

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 779 303**

51 Int. Cl.:

A01N 63/04 (2006.01)

A01H 5/10 (2008.01)

A01P 21/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.11.2014 PCT/US2014/064411**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.05.2015 WO15069938**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.11.2014 E 14860187 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.12.2019 EP 3068212**

54 Título: **Endófitos fúngicos para mejorar el rendimiento de los cultivos y la protección contra plagas**

30 Prioridad:

06.11.2013 US 201361900935 P
06.11.2013 US 201361900929 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
14.08.2020

73 Titular/es:

THE TEXAS A&M UNIVERSITY SYSTEM (100.0%)
3369 Tamu
College Station, 77843-3369, US

72 Inventor/es:

SWORD, GREGORY, A.

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 779 303 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Endófitos fúngicos para mejorar el rendimiento de los cultivos y la protección contra plagas

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a endófitos fúngicos de cultivos agrícolas para mejorar el rendimiento y/o para la protección contra plagas.

10 **Descripción de la técnica relacionada**

Los endófitos fúngicos son hongos que colonizan internamente los tejidos vegetales sin causar daños o enfermedades evidentes. Los endófitos fúngicos particulares, tales como las micorrizas, sobreviven dentro de varios tejidos de la planta hospedadora, colonizando a menudo los espacios intercelulares de las hojas, los tallos, las flores o las raíces del hospedador. Las relaciones simbióticas endófito-hospedador pueden proporcionar varios beneficios al estado físico de la planta hospedadora, tales como la mejora de la nutrición y/o el aumento de la tolerancia a la sequía. Las micorrizas colonizadoras de la raíz sobreviven de los carbohidratos fotosintéticos de la planta y, a cambio, ayudan en la solubilización y absorción de agua y minerales al hospedador, lo que puede llevar a la promoción de la germinación de semillas y el crecimiento de las plantas. Adicionalmente, la asociación de un endófito fúngico con una planta hospedadora puede proporcionar tolerancia a varios estreses bióticos y abióticos. Se cree que el crecimiento, la promoción y la protección del estado físico se logran a través de múltiples propiedades beneficiosas de la asociación endófito-hospedador. Por ejemplo, los organismos endofíticos pueden producir sustancias reguladoras del crecimiento para inducir la producción de biomasa y alcaloides u otros metabolitos. Adicionalmente, los endófitos fúngicos pueden suprimir o competir directamente con los microbios causantes de enfermedades, protegiendo a la planta de posibles patógenos.

Ek-Ramos et al. (2013) Spatial and Temporal Variation in Fungal Endophyte Communities Isolated from Cultivated Cotton (*Gossypium hirsutum*) (Plos one, volumen 8, número 6) publicó un estudio de los diversos endófitos detectados en las hojas de las plantas de algodón. Los autores tomaron muestras de múltiples variedades de algodón en Texas, EE. UU. y probado la variación temporal y espacial en la diversidad de hongos endófitos y la composición de la comunidad, así como las diferencias asociadas con las prácticas agrícolas orgánicas y convencionales. Los autores documentaron que no se detectaron diferencias en la riqueza o diversidad de especies endófitas entre las diferentes variedades de algodón, pero detectaron diferencias con el tiempo y en diferentes tejidos vegetales. No se observaron patrones consistentes de similitud comunitaria asociados con la variedad, la región, práctica agrícola, el tiempo de la temporada o el tipo de tejido independientemente de las medidas de similitud de la comunidad ecológica utilizada. Los autores especulan que sus resultados indicaron que las comunidades endófitas fúngicas locales pueden verse afectadas por la época del año y el tejido vegetal, pero la composición específica de la comunidad varía de un sitio a otro.

40 **Compendio de la invención**

En un aspecto, la invención proporciona un método para mejorar un rasgo en una planta de algodón, comprendiendo el método: poner en contacto una semilla agrícola de dicha planta de algodón con una formulación que comprende endófitos fúngicos filamentosos facultativos purificados, formadores de esporas, de al menos un *Dothideomycetes* no de *Alternaria* seleccionado de *Cladosporium cladosporioides*, *Cladosporium uredinicola* y *Epicoccum nigrum* y en donde los endófitos capaces de producir sustancias que son beneficiosas para las plantas o perjudiciales para las plagas o ambas, y en donde los endófitos están presentes en la formulación en una cantidad eficaz para modular las frecuencias de colonización de los endófitos del género *Alternaria* que son naturales de la planta de algodón, y para proporcionar un beneficio a la planta de algodón en comparación con una planta de algodón cultivada a partir de una semilla no tratada con los endófitos fúngicos facultativos de *Dothideomycetes* no de *Alternaria*, en donde el beneficio es una mayor resistencia al estrés por sequía.

En un aspecto adicional, el beneficio para las plantas de algodón derivadas de la semilla puede ser un aumento del rendimiento en una población de dichas plantas en un 5 %, en un 10 %, en un 15 %, en un 20 %, en un 30 %, en un 40 %, o en un 45 % en relación con una población de referencia de plantas de algodón cultivadas a partir de semillas no tratadas con los endófitos facultativos fúngicos de *Dothideomycetes* o una reducción de la pérdida de rendimiento en una población de dichas plantas en más del 40 %, en un 30 %, en un 20 %, en un 10 %, 5 % o 1 % en relación con una población de referencia de plantas de algodón cultivadas a partir de semillas no tratadas con endófitos fúngicos facultativos de *Dothideomycetes*.

En un aspecto adicional, el endófito puede estar presente en la formulación en una cantidad eficaz para obtener al menos un 50 % de colonización de las hojas, tallos o raíces de una planta de algodón cultivada a partir de la semilla.

En un aspecto adicional, la formulación puede comprender al menos 1, 2 o 3 especies de endófitos fúngicos facultativos.

En un aspecto adicional, el método puede comprender además envasar las semillas en contacto en un recipiente.

5 En un aspecto adicional, el método comprende además el crecimiento de una población de dichas plantas de algodón, en donde el beneficio se mide a nivel de la población, en comparación con una población de plantas de referencia.

10 La presente invención también proporciona una combinación sintética de semilla de algodón y una composición que comprende endófitos fúngicos filamentosos facultativos purificados, formadores de esporas, de al menos una especie, en donde los endófitos son *Dothideomycetes* no de *Alternaria* seleccionado de *Cladosporium cladosporioides*, *Cladosporium uredinicola* y *Epicoccum nigrum* capaces de producir sustancias que son beneficiosas para las plantas o perjudiciales para las plagas o ambas, y en donde los endófitos fúngicos facultativos están presentes en la formulación en una cantidad eficaz para modular las frecuencias de colonización de los endófitos del género *Alternaria* que son naturales de la planta de algodón, y para proporcionar un beneficio a la planta de algodón en comparación con una planta de algodón cultivada a partir de una semilla no tratada con los
15 endófitos fúngicos facultativos de *Dothidoemycetes* no de *Alternaria*, en donde el beneficio es una mayor resistencia al estrés por sequía.

20 En otro aspecto de la combinación sintética, el endófito está presente en la combinación sintética en una cantidad eficaz para obtener al menos un 50 % de colonización de las hojas, tallos o raíces de una planta de algodón cultivada a partir de la semilla.

En otro aspecto, la combinación sintética puede comprender al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 cepas de endófitos.

25 En otro aspecto adicional de la combinación sintética, el beneficio para las plantas de algodón derivadas de la semilla puede ser un aumento del rendimiento en una población de dichas plantas en un 5 %, en un 10 %, en un 15 %, en un 20 %, en un 30 %, en un 40 %, o en un 45 % en relación con una población de referencia de plantas de algodón cultivadas a partir de semillas no tratadas con los endófitos facultativos fúngicos de *Dothidoemycetes* o una
30 reducción de la pérdida de rendimiento en una población de dichas plantas en más del 40 %, 30 %, 20 %, 10 %, 5 % o 1 % en relación con una población de referencia de plantas de algodón cultivadas a partir de semillas no tratadas con endófitos fúngicos facultativos de *Dothidoemycetes*.

Breve descripción de los dibujos

35 **FIG. 1:** Las eficacias de colonización demuestran que los endófitos pueden manipularse en el campo. Se muestran las medias +/- EE de las frecuencias de colonización endófitica de plántulas de algodón en condiciones de campo inoculadas por tratamientos con diferentes concentraciones de esporas de *Paecilomyces lilacinus* (izquierda) o de *Beauveria bassiana* (derecha). **FIG. 2:** El hongo endófitico *Paecilomyces lilacinus* afecta negativamente a la reproducción del nemátodo del nudo radicular (*Meloidogyne incognita*) cuando está presente como un endófito en algodón.
40

A altos niveles de inóculo de nemátodos (10.000 huevos), el endófito redujo la producción de huevos en las plantas después del tratamiento de semillas con soluciones que contienen 10^6 o 10^7 esporas/ml en comparación con las semillas control no tratadas. A niveles de inóculo de campo (2000 huevos), la presencia del endófito redujo significativamente la producción de agallas y huevos a ambas concentraciones de tratamiento de semillas.

45 **FIG. 3:** El endófito *Chaetomium globosum* afecta negativamente a la reproducción de nemátodos del nudo radicular. Efectos negativos del endófito *Chaetomium globosum* sobre la formación de agallas por el nemátodo del nudo radicular y la producción de huevos después de los tratamientos de remojo de semillas de algodón en soluciones de 0 (controles no tratados), 10^6 y 10^8 esporas/ml. Las plántulas se inocularon con 1000 huevos de nemátodos y se cultivaron en el invernadero. La producción de huevos al incubar nemátodos que infectaron con éxito las plántulas se cuantificó 60 días después.
50

FIG. 4A, 4B: El efecto de los hongos endófitos sobre la reproducción de los áfidos del algodón. (*Aphis gossypii*). La Fig. 4A demuestra que la presencia de *Beauveria bassiana* en el algodón afecta negativamente a la reproducción de los áfidos del algodón. La Fig. 4B demuestra que la presencia de *Paecilomyces lilacinus* en el algodón afecta negativamente a la reproducción de los áfidos del algodón.

55 **FIG. 5:** Efectos de *Chaetomium globosum* sobre los áfidos del algodón. El endófito *Chaetomium globosum* en el algodón afecta negativamente a la tasa de crecimiento de la población de áfidos del algodón, como lo demuestra la reproducción reducida después de 14 días en plantas colonizadas con endófito frente a las plantas de control. Las plantas de algodón se cultivaron a partir de semillas tratadas mediante remojo en soluciones de esporas de 0 (control), 10^6 (bajo) y 10^8 (alto) esporas/ml.

60 **FIG. 6A, 6B:** El efecto de los hongos endófitos *Beauveria bassiana* y *Paecilomyces lilacinus* sobre la chinche opaca de las plantas occidentales *Lygus hesperus* (Miridae). La Fig. 6A demuestra que *Beauveria bassiana* y *Paecilomyces lilacinus* afectan negativamente la selección de plantas hospedadoras de la chinche opaca de las plantas occidentales cuando están presentes como endófitos en el algodón. La Fig. 6B demuestra que *Beauveria bassiana* y *Paecilomyces lilacinus* afectan negativamente al comportamiento de selección de la planta
65 hospedadora de las chinches opacas de las plantas occidentales cuando están presentes como endófitos en el algodón.

FIG. 7A, 7B: El efecto de los hongos endófitos. *Beauveria bassiana* y *Paecilomyces lilacinus* en chinches verdes apestosas del sur (*Nezara viridula* (Pentatomidae)). La Fig. 7A demuestra que *Beauveria bassiana* y *Paecilomyces lilacinus* afectan negativamente a la selección de plantas hospedadoras de chinches verdes apestosas del sur cuando están presentes como endófitos en el algodón. La figura 7B demuestra que *Beauveria bassiana* y *Paecilomyces lilacinus* afectan negativamente el comportamiento de selección de la planta hospedadora de las chinches apestosas del sur cuando están presente como endófitos en el algodón.

FIG. 8: Se observó una reducción en el daño de las cápsulas de algodón durante los ensayos de campo. En relación con las plantas de control, los niveles de daño de las cápsulas asociado a los insectos fueron más bajos entre las plantas que fueron tratadas remojando semillas en soluciones de esporas de *Beauveria bassiana* y *Paecilomyces lilacinus* a concentraciones de 10^6 y 10^8 esporas/ml.

FIG. 9: La aplicación foliar de algodón en el campo con esporas de hongos entomopatógenos endofíticos mejora el rendimiento de la planta. Las semillas de algodón (variedad FM1740B2F) tratadas con varios fungicidas típicos (Metalaxil, Triadimenol, Trifloxiestrobina, 2-(Tiocianometiltio)benzotioazol) e insecticidas (Tiodicarb, limidacloprid, Cloropirifós) se plantaron y cultivaron en condiciones de campo. Las plantas se rociaron en la 5ª etapa de hoja verdadera con soluciones acuosas de *Beauveria bassiana* y *Paecilomyces fumosoroseus*. La sacarosa se incluyó (1 % en peso/vol) como un recurso nutricional adicional para los hongos. Se observó una retención significativamente mayor de cápsula de primera posición (desarrolladoras de fruto) en plantas rociadas con *Beauveria bassiana* sin sacarosa y *Paecilomyces fumosoroseus* más sacarosa.

FIG. 10A, 10B: Efectos positivos de los hongos endófitos en el rendimiento de la planta de algodón en condiciones de campo. La Fig. 10A demuestra una tendencia de temporada temprana para una mayor retención de cuadrados en las plantas tratadas frente a las no tratadas. La figura 10B demuestra que se retuvieron significativamente más cápsulas en los grupos de tratamiento con endófitos más adelante en la temporada, en relación con el control. Esto se demuestra con ambas especies de endófito utilizadas y con ambas concentraciones de tratamiento de semillas empleadas (ANOVA de mediciones repetidas: Tiempo, $P < 0,001$; Tiempo*Endófito, $P = 0,045$, Endófito, $P = 0,003$).

FIG. 11: Efectos positivos de los hongos endófitos sobre los rendimientos de la planta de algodón en condiciones de campo. Los datos demuestran que los tratamientos endófitos lograron rendimientos del 25 % más en plantas de algodón tratadas.

FIG. 12: Efectos positivos de los hongos endófitos en el sorgo (a) altura de la planta y (b) biomasa fresca total bajo ensayos de plántulas en la cámara de crecimiento. Los datos mostrados son la altura promedio de la planta (cm) y la biomasa fresca total (g) de $n = 10$ réplicas independientes. Las barras de error representan ± 1 de error estándar. Los tres endófitos fúngicos mejoran ambos rasgos en relación con el control no tratado.

FIG. 13: La modulación en el campo de la colonización endógena de endófitos de algodón endógenos en (a, b) tallos y (c, d) raíces cuando se trata con hongos endófitos *Paecilomyces lilacinus* (a, c) y *Beauveria bassiana* (b, d). Los datos mostrados son un cambio porcentual en la colonización en relación con el control no tratado correspondiente y el tejido vegetal.

FIG. 14: Diferencia porcentual promedio en el rendimiento entre las plantas de algodón tratadas con endófitos y de control ($n = 6$ parcelas replicadas en un campo de tierras secas, College Station, TX) para 15 endófitos fúngicos facultativos y dos variedades de cultivo de algodón; Delta Pine (DP 0912B2RF) y Phytogen (PHY 499WRF). En Delta Pine, 11 de 15 y en Phytogen 14 de 15 endófitos fúngicos facultativos probados mostraron un aumento en el rendimiento en relación con las plantas de algodón no tratadas.

FIG. 15: Diferencia porcentual promedio agregada en el rendimiento entre las plantas de algodón tratadas con endófitos y de control ($n = 6$ parcelas replicadas en un campo de tierras secas, College Station, TX) para 15 endófitos fúngicos facultativos y dos variedades de cultivo de algodón; Delta Pine (DP 0912B2RF) y Phytogen (PHY 499WRF). Las barras representan un intervalo de confianza del 95 % alrededor de la media.

FIG. 16: Diferencia porcentual promedio en el daño por trips (A) y el daño por pulguitas (B) entre las plantas de algodón tratadas con endófitos y de control. El daño por trips se evaluó en la variedad de cultivo Delta Pine (DP 0912B2RF) ($n = 6$ parcelas replicadas en un campo de tierras secas, College Station, TX) para 15 endófitos fúngicos facultativos. 12 de los 15 endófitos fúngicos facultativos probados mostraron una disminución en el daño por trips en relación con las plantas de algodón no tratadas. Se evaluó el daño de la pulguita en plantas de algodón de la variedad de cultivo Phytogen (PHY 499WRF) ($n = 6$ parcelas replicadas en un campo de tierras secas, College Station, TX) para 15 endófitos fúngicos facultativos. 6 de los 15 endófitos fúngicos facultativos probados mostraron una disminución promedio en el daño por pulguitas en comparación con las plantas de algodón no tratadas.

FIG. 17: Rasgo de campo de mitad de temporada medido en junio en el ensayo de tierras secas de (A) longitud de raíz y (B) peso subterráneo. Los datos presentados son el promedio de $n = 10$ réplicas independientes y las barras de error representan \pm uno de error estándar.

FIG. 18: Rasgo de campo de mitad de temporada medido en julio en la prueba de temperatura de la copa (Celsius) en seco para las variedades de cultivo Delta Pine (barras azules) y Phytogen (barras verdes). Los datos presentados son el promedio controlado por bloques de $n = 10$ réplicas independientes, en relación con el gráfico de control y las barras de error representan \pm uno de error estándar.

FIG. 19: Rasgo de campo de mitad de temporada medido en agosto en el ensayo del NDVI en seco para las variedades de cultivo Delta Pine (barras azules) y Phytogen (barras verdes). Los datos presentados son el promedio controlado por bloques de $n = 10$ réplicas independientes, en relación con el gráfico de control y las barras de error representan \pm uno de error estándar.

FIG. 20: Rasgo de campo de mitad de temporada medido en agosto en la retención de cuadrados en primera

posición en seco para las variedades de cultivo Delta Pine (barras azules) y Phyton (barras verdes). Los datos presentados son el promedio controlado por bloques de $n = 10$ réplicas independientes, en relación con el gráfico de control y las barras de error representan \pm uno de error estándar.

FIG. 21: Rasgo de campo de mitad de temporada medido en agosto en el ensayo de la altura de la planta (cm) en seco para las variedades de cultivo Delta Pine (barras azules) y Phyton (barras verdes). Los datos presentados son el promedio controlado por bloques de $n = 10$ réplicas independientes, en relación con el gráfico de control y las barras de error representan \pm uno de error estándar.

FIG. 22: Rasgo de campo de mitad de temporada medido en julio en la prueba de altura de la planta (cm) en seco para las variedades de cultivo Delta Pine (barras azules) y Phyton (barras verdes). Los datos presentados son el promedio controlado por bloques de $n = 10$ réplicas independientes, en relación con el gráfico de control y las barras de error representan \pm uno de error estándar.

FIG. 23: Imagen que muestra un aumento de la biomasa en las plantas tratadas con endófitos (mitad derecha de la imagen) en comparación con el control no tratado (mitad izquierda de la imagen).

FIG. 24: Tabla que muestra el tiempo para marchitarse después del estrés por sequía en días para plantas cultivadas a partir de semillas tratadas con endófitos fúngicos y de control.

FIG. 25: Tabla que muestra el tiempo para la muerte después del estrés por sequía en días para plantas cultivadas a partir de semillas tratadas con endófitos fúngicos y de control.

Descripción detallada de la invención

Los hongos endófitos son ubicuos en la naturaleza, infectando prácticamente a todas las plantas tanto en ecosistemas naturales como agronómicos. Las plantas comúnmente albergan diversos hongos que viven dentro de sus tejidos como endófitos asintomáticos que pueden proporcionar protección contra varios factores de estrés bióticos y abióticos. La presente divulgación describe ciertos endófitos fúngicos que pueden ser patógenos, parásitos o antagonistas de patógenos, insectos y plagas de nemátodos en plantas, proporcionando beneficios de salud y rendimiento a las plantas de cultivo. Las relaciones simbióticas endófito-hospedador pueden proporcionar varios beneficios a la salud general y al estado físico de la planta hospedadora, tales como la mejora de la nutrición, una mayor tolerancia a la sequía y/o la defensa química de posibles herbívoros y, a menudo, una mayor producción de biomasa. Las micorrizas colonizadoras de la raíz sobreviven de los carbohidratos fotosintéticos de la planta y, a cambio, ayudan en la solubilización y absorción de agua y minerales al hospedador, lo que puede llevar a la promoción de la germinación de semillas y el crecimiento de las plantas. Adicionalmente, la asociación de un endófito fúngico con una planta hospedadora a menudo proporciona protección frente a patógenos o tolerancia para varios estreses bióticos y abióticos, tales como la infestación de insectos, el pasto, deficiencias de agua o de nutrientes, estrés por calor, toxicidad por sal o aluminio y temperaturas de congelación. Se cree que el crecimiento, la promoción del estado físico y la protección se logran a través de múltiples propiedades beneficiosas de la asociación endófito-hospedador.

Estos endófitos fúngicos proporcionados en la Tabla 1 se recolectaron originalmente como endófitos fúngicos del algodón. Estos hongos endófitos pueden inocularse para vivir dentro del algodón utilizando la demanda de semillas, hojas o suelo y presentan efectos sorprendentemente beneficiosos al proporcionar protección contra la infestación de plagas. Las plagas pueden ser plagas de nemátodos y/o plagas de insectos. Además, estos hongos endófitos tienen un efecto beneficioso inesperado sobre el rendimiento del algodón.

Se describe la aplicación de hongos beneficiosos para establecerlos endófiticamente dentro de las plantas de cultivo para mejorar el rendimiento y la productividad de la planta al tiempo que confiere protección contra las plagas de insectos y nemátodos. En este sentido, la presente divulgación supera las limitaciones de la técnica anterior, tales como la susceptibilidad de los hongos a la degradación por la luz UV, la desecación o el calor después de la exposición al medio ambiente tras la aplicación como suelo inundante o biopesticida foliar. La inoculación y el establecimiento endofítico de los hongos dentro de la planta los protege de la luz ultravioleta, la desecación y temperaturas desfavorables, mientras albergan los hongos en los tejidos de las plantas que están destinados a proteger. La introducción de hongos para vivir endofíticamente dentro de las plantas no requiere modificación genética de la planta o de los microorganismos, y los hongos en sí pueden ser una fuente de productos naturales. En diversas realizaciones, el inoculante fúngico puede formularse y aplicarse, por ejemplo, como tratamiento de semillas, en aplicaciones de surcos, antes o durante la siembra, o como aplicación foliar después de la germinación de la planta, y después de la inoculación, los endófitos fúngicos proporcionan efectos protectores durante toda la temporada y mayores rendimientos de los cultivos (aproximadamente un 25 % más). En determinadas realizaciones, el aumento del rendimiento es de aproximadamente el 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 30 %, 40 %, 45 %, 50 %, o más del 50 % en relación con un cultivo al que no se le ha aplicado una composición endófito. En realizaciones adicionales, el aumento del rendimiento es el resultado de la reducción de la pérdida que comprende la reducción de la pérdida debido a la infestación de insectos o la sequía y la pérdida es inferior al 50 %, 40 %, 30 %, 20 %, 10 %, 5 % o 5 % en relación con un cultivo al que no se le ha aplicado composición endófito. En determinadas realizaciones, el cultivo es algodón y la reducción de la pérdida comprende un daño reducido en las cápsulas de algodón.

Por lo tanto, en un aspecto, la divulgación proporciona una combinación (también denominada "simbionte") de una planta hospedadora y un endófito que permite mejorar las propiedades agronómicas de las plantas hospedadoras. La combinación se puede lograr por inoculación artificial, aplicación u otra infección de una planta hospedadora o

semillas de la misma, tal como una planta de algodón o semilla de la misma, o tejidos de plantas hospedadoras, con una cepa de endófitos fúngicos. Por lo tanto, una combinación lograda por tal inoculación se denomina combinación "sintética", composición sintética, revestimiento sintético de semillas, composición de semillas sintética resistente a plagas. El endófito fúngico puede estar presente en espacios intercelulares dentro del tejido vegetal, tal como la raíz.

5 Su presencia también puede ocurrir o también puede mantenerse dentro de una planta o población de plantas mediante injerto u otros métodos de inoculación como el tratamiento de semillas, plantas o partes de las mismas con micelios endófitos o esporas endófitas. En determinadas realizaciones, la planta, parte de la planta, las raíces, las semillas o las hojas se esterilizan para eliminar microorganismos antes de aplicar el endófito. En realizaciones particulares, las semillas se esterilizan para eliminar endófitos naturales antes de añadir las composiciones endófitas
10 descritas en el presente documento. En determinados aspectos, la capacidad de la semilla para germinar no se ve afectada por la esterilización.

La divulgación también proporciona métodos para detectar la presencia del endófito fúngico dentro de una planta hospedadora. Esto puede lograrse, por ejemplo, mediante el aislamiento del ADN total de los tejidos de una posible
15 combinación planta-endófito, seguido por PCR, o como alternativa, análisis por transferencia de Southern, análisis por transferencia de Western u otros métodos conocidos en la materia, para detectar la presencia de secuencias de ácidos nucleicos o de aminoácidos específicos asociados con la presencia de una cepa de endófito fúngico de la presente divulgación. Como alternativa, los métodos bioquímicos tales como ELISA, HPLC, TLC o ensayos de metabolitos fúngicos se pueden utilizar para determinar la presencia de una cepa endófitas de la presente divulgación
20 en una muestra dada de tejido de cultivo. Adicionalmente, los métodos de identificación pueden incluir análisis microscópico, tal como tinción de raíces o métodos de cultivo, tales como pruebas de crecimiento u otros métodos conocidos en la materia (Deshmukh et al. 2006 Proc Natl Acad Sci EE.UU. 103 (49). En realizaciones particulares, las raíces de una posible combinación de planta de hierba y endófito se pueden teñir con cepas específicas de hongos, tales como WGA-Alexa 488, y se analizan microscópicamente para determinar los asociados de raíces
25 fúngicas.

En determinadas realizaciones, las cualidades agronómicas pueden seleccionarse del grupo que consiste en: aumento de biomasa, aumento de macollaje, aumento de la masa de la raíz, aumento de la floración, aumento del
30 rendimiento de la semilla y mayor resistencia a estreses bióticos y/o abióticos, cada una de estas cualidades se clasifica en comparación con plantas de otro modo idénticas cultivadas en las mismas condiciones, y que difieren solo con respecto a la presencia o ausencia de un endófito fúngico. Las combinaciones y métodos sintéticos de la presente divulgación pueden aplicarse para responder a estreses reales o anticipados. Tales estreses pueden incluir, por ejemplo, sequía (déficit de agua), frío, estrés por calor, deficiencia de nutrientes, toxicidad de sal, toxicidad de aluminio, pastoreo por herbívoros, infestación de insectos, infección por nemátodos e infección fúngica,
35 bacteriana o vírica, entre otros.

