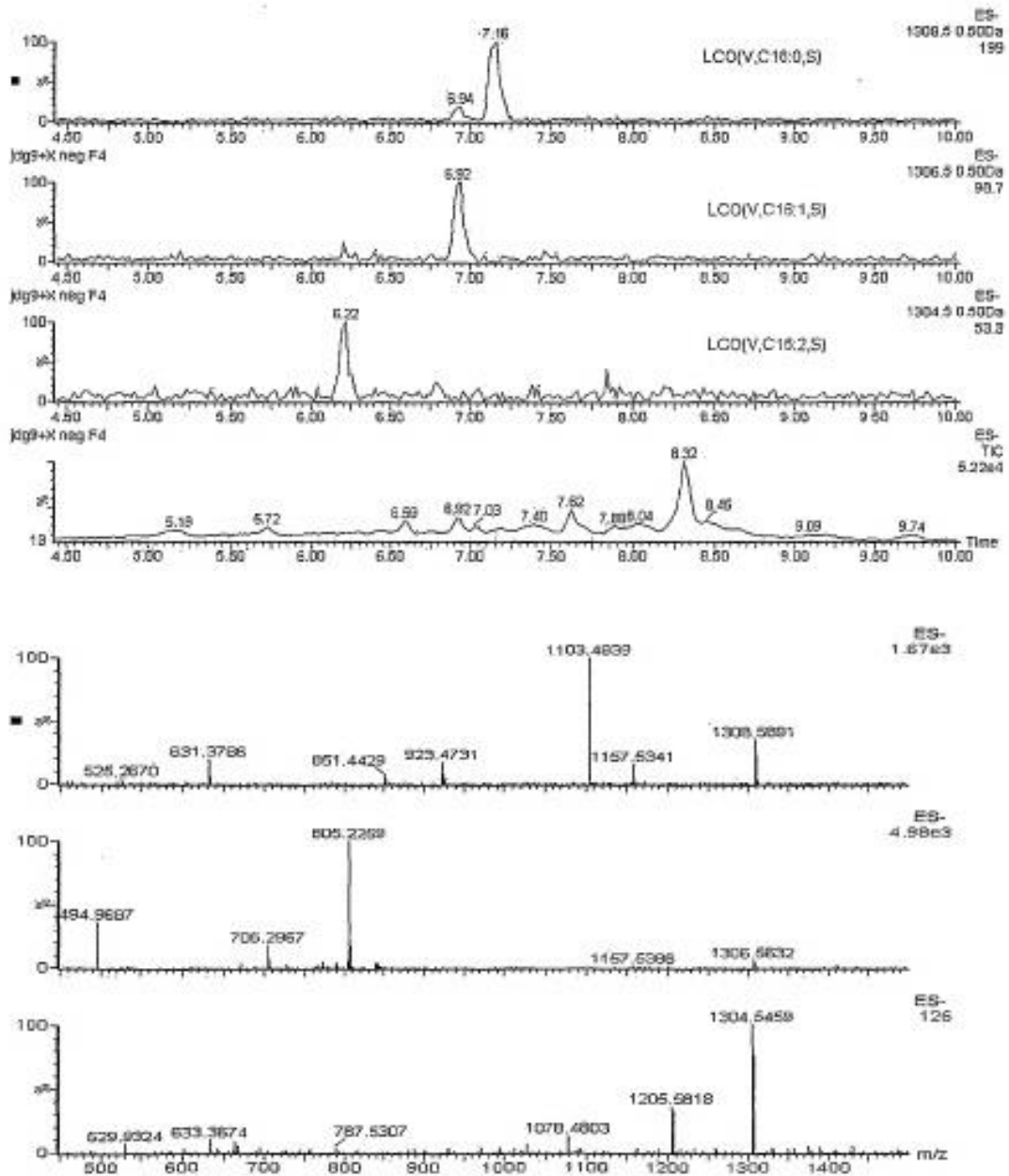


FIGURA 7

