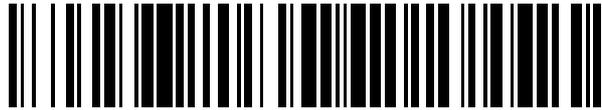


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 573 779**

51 Int. Cl.:

A01N 63/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.03.2012 E 12712208 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.03.2016 EP 2690959**

54 Título: **Cepas competitivas y eficaces de Bradyrhizobium japonicum**

30 Prioridad:

31.03.2011 US 201161470145 P
05.01.2012 US 201261583413 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
10.06.2016

73 Titular/es:

NOVOZYMES BIOLOGICALS, INC. (100.0%)
5400 Corporate Circle
Salem, VA 24153, US

72 Inventor/es:

KANG, YAOWEI;
SMITH, JESSICA;
SEMONES, SHAWN y
WOODS, KRISTI

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 573 779 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

Cepas competitivas y eficaces de *Bradyrhizobium japonicum*

5 **Referencia a listado de secuencias**

[0001] Esta solicitud contiene un Listado de Secuencias en forma legible por ordenador. La forma legible por ordenador es incorporada aquí por referencia.

10 **Referencia a un depósito de material biológico**

[0002] Esta solicitud contiene una referencia a un depósito de material biológico, este depósito es incorporado aquí por referencia. Para información completa ver tabla 1.

15 **Campo de la invención**

[0003] La presente invención se refiere a cepas bacterianas aisladas, y un método de selección de cepas bacterianas teniendo características de competitividad y de rendimiento mejoradas.

20 **Antecedentes de la invención**

[0004] Para mantener un crecimiento saludable, las plantas deben extraer una variedad de elementos del suelo donde crecen.

25 Estos elementos incluyen nitrógeno y los llamados micronutrientes (por ejemplo, cobre, hierro y zinc), pero muchos suelos son deficitarios de tales elementos o los contienen solo en formas que no pueden ser fácilmente absorbidos por las plantas (se cree generalmente que los elementos esenciales no pueden ser fácilmente absorbidos por las plantas a menos que estos estén presentes en forma disuelta en el suelo).

30 El nitrógeno es un elemento esencial para la mayoría de las plantas porque juega un papel en la síntesis de aminoácidos, proteínas, nucleótidos, ácidos nucleicos, clorofila, coenzimas y en el crecimiento total y salud de la planta.

Para contrarrestar tales deficiencias, fuentes de los elementos deficitarios son comúnmente aplicadas a los suelos para mejorar los índices de crecimiento y los rendimientos obtenidos de las plantas cultivadas.

35 Por ejemplo, nitrato y/o amonio es frecuentemente añadido al suelo para contrarrestar una falta del nitrógeno disponible.

[0005] En el campo de la tecnología agrícola, es bien conocido que muchas plantas cultivadas requieren que el suelo proporcione cantidades relativamente grandes de nitrógeno a la planta.

40 Las excepciones notables a estas plantas que requieren nitrógeno por medio del suelo son plantas de la familia de las legumbres.

[0006] Específicamente, las plantas leguminosas son únicas de plantas no leguminosas en su capacidad para fijar nitrógeno atmosférico en el amoniaco.

45 La capacidad para fijar nitrógeno atmosférico en una fuente de nitrógeno utilizable para la planta evita la necesidad para la planta de obtener nitrógeno del suelo.

La fijación de nitrógeno, sin embargo, requiere una relación simbiótica entre la planta leguminosa y bacteriana nativa en el suelo.

50 Uno de los socios estudiados más extensamente en esta relación simbiótica son las bacterias del género *Bradyrhizobium* o *Rhizobium*. Gresshoff, P. (1999). Identification of Plant Genes Involved in Plant-Microbe Interactions. Stacey, G. & Keen, T. (Ed.), Plant-Microbe Interactions (4ª ed.) (Ch. 6). St. Paul: APS Press.

[0007] La simbiosis es generalmente conseguida a través de un intercambio de señalización bidireccional compleja entre la planta y el microbio y el microbio y la planta.

55 Típicamente, factores de las plantas, tales como flavonoides y sustancias tipo flavonoides, inducen la colonización de las bacterias en el nódulo de la raíz de la planta leguminosa. (Gresshoff, 1999).

Una vez que las bacterias han colonizado el nódulo de la raíz, las bacterias efectúan cambios morfológicos en la planta, es decir enrollamiento de la raíz y el desarrollo de un nuevo órgano de la raíz - el nódulo. (Gresshoff, 1999).

60 El nódulo permite el establecimiento de un entorno fisiológico nuevo para las bacterias inductoras de nódulos para diferenciar un endosimbionte fijador de nitrógeno, o bacteroide, para la planta colonizada. (Gresshoff, 1999).

[0008] Es bien conocido que la motilidad de *Rhizobium* y quimiotaxis son atributos importantes para la competitividad de la cepa.

65 Por ejemplo, Althabegoiti, et al., 2008, FEMS Microbiol. Letf. 282: 115-123 discute la derivación de una cepa mutante espontánea de USDA 110 teniendo motilidad aumentada que aumenta la nodulación cuando se compara con su cepa de tipo salvaje.

Además, Maier, et al., 1990, Appl. Environ. Microbiol. 56 (8): 2341-2346 discute el papel del molibdeno durante el

proceso de fijación de nitrógeno biológico.

Además, Alves, et al., 2003, Plant and Soil 252: 1-9 discute inoculantes de soja usados en Brasil y la importancia de la competitividad para la fijación eficaz de nitrógeno.

Finalmente, Bloem, J.F., et al., 2001, Bio Fertil. Soils 33: 181-189 informa de la importancia de la competitividad en la selección de cepas.

En el estudio, los investigadores usan métodos de ingeniería genética para poner un gen reportero (GUS) en su cepa de índice como una vía para determinar la competitividad de las cepas. (Bloem, et al. 2001).

Como el estudio realizado (Bloem, et al. 2001) requirió un uso extenso de coloración química y tecnología de microscopía, el método proporcionado continua siendo un método poco práctico para seleccionar muestras grandes de microbios.

[0009] Es un objeto de la presente invención proporcionar un(os) aislado(s) súper competitivo(s) de bacterias del género *Bradyrhizobia* para colonizar plantas leguminosas que supera la capacidad de colonizar las cepas disponibles comercialmente, por ejemplo, la cepa comercial USDA 532C.

Otro objeto de la presente invención es proporcionar un(os) aislado(s) súper competitivo(s) de bacterias del género *Bradyrhizobia* para colonizar plantas leguminosas capaces de aumentar la eficacia en la promoción del crecimiento de las plantas leguminosas en comparación con las cepas disponibles comercialmente, por ejemplo, la cepa comercial USDA 532C.

Resumen de la invención

[0010] Para mejorar la salud global de la planta y la disponibilidad de una fuente de nitrógeno utilizable para plantas, existe una necesidad de cepas bacterianas que sean superiores en la colonización de las plantas y aumento del crecimiento global de la planta.

Las cepas aisladas de la presente invención realizan estos beneficios.

[0011] La presente invención se refiere a cepas aisladas de bacterias teniendo al menos las siguientes características mejoradas en comparación con las cepas disponibles comercialmente, por ejemplo, cepa comercial USDA 532C, donde características mejoradas incluyen, pero de forma no limitativa:

- a. competitividad mejorada para colonizar una planta; y
- b. eficacia mejorada en la promoción del crecimiento de la planta.

[0012] La presente invención se refiere a un(os) cultivo(s) biológicamente puro(s) de la(s) cepa(s) de *Bradyrhizobia japonicum*

la cepa con el número de acceso de depósito NRRL B-50592 (depositado también como NRRL B-59571);

la cepa con el número de acceso de depósito NRRL B-50593 (depositado también como NRRL B-59572);

la cepa con el número de acceso de depósito NRRL B-50586 (depositado también como NRRL B-59565);

la cepa con el número de acceso de depósito NRRL B-50588 (depositado también como NRRL B-59567);

la cepa con el número de acceso de depósito NRRL B-50587 (depositado también como NRRL B-59566);

la cepa con el número de acceso de depósito NRRL B-50589 (depositado también como NRRL B-59568);

la cepa con el número de acceso de depósito NRRL B-50591 (depositado también como NRRL B-59570);

la cepa con el número de acceso de depósito NRRL B-50590 (depositado también como NRRL B-59569);

la cepa con el número de acceso de depósito NRRL B-50594 (depositado también como NRRL B-50493);

la cepa con el número de acceso de depósito NRRL B-50726;

la cepa con el número de acceso de depósito NRRL B-50727;

la cepa con el número de acceso de depósito NRRL B-50728;

la cepa con el número de acceso de depósito NRRL B-50729 y

la cepa con el número de acceso de depósito NRRL B-50730, o una combinación de al menos dos o más de las anteriores cepas depositadas.

[0013] La presente invención también se refiere a cepa(s) bacteriana(s) aislada(s) de la presente invención incluidas cepa(s) que es(son) cercanamente relacionada(s) con cualquiera de las cepas anteriores basándose en la identidad de la secuencia de ADNr 16S, y que son al menos 95% idénticas a cualquiera de las cepas anteriores basándose en la identidad de la secuencia de ADNr 16S.

[0014] La presente invención además incluye un método de aumento del crecimiento de la planta, que comprende aplicar a las plantas, semillas de planta, o plantas que rodean el suelo, o semillas de planta una composición que comprende al menos una de las cepas de la presente invención o una combinación de al menos dos o más de las anteriores cepas depositadas.

[0015] La invención además incluye composiciones que comprenden una o varias cepas de la presente invención, incluido un portador agrónomicamente aceptable.

Breve descripción de dibujos

[0016]

Fig. 1A es una imagen de un gel PCR que muestra un único cebador 209 específico para USDA 532C.

Fig. 1B es una imagen de un gel PCR que muestra especificidad al cebador 209 usando USDA 532C y cepas nativas.

Fig. 2A es una imagen de un gel PCR que muestra la cepa USDA 532C de *Bradyrhizobia japonicum* como la cepa competitivamente dominante para la nodulación de la soja.

Fig. 2B es una imagen de un gel PCR que muestra cepas además de la cepa USDA 532C de *Bradyrhizobia japonicum* como la cepa competitivamente dominante para la nodulación de la soja.

Fig. 3A es un dendrograma de huella digital de ADN de cepas aisladas y USDA 532C:

138 - NRRL B-50589 (depositado también como NRRL 6-59568);

13 - NRRL B-50586 (depositado también como NRRL B-59565);

P140 - USDA 532C;

184 - NRRL B-50594 (depositado también como NRRL B-50493);

142 - NRRL B-50590 (depositado también como NRRL B-59569);

130 - NRRL B-50587 (depositado también como NRRL B-59566);

65 - NRRL B-50588 (depositado también como NRRL B-59567);

198 - NRRL B-50592 (depositado también como NRRL B-59571);

135 - NRRL B-50591 (depositado también como NRRL B-59570); y

48 - NRRL B-50593 (depositado también como NRRL B-59572).

Fig. 3B es un dendrograma de huella digital de ADN de cepas aisladas y USDA 532C:

138 - NRRL B-50589 (depositado también como NRRL B-59568);

13 - NRRL B-50586 (depositado también como NRRL B-59565);

140 - USDA 532C;

184 - NRRL B-50594 (depositado también como NRRL B-50493);

142 - NRRL B-50590 (depositado también como NRRL B-59569);

130 - NRRL B-50587 (depositado también como NRRL B-59566);

65 - NRRL B-50588 (depositado también como NRRL B-59567);

198 - NRRL B-50592 (depositado también como NRRL B-59571);

135 - NRRL B-50591 (depositado también como NRRL B-59570);

48 - NRRL B-50593 (depositado también como NRRL B-59572)

318 - NRRL B-50727,

278 - NRRL B-50726,

727 - NRRL B-50730,

370 - NRRL B-50728 y

518 - NRRL B-50729.

Descripción detallada de la invención

[0017] La presente invención proporciona cepas aisladas de bacterias que tienen al menos las siguientes características mejoradas en comparación con las cepas disponibles comercialmente, por ejemplo, cepa comercial USDA 532C, donde características mejoradas incluyen, pero de forma no limitativa:

a. competitividad mejorada para colonizar una planta; y

b. eficacia mejorada para promover el crecimiento de la planta.

[0018] "Cepa(s) bacteriana(s)" como se utiliza en este caso, significa cepas bacterianas que son diazótrofes.

Es decir, bacterias que son bacterias simbióticas fijadoras de nitrógeno.

Ejemplos no limitativos de cepas bacterianas como se utilizan en este caso incluyen, pero de forma no limitativa bacterias del género *Rhizobium spp.* (por ejemplo, *R. celtulosiliticum*, *R. daejeonense*, *R. etli*, *R. galegae*, *R. gallicum*, *R. giardinii*, *R. hainanense*, *R. huautlense*, *R. indigoferae*, *R. leguminosarum*, *R. loessense*, *R. lupini*, *R. lusitanum*, *R. mongolense*, *R. miluonense*, *R. sultae*, *R. tropici*, *R. undicola*, y/o *R. yanglingense*), *Bradyrhizobium spp.* (por ejemplo, *B. betae*, *B. canariense*, *B. elkanii*, *B. iriomotense*, *B. japonicum*, *B. jicamae*; *B. liaoningense*, *B. pachyrhizi*, y/o *B. yuanmingense*), *Azorhizobium spp.* (por ejemplo, *A. caulinodans* y/o *A. doebereineriae*), *Sinorhizobium spp.* (por ejemplo, *S. abri*, *S. adhaerens*, *S. americanum*, *S. aboris*, *S. fredii*, *S. indiaense*, *S. kostiense*, *S. kummerowiae*, *S. medicae*, *S. meliloti*, *S. mexicanus*, *S. morelense*, *S. sahelii*, *S. terangaie*, y/o *S. xinjiangense*), *Mesorhizobium spp.* (*M. Albiziae*, *M. amorphae*, *M. chacoense*, *M. ciceri*, *M. huakuii*, *M. loti*, *M. mediterraneum*, *M. pluifarium*, *M. septentrionale*, *M. temperatum*, *M. tianshanense*).