La presente divulgación proporciona, en una realización, endófitos fúngicos seleccionados de los de la Tabla 1 que afectan negativamente a la reproducción de los herbívoros e insectos que se alimentan de hojas sobre el suelo (áfidos de algodón, *Aphis gossypii*) y de nemátodos parásitos de plantas que atacan las raíces bajo tierra (nemátodos de nudos radiculares, *Meloidogyne incognita*). Además, se puede observar un mejor rendimiento y productividad de la planta en plantas de control colonizadas frente a las no colonizadas en ensayos de campo que emplean el tratamiento de semillas con dichos endófitos. La mejora del crecimiento de las plantas y el aumento de la resistencia a los nemátodos del nudo radicular se demostró en el algodón, por ejemplo, empleando *Chaetomium globosum* como endófito en ensayos de invernadero. Además y como otro ejemplo ilustrativo no limitante, utilizando
45 *Beauveria bassiana* como endófito en algodón, se demostraron reducciones en la reproducción de insectos (áfido de algodón) se demostró en ensayos de invernadero y de campo. La presencia endofítica de *Paecilomyces lilacinus* y *Beauveria bassiana* también tuvo efectos negativos en el comportamiento de selección del hospedador de las principales plagas de chinches chupadoras (*Lygus hesperus* y *Nezara viridula*) que atacan el desarrollo de flores y frutos en la planta de algodón. Además, en ensayos de campo utilizando *Beauveria bassiana* como endófito en el
50 algodón, se demostraron efectos positivos sobre el rendimiento de la planta y mayores productividades en plantas por endófitos frente a las plantas de control no colonizadas.

Las diferencias metabólicas entre las plantas se pueden detectar utilizando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, una muestra biológica (tejido entero, exudado, savia del floema, savia de xilema, exudado de raíz, etc.) de
55 las plantas asociadas a endófitos y de las plantas agrícolas de referencia se puede analizar esencialmente tal como se describe en Fiehn et al., (2000) Nature Biotechnol., 18, 1157-1161, o en Roessner et al., (2001) Plant Cell, 13, 11-29. Tales métodos metabólicos se pueden usar para detectar diferencias en los niveles de hormonas, nutrientes, metabolitos secundarios, exudados de raíz, contenido de savia del floema, contenido de savia de xilema, contenido de metales pesados y similares.

En otra realización, la presente divulgación contempla métodos para recubrir la semilla de una planta con una pluralidad de endófitos, así como composiciones de semillas que comprenden una pluralidad de endófitos sobre y/o en la semilla. Estos métodos se pueden realizar de manera similar a los descritos en el presente documento para un único recubrimiento de los endófitos. En un ejemplo, se pueden preparar múltiples endófitos en una sola preparación que se recubre sobre la semilla. Los endófitos pueden ser de un origen común (es decir, una misma planta). Como
65 alternativa, los endófitos pueden ser de diferentes plantas.

5 Cuando múltiples endófitos están recubiertos sobre la semilla, cualquiera o todos los endófitos pueden ser capaces de conferir un rasgo beneficioso a la planta hospedadora. En algunos casos, todos los endófitos son capaces de conferir un rasgo beneficioso a la planta hospedadora. El rasgo conferido por cada uno de los endófitos puede ser el mismo (por ejemplo, ambos mejoran la tolerancia de la planta hospedadora a un estrés biótico particular), o pueden ser distintos (por ejemplo, uno mejora la tolerancia de la planta hospedadora a la sequía, mientras que otro mejora la utilización de fosfato). En otros casos, el rasgo conferido puede ser el resultado de interacciones entre los endófitos.

10 Definiciones

En la descripción y las tablas del presente documento, se utiliza una serie de términos. Para proporcionar una comprensión clara y coherente de la memoria descriptiva y de las reivindicaciones, se proporcionan las siguientes definiciones. A menos que se indique otra cosa, los términos deben entenderse de acuerdo con el uso convencional por los expertos en la técnica relevante.

15 Cuando se proporciona un término en singular, los autores de la invención también contemplan aspectos de la invención descritos por el plural de ese término. La forma singular "un", "una", y "el" o "la" incluyen referentes plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por ejemplo, el término "una célula" incluye una o más células, incluyendo mezclas de las mismas.

20 El término "que comprende" pretende significar que las composiciones y los métodos incluyen los elementos citados, pero no excluyen otros. "Que consiste esencialmente en" cuando se usa para definir las composiciones y los métodos, significará excluir otros elementos de cualquier significado esencial para la combinación. Por lo tanto, una composición que consista esencialmente en los elementos tal como se definen en el presente documento no excluiría los contaminantes traza del método de aislamiento y purificación y los vehículos aceptables para la agricultura. "Que consiste en" significará excluir más elementos traza de otros ingredientes y etapas sustanciales del método para aplicar las composiciones de la presente invención. Las realizaciones definidas por cada uno de estos términos de transición están dentro del alcance de la presente invención.

30 Control biológico: la expresión "control biológico" y su forma abreviada "biocontrol", tal como se usa en el presente documento, se define como el control de una plaga, patógeno, insecto o cualquier otro organismo indeseable mediante el uso de al menos un endófito.

35 Se pretende que una "composición" signifique una combinación de agente activo y al menos otro compuesto, vehículo o composición, inerte (por ejemplo, un agente o marcador detectable o vehículo líquido) o activo, tal como un pesticida.

40 Tal como se usa en el presente documento, una "semilla agrícola" es una semilla utilizada para cultivar plantas en la agricultura (una "planta agrícola"). La semilla puede ser de una planta monocotiledónea o dicotiledónea, y se planta para la producción de un producto agrícola, por ejemplo granos, un alimento, fibra, etc. Tal como se usa en el presente documento, una semilla agrícola es una semilla que está preparada para plantar, por ejemplo, en granjas para el cultivo. Las semillas agrícolas se distinguen de las semillas de productos básicos en que las primeras no se utilizan para generar productos, por ejemplo, productos vegetales básicos.

45 Tal como se usa en el presente documento, un "producto vegetal básico" se refiere a cualquier composición o producto que se compone de material derivado de una planta, semilla, célula vegetal, o parte de la planta. Los productos vegetales básicos pueden venderse a los consumidores y pueden ser viables o no viables. Los productos básicos no viables incluyen, entre otros, semillas y granos no viables; semillas procesadas, partes de semillas y partes de plantas; tejido vegetal deshidratado, tejido vegetal congelado y tejido vegetal procesado; semillas y partes de plantas procesadas para alimentación animal para consumo de animales terrestres y/o acuáticos, aceite, comida, harina, copos, salvado, fibra y cualquier otro alimento para consumo humano o animal; y biomasas y productos combustibles. Cualquiera de estos productos vegetales básicos de la presente invención puede contener al menos una cantidad detectable del ADN específico y único correspondiente a los endófitos descritos en el presente documento. Se puede usar cualquier método convencional de detección de moléculas de polinucleótidos, incluidos los métodos de detección desvelados en el presente documento.

60 Tal como se usa en el presente documento, la frase "plantas agrónomicamente de élite" se refiere a un genotipo o a una variedad de cultivo con un fenotipo adaptado para cultivo comercial. Los rasgos compuestos por una planta agrónomicamente de élite pueden incluir el rendimiento de biomasa, carbohidratos y/o de semillas; resistencia al estrés biótico o abiótico, incluyendo resistencia a la sequía, resistencia a insectos, resistencia a hongos, resistencia a virus, resistencia a bacterias, tolerancia al frío y tolerancia a la sal; estabilidad mejorada, mayor eficiencia en el uso de nutrientes y menor contenido de lignina.

65 En determinadas realizaciones, las plantas de algodón agrónomicamente de élite incluyen, por ejemplo, las variedades de algodón conocidas AM 1550 B2RF, NG 1511 B2RF, NG 1511 B2RF, FM 1845LLB2, FM 1944GLB2, FM 1740B2F, PHY 499 WRF, PHY 375 WRF, PHY 367 WRF, PHY 339 WRF, PHY 575 WRF, DP 1252 B2RF, DP

1050 B2RF, DP 1137 B2RF, DP 1048 B2RF, y/o DP 1137 B2RF.

5 Tal como se usa en el presente documento, la frase "filtrado de cultivo" se refiere a caldo o medio obtenido de cultivos inoculados con una cepa de hongos y que se dejan crecer. Los medios generalmente se filtran para eliminar las células suspendidas, dejando los nutrientes, hormonas u otras sustancias químicas.

10 Tal como se usa en el presente documento, el término "endófito" se refiere a un organismo capaz de vivir dentro de una planta o tejido vegetal. Un endófito puede comprender un organismo fúngico que puede conferir un aumento en el rendimiento, biomasa, resistencia o aspecto físico en su planta hospedadora. Los endófitos fúngicos pueden ocupar los espacios intracelulares o extracelulares del tejido vegetal, incluyendo las hojas, los tallos, las flores o las raíces.

15 La frase "resistencia a las plagas" se refiere a inhibir o reducir el ataque de las plagas. La resistencia a las plagas proporciona al menos un cierto aumento en la resistencia a las plagas sobre lo que ya posee la planta.

Tal como se usa en el presente documento, el término "genotipos" se refiere a la constitución genética de una célula u organismo.

20 Tal como se usa en el presente documento, el término "fenotipo" se refiere a las características detectables de una célula u organismo, cuyas características son la manifestación directa o indirecta de la expresión génica.

25 Tal como se usa en el presente documento, la frase "planta hospedadora" se refiere a cualquier planta que coloniza un hongo endófito. En determinadas realizaciones, la planta hospedador comprende la progenie de la planta colonizada.

30 Tal como se usa en el presente documento, la frase "rendimiento aumentado" se refiere a un aumento en la biomasa o el peso de la semilla, el tamaño de semilla o fruto, el número de semillas por planta, el número de semillas por unidad de área, bushels por acre, toneladas por acre, kilo por hectárea, rendimiento de carbohidratos o rendimiento de algodón. Tal rendimiento aumentado es relativo a una planta o cultivo que no ha sido inoculado con el endófito. En determinadas realizaciones, el aumento del rendimiento es relativo a otros tratamientos de plagas comúnmente utilizados u otros métodos para abordar el estrés biótico o abiótico.

35 Tal como se usa en el presente documento, la frase "biomasa" significa la masa o peso total (fresco o seco), en un momento dado, de un tejido vegetal, tejidos de plantas, una planta completa, o población de plantas, generalmente se da como peso por unidad de área. El término también puede referirse a todas las plantas o especies en la comunidad (biomasa comunitaria).

40 Tal como se usa en el presente documento, "adhesivo" se refiere a compuestos para mejorar la unión de esporas a la superficie de la semilla. Los ejemplos no limitantes de tales compuestos son el ácido alginico, carragenano, dextrina, dextrano, pelgel, polietilenglicol, polivinilpirrolidona, metilcelulosa, alcohol polivinílico o gelatina.

45 Tal como se usa en el presente documento, un excipiente o vehículo "agrícolamente aceptable" es aquel que es adecuado para su uso en agricultura sin efectos secundarios adversos indebidos para las plantas, para el medio ambiente, o para los humanos o los animales que consumen los productos agrícolas resultantes derivados de los mismos en proporción razonable con una relación beneficio/riesgo.

50 Tal como se usa en el presente documento, el término "sintético" o la frase "combinación sintética" se refiere a una combinación artificial que incluye micelios y/o esporas de un endófito que es o que lleva a una relación endofítica hongo-hospedador (también llamado "simbionte") de una planta hospedadora y un endófito. La combinación sintética se puede lograr, por ejemplo, por inoculación artificial, aplicación u otra infección de una planta hospedadora, semillas de la planta hospedadora o tejidos de la planta hospedadora con el endófito. Además, la combinación de la planta hospedadora y un endófito se puede lograr inoculando el suelo o los medios de cultivo de la planta.

55 Tal como se usa en el presente documento, un microbio aislado es un microbio que está aislado de su entorno natural, y lleva consigo la inferencia de que el aislamiento fue realizado por la mano del hombre. Un microbio aislado es uno que se ha separado de al menos algunos de los componentes con los que estaba asociado anteriormente (ya sea en la naturaleza o en un entorno experimental).

60 Tal como se usa en el presente documento, se considera que un microbio es "natural" de una planta o una porción de la planta, y se dice que está "naturalmente" presente en la planta o en una porción de la planta, si esa planta o porción de la planta contiene el microbio, por ejemplo, en ausencia de cualquier contacto con la preparación de microbios.

65 Algunos de los métodos descritos en el presente documento permiten la colonización de semillas de plantas por microbios. Tal como se usa en el presente documento, se dice que un microbio "coloniza" una planta o semilla cuando puede existir en una relación simbiótica o no perjudicial con la planta en el entorno de la planta, por ejemplo

sobre y/o dentro de una planta, incluyendo la semilla.

Una "población" de plantas, tal como se usa en el presente documento, se refiere a una pluralidad de plantas que crecieron a partir de las semillas recubiertas con los endófitos tal como se describe en el presente documento, o son descendientes de una planta o grupo de plantas que se sometieron a los métodos de inoculación. Las plantas dentro de una población normalmente serán de la misma especie, y también generalmente compartirán una derivación genética común

Ejemplos

Ejemplo 1: Creación de suspensiones de esporas y tratamiento de semillas

Cultivo de plantas y cepas de hongos endófitos: La variedad de semilla de algodón utilizada en realizaciones particulares fue la variedad LA122 (disponible de All-Tex Seed, Inc., Levelland, TX 79336). *Paecilomyces lilacinus* y *Chaetomium globosum* se obtuvieron de plantas de algodón tal como se describe (Ek-Ramos et al. 2013, PLoS ONE 8(6): e66049. doi:10.1371/journal.pone.0066049). Los expertos en la materia pueden obtener endófitos adecuados para realizar las diversas realizaciones de la presente invención realizando los procedimientos descritos en la misma. En resumen, las muestras de plantas se enjuagaron con agua corriente y se esterilizaron en superficie por inmersión en etanol al 70 % durante 5 minutos, con solución de lejía al 10 % durante 3 minutos, y se enjuagaron dos veces con agua destilada en autoclave. Las muestras se secaron mediante transferencia utilizando toallas de papel esterilizadas en autoclave. Cinco hojas, cuadrados y cápsulas individuales esterilizados en superficie (N = 15 muestras totales) se seleccionaron al azar y se imprimieron en agar fresco de dextrosa de patata (PDA) y medios V8 como una forma de controlar la eficacia de la esterilización de la superficie. Para el aislamiento de endófitos, las hojas se cortaron en pequeños fragmentos de aproximadamente 1 cm². Los cuadrados y las cápsulas se cortaron en seis piezas. Se eliminó cualquier fibra presente y se cortó en seis piezas más pequeñas. Los fragmentos de hojas se colocaron boca abajo en placas medianas con PDA y V8 por triplicado. Cada placa contenía 3 fragmentos de hojas para un total de 9 fragmentos analizados por planta. Para los cuadrados recolectados a principios de la temporada, se colocaron 3 cortes por cuadrado en medio de PDA y V8 como con los fragmentos de hoja. Debido a la similitud en tamaño y ubicación dentro de una planta, cuando se recoge más tarde en la temporada, los cuadrados y las cápsulas de una planta dada se colocaron en placas de Petri que contenían dos cortes de cuadrados, dos cortes de cápsulas y dos pedazos de fibra. Los antibióticos Penicilina G (100 unidades/ml) y Estreptomycin (100 µg/ml) (Sigma, St Louis, MO, EE.UU.) se añadieron a los medios para suprimir el crecimiento bacteriano. Todas las placas se incubaron en la oscuridad a temperatura ambiente durante, en promedio, dos semanas hasta que se detectó el crecimiento de hifas del endófito fúngico a partir de tejidos vegetales.

Para la identificación se empleó una combinación inclusiva de identificación morfológica y molecular de endófitos fúngicos. Una vez que se detectaron hifas fúngicas que crecían a partir del material vegetal, se tomaron muestras para obtener aislados puros de hongos. Para la identificación por PCR, se extrajo el ADN genómico del micelio de cada cepa fúngica aislada, siguiendo un protocolo de cloroformo:alcohol isoamílico a 24:1 y se usaron cebadores específicos de hongos para amplificar la región ITS (espaciador de transcrito interno) del ADN ribosómico nuclear. Esta región es el marcador de código de barras principal para hongos e incluye las regiones ITS 1 e ITS2, separadas por el gen ribosómico 5,8S. Para evitar la introducción de sesgos durante la PCR (sesgo de taxonomía e introducción de desajustes), se ha sugerido amplificar solo la región ITS1, por lo tanto, se usaron los cebadores ITS1 (5 'TCC GTA GGT GAA CCT GCG G 3') (SEQ ID NO: 5) e ITS2 (5 'GCT GCG TTC TTC ATC GAT GC 3') (SEQ ID NO: 6) para amplificar y secuenciar la región ITS1 de aproximadamente 240 pb de cada una de las cepas fúngicas aisladas. Las secuencias resultantes se alinearon como secuencias de consulta con las bases de datos disponibles públicamente de los nucleótidos de GenBank, UNITE y PlutoF. Las dos últimas se compilan específicamente y se utilizan para la identificación de hongos. La Tabla 1 proporciona un listado de endófitos. Todos estos endófitos pertenecen al filo Ascomycota, subfilo Pezizomycotina, salvo *Phanerochaete crassa*, que pertenece al filo Basidiomycota, subfilo Agaricomycotina, y *Pseudozyma* sp, que pertenece al filo Basidiomycota, subfilo Ustilaginomycotina. La Tabla 1 muestra la especie/género, familia, orden, subclase, clase, y la SEQ ID NO se corresponde con la región ITS1 de aproximadamente 240 pb para cada una de las cepas fúngicas aisladas, salvo *Beauveria bassiana*, *Aspergillus parasiticus*, *Lecanicillium lecanii*, y *Paecilomyces lilacinus*, en donde las secuencias mostradas incluyen las secuencias de ITS1, ITS2, 5,8S, 18S y 28S y se obtuvieron de la base de datos UNITE para los números de GenBank JF837090, JX857815, FJ643076 y EU553283, respectivamente.

Tabla 1: endófitos

Género/Especie	Familia	Orden	Subclase	Clase	SEQ ID NO.
<i>Acremonium alternatum</i>	Incertaesedis	Hypocreales	Hypocreomycetidae	Sordariomycetes	7
<i>Alternaria alternata</i>	Pleosporaceae	Pleosporales	Pleosporomycetidae	Dothideomycetes	8
<i>Alternaria brassicae</i>	Pleosporaceae	Pleosporales	Pleosporomycetidae	Dothideomycetes	9
<i>Alternaria compacta</i>	Pleosporaceae	Pleosporales	Pleosporomycetidae	Dothideomycetes	10
<i>Alternaria dianthi</i>	Pleosporaceae	Pleosporales	Pleosporomycetidae	Dothideomycetes	11
<i>Alternaria longipes</i>	Pleosporaceae	Pleosporales	Pleosporomycetidae	Dothideomycetes	12
<i>Alternaria mali</i>	Pleosporaceae	Pleosporales	Pleosporomycetidae	Dothideomycetes	13
<i>Alternaria sesami</i>	Pleosporaceae	Pleosporales	Pleosporomycetidae	Dothideomycetes	14
<i>Alternaria solani</i>	Pleosporaceae	Pleosporales	Pleosporomycetidae	Dothideomycetes	15
<i>Alternaria sp.</i>	Pleosporaceae	Pleosporales	Pleosporomycetidae	Dothideomycetes	16
<i>Alternaria tenuissima</i>	Pleosporaceae	Pleosporales	Pleosporomycetidae	Dothideomycetes	17
<i>Bipolaris spicifera</i>	Pleosporaceae	Pleosporales	Pleosporomycetidae	Dothideomycetes	18
<i>Cercospora canescens</i>	Mycosphaerellaceae	Capnodiales	Dothideomycetidae	Dothideomycetes	19
<i>Cercospora capsici</i>	Mycosphaerellaceae	Capnodiales	Dothideomycetidae	Dothideomycetes	20
<i>Cercospora kikuchii</i>	Mycosphaerellaceae	Capnodiales	Dothideomycetidae	Dothideomycetes	21
<i>Cercospora zinnia</i>	Mycosphaerellaceae	Capnodiales	Dothideomycetidae	Dothideomycetes	22
<i>Chaetomium globosum</i>	Chaetomiaceae	Sordariales	Sordariomycetidae	Sordariomycetes	23
<i>Chaetomium piluliferum</i>	Chaetomiaceae	Sordariales	Sordariomycetidae	Sordariomycetes	24
<i>Chaetomium sp.</i>	Chaetomiaceae	Sordariales	Sordariomycetidae	Sordariomycetes	25
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	Cladosporiaceae	Capnodiales	Dothideomycetidae	Dothideomycetes	26
<i>Cladosporium sp.</i>	Cladosporiaceae	Capnodiales	Dothideomycetidae	Dothideomycetes	27
<i>Cladosporium uredinicola</i>	Cladosporiaceae	Capnodiales	Dothideomycetidae	Dothideomycetes	28
<i>Cochliobolus sp</i>	Pleosporaceae	Pleosporales	Pleosporomycetidae	Dothideomycetes	29
<i>Phanerochaete crassa</i>	Phanerochaetaceae	Polyporales	Incertae sedis	Agaricomycetes	30
<i>Phoma americana</i>	Incertae sedis	Pleosporales	Pleosporomycetidae	Dothideomycetes	31
<i>Phoma subherbarum</i>	Incertae sedis	Pleosporales	Pleosporomycetidae	Dothideomycetes	32
<i>Phomopsis liquidambari</i>	Diaporthaceae	Diaporthales	Sordariomycetidae	Sordariomycetes	33
<i>Phomopsis sp.</i>	Diaporthaceae	Diaporthales	Sordariomycetidae	Sordariomycetes	34
<i>Pleospora sp.</i>	Pleosporaceae	Pleosporales	Pleosporomycetidae	Dothideomycetes	35
<i>Pleosporaceae sp.</i>	Pleosporaceae	Pleosporales	Pleosporomycetidae	Dothideomycetes	36
<i>Preussia africana</i>	Sporormiaceae	Pleosporales	Pleosporomycetidae	Dothideomycetes	37
<i>Preussia sp.</i>	Sporormiaceae	Pleosporales	Pleosporomycetidae	Dothideomycetes	38
<i>Pseudozyma sp.</i>	Ustilaginaceae	Ustilaginales	Ustilaginomycetidae	Ustilaginomycetes	39
<i>Pyrenophora teres</i>	Pleosporaceae	Pleosporales	Pleosporomycetidae	Dothideomycetes	40
<i>Colletotrichum capsici</i>	Glomerellaceae	Incertae sedis	Sordariomycetidae	Sordariomycetes	41
<i>Coniolarrella gamsii</i>	Incertae sedis	Xylariales	Xylariomycetidae	Sordariomycetes	42
<i>Coniothyrium aleuritidis</i>	Coniothyriaceae	Pleosporales	Pleosporomycetidae	Dothideomycetes	43

(continuación)

Género/Especie	Familia	Orden	Subclase	Clase	SEQ ID NO.
<i>Coniothyrium sp.</i>	Coniothyriaceae	Pleosporales	Pleosporomycetidae	Dothideomycetes	44
<i>Corynespora cassiicola</i>	Corynesporascaceae	Pleosporales	Pleosporomycetidae	Dothideomycetes	45
<i>Diaporthe sp.</i>	Diaporthaceae	Diaporthales	Sordariomycetidae	Sordariomycetes	46
<i>Diatrype sp.</i>	Diatrypaceae	Xylariales	Xylariomycetidae	Sordariomycetes	47
<i>Drechlerella dactyloides</i>	Orbiliaceae	Orbiliales	Orbiliomycetidae	Orbiliomycetes	48
<i>Embellisia indefessa</i>	Pleosporaceae	Pleosporales	Pleosporomycetidae	Dothideomycetes	49
<i>Epicoccum nigrum</i>	Pleosporaceae	Pleosporales	Pleosporomycetidae	Dothideomycetes	50
<i>Epicoccum sp.</i>	Pleosporaceae	Pleosporales	Pleosporomycetidae	Dothideomycetes	51
<i>Exserohilum rostratum</i>	Pleosporaceae	Pleosporales	Pleosporomycetidae	Dothideomycetes	52
<i>Fusarium chlamydosporum</i>	Nectriaceae	Hypocreales	Hypocreomycetidae	Sordariomycetes	53
<i>Fusarium sp.</i>	Nectriaceae	Hypocreales	Hypocreomycetidae	Sordariomycetes	54
<i>Gibellulopsis nigrescens</i>	Plectosphaerellaceae	Incertae sedis	Hypocreomycetidae	Sordariomycetes	55
<i>Gnomoniopsis sp.</i>	Glomerellaceae	Incertae sedis	Hypocreomycetidae	Sordariomycetes	56
<i>Lewia infectoria</i>	Pleosporaceae	Pleosporales	Pleosporomycetidae	Dothideomycetes	57
<i>Mycosphaerella coffeicola</i>	Mycosphaerellaceae	Capnodiales	Dothideomycetidae	Dothideomycetes	58
<i>Mycosphaerellaceae sp.</i>	Mycosphaerellaceae	Capnodiales	Dothideomycetidae	Dothideomycetes	59
<i>Nigrospora oryzae</i>	Incertae sedis	Trichosphaeriales	Incertae sedis	Sordariomycetes	60
<i>Nigrospora sp.</i>	Incertae sedis	Trichosphaeriales	Incertae sedis	Sordariomycetes	61
<i>Nigrospora sphaerica</i>	Incertae sedis	Trichosphaeriales	Incertae sedis	Sordariomycetes	62
<i>Paecilomyces sp.</i>	Trichocomaceae	Eurotiales	Eurotiomycetidae	Eurotiomycetes	63
<i>Penicillium citrinum</i>	Trichocomaceae	Eurotiales	Eurotiomycetidae	Eurotiomycetes	64
<i>Retroconis sp.</i>	Incertae sedis	Incertae sedis	Incertae sedis	Incertae sedis	65
<i>Rhizopycnis sp.</i>	Incertae sedis	Incertae sedis	Incertae sedis	Dothideomycetes	66
<i>Schizothecium inaequale</i>	Lasiosphaeriaceae	Sordariales	Sordariomycetidae	Sordariomycetes	67
<i>Stagonospora sp.</i>	Phaeosphaeriaceae	Pleosporales	Pleosporomycetidae	Dothideomycetes	68
<i>Stemphylium lancipes</i>	Pleosporaceae	Pleosporales	Pleosporomycetidae	Dothideomycetes	69
<i>Thielavia hyrcaniae</i>	Chaetomiaceae	Sordariales	Sordariomycetidae	Sordariomycetes	70
<i>Thielavia sp.</i>	Chaetomiaceae	Sordariales	Sordariomycetidae	Sordariomycetes	71
<i>Ulocladium chartarum</i>	Pleosporaceae	Pleosporales	Pleosporomycetidae	Dothideomycetes	72
<i>Verticillium sp.</i>	Plectosphaerellaceae	Incertae sedis	Hypocreomycetidae	Sordariomycetes	73
<i>Beauveria bassiana</i>	Cordycipitaceae	Hypocreales	Hypocreomycetidae	Sordariomycetes	74
<i>Aspergillus parasiticus</i>	Trichocomaceae	Eurotiales	Eurotiomycetidae	Eurotiomycetes	75
<i>Lecanicillium lecanii</i>	Cordycipitaceae	Hypocreales	Hypocreomycetidae	Sordariomycetes	76
<i>Paecilomyces lilacinus</i>	Trichocomaceae	Eurotiales	Eurotiomycetidae	Eurotiomycetes	77

TABLA 1 Listado de endófitos:

5 *Acremonium alternatum*, *Alternaria alternata*, *Alternaria brassicae*, *Alternaria compacta*, *Alternaria dianthi*, *Alternaria longipes*, *Alternaria mali*, *Alternaria sesami*, *Alternaria solani*, *Alternaria sp.*, *Alternaria tenuissima*, *Ascomycota sp.*,
 10 *Bipolaris spicifera*, *Cercospora canescens*, *Cercospora capsici*, *Cercospora kikuchii*, *Cercospora zinnia*, *Chaetomium globosum*, *Chaetomium piluliferum*, *Chaetomium sp.*, *Cladosporium cladosporioides*, *Cladosporium sp.*,
Cladosporium uredinicola, *Cochliobolus sp.*, *Phanerochaete crassa*, *Phoma americana*, *Phoma subherbarum*,
Phomopsis liquidambari, *Phomopsis sp.*, *Pleospora sp.*, *Pleosporaceae sp.*, *Polyporales sp.*, *Preussia africana*,
Preussia sp., *Pseudozyma sp.*, *Pyrenophora teres*, *Colletotrichumcapsici*, *Coniolarrella gamsii*, *Coniothyrium aleuritis*,
 15 *Coniothyrium sp.*, *Corynespora cassiicola*, *Diaporthe sp.*, *Diatrype sp.*, *Drechslerella dactyloides*, *Embellisia indefessa*, *Epicoccum nigrum*, *Epicoccum sp.*, *Exserohilum rostratum*, *Fusarium chlamydosporum*, *Fusarium sp.*,
Gibellulopsis nigrescens, *Gnomoniopsis sp.*, *Lewia infectoria*, *Mycosphaerella coffeicola*, *Mycosphaerellaceae sp.*,
Nigrospora oryzae, *Nigrospora sp.*, *Nigrospora sphaerica*, *Paecilomyces sp.*, *Penicillium citrinum*, *Retroconis sp.*,
Rhizopycnis sp., *Schizothecium inaequale*, *Stagonospora sp.*, *Stemphylium lancipes*, *Thielavia hyrcaniae*, *Thielavia sp.*,
Ulocladium chartarum, *Verticillium sp.*, *Beauveria bassiana*, *Aspergillus parasiticus*, *Lecanicillium lecanii*,
Paecilomyces lilacinus.