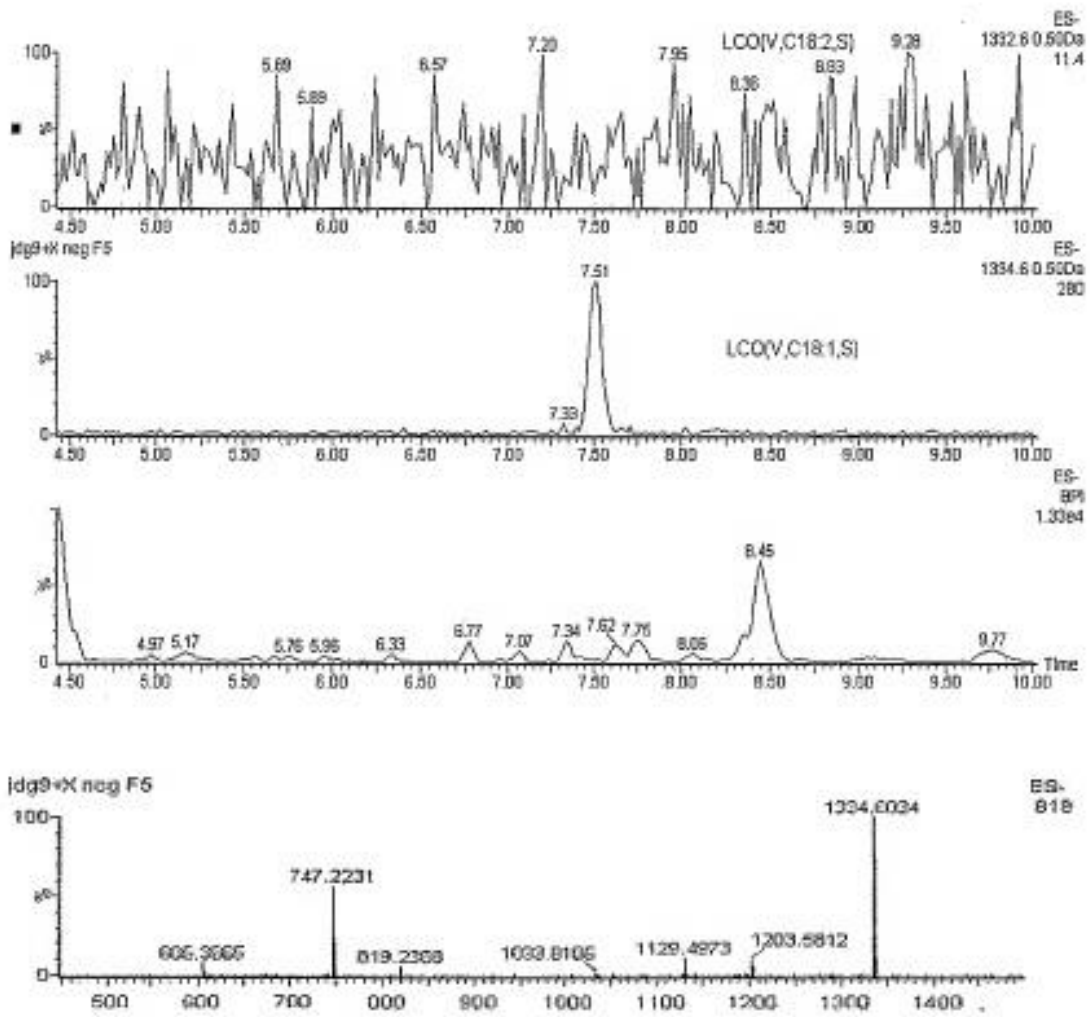


FIGURA 8

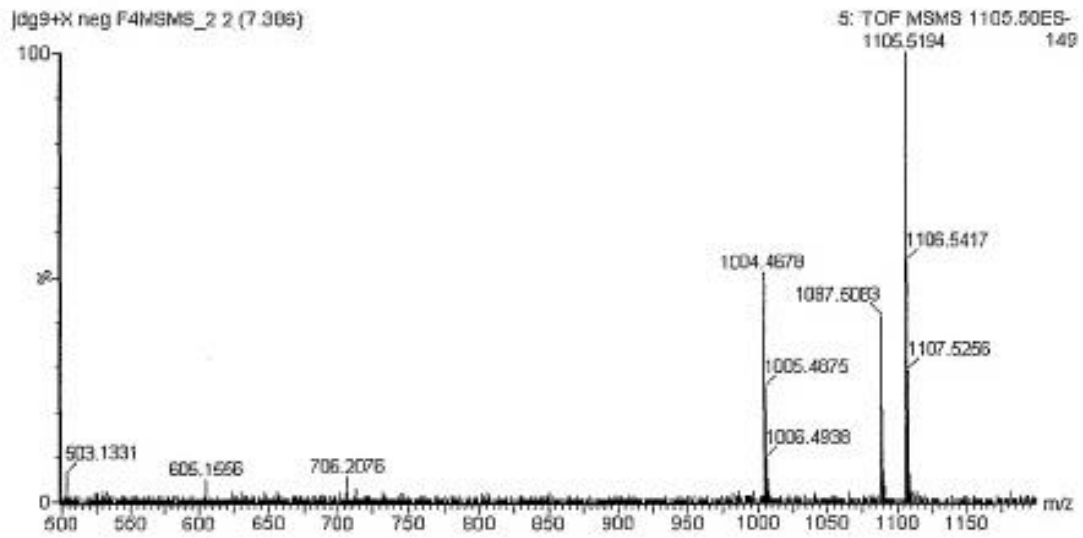