En una forma de realización particular, la(s) cepa(s) bacteriana(s) de la invención además incluyen cepas de *Bradyrhizobium japonicum* teniendo los números de depósito NRRL B-50592 (depositado también como NRRL B-59571), NRRL B-50593 (depositado también como NRRL B-59572), NRRL B-50586 (depositado también como NRRL B-59565), NRRL B-50588 (depositado también como NRRL B-59567), NRRL B-50587 (depositado también como NRRL B-59566), NRRL B-50589 (depositado también como NRRL B-59568), NRRL B-50591 (depositado también como NRRL B-59570); NRRL B-50590 (depositado también como NRRL B-59569); NRRL B-50594 (depositado también como NRRL B-50493); NRRL B-50726 NRRL B-50727 NRRL B-50728 NRRL B-50729 NRRL B-50730, o una combinación de al menos dos o más de las cepas depositadas anteriores, incluyendo dos de las cepas anteriores, al menos tres de las cepas anteriores, al menos cuatro de las cepas anteriores, al menos cinco de las cepas anteriores, al menos seis de las cepas anteriores, al menos siete de las cepas anteriores, al menos ocho de

las cepas anteriores, al menos nueve de las cepas anteriores, al menos diez de las cepas anteriores, al menos once de las cepas anteriores, al menos doce de las cepas anteriores, al menos trece de las cepas anteriores, hasta e incluso todas las cepas anteriores.

5 [0019] El término "cepa(s) comercialmente disponible(s)" significa cepas bacterianas disponibles comercialmente, por ejemplo, USDA 532C, USDA 110, USDA 123, USDA 127, USDA 129, etc. Cregan, P.B., et al., 1989, Appl. and Environ. Microbiol. 55 (10): 2532-2536.

10 [0020] Como se utiliza en este caso, "competitividad aumentada" y/o "nodulación aumentada" se define para significar cepa(s) bacteriana(s) que poseen un porcentaje dominante de ocupación de nódulo, por ejemplo al menos 50%, al menos 55%, al menos 60%, al menos 65%, al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99%, hasta 100% de ocupación del nódulo. "Competitividad aumentada" fue determinada conforme al(los) ensayo(s) detallado(s) descrito(s) abajo (ver Materiales y Métodos: "Protocolo de selección primaria" y "Protocolo de estudio de competición").

15 [0021] Como se utiliza en este caso, el término "nódulo" se define para incluir, pero no se destina a limitarse a, nódulos determinados, nódulos indeterminados, o una combinación de los mismos. Ejemplos de nódulos determinados y nódulos indeterminados se conocen bien en la técnica y se describen en Denison, R. F., 2000, The Amer. Naturalist. 156 (6): 567-576. Nódulos determinados se encuentran en especies de glicina, de *Lotus*, o de *Phaseolus* y son de forma redonda y esférica. (Denison; 2000) Nódulos determinados crecen solo durante un periodo de tiempo limitado - típicamente unas pocas semanas. (Denison; 2000) A diferencia de nódulos determinados, nódulos indeterminados son descubiertos en las especies *Medicago*, *Trifolium*, y *Pisium*, tienen una forma alargada y crecen continuamente. (Denison; 2000)

20 [0022] "Ocupación del nódulo" es un término conocido en la técnica. McDermott T.R. & Graham, P.H., Appl. and Environ. Microbiol. 55(10): 2493-2498.

30 Como se utiliza en este caso, "ocupación del nódulo" significa el porcentaje de nódulos ocupado por una(s) cepa(s) bacteriana(s) además de la cepa de *Bradyrhizobium* disponible comercialmente, por ejemplo USDA 532C, y/o el número de nódulos que contienen una(s) cepa(s) bacteriana(s) particular(es) además de la cepa de *Bradyrhizobium* disponible comercialmente, por ejemplo USDA 532C, dividido por el número total de nódulos que contiene todas las cepas bacterianas. La "ocupación del nódulo" fue determinada conforme al(los) ensayo(s) detallado(s) descrito(s) abajo (ver Materiales y Métodos: "Protocolo de Selección primaria" y "protocolo de estudio de competición") y se pueden determinar a partir de un análisis de nódulos de plantas obtenidas bien de muestras de invernadero o de campo.

35 Como ejemplo, el porcentaje de ocupación de nódulo = $A/(A+B)$ donde A es el número de nódulos que contiene una cepa(s) bacteriana particular aparte de una cepa de *Bradyrhizobium* disponible comercialmente, por ejemplo USDA 532C, y B es el número de nódulos con una cepa de *Bradyrhizobium* disponible comercialmente, por ejemplo, USDA 532C.

40 Es bien conocido en la técnica que, a pesar de la excepción rara, un nódulo único contendrá solo una cepa bacteriana.

45 Johnston, A.W.B., et al., 1974, J. Gen. Microbiol 87: 343-350; Dunham, D. H. & Baldwin, I.L., 1931, Soil Science 32: 235-249; Johnson, H.W., et al., 1963, Agrono. J. 55: 269-271; Dudman, W.F. & Brockwell, J., 1968, J. Agricul. Res. 19: 739-747; Nicol, H. & Thornton, H.G., 1941, Proc. Roy. Soc. B 130,32-59; Hughes, D.Q., & Vincent, J.M., 1942, Proc. of the Linnenan Soc. of New South Wales 67: 142-152; y Vincent, J.M. & Waters, L.M., 1953, J. Gen. Microbiol. 9: 357-370.

50 [0023] Como se utiliza en este caso, "efectividad aumentada en la promoción del crecimiento" incluye al menos uno de mayor rendimiento de planta medido en cuanto a fanegas/acre, mayor número de fruta, mayor número de raíz, mayor longitud de raíz, mayor masa de la raíz, mayor volumen de la raíz, mayor área de la hoja, mayor porte de la planta, mayor vigor de la planta, y/o mayor capacidad de fijar nitrógeno (N₂). "Mayor efectividad en la promoción del crecimiento" fue determinada conforme al(los) ensayo(s) detallado(s) descrito(s) abajo (ver Materiales y Métodos: "Protocolo de Selección primaria" y "protocolo de estudio del rendimiento") y se pueden determinar a partir de un análisis de plantas obtenidas bien de muestras de invernadero o de campo.

55 [0024] Como se utiliza en este caso "mayor número de frutos" significa un número total aumentado de vainas de soja en una planta de soja y/o un peso en seco total aumentado de vainas de soja en una planta de soja.

60 [0025] Como se utiliza en este caso "peso en seco total" significa el peso de materia vegetal (por ejemplo, frutos de la planta, vainas de la planta, raíces de planta, nódulos de la planta, plantas enteras, plantas parciales, etc.) después de la incubación a 80° C durante un periodo de tiempo específico, por ejemplo, al menos 4 horas, al menos 8 horas, al menos 12 horas, al menos 24 horas, al menos 48 horas, etc., o cualquier periodo de tiempo necesario para secar la materia vegetal.

65 Debe entenderse que tiempos de secado para los fines de determinar el "peso en seco total" son dependientes de

muchos factores.

Factores no limitadores que pueden impactar en el tiempo de secado incluyen el material para ser secado, la masa del material para ser secado, la cantidad de material para ser secado, y/o combinaciones de los mismos.

5 La incubación se puede realizar en cualquier dispositivo controlado de temperatura usado en la técnica. Para los fines de esta invención, "peso en seco total" fue determinado con una incubadora Innova® 42R de Eppendorf.

[0026] El término "mayor capacidad de fijación de nitrógeno (N₂)", como se utiliza aquí, significa que las bacterias aisladas pueden aumentar la fijación de nitrógeno (N₂).

10 Conforme al "Protocolo de estudio de rendimiento" proporcionado infra (materiales y métodos), la capacidad de fijación relativa del nitrógeno (N₂) de bacterias se puede cuantificar por medición del contenido de nitrógeno total de la planta usando métodos de cuantificación de nitrógeno estándar conocidos por los expertos en la materia (por ejemplo, el método de Kjeldahl, etc.).

15 Ver Takahashi, M., et al., 2007. Uptake, Assimilation, and Novel Metabolism of Nitrogen Dioxide in Plants, p. 109-118. En N. Willey (ed.), Phytoremediation: Methods and Reviews, vol. 23. Humana Press, New York; Bremner, J. M. 1965. Total nitrogen, p. 1149-1178. in C.A. Black (ed.), Methods of soil analysis, vol. 2. American Society for Agronomy, Madison; Schank, S.C., et al., 1981, App. and Enviro. Microbial., 41 (2): 342-345.

20 [0027] En otro aspecto de la presente invención, la(s) cepa(s) bacteriana(s) aislada(s) tienen una tolerancia a la temperatura mejorada. "Tolerancia a la temperatura mejorada" significa la gama de temperaturas en las que la(s) cepa(s) bacteriana(s) aislada(s) es(son) capaces de crecer, por ejemplo, las temperaturas máximas y mínimas en las que la(s) cepa(s) de *Bradyrhizobium* aislada(s) puede(n) crecer.

En un aspecto, "tolerancia a la temperatura mejorada" fue determinada según el "Protocolo de Perfil de Temperatura" discutido infra (materiales y métodos).

25 [0028] En otro aspecto de la presente invención, la(s) cepa(s) bacteriana(s) aislada(s) es(son) naturalmente resistente(s) al glifosato.

En un aspecto, "tolerancia a la temperatura mejorada" fue determinada según el "Protocolo de Perfil de Resistencia al Glifosato" discutido infra (materiales y métodos).

30 [0029] En otro aspecto, la(s) cepa(s) bacteriana(s) aislada(s) de la presente invención incluye(n) cepa(s) que es(son) cercanamente relacionadas con cualquiera de las cepas anteriores basándose en la identidad de secuencia de ADNr 16S.

35 Ver Stackebrandt E, et al., "Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology," Int J Syst Evol Microbial. 52(3):1043-7 (2002) con relación al uso de identidad de secuencia de ADNr 16S para determinar la relación en bacterias.

40 En una forma de realización, al menos una cepa es al menos 95% idéntica a cualquiera de las cepas anteriores basándose en la identidad de secuencia de ADNr 16S, al menos 96% idéntica a cualquiera de las cepas anteriores basándose en la identidad de secuencia de ADNr 16S, al menos 97% idéntica a cualquiera de las cepas anteriores basándose en la identidad de secuencia de ADNr 16S, al menos 98% a cualquiera de las cepas anteriores basándose en la identidad de secuencia de ADNr 16S, al menos 98.5% idéntica a cualquiera de las cepas anteriores basándose en la identidad de secuencia de ADNr 16S, al menos 99% idéntica a cualquiera de las cepas anteriores basándose en la identidad de secuencia de ADNr 16S o al menos 99,5% a cualquiera de las cepas anteriores basándose en la identidad de secuencia de ADNr 16S.

45 [0030] En otra forma de realización, la presente invención incluye un método para aislar cepa(s) bacteriana(s) teniendo competitividad mejorada para ocupar los nódulos de una planta leguminosa y eficacia mejorada para promover el crecimiento de la planta leguminosa.

Como se utiliza en este caso, el término "aislan, aisla, aislamiento, y/o aislado, etc." significa que el material referenciado es quitado del entorno donde se encuentra normalmente.

50 El método incluye, entre otras cosas,

- a. obtener una(s) cepa(s) bacteriana(s) de una muestra de suelo;
- b. someter la(s) cepa(s) bacteriana(s) y una cepa disponible comercialmente a una planta leguminosa;
- c. seleccionar la(s) cepa(s) bacteriana(s) que son más competitiva(s) que la cepa disponible comercialmente para la ocupación de los nódulos de una planta leguminosa;
- 55 d. analizar la(s) cepa(s) bacteriana(s) seleccionada(s) que son más competitiva(s) que la cepa disponible comercialmente para la ocupación de los nódulos de una planta leguminosa para aquellas cepa(s) bacteriana(s) que tienen una eficacia mejorada en promover el crecimiento de la planta leguminosa; y
- e. aislar la(s) cepa(s) bacteriana(s) que tienen eficacia mejorada en promover el crecimiento de la planta leguminosa.

60 [0031] En un aspecto, la(s) cepa(s) bacteriana(s) aislada(s) son cepas del género *Bradyrhizobium*.

En todavía otro aspecto, el método además incluye la etapa de selección de la(s) cepa(s) de *Bradyrhizobium* contra un cebador específico único para una cepa disponible comercialmente de *Bradyrhizobia*, por ejemplo, cepa comercial USDA 532C.

65 [0032] En otro aspecto, el método incluye el aislamiento de un cultivo de *Bradyrhizobia japonicum* seleccionado del grupo consistente en:

la cepa con el número de acceso de depósito NRRL B-50592 (depositado también como NRRL B-59571);
 la cepa con el número de acceso de depósito NRRL B-50593 (depositado también como NRRL B-59572);
 La cepa con el número de acceso de depósito NRRL B-50586 (depositado también como NRRL B-59565);
 la cepa con el número de acceso de depósito NRRL B-50588 (depositado también como NRRL B-59567);
 5 la cepa con el número de acceso de depósito NRRL B-50587 (depositado también como NRRL B-59566);
 la cepa con el número de acceso de depósito NRRL B-50589 (depositado también como NRRL B-59568);
 la cepa con el número de acceso de depósito NRRL B-50591 (depositado también como NRRL B-59570);
 la cepa con el número de acceso de depósito NRRL B-50590 (depositado también como NRRL B-59569);
 la cepa con el número de acceso de depósito NRRL B-50594 (depositado también como NRRL B-50493);

10 la cepa con el número de acceso de depósito NRRL B-50726;
 la cepa con el número de acceso de depósito NRRL B-50727;
 la cepa con el número de acceso de depósito NRRL B-50728;
 la cepa con el número de acceso de depósito NRRL B-50729 y

15 la cepa con el número de acceso de depósito NRRL B-50730, o una combinación de al menos dos o más de las
 cepas depositadas anteriores, incluyendo más de dos, tal como, al menos tres de las cepas anteriores, al menos
 cuatro de las cepas anteriores, al menos cinco de las cepas anteriores, al menos seis de las cepas anteriores, al
 menos siete de las cepas anteriores, al menos ocho de las cepas anteriores, al menos nueve de las cepas
 anteriores, al menos diez de las cepas anteriores, al menos once de las cepas anteriores, al menos doce de las
 cepas anteriores, al menos trece de las cepas anteriores, hasta todas las cepas anteriores.

20 [0033] En todavía otro aspecto, el método incluye aislar cepa(s) bacteriana(s) teniendo tolerancia a la temperatura
 mejorada.

Ver materiales y métodos: "Protocolo de perfil de la temperatura."

25 [0034] Además, el método incluye aislamiento de una(s) cepa(s) bacteriana(s) teniendo resistencia natural al
 glifosato.

Ver materiales y métodos: "Protocolo de perfil de resistencia al glifosato."

30 [0035] En otro aspecto preferido, el método incluye el aislamiento de cepa(s) bacteriana(s) seleccionada(s) del
 género consistente en *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* capaz de aumentar la nodulación de una planta leguminosa.