20 *Beauveria bassiana* se cultivó a partir de una cepa obtenida comercialmente (disponible de Botanigard). *Beauveria bassiana*, *Paecilomyces lilacinus*, y *Chaetomium globosum* se cultivaron en medio agar de dextrosa de patata (PDA). Las soluciones madre de concentración de esporas de cada hongo se prepararon añadiendo 10 ml de agua estéril a las placas de hongos y raspándolas del agar con un bisturí estéril. El micelio resultante y las esporas obtenidas se filtraron luego en un vaso de precipitados estéril utilizando una estopilla para filtrar el micelio, creando así soluciones madre. Se usó un hemocitómetro para medir y calcular las concentraciones de esporas de las soluciones madre. Las concentraciones deseadas se crearon por dilución, y las semillas se colocaron en suspensiones de esporas con las concentraciones de esporas deseadas. En diversas realizaciones, las concentraciones finales de tratamiento pueden ser aproximadamente 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 o 10^9 esporas/ml que pueden alcanzarse mediante diluciones seriadas en agua estéril o en una solución o tampón apropiado.

30 Para la inoculación de semillas, las semillas se esterilizaron en superficie antes de sumergirlas en suspensiones de esporas con la concentración deseada por inmersión de las semillas en etanol al 70 % durante 3 minutos con agitación constante seguida de incubación en NaOCl al 2 % durante 3 minutos; seguido de tres lavados en agua estéril. El tercer lavado con agua estéril se colocó en placa sobre medio de agar de dextrosa de patata (PDA) para confirmar que la esterilización de la superficie era eficaz. Luego se remojaron las semillas durante 24 horas en vasos de precipitados que contenían suspensiones de esporas con dos concentraciones diferentes de hongos. Las semillas del grupo de control se trataron solo con agua estéril. Las concentraciones de esporas para *Beauveria bassiana* eran cero (control), 1×10^6 (tratamiento 1) y 1×10^9 (tratamiento 2) y para *Paecilomyces lilacinus* o *Chaetomium globosum* eran cero (control), 1×10^6 (tratamiento 1) y 1×10^7 (tratamiento 2). Estos vasos de precipitados se incubaron durante 24 horas a 32 °C en una cámara de cultivo hasta el día siguiente para la plantación (24 horas).

40 Las semillas remojadas se plantaron en suelo mixto L22 (Instituto Borlaug, Texas A&M). Todas las plantas se cultivaron en un invernadero de laboratorio a ~ 28 °C con un fotoperíodo de luz natural. No hubo fertilización de las plantas, y el riego se realizó de manera consistente en todos los tratamientos según era necesario.

45 Inoculación directa de semillas: En realizaciones particulares, las semillas individuales y el suelo circundante pueden inocularse directamente con la solución de esporas (10^2 - 10^3 , 10^3 - 10^4 , 10^4 - 10^5 , 10^6 - 10^7 o 10^7 - 10^8 esporas/ml) en la plantación antes de cubrir la semilla con tierra.

50 En diversas realizaciones, puede emplearse cualquier tratamiento de semillas o plantas que sea adecuado para la aplicación de agentes biológicos a semillas o plantas y conocido por expertos en la materia.

Ejemplo 2: Aplicación de esporas de endófitos como una composición de polvo seco.

55 Además de la aplicación de una solución de esporas para el tratamiento de semillas, los endófitos o esporas de endófitos también se pueden aplicar como polvo seco o usando un agente adhesivo como la metilcelulosa para el tratamiento de semillas. En determinadas realizaciones, la concentración puede ser de al menos 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 , o de más unidades formadoras de colonias o esporas/g de peso seco.

60 En determinadas realizaciones, los endófitos se pueden cultivar en medios de cultivo de hongos en un fermentador. Los fragmentos de micelios o esporas de endófitos se pueden recoger, secar y moler. También se puede añadir un adhesivo tal como caboximetilcelulosa al material endofítico molido.

65 En ciertas realizaciones, la relación en peso entre el material endofítico y el adhesivo puede estar entre 1:10-50, 1:50-100, 1: 100-500, o 1:500-1000 para obtener el recubrimiento de semillas o el material de inoculación de semillas. Este material de inoculación de semillas se puede aplicar a las semillas. En diversas realizaciones, la relación en peso entre el material de inoculación de semilla y la semilla puede ser 1:10-50, 1:50-100, 1:100-500,

1:500-1000 o 1:1000-5000.

Ejemplo 3: Tratamientos de endófitos en el suelo (en surcos)

- 5 La aplicación de drenaje en el suelo (en surcos) puede realizarse aplicando una composición endófito a la superficie del suelo y/o semilla durante la plantación. En realizaciones particulares, la composición de endófito puede comprender una suspensión de endófito o una formulación de polvo seco de endófito. En diversas realizaciones, el endófito puede comprender micelios y/o esporas. En realizaciones particulares, la aplicación de drenaje en el suelo puede comprender aplicar la composición de endófito a la superficie del suelo directamente encima de cada semilla.
- 10 En determinadas realizaciones, la composición de endófito puede comprender 0,01-0,1, 0,1-1, o 1-10 ml de suspensión de endófito, que puede ser una suspensión de esporas de endófitos.

Inoculación del suelo: En determinadas realizaciones, las semillas se pueden plantar en suelo inoculado. El inóculo se puede obtener multiplicando el endófito en los medios de crecimiento fúngico. Los medios de crecimiento fúngico pueden ser medios de agar de dextrosa de patata (PDA). En otras realizaciones, los medios de crecimiento fúngico pueden ser como los granos de trigo. En un ejemplo no limitante, se pueden lavar y remojar 100 g de grano de trigo durante la noche en agua estéril. El exceso de agua se puede drenar, las semillas se pueden secar sobre papel de cocina, envasarlas en un matraz cónico de 500 ml y esterilizarlas en autoclave a 15 psi durante 1 hora. Se puede inocular un mililitro de la suspensión de esporas de hongos endófitos (10^7 esporas/ml) en el matraz y los cultivos se pueden incubar a 25 °C durante 2 semanas. Para evitar aglomeraciones, los matraces se pueden agitar vigorosamente para separar el grano y romper el tapete micelial. Se pueden colocar aproximadamente 5 g de inóculo en el suelo en la plantación. En determinadas realizaciones, el inóculo se puede colocar en el suelo al mismo tiempo o dentro de 1 mes de plantar las semillas. En determinadas realizaciones, las semillas pueden comprender semillas esterilizadas.

25

Ejemplo 4: Tratamientos foliares con endófitos

Las plantas se inocularon mediante aplicación foliar en la tercera etapa de hojas verdaderas rociando la superficie de las hojas completamente expandidas para escurrirlas con una suspensión de esporas (10^8 esporas/ml) usando un pulverizador de mano de plástico (1 litro). En determinadas realizaciones, se realizaron suspensiones de esporas de endófitos en agua. En determinadas realizaciones, el agua se suplementó con un detergente. En un ejemplo particular no limitante, la suspensión de esporas contenía Triton X 100 al 0,02 % como detergente.

35 El tratamiento foliar con endófitos se puede realizar utilizando cualquier método adecuado conocido por un experto en la materia. En particular, el tratamiento foliar con endófitos se puede realizar usando un pulverizador que rocía directamente las hojas con una suspensión de endófitos, que puede ser una suspensión de esporas de endófitos.

La Fig. 9 demuestra que la aplicación foliar de algodón en el campo con esporas de hongos entomopatógenos endofíticos mejoró el rendimiento de la planta. Las semillas de algodón (variedad FM1740B2F) se trataron con varios fungicidas típicos (Metalaxil, Triadimenol, Trifloxiestrobina, 2-(Tiocianometilto)benzotioazol) e insecticidas (Tiodicarb, limidacloprid, Clorpirifós) y las semillas tratadas se plantaron y cultivaron en condiciones de campo. Las plantas se rociaron en la 5ª etapa de hoja verdadera con soluciones acuosas de *Beauveria bassiana* y *Paecilomyces fumosoroseus*. La sacarosa se incluyó (1 % en peso/vol) como un recurso nutricional adicional para los hongos. Se observó una retención significativamente mayor de cápsula de primera posición (desarrolladoras de fruto) en plantas rociadas con *Beauveria bassiana* sin sacarosa y *P. fumosoroseus* más sacarosa.

Ejemplo 5: Confirmación de colonización de plantas por hongos endófitos

Las plantas se colocaron individualmente en bolsas de plástico, que se marcaron con el número de planta, el tratamiento y número final de áfidos, y se almacenaron a 4 °C hasta el día siguiente para confirmación del endófito. La mitad de cada planta se utilizó para colocar en placas en agar PDA y la otra mitad se liofilizó para realizar ensayos de diagnóstico de PCR para la confirmación de los endófitos. El protocolo de esterilización de la superficie y el cultivo en placa del tercer lavado con agua estéril en PDA para probar la contaminación de la superficie se realizó como se describió anteriormente. Para ensayos de diagnóstico de PCR, el tejido vegetal se liofilizó y se extrajo el ADN utilizando el protocolo CTAB (Doyle y Doyle, 1987, Phytochemistry Bulletin 19:11-15). Las secuencias de cebadores de oligonucleótidos sintetizadas se basaron en una búsqueda BLAST del NCBI correspondiente a los resultados de la secuencia de cultivo de laboratorio aislados (Ek-Ramos *et al.* 2013). Secuencias de oligonucleótidos de sentido y antisentido para *Beauveria bassiana* fueron: 5'-CGGCGGACTCGCCCCAGCCCG-3' (SEQ ID NO:1) y 5'-CCGCGTCGGGGTTCCGGTGCG-3' (SEQ ID NO:2) respectivamente. Los oligonucleótidos utilizados para amplificar *Paecilomyces lilacinus* fueron: 5' CTCAGTTCCTCGGCGGGAA 3' (SEQ ID NO:3) y 5' GTGCAACTCAGAGAAGAAATTCCG 3' (SEQ ID NO:4).

El protocolo de PCR consistió en una etapa de desnaturalización a 95 °C durante 5 minutos, seguido de la alineación de oligonucleótidos a 56 °C durante 2 minutos y una etapa de extensión de 7 minutos a 72 °C con un total de 35 ciclos. Los productos de PCR se visualizaron en un gel de agarosa al 2 % que contenía bromuro de etidio al 1 %. La electroforesis se realizó a 70 voltios durante 30 minutos.

65

Ejemplo 6: Los hongos endófitos se pueden manipular en el campo

5 Durante el verano se realizó un ensayo de campo utilizando aislados de *Paecilomyces lilacinus* y *Beauveria bassiana*. Un diseño en bloques aleatorizado con cinco parcelas replicadas que fueron plantadas con semillas que fueron inoculadas remojándolas durante 9 horas en tres concentraciones diferentes de esporas acuosas (0, 10^6 o 10^8 esporas/ml) del endófito candidato (como *Paecilomyces lilacinus* o *Beauveria bassiana*). Cada parcela constaba de cuatro hileras de 15,24 m (40 pies), cada uno separado por 101,6 cm (40 in).

10 Eficiencia de colonización: En la primera etapa de hojas verdaderas, se muestrearon al azar cuatro plantas de cada parcela para un total de 20 plantas por tratamiento y se analizó la colonización por cada uno de los endófitos candidatos. Las frecuencias de colonización se determinaron incubando los fragmentos de raíz, tallo y hojas esterilizados en superficie en medios PDA y observando el crecimiento de los hongos. Las frecuencias de colonización se documentaron como el número de plantas por grupo de tratamiento con al menos un fragmento de
15 planta colonizado positivamente.

La alta frecuencia de colonización endofítica de plántulas por *Paecilomyces lilacinus* o *Beauveria bassiana* demuestra que la presencia de endófitos específicos puede manipularse en condiciones de plantación en campo (Fig. 1).
20

Ejemplo 7: Ensayo de reproducción de áfidos de algodón

Una colonia de *A. gossypii* se crió en algodón en cestas en un invernadero mantenido a aproximadamente 28 °C con fotoperíodo de luz natural. Las ninfas del segundo estadio se colocaron directamente sobre plantas de algodón
25 tratadas con endófitos y sobre plantas de control. Se utilizaron diez plantas por grupo de tratamiento y se colocaron diez áfidos por planta. Después de que se inoculasen las plantas con los áfidos, las plantas se colocaron en macetas de plástico individuales de 45 x 20 cm y se sellaron con una malla no-see-um (Eastex products, NJ) para evitar el movimiento de áfidos de una planta a otra. En una realización, las plantas utilizadas tenían 13 días de edad, aproximadamente en la primera etapa de hojas verdaderas, y se dejó que los áfidos se reprodujesen durante siete
30 días en condiciones de invernadero. En otra realización, se dejó que los áfidos se reprodujesen durante 14 días en plantas que inicialmente tenían 20 días de edad al comienzo del experimento, aproximadamente en la tercera etapa de hojas verdaderas. Al final de cada realización, se contó y se registró el número de áfidos por planta individual. La presencia de *Beauveria bassiana* o *Paecilomyces lilacinus* como un endófito en algodón redujo significativamente la reproducción de los áfidos del algodón en plantas tratadas con endófito frente a plantas de control no tratadas (Fig. 4A, 4B, y Fig. 5)
35

Ejemplo 8: Los endófitos fúngicos reducen la reproducción de los nemátodos

Las plantas germinaron de semillas tratadas y de control no tratadas en una cámara ambiental y luego se trasplantaron al suelo en macetas 11 días después de la plantación. Se tomaron muestras de dos plántulas replicadas por tratamiento para examinar la eficacia de colonización de endófitos mediante esterilización superficial y se colocaron en placas de agar PDA. Las plántulas del grupo de tratamiento con nemátodos se trataron con 2.000 o 10.000 huevos/planta el día seis después del trasplante. Las plantas fueron cosechadas y procesadas 6 semanas después de la inoculación con nemátodos. Se cuantificó el número de agallas por gramo de tejido radicular y el
45 número total de huevos en la población para cada planta para comparar el rendimiento de nemátodos entre las plantas tratadas con endófito y sin tratar (control).

Las Fig. 2 y 3 demuestran que los hongos endófitos *Paecilomyces lilacinus* y *Chaetomium globosum* afectan negativamente a la reproducción del nemátodo del nudo radicular (*Meloidogyne incognita*) cuando está presente como endófito en el algodón. A altos niveles de inóculo de nemátodos (10.000 huevos), *Paecilomyces lilacinus* redujo la producción de huevos en plantas después del tratamiento de semillas con soluciones que contienen 10^6 o 10^7 esporas/ml en comparación con las semillas de control no tratadas. A niveles de inóculo de campo (2000 huevos), la presencia de *Paecilomyces lilacinus* redujo significativamente la producción de agallas y huevos a ambas concentraciones de tratamiento de semillas. El endófito *Chaetomium globosum* afecta negativamente a la
50 reproducción de nemátodos del nudo radicular. Los efectos negativos del endófito *Chaetomium globosum* en la formación de agallas de nemátodos del nudo radicular y la producción de huevos se demostraron después de tratamientos de remojo de semillas de algodón en soluciones de 0 (controles no tratados), 10^6 y 10^8 esporas/ml.
55

Ejemplo 9: Efecto de los endófitos fúngicos sobre los insectos

Las plantas tratadas con endófitos y de control se cultivaron a partir de semillas de algodón no transgénicas (*Gossypium hirsutum*) (variedad LA122, AllTex Seed Co.). Las semillas se remojaron durante 24 horas en vasos de precipitados que contenían soluciones de 10^8 esporas/ml de los hongos utilizados más agua estéril solo como control. Los vasos de precipitados se colocaron en una cámara de cultivo a 32 °C durante la noche (aprox. 9 h)
60 hasta la plantación al día siguiente. Las plantas se cultivaron tanto en condiciones de invernadero como en condiciones de campo. Las plantas de invernadero germinaron primero en bandejas de plántulas y luego se
65

transfirieron a macetas de 30 cm. Las plantas cultivadas en el campo se plantaron y crecieron simultáneamente.

Ensayos de comportamiento: Se realizaron ensayos de comportamiento de sin selección y con selección para comparar la respuesta de las chinches opacas de las plantas occidentales (*L. hesperus*) y de las chinches verdes apestosas (*N. viridula*) a cuadrados y cápsulas de plantas tratadas y no tratadas con endófitos. Los ensayos se realizaron a 30 °C en placas de Petri de 10 cm de diámetro con una capa delgada de agar al 2 % en el fondo para proporcionar humedad a los cuadrados (ensayos con *L. hesperus*) y a las cápsulas (ensayos con *N. viridula*) de plantas experimentales ofrecidas a los insectos durante las observaciones. Para ensayos sin selección, se insertó un solo cuadrado o cápsula por la base en el agar en el centro del plato. Se colocó un solo insecto adulto joven (1-7 días después de la muda) en cada plato y se cubrió con la parte superior. Se observó un total de 30 insectos en cada ensayo con N=10 insectos cada uno en los grupos de tratamiento con *Beauveria bassiana*, *Paecilomyces lilacinus* y control. Los ensayos sin selección de *L. hesperus* se repitieron cuatro veces (N = 40 por tratamiento) con cuadrados de plantas cultivadas en invernadero utilizados en todos los ensayos menos uno. Los ensayos sin selección de *N. viridula* se repitieron tres veces (N = 20 por tratamiento) con cápsulas de plantas cultivadas en invernadero utilizadas en un ensayo.

Los ensayos de selección se realizaron en condiciones similares utilizando los mismos escenarios, pero con dos cuadrados de igual tamaño (*L. hesperus*) o cápsulas (*N. viridula*) colocados a 4 cm de distancia en el centro de la placa de Petri. Los dos cuadrados o cápsulas por escenario eran de una planta de control no tratada y de una planta tratada con *Beauveria bassiana* o con *Paecilomyces lilacinus*. Se observó un total de 20 insectos en cada ensayo, con N = 10 cada uno en el grupo de tratamiento de *Beauveria bassiana* frente al de control y en el de *Paecilomyces lilacinus* frente al de control. Los ensayos de selección con *L. hesperus* y *N. viridula* se replicaron dos veces (N = 20 por tratamiento) con cuadrados de plantas cultivadas en campo en todos los ensayos.

Los insectos se observaron durante 6 horas por ensayo utilizando un procedimiento de muestreo puntual para los ensayos con selección y sin selección. Las observaciones preliminares indicaron que los insectos de ambas especies eran más activos al comienzo del ensayo, por lo tanto, se adoptó un programa de muestreo por etapas con observaciones registradas a intervalos de 5 minutos al principio del ensayo (0-60 min), intervalos de 15 minutos en el medio (61-180 min) e intervalos de 30 minutos al final (181-360 min) en el ensayo. En cada intervalo de muestreo, los insectos fueron registrados ya sea fuera del cuadrado/cápsula o alimentándose o descansando sobre el cuadrado/cápsula.

Análisis de datos: En los ensayos sin selección, la proporción de insectos observados alimentándose o descansando sobre cuadrados de algodón (*L. hesperus*) o cápsulas (*N. viridula*) se comparó entre los grupos de tratamiento en cada punto de observación a lo largo de la duración del ensayo usando la prueba de los rangos con signo de Wilcoxon. Para probar la variación en las respuestas a lo largo del tiempo, para cada individuo, se calculó la proporción de observaciones, ya sea de alimentación o sobre la muestra de la planta, para los períodos temprano (0-60 min), medio (61-180 min) y tardío (181-360 min) del ensayo y se comparó entre los grupos de tratamiento utilizando un análisis de varianza (ANOVA) de medidas repetidas con el grupo de tratamiento con endófitos como factor principal y el tiempo como efecto repetido. La frecuencia observada de los individuos que no logran hacer contacto con los cuadrados o las cápsulas de las plantas tratadas con endófitos se comparó con la frecuencia esperada de los individuos que no lo hicieron en función del grupo de control utilizando una prueba X². Entre los insectos que hicieron contacto con un cuadrado o una cápsula, se comparó el tiempo hasta el primer contacto (latencia) entre los grupos de tratamiento utilizando una ANOVA de una vía. Todos los análisis, incluidas las pruebas de normalidad y homogeneidad de las variaciones, se realizaron en SPSS 21 (SPSS Inc.).

Resultados de los ensayos sin selección de *L. hesperus*: Durante la duración del ensayo, se observó una proporción significativamente mayor de individuos de *L. hesperus* a lo largo del tiempo en contacto y alimentándose de los cuadrados de plantas de control no tratadas en relación con los de cualquiera de los grupos tratados con los endófitos *Beauveria bassiana* o *Paecilomyces lilacinus* (prueba de rangos con signo de Wilcoxon, P <0,0001 para ambas comparaciones) (Figura 6A). El ANOVA de mediciones repetidas indicó un efecto significativo del tiempo ($F_{1,116} = 86,175$; P <0,001) con una mayor proporción de insectos en contacto con el cuadrado a medida que avanzaba el ensayo (Figura 6B). También hubo un efecto significativo del tratamiento con endófitos ($F_{2,116} = 4,929$; P = 0,009) sin interacción significativa de tratamiento con endófito X tiempo ($F_{2,116} = 1,015$; P = 0,366). De los 40 insectos en cada grupo de tratamiento, el 12,5% del grupo de control no pudo hacer contacto con el cuadrado durante el transcurso del ensayo, mientras que un 35 % y un 32,5 % significativamente más altos de los insectos de grupos de tratamiento con *Beauveria bassiana* y *Paecilomyces lilacinus*, respectivamente, no pudo hacer contacto (prueba X², P <0,0001). Entre los insectos que hicieron contacto con un cuadrado, hubo una diferencia significativa en la latencia al primer contacto entre los grupos de tratamiento ($F_{2,85} = 7,225$; P <0,0001) con el grupo de control presentando una latencia de contacto más corta que cualquiera de los grupos de tratamiento con los endófitos *Beauveria bassiana* (prueba posthoc LSD; P = 0,001) o *Paecilomyces lilacinus* (prueba LSD posthoc; P = 0,006 (Fig. 6A).

Resultados de los ensayos con selección de *L. hesperus*: En ensayos con selección simultánea, los individuos de *L. hesperus* seleccionaron cuadrados de plantas de control no tratadas con mayor frecuencia que los de plantas tratadas con endófitos. Las relaciones de respuesta fueron significativamente mayores que 0,5 durante la duración

de los ensayos, lo que indica que los insectos seleccionaron de manera no aleatoria las cápsulas de las plantas de control sobre las cápsulas de las plantas colonizadas endófiticamente por cualquiera de (A) *Beauveria bassiana* ($P < 0,0001$; Prueba de rangos con signo de Wilcoxon) o (B) *Paecilomyces lilacinus* ($P < 0,0001$; prueba de rangos con signo de Wilcoxon) (Fig. 6B).

5 Resultados de los ensayos sin selección de *N. viridula*: Durante la duración del ensayo, una proporción significativamente mayor de individuos de *N. viridula* a lo largo del tiempo en contacto con y alimentándose de cápsulas de plantas de control no tratadas en relación con las de cualquiera de los grupos de tratamiento con los endófitos *Beauveria bassiana* o *Paecilomyces lilacinus* (prueba de rangos con signo de Wilcoxon, $P < 0,0001$ para
10 ambas comparaciones) (Fig. 7A). El ANOVA de mediciones repetidas indicó un efecto significativo del tiempo ($F_{1,116} = 86,175$; $P < 0,001$) con una mayor proporción de insectos en contacto con el cuadrado a medida que avanzaba el ensayo (Figura 1), También hubo un efecto significativo del tratamiento con endófitos ($F_{2,116} = 4,929$; $P = 0,009$) sin interacción significativa de tratamiento con endófito X tiempo ($F_{2,116} = 1,015$; $P = 0,366$). De los 40 insectos en cada grupo de tratamiento, el 12,5% del grupo de control no pudo hacer contacto con el cuadrado durante el transcurso del ensayo, mientras que un 35 % y un 32,5 % significativamente más altos de los insectos de grupos de tratamiento
15 con *Beauveria bassiana* y *Paecilomyces lilacinus*, respectivamente, no pudo hacer contacto (prueba X2, $P < 0,0001$). Entre los insectos que hicieron contacto con un cuadrado, hubo una diferencia significativa en la latencia al primer contacto entre los grupos de tratamiento ($F_{2,85} = 7,225$; $P < 0,0001$) con el grupo de control presentando una latencia de contacto más corta que cualquiera de los grupos de tratamiento con los endófitos *Beauveria bassiana* (prueba posthoc LSD; $P = 0,001$) o *Paecilomyces lilacinus* (prueba LSD posthoc; $P = 0,006$ (Fig. 7B).

Ejemplo 10: Se conservan más cápsulas después del tratamiento con endófitos

25 Durante el ensayo de campo, la fenología y el desarrollo del algodón se cuantificaron utilizando un sistema de mapeo e información de la planta desarrollado específicamente para que el algodón rastree el desarrollo y la retención de la fruta por la planta como un medio para controlar el desarrollo y el estrés de la planta (COTMAN™, Cotton Inc.). Una medida del estrés del algodón es la retención de flores en desarrollo (cuadrados) y frutos (cápsulas) en la primera posición de fructificación en las ramas. Los cuadrados y cápsulas de primera posición se midieron en 5 plantas por fila en cada una de las cinco parcelas replicadas ($N = 10$ plantas por parcela)
30 para cada grupo de tratamiento.