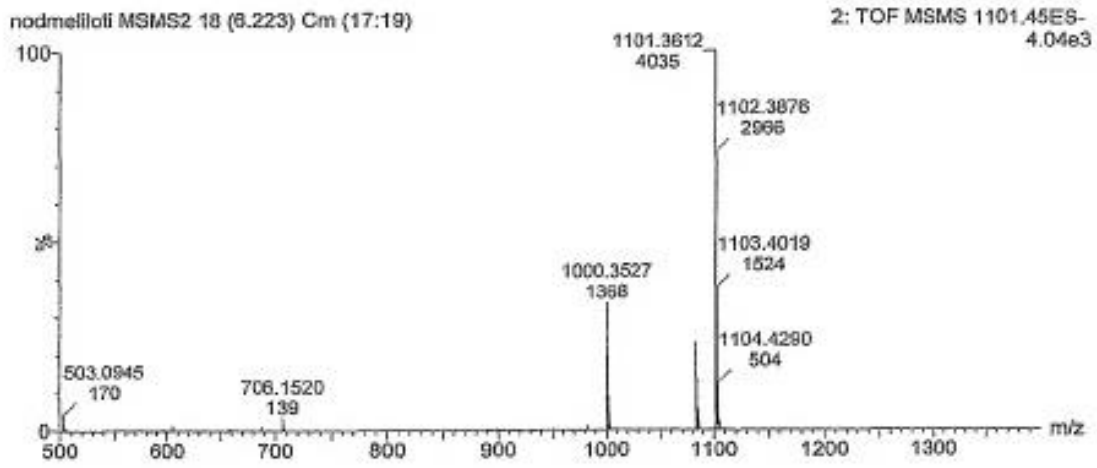