Composición

35 [0036] La presente invención incluye una composición que comprende al menos una de la(s) cepa(s) bacteriana(s)
 aislada(s) de la presente invención o una combinación de al menos dos o más de las cepas depositadas anteriores,
 incluyendo más de dos, tal como, al menos tres de las cepas anteriores, al menos cuatro de las cepas anteriores, al
 menos cinco de las cepas anteriores, al menos seis de las cepas anteriores, al menos siete de las cepas anteriores,
 al menos ocho de las cepas anteriores, al menos nueve de las cepas anteriores, al menos diez de las cepas
 anteriores, al menos once de las cepas anteriores, al menos doce de las cepas anteriores, al menos trece de las
 40 cepas anteriores, hasta todas las cepas anteriores y un portador agronómicamente adecuado.

[0037] En algunas formas de realización, la composición puede ser una composición inoculante.

45 Como se utiliza en este caso y en la técnica, el término "composición inoculante" se refiere generalmente a
 composiciones o materiales que introducen cepas bacterianas compatibles bien sobre una superficie externa de
 semillas o en el surco de siembra.

[0038] La composición puede comprender uno o varios portadores agronómicamente aceptables.

En los casos en los que se usan múltiples portadores agronómicamente aceptables, los portadores
 agronómicamente aceptables pueden ser iguales o diferentes.

50 Como se utiliza en este caso en relación con "portador", el término "agronómicamente aceptable" se refiere a
 cualquier material que se puede usar para entregar los activos a una semilla, suelo o planta, y preferiblemente cuyo
 portador se puede adicionar (a la semilla, suelo o planta) sin que tenga un efecto adverso en el crecimiento de la
 planta, estructura del suelo, drenaje del suelo o similar.

55 Portadores adecuados comprenden, pero de forma no limitativa, paja de trigo, salvado, paja de trigo molida, polvos a
 base de turba o gránulos, gránulos a base de yeso, y arcillas (por ejemplo, caolín, bentonita, montmorilonita).

Formulaciones como líquido, turba, o polvo humectable serán adecuadas para el revestimiento de semillas.

Cuando se usa para revestir semillas, el material puede mezclarse con agua, aplicado a las semillas y dejándose
 secar.

Ejemplo de otros portadores incluyen salvado humedecido, secado, tamizado y aplicado a semillas previamente
 60 recubiertas con un adhesivo, por ejemplo, goma arábiga.

En formas de realización que implican formulación de los activos, el portador agronómicamente aceptable puede ser
 acuoso.

Si se usa un portador líquido, el portador líquido (por ejemplo; agua) típicamente incluirá medios de crecimiento para
 cultivar las cepas bacterianas.

65 Ejemplos no limitativos de medios de crecimiento adecuados para las cepas bacterianas incluyen extracto de
 levadura de manitol, extracto de levadura de glicerol, o cualquier medio conocido por los expertos en la técnica por

ser compatible con, y/o proporcionar nutrientes de crecimiento a las cepas bacterianas.

[0039] También comprendidas por las composiciones de la presente invención son las composiciones que incluyen una o varias moléculas señal.

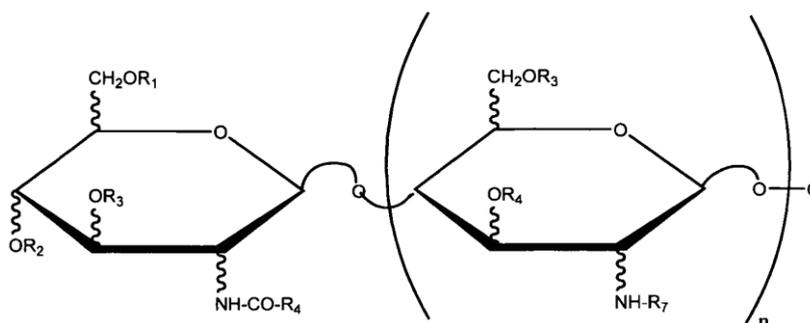
5 Ejemplos no limitativos de moléculas señal de plantas incluyen factores nod (es decir, lipo-quitoooligosacáridos), quito-oligosacáridos, compuestos quitinosos, flavonoides, ácido jasmónico o sus derivados, ácido linoleico o sus derivados, ácido linolénico o sus derivados, karrikinas, o sus combinaciones.

[0040] Compuestos de lipo-quitoooligosacárido (LCO's), también conocidos en la técnica como señales Nod simbióticas o factores Nod, consisten en un esqueleto de oligosacárido de residuos de N-acetil-D-glucosamina β -1,4-

10 enlazada ("GlcNAc") con una cadena de acilo graso N-enlazada condensada en el extremo no reducido. LCO difieren en el número de residuos GlcNAc en el esqueleto, en la longitud y grado de saturación de la cadena de acilo graso, y en las sustituciones de residuos de azúcar reductores y no reductores.

Un ejemplo de un LCO es presentado debajo como fórmula I:

15



donde:

G es una hexosamina que puede ser sustituida, por ejemplo, por un grupo acetilo en el nitrógeno, un grupo sulfato, un grupo acetilo y/o un grupo éter en un oxígeno,

20 R₁, R₂, R₃, R₅, R₆ y R₇, que puede ser idéntico o diferente, representan H, CH₃ CO--, C_x H_y CO-- donde x es un número entero entre 0 y 17, e y es un número entero entre 1 y 35, o cualquier otro grupo de acilo tal como por ejemplo un carbamilo,

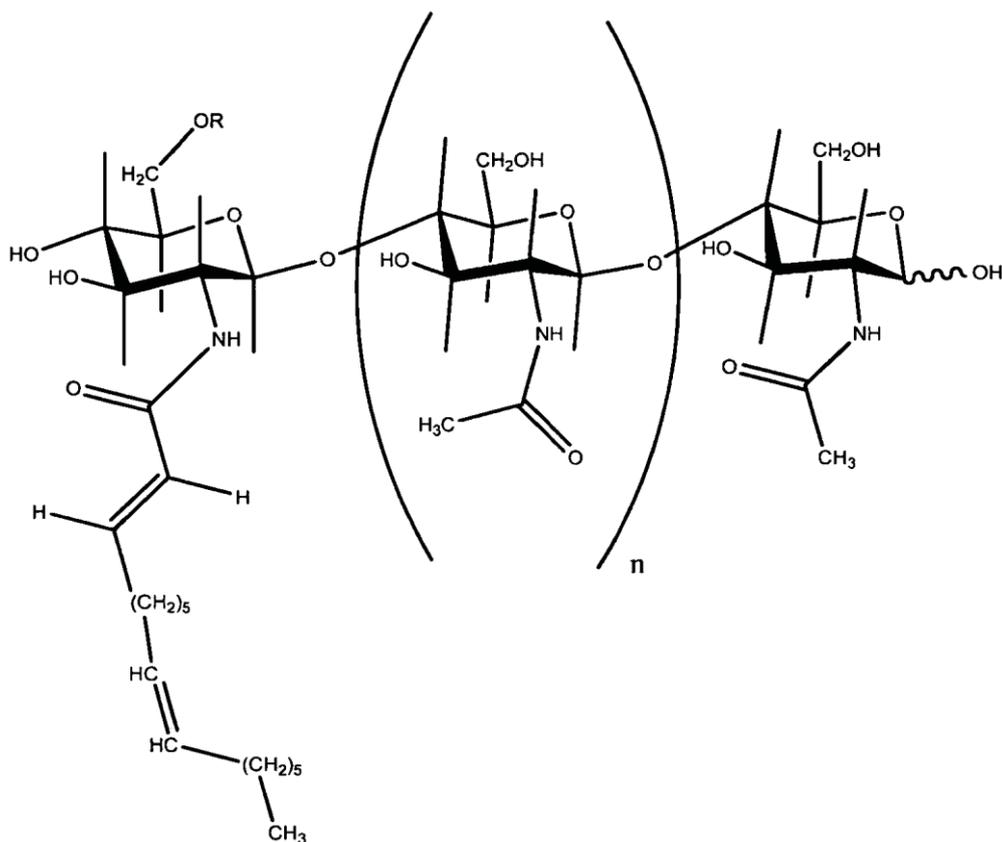
R₄ representa una cadena alifática mono-, di- o triinsaturada que contiene al menos 12 átomos de carbono, y n es un número entero entre 1 y 4.

25

[0041] LCO puede ser obtenido (aislado y/o purificado) de bacterias tales como *Rhizobia*, por ejemplo, *Rhizobium spp.*, *Bradyrhizobium spp.*, *Sinorhizobium spp.* y *Azorhizobium spp.*

La estructura de LCO es característica para cada una de estas especies bacterianas, y cada cepa puede producir LCO múltiples con estructuras diferentes.

30 Por ejemplo, LCO específico de *S. meliloti* han sido también descritos en la Patente de EEUU 5,549,718 como teniendo la fórmula II:



donde R representa H o $\text{CH}_3\text{CO--}$ y n es igual a 2 o 3.

5 [0042] LCO aún más específicos incluyen NodRM, NodRM-1; NodRM-3. Cuando se acetilan (el $\text{R}=\text{CH}_3\text{CO--}$), se vuelven AcNodRM-1, y AcNodRM-3, respectivamente (Patente de EEUU 5,545,718).

10 [0043] LCO de *Bradyrhizobium japonicum* están descritos en las Patentes de EEUU 5,175,149 y 5,321,011. En general, son fitohormonas pentasacáridas que comprenden metilfucosa. Varios de estos LCO derivados de *B. japonicum* están descritos: BjNod-V (C18:1); BjNod-V (ca; C18:1), BjNod-V (C16:1); y BjNod-V (ca; C16:0), con "V" indicando la presencia de cinco n-acetilglucosaminas; "Ac" una acetilación; el número después de "C" indicando el número de carbonos en la cadena lateral de ácido graso; y el número después de ":" el número de enlaces dobles.

15 [0044] LCO usados en composiciones de la invención se pueden obtener (es decir, aislar y/o purificar) de cepas bacterianas que producen LCO, tales como cepas de *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium* (incluyendo *B. japonicum*), *Mesorhizobium*, *Rhizobium* (incluyendo *R. leguminosarum*), *Sinorhizobium* (incluyendo *S. meliloti*), y cepas bacterianas genéticamente modificadas para producir LCO.

20 [0045] También están comprendidas por la presente invención composiciones que usan LCO obtenidos (es decir, aislados y/o purificados) de un hongo micorrizal, tal como hongos del grupo *Glomerocycota*, por ejemplo, *Glomus intraradicus*.

25 Las estructuras de LCO representativas obtenidas de estos hongos están descritas en WO 2010/049751 y WO 2010/049751 (los LCO descritos en estos también son referidos como "factores Myc").

[0046] También está comprendido por las composiciones de la presente invención el uso de compuestos de LCO sintéticos, tales como los descritos en WO 2005/063784, y LCO recombinantes a través de ingeniería genética.

30 La estructura de LCO básica, de origen natural puede contener modificaciones o sustituciones encontradas en LCO de origen natural, tales como las descritas en Spaink, Crit. Rev. Plant Sci. 54:257-288 (2000) y D'Haese, et al., Glycobiology 12:79R-105R (2002).

35 Moléculas precursoras de oligosacáridos (CO, que como se describe abajo, son también útiles como moléculas señal de plantas en la presente invención) para la construcción de LCO también se pueden sintetizar por organismos genéticamente modificados, por ejemplo, como en Samain, et al., Carb. Res. 302:35-42 (1997); Samain, et al., J. Biotechnol. 72:33-47 (1999).

[0047] LCO se pueden utilizar en varias formas de pureza y se pueden usar solos o en forma de un cultivo de bacterias u hongos productores de LCO.

Métodos para proporcionar LCO sustancialmente puros incluyen sencillamente eliminar las células microbianas de una mezcla de LCO y el microbio, o continuar aislando y purificando las moléculas de LCO a través de la separación de la fase solvente de LCO seguida de cromatografía de HPLC como se describe, por ejemplo, en la patente de EEUU 5,549,718.

La purificación se puede mejorar por HPLC repetida, y las moléculas de LCO purificadas se pueden liofilizar para almacenamiento a largo plazo.

[0048] Quito-oligosacáridos (CO) se conocen en la técnica como estructuras de N-acetil glucosamina β -1-4 enlazadas identificadas como oligómeros de quitina, también como N-acetilquitooligosacáridos.

CO tienen decoraciones de cadena lateral únicas y diferentes que los hacen diferentes de las moléculas de quitina $[(C_8H_{13}NO_5)_n]$, CAS n° 1398-61-4, y las moléculas de quitosano $[(C_5H_{11}NO_4)_n]$, CAS n° 9012-76-4.

Bibliografía representativa que describe la estructura y producción de CO es la siguiente: Van der Holst, et al., Current Opinion in Structural Biology, 11:608-616 (2001); Robina, et al., Tetrahedron 58:521-530 (2002); Hanel, et al., Planta 232:787-806 (2010); Rouge, et al. Capítulo 27, "The Molecular Immunology of Complex Carbohydrates" en Advances in Experimental Medicine and Biology, Springer Science; Wan, et al., Plant Cell 21:1053-69 (2009); PCT/F100/00803 (9/21/2000); y Demont-Caulet, et al., Plant Physiol. 120(1):83-92 (1999).

Los CO pueden ser sintéticos o recombinantes.

Métodos para la preparación de CO recombinantes se conocen en la técnica. Ver, por ejemplo, Samain, et al. (supra.); Cottaz, et al., Meth. Eng. 7(4):311-7 (2005) y Samain, et al., J. Biotechnol. 72:33-47 (1999).

[0049] Composiciones de la presente invención también pueden incluir compuestos quitinosos (diferentes de los CO), flavonoides, ácido jasmónico, ácido linoleico y ácido linolénico y sus derivados, y karrikinas.

[0050] Quitinas y quitosanos, que son componentes mayores de las paredes celulares de hongos y los exoesqueletos de insectos y crustáceos, están también compuestos por residuos de GlcNAc.

Compuestos quitinosos incluyen quitina, (IUPAC: N-[5-[[3-acetilamino-4,5-dihidroxi-6-(hidroximetil)oxan-2il]metoximetil]-2-[[5-acetilamino-4,6-dihidroxi-2-(hidroxi metil)oxan-3-il]metoximetil]-4-hidroxi-6-(hidroximetil)oxan-3-is]etanamida), y quitosano, (IUPAC: 5-amino-6-[5-amino-6-[5-amino-4,6-dihidroxi-2(hidroximetil)oxan-3-il]oxi-4-hidroxi-2-(hidroximetil)oxan-3-il]oxi-2(hidroximetil)oxano-3,4-diol).

Estos compuestos se pueden obtener comercialmente, por ejemplo, de Sigma-Aldrich, o preparar a partir de insectos, conchas de crustáceos, o paredes celulares de células fúngicas.