La Fig.10 demuestra que a principios de la temporada de cultivo, cuando las flores comienzan a desarrollarse, se observó una tendencia a una mayor retención de cuadrados en las plantas tratadas con endófito en relación con los controles. Esta tendencia continuó más adelante en la temporada como lo demuestra la retención de cápsulas significativamente mayor entre los grupos de tratamiento con endófitos en relación con las plantas de control no tratadas.
35

La Fig. 8 demuestra la reducción en el daño de las cápsulas de algodón durante los ensayos de campo. En relación con las plantas de control, los niveles de daño de las cápsulas asociado a los insectos fueron más bajos entre las plantas que fueron tratadas remojando semillas en soluciones de esporas de *Beauveria bassiana* y *Paecilomyces lilacinus* a concentraciones de 10^6 y 10^8 esporas/ml. Efectos positivos de los hongos endófitos en el rendimiento de la planta de algodón en condiciones de campo.
40

Ejemplo 11: El tratamiento con endófitos aumenta el rendimiento

45 Al final del ensayo de campo que emplea tratamiento de endófitos y plantas de tratamiento, las parcelas se cosecharon a máquina con un recogedor de 1 hilera. Sorprendentemente, los rendimientos finales en la cosecha fueron significativamente más altos de lo esperado (25 % más que los controles no tratados). Inesperadamente, el tratamiento con *Paecilomyces lilacinus* o *Beauveria bassiana* dio como resultado rendimientos más altos que las plantas de control sin tratar, independientemente de la concentración inicial de tratamiento de semillas. (Fig. 11)
50

Ejemplo 12: El tratamiento con endófitos del sorgo aumentó el crecimiento en la GH

55 El efecto de las composiciones microbianas descritas sobre el sorgo se probó en un ensayo de plántulas. Las semillas de sorgo bicolor se esterilizaron en superficie usando etanol y lejía como se describe en el Ejemplo 1 para el algodón. Se prepararon tres cepas (*B. bassiana*, *P. fumosoroseus*, y *P. lilacinus*) como suspensiones de conidios a 10^7 conidios/ml, y se recubrieron con las semillas de sorgo como se describe en el Ejemplo 1. Las semillas de control se remojaron en agua estéril en lugar de una suspensión de conidios. Las semillas plantadas se mantuvieron en condiciones de cámara de crecimiento constante durante dos semanas a una replicación de 10. Al final de las dos
60 semanas, las plantas se retiraron de la cámara de crecimiento y se midió la altura de la planta y la biomasa. La Fig. 12A muestra el aumento en la altura de la planta cuando se aplica con la composición microbiana descrita en relación con el control ($p < 0,05$). La Fig. 12B muestra el aumento de la biomasa vegetal en plantas cultivadas a partir de semillas que se trataron con la composición microbiana descrita en relación con el control ($p < 0,05$).

65 **Ejemplo 13: El tratamiento con endófitos fúngicos modula las frecuencias de colonización de endófitos naturales**

Para determinar si los tratamientos de semillas con endófitos podrían alterar el microbioma de la planta cultivada a partir de la semilla, se trataron las semillas de algodón con suspensiones de esporas de *Paecilomyces lilacinus* o *Beauveria bassiana*. Las plantas se cultivaron en el campo como parte de un ensayo de campo y se mantuvieron bajo prácticas agrícolas convencionales. Los hongos endofíticos se aislaron en medios PDA por separado del tallo/hoja sobre el suelo esterilizado en la superficie y del tejido de la raíz debajo del suelo para evaluar los cambios en la comunidad microbiana. La comparación que se muestra en la Fig. 13 es relativa a las comunidades de hongos endófitos en plantas de control no tratadas. Los resultados muestran que estos tratamientos pueden alterar las tasas de colonización de endófitos fúngicos naturales.

Los tratamientos con endófitos fúngicos pueden alterar las frecuencias de colonización de cualquiera de los endófitos fúngicos presentes de forma natural en las plantas. Para determinar qué otros endófitos naturales pueden verse afectados por los tratamientos de semillas con hongos endófitos, se evaluó la identidad de los endófitos fúngicos del algodón aislados de plantas de dos variedades comerciales de algodón. CG3787B2RF y PHY499WRF. Las muestras se obtuvieron durante un ensayo de variedades cerca de Lubbock, Texas, Estados Unidos identificado como Lubbock-RACE. Se recolectó una sola hoja sana de cada una de las nueve plantas individuales muestreadas por variedad en múltiples parcelas replicadas dispuestas en un diseño de bloques aleatorizados para controlar la variación espacial en el campo. Para identificar las especies de hongos endófitos, se extrajo el ADN genómico completo y la región del espaciador interno transcrito (ITS) del ADN ribosómico se amplificó como un código de barras para 454 pirosecuenciación utilizando los cebadores de fusión universal ITS1F directo e ITS2 inverso. Los hongos endófitos identificados en este experimento, junto con los que se muestran en la Fig. 13, se enumeran en la Tabla 2.

Tabla 2: Endófitos fúngicos naturales que pueden ser alterados por tratamientos de semillas con otros endófitos fúngicos

Filo	Clase	Orden	Familia	Género/Especie
Ascomycota				
	Leotiomycetes			
	Leotiomycetes			Geomyces auratus
	Dothideomycetes	Botryosphaerales	Botryosphaeriaceae	Macrophomina sp.
	Dothideomycetes	Capnodiales	Davidiellaceae	
	Dothideomycetes	Capnodiales	Davidiellaceae	Cladosporium sp.
	Dothideomycetes	Capnodiales	Davidiellaceae	Cladosporium cladosporioides
	Dothideomycetes	Capnodiales	Davidiellaceae	Davidiella sp.
	Dothideomycetes	Capnodiales	Mycosphaerellaceae	Cercospora sp.
	Dothideomycetes	Capnodiales	Mycosphaerellaceae	Cercospora beticola
	Dothideomycetes	Pleosporales		
	Dothideomycetes	Pleosporales	Pleosporaceae	
	Dothideomycetes	Pleosporales	Pleosporaceae	<i>Alternaria</i> sp.
	Dothideomycetes	Pleosporales	Pleosporaceae	<i>Alternaria alternata</i>
	Dothideomycetes	Pleosporales	Pleosporaceae	<i>Alternaria citri</i>
	Dothideomycetes	Pleosporales	Pleosporaceae	<i>Alternaria porri</i>
	Dothideomycetes	Pleosporales	Pleosporaceae	<i>Alternaria tenuissima</i>
	Dothideomycetes	Pleosporales	Pleosporaceae	<i>Cochliobolus</i> sp.
	Dothideomycetes	Pleosporales	Pleosporaceae	<i>Curvularia</i> sp.
	Dothideomycetes	Pleosporales	Pleosporaceae	<i>Epicoccum</i> sp.
	Dothideomycetes	Pleosporales	Pleosporaceae	<i>Exserohilum</i> sp.
	Dothideomycetes	Pleosporales	Pleosporaceae	<i>Lewia</i> sp.
	Dothideomycetes	Pleosporales	Pleosporaceae	<i>Lewia infectoria</i>
	Dothideomycetes	Pleosporales	Pleosporaceae	<i>Pyrenophora</i> sp.
	Dothideomycetes	Pleosporales	Pleosporaceae	<i>Pyrenophora triticirepentis</i>
	Dothideomycetes	Pleosporales	Pleosporaceae	<i>Pleospora</i> sp.
	Dothideomycetes	Pleosporales	Didymellaceae	<i>Phoma americana</i>
	Dothideomycetes	Pleosporales	Sporormiaceae	<i>Preussia africana</i>
	Eurotiomycetes	Chaetothyriales		
	Eurotiomycetes	Chaetothyriales	Chaetothyriaceae	
	Eurotiomycetes	Eurotiales	Trichocomaceae	
	Eurotiomycetes	Eurotiales	Trichocomaceae	<i>Aspergillus</i> sp.
	Eurotiomycetes	Eurotiales	Trichocomaceae	<i>Penicillium</i> sp.
	Eurotiomycetes	Eurotiales	Trichocomaceae	<i>Thermomyces</i> sp.
	Eurotiomycetes	Eurotiales	Trichocomaceae	<i>Thermomyces lanuginosus</i>

(continuación)

Filo	Clase	Orden	Familia	Género/Especie
	Saccharomycetes	Saccharomycetales		
	Saccharomycetes	Saccharomycetales	Saccharomycetaceae	
	Saccharomycetes	Saccharomycetales	Saccharomycetaceae	Candida sp.
	Saccharomycetes	Saccharomycetales	Saccharomycetaceae	Candida quercitrusa
	Saccharomycetes	Saccharomycetales	Saccharomycetaceae	Candida tropicalis
	Saccharomycetes	Saccharomycetales	Saccharomycetaceae	Cyberlindnera sp.
	Saccharomycetes	Saccharomycetales	Saccharomycetaceae	Cyberlindnera jadinii
	Saccharomycetes	Saccharomycetales	Saccharomycetaceae	Kluyveromyces sp.
	Saccharomycetes	Saccharomycetales	Saccharomycetaceae	Kluyveromyces marxianus
	Sordariomycetes			
	Sordariomycetes	Diaporthales	Gnomoniaceae	Gnomoniopsis sp.
	Sordariomycetes	Hypocreales	Cordycipitaceae	Beauveria bassiana
	Sordariomycetes	Hypocreales	Cordycipitaceae	Cordyceps sp.
	Sordariomycetes	Hypocreales	Cordycipitaceae	Cordyceps bassiana
	Sordariomycetes	Hypocreales	Nectriaceae	
	Sordariomycetes	Hypocreales	Nectriaceae	Fusarium sp.
	Sordariomycetes	Hypocreales	Hypocreaceae	
	Sordariomycetes	Hypocreales	Hypocreaceae	Gibellulopsis nigrescens
	Sordariomycetes	Hypocreales	Hypocreaceae	Hypocrea sp.
	Sordariomycetes	Hypocreales	Hypocreaceae	Hypocrea lixii
	Sordariomycetes	Hypocreales	Hypocreaceae	Hypocrea virens
	Sordariomycetes	Hypocreales	Hypocreaceae	Trichoderma sp.
	Sordariomycetes	Hypocreales	Hypocreaceae	Trichoderma tomentosum
	Sordariomycetes	Hypocreales	Plectosphaerellaceae	Verticillium sp.
	Sordariomycetes	Ophiostomatales	Ophiostomataceae	
	Sordariomycetes	Ophiostomatales	Ophiostomataceae	Ophiostoma sp.
	Sordariomycetes	Ophiostomatales	Ophiostomataceae	Ophiostoma dendifundum
	Sordariomycetes	Sordariales	Chaetomiaceae	Chaetomium sp.
	Sordariomycetes	Sordariales	Chaetomiaceae	Chaetomium globosum
	Sordariomycetes	Sordariales	Chaetomiaceae	Thielavia hyrcaniae
	Sordariomycetes	Sordariales	Chaetomiaceae	Taifanglania sp.
	Sordariomycetes	Sordariales	Chaetomiaceae	Taifanglania inflata
	Sordariomycetes	Sordariales	Lasiosphaeriaceae	Schizothecium inaequale
	Sordariomycetes	Trichosphaeriales	Trichosphaeriaceae	Nigrospora sp.
	Sordariomycetes	Xylariales	Amphisphaeriaceae	Truncatella angustata
Basidiomycota	Agaricomycetes	Cantharellales	Ceratobasidiaceae	Rhizoctonia sp.
	Agaricomycetes	Corticiales	Corticaceae	
	Agaricomycetes	Corticiales	Corticaceae	Phanerochaete sp
	Agaricomycetes	Polyporales	Coriolaceae	
	Agaricomycetes	Polyporales	Coriolaceae	Trametes sp.
	Agaricomycetes	Polyporales	Coriolaceae	Trametes hirsuta
	Agaricomycetes	Polyporales	Coriolaceae	Trametes villosa
	Agaricomycetes	Russulales	Peniophoraceae	
	Microbotryomycetes	Sporidiobolales		
	Microbotryomycetes	Sporidiobolales	Sporidiobolaceae	Rhodotorula sp.
	Microbotryomycetes	Sporidiobolales	Sporidiobolaceae	Rhodotorula mucilaginosa
	Tremellomycetes			
	Tremellomycetes	Tremellales		
	Tremellomycetes	Tremellales	Tremellaceae	Cryptococcus sp
	Tremellomycetes	Tremellales	Tremellaceae	Cryptococcus skinneri
	Tremellomycetes	Tremellales	Tremellaceae	Tremella sp.

Ejemplo 14: El tratamiento de semillas con endófitos fúngicos lleva a la modulación de los niveles de fitohormonas en plantas cultivadas a partir de la semilla.

5 Para determinar si el tratamiento de semillas con endófitos fúngicos afecta a los niveles de fitohormonas en plantas

5 cultivadas a partir de la semilla, se recolectó tejido de la raíz o de la tercera hoja verdadera de plantas de algodón inoculadas con los endófitos *Beauveria bassiana* o *Paecilomyces lilacinus*. El experimento se realizó con tres tratamientos endófitos (control no colonizado, *B. bassiana* o *P. lilacinus*) y, para *Beauveria bassiana*, dos tratamientos de herbívoros (sin áfidos o con áfidos herbívoros durante 1, 4, 8, 24 o 48 horas). Se evaluaron mediante LC-MS en tejidos de hoja y raíz por separado los niveles de fitohormonas para el ácido abscísico (ABA), ácido tuberónico (12-OH-JA, un producto de oxidación de JA-Ile) (TA), ácido ascórbico (AA), ácido 12-oxofitodienoico (un precursor de JA) (OPDA), JA-iso-leucina (JA-Ile) y ácido salicílico (SA). Todas las comparaciones de los niveles de fitohormonas se hicieron frente a las plantas en el grupo de control no colonizado con significación de $P < 0,05$. Los niveles de fitohormonas en plantas cultivadas a partir de semillas tratadas con *Beauveria bassiana* se muestran en la Tabla 3, y los niveles de fitohormonas en plantas cultivadas a partir de semillas tratadas con *Paecilomyces lilacinus* se muestran en la Tabla 4.

Tabla 3: Niveles de fitohormonas en plantas cultivadas a partir de semillas tratadas con *Beauveria bassiana*

Herbivoría	Fitohormona	Tejido	Regulado positivamente/negativamente	Tejido	Regulado positivamente/negativamente
Sí No	ABA	Hojas	Abajo a las 8 horas de alimentación No significativo	Raíces	Regulado negativamente a las 48 horas de alimentación Regulado positivamente
Sí No	TA	Hojas	No significativo No significativo	Raíces	Regulado positivamente a las 48 horas de alimentación No significativo
Sí No	AA	Hojas	Abajo a las 4 horas, arriba a las 24 horas No significativo	Raíces	Arriba a las 8 horas, abajo a las 48 horas Regulado positivamente
Sí No	OPDA	Hojas	No significativo No significativo	Raíces	Arriba a las 4 y 8 horas Regulado positivamente
Sí No	JA-Ile	Hojas	Arriba a las 48 horas No significativo	Raíces	Arriba a las 48 horas Regulado positivamente
Sí No	SA	Hojas	Arriba a 1 hora, 8 horas, 24 y 48 horas No significativo	Raíces	Abajo a las 4 horas el resto n.s No significativo

15 Tabla 4: Niveles de fitohormonas en plantas cultivadas a partir de semillas tratadas con *Paecilomyces lilacinus*

Sí	ABA	Hojas	Abajo a las 48 horas	Raíces	Arriba a 1 hora y 8 horas
Sí	TA	Hojas	Abajo a las 4 y 8 horas	Raíces	Arriba a las 4 horas
Sí	AA	Hojas	Abajo a las 4 y 8 horas	Raíces	Arriba a las 4 horas
Sí	OPDA	Hojas	Abajo a las 4 y 8 horas	Raíces	Arriba a las 4 y 48 horas, abajo a las 24 horas
Sí	JA-Ile	Hojas	Abajo a las 8 y 48 horas	Raíces	Arriba a las 4 y 24 horas
Sí	SA	Hojas	Arriba a las 1 y 4 horas, abajo a las 8 horas	Raíces	Arriba a 1, abajo a las 8 horas

Ejemplo 15: Los tratamientos de semillas con endófitos fúngicos alteran los rasgos de ciertas variedades de cultivo de algodón en ensayos de campo

20 Los ensayos de campo de 2014 se ejecutaron de manera similar a la descrita en el Ejemplo 6. Durante el verano se realizó un ensayo de campo con los aislamientos que se enumeran a continuación. Cada parcela constaba de cuatro hileras de 15,24 m (40 pies), cada uno separado por 101,6 cm (40 pulgadas), y hubo 6 parcelas replicadas por tratamiento. El rendimiento de las parcelas tratadas con las composiciones microbianas descritas se comparó con respecto a las parcelas de control no tratadas. Para los trips, esta evaluación de daños se realizó en una escala de 0 a 5; 0 = sin daños, 1 = cicatrices de alimentación notables, pero sin retraso en el crecimiento, 2 = alimentación notable y retraso del crecimiento del 25 %, 3 = alimentación con terminales de hojas ennegrecidas y retraso en el crecimiento del 50 %, 4 = alimentación severa y retraso del crecimiento del 75 %, y 5 = alimentación severa y retraso del crecimiento del 90 %. Para las pulguitas, el número de insectos por planta se cuantificó y se documentó como un promedio para cada parcela. La Fig. 14 muestra la mejora del rendimiento de los cultivos cuando se tratan con las composiciones microbianas descritas, para las variedades de Delta Pine y Phytogen, respectivamente. La Fig. 15 muestra la mejora del rendimiento agregado de los microbios a través de las dos variedades de cultivo. Las barras representan intervalos de confianza del 95 %. La Fig. 16A muestra el efecto beneficioso de 12 de 15 composiciones microbianas probadas en daños por trips en la variedad de cultivo Delta Pine. En la variedad de cultivo Phytogen, solo 2 de las 15 composiciones microbianas probadas mostraron un beneficio al reducir el daño por trips. La Fig. 16B muestra el efecto beneficioso de reducir el daño de las pulguitas en la variedad de cultivo Phytogen, en donde 6 de los 15 endófitos fúngicos facultativos probados mostraron una disminución promedio en el daño por pulguitas en comparación con las plantas de algodón no tratadas. En la variedad de cultivo Delta Pine, solo una composición microbiana mostró un efecto beneficioso sobre el daño de la pulguita.

También se evaluaron una serie de otros rasgos de plantas de mitad de temporada en el campo para determinar el efecto de las composiciones de endófitos fúngicos descritas. La Fig. 17A muestra el aumento beneficioso de las composiciones microbianas descritas sobre la longitud media de la raíz a mitad de temporada. La Fig. 17B muestra el aumento beneficioso de las composiciones de endófitos fúngicos descritas sobre el peso subterráneo a mitad de temporada. La Fig. 18 muestra el aumento beneficioso de las composiciones de endófitos fúngicos descritas sobre la temperatura de la copa a mitad de temporada para las variedades de cultivo Delta Pine y Phytogen. La Fig. 19 muestra el aumento beneficioso de las composiciones de endófitos fúngicos descritas sobre el NDVI (Índice de Vegetación de Diferencia Normalizada) de mitad de temporada para las variedades de cultivo Delta Pine y Phytogen. El NDVI es una medida del contenido de clorofila. La Fig. 20 muestra el aumento beneficioso de las composiciones de endófitos fúngicos descritas sobre la retención de cuadrados de primera posición a mitad de temporada tanto para las variedades de cultivo Delta Pine y Phytogen. La Fig. 21 y la Fig. 22 muestran la modulación (hacia arriba en julio y hacia abajo en agosto) de la altura de la planta a mitad de temporada cuando se trata con las composiciones de endófitos fúngicos descritas para las variedades de cultivo Delta Pine y Phytogen. La Fig. 23 muestra un aumento de la biomasa en las plantas tratadas con endófitos (mitad derecha de la imagen) en comparación con el control no tratado (mitad izquierda de la imagen).

En las figuras 15 a la 22, TAM505 es *Acremonium* sp., TAM32 es *Epicoccum nigrum*, TAM534 es *Cladosporium urdinicola*, TAM244 es *Cladosporium* sp., TAM514 es *Cladosporium urdinicola*, TAM474 es *Cladosporium cladosporioides*, TAM554 es *Chaetomium globosum*, TAM15 es *Exserohilum* sp., TAM488 es *Epicoccum nigrum*, TAM452 es *Cladosporium urdinicola*, TAM490 es *Paecilomyces lilacinus*, TAMBB es *Beauveria bassiana*, TAM105 es *Cochliobolus* sp., TAM189 es *Bipolaris* sp., y TAM47 es *Epicoccum nigrum*.

Ejemplo 16: Los tratamientos de semillas con endófitos fúngicos proporcionan tolerancia a la sequía en variedades de cultivo de algodón en ensayos de invernadero

Las plantas de algodón germinaron a partir de semillas de control tratadas con endófitos y sin tratar en el invernadero. Todas las semillas se regaron durante 7 días o hasta la etapa de cotiledón utilizando un volumen de agua de saturación de suelo predeterminado por planta. A los 7 DDP, el agua se retuvo de las plantas con estrés hídrico mientras que los controles continuaron siendo regados. El tiempo hasta el marchitamiento y el tiempo hasta la muerte se midieron a un máximo de 21 DDP. Los datos en la Figura 24 muestran el tiempo medio para marchitarse, y los datos en la Figura 25 muestran el tiempo medio hasta la muerte. El tratamiento con endófitos aumentó la supervivencia de las plantas sometidas a estrés por sequía tanto en las variedades de cultivo Delta Pine (DTP) como Phytogen (PHY). En las Figuras 24 y 25, el endófito número 194 es *Epicoccum nigrum*, 249 es *Cladosporium cladosporioides*, 355 es *Chaetomium globosum*, 46 es *Epicoccum* sp., 463 es *Cladosporium* sp., 534 es *Cladosporium uredinicola*, 554 es *Chaetomium globosum*, 58 es *Epicoccum nigrum*, y el control es sin tratamiento con endófitos.

Ejemplo 17: Identificación de endófitos fúngicos con al menos un 97 % de identidad con los de la Tabla 1

Todos los endófitos fúngicos conocidos con un 97 % de identidad con la SEQ ID NO: 7 hasta la SEQ ID NO: 77 se identificaron y se enumeran aquí por número de registro: FJ425672, AY526296, JQ760047, UDB014465, KC662098, HQ649874, JQ764783, EU881906, KF251285, JQ862870, AB019364, AB594796, JF773666, JN034678, KC343142, EU707899, AB627855, GU138704, JN695549, DQ279491, HM776417, AB361643, DQ782839, AF222826, EU682199, DQ782833, EU054429, FJ025275, AY354239, AF222828, GU721921, GU721920, DQ093715, AJ309335, FR774125, JQ747741, EF042603, KC968942, HE584924, AY740158, FJ645268, HQ692590, GQ203786, AY233867, HE579398, AB777497, KF435523, DQ420778, JQ649365, AJ271430, GQ996183, EF070423, FJ172277, AF483612, JX675127, EF070420, EF070421, AB741597, JN 225408, DQ019364, KF251279, EF194151, EU977196, JX981477, EU686115, JX021531, FJ527863, AJ302451, AJ302455, JN975370, EU754952, AF284388, KF296855, AF502785, JX317207, AF502781, DQ278915, EU686867, KC179120, HM991270, AF284384, DQ632670, JQ759806, JQ747685, EU885302, GU721781, EF434047, EF505854, JQ666587, JQ619887, GQ919270, KF531831, AB627854, DQ914679, DQ914681, HQ599592, DQ279490, DQ660336, JX069862, AB607957, HE820869, FJ859345, JX966567, GU910230, AB627850, JX144030, DQ914723, HM595556, KC771473, DQ849310, EU179868, KF312152, JN890447, JX042854, EU554174, JN198518, HM992813, JQ845947, KF251310, JQ758707, AM930536, KF296912, JN865204, JN943512, GQ921743, EU245000, EU977304, EU144787, HE579322, HE579402, GU910171, HE792919, KC960885, DQ485941, JN604449, HQ607913, AF502620, DQ468027, JX944132, JN207338, JQ922240, JN207336, JX559559, JN207330, JN207333, HE820882, JX969625, HQ339994, JF744950, HE584937, JN120351, JX298885, DQ872671, AJ877102, JQ081564, DQ019391, AF071342, EF104180, JQ759755, GU827492, JN418769, GU324757, JX984750, JX256420, KF436271, JX205162, JN712450, KF435911, GU367905, JX416919, KC315933, JQ736648, AY904051, AF404126, FJ466722, HE584965, JN890282, HE584966, HQ166312, KC305124, HE977536, KC305128, AY907040, JF710504, AF483609, AJ302460, AJ302461, AJ302462, AY969615, EU685981, U75615, AJ302468, FJ210503, GU237860, JX960591, JX143632, HM044649, EU164404, HE584824, HQ116406, DQ156342, JX416911, U75617, GU721359, KC427041, EU254839, JX262800, KC179307, HQ107993, KF361474, GU721420, HM053659, EF619702, EU686156, HE820839, HQ634617, GU721810, AB277211, AJ302417, KC315945, JQ002571, AM237457, AF009805, JX489795, EU680554, KC507199, FJ236723, HQ692618, JN846717, JX944160, JQ585672, KF435573, EU520590, HM581946, DQ250382, JX243908, KC343184, KC485454, GQ479695, GU237760, KF147147, EF619849, GU237767,