FIGURA 9

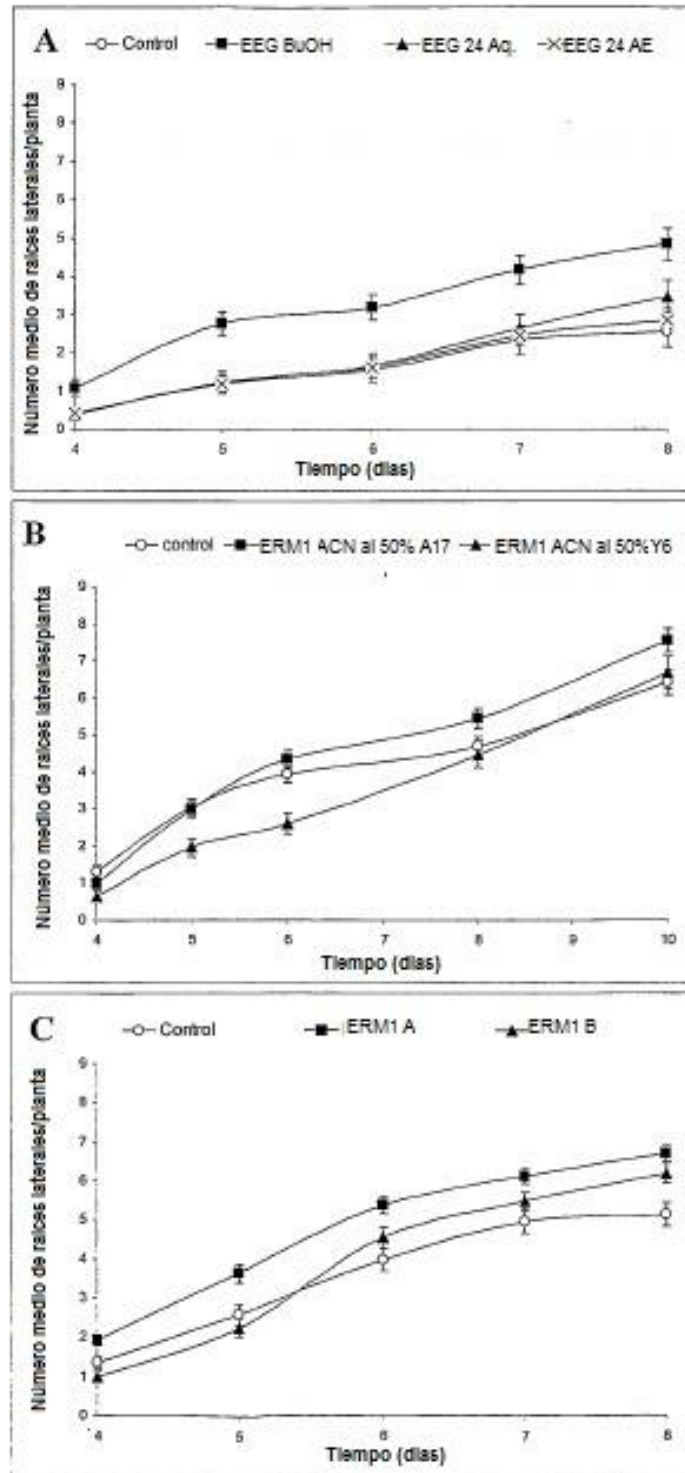
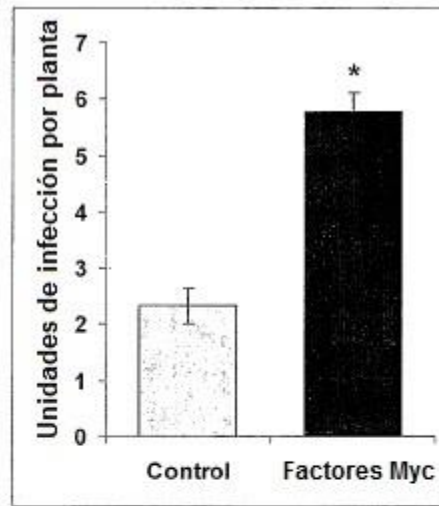