Métodos para la preparación de quitina y quitosano se conocen en la técnica, y se han descrito, por ejemplo, en la patente de EEUU 4,536,207 (preparación de conchas de crustáceo), Pochanavanich, et al., Lett. Appl. Microbiol. 35:17-21 (2002) (preparación de paredes de célula fúngica), y patente de EEUU 5,965,545 (preparación de conchas de cangrejo e hidrólisis de quitosano comercial).

Quitinas y quitosanos desacetilados se pueden obtener que varían de menos del 35% a más del 90% de desacetilación, y cubren un amplio espectro de pesos moleculares, por ejemplo, oligómeros de quitosano de bajo peso molecular inferior a 15kD y oligómeros de quitina de 0.5 a 2kD; quitosano de "grado práctico" con un peso molecular de aproximadamente 15kD; y quitosano de peso molecular alto de hasta 70kD.

Composiciones de quitina y de quitosano formuladas para el tratamiento de semillas están también disponibles comercialmente.

Productos comerciales incluyen, por ejemplo, ELEXA® (Plant Defense Boosters, Inc.) y BEYOND™ (Agrihouse, Inc.).

[0051] Flavonoides son compuestos fenólicos que tienen la estructura general de dos anillos aromáticos conectados por un puente de tres carbonos.

Flavonoides se producen por plantas y tienen muchas funciones, por ejemplo, como moléculas de señalización beneficiosas, y como protección contra los insectos, animales, hongos y bacterias.

Clases de flavonoides incluyen chalconas, antocianidinas, cumarinas, flavonas, flavanoles, flavonoles, flavanonas, e isoflavonas.

Ver, Jain, et al., J. Plant Biochem. & Biotechnol. 11:1-10 (2002); Shaw, et al., Environmental Microbiol. 11:1867-80 (2006).

[0052] Flavonoides representativos que pueden ser útiles en composiciones de la presente invención incluyen genisteína, daidzeína, formononetina, naringenina, hesperetina, luteolina, y apigenina.

Compuestos flavonoides están disponibles comercialmente, por ejemplo, de Natland International Corp., Research Triangle Park, NC; MP Biomedicals, Irvine, CA; LC Laboratories, Woburn MA.

Compuestos flavonoides se pueden aislar de plantas o semillas, por ejemplo, como se describe en las Patentes de EEUU 5,702,752, 5,990,291; y 6,146,668.

Compuestos flavonoides también se pueden producir por organismos genéticamente modificados, tales como levadura, como se describe en Ralston, et al., Plant Physiology 137:1375-88 (2005).

[0053] Ácido jasmónico (JA, ácido [1R-[2 α ,2 β (Z)]]-3-oxo-2-(pentenil)ciclopentanoacético) y sus derivados, ácido linoleico (ácido (Z,Z)-9,12-Octadecadienoico) y sus derivados, y ácido linolénico (ácido (Z,Z,Z)-9,12,15-

octadecatrienoico) y sus derivados, también se pueden usar en composiciones de la presente invención.

Ácido jasmónico y su éster metílico, metil jasmonato (MeJA), colectivamente conocidos como jasmonatos, son compuestos a base de octadecanoides que ocurren naturalmente en plantas.

5 Ácido jasmónico se produce por las raíces de semillas de trigo, y por microorganismos fúngicos tales como *Botryodiplodia teobromae* y *Gibbrella fujikuroi*, levadura (*Saccharomyces cerevisiae*), y cepas patógenas y no patógenas de *Escherichia coli*.

Ácido linoleico y ácido linolénico se producen durante la biosíntesis de ácido jasmónico.

Jasmonatos, ácido linoleico y ácido linolénico (y sus derivados) se proporcionan por ser inductores de expresión del gen nod o producción de LCO por rizobacterias.

10 Ver, por ejemplo, Mabood, Fazli, "Jasmonates induce the expression of nod genes in Bradyrhizobium japonicum," Mayo 17, 2001; y Mabood, Fazli, "Linoleic and linolenic acid induce te expression of nod genes in Bradirrhizobium japonicum," USDA 3, Mayo 17, 2001.

15 [0054] Derivados útiles de ácido linoleico, ácido linolénico, y ácido jasmónico que pueden ser útiles en composiciones de la presente invención incluyen ésteres, amidas, glucósidos y sales.

Ésteres representativos son compuestos donde el grupo carboxilo de ácido linoleico, ácido linolénico, o ácido jasmónico se ha sustituido por un grupo --COR, donde R es un grupo --O, donde R₁ es: un grupo alquilo, tal como un grupo alquilo no ramificado C₁-C₈ o ramificado, por ejemplo, un grupo metilo, etilo o propilo; un grupo de alqueno, tal como un grupo alqueno C₂-C₈ no ramificado o ramificado; un grupo alquino, tal como un grupo alquino C₂-C₈ no ramificado o ramificado; un grupo arilo teniendo, por ejemplo, 6 a 10 átomos de carbono; o un grupo heteroarilo teniendo, por ejemplo, 4 a 9 átomos de carbono, donde los heteroátomos en el grupo heteroarilo pueden ser, por ejemplo, N, O, P, o S.

20 Amidas representativas son compuestos donde el grupo carboxilo de ácido linoleico, ácido linolénico, o ácido jasmónico se ha sustituido por un grupo --COR, donde R es un grupo NR₂R₃, donde R₂ y R₃ son independientemente: hidrógeno; un grupo alquilo, tal como un grupo alquilo C₁-C₈ no ramificado o ramificado, por ejemplo, un grupo metilo, etilo o propilo; un grupo alqueno, tal como un grupo alqueno C₂-C₈ no ramificado o ramificado un grupo alquino, tal como un grupo alquino C₂-C₈ no ramificado o ramificado; un grupo arilo teniendo, por ejemplo, 6 a 10 átomos de carbono; o un grupo heteroarilo teniendo, por ejemplo, 4 a 9 átomos de carbono, donde los heteroátomos en el grupo heteroarilo pueden ser, por ejemplo, N, O, P, o S. Ésteres se pueden preparar por métodos conocidos, tal como adición nucleofílica catalizada por ácido, donde el ácido carboxílico se reacciona con un alcohol en presencia de una cantidad catalítica de un ácido mineral.

25 Amidas también se pueden preparar por métodos conocidos, tal como reaccionar el ácido carboxílico con la amina apropiada en presencia de un agente de acoplamiento tal como (DCC) de dicitohexil carbodiimida, bajo condiciones neutras.

35 Sales adecuadas de ácido linoleico, ácido linolénico, y ácido jasmónico incluyen por ejemplo, sales de adición básicas.

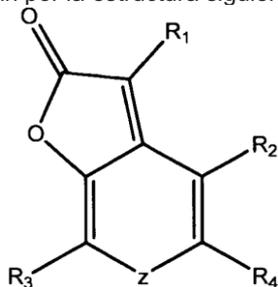
Las bases que se pueden utilizar como reactivos para preparar sales de base metabólicamente aceptables de estos compuestos incluyen aquellas derivadas de cationes tales como cationes de metal alcalino (por ejemplo, potasio y sodio) y cationes de metal alcalinotérreo (por ejemplo, calcio y magnesio).

40 Estas sales pueden ser fácilmente preparadas mezclando una solución de ácido linoleico, ácido linolénico, o ácido jasmónico con una solución de la base.

La sal se puede precipitar de la solución y ser recogida por filtración o se puede recuperar por otros medios tales como por evaporación del solvente.

45 [0055] Kariquinas son 4H-pironas vinílogas por ejemplo, 2H-furo[2,3-c]piran-2-onas incluyendo derivados y sus análogos.

Ejemplos de estos compuestos se representan por la estructura siguiente:



50 donde; Z es O, S o NR₅; R₁, R₂, R₃, y R₄ son cada uno independientemente H, alquilo, alqueno, alquino, fenilo, bencilo, hidroxilo, hidroxialquilo, alcoxi, feniloxi, benciloxi, CN, COR₆, COOR₇, halógeno, NR₆R₇, o NO₂ y R₅, R₆, y R₇ son cada uno independientemente H, alquilo o alqueno, o una sal derivada biológicamente aceptable.

Ejemplos de sales biológicamente aceptables de estos compuestos pueden incluir sales de adición de ácido formadas con ácidos biológicamente aceptables, ejemplos de los cuales incluyen hidrocloreto, hidrobromuro, sulfato o bisulfato, fosfato o fosfato de hidrógeno, acetato, benzoato, succinato, fumarato, maleato, lactato, citrato, tartrato, gluconato; metanosulfonato, bencenosulfonato y ácido p-tolueno sulfónico.

55 Sales metálicas biológicamente aceptables adicionales pueden incluir sales de metal alcalino, con bases, ejemplos

de los cuales incluyen sales de sodio y de potasio.

Ejemplos de compuestos adoptados por la estructura y que se pueden adecuar para usar en la presente invención incluyen los siguientes: 3-metil-2H-furo[2,3-c]piran-2-ona (donde $R_1=CH_3$, $R_2, R_3, R_4=H$), 2H-furo[2,3-c]piran-2-ona (donde $R_1, R_2, R_3, R_4=H$), 7-metil-2H-furo[2,3-c]piran-2-ona (donde $R_1, R_2, R_4=H$, $R_3=CH_3$), 5-metil-2H-furo[2,3-c]piran-2-ona (donde $R_1, R_2, R_3=H$, $R_4=CH_3$), 3,7-dimetil-2H-furo[2,3-c]piran-2-ona (donde $R_1, R_3=CH_3$, $R_2, R_4=H$), 3,5-dimetil-2H-furo[2,3-c]piran-2-ona (donde $R_1, R_4=CH_3$, $R_2, R_3=H$), 3,5,7-trimetil-2H-furo[2,3-c]piran-2-ona (donde $R_1, R_3, R_4=CH_3$, $R_2=H$), 5-metoximetil-3-metil-2H-furo[2,3-c]piran-2-ona (donde $R_1=CH_3$, $R_2, R_3=H$, $R_4=CH_2OCH_3$), 4-bromo-3,7-dimetil-2H-furo[2,3-c]piran-2-ona (donde $R_1, R_3=CH_3$, $R_2=Br$, $R_4=H$), 3-metilfuro[2,3-c]piridin-2(3H)-ona (donde $Z=NH$, $R_1=CH_3$, $R_2, R_3, R_4=H$), 3,6-dimetilfuro[2,3-c]piridin-2(6H)-ona (donde $Z=N-CH_3$, $R_1=CH_3$, $R_2, R_3, R_4=H$).

Ver patente de EEUU 7,576,213.

Estas moléculas son también conocidas como karrikinas.

Ver, Halford, supra.

[0056] Composiciones de la presente invención pueden incluir además un agente agrícola/agronómicamente beneficioso.

Ejemplos no limitativos de tales agentes que pueden ser útiles en la práctica de la presente invención incluyen herbicidas, fungicidas e insecticidas.

[0057] Herbicidas adecuados incluyen bentazona, acifluorfen, clorimurón, lactofen, clomazona, fluazifop, glufosinato, glifosato, setoxidim, imazetapir, imazamox, fomesafen, flumiclorac, imazaquin, y clethodim.

Productos comerciales que contienen cada uno de estos compuestos están fácilmente disponibles.

Concentración herbicida en la composición generalmente corresponderá al índice de uso marcado para un herbicida particular.

[0058] Un "fungicida" como se utiliza en este caso y en la técnica, es un agente que mata o inhibe el crecimiento fúngico.

Como se utiliza en este caso, un fungicida "presenta actividad contra" unas especies particulares de hongos si el tratamiento con el fungicida produce muerte o inhibición del crecimiento de una población fúngica (por ejemplo, en el suelo) con respecto a una población no tratada.

Fungicidas eficaces conforme a la invención presentarán adecuadamente actividad contra una gama amplia de patógenos, incluyendo pero no limitado a *Phytophthora*, *Rhizoctonia*, *Fusarium*, *Pythium*, *Phomopsis* o *Sclerotinia* y *Phakopsora* y sus combinaciones.

[0059] Fungicidas comerciales pueden ser adecuados para el uso en la presente invención.

Fungicidas disponibles comercialmente adecuados incluyen PROTÉGÉ, RIVAL o ALLEGIANCE FL o LS (Gustafson, Plano, TX), WARDEN RTA (Agrilance, St. Paul, MN), APRON XL, APRON MAXX RTA o RFC, MAXIM 4FS o XL (Syngenta, Wilmington, DE), CAPTAN (Arvesta, Guelph, Ontario) y PROTREAT (Nitragin Argentina, Buenos Aires, Argentina).

Ingredientes activos en estos y otros fungicidas comerciales incluyen, pero de forma no limitativa, fludioxonil, mefenoxam, azoxystrobin y metalaxil.

Fungicidas comerciales son más adecuadamente usados de acuerdo con las instrucciones del fabricante en las concentraciones recomendadas.

[0060] Como se utiliza en este caso, un insecticida "presenta actividad contra" unas especies particulares de insecto si el tratamiento con el insecticida produce muerte o inhibición de una población de insecto con respecto a una población no tratada.

Insecticidas eficaces conforme a la invención presentarán adecuadamente actividad contra una gama amplia de insectos incluyendo, pero no limitados a, gusanos alambre, gusano cortador, larvas, gusano de la raíz del maíz, mosca de los sembrados, alticinos, chinches, áfidos, escarabajos de hoja, y chinches hediondos.

[0061] Insecticidas comerciales pueden ser adecuados para el uso en la presente invención.

Insecticidas disponibles comercialmente adecuados incluyen CRUISER (Syngenta, Wilmington, DE), GAUCHO y PONCHO (Gustafson, Plano, TX).

Ingredientes activos en estos y otros insecticidas comerciales incluyen tiametoxam, clotianidina, e imidacloprid.

Insecticidas comerciales son más adecuadamente usados de acuerdo con las instrucciones del fabricante en las concentraciones recomendadas.

[0062] Composiciones de la presente invención también se destinan a incluir el uso de uno o varios agentes de solubilización de fosfato.

Como se utiliza en este caso, agentes de solubilización de fosfato, incluyen, pero de forma no limitativa, microorganismos de solubilización de fosfato.

Como se utiliza en este caso, "microorganismo de solubilización de fosfato" es un microorganismo que es capaz de aumentar la cantidad de fósforo disponible para una planta.

Microorganismos de solubilización de fosfato incluyen cepas bacterianas y fúngicas.

En una forma de realización, el microorganismo de solubilización de fosfato es un microorganismo formador de

esporas.