GU237766, AB818997, AF502847, EU683672, KF225801, KC965743, AJ488254, DQ825983, JN031007,
 DQ825985, KF028765, AB818999, HQ238268, EU685984, KC966180, HE998711, HQ533007, AM113729,
 KF251637, FN394692, KF435172, JN207307, JQ814305, HM770988, KC145175, AB511813, EU552102, AJ309344,
 5 EU645686, JQ936328, JN038492, DQ875349, EU977228, JQ814357, KF040480, JX317350, DQ401548,
 DQ318195, DQ318194, GU721776, KF193449, AF178544, AM262354, AB540567, AY627787, HE792907,
 HE579333, EU445372, AF362069, GU973687, HM053663, AB374284, DQ062977, GU237797, JQ760783,
 EF029240, HM751829, FM200445, AY953383, AY233922, JF742784, HM626650, FN610871, JX155902, JX006065,
 AB566289, AF163078, AY344976, AB566287, AF282089, AY251441, AF395693, JQ761899, AJ315835, HQ187633,
 10 KC287233, AJ315831, HE820745, JN418779, M13906, JQ761896, AJ315838, AY536373, HQ328035, JX838793,
 JQ758986, HQ166357, JN163855, KC965595, JN545789, JN545788, GU944558, HE579247, KF296900, EF377335,
 KC965954, GU269703, AB095511, EF419913, DQ993641, AB325678, HQ223035, AY513945, FJ197013,
 FR799277, HM071900, JN207293, FJ025268, JQ758966, GU138733, GU138730, DQ267595, GQ919269,
 JF770450, GU138734, DQ279488, DQ279486, DQ242472, EU164804, EF104177, GU366726, KF212243,
 DQ923534, GU079598, JX987761, JX984765, AY585343, JQ769260, GU721919, DQ923538, EU686756,
 15 EU040222, U75626, GU004264, EU686753, JQ765651, JX270629, JN943408, EF042604, AJ271588, HE579386,
 GQ479556, JQ759962, JX317413, EU516867, DQ780361, JQ905644, HQ649792, JQ247355, FN386296,
 AY004778, DQ102374, KF251383, GU237835, DQ383642, FN868479, GU237814, KC343032, JN943394,
 HQ450001, KC800573, AB217793, GQ851883, EU330630, JF309198, AY489281, GU325687, JX399008,
 AB164703, EF159407, AJ302429, UDB008141, UDB008140, FM200496, AJ302426, AJ302422, AJ302423,
 20 JQ683725, KF193481, JQ683727, HE792931, AB220252, FJ013057, DQ286207, JQ759811, JF414842, JX088707,
 JN415754, AY877715, JX559577, KC776206, GU166440, KC460867, FJ515595, KF056850, DQ118964, KC806227,
 KC631802, EU823315, AY528970, HQ116401, JX317516, KF251313, KC800565, AF502705, AF502810, JQ747697,
 AY527407, EU680518, AJ621773, AB374285, HQ832827, GU174316, DQ974750, JN198507, JF749806, JQ782739,
 HQ023202, AY616234, KC965315, AB743781, EU554161, KC507201, HM036624, EF464164, JX391942,
 25 AB743995, FJ415474, AY647237, KC965503, AB540553, HQ377280, JX898571, JN969419, DQ166962,
 HM123519, GU237881, AB683953, AY681487, EU498738, EU687037, AB540550, EF394866, AY853245,
 EU680532, HQ450006, AM292674, KF435452, AF502638, JN890354, JX256427, JF773646, KC916704, FJ347031,
 JN572154, AF443850, AY273300, JQ247392, JQ247393, HQ316569, GU324760, AB120858, JF440978, HQ115719,
 JF440976, DQ124120, HQ022342, AF333138, AB255293, GQ999456, DQ286209, HE820785, AF451751,
 30 JN038479, JQ044421, JQ044422, KC968911, KC492447, FM172902, AF437754, HM030631, HM595545,
 AY510424, JX414184, HQ184179, AB588822, JQ813816, JQ813817, FJ025255, AY745019, EU668292, HM216214,
 AF427105, EU479799, JQ769257, HM484866, EU301059, EU564808, AY265329, HQ701737, KC677889,
 AY907030, GU721349, AY304513, GU062277, AY907037, HM484859, AB576865, JX090109, UDB004179,
 JN692542, JQ327868, AY756490, JN890185, JX042994, FJ613832, AF009815, HQ332534, AF009816, EU686781,
 35 DQ520639, KC247154, HE820841, HE820847, JN717228, JX944174, GU721348, AB444657, KF435560,
 JQ585546, JQ775777, UDB004443, JF744968, KF192823, JN102440, AM504058, JF164074, GU907781,
 HQ889707, FJ612980, KF251355, AF502854, AF350291, HQ649989, GU966521, FJ481149, AY916491, AB444663,
 FR799197, KC691458, HE820786, JN802324, AF149926, AY372686, AY233908, HQ631033, UDB004677,
 KF251596, EU479757, GU079602, KC691456, DQ420883, DQ914680, DQ914683, KC305134, JN207313,
 40 AB512307, JN807326, GQ395365, JN207256, FJ425678, AB000932, JN207252, KF293814, GU138728, AY160210,
 UDB015006, KC565735, FJ524302, AF404127, EU272486, JF796251, JF439458, AY304511, KC592278,
 JX143583, JF440977, EU686925, JX982370, EU687082, JX966607, GU222370, JN687988, JN006771, JX436806,
 JQ936201, KF481950, AF178551, KC181937, JX144778, DQ790541, JF796076, JX898576, JX418352, AF097902,
 FJ411320, AF309617, FR863589, HM469970, AF163069, KF582795, AB566293, HE820790, GQ267191, JX130356,
 45 JN049828, HM060596, KF436001, GQ919283, HQ832834, JN049822, EU041786, AB594789, HE579259,
 HE584944, GU004268, GU237770, GQ921765, HE579253, KC305158, AF043599, GQ267190, AY344968,
 JN601031, JN969420, GU328624, AB540507, AM691002, JN102384, EU480019, JN545815, DQ993651, JX130360,
 JX398990, AY969704, KF251559, AF395695, HQ449993, U94714, KF435968, JX966550, AB859762, JF749808,
 U94713, GU981750, AF177152, FJ430599, JQ647433, GU981756, GU981757, EF104164, JN802311, GQ266146,
 50 HQ445083, JX155909, KF436256, DQ318204, GU078649, JN890115, DQ386141, GQ999487, EU686744,
 FJ426983, UDB013022, FN435799, EF600976, HM596012, JF825143, AM711381, EU816668, AJ972833,
 JQ905735, AF004686, EU266103, EU266107, HQ166334, EF679384, UDB004580, AM691001, JX399012,
 KC460880, JX982437, AB482221, AM292048, KF251253, AF350308, JF502446, JQ905803, KC179320, KF251393,
 GU053815, DQ323686, DQ323681, KC343119, HE820747, KF251529, DQ676536, U17215, DQ278919, EU489950,
 55 FR668016, GU903287, AJ302439, AJ302438, AJ302435, AJ302434, JN807325, AB741584, KC790941, DQ394387,
 FJ403513, GQ461566, KF193491, KC305164, AF502895, GU237707, EU977520, AB247177, AB482220,
 AY929321, GU004278, AB247171, GU461294, GU461295, JX123570, AY684241, EU686968, JX944143,
 JN871718, JQ796813, HQ829122, KF435590, KC806231, JX414183, GU944858, AF502733, JN662314, HQ022970,
 AY510418, KC623569, KC216145, KF129059, DQ279515, KF251526, JN192379, JN192376, HM140630,
 60 DQ006928, AF011289, EU089663, FJ825373, DQ307292, JN890424, KF155521, AB670714, GQ927271,
 AB670717, AB670711, AB670713, KF435279, GU053814, KF435375, JX414188, AF033422, GU225946,
 EU520610, JF773645, KC595884, KC965570, DQ812921, EU885299, DQ078757, FJ612618, KF018920, JX077035,
 EU686911, JX270567, HE579352, EU885297, FJ418185, DQ914724, HQ608112, HQ450016, GU174399,
 JN890327, HM999913, GU079580, HE584936, JQ765675, GU276947, JQ765670, HM588120, AY969986,
 65 JN120335, JQ247384, HQ891112, JQ769297, JN207242, EU002888, EU479803, AY365468, AF163083,
 DQ534482, KC146356, KF436052, AF416460, JX537970, JX156018, AY907035, GQ241278, AF409972, JQ388941,

FR668022, EU687151, DQ468026, AY251418, AB508842, AB508840, DQ233665, GU721949, AJ302444, JF927155, AJ302442, GU721976, AJ302440, KC790931, UDB004433, GU328539, EU479791, HQ649905, KC797566, JQ753968, GU721449, HQ701742, AY613410, GU062246, AY907045, HM991267, DQ979608, JQ781840, GU721442, EU426553, DQ980024, HQ634638, AF222836, GU222372, AY969338, EF104158, 5 AY431101, JQ081415, FJ649318, AY152583, JN943058, EU885294, HQ231255, FJ179477, EU304350, KC005785, FR799224, EF070422, HQ533789, AJ289870, KF025952, HQ611347, DQ485934, KC989106, JQ081921, HE820871, AF040125, JN603182, KF436170, HQ832964, DQ185074, KC216108, JN102460, GU553324, DQ318207, HQ589260, AB819001, AF699669, EU812501, AB819004, HQ436065, KC013976, KF251204, KF435307, AF249905, EF029217, EF029216, FJ708614, EF029198, JQ517314, GU199416, HM180398, EU479748, 10 GU721599, DQ185081, EF104175, JX021528, KF251430, AY611071, AY32922 1, JN207241, HM235963, JN890375, JF506092, KF193461, KF453551, HM123501, HM051074, AB255269, HQ904082, KF193500, FN562038, GU721911, EF417805, KF193504, KF028766, HE579312, EF433991, KF144910, KF144911, FM200450, AF163090, AB444665, AB444664, HQ649964, AB444666, AB444661, AY528998, DQ525492, KC870889, EF543844, GU073125, AY684240, JN163853, EU680538, AF395694, KC179102, KC1778197, JN102425, 15 DQ520638, EU244997, GU994552, DQ279527, KC179418, EF495164, AY999117, JX860441, JQ793663, DQ836775, EU479964, AY772736, AJ875343, KC013972, AJ875346, AY208785, HE614864, HF570009, KF435344, KC148376, EF641857, JX625368, AB512308, KC305146, AY266384, KC662096, HE579269, GU004277, GU004276, EF504668, EU687114, GU004272, GU004271, EU516731, KC213751, JN102394, HQ654776, JQ862729, EU687052, JX868653, FJ172294, JX130355, HE584891, FJ427063, GQ9 96174, FN252438, AJ633598, 20 JX398987, EU245009, HM069466, FJ859344, JN942165, FJ785433, EF504592, HQ449989, HQ449988, JN120346, JX868648, EF600969, HQ529711, JN383815, KF003112, JN890192, GU981748, EU15654, EF535663, GU328634, UDB004320, GQ999475, FR731421, GU322457, EF550969, GU322450, FJ477838, KC305130, AJ247519, JQ026214, AJ972825, KC305135, EU520614, EU338415, JQ747670, EU040241, HE584979, KF477240, HM162095, AB746179, KC963934, AY906949, JN975339, EU520120, HM071902, JX399005, EU828350, 25 JX399006, EF070418, FJ025231, EF070415, JN859327, JQ517292, JX399009, KF297004, JN618372, AY233888, EU784271, AM292673, EU514295, GQ921804, GU595027, HM008727, GU174426, JN673038, AF442801, EU686126, FJ440982, EU754960, GQ154505, GU055711, FJ175159, KC354573, DQ993639, JQ621881, JN102454, AY177233, FJ013071, AY566992, GQ120971, EF408555, JX317505, AF524905, FJ887922, AF264905, AF264906, HM997113, EF619857, KC537805, KC537804, FJ887928, AB255303, HQ671302, FJ210537, FN386267, 30 HQ649813, GU083033, KF251334, GU721297, KC181926, DQ832329, JQ781696, KF251233, KF251234, GQ505688, AJ437294, AJ437295, EF679363, HE820831, FN868450, GU174305, AY428866, AY956759, JQ759940, DQ489291, AJ271418, AY157952, EU784408, FJ427055, EF419900, FN813731, FJ427059, KF435462, JQ860113, KF209290, JF439437, KC565714, FJ228189, AF377282, JQ814364, HM991266, EF458676, AY762046, JN048884, HQ896484, HE579345, AB444659, EU076958, HQ402674, AF540504, AM922204, EU479758, 35 JN943840, JN943841, FJ427025, KC584194, AF502754, FJ418192, KC343004, AB524806, AJ877224, DQ394377, FJ427028, AF282090, GQ927270, EU178738, DQ059579, EF535699, KF040479, AF163085, JX256429, AY999125, KF477238, KC513506, GQ999534, GU237837, EU002898, HM164732, AF443193, AJ315828, AJ315829, AY586560, JX868722, EU686847, DQ875350, DQ421277, AM176740, JX280875, AM691003, KF302463, GQ921786, KC965801, AM691004, EF452446, EU040235, KC662103, KC662102, AY251073, DQ993637, 40 AY489282, FJ151434, JQ936199, EF505495, JN163856, JN659510, EF452449, EF504 607.1, GQ516009.1, GQ508761.1, KC800847.1, JX187590.1, GQ508832.1, KC800841.1, KC800840.1, EF504876.1, HQ540685.1, EF505180.1, AY842353.1, GU014821.1, FJ761203.1, GQ510033.1, EF504642.1, GU014822.1, AY998786.1, AB581046.1, EF452470.1, FJ907534.1, EF504721.1, Y08744.2, FJ757587.1, GU014820.1, AF400896.1, KC800831.1, EF505 804.1, EF505121.1, JX187587.1, KC800858.1, GQ866210.1, GQ522120.1, Y10748.1, 45 EF504853.1, EF452471.1, KJ83432 9.1, AB581446.1, JX187588.1, AF163061.1, AB632670.1, Y08746.1, EF505082.1, JX187589.1, EF504723.1, AF400889.1, KC800835.1 y EF505282.1.

Ejemplo 18: Endófitos y sus combinaciones

50 Los protocolos descritos en los Ejemplos 1-16 se usan en relación con los endófitos de la Tabla 1 para confirmar las propiedades beneficiosas para la salud de las plantas, tales como rendimiento y/o la resistencia al pasto, por ejemplo. En particular, los endófitos de la Tabla 1 se emplean en una combinación sintética con una planta tal como se describe en el presente documento con plantas de cultivo, tales como algodón. Cualquier endófito solo o 55 combinación de endófitos enumerados en la Tabla 1 también se puede usar de esta manera, empleando por ejemplo revestimientos de semillas o aplicaciones foliares, en suelo o en la rizosfera. Una composición de semillas puede comprender semillas y cualquier combinación de endófitos enumerados en la Tabla 1. Los endófitos enumerados en la Tabla 1 o combinaciones de los mismos se emplean así en métodos para prevenir la infestación de plagas, rendimiento aumentado, tratar una infestación de plagas, fabricar semillas resistentes a plagas; o aumentar el 60 rendimiento o reducir la pérdida de un cultivo de acuerdo con los métodos de los Ejemplos 1-15.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> The Texas A&M University System

65 <120> Endófitos fúngicos para mejorar el rendimiento de los cultivos y la protección contra las plagas

<130> TAMC:027WO
 <150> 61/900.929
 <151> 06/11/2013
 5
 <150> 61/900.935
 <151> 06/11/2013
 <160> 77
 10
 <170> PatentIn versión 3.5
 <210> 1
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 20
 <400> 1
 cggcggactc gcccagccc g 21
 <210> 2
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 30
 <400> 2
 ccgctcggg gttccggtgc g 21
 <210> 3
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 40
 <400> 3
 ctcagttgcc tcggcgggaa 20
 <210> 4
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 45
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 50
 <400> 4
 gtgcaactca gagaagaaat tccg 24
 <210> 5
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 55
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 60
 <400> 5
 tccgtaggtg aacctgcg 18

ES 2 779 303 T3

5	<210> 6 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
	<220> <223> Oligonucleótido sintético		
10	<400> 6 gctgcttct tcatgatgc	20	
15	<210> 7 <211> 225 <212> ADN <213> Acremonium alternatum		
	<400> 7		
	gggtacataa actcccaaac cattgtgaac ttaccactgt tgcttcggcg gcctcgcccc		60
	gggcgcgttc gcgcggcccc gaccagggcg tccgccggag gctccaaact cttgtctttt		120
	agtgtatttc tgagtggcat aagcaaataa atcaaaactt tcagcaacgg atctcttggg		180
	tctggcatcg atgaagaacg cagcaggact aacgtgtgtc gacgg		225
20			
25	<210> 8 <211> 225 <212> ADN <213> Alternaria alternata		
	<400> 8		
	gccaatgaac acctgoggag ggatcattac acaaatatga aggcgggctg gacctctcgg		60
	ggttacagcc ttgctgaata atcccccttg tcttttgcgt acttcttggt tccttggtgg		120
	gttcgcccac cactaggaca aacataaacc ttttgtaatt gcaatcagcg tcagtaacaa		180
	attaataatt acaactttca acaacggatc tcttggttct ggcat		225
	tggttaattac aaaatgaagc gggctggacc tctcgggggtt acagcctgct gaattattca		60
	cccttgtctt ttgcgtactt cttgtttcct tgggtgggttc gccaccact aggacaaaca		120
	taaacctttt gtaattgcaa tcagcgtcag taacaaatta ataattacaa ctttcaacaa		180
	cggatctctt ggttctggca tcgatgaaga acgcagcaaa ttaatgccgg ctggaacgcc		240
30	tctgggata		249
35	<210> 9 <211> 240 <212> ADN <213> Alternaria brassicae		
	<400> 9		

ES 2 779 303 T3

	gactttcata gtaggaggag cgggctggaa tcaccctctc ggggggtaca gccttgctga	60
	attatttcac ccttgtcttt tgcgtacttc ttgtttcctt ggtgggttcg cccaccacta	120
	ggacaaacat aaaccttttg taattgcaat cagcgtcagt aacaaattaa taattacaac	180
	tttcaacaac ggatctcttg gttctggcat cgatgaagaa cgcacagtca gtgtgaaatc	240
5	<210> 10 <211> 224 <212> ADN <213> <i>Alternaria compacta</i> <400> 10	
	tgcgtatgtc cgacatatca ggcgggctgg acctctcggg gttacagcct tgctgaatta	60
	ttcaccctt gtcttttgcg tacttcttgt ttccttggtg ggttcgcca cactaggac	120
	aaacataaac cttttgtaat tgcaatcagc gtcagtaaca aattaataat tacaactttc	180
10	aacaacggat ctcttggttc tggcatcgat gaaaaacgca tcaa	224
15	<210> 11 <211> 297 <212> ADN <213> <i>Alternaria dianthi</i> <400> 11	
	cctccggact ggctcgagga ggttggaac gaccacctca agccggaag ttggtcaaac	60
	tcggtcattt agaggaagta aaagtcgtaa caatttctcc gtaggtgaac ctgctggagg	120
	atcattacac aggtatgaag gcgggctgga atctctcggg gttacagcct tgctgaatta	180
	ttcaccctg tcttttgcgt acttcttgtt tcctgggtgg gttcgccac caccaggacc	240
20	aaccataaac cttttgtaat tgcaatcagc gtcagtaaca aataataat tacaact	297
25	<210> 12 <211> 249 <212> ADN <213> <i>Alternaria longipes</i> <400> 12	
30	<210> 13 <211> 227 <212> ADN <213> <i>Alternaria mali</i>	
35	<400> 13	

ES 2 779 303 T3

	atcgtggagg tcaggactat tacacatatg aaggcgggct ggaacctctc ggggttacag	60
	ccttgctgaa ttattcacc ttgtcttttg cgtacttctt gtttccttgg tgggttcgcc	120
	caccactagg acaaacataa accttttgta attgcaatca gcgtcagtaa caaattaata	180
	attacaactt tccacaacgg gatctcttgg gttctggcat cgctagc	227
	<210> 14	
	<211> 210	
5	<212> ADN	
	<213> Alternaria sesami	
	<400> 14	
	aggcgggctg gcacctctcg ggggtggccag ccttgctgaa ttattccacc cgtgtctttt	60
	gcgtacttct tgtttccttg gtgggctcgc ccaccacaag gaccaacca taaacctttt	120
	tgtaatggca atcagcgtca gtaacaatgt aataattaca actttcaaca acggatctct	180
10	tggttctggc atcgatgaag aacgcagcaa	210
	<210> 15	
	<211> 256	
15	<212> ADN	
	<213> Alternaria solani	
	<400> 15	
	atgtgtcatg gtatgaggcg ggctggacct ctcggggta cagccttgct gaattattca	60
	cccttgtctt ttgcgtactt cttgtttcct tgggtgggttc gccaccact aggacaaaca	120
	taaacctttt gtaattgcaa tcagcgtcag taacaaatta ataattacaa ctttcaacaa	180
	cggatctctt ggttctggca tcgatgaaga acgcagcga atgcgataag tagtgtgaat	240
	tgcagaattc agtaat	256
20	<210> 16	
	<211> 263	
	<212> ADN	
	<213> Alternaria sp.	
25	<400> 16	
	aggcgggctg gacctctcgg gggttacagcc ttgctgaatt attcaccctt gtcttttgcg	60
	tacttcttgt ttccttgggtg ggttcgccc ccactaggac aacataaac cttttgtaat	120
	tgcaatcagc gtcagtaaca aattaataat tacaactttc aacaacggat ctcttggttc	180
	tggcatcgat gaagaacgca gctaaataca tatgaaggcg ggctggaacg tcccgcggtt	240
	gcagacttgc tgacttattc acc	263
30	<210> 17	
	<211> 204	
	<212> ADN	

ES 2 779 303 T3

	<213> <i>Alternaria tenuissima</i>	
	<400> 17	
	tgaggcgggc tggacctctc ggggttacag ccttgctgaa ttattcacc	60
	cgtaacttctt gtttccttgg tgggttcgcc caccactagg acaaacataa accttttgta	120
	attgcaatca gcgtcagtaa caaattaata attacaactt tcaacaacgg atctcttgg	180
5	tctggcatcg atgaagaacg cagc	204
	<210> 18	
	<211> 244	
10	<212> ADN	
	<213> <i>Bipolaris spicifera</i>	
	<400> 18	
	acgaaggccg ttcgcggctg gactatztat tacccttgtc ttttgcgcac ttgttgtttc	60
	ctgggcgggt tcgctcgcca ccaggaccac aatataaacc ttttttatgc agttgcaatc	120
	agcgtcagta taacaaatgt aaatcattta caactttcaa caacggatct cttggttctg	180
	gcatcgatga agaacgcagc aatacacact caataaaaaa cgaaggccgt tcgcgagcgg	240
15	acta	244
	<210> 19	
	<211> 246	
	<212> ADN	
20	<213> <i>Cercospora canescens</i>	
	<400> 19	
	cttcggtgcg cttccccctt gggggacttt gggagggatc attactgagt gagggccttc	60
	gggctcgacc tccaaccctt tgtgaacaca acttgttgct tcgggggcga ccttgccgtt	120
	tcgacggcga gcgccccggg aggccttcaa aactgcate tttgcgtcgg agttaaagta	180
	aattaaacaa aactttcaac aacggatctc ttggttctgg catcgatgaa gaacgcagcg	240
	aatgc	246
25	<210> 20	
	<211> 280	
	<212> ADN	
	<213> <i>Cercospora capsici</i>	
30	<400> 20	

ES 2 779 303 T3

	<code>gactagctac ataggcttcg ggctcgacct ccaccctttg tgaacacaac ttgttgcttc</code>	60
	<code>gggggcgacc ctgccgtttc gacggcgagc gccccgggag gccttcaaac actgcatctt</code>	120
	<code>tgcgctcgag ttttaagtaaa ttaaacaataa ctttcaacaa cggatctctt ggttctggca</code>	180
	<code>tcgatgaaga acgcagcaga aatgcgataa gtaatgtgaa ttgcagaatt cagtgaatca</code>	240
	<code>tcgaatcttt gaacgcacat tgcgcccctt ggtattccga</code>	280
	<p><210> 21 <211> 220 <212> ADN <213> Cercospora kikuchii</p>	
5	<p><400> 21</p>	
	<code>cgtaggggtga acctgctggag ggatcattac tgagtgaggg ccttcgggct cgacctcaa</code>	60
	<code>ccctttgtga acacaacttg ttgcttcggg ggcgaccctg ccgtttcgac ggcgagcgcc</code>	120
	<code>cccggaggcc ttcaaactt gcactcttgc gtcggagttt aagtaaatta aacaaaactt</code>	180
10	<code>tcaacaacgg atctcttggg tctggcatcg atgaagaacg</code>	220
	<p><210> 22 <211> 243 <212> ADN <213> Cercospora zinnia</p>	
15	<p><400> 22</p>	
	<code>tcgattgaat ggctcagtga ggccttcgga ctggcccagg gaggtcggca acgaccacc</code>	60
	<code>agggccggaa agttgggtcaa actcgggtcat ttagaggaag taaaagtcgt aacaaggtct</code>	120
	<code>ccgtaggtga acctgctggag ggatcattac tgagtgaggg ccttcgggct cgacctcaa</code>	180
	<code>ccctttgtga acacaacttg ttgcttcggg ggcgaccctg ccgtttcgac ggcgatcact</code>	240
	<code>tgt</code>	243
20	<p><210> 23 <211> 291 <212> ADN <213> Chaetomium globosum</p>	
25	<p><400> 23</p>	
	<code>aaactcccta accattgtga acgttaccta taccgttgc tggcgggcg gccccggggt</code>	60
	<code>ttaccccccg ggcgcccctg ggccccaccg cgggccccg ccggaggtca ccaaactctt</code>	120
	<code>gataatttat ggcctctctg agtcttctgt actgaataag tcaaaaacttt caacaacgga</code>	180
	<code>tctcttgggt ctggcatcga tgaagaacgc agccatcatt agagagttgc aaactcccta</code>	240
	<code>aacccttgtg aacgtaacct ataccgttgc gttcggcggg cggcccccg g</code>	291
30	<p><210> 24 <211> 263</p>	

ES 2 779 303 T3

	<212> ADN	
	<213> Chaetomium piluliferum	
	<400> 24	
5	cattacagag ttgcaaaact ccctaaacca ttgtgaacgt taccttcaaa cggttgcttc	60
	ggcggggcggc cccgctccgc cgggtgcccc ctggccccct agcggggcgc ccgcccggagg	120
	aaaaccaaac tcttgattat aatggcctct ctgtctcttc tgtactgaat aagtcaaaac	180
	tttcaacaac ggatctcttg gttctggcat cgatgaagaa cgcagcgaaa tgcgataagt	240
	aatgtgaatt gcagaattca gtg	263
10	<210> 25	
	<211> 210	
	<212> ADN	
	<213> Chaetomium sp.	
15	<400> 25	
	ctccctaacc attgtgaacg ttacctaaac cgttgcttcg gcgggcggcc ccggggttta	60
	ccccccgggc gccctgggc cccaccgcgg gcgcccgcgg gaggtcacca aactcttgat	120
	aatttatggc ctctctgagt cttctgtact gaataagtca aaactttcaa caacggatct	180
	cttggttctg gcatcgatga aaaacgcagc	210
20	<210> 26	
	<211> 255	
	<212> ADN	
	<213> Cladosporium cladosporioides	
25	<400> 26	
	tctaccaccg ggatgttcat aaccctttgt tgtccgactc tgttgccctcc ggggcgacct	60
	tgccttcggg cgggggctcc ggggtggacac ttcaaactct tgcgtaactt tgcagtctga	120
	gtaaatttaa ttaataaatt aaaactttta acaacggatc tcttggttct ggcacgatg	180
	aagaacgcag ccaaacccagc aaaccgggc taacccccgg gatgttcatg accctttggt	240
	gtccgactct gaggc	255
30	<210> 27	
	<211> 240	
	<212> ADN	
	<213> Cladosporium sp.	
	<400> 27	

ES 2 779 303 T3

	actgcttcat tacaacaacg cccgggcttc ggcctgggta ttcaaaacc tttgttgcc	60
	gactctgttg cctccgcggc gaccctgcct tcgggcgggg gctccgggtg gacacttcaa	120
	actcttgctg aactttgcag tctgagtaaa cttaattaat aaattaaaac ttttaacaac	180
	ggatctcttg gttctggcat cgatgaagaa cggagcgaaa tgcgataagt aatgaattgc	240
5	<210> 28 <211> 226 <212> ADN <213> Cladosporium uredinicola	
	<400> 28	
	ggctctaccac cgggatgttc ataacccttt gttgtccgac tctggtgcct ccggggcgac	60
	cctgccttcg ggcgggggct ccgggtggac acttcaaact cttgcgtaac tttgcagtct	120
	gagtaaactt aattaataaa ttaaaacttt taacaacgga tctcttggtt ctggcatcga	180
10	tgaagaacgc agcgaaaatc aagtgggtct gcccccgca tgggat	226
15	<210> 29 <211> 250 <212> ADN <213> Cochliobolus sp	
	<400> 29	
	gctaattaac caataaccta tgaaggctgt acgccgtgc gccccggcc agttggctga	60
	ggctggatta tttattacc cttgtctttt gcgcacttgt tgtttcctgg gcgggttcgc	120
	ccgcctccag gaccacacca taaacctttt ttatgcagtt gcaatcagcg tcagtacaac	180
	aaatgtaaat catttacaac tttcaacaac ggatctcttg gttctggcat cgatgaagaa	240
20	ccgcaacagc	250
25	<210> 30 <211> 249 <212> ADN <213> Phanerochaete crassa	
	<400> 30	
	ggttgtagct ggcctcatac tgggcatgtg cacacctggc tcatccactc cttaacctct	60
	gtgcactttt tgtaggctct ggttgaaagg cgttgcttca cttcgggtgtg gtaatcgctg	120
	gaagacctgg tctatgtttt attacaaacg cttcagttat acaatgttta tctgcgtata	180
	acgcatttat atacaacttt cagcaacgga tctcttggtc ctcgcatcga tgaagaacgc	240
30	agctcgagt	249
	<210> 31 <211> 267 <212> ADN	