FIGURA 10

a



b

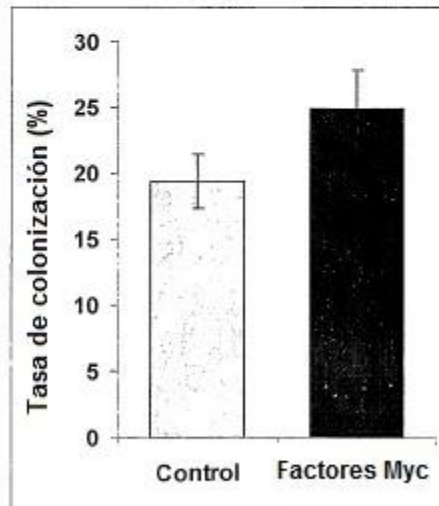
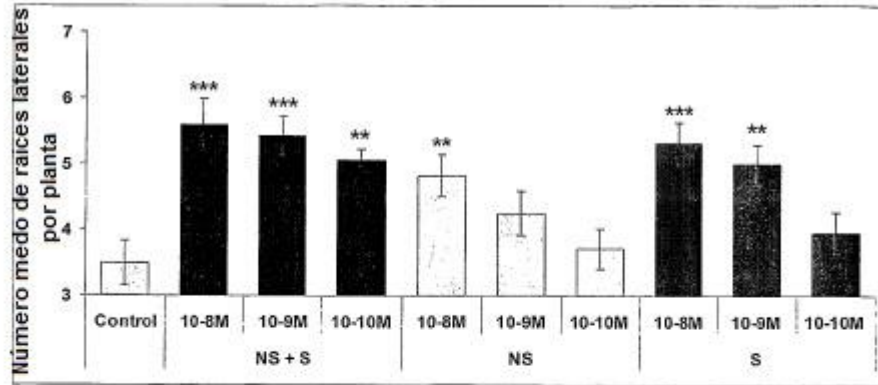


FIGURA 11

a



b

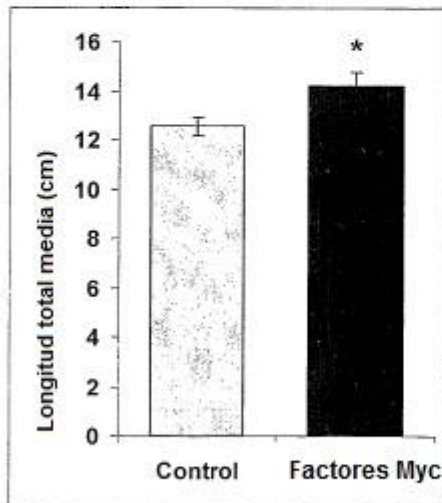


FIGURA 12

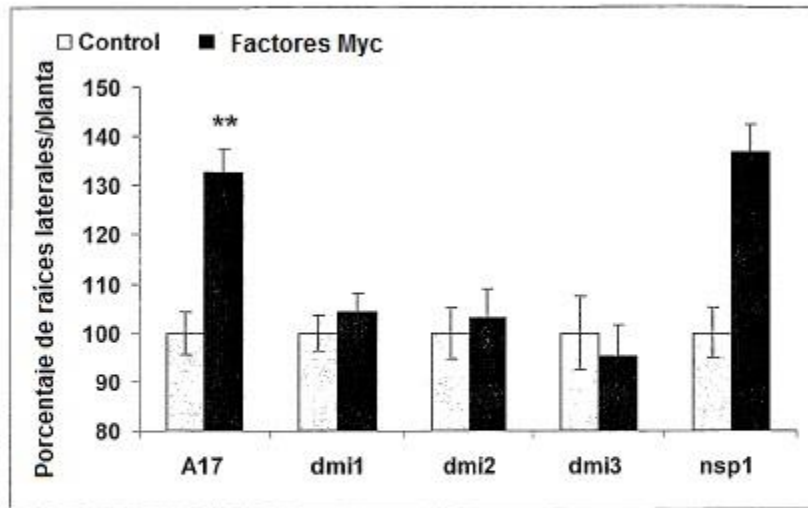
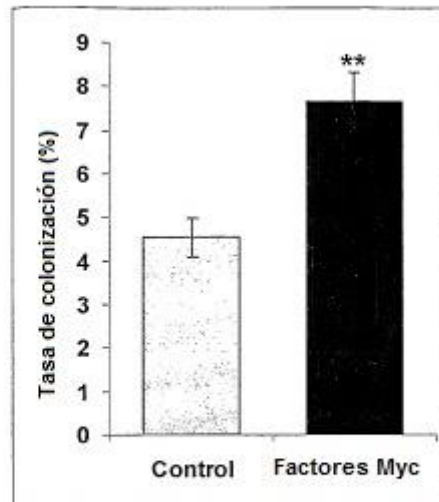