[0063] Ejemplos no limitativos de microorganismos de solubilización de fosfato incluyen especies de un género seleccionado del grupo consistente en *Acinetobacter*, *Arthrobacte*, *Arthrobotrys*, *Aspergillus*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Candida*, *Chryseomonas*, *Enterobacter*, *Eupenicillium*, *Exiguobacterium*, *Klebsiella*, *Kluyvera*, *Microbacterium*, *Mucor*, *Paecilomyces*, *Paenibacillus*, *Penicillium*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Stenotrophomonas*, *Streptomyces*, *Streptosporangium*, *Swaminathania*, *Thiobacillus*, *Torulospora*, *Vibrio*, *Xanthobacter*, y *Xanthomonas*.

[0064] Ejemplos no limitativos de microorganismos de solubilización de fosfato son seleccionados del grupo que consiste en *Acinetobacter calcoaceticus*, *Acinetobacter*, spp. *Arthrobacter* spp., *Arthrobotrys oligospora*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus* spp., *Azospirillum halopraeferans*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus atrophaeus*, *Bacillus circulans*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis*, *Burkholderia cepacia*, *Burkholderia vietnamiensis*, *Candida krissii*, *Chryseomonas luteola*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter asburiae*, *Enterobacter* spp., *Enterobacter taylorae*, *Eupenicillium parvum*, *Exiguobacteriu* spp., *Klebsiella* spp., *Kluyvera cryocrescera*, *Microbacterium* spp., *Mucor ramosissimus*, *Paecilomyces hepialid*, *Paecilomyces marquandii*, *Paenibacillus macerans*, *Paenibacillus mucilaginosus*, *Pantoea agglomerans*, *Penicillium expansum*, *Pseudomonas corrugate*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas lutea*, *Pseudomonas poae*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas stutzeri*, *Pseudomonas trivialis*, *Serratia marcescens*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Streptomyces* sp., *Streptosporangium* spp., *Svaminathania salitolerans*, *Thiobacillus ferrooxidans*, *Torulospora globosa*, *Vibrio proteolyticus*, *Xanthobacter agilis*, y *Xanthomonas campestris*.

[0065] En una forma de realización, el microorganismo de solubilización de fosfato es una cepa del hongo *Penicillium*.

Cepas del hongo *Penicillium* que pueden ser útiles en la práctica de la presente invención incluir *P. bilaiae* (precedentemente conocido como *P. bilail*), *P. albidum*, *P. aurantiogriseum*, *P. chrysogenum*, *P. citreonigrum*, *P. citrinum*, *P. digitatum*, *P. frequentas*, *P. fuscum*, *P. gaestrivorus*, *P. glabrum*, *P. griseofulvum*, *P. implicatum*, *P. janthinellum*, *P. lilacinum*, *P. minioluteum*, *P. montanense*, *P. nigricans*, *P. oxalicum*, *P. pinetorum*, *P. pinophilum*, *P. purpurogenum*, *P. radicans*, *P. radicum*, *P. raistrickii*, *P. rugulosum*, *P. simplicissimum*, *P. solitum*, *P. variabile*, *P. velutinum*, *P. viridicatum*, *P. glaucum*, *P. fussiporus*, y *P. expansum*.

[0066] En otra forma de realización, las especies de *Penicillium* de microorganismo de solubilización de fosfato son *P. bilaiae*, *P. gaestrivorus*, y/o una combinación de las mismas.

En todavía otra forma de realización, las cepas de *P. bilaiae* son seleccionadas del grupo consistente en ATCC 20851, NRRL 50169, ATCC 22348, ATCC 18309, NRRL 50162 (Wakelin, et al., 2004. *Biol Fertl Soils* 40:36-43) y la cepa de *P. gaestrivorus* es NRRL 50170 (ver, Wakelin, supra.).

[0067] Según composiciones de la invención, está previsto que más de un microorganismo de solubilización de fosfato pueda ser utilizado, tal como, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco, al menos 6, incluyendo cualquier combinación de *Acinetobacter*, *Arthrobacter*, *Arthrobotrys*, *Aspergillus*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Candida*, *Chryseomonas*, *Enterobacter*, *Eupenicillium*, *Exiguobacterium*, *Klebsiella*, *Kluyvera*, *Microbacterium*, *Mucor*, *Paecilomyces*, *Paenibacillus*, *Penicillium*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Stenotrophomonas*, *Streptomyces*, *Streptosporangium*, *Swaminathania*, *Thiobacillus*, *Torulospora*, *Vibrio*, *Xanthobacter*, y *Xanthomonas*, incluyendo unas especies seleccionadas del grupo siguiente: *Acinetobacter calcoaceticus*, *Acinetobacter* spp., *Arthrobacter* spp., *Arthrobotrys oligospora*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus* spp., *Azospirillum halopraeferans*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus atrophaeus*, *Bacillus circulans*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis*, *Burkholderia cepacia*, *Burkholderia vietnamiensis*, *Candida krissii*, *Chryseomonas luteola*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter asburiae*, *Enterobacter* spp., *Enterobacter taylorae*, *Eupenicillium parvum*, *Exiguobacterium* spp., *Klebsiella* spp., *Kluyvera cryocrescens*, *Microbacterium* spp., *Mucor ramosissimus*, *Paecilomyces hepialid*, *Paecilomyces marquandii*, *Paenibacillus macerans*, *Paenibacillus mucilaginosus*, *Pantoea agglomerans*, *Penicillium expansum*, *Pseudomonas corrugate*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas lutea*, *Pseudomonas poae*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas stutzeri*, *Pseudomonas trivialis*, *Serratia marcescens*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Streptomyces* spp., *Streptosporangium* spp., *Swaminathania salitolerans*, *Thiobacillus ferrooxidans*, *Torulospora globosa*, *Vibrio proteolyticus*, *Xanthobacter agilis*, y *Xanthomonas campestris*.

[0068] En otra forma de realización, la presente invención incluye un método de aumento del crecimiento de la planta, que comprende aplicar a las plantas, semillas de planta, o plantas que rodean el suelo, o semillas de planta una o varias de la cepa(s) bacterianas de la presente invención (incluyendo una composición que comprende al menos una de la(s) cepa(s) bacteriana(s) aislada(s) de la presente invención y un portador agronómicamente aceptable.

Una o varias cepas bacterianas pueden comprender solo una cepa bacteriana o una combinación de al menos dos o más de las cepas de la presente invención, incluyendo más de dos, tal como, al menos tres de las cepas anteriores, al menos cuatro de las cepas anteriores, al menos cinco de las cepas anteriores, al menos seis de las cepas anteriores, al menos siete de las cepas anteriores, al menos ocho de las cepas anteriores, al menos nueve de las cepas anteriores, al menos diez de las cepas anteriores, al menos once de las cepas anteriores, al menos doce de las cepas anteriores, al menos trece de las cepas anteriores, hasta todas las cepas anteriores.

Aplicaciones

- [0069] Métodos de la invención incluyen un paso de tratamiento para aplicar al menos una de las cepas aisladas y/o composiciones que comprenden al menos una de las cepas aisladas para semillas, plántulas, raíces, plantas, suelos, o combinaciones de los mismos. "Tratar" o "tratamiento," según se utilizan aquí y en la técnica, se refieren a cualquier aplicación que produce contacto de semillas, plántulas, raíces, o planta con una cantidad eficaz de una composición o componentes de tratamiento para mejorar la competitividad para colonizar una planta y eficacia para promover el crecimiento de la planta.
- [0070] La cantidad eficaz y/o índices de aplicación adecuados varían según el tipo de suelo, el tipo de plantas, las cantidades de la fuente de micronutrientes presentes en el suelo o adicionados a este, etc. y un índice adecuado puede ser encontrado sin dificultad por experimentos simples de prueba y error para cada caso particular. Normalmente, el índice para aplicar al menos una de las cepas aisladas y/o composiciones que comprende al menos una de las cepas aisladas está en la gama de 1×10^2 - 1×10^8 unidades formadoras de colonias (cfu) por semilla (cuando se usan semillas recubiertas). En una forma de realización específica, el índice de aplicación cae en el rango de 1×10^4 - 1×10^5 unidades formadoras de colonias (cfu) por semilla (cuando se usan semillas recubiertas). En un portador granuloso, el índice de aplicación cae en la gama de 1×10^8 - 1×10^{13} cfu por hectárea. En una forma de realización específica, el índice de aplicación en un portador granuloso cae en la gama de 2×10^{11} - 6×10^{11} cfu por hectárea. Aunque las composiciones inoculantes y/o composiciones usadas según la presente invención pueden incluir una mezcla/combinación de al menos dos o más cepas bacterianas diferentes, es a la cantidad total de unidades formadoras de colonias en la mezcla combinada a la que se refiere toda la especificación. La cantidad eficaz de LCO y/o CO usada en una composición de la invención para tratar una semilla directamente se expresa en unidades de concentración y generalmente varía de aproximadamente 10^{-5} a aproximadamente 10^{-14} M (concentración molar), y en algunas formas de realización, de aproximadamente 10^{-5} a aproximadamente 10^{-11} M, y en algunas otras formas de realización de aproximadamente 10^{-7} a aproximadamente 10^{-8} M. Expresado en unidades de peso, la cantidad eficaz generalmente varía de aproximadamente 1 a aproximadamente 400 µg/quintal (cwt) de semilla, y en algunas formas de realización de aproximadamente 2 a aproximadamente 70 µg/CWT, y en algunas otras formas de realización, de aproximadamente 2.5 a aproximadamente 3.0 µg/cwt de semilla.
- [0071] Para fines de tratamiento de semilla indirectamente, es decir, tratamiento en el surco, la cantidad eficaz del LCO o CO generalmente varía de 1 µg/acre a aproximadamente 70 µg/acre, y en algunas formas de realización, de aproximadamente 50 µg/acre a aproximadamente 60 µg/acre. Para fines de aplicación a las plantas, la cantidad eficaz del LCO o CO generalmente varía de 1 µg/acre a aproximadamente 30 µg/acre, y en algunas formas de realización, de aproximadamente 11 µg/acre a aproximadamente 20 µg/acre.
- [0072] El tratamiento se puede realizar directamente, es decir, por aplicación directamente en semillas, plántulas, raíces, o planta (incluso follaje), o se puede realizar indirectamente, es decir, por aplicación al suelo (incluso en el surco).
- [0073] Como será entendido, el tratamiento con cada componente se puede realizar consecutivamente o simultáneamente. Por ejemplo, si se usa un portador líquido, los componentes se pueden co-mezclar en un tanque de mezcla de tratamiento comercial y aplicar posteriormente a las semillas por cualquier proceso de recubrimiento adecuado, por ejemplo, recubrimiento pelicular. En el proceso de recubrimiento pelicular, un lodo se pulveriza sobre las semillas en un proceso de recubrimiento continuo. Alternativamente, por ejemplo, si se usa un polvo o portador de polvo, los componentes pueden ser consecutivamente aplicados. Por consiguiente, el tratamiento también puede abarcar aplicación foliar y/o aplicación de las composiciones en el surco.
- [0074] Ejemplos no limitativos de plantas para ser tratadas por las cepas aisladas y/o composiciones que comprenden al menos una de las cepas aisladas incluyen plantas de cultivo leguminosas. Ejemplos no limitativos de plantas de cultivo leguminosas incluyen, pero de forma no limitativa, plantas tales como soja, alfalfa, cacahuete, guisante, lenteja, judía, y trébol. Como será apreciado, el término "planta de cultivo" abarca cualquier material vegetal que puede ser cosechado.

Cultivo

- [0075] La presente invención se refiere a un cultivo biológicamente puro de cepa(s) de *Bradyrhizobia japonicum* la cepa con el número de acceso de depósito NRRL B-50592 (depositado también como NRRL B-59571); la cepa con el número de acceso de depósito NRRL B-50593 (depositado también como NRRL B-59572);

la cepa con el número de acceso de depósito NRRL B-50586 (depositado también como NRRL B-59565);
 la cepa con el número de acceso de depósito NRRL B-50588 (depositado también como NRRL B-59567);
 la cepa con el número de acceso de depósito NRRL B-50587 (depositado también como NRRL B-59566);
 la cepa con el número de acceso de depósito NRRL B-50589 (depositado también como NRRL B-59568);
 5 la cepa con el número de acceso de depósito NRRL B-50591 (depositado también como NRRL B-59570);
 la cepa con el número de acceso de depósito NRRL B-50590 (depositado también como NRRL B-59569);
 la cepa con el número de acceso de depósito NRRL B-50594 (depositado también como NRRL B-50493);
 la cepa con el número de acceso de depósito NRRL B-50726;
 la cepa con el número de acceso de depósito NRRL B-50727;
 10 la cepa con el número de acceso de depósito NRRL B-50728;
 la cepa con el número de acceso de depósito NRRL B-50729 y
 la cepa con el número de acceso de depósito NRRL B-50730.

[0076] Como se utiliza en este caso, la frase "cultivo biológicamente puro" significa un cultivo esencialmente libre de
 15 contaminación biológica y teniendo una uniformidad genética de manera que subcultivos diferentes tomados de los
 mismos mostrarán genotipos sustancialmente idénticos y fenotipos (por ejemplo, los cultivos tienen una pureza de al
 menos 60%, de al menos 65%, al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al
 menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos
 20 98%, al menos 99%, hasta 100% puro).

Tales cultivos pueden ser útiles en la fermentación a gran escala o para otros fines comerciales.
 Por consiguiente, variantes mutantes, transconjugantes, recombinantes, y genéticamente modificadas que son
 derivadas de cepas de *Bradyrhizobium japonicum* teniendo los números de depósito NRRL B-50592 (depositado
 también como NRRL B-59571), NRRL B-50593 (depositado también como NRRL B-59572), NRRL B-50586
 (depositado también como NRRL B-59565), NRRL B-50588 (depositado también como NRRL B-59567), NRRL B-
 25 50587 (depositado también como NRRL B-59566), NRRL B-50589 (depositado también como NRRL B-59568),
 NRRL B-50591 (depositado también como NRRL B-59570); NRRL B-50590 (depositado también como NRRL B-
 59569); NRRL B-50594 (depositado también como NRRL B-50493); NRRL B-50726; NRRL B-50727; NRRL B-
 50728; NRRL B-50729; NRRL B-50730, y cultivos de los mismos están dentro del campo de la invención.