ES 2 779 303 T3

	<213> <i>Phoma americana</i>	
	<400> 31	
	cgtagctac atggaagtaa aagtagtaac aaggtttccg taggtgaacc tgcggaagga	60
	tcattaccta gagttgtagg ctttgccctgc tatctcttac ccatgtcttt tgagtacctt	120
	cgtttcctcg gcgggtccgc ccgccgattg gacaatttaa accatttgca gttgcaatca	180
	gcgtctgaaa aaacttaata gttacaactt tcaacaacgg atctcttggg tctggcatca	240
5	atgaaaaacg cagcaacaca aaattac	267
	<210> 32	
	<211> 205	
10	<212> ADN	
	<213> <i>Phoma subherbarum</i>	
	<400> 32	
	tacgtgcagc gctttgcctg ctatctctta cccatgtctt ttgagtacct tcgtttcctc	60
	ggcgggtccg ccgccgatt ggacaattta aaccatttgc agttgcaatc agcgtotgaa	120
	aaaaacttaa tagttacaac tttcaacaac ggatctcttg gttctggcat cgatgaagaa	180
15	cgcagcttac ctagagaatg cgtgt	205
	<210> 33	
	<211> 264	
20	<212> ADN	
	<213> <i>Phomopsis liquidambari</i>	
	<400> 33	
	aggcgcaccc agaaaccctt tgtgaactta taccttactg ttgcctcggc gcatgctggc	60
	cccctcgggg tcccctggag acagggagca ggcacgccgg cggccaagtt aactcttgtt	120
	tttactga aactctgaga aaaaaacaca aatgaatcaa aactttcaac aacggatctc	180
	ttggttctgg catcgatgaa gaacgcacaa gtggagggcc ccaggcgccc ccccaaaacc	240
	ttttttgagt tattacttac tggt	264
25		
	<210> 34	
	<211> 222	
	<212> ADN	
30	<213> <i>Phomopsis sp.</i>	
	<400> 34	

ES 2 779 303 T3

	ccggcgccacc cagaaaccct ttgtgaactt atacctactg ttgcctcggc gcaggccggc	60
	cttttgtcaa aaaaggcccc ctggagacag ggagcagccc gccggcggcc aaccaaactc	120
	ttgtttctac agtgaatctc tgaggaaaaa acataaatga atcaaaactt tcaacaacgg	180
	atctcttggt tctggcatcg atgaagaacg cagcatgctg gc	222
	<210> 35	
	<211> 255	
5	<212> ADN	
	<213> Pleospora sp.	
	<400> 35	
	cgggttggga cctcacctcg gtgagggtc cagcttgtct gaattattca cccatgtctt	60
	ttgogcaactt cttgtttcct gggcgggttc gcccgccacc aggaccaaac cataaacctt	120
	tttgtaattg caatcagcgt cagtaaacia tgtaattatt acaactttca acaacggatc	180
	tcttggttct ggcacgatg aagaacgcag cgaaatgcga tacgtagtgt gaattgcaga	240
10	attcagtgat tttgc	255
	<210> 36	
	<211> 349	
15	<212> ADN	
	<213> Pleosporaceae sp.	
	<400> 36	
	ggatcattac acaatatgaa ggcgggctgg aacctctcgg ggttacagcc ttgctgaatt	60
	attcaccctt gtcttttgcg tacttcttgt ttccttgggtg ggttcgccca ccaactaggac	120
	aaacataaac cttttgtaat tgcaatcagc gtcagtaaca aattaataat taccactttc	180
	aacaacggga tctcttggtt ctgggcatcg agcagaaaaa cgcagaattg aaggcgggct	240
	gggaacctct tcgggggggt ccagggcttt ggtgaattat tcacccttg cctttgcgta	300
20	cgttgtttgt tttccttggg gggggtaggc acacaaaaaa agaaaacgg	349
	<210> 37	
	<211> 222	
25	<212> ADN	
	<213> Preussia africana	
	<400> 37	
	aagtaccatt atcgtagggc ttcggccctg tcgagataga acccttgect ttttgagtac	60
	cttttcgttt cctcggcagc ctgcctgcc aatggggacc ccaacaaca ctttgcagta	120
	cctgtaaaca gtctgaacia acttttaaaa attaaaactt tcaacaacgg atctcttggt	180
	tctggcatcg atgaagaacg cagcgaatg cgataaacg tg	222

ES 2 779 303 T3

5	<210> 38 <211> 218 <212> ADN <213> Preussia sp.		
	<400> 38		
	ttcgagatac acccttgcct ttttgagtac cttttcgttt cctcggcagg ctgcctgcc	60	
	aacggggacc cttcaaaacg ctttgtaata cctgtaactg tctgatataa caagcaaaaa	120	
	tcaaaacttt caacaacgga tctcttggtt ctggcatcga tgaagaacgc agcaatcgtt	180	
	gggcttcggc ccattagaga taacaccctt gccttttt	218	
10	<210> 39 <211> 254 <212> ADN <213> Pseudozyma sp.		
15	<400> 39		
	acatctcgcg gttcagcctt gttgagtatt cacccttggt ttttgcggag aaatgtttg	60	
	gtggagggag caccagcacc aagacaaatc taaacctttt gcaattgcaa tacgggcgac	120	
	atttacctta ataattggtt atttcataag attatatctt ggttgaaact ccactggtaa	180	
	tgccatcgtc taaaatctaa aaacaacttt tggcaacgga tctcttggtt ctgcgatcga	240	
	tgaagaacgc agcc	254	
20	<210> 40 <211> 277 <212> ADN <213> Pyrenophora teres		
25	<400> 40		
	aggcagattg ggtagtcccc gcttttgggg tttgccatt ctggcgccat attcaccat	60	
	gtcttttgcg tactacttgt ttccttggcg ggttcgcccg ccaattggac tttattcaac	120	
	cctttttttt ttattgcaat cagcgtcagc aaaacaatgt aatcaattta caactttcaa	180	
	caacggatct cttggttctg gcatcgatga aaaacgcagc cacaatatga tggccgatgg	240	
	ggcaggcctc ttttgggggtt gccccctctg gcgccct	277	
30	<210> 41 <211> 289 <212> ADN <213> Colletotrichum capsici		
35	<400> 41		

ES 2 779 303 T3

	<code>gctcatcacc ctttgtgaca taccttaact gttgcttcgg cgggtaggcg tcccctgaaa</code>	60
	<code>aggacgtctc ccggccctct cccgtccgcg ggtggggcgc ccgccggagg ataaccaaac</code>	120
	<code>tctgatttaa cgacgtttct tctgagtgac acaagcaaat aatcaaaact tttacaacg</code>	180
	<code>gatctcttgg ttctggcatc gatgaagaac gcagcaatta ttggggtggt gctcatcacc</code>	240
	<code>ctttgtggtg aaccttaact gttgctgcgg cggggggcgg cgtcccctg</code>	289
5	<210> 42 <211> 216 <212> ADN <213> Coniolarrella gamsii	
	<400> 42	
	<code>tgacactccc aaaaccctg tgaacatacc gtacgttgcc tcggcggggg ggcgctcccc</code>	60
	<code>ccccgccggc ggcccacgaa actctgtttt gccctgaatc tctgaaacga caaactaaat</code>	120
	<code>cagttaaaac tttcaacaac ggatctcttg gttctggcat cgatgaagaa cgcagcgaac</code>	180
10	<code>tatagaagtg acccaactcc taaccactgt gaacaa</code>	216
15	<210> 43 <211> 268 <212> ADN <213> Coniothyrium aleuritis	
	<400> 43	
	<code>tagacttcac taaagcttgt agacttcggt ctgctacctc ttaccatgt cttttgagta</code>	60
	<code>ccttcgtttc ctccggcggg cgcgccgcg attggacaac attcaaacc tttgcagttg</code>	120
	<code>caatcagcgt ctgaaaaaac ataatagtta caactttcaa caacggatct cttggttctg</code>	180
	<code>gcatcgatga agaacgcagc gaaatgcgat aagtagtggt aattgcagaa ttcagtgaat</code>	240
20	<code>catcgaatct ttgaacgcac attgcgcc</code>	268
25	<210> 44 <211> 210 <212> ADN <213> Coniothyrium sp.	
	<400> 44	
	<code>gggctggatc tctcgggggt acagccttgc tgaattattc acccttgtct tttgcgtact</code>	60
	<code>tcttgtttcc ttggtgggtt cggccaccac taggacaaac ataaaccttt tgtaattgca</code>	120
	<code>atcagcgtca gtaacaaatt aataattaca actttcaaca acggatctct tggttctggc</code>	180
30	<code>atcgatgaag aacgcagcaa cactaatatg</code>	210
	<210> 45 <211> 218	

ES 2 779 303 T3

	<212> ADN		
	<213> <i>Corynespora cassiicola</i>		
	<400> 45		
5			
	cgcccccttcg agatagcacc ctttgtttat gagcacctct cgtttcctcg gcaggctcgc	60	
	ctgccaacgg ggaccacca caaacccatt gtagtacaag aagtacacgt ctgaacaaaa	120	
	caaaacaaac tatttacaac tttcaacaac ggatctcttg gttctggcat cgatgaagaa	180	
	cgcagcggat atcgtagggg ccgcgcccc ttccagat	218	
	<210> 46		
	<211> 204		
10	<212> ADN		
	<213> <i>Diaporthe</i> sp.		
	<400> 46		
	accctttgtg aacttatacc taccgttgcc tcggcgcagg ccggcccccc tcaccggggg	60	
	ccccccggag acgggggagca gcccgccggc ggccaaccaa actcttgttt cttagtgaat	120	
	ctctgagtaa aaatcataaa tgaatcaaaa ctttcaacaa cggatctctt ggttctggca	180	
	tcgatgaaga acgcagcaag ttgc	204	
15			
	<210> 47		
	<211> 281		
20	<212> ADN		
	<213> <i>Diatrype</i> sp.		
	<400> 47		
	ccatgtgaac ttacctttgt tgcctcggcg ggagagccta cccggtacct accctgtagt	60	
	taccggggag cgagctaccc tgtagccgc tgctggccga cccgccggtg gacagtaaaa	120	
	ctcttgtttt ttagtgatta tctgagtgtt tatacttaat aagttaaac tttcaacaac	180	
	ggatctcttg gttctggcat cgatgaagaa cgcagccaat acagagttat cttctcccag	240	
	cccatgtgaa cttacctttg ttgccccggc gggagagcct a	281	
25			
	<210> 48		
	<211> 338		
	<212> ADN		
30	<213> <i>Drechslerella dactyloides</i>		
	<400> 48		

ES 2 779 303 T3

	ggtagaaac tgttgtttcg gcgggatctc tgccccgggg gcgtcgcagc cccggaccaa	60
	gggggcccgc ggaggaccaa ccaaaactct ttttgtatac cccctcggcg gttttttta	120
	taatctgagc cttctcggcg cctctcgtag gcgtttcgaa aatgaatcaa aacttttaaa	180
	aacggatctc ttggttctgg catcggatga agaacgcaga gaaatgcgat aagtaatgtg	240
	aattgcagaa ttcactgaat catctaactt ttgaacggac attgcgcccg ccagttttct	300
	ggcgggcatg cctgtccgag cgtcatttca accctcga	338
	<210> 49	
5	<211> 247	
	<212> ADN	
	<213> Embellisia indefessa	
	<400> 49	
	gcatcgatac ctgatccgag gtcaaaagt gaaaaaggc tttgtggatg ctgaccttgg	60
	ctggaagaga gcgcgacttg tgctgcgctc cgaaaccagt aggccggctg caatgacttt	120
	aaggcgagtc tccagcgaac tggagacaag acgccaaca ccaagcaaag cttgagggta	180
	caaatgacgc tcgaacaggc atgccctttg gaataccaaa gggcgcaatg tgcgttcaaa	240
	aaaagca	247
10		
	<210> 50	
	<211> 207	
15	<212> ADN	
	<213> Epicoccum nigrum	
	<400> 50	
	ttgtagactt cggctctgcta cctcttacc atgtcttttg agtaccttcg tttcctcggc	60
	gggtccgccc gccgattgga caacattcaa accctttgca gttgcaatca gcgtctgaaa	120
	aaacataata gttacaactt tcaacaacgg atctcttggg tctggcatcg atgaaaaacg	180
	catcacctag agttttaga cttcggg	207
20		
	<210> 51	
	<211> 234	
	<212> ADN	
25	<213> Epicoccum sp.	
	<400> 51	
	gtacttacct acgatttgg gagttcggtc tgctacctct taccatgctc tttttaagta	60
	ccttcgtttc ctcggcgggt ccgcccgcg gttggacaac attcaaacc tttgcagttg	120
	caatcagcgt ctgaaaaaac ttaatagtta caactttcaa caacggatct cttggttctg	180
	gcatcgaaca caaacgcagc agcttttagg gacctaccgt ctctcctct tacc	234
30		
	<210> 52	
	<211> 237	

ES 2 779 303 T3

	<212> ADN		
	<213> Exserohilum rostratum		
	<400> 52		
5		gctaatttcc ccaccaaact tgtagggtgt ggtttgctgg caacagcgaa cgcgcccaag	60
		tatttttcac ccatgtcttt tgcgcacttt ttgtttcctg ggccagttcg ctcgccacca	120
		ggaccaacc ataaaccttt ttttatgcag ttgcaatcag cgtcagtata ataattcaat	180
		ttattaaaac tttcaacaac ggatctcttg gttctggcat cgatgaagaa cgcacaa	237
	<210> 53		
	<211> 223		
10	<212> ADN		
	<213> Fusarium chlamyosporum		
	<400> 53		
		tcccaacccc tgtgacatac ctatacgttg cctcggcgga tcagcccgcg ccccgtaaaa	60
		cgggacggcc cgcccagga cccctaaact ctgtttttag tggaacttct gagtaaaaca	120
		aacaaataaa tcaaaacttt caacaacgga tctcttggtt ctggcatcga tgaagaacgc	180
15		agctcgatga agaacgcagc cccctcccca cgggtgggaa cat	223
	<210> 54		
	<211> 258		
20	<212> ADN		
	<213> Fusarium sp.		
	<400> 54		
		cactcccaac ccatgtgaac ttatctcttt gttgcctcgg cgcaagctac ccgggacctc	60
		gcgccccggg cggcccgcg gcggacaaac caaactctgt tatcttagtt gattatctga	120
		gtgtcttatt taataagtca aaactttcaa caacggatct cttggttctg gcatcgatga	180
		agaacgcagc aaatcattac agaattatcc aactcccaa cccatgtgaa cttttctttt	240
		tgttgctcgg gcgcaage	258
25			
	<210> 55		
	<211> 236		
	<212> ADN		
	<213> Gibellulopsis nigrescens		
30	<400> 55		
		atactcataa ccctttgtga ccttcatacc tgttgcttcg gcggcgcgcc tctcggggcg	60
		tgcccgcggg cattatcaga atctctgttc gaaccgcagc atacttctga gtgttctaag	120
		cgaactgtta aaactttcaa caacggatct cttggctcca gcatcgatga agaacgcagc	180
		aaatgagggg tactactctc accccccttt ggctcttcc cacttggtgc ttcggc	236

ES 2 779 303 T3

	<210> 56		
	<211> 243		
	<212> ADN		
	<213> Gnomoniopsis sp.		
5	<400> 56		
	cgggtgctac ccagaaaccc tttgtgaatt attctcattg ttgcctcggc attgactggc	60	
	ctcttctgga ggtccctttt ctttcgggga aaggagcagg tcggccgggtg gccctataaa	120	
	ctctttgttt ttacagtgta tcttctgagt aaacaactat aatgaatca aaacttttaa	180	
	caacggatct cttggttctg gcatcgatga agaacgcagc aatggaacaa acgccctccg	240	
	ggg	243	
10	<210> 57		
	<211> 251		
	<212> ADN		
	<213> Lewia infectoria		
15	<400> 57		
	gcgggctgga cccccccagc cgggcactgc ttcacggcgt gcgcggctgg gccggccctg	60	
	ctgaattatt caccogtgtc ttttgcgtag ttcttgtttc ctgggtgggc tcgcccgcca	120	
	tcaggaccaa ccacaaacct tttgcaatag caatcacggc cagtaacaac gtaattaatt	180	
	acaactttca acaacggatc tcttggttct ggcacgatg aagaacgtag cgaaatgcga	240	
	tacgtagtgt g	251	
20	<210> 58		
	<211> 210		
	<212> ADN		
	<213> Mycosphaerella coffeicola		
25	<400> 58		
	aagtcgtact ggcttcgggc tcgacctcca cccctttgtga acacaacttg ttgcttcggg	60	
	ggcgaccctg ccgtttcgac ggcgagcgcc cccggaggcc ttcaaact gcacctttgc	120	
	gtcggagttt aagtaaatta aacaaaactt tcaacaacgg atctcttggt tctggcatcg	180	
	atgaagaacg cagcggctctg cacacatcag	210	
30	<210> 59		
	<211> 213		
	<212> ADN		
	<213> Mycosphaerellaceae sp.		
	<400> 59		

ES 2 779 303 T3

	gaccacggcc ggccgcgcca gcgataatcc tttgtgcccc gacattgttg cctgcctttt	60
	gaccctgcct tggggcgggg gctccgggtg gacacttaaa ctcttgcgta actttgcagt	120
	ctgagtaaac ttaattaata aattaaaact tttaacaccg gatctcttgg ttctggcatc	180
	gatgacaaaa cgcaacaaac gcagcagtta acc	213
5	<210> 60 <211> 227 <212> ADN <213> Nigrospora oryzae	
	<400> 60	
	ctcccaaccc atgtgaactt atctctttgt tgcctcggcg caagctaccc gggacctcgc	60
	gccccgggcg gcccgccggc ggacaaacca aactctgtta tcttcggtga ttatctgagt	120
	gtcttattta ataagtcaaa actttcaaca acggatctct tggttctggc atcgatgaag	180
10	aacgcagcaa aaaacgcagc attatcccac tcccaaacc gtgggaa	227
15	<210> 61 <211> 216 <212> ADN <213> Nigrospora sp.	
	<400> 61	
	cccatgtgaa catatctctt tgttgcctcg gcgcaagcta cccgggacct cgcgccccgg	60
	gcgccccgcc ggcggacaaa ccaaactctg ttatcttcgt tgattatctg agtgtcttat	120
	ttaataagtc aaaactttca acaacggatc tcttggttct ggcacgatg aagaacgcag	180
	cagaaacgct cagccaactc ccagaccctg gtgaag	216
20	<210> 62 <211> 249 <212> ADN <213> Nigrospora sphaerica	
25	<400> 62	
	actcccaaac ccatgtgaac atatctcttt gttgcctcgg cgcaagctac cggggacctc	60
	gcgccccggg cggccccg cgcgacaaac caaactctgt tatcttcggt gattatctga	120
	gtgtcttatt taataagtca aaactttcaa caacggatct cttggttctg gcatcgatga	180
	agaacgcagc aaaaaaaaa atattccact cccaagccg ggggggaaaa tttttttttt	240
	tttttttgg	249
30	<210> 63 <211> 223 <212> ADN <213> Paecilomyces sp.	

ES 2 779 303 T3

	<400> 63		
	aatgCGGact cccaaaccac tgtgaacata cccgtaccgt tgcctcggcg ggcggcccca	60	
	gggCGGGGCC gcagcctccc cagcggagge gcccgccgca ggtcgcaaaa ctataactat	120	
	atttagtggc atctctgagt aacttccaaa caatcaaaac tttcaacaac ggatctcttg	180	
	gttctggcat cgatgaagaa cgcagccaat acagaacttc gcg	223	
5	<210> 64 <211> 205 <212> ADN <213> Penicillium citrinum		
10	<400> 64		
	aagtacgtga acggggcaaa cctcccaccc gtggtgcccg aacctatggt gcctcggcgg	60	
	gccccgcgcc cgccgacggc ccccctgaac gctgtctgaa gttgcagtct gagacctata	120	
	acgaaattag ttaaaacttt caacaacgga tctcttggtt ccggcatcga tgaagaacgc	180	
	agcatctggc atcggctgca attcg	205	
15	<210> 65 <211> 213 <212> ADN <213> Retroconis sp.		
20	<400> 65		
	gctatcccaa ccattgtgaa cctacctaca accgttgctt cggcggggcgg ccccgggtct	60	
	ccccgggggc ccctccggcc cctcggggg gcccgccgga ggtacgcaac cctctgtatt	120	
	tgcattggcct ctctgagtct ctgtactgaa taagtcaaaa ctttcaacaa cggatctott	180	
	ggttctggca tcgatgaaga acgcagcagc tac	213	
25	<210> 66 <211> 253 <212> ADN <213> Rhizopycnis sp.		
30	<400> 66		
	gaaatattgg gggtaagttt acgcttaacc aaaccgttcc gtaggtgaac ctgcggaagg	60	
	atcattatcg atttcggttt acaccgtttt ctacctttgt ctatgcgtac cacacgttcc	120	
	ctcggggggc ttggccccca ctaggaccaa acataaacct ttggtaatgg caatcggggt	180	
	ctgaaataat ttaattatta caactttaa caacggatct ctgggttctg gcatcggtaa	240	
	aaaaacacag gaa	253	
35	<210> 67 <211> 210 <212> ADN <213> Schizothecium inaequale		

ES 2 779 303 T3

	<400> 67	
	tgcaactccc aaccattgtg aacctacctc accgttgctt cggcgggtgg cccccacccg	60
	ggccgcgcgcg gccccacccg gccggcaacc cgtcagagga ccgcaactct tagtcatcat	120
	tggcctctct gagtaactta tacaataagt caaaactttc aacaacggat ctcttggttc	180
	tggcatcgat gaagaacgca gcaagtctaa	210
5	<210> 68 <211> 237 <212> ADN <213> Stagonospora sp.	
10	<400> 68	
	ctagctactg gcatggggac tgtagtctg catggtatca ctaccgatga gcagcaggtc	60
	ccctgtctat acccttgttt tttgcgtacc tattgtttcc tcggcgggct tgctcgccgg	120
	ctggacaaaa tctataacct ttttttaatc ttcaatcagc gtctgaaatt atacataata	180
	attacaactt tcaacaacgg atctcttggt tctggcatcg atgaaaaacg cagccaa	237
15	<210> 69 <211> 223 <212> ADN <213> Stemphylium lancipes	
20	<400> 69	
	aaatgtggcg ccctttggta ttccaaaggg catgcctggt cgagcgtcat ttgtaccctc	60
	aagctttgct tgggtgttggg cgtctttgtc tctcaagaga ctgccttaa aatgattggc	120
	agccgacctt ctggtttcgg agcgcagcac aattcttgca ctttgaatca gccttggttg	180
	agcatccatc aagaccacat ttttttaact ttttaccgta cta	223
25	<210> 70 <211> 209 <212> ADN <213> Thielavia hyrcaniae	
30	<400> 70	
	ctaaaccatt gtgaacctac cttctaccgt tgcttcggcg ggcgggcccc agcgcacccc	60
	ccggcccccc gcgggcgccc gccggaggat acccaaactc ttgacattag tggcctctct	120
	gagtattctt tactgaataa gtcaaaactt tcaacaacgg atctcttggt tctggcatcg	180
	atgaagaacg cagcaattta cagagttgc	209
35	<210> 71 <211> 252 <212> ADN <213> Thielavia sp.	