FIGURA 13

a



b

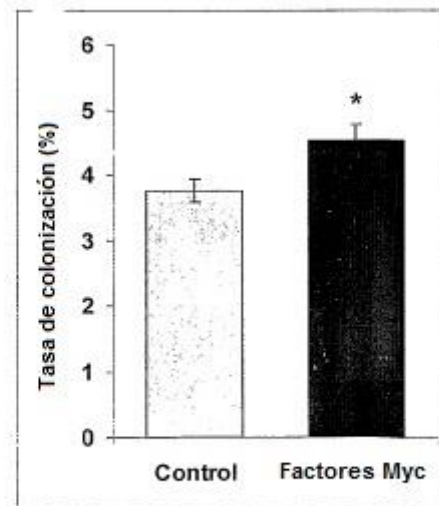


FIGURA 14

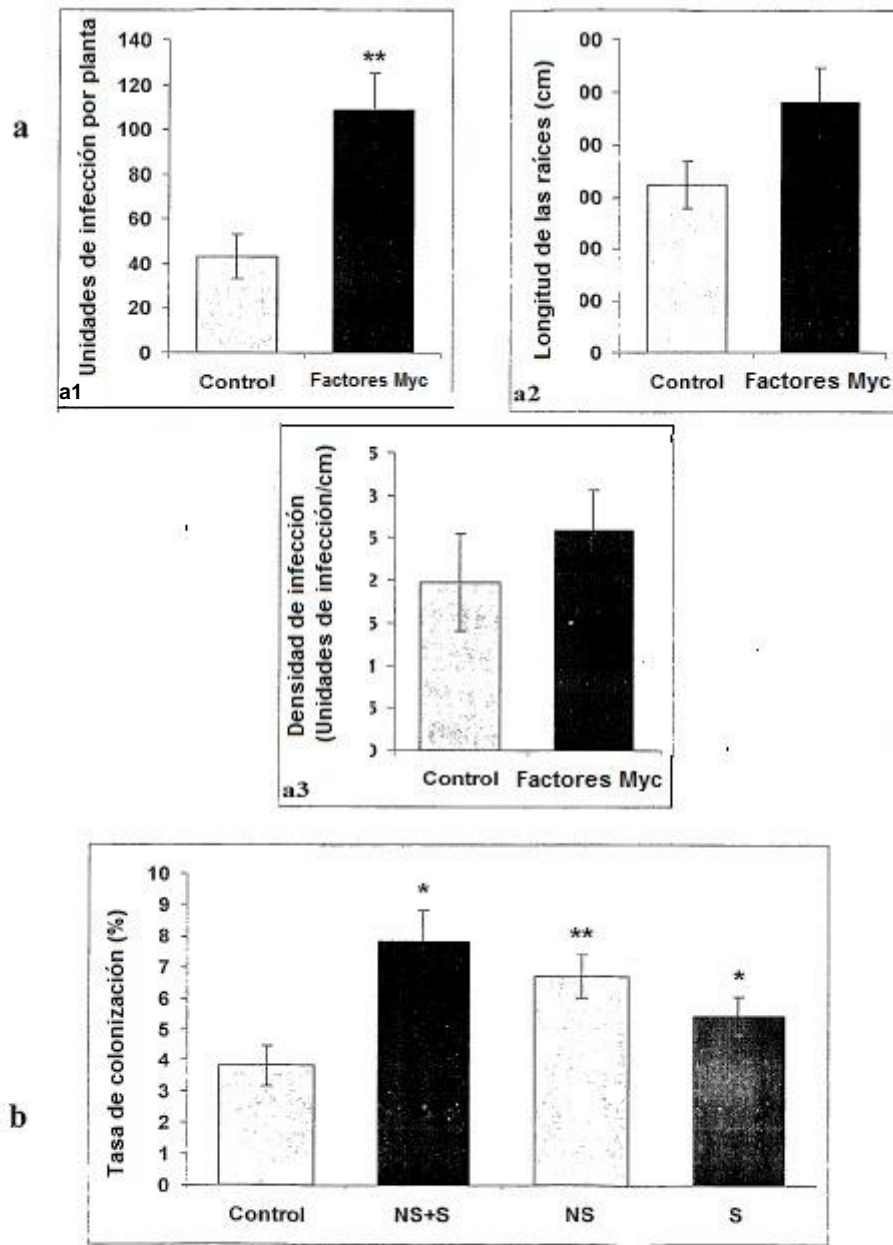


FIGURA 15

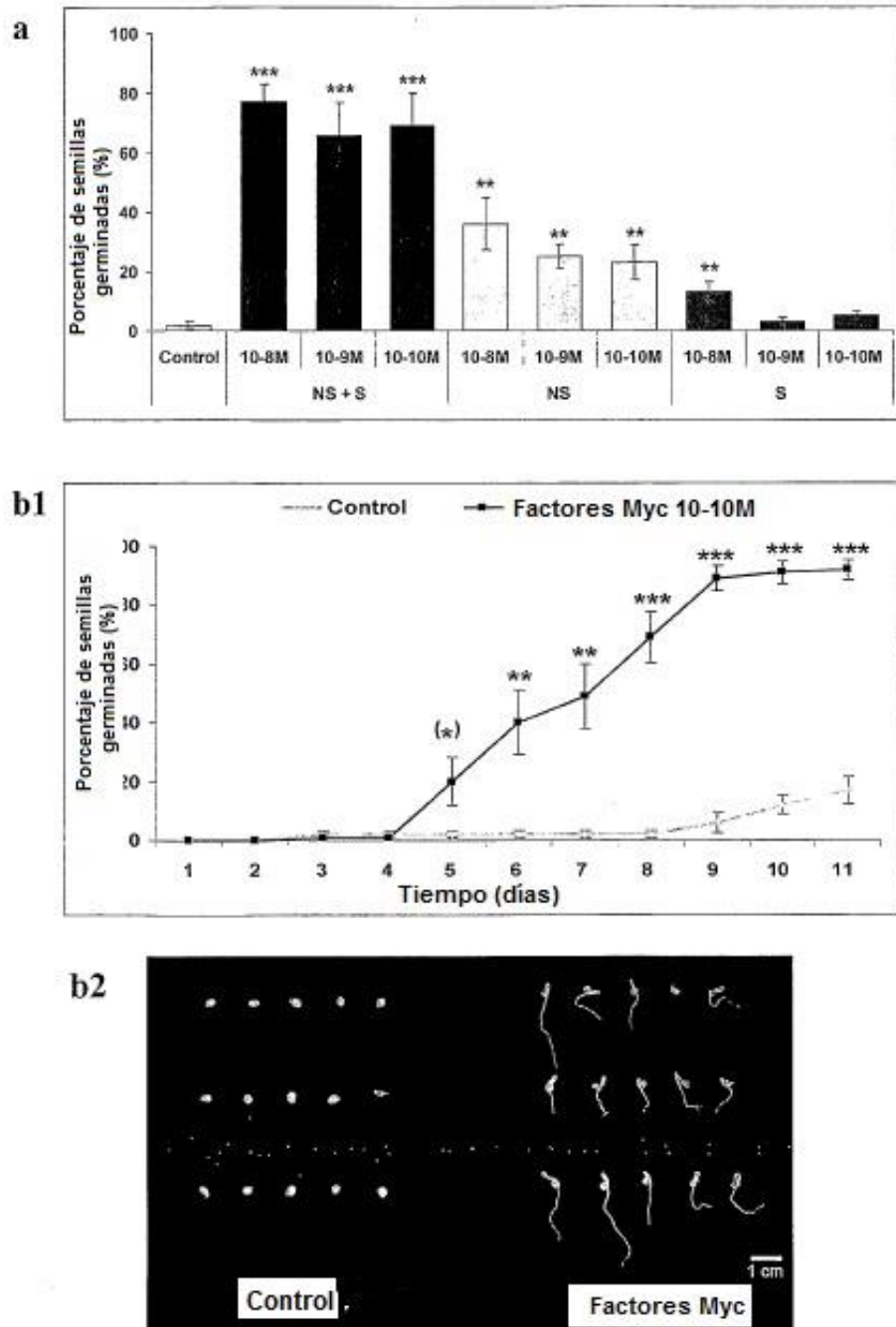


FIGURA 16