[0077] En una forma de realización el cultivo es una cepa con el número de acceso de depósito NRRL B-50592
 (depositado también como NRRL B-59571).
 En otra forma de realización el cultivo es una cepa con el número de acceso de depósito NRRL B-50593 (depositado
 también como NRRL B-59572).
 En otra forma de realización el cultivo es una cepa con el número de acceso de depósito NRRL B-50586 (depositado
 35 también como NRRL B-59565).
 En otra forma de realización el cultivo es una cepa con el número de acceso de depósito NRRL B-50588 (depositado
 también como NRRL B-59567).
 En otra forma de realización el cultivo es una cepa con el número de acceso de depósito NRRL B-50587 (depositado
 también como NRRL B-59566).
 40 En otra forma de realización el cultivo es una cepa con el número de acceso de depósito NRRL B-50589 (depositado
 también como NRRL B-59568).
 En otra forma de realización el cultivo es una cepa con el número de acceso de depósito NRRL B-50591 (depositado
 también como NRRL B-59570).
 En otra forma de realización el cultivo es una cepa con el número de acceso de depósito NRRL B-50590 (depositado
 45 también como NRRL B-59569).
 En otra forma de realización el cultivo es una cepa con el número de acceso de depósito NRRL B-50594 (depositado
 también como NRRL B-50493).
 En otra forma de realización el cultivo es una cepa con el número de acceso de depósito NRRL B-50726.
 En otra forma de realización el cultivo es una cepa con el número de acceso de depósito NRRL B-50727.
 50 En otra forma de realización el cultivo es una cepa con el número de acceso de depósito NRRL B-50728.
 En otra forma de realización el cultivo es una cepa con el número de acceso de depósito NRRL B-50729.
 En otra forma de realización el cultivo es una cepa con el número de acceso de depósito NRRL B-50730.

Depósito de Material biológico

[0078] El material biológico siguiente ha sido depositado según las condiciones del tratado de Budapest en la
 55 Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC), 10801 University Blvd., Manassas, VA 20108, USA, y la Unidad de
 Investigación de Genómica Microbiana y Bioprocesamiento (NRRL) National Center for Agricultural Utilization
 Research 1815 N. University Street, Peoria, IL 61604, USA y se le dio el siguiente número de acceso:

Tabla 1: Depósito de Material biológico

Identificación	Número de acceso	Fecha de depósito
<i>Bradyrhizobia japonicum</i>	NRRL B-50592 NRRL B-59571	Noviembre-09-2011 Marzo-08-2011
<i>Bradyrhizobia japonicum</i>	NRRL B-50593 NRRL B-59572	Noviembre-09-2011 Marzo-08-2011

<i>Bradyrhizobia japonicum</i>	NRRL B-50586 NRRL B-59565	Noviembre-09-2011 Marzo-08-2011
<i>Bradyrhizobia japonicum</i>	NRRL B-50588 NRRL B-59567	Noviembre-09-2011 Marzo-08-2011
<i>Bradyrhizobia japonicum</i>	NRRL B-50587 NRRL B-59566	Noviembre-09-2011 Marzo-08-2011
<i>Bradyrhizobia japonicum</i>	NRRL B-50589 NRRL B-59568	Noviembre-09-2011 Marzo-08-2011
<i>Bradyrhizobia japonicum</i>	NRRL B-50591 NRRL B-59570	Noviembre-09-2011 Marzo-08-2011
<i>Bradyrhizobia japonicum</i>	NRRL B-50590 NRRL B-59569	Noviembre-09-2011 Marzo-08-2011
<i>Bradyrhizobia japonicum</i>	NRRL B-50594 NRRL B-50493	Noviembre-09-2011 Marzo-08-2011
<i>Bradyrhizobia japonicum</i>	NRRL B-50726	marzo 09-2012
<i>Bradyrhizobia japonicum</i>	NRRL B-50727	marzo 09-2012
<i>Bradyrhizobia japonicum</i>	NRRL B-50728	marzo 09-2012
<i>Bradyrhizobia japonicum</i>	NRRL B-50729	marzo 09-2012
<i>Bradyrhizobia japonicum</i>	NRRL B-50730	marzo 09-2012
*NRRL indica depósito con la Colección de Cultivos del Servicio de Investigación Agrícola, Peoria, IL.		

[0079] La cepa ha sido depositada bajo condiciones que aseguran que el acceso al cultivo estará disponible durante la pendencia de esta solicitud de patente a una determinada por el comisario de patentes y marcas que será autorizada para ello bajo 37 C.F.R. §1.14 y 35 U.S.C. §122.

5 El depósito representa un cultivo puro de la cepa depositada.

El depósito está disponible según es requerido por las leyes extranjeras de patente en países donde equivalentes de esta solicitud o su progenie son solicitados.

Sin embargo, se debe entender que la disponibilidad de un depósito no constituye una licencia para poner en práctica la presente invención en derogación de los derechos de patentes concedidas por acción del Gobierno.

10 [0080] Los ejemplos siguientes se incluyen para fines ilustrativos solo y no se destinan para limitar el ámbito de la invención.

15 **EJEMPLOS**

Materiales y Métodos

Medios

20 [0081] YEM Agar (YEMA): (10 g/L D-manitol; 0.50 g/L Extracto de levadura oxoid; 0.10 g/L de NaCl; 0.50 g/L de K₂HPO₄ 0.20 g/L de MgSO₄·7H₂O 12.0 g/L de Agar; pH=6.8).

[0082] Líquido YEM: (10 g/L D-manitol; 0.50 g/L de Extracto de levadura oxoid; 0.10 g/L de NaCl; 0.50 g/L de K₂HPO₄, 0.20 g/L de MgSO₄·7H₂O pH≈6.8).

25 Protocolo de aislamiento de ADN

[0083] Para cepas crecidas en placas, un bucle de 1 µL de cada cepa de placas fue añadido individualmente a 100 µL solución de aislamiento de ADN PrepMan® Ultra de Applied Biosystems.

30 La solución fue calentada a 100° C durante 10 minutos.

ADN aislado fue usado para análisis de PCR.

[0084] Para ADN aislado de nódulos, los nódulos fueron quitados con fórceps de las raíces de la soja y enjuagados en diH₂O.

35 Los nódulos fueron colocados individualmente en 100µL de solución de aislamiento de ADN PrepMan® Ultra de Applied Biosystems, rotos, y calentados a 100° C durante 10 minutos utilizando una placa de PCR de 96 pocillos también de Applied Biosystems.

Mondadientes desechables fueron usados para romper los nódulos abiertos para evitar contaminación cruzada.

ADN aislado fue usado para análisis PCR.

40 Protocolo de PCR

[0085] Reacciones de cadena de polimerasa (PCR) fueron realizadas usando un ciclador térmico rápido de 96 pocillos Verity® de Applied Biosystems.

45 PCRs fueron preparadas para cada cepa. 2 µL de ADN se añadió a 0.5 µL de un cebador, 0.5 µL de un cebador, 0.5

µL de Taq polimerasa (New England Biolabs, Inc.) y 21.5 µL de Platinum Blue PCR Supermix® (Invitrogen).
La mezcla de PCR fue calentada a 94° C durante 4 minutos.

Después de la desnaturalización, la PCR fue realizada durante 35 ciclos con el programa siguiente: 94° C para 1 minuto, 68° C o temperatura(s) dependiente de derretimiento de cebador para 1 minuto, y extensión de reacción a 72° C para 1 minuto.

Después de la finalización del programa de PCR, 5 µL de mezcla de PCR fueron ejecutados en un sistema Lonza® FlashGel®.

Protocolo de aislamiento de cepas

[0086] Para aislar cepas, nódulos fueron esterilizados en superficie con 10% de lejía doméstica durante 2 minutos. Nódulos fueron enjuagados en agua esterilizada y luego colocados en un tubo microcentrifugador con 250µL de agua esterilizada.

Nódulos fueron molidos con mondadientes estériles y las cepas de *Rhizobium* fueron liberadas en el agua.

Dos bucles de 10µL de agua fueron estriados para colonias individuales sobre placas YEMA.

Todas las placas fueron envueltas con Parafilm® y crecidas a 30° C en una Incubadora de Eppendorf Innova® 42R. El tiempo de crecimiento difirió por aislado.

Protocolo de selección primaria

[0087] Cepas fueron principalmente seleccionadas por dos protocolos diferentes, es decir, el "Protocolo de Suelo de Campo de Soja (Campo tratado USDA 532C)" y el "Protocolo de Campo (Control) No tratado." Cada protocolo está descrito.

Protocolo de suelo de campo de soja (campo tratado USDA 532C)

[0088] Semillas de soja recubiertas con USDA 532C fueron plantadas en varios suelos en todas las regiones de crecimiento de soja en los Estados Unidos, por ejemplo, Dakota del sur, Dakota del norte, Georgia, Iowa, Nebraska, Illinois, Indiana, Texas, Kansas, Minnesota, etc.. semillas de soja tratadas con la cepa USDA 532C de *Bradyrhizobium japonicum* fueron crecidas en estos suelos, cosechadas, y los nódulos de soja fueron analizados directamente utilizando análisis de PCR.

Cuarenta (40) nódulos fueron recogidos de cada muestra de suelo.

Nódulos de soja individuales fueron cargados en un único pocillo de una placa de microtitulación de 96 pocillos.

ADN de esos nódulos de soja individuales fue aislado directamente de nódulos basados en el procedimiento descrito supra (ver Materiales y Métodos: Protocolo de Aislamiento de ADN).

[0089] Análisis de PCR usando el cebador específico 209 de USDA 532C fue realizado directamente en la placa de 96 pocillos (ver Materiales y Métodos: Protocolo PCR).

La amplificación del cebador 209 (0.9kb banda) de los 40 nódulos fue calculada para decidir el porcentaje de amplificación.

Si la amplificación de ADN de 0.9kb fue inferior o igual al 30% (es decir, superior o igual al 70 % de la PCR fue negativo para amplificación de cebador 209), entonces la muestra de suelo contenía las cepas de *Bradyrhizobium japonicum* con competitividad superior que la cepa USDA 532C.

Nódulos de soja con menos de o igual al 30% de amplificación contenía cepas nativas identificadas como siendo más competitivas que USDA 532C basada en el procedimiento descrito (ver Materiales y Métodos: Protocolo de Aislamiento de Cepas).

[0090] Si más del 30% de nódulos de soja fueron colonizados por la cepa USDA 532C de *Bradyrhizobia japonicum*, entonces el suelo fue considerado inadecuado para el aislamiento de cepas nuevas y la muestra de suelo fue terminada.

Campo no tratado (Protocolo de Control)

[0091] Nódulos fueron obtenidos de campos de soja no tratados con USDA 532C, en los siguientes estados: Arkansas, Georgia, Illinois, Indiana, Iowa, Oklahoma, Nebraska, Kansas, Missouri, y Texas.

Cepas de *Bradyrhizobium japonicum* fueron aisladas directamente de estos nódulos por el protocolo descrito supra (ver Materiales y Métodos: Protocolo de Aislamiento de Cepas).

Cepas aisladas fueron puestas en competición directa con la cepa USDA 532C de *Bradyrhizobia japonicum* por el "Protocolo de Estudio de Competición" (ver Materiales y Métodos: Protocolo de Estudio de Competición).

Las cepas aisladas que ocupaban más del 70% de nódulos de soja cuando se compara con la cepa USDA 532C de *Bradyrhizobia japonicum*, fueron seleccionadas para la evaluación del rendimiento (ver Materiales y Métodos: Protocolo de Estudio de Rendimiento).

Protocolo de Estudio de Competición

[0092] Densidades ópticas fueron determinadas. (espectrofotómetro Nanodrop® ND1000) Se obtuvo una proporción

de inóculo 1:1 de USDA 532C para cada cepa aislada.

USDA 532C fue diluida o concentrada a una densidad óptica de 0,5 a 600 nm y 0,5 mL de inóculo de USDA 532C fue reservado para cada aislado.

5 Todas las cepas aisladas fueron bien concentradas o diluidas a una densidad óptica de 0,5 a 600 nm utilizando el cálculo siguiente: $(0,5 \text{ densidad óptica USDA 532C}) \times (0,5 \text{ mL USDA 532C}) = (\text{densidad óptica de cepa aislada}) \times (\text{cepa aislada mL})$. 0,5 mL de USDA 532C se añadió a 0,5 mL de cada aislado como tratamientos separados.

Semillas de soja fueron recubiertas con la mezcla de inóculo a razón de 0,5 mL de mezcla de inóculo por 12 semillas de soja.

10 Las semillas se dejaron embeber durante 30 minutos. 5 de las 12 semillas de soja tratadas fueron plantadas en la mezcla de Fafard® 3BPotting en un macetero de 1 galón.

Se utilizaron guantes para plantar las semillas y fueron cambiados entre tratamientos.

Después de la siembra, las 7 semillas de soja restantes tratadas fueron descartadas.

[0093] En la germinación, las macetas fueron reducidas a 3 plantas.

15 Las plantas fueron dejadas crecer durante 6-7 semanas en un invernadero y se evitó la contaminación cruzada durante el proceso de riego.

Las temperaturas oscilaron de aproximadamente 23° C - 32° C.

El riego fue realizado en una base "según necesidad".

20 Los nódulos fueron cosechados de cada tratamiento y usados para aislamiento de ADN y análisis de PCR con cebador específico 209 de USDA 532C.

Ver Materiales y Métodos: Protocolo de Aislamiento de ADN y Protocolo PCR.

Protocolo de Estudio de Rendimiento

25 [0094] El estudio de rendimiento es una comparación directa de rendimiento de cepa a cepa entre una cepa aislada única y la cepa USDA 532C de *Bradyrhizobium japonicum* disponible comercialmente.

La cepa aislada y la cepa de control (cepa USDA 532C de *Bradyrhizobium japonicum*) fueron estriadas al mismo tiempo en placas YEMA separadas.

30 La cepa aislada y la cepa de control fueron separadamente inoculadas en 5 mL de medios YEM líquido para obtener una densidad óptica inicial de 0,03 a 600 nm en cada tubo de inóculo. (espectrofotómetro Nanodrop® ND1000) La cepa aislada y la cepa de control fueron incubadas separadamente a 30° C durante 3 días.

35 Después de la incubación, el inóculo para la cepa aislada y la cepa de control fue además diluida o concentrada a una densidad óptica final de 0,5 a 600 nm en cada tubo de inóculo (espectrofotómetro Nanodrop® ND1000) para obtener un tratamiento de prueba (cepa aislada) y un tratamiento de control (cepa de control de cepa USDA 532C de *Bradyrhizobium japonicum*).

[0095] 0,75 mL del tratamiento de prueba se añadió a 32 semillas de soja.

Las semillas tratadas se dejaron embeber durante 30 minutos.

40 Después de 30 minutos, 2 semillas fueron plantadas en 15 macetas separadas (4"x43x6") en la mezcla de Fafard® 3B Potting.

Se utilizaron guantes para plantar las semillas y fueron cambiados entre tratamientos.

Después de la siembra, las 2 semillas de soja restantes tratadas fueron descartadas.

Este proceso fue repetido para el tratamiento de control.