ES 2 779 303 T3

	<400> 71	
	aaccattgtg acgttacctt caaaccgttg cttcggcggg cggcccgggt ccgcccggtg	60
	ccccctggcc ccctcgcggg gcgcccgcgc gaggaacc aactcttgat acattatggc	120
	ctctctgagt cttctgtact gaataagtca aaactttcaa caacggatct cttggttctg	180
	gcatcgatga agaacgcagc gaaatgcgat aagtaatgtg aattgcagaa ttcagtgaat	240
	catcgaatct tt	252
5	<210> 72 <211> 217 <212> ADN <213> Ulocladium chartarum	
10	<400> 72	
	tgaagcgggc tggcatcctt cggggttaca gccttgctga attattcacc cgtgtctttt	60
	gcgtacttct tgtttccttg gtgggttcgc ccaccatagg acaaaccata aaccttttgt	120
	aattgcaatc agcgtcagta aaaaaattaa taattacaac ttttaacaac ggatctcttg	180
	gttctggcat cgatgaagaa cgcagccact tacaaaa	217
15	<210> 73 <211> 219 <212> ADN <213> Verticillium sp.	
20	<400> 73	
	gtacacgata ctcataaccc tttgtgaacc ttcataactg ttgcttcggc ggcgcgcctc	60
	tcggggcgtg cccgcggca ttatcagaat ctctgttcga acccgacgat acttctgagt	120
	gttctaagcg aactgttaaa actttcaaca acggatctct tggctccagc atcgatgaag	180
	aacgcagcaa ggatcaatga atttctcacc acccaagta	219
25	<210> 74 <211> 477 <212> ADN <213> Beauveria bassiana	
	<400> 74	

ES 2 779 303 T3

ccgagttttc aactcccaaa cccttatgtg aactcaccta tcgttgcttc ggcggactcg 60
 cccagccgg acgggactgg accagcggcc cgccggggac ctcaaactct tgtattccag 120
 catcttctga atacgccga aggcaaaaca tatgaatcaa aactttcaac aacggatctc 180
 ttggctctgg catcgatgaa gaacgcagcg aatgcgata agtaatgtga attgcagaat 240
 ccagtgaatc atcgaatctt tgaacgcaca ttgcgcccgc cagcattctg gcgggcatgc 300
 cctttcgagc gtcatttcaa ccctcgacct ccccttgggg aggtcggcgt tggggacggc 360
 agcacaccgc cggccctgaa atggagtggc ggcccgtccg cggcgacctc tgcgtagtaa 420
 tacagctcgc accgtaacct gacgcggcct caccgtaaaa cgacccaact tctgaac 477

5 <210> 75
 <211> 506
 <212> ADN
 <213> Aspergillus parasiticus
 <400> 75

ccgagtgtag ggttcctagc gagcccaacc tcccaccgt gtttactgta ccttagttgc 60
 ttcggcgggc ccgccattca tggccgcccgg gggttctcag ccccgggccc gcgcccgcg 120
 gagacaccac gaactctgcc tcactaatag aagtctgagt tgattgtatc gcaatcaact 180
 taaactttca acaatggatc tcttggttcc gggatcaatg agcaacccaa caaatgcga 240

10 taactagtgt gaattgcaga attccgtgaa tcactcgatc tttgaacgca cattgcgccc 300
 cctggtattc ctgcggggat gcatgtccga gctgaattgc tgcccatcaa gtacgacttg 360
 tgtgttgggt cgtcgtcccc tctccggggg ggacgggccc caaacgcagc tgaggcaccg 420
 cggccgatcc tagagggtat gggcgctttg tcacctgac tataggccag gccggcgcta 480
 gcctaacca aatcaatctt ttacag 506

15 <210> 76
 <211> 451
 <212> ADN
 <213> Lecanicillium lecanii

20 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (337)..(337)
 <223> n es a, c, g o t

25 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (371)..(371)
 <223> n es a, c, g o t

30 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (415)..(415)
 <223> n es a, c, g o t

ES 2 779 303 T3

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (429)..(429)
 <223> n e s a , c , g o t

5

<400> 76

```

ccggcgctccg gacggcctcg cgccgcccgc ggcccggacc caggcggccg ccggagacct      60
ctaaactctg tattatcagc attttctgaa tccgccgcaa ggcaaaacaa atgaatcaaa      120
actttcaaca acggaacctc ttgggtttcg ggcacgatg aagaacgcag cgaaatgcga      180
taagtaatgt gaattgcaga attcagtcaa tcatcgaatc tttgaacgca cattgcgccc      240
gccagcattc tggcgggcat gcctgttcga gcgtcatttc aaccctcgac ttccctttgg      300
ggaaatccgc gttggggaaa cggcagcata cccgccnggc cccgaaatgg gagtggcggc      360
ccggtcccgc ngcgaccctt ctgcgtaagt aatccaactc ggcaccggaa ccccnacgtg      420
gccaccccn g taaaacaccc aacttccgaa c                                     451
    
```

10

<210> 77
 <211> 549
 <212> ADN
 <213> Paecilomyces lilacinus

15

<400> 77

```

ggaggggatca ttaccgagtt tacaactccc aaaccccctg tgaacttata ccattactgt      60
tgcttcggcg ggttattgcc ccggggaagg atagggtgcc gcgaggtgcc ctgcccgccc      120
ccccggaaac aggcgcccgc cggaggactc aaactctgta tttttcttg ttttagtgta      180
tactatctga gtaaaaaaca atataatgaa tcaaaacttt caacaacgga tctcttggtt      240
ctggcatcga tgaagaacgc agcgaaatgc gataagtaat gtgaattgca gaattcagtg      300
aatcatcgaa tctttgaacg cacattgcgc ccgccagtat tctggcgggc atgcctgttc      360
gagcgtcatt tcaaccctca agcccctttg gacttgggtg tggggaccgg cgatggacaa      420
actgtccttt cgccgcccc taaatgactt ggcggcctcg tcgcgccct cctctgcgta      480
gtagcacaca cctcgcaaca ggagcccggc gaatggccac tgccgtaaaa ccccccaact      540
tttttcaga                                     549
    
```

REIVINDICACIONES

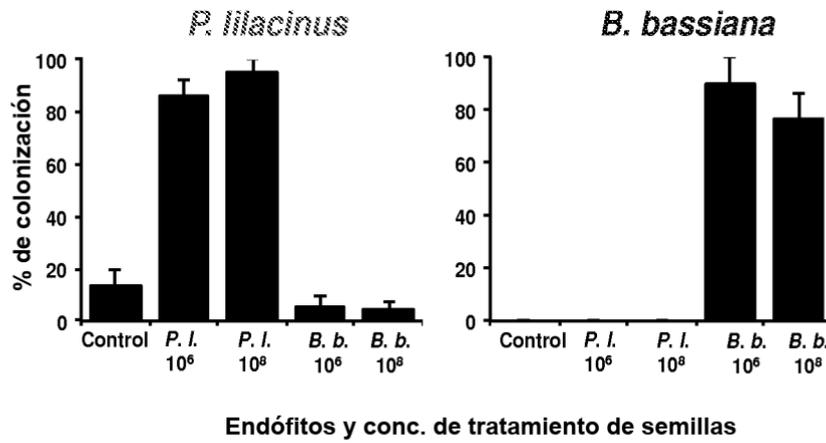
1. Un método para mejorar un rasgo en una planta de algodón, comprendiendo el método: poner en contacto una semilla agrícola de dicha planta de algodón con una formulación que comprende endófitos fúngicos filamentosos facultativos, purificados y formadores de esporas, de al menos un *Dothideomyces* no de *Alternaria* seleccionado de *Cladosporium cladosporioides*, *Cladosporium uredinicola* y *Epicoccum nigrum* y en donde los endófitos capaces de producir sustancias que son beneficiosas para las plantas o perjudiciales para las plagas o ambas, y en donde los endófitos están presentes en la formulación en una cantidad eficaz para modular las frecuencias de colonización de los endófitos del género *Alternaria* que son naturales de la planta de algodón, y para proporcionar un beneficio a la planta de algodón en comparación con una planta de algodón cultivada a partir de una semilla no tratada con los endófitos fúngicos facultativos de *Dothidoemycetes* no de *Alternaria*, en donde el beneficio es una mayor resistencia al estrés por sequía.
2. El método de la reivindicación 1, en donde el beneficio para las plantas de algodón derivadas de la semilla es un aumento del rendimiento en una población de dichas plantas en un 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 30 %, 40 % o 45 % en relación con una población de referencia de plantas de algodón cultivadas a partir de semillas no tratadas con endófitos fúngicos facultativos de *Dothidoemycetes*.
3. El método de la reivindicación 1, en donde el beneficio para las plantas de algodón derivadas de la semilla es una reducción de la pérdida de rendimiento en una población de dichas plantas en más del 40 %, 30 %, 20 %, 10 %, 5 % o 1 % en relación con una población de referencia de plantas de algodón cultivadas a partir de semillas no tratadas con endófitos fúngicos facultativos de *Dothidoemycetes*.
4. El método de la reivindicación 1, en donde el endófito está presente en la formulación en una cantidad eficaz para obtener al menos un 50 % de colonización de las hojas, tallos o raíces de una planta de algodón cultivada a partir de la semilla.
5. El método de la reivindicación 1, en donde la formulación comprende al menos 1, 2 o 3, especies de endófitos fúngicos facultativos.
6. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que comprende además envasar las semillas puestas en contacto en un recipiente.
7. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que comprende además cultivar una población de dichas plantas de algodón, en donde el beneficio se mide a nivel de la población, en comparación con una población de plantas de referencia.
8. Una combinación sintética de semilla de algodón y una composición que comprende endófitos fúngicos filamentosos facultativos, purificados y formadores de esporas, de al menos una especie, en donde los endófitos son *Dothideomyces* no de *Alternaria* seleccionado de *Cladosporium cladosporioides*, *Cladosporium uredinicola* y *Epicoccum nigrum* capaces de producir sustancias que son beneficiosas para las plantas o perjudiciales para las plagas o ambas, y en donde los endófitos fúngicos facultativos están presentes en la formulación en una cantidad eficaz para modular las frecuencias de colonización de los endófitos del género *Alternaria* que son naturales de la planta de algodón, y para proporcionar un beneficio a la planta de algodón en comparación con una planta de algodón cultivada a partir de una semilla no tratada con los endófitos fúngicos facultativos de *Dothidoemycetes* no de *Alternaria*, en donde el beneficio es una mayor resistencia al estrés por sequía.
9. La combinación sintética de la reivindicación 8, en donde el endófito está presente en la combinación sintética en una cantidad eficaz para obtener al menos un 50 % de colonización de las hojas, tallos o raíces de una planta de algodón cultivada a partir de la semilla.
10. La combinación sintética de la reivindicación 8, que comprende al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 cepas de endófitos.
11. La combinación sintética de la reivindicación 8, en donde el beneficio para las plantas de algodón derivadas de la semilla es un aumento del rendimiento en una población de dichas plantas en un 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 30 %, 40 % o 45 % en relación con una población de referencia de plantas de algodón cultivadas a partir de semillas no tratadas con endófitos fúngicos facultativos de *Dothidoemycetes*.
12. La combinación sintética de la reivindicación 8, en donde el beneficio para las plantas de algodón derivadas de la semilla es una reducción de la pérdida de rendimiento en una población de dichas plantas en más del 40 %, 30 %, 20 %, 10 %, 5 % o 1 % en relación con una población de referencia de plantas de algodón cultivadas a partir de semillas no tratadas con endófitos fúngicos facultativos de *Dothidoemycetes*.

FIG. 1

Endófitos candidatos que se pueden manipular en el campo.

Eficacias de colonización

- Plántulas (cotiledones)
- 14 días tras la plantación
- Tejidos muestreados: hojas, tallos, raíces



CONFIDENCIAL

FIG. 2

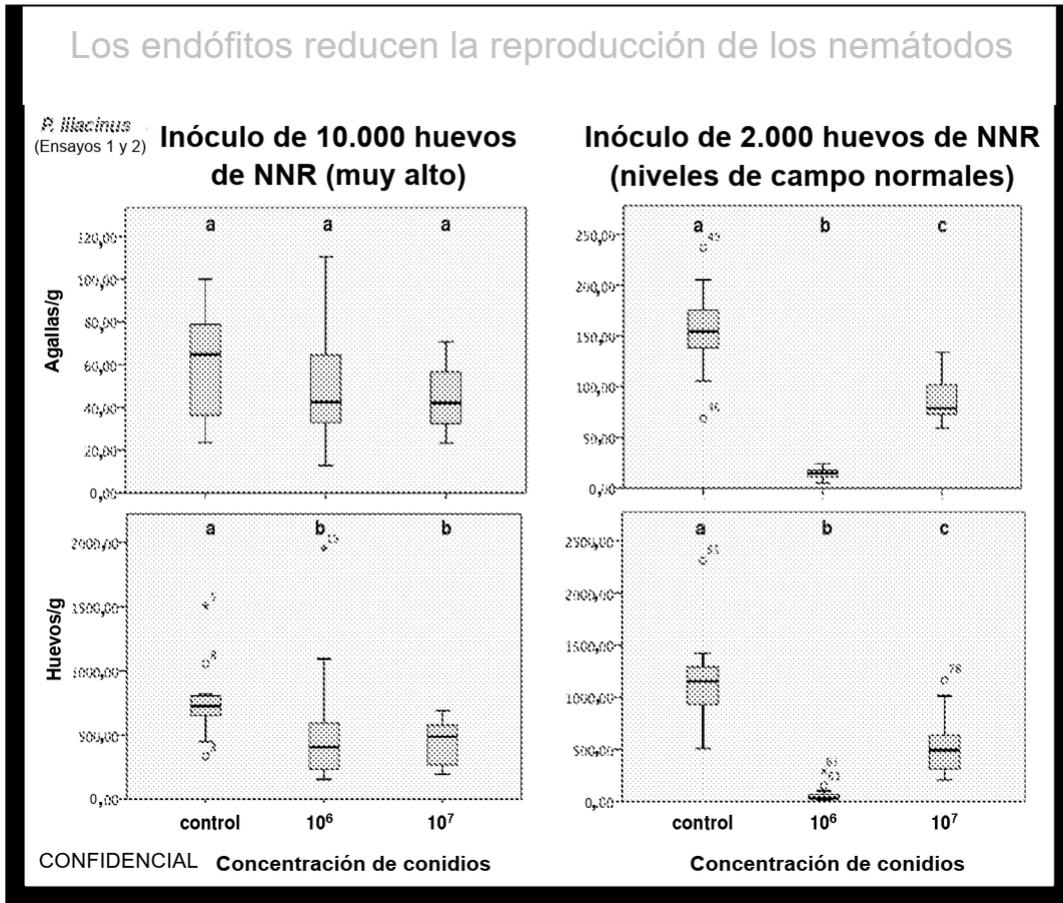
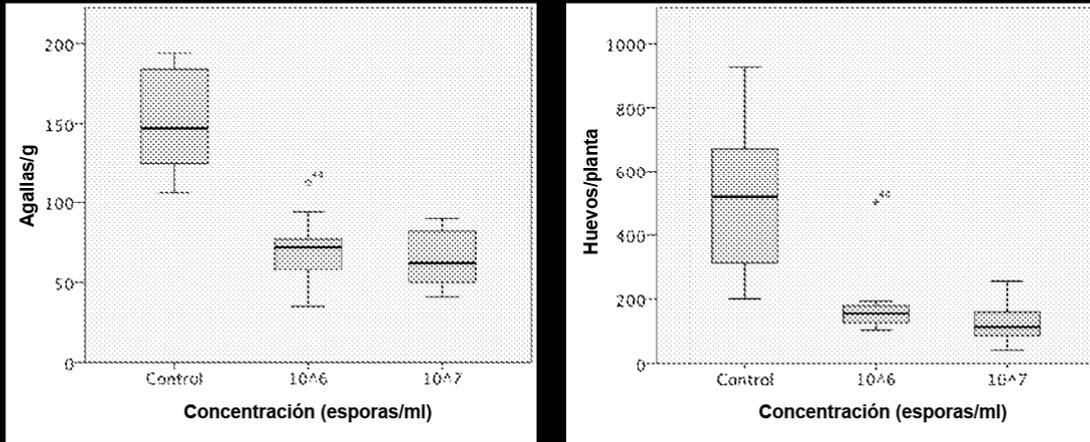


FIG. 3

El endófito *Chaetomium globosum* afecta negativamente a la reproducción del nematodo del nudo radicular.

Principales reducciones en la producción de agallas y huevos independientemente de la concentración.



- Dos ensayos de réplica con resultados muy similares
- Ensayos con insectos en marcha
- Candidato para ensayos de campo de 2014
- Aún por probar seis aislados más de *C. globosum* genéticamente distintos

CONFIDENCIAL

FIGs 4A, 4B

Fig. 4A

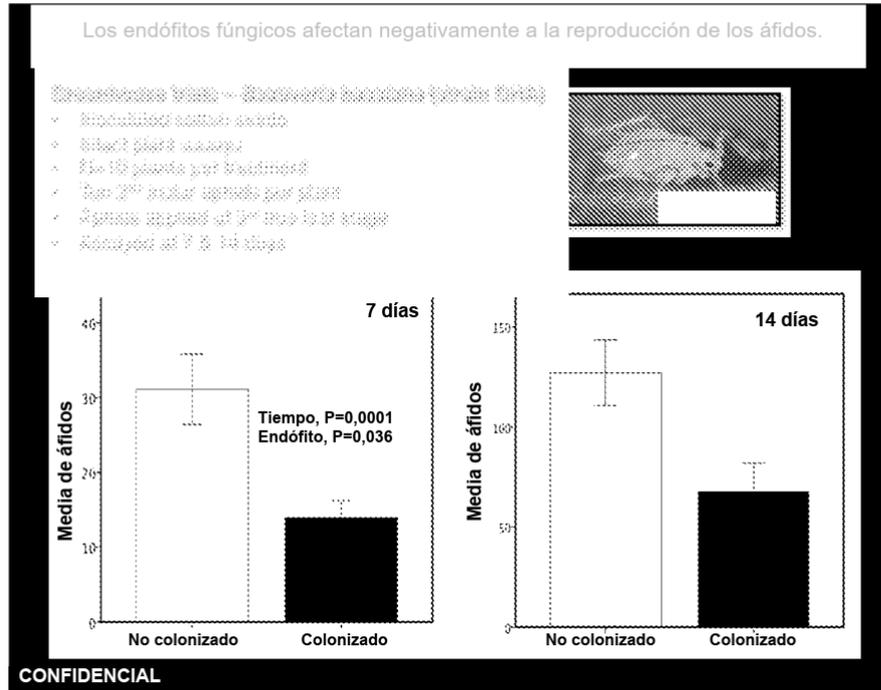


Fig. 4B

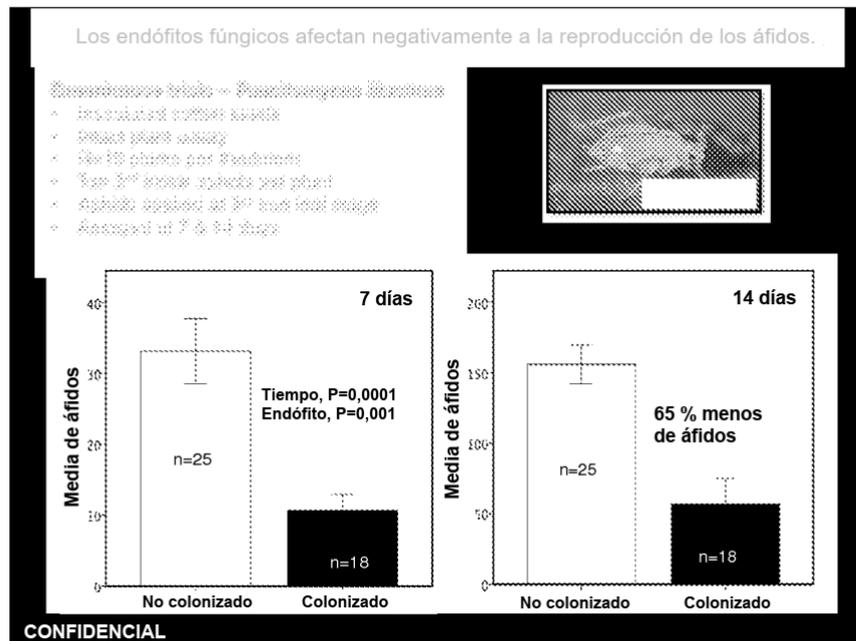
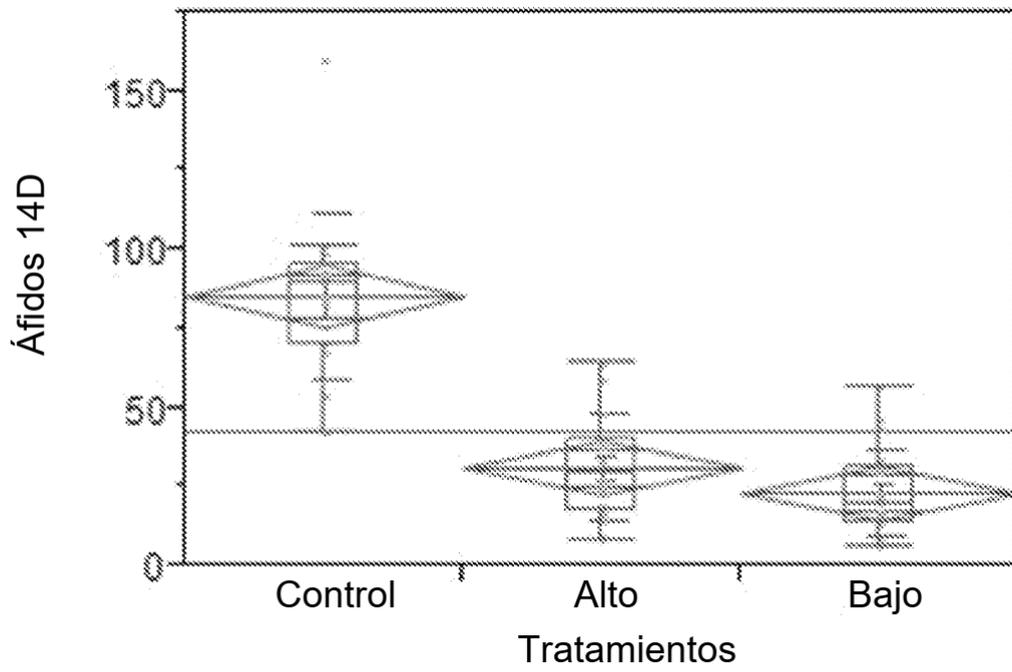


FIG. 5



FIGs. 7A, 7B

Fig. 7A

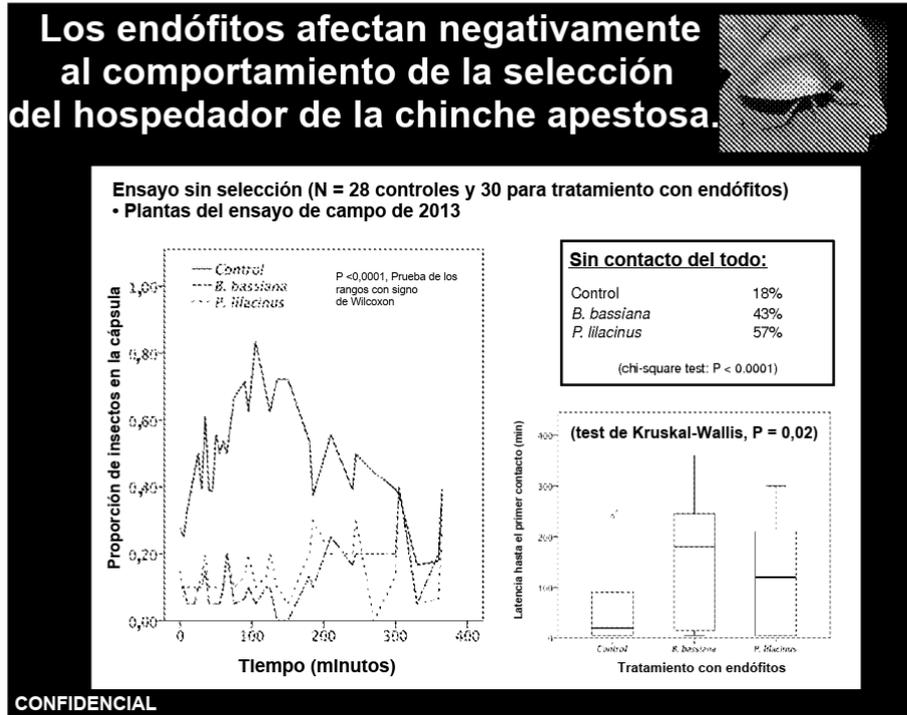


Fig. 7B

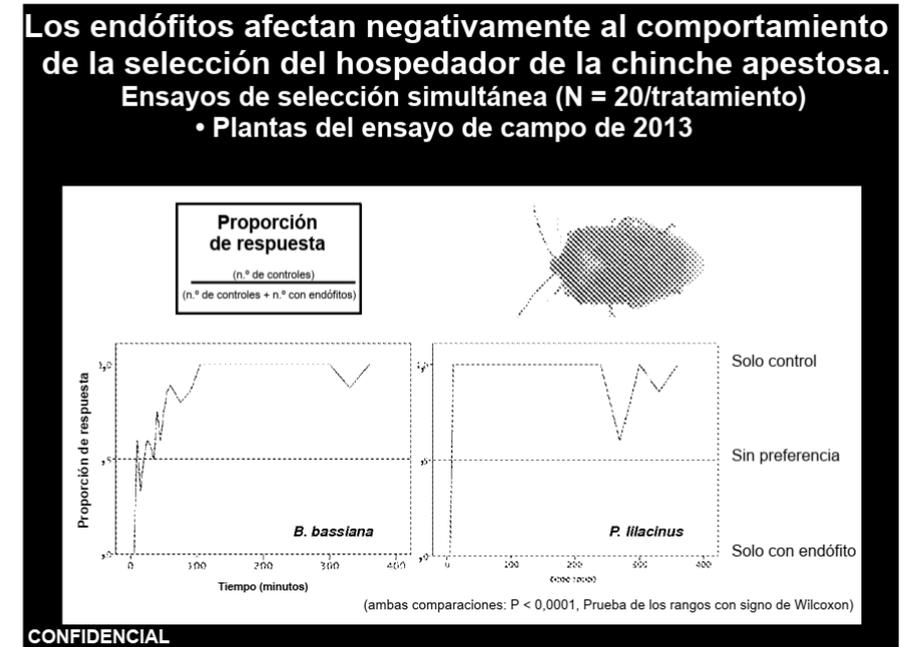


FIG. 8

Efectos anti-insectos – Reducción en el daño a las cápsulas

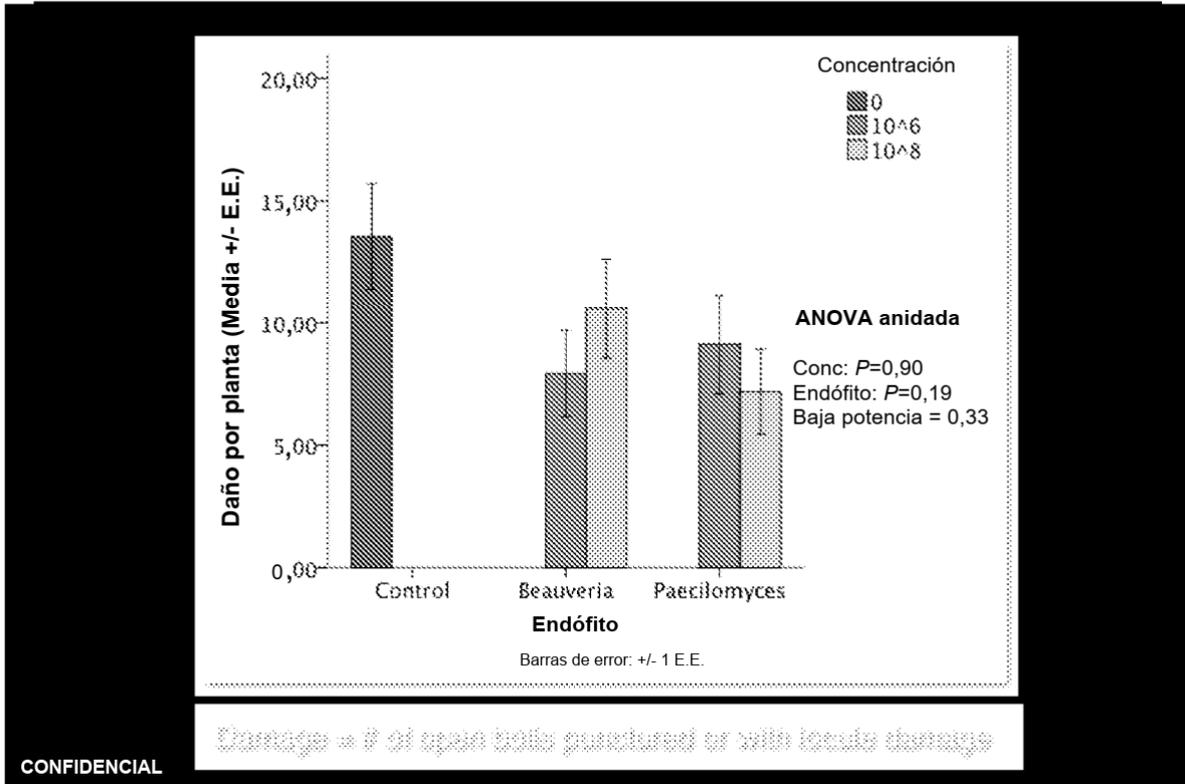


FIG. 9

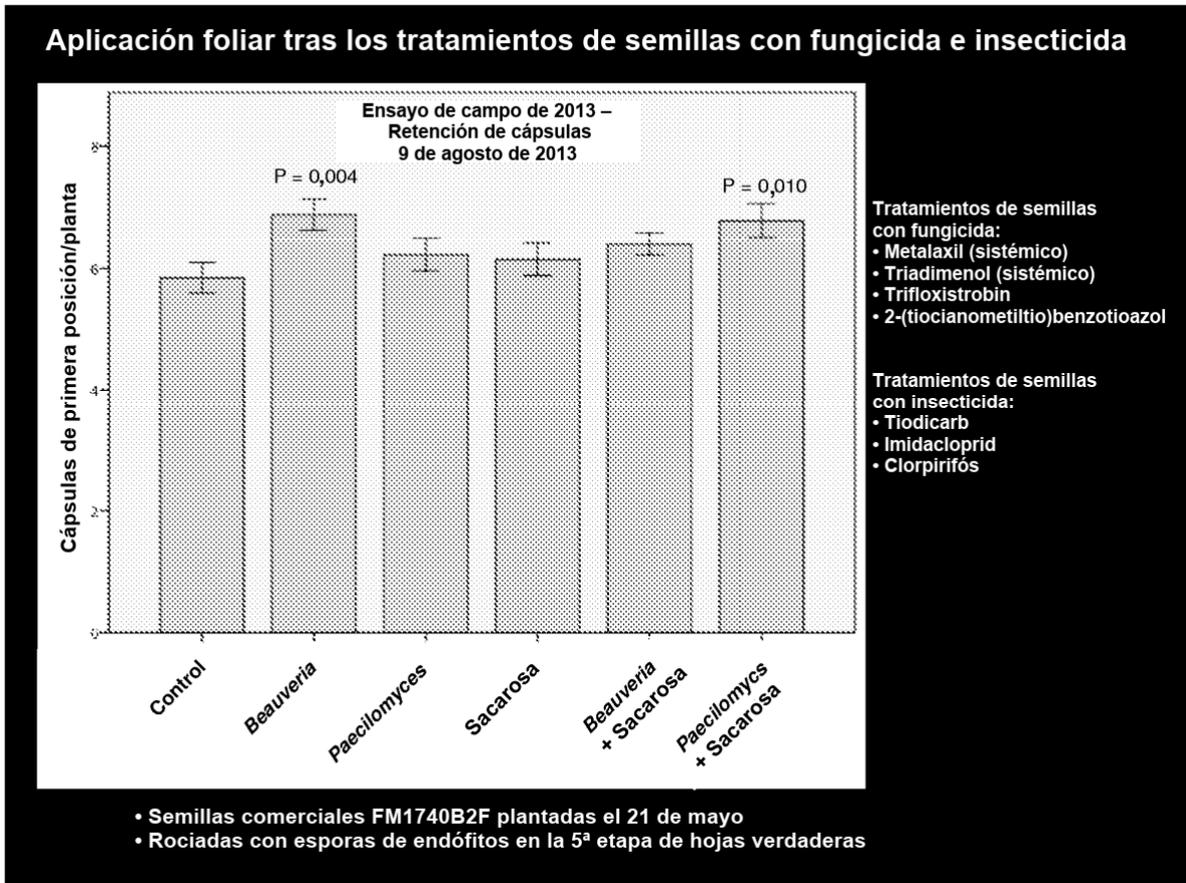
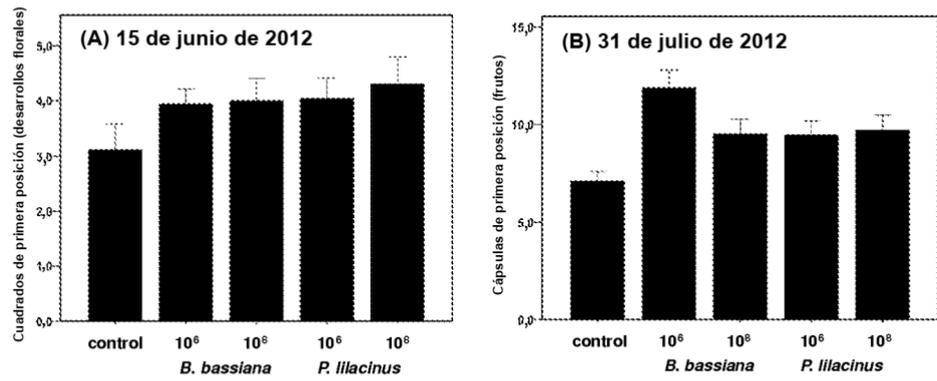


FIG. 10

Más cuadrados y cápsulas conservados en *todos* los tratamientos con endófitos.



ANOVA de mediciones repetidas (Tiempo, P < 0,001; Tiempo del endófito, P = 0,045, Endófito, P = 0,003)

Efectos positivos de los endófitos sobre las características reproductoras de la planta.

• ¿Estado físico?



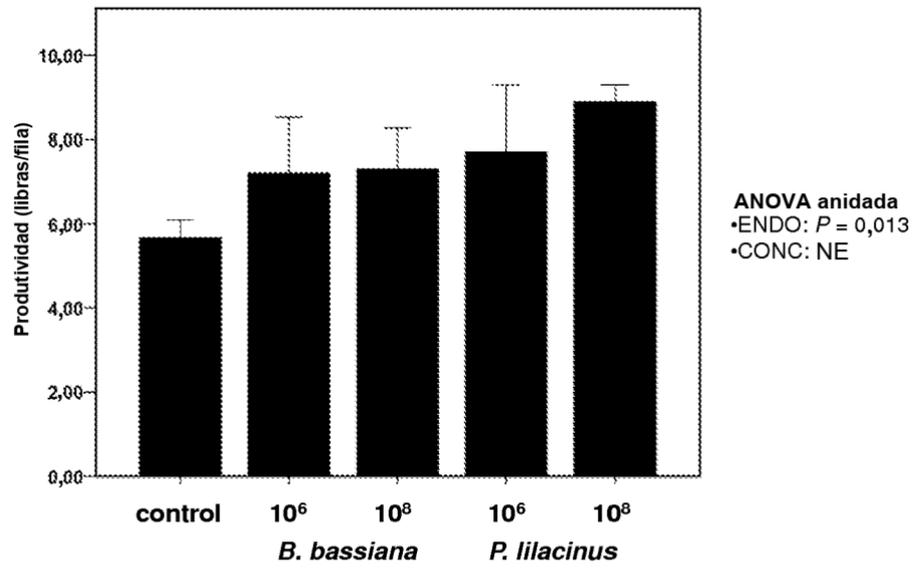
• ¿Productividad?



CONFIDENCIAL

FIG. 11

Los endófitos afectaron positivamente a la productividad.



Productividades mayores del 25 % en plantas de algodón tratadas con endófitos

CONFIDENCIAL

FIG. 12

Fig. 12A

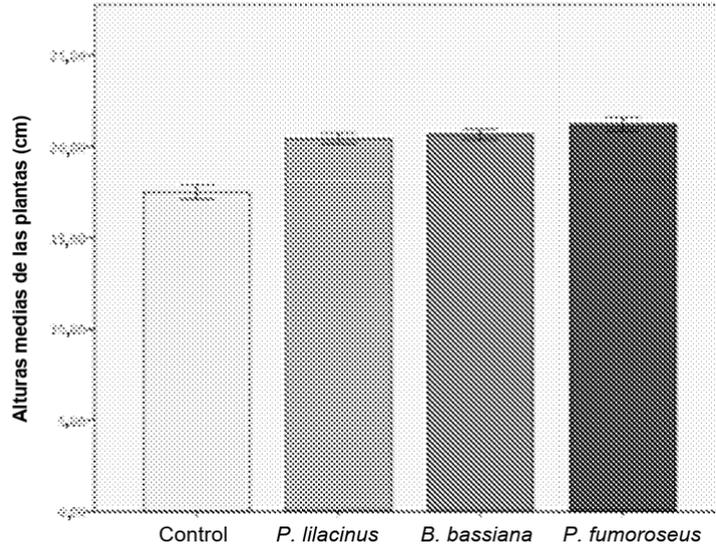


Fig. 12B

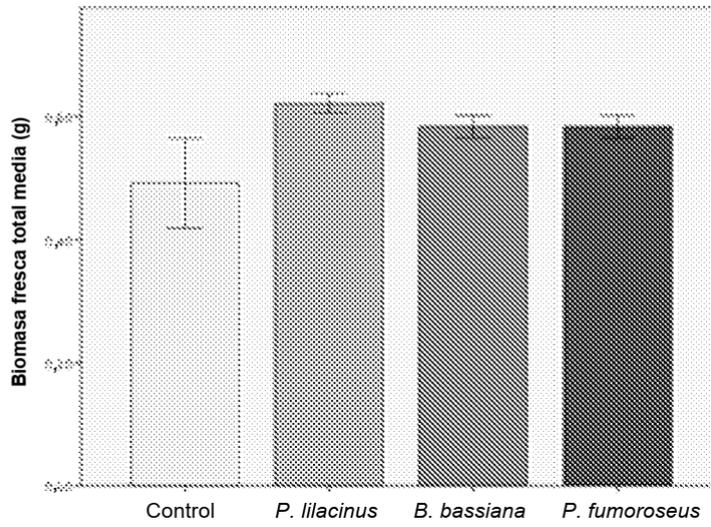


FIG. 13

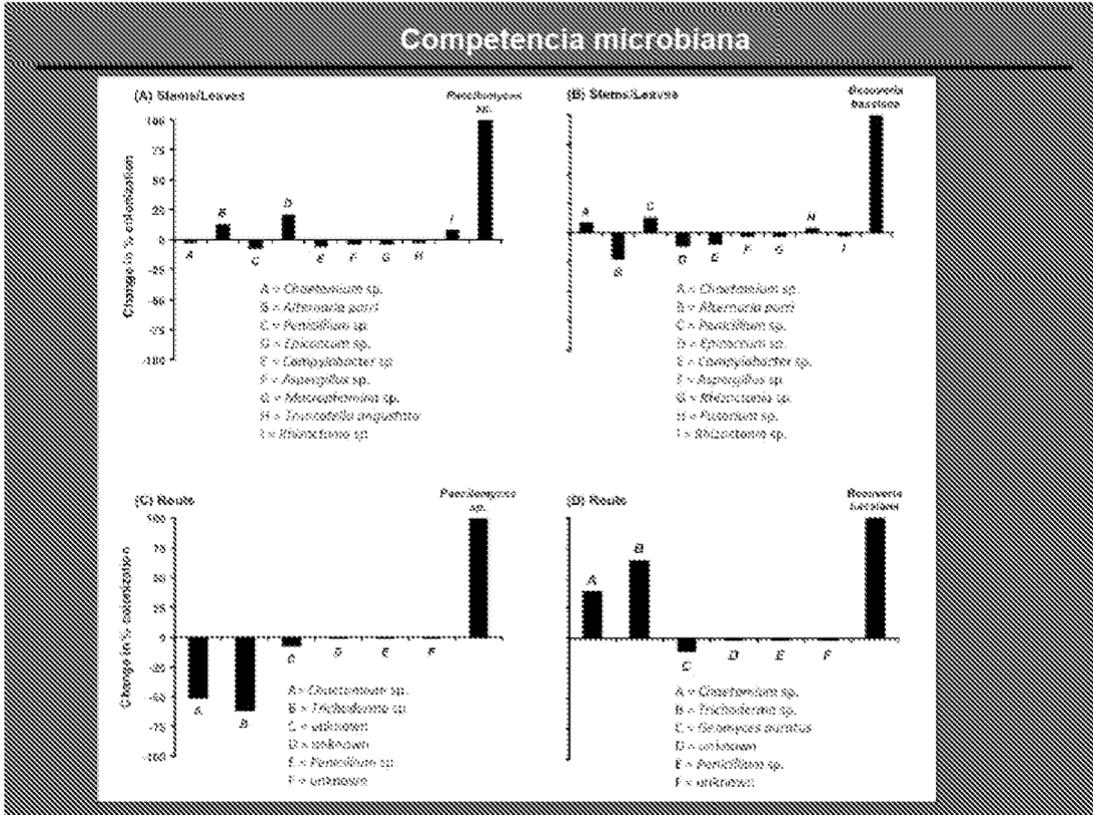


FIG. 14

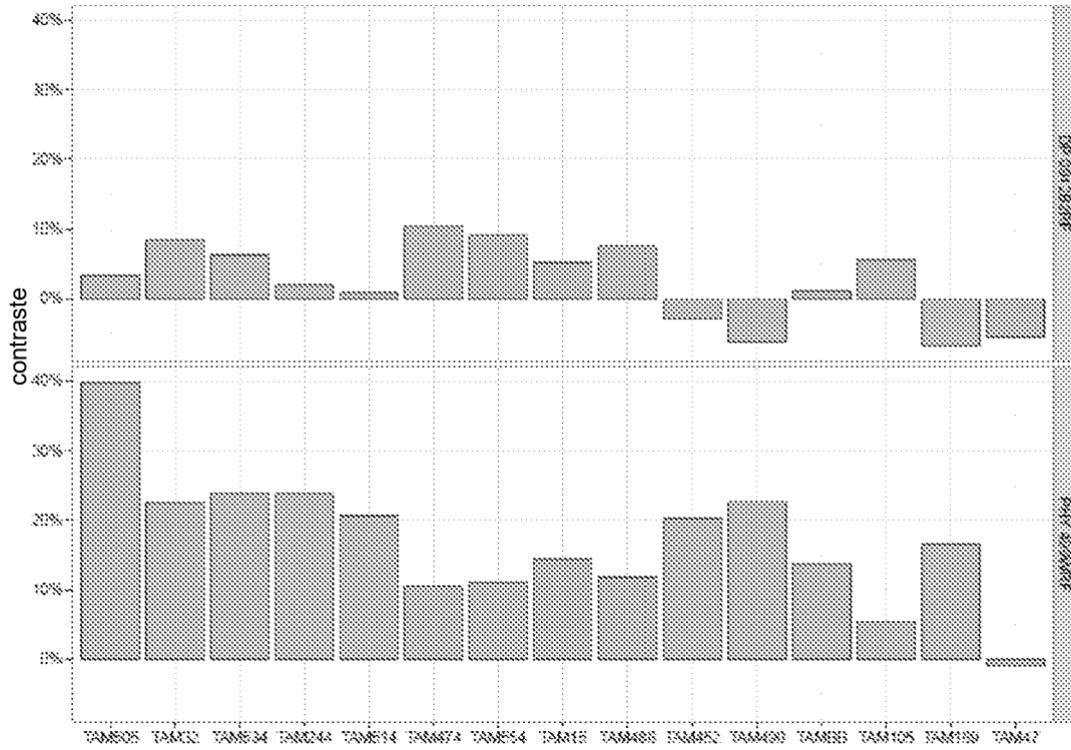


FIG. 15

Agregado sobre los tratamientos

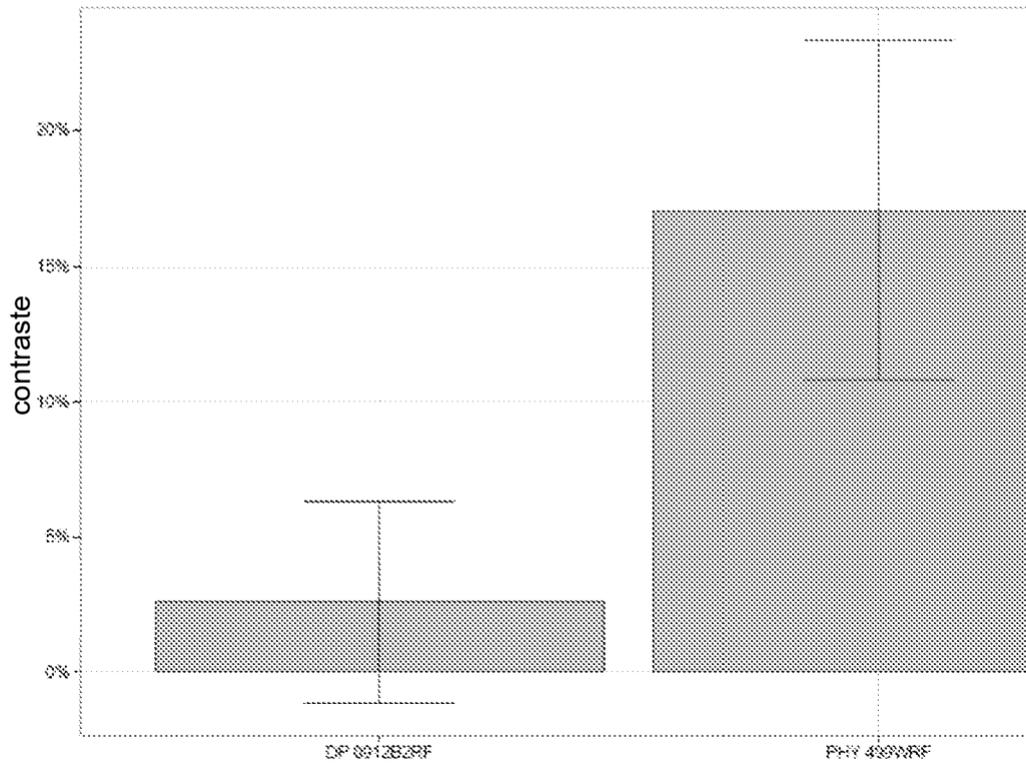


FIG. 16

FIG.16A

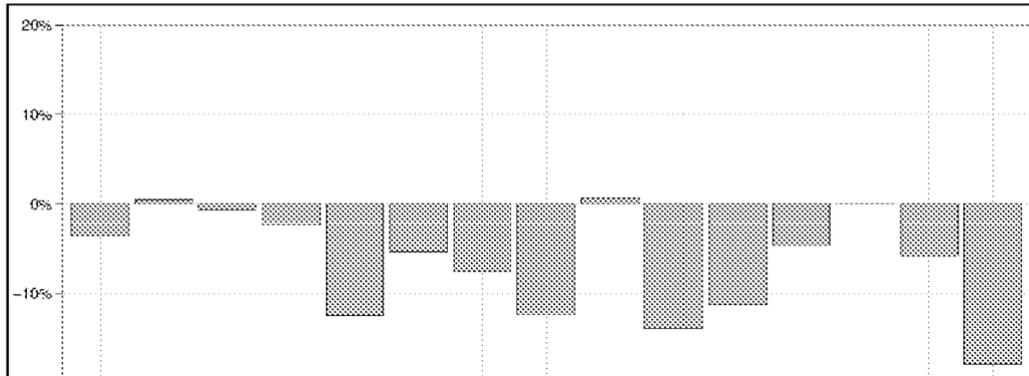


FIG.16B

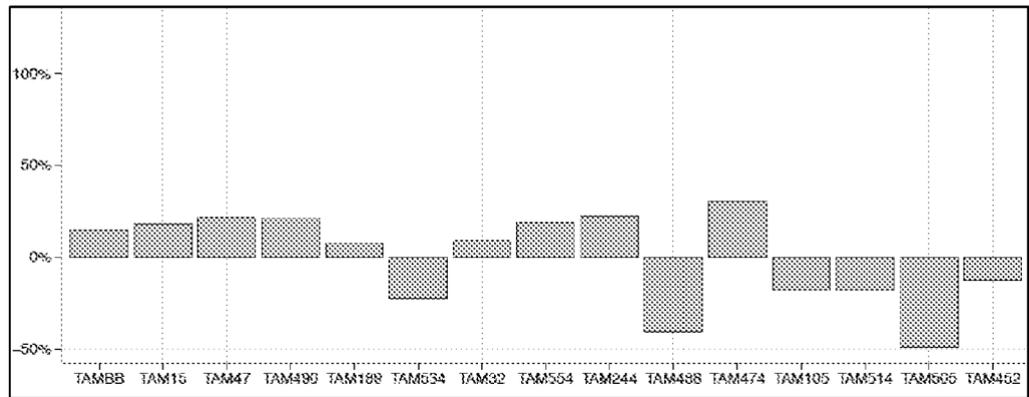


FIG. 18

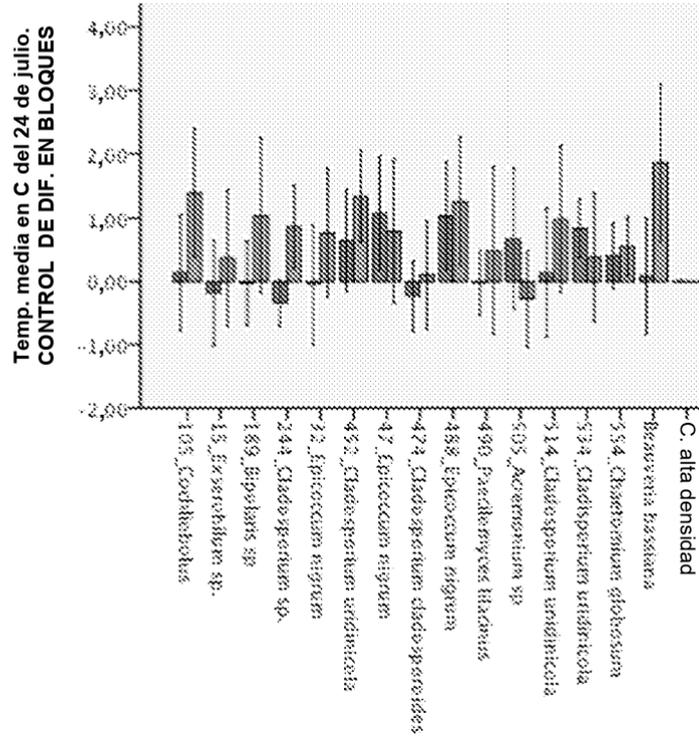


FIG. 19

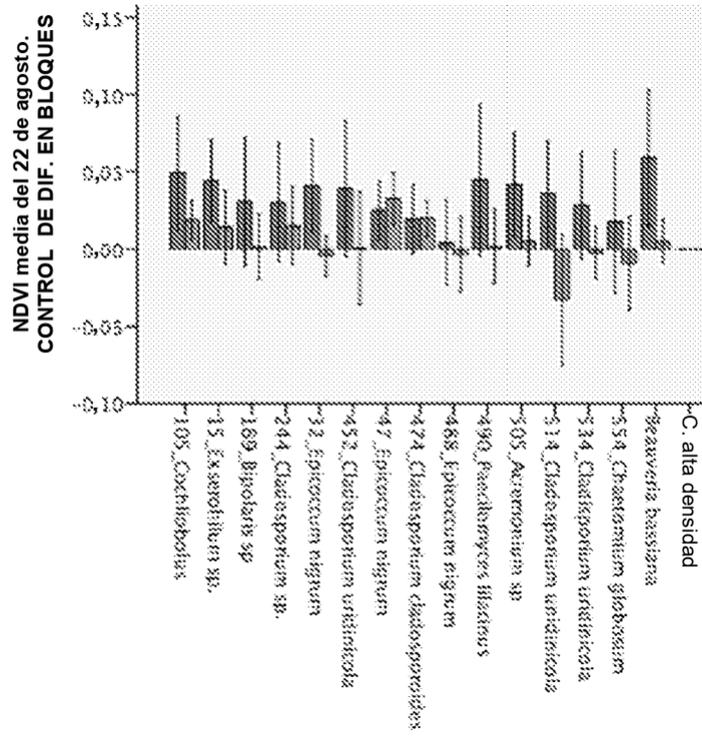


FIG. 20

Media de cuadrados conservados el 22 de agosto.
CONTROL DE DIF. EN BLOQUES

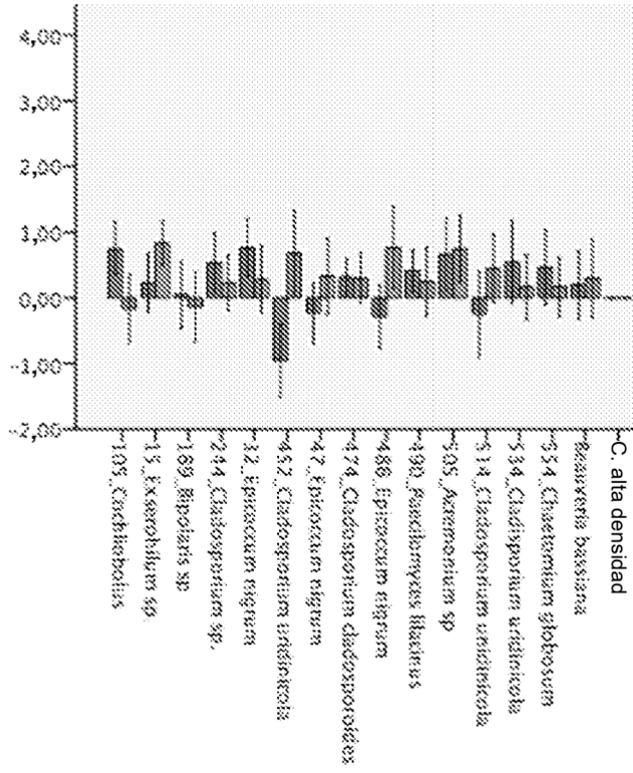


FIG. 22

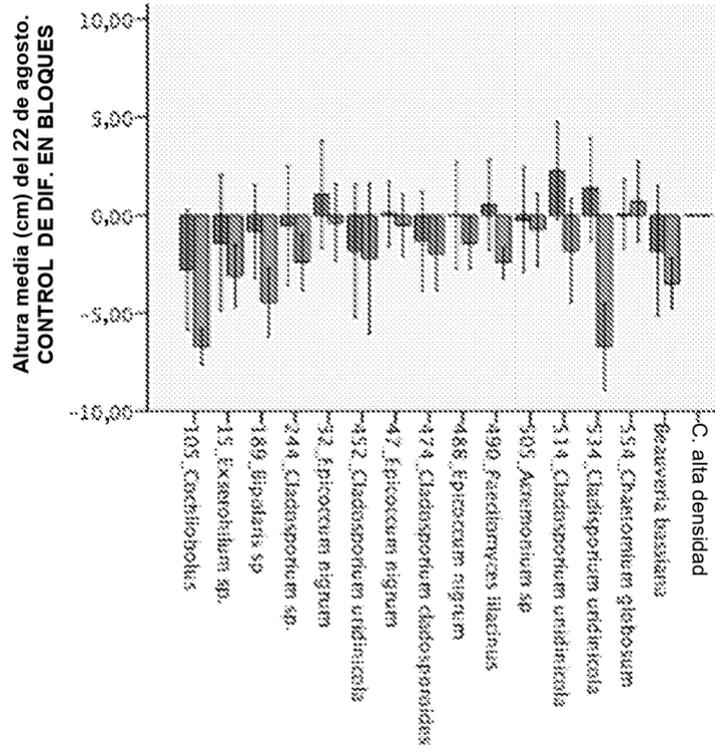


FIG. 23



FIG. 24

Genotipo	Tratamientos		
		Estimación	Error estad.
DTP	194/Epic	15,000	0,323
	249/Clad	15,778	0,173
	355/Chae	16,500	0,345
	46/Epico	17,125	0,364
	463/Clad	16,571	0,291
	534/Clad	15,722	0,289
	554/Chae	15,571	0,272
	58/Epico	15,438	0,433
	control	16,000	0,296
	Total	15,952	0,116
PHY	194/Epic	15,706	0,329
	249/Clad	15,000	0,331
	355/Chae	14,471	0,194
	46/Epico	18,000	0,257
	463/Clad	15,438	0,288
	534/Clad	14,333	0,347
	554/Chae	16,294	0,254
	58/Epico	14,824	0,376
	control	16,722	0,289
	Total	15,682	0,135
Total	Total	15,816	0,089

FIG. 25

Genotipo	Tratamientos		
		Estimación	Error estad.
DTP	194	18,889	0,332
	249	19,000	0,370
	355	19,389	0,244
	46	20,188	0,248
	463	19,357	0,289
	534	19,444	0,258
	554	19,429	0,374
	58	19,563	0,343
	control	20,286	0,294
	Total	19,479	0,107
PHY	194	19,176	0,246
	249	18,357	0,341
	355	17,647	0,363
	46	20,353	0,171
	463	19,125	0,340
	534	18,200	0,279
	554	19,529	0,244
	58	19,706	0,319
	control	19,667	0,354
	Total	19,115	0,118
Total	Total	19,296	0,080