45 [0096] En la germinación, macetas de tratamiento de prueba y de tratamiento de control fueron reducidos a una planta única.

Las plantas fueron dejadas crecer durante 8-10 semanas en un invernadero y la contaminación cruzada durante el proceso de riego fue evitada.

Las temperaturas oscilaron de aproximadamente 23° C - 32° C.

50 El riego fue realizado en una base "según necesidad".

Después de 8-10 semanas, las vainas fueron cosechadas y secadas durante toda la noche a 80° C.

Análisis con software estadístico de JMP® (SAS Institute, Inc.) fue usado para determinar un aumento del rendimiento estadísticamente significativo en comparación con la cepa USDA 532C de *Bradyrhizobium japonicum*.

Protocolo de Perfil de Temperatura

[0097] Cepas de *Bradyrhizobium japonicum* aisladas fueron estriadas sobre placas YEMA (10 g/L D-manitol; 0,50 g/L de extracto de levadura oxoid; 0,10 g/L de NaCl; 0,50 g/L de K₂HPO₄; 0,20 g/L MgSO₄·7H₂O; 12,0 g/L de Agar; pH≈6.8) e incubadas a 30° C y 35° C respectivamente durante 7 días.

60 Las cepas aisladas fueron analizadas para su capacidad para hacer crecer colonias aisladas.

Protocolo de Perfil de Resistencia al Glifosato

65 [0098] Cepas de *Bradyrhizobium japonicum* aisladas fueron estriadas sobre 1 mM de glifosato, y 2 mM de glifosato, placas YEMA (10 g/L D-manitol; 0,50 g/L de extracto de levadura oxoid; 0,10 g/L de NaCl; 0,50 g/L de K₂HPO₄; 0,20 g/L de MgSO₄·7H₂O 12,0 g/L de Agar; pH≈6.8).

Las placas fueron incubadas a 30° C durante 7 días y las cepas fueron analizadas por su capacidad para hacer crecer colonias aisladas.

Protocolo de Perfil Antibiótico

5 [0099] Cepas de *Bradyrhizobium japonicum* aisladas fueron estriadas en T sobre gentamicina (50 mg/L) YEMA, cloranfenicol (50 mg/L) YEMA, polimixina B (100 mg/L) YEMA, carbenicilina (100 mg/L) YEMA, neomicina (50 mg/L) YEMA, y ácido nalidixico (50 mg/L) YEMA.

10 Las placas fueron incubadas a 30° C durante 7 días y las cepas fueron analizadas para su capacidad para hacer crecer colonias aisladas.

Protocolo de PCR Diversilab®

15 [0100] PCR Diversilab® fue preparada utilizando el Diversilab Pseudomonas Kit® de BioMerieux. Este kit contenía cebadores propietarios diseñados para amplificar varias partes del genoma para producir una huella digital de amplificaciones de ADN múltiples. Cada cepa tiene una huella digital única y el porcentaje de similitud entre cepas se puede determinar utilizando el software Diverilab.

20 [0101] La PCR fue preparada en consecuencia. 2 µL de ADN se añadió a 18,0 µL de Re-PCR MM1, 2,0 µL de mezcla de cebador, 0,5 µL de Taq polimerasa (New England Biolabs, Inc) y 2,5 µL de tampón de Taq Polimerasa (New England Biolabs, Inc.) para un volumen total de 25µL.

La PCR fue calentada a 94°C durante 2 minutos y luego ejecutada durante 35 ciclos conforme a lo siguiente: 94° C durante 0,5 minutos, luego 50° C durante 0,5 minutos, y finalmente 70°C durante 1,5 minutos.

25 Después de la finalización de los 35 ciclos, la reacción entera fue mantenida a 70° C durante 3 minutos. Después de la finalización del análisis de PCR, el producto de PCR fue ejecutado en el Bioanalizador Agilent® 2100 Series.

Reactivos de ADN Diversilab® & Supplies Kit de BioMerieux fueron usados para cargar el producto de PCR sobre chips de Diversilab® System.

30 El equipo fue mantenido según las instrucciones. Antes del uso, el equipo se dejó a la temperatura ambiente durante 30 minutos antes de cargar el chip de Diversilab®.

El chip de Diversilab® fue cargado cumpliendo totalmente con todos protocolos e instrucciones proporcionadas. Tras la finalización de carga del chip de Diversilab®, el chip fue cargado en el Bioanalizador Agilent® 2100 Series y el análisis fue realizado hasta la finalización.

Ejemplo 1

Diseño de cebador único para cepa comercial USDA 532C de *Bradyrhizobium*

40 [0102] Un método de identificación genética fue desarrollado para evaluar la competitividad de la cepa comercial USDA 532C de *Bradyrhizobium japonicum* contra las cepas nativas en el campo. Un cebador específico para USDA 532C fue identificado y tecnología de PCR fue usada para evaluar eficazmente la competitividad de USDA 532C en el campo.

45 [0103] La secuenciación del genoma completo de USDA 532C fue realizada en Novozymes Davis. Veinticinco fragmentos de ADN diferentes fueron descubiertos por tener baja homología con secuencias públicas de *Bradyrhizobium japonicum*.

ADN fue aislado de cepas de *B. japonicum* (USDA 532C, P152; Br173; Br187; P190, y P194) crecidas en placas según el procedimiento descrito supra (ver Materiales y Métodos: Protocolo de Aislamiento de ADN).

50 El análisis adicional de las secuencias fue realizado en aquellos veinticinco fragmentos de ADN. Cebadores únicos putativos para la cepa USDA 532C fueron elegidos y usados para la selección del cebador específico para USDA 532C por PCR contra algunas cepas de *Bradyrhizobium japonicum* representativas.

55 Después de la evaluación por PCR, un cebador único individual para USDA 532C fue identificado y fue designado como p209.

[0104] La secuencia del cebador 209 fue de la siguiente manera:
 SEC ID n.º: 1 - P209p5-TTGGGTTGAGCATGCCACCCGACGG,
 SEC ID n.º: 2 - P209p3-GTCTCAGTTGCCGAGCCACGGCGC

Especificidad del cebador

60 [0105] Los veinticinco cebadores fueron evaluados individualmente para identificación positiva de USDA 532C. Los cebadores fueron además evaluados para especificidad de USDA 532C a través de PCR usando USDA 532C y 5 cepas nativas diferentes de *B. japonicum* (P152; Br173; Br187; P190, y P194) para comparación. La secuenciación del genoma indicó que Br187 y USDA 532C fueron genéticamente los mismos.

Tabla 2: Resumen de selección de cebador

Cebador	USDA 532C	P152	Br173	Br187	P190	P194	Temp PCR
787	-	-	-	-	-	-	65
1114	+	+	+	+	+	+	65
1181	+	+	+	+	+	+	64
943	+	+	+	+	+	+	60
1073	+	+	+	+	+	+	65
125	+	-	-	+	-	-	68
209*	+	-	-	+	-	-	68
487	+	-	-	+	-	-	68
567	+	-	-	+	-	-	58
744	+	-	-	+	-	-	65
811	+	-	-	+	-	-	65
989	+	-	-	+	-	-	69
1073	+	-	-	+	-	-	69
989 a	+	-	-	+	-	-	64
893	+	-	-	+	-	-	64
2254	+	-	-	+	+	+	68
607	+	-	-	+	+	+	68
389	+	-	-	+	+	+	60
728	+	-	-	+	+	+	65
869	+	-	-	+	+	+	62
1424	+	-	+	+	+	+	65
1181	+	+	+	+	+	+	60
989 b	+	-	+	+	+	+	65
895	+	-	+	+	+	+	65
943	+	-	-	+	+	-	64

*cebador 209 mostró las bandas más claras y fue elegido para otra evaluación.

5 [0106] Tabla 2 resume las conclusiones ("+" indica una identificación positiva de una banda de amplificación de PCR en el gel, "-" indica ninguna amplificación de ADN).

[0107] En referencia a FIG. 1A, se demostró que el cebador aislado 209 es específico para USDA 532C y Br187. Una prueba genética adicional, mostró que la cepa USDA 532C y P187 de *Bradyrhizobium japonicum* son idénticas (resultados no mostrados).

10 El contenido del pocillo (izquierda a derecha) indica las siguientes cepas nativas USDA 532C, P152, Br173, Br187, Br190, Br194, y la escala de control.
Ver FIG. 1A.

15 [0108] La especificidad de cebador 209 fue evaluada contra las cepas nativas P152, Br173, Br187, Br190, Br194, y USDA 532C.
Ver FIG. 1B.

PCR con cebador 209 fue realizada para 100 cepas obtenidas de terrenos no tratados en los ensayos de campo según el método anterior (ver Materiales y Métodos: Protocolo de Campo (de Control) no tratado).

Cepa USDA 532C de *Bradyrhizobium japonicum* no fue añadida a estos terrenos.

20 De las cepas evaluadas, solo el 3% de las cepas nativas pudieron ser amplificadas para una banda específica de 0.9kb para el cebador 209.

Este resultado demostró que el cebador 209 podía usarse para la detección específica de USDA 532C.

Ejemplo 2

25 Análisis y aislamiento de cepas nuevas

[0109] El cebador 209 fue usado como un marcador para indicar la presencia o ausencia de colonización por la cepa de *Bradyrhizobia japonicum* USDA 532C en los nódulos de la raíz de plantas de soja.

30 Las bandas (es decir, una banda de 0.9kb) que indican la presencia de cebador 209 representan una identificación positiva de la cepa USDA 532C de *Bradyrhizobia japonicum*.

Ver FIG. 2A.

La FIG. 2A es ilustrativa de un caso donde la cepa USDA 532C de *Bradyrhizobia japonicum* es la cepa predominantemente competitiva para colonización de nódulos de planta de soja cuando se compara con otras cepas rizobianas nativas.

35 En la FIG. 2B, el número de bandas que indica la identificación positiva para el cebador 209, y por lo tanto la

presencia de la cepa USDA 532C de *Bradyrhizobia japonicum*, se reduce en comparación con el número total de bandas presentes para el cebador 209 en la FIG. 2A.

Las FIG. 2A y FIG. 2B demuestran que la presencia o ausencia de cebador 209 puede utilizarse para decidir si USDA 532C es la cepa predominantemente competitiva en los nódulos de una planta de soja.

[0110] Cepas de *Bradyrhizobium japonicum* aisladas fueron seleccionadas de nódulos según ambos protocolos de selección (ver Materiales y Métodos: Protocolo de Selección Primaria).

Las cepas seleccionadas fueron aisladas de los nódulos según el procedimiento de aislamiento (ver Materiales y Métodos: Protocolo de Aislamiento de Cepas).

Ejemplo 3

Evaluación de competición directa

[0111] Todas las cepas aisladas fueron puestas en un programa de selección diseñado para directamente desafiar la competitividad del aislado contra la cepa USDA 532C de *Bradyrhizobium japonicum* en cuanto a la capacidad de colonización del nódulo (ver Materiales y Métodos: Protocolo de Estudio de Competición).

[0112] Cebador aislado 209 específico para USDA 532C fue usado como una etiqueta para indicar la presencia o ausencia de colonización por la cepa USDA 532C de *Bradyrhizobium japonicum* en los nódulos de la raíz de plantas de soja.

La identificación positiva para el cebador 209 ha indicado la colonización de la cepa USDA 532C de *Bradyrhizobia japonicum* en los nódulos de la raíz de plantas de soja.

Por el contrario, la ausencia de bandas que indican la identificación positiva para el cebador 209 indicó la colonización de una cepa nativa en los nódulos de la raíz de plantas de soja además de la cepa USDA 532C de *Bradyrhizobia japonicum*.

Las cepas aisladas que mostraron una colonización mayor del 70% de los nódulos analizados fueron elegidas para una segunda evaluación para confirmación.

Las cepas fueron sometidas a por lo menos dos ciclos de evaluación de competición.

A través de este procedimiento, unos 1000 aislados han sido seleccionados por su competitividad mejorada.

Ejemplo 4

Evaluación de rendimiento

[0113] El estudio de rendimiento es una comparación directa de cepa a cepa de cepas aisladas para USDA 532C. El rendimiento mejorado fue medido como función del peso en seco de la vaina (g).

Ver Materiales y Métodos: Protocolo de Estudio de Rendimiento.

Los resultados se proporcionan en las Tablas 3A - 3D

Tabla 3A: rendimiento mejorado como función de peso en seco de la vaina (g)

Cepa	Porcentaje de colonización	Peso en seco de la vaina (g)
NRRL B-59571	85	5.92
NRRL B-59567	80	6.12
NRRL B-59572	85	6.05
NRRL B-59565	80	5.87
USDA532-C	-	5.72

El porcentaje de colonización fue confirmado por estudios triplicados y el peso en seco de la vaina aumentado fue confirmado por estudios duplicados para todas las cepas.

Tabla 3B: Rendimiento mejorado como función de peso en seco de la vaina (g)

Cepa	Porcentaje de colonización	Peso en seco de la vaina (g)
NRRL B-50493	75	4.86
NRRL B-59570	80	5.30
USDA532-C	-	5.45

El porcentaje de colonización fue confirmado por estudios triplicados y el peso en seco de la cápsula aumentado fue confirmado por estudios duplicados para todas las cepas.

Tabla 3C: rendimiento mejorado como función de peso en seco de la vaina (g)

Cepa	Porcentaje de colonización	Peso en seco de la vaina (g)
NRRL B-59566	85	5.30
NRRL B-59569	85	5.50
NRRL B-59568	95	5.69
USDA532-C	-	4.69

El porcentaje de colonización fue confirmado por estudios triplicados y peso en seco de la vaina aumentado fue

confirmado por estudios duplicados para todas las cepas.

Tabla 3D: Rendimiento mejorado como función de peso en seco de la vaina (g)

Cepa	Porcentaje de colonización	Peso en seco de la vaina (g)
NRRL B-50726	95	5.79
NRRL B-50727	85	5.02
NRRL B-50728	83	5.78
NRRL B-50729	83	5.94
NRRL B-50730*	90	5,94
USDA532-C	-	5.45

El porcentaje de colonización y peso en seco de cápsula aumentado fueron confirmados por estudios duplicados para todas las cepas excepto NRRL B-50730* que tiene solo una ronda de pruebas.

- 5 [0114] Cepa USDA 532C disponible comercialmente fue usada como un control para cada evaluación. Los resultados de las tablas 3A-3D indican que todas menos una de las cepas aisladas tuvieron rendimiento mejorado cuando se compara con el control, USDA 532C.

Ejemplo 5

10 Estudio de caracterización

[0115] Cepas de *Bradyrhizobium japonicum* aisladas fueron además caracterizadas con base en la temperatura, resistencia al glifosato, y perfiles antibióticos (ver Materiales y Métodos: 5 Perfil de Temperatura, Perfil de Resistencia al Glifosato, y Protocolos de Perfil Antibiótico).

- 15 Los resultados se proporcionan en la tabla 4.

Tabla 4: Caracterización de cepas aisladas como función de perfil de temperatura, resistencia al glifosato, y resistencia antibiótica

Tratamiento	NRRL B-59565	NRRL B-59572	NRRL B-59567	NRRL B-59566	NRRL B-59570	NRRL B-59568	NRRL B-59569	NRRL B-50493	NRRL B-59571	USDA 532C
30°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
35°C	+	-	-	+	+	+	-	+	-	-
1.0 mM glifosato	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-
2.0 mM glifosato	-	-	-	-	-	+-	-	+	-	-
Gentamicina	+	-	-	-	+	-	+	+-	-	+
Cloranfenicol	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+
Polimixina B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Carbencilina	+	-	-	-	-	-	+	-	+-	+
Neomicina	+	-	+	+-	-	+	+	-	+	+
Ácido nalidíxico	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-

Tabla 4 resume los resultados ("+" indica crecimiento con colonias aisladas, "-" indica ningún crecimiento, y "+-" indica un poco de crecimiento de colonias aisladas/crecimiento mínimo y esporádico). Resultados indican que cepas NRRL B-59570, NRRL B-59568, NRRL B-59565, NRRL B-59566 y NRRL B-50493 son tolerantes a temperaturas de sustancialmente 35 °C. Resultados además indican que cepas aisladas NRRL B-59569, NRRL B-59568, NRRL B-59565, y NRRL B-50493 son naturalmente resistentes al glifosato. Se descubrió que las cepas NRRL B-59566 y NRRL B-59569 tenían resistencia al ácido nalidíxico.

Ejemplo 5Desarrollo de huella digital de ADN

5

[0116] Los aislados de mayor rendimiento fueron sometidos a análisis de huella digital de ADN de Diversilab® (ver Materiales y Métodos: Protocolo de PCR de Diversilab®).

ADN fue aislado de cada cepa según los métodos discutidos (ver Materiales y Métodos: Protocolo de Aislamiento de ADN).

10 ADN aislado fue usado para análisis de PCR.

[0117] Resultados al análisis de huella digital de ADN de Diversilab se indican en las figuras 3A - 3B. Los resultados demuestran que las cepas aisladas son únicas cepas y cepas diferentes que USDA 532C.

15 [0118] La presente invención es descrita, al menos en parte, por los siguientes párrafos numerados:

1. Cultivo biológicamente puro de *Bradyrhizobia japonicum* seleccionado del grupo consistente en:

la cepa con el número de acceso de depósito NRRL B-50592;

la cepa con el número de acceso de depósito NRRL B-50593;

20 la cepa con el número de acceso de depósito NRRL B-50586;

la cepa con el número de acceso de depósito NRRL B-50588;

la cepa con el número de acceso de depósito NRRL B-50587;

la cepa con el número de acceso de depósito NRRL B-50589;

25 la cepa con el número de acceso de depósito NRRL B-50591;

la cepa con el número de acceso de depósito NRRL B-50590;

la cepa con el número de acceso de depósito NRRL B-50594;

la cepa con el número de acceso de depósito NRRL B-50726;

la cepa con el número de acceso de depósito NRRL B-50727;

la cepa con el número de acceso de depósito NRRL B-50728;

30 la cepa con el número de acceso de depósito NRRL B-50729 y

la cepa con el número de acceso de depósito NRRL B-50730.

2. Cepas de *Bradyrhizobium* de párrafo 1, donde dichas cepas son capaces de promover la fijación de nitrógeno en una planta.

35

3. Cepas de *Bradyrhizobium* de cualquiera de los párrafos 1-2, donde dichas cepas son tolerantes al crecimiento a una temperatura de sustancialmente 35 °C.

4. Cepas de *Bradyrhizobium* de cualquiera de los párrafos 1-3, donde dichas cepas son seleccionadas del grupo consistente en:

40

la cepa con el número de acceso de depósito NRRL B-50591;

la cepa con el número de acceso de depósito NRRL B-50589;

la cepa con el número de acceso de depósito NRRL B-50586;

la cepa con el número de acceso de depósito NRRL 50594; y una combinación de al menos dos o más de las cepas.

45

5. Cepas de *Bradyrhizobium* de cualquiera de los párrafos 1-4, donde dichas cepas de *Bradyrhizobium* son naturalmente resistentes al glifosato.

6. Cepas de *Bradyrhizobium* según el párrafo 5, donde dichas cepas son seleccionadas del grupo consistente en:

50

la cepa con el número de acceso de depósito NRRL B-50590;

la cepa con el número de acceso de depósito NRRL B-50594 y una combinación de al menos dos o más de las cepas.

7. Cepas de *Bradyrhizobium* de cualquiera de los párrafos 1-6, donde dichas cepas tienen competitividad mejorada para colonizar una planta.

55

8. Cepas de *Bradyrhizobium* de cualquiera de los párrafos 1-7, donde dichas cepas tienen eficacia mejorada en la promoción del crecimiento de la planta.

9. Cepas de *Bradyrhizobium* de cualquiera de los párrafos 1-8, donde competitividad mejorada incluye una ocupación de nódulo de al menos 51% , por ejemplo, al menos 55%, al menos 60%, al menos 65%, al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%,

60

al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99%, o una ocupación de nódulo del 100%.

- 5 10. Cepas de *Bradyrhizobium* de cualquiera de los párrafos 1-9, donde la eficacia mejorada en la promoción del crecimiento de la planta incluye al menos uno de rendimiento aumentado de la planta medido en cuanto a fanegas/acre, número aumentado de frutos, número aumentado de raíces, longitud aumentada de raíz, masa aumentada de raíz, volumen aumentado de raíz, área aumentada de hoja, porte aumentado de la planta, vigor aumentado de la planta, y/o capacidad de fijación nitrógeno (N₂) aumentada cuando se compara con una cepa disponible comercialmente, por ejemplo, USDA 532C.
- 10 11. Cepas de *Bradyrhizobium* de cualquiera de los párrafos 1-10, donde la eficacia mejorada en la promoción del crecimiento de la soja incluye un aumento en el peso en seco total de las vainas de soja en dicha planta de soja cuando dicho peso en seco total de vainas de soja se compara con el peso en seco total de vainas de soja en una planta de soja sometida a una cepa disponible comercialmente, por ejemplo, la cepa comercial USDA 532C.
- 15 12. Composición que comprende una cepa de *Bradyrhizobia japonicum* seleccionada del grupo consistente en:
 la cepa con el número de acceso de depósito NRRL B-50592;
 la cepa con el número de acceso de depósito NRRL B-50593;
 la cepa con el número de acceso de depósito NRRL B-50586;
 la cepa con el número de acceso de depósito NRRL B-50588;
 20 la cepa con el número de acceso de depósito NRRL B-50587;
 la cepa con el número de acceso de depósito NRRL B-50589;
 la cepa con el número de acceso de depósito NRRL B-50591;
 la cepa con el número de acceso de depósito NRRL B-50590;
 la cepa con el número de acceso de depósito NRRL B-50594;
 25 la cepa con el número de acceso de depósito NRRL B-50726;
 la cepa con el número de acceso de depósito NRRL B-50727;
 la cepa con el número de acceso de depósito NRRL B-50728;
 la cepa con el número de acceso de depósito NRRL B-50729;
 la cepa con el número de acceso de depósito NRRL B-50730 y una combinación de al menos dos o más de las cepas y
 30 un portador agrónomicamente adecuado.
13. Composición según el párrafo 12, donde dicha composición incluye una o varias moléculas señal.
- 35 14. Composición según el párrafo 13, donde la molécula señal de la planta es un lipoquitooligosacárido (LCO).
15. Composición de cualquiera de los párrafos 13-14, donde el LCO es sintético.
16. Composición de cualquiera de los párrafos 13-15, donde el LCO es recombinante.
- 40 17. Composición de cualquiera de los párrafos 13-16, donde el LCO es de origen natural.
18. Composición de cualquiera de los párrafos 13-17, donde el LCO se obtiene de una especie de *Rhizobia* seleccionadas de *Rhizobium*, *spp. Bradyrhizobium spp.*, *Sinorhizobium spp.* y *Azorhizobium spp.*
- 45 19. Composición de cualquiera de los párrafos 13-18, donde el LCO se obtiene de *Bradyrhizobium japonicum*.
20. Composición de cualquiera de los párrafos 13-19, donde el LCO se obtiene de un hongo micorrizal arbuscular.
21. Composición según el párrafo 13, donde la molécula señal de la planta es un compuesto quitinoso.
- 50 22. Composición según el párrafo 22, donde el compuesto quitinoso es un quitito-oligómero (CO).
23. Composición de cualquiera de los párrafos 21-22, donde el CO es sintético.
- 55 24. Composición de cualquiera de los párrafos 21-23, donde el CO es recombinante.
25. Composición de cualquiera de los párrafos 21-24, donde el CO es de origen natural.
26. Composición según el párrafo 13, donde la molécula señal de la planta es un flavonoide.
- 60 27. Composición según el párrafo 13, donde la molécula señal de la planta es ácido jasmónico o un derivado.

28. Composición según el párrafo 13, donde la molécula señal de la planta es ácido linoleico o un derivado.
29. Composición según el párrafo 13, donde la molécula señal de la planta es ácido linolénico o un derivado.
- 5 30. Composición según el párrafo 13, donde la molécula señal de la planta es una karriquina.
31. Composición de cualquiera de los párrafos 12-30, donde la composición incluye al menos dos moléculas señal de la planta diferentes.
- 10 32. Composición de cualquiera de los párrafos 12-31, donde la composición incluye al menos un agente agrónomicamente beneficioso.
33. Composición según el párrafo 32, donde el agente agrónomicamente beneficioso es un herbicida, insecticida o un fungicida.
- 15 34. Composición según el párrafo 33, donde el agente agrónomicamente beneficioso es al menos un microorganismo de solubilización de fosfato.
35. Composición según el párrafo 34, donde al menos un microorganismo de solubilización de fosfato comprende una cepa del hongo *Penicillium*.
- 20 36. Composición según el párrafo 35, donde al menos un microorganismo de solubilización de fosfato comprende una cepa de *P. bilaiae*.
- 25 37. Composición según el párrafo 36, donde la cepa de *P. bilaiae* es seleccionada del grupo consistente en NRRL 50162, NRRL 50169, ATCC 20851, ATCC 22348, y ATCC 18309.
38. Composición según el párrafo 34, donde al menos un microorganismo de solubilización de fosfato comprende una cepa de *P. gaestrivorus*.
- 30 39. Composición según el párrafo 38, donde la cepa de *P. gaestrivorus* es NRRL 50170.
40. Método para aislar cepa(s) bacteriana(s) seleccionada(s) del género consistente en *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* teniendo competitividad mejorada para colonizar una planta leguminosa y eficacia mejorada para promover el crecimiento de la planta leguminosa que comprende:
- 35 a. obtener una(s) cepa(s) bacteriana(s) de una muestra de suelo;
- b. someter dicha(s) cepa(s) bacteriana(s) y una(s) cepa(s) disponible(s) comercialmente, por ejemplo la cepa comercial USDA 532C, a una planta leguminosa;
- 40 c. seleccionar dicha(s) cepa(s) bacteriana(s) que es(son) más competitiva(s) que la cepa disponible comercialmente para ocupar los nódulos de una planta leguminosa;
- f. analizar la(s) cepa(s) bacteriana(s) seleccionada(s) que es(son) más competitiva(s) que la cepa disponible comercialmente para la ocupación de los nódulos de una planta leguminosa para aquella(s) cepa(s) bacteriana(s) que tiene(n) una eficacia mejorada para promover el crecimiento de la planta leguminosa; y
- 45 d. aislar dicha(s) cepa(s) bacteriana(s) que tiene(n) eficacia mejorada para promover el crecimiento de la planta leguminosa.
41. Cepa bacteriana aislada según el párrafo 40, donde dicha cepa bacteriana es una cepa de *Bradyrhizobium spp.*
- 50 42. Cepa de *Bradyrhizobium* aislada según el párrafo 41, donde dicha cepa de *Bradyrhizobium spp.* es una cepa de *Bradyrhizobium japonicum*.
43. Cepa de *Bradyrhizobium* aislada de cualquiera de los párrafos 41-42, donde dicha cepa es una cepa de *Bradyrhizobia japonicum* seleccionada del grupo consistente en:
- 55 la cepa con el número de acceso de depósito NRRL B-50592;
- la cepa con el número de acceso de depósito NRRL B-50593;
- la cepa con el número de acceso de depósito NRRL B-50586;
- la cepa con el número de acceso de depósito NRRL B-50588;
- la cepa con el número de acceso de depósito NRRL B-50587;
- 60 la cepa con el número de acceso de depósito NRRL B-50589;
- la cepa con el número de acceso de depósito NRRL B-50591;

- la cepa con el número de acceso de depósito NRRL B-50590;
 la cepa con el número de acceso de depósito NRRL B-50594;
 la cepa con el número de acceso de depósito NRRL B-50726;
 la cepa con el número de acceso de depósito NRRL B-50727;
 5 la cepa con el número de acceso de depósito NRRL B-50728;
 la cepa con el número de acceso de depósito NRRL B-50729;
 la cepa con el número de acceso de depósito NRRL B-50730 y una combinación de al menos dos o más de las cepas.
44. Método según cualquiera de los párrafos 40-43, donde la cepa de *Bradyrhizobia japonicum* aislada es capaz de fijar
 10 el nitrógeno en una planta.
45. Método según cualquiera de los párrafos 40-44, donde la cepa de *Bradyrhizobia japonicum* aislada es tolerante a una
 temperatura de crecimiento de sustancialmente 35 °C.
- 15 46. Método según el párrafo 45, donde la cepa de *Bradyrhizobia japonicum* aislada es seleccionada del grupo
 consistente en:
 la cepa con el número de acceso de depósito NRRL B-50591;
 la cepa con el número de acceso de depósito NRRL B-50589;
 la cepa con el número de acceso de depósito NRRL B-50586;
 20 la cepa con el número de acceso de depósito NRRL 50594; y una combinación de al menos dos o más de las cepas.
47. Método según cualquiera de los párrafos 40-46, donde la cepa de *Bradyrhizobia japonicum* tiene una resistencia
 natural al glifosato.
- 25 48. Método según el párrafo 47, donde la cepa de *Bradyrhizobia japonicum* aislada es seleccionada del grupo
 consistente en:
 la cepa con el número de acceso de depósito NRRL B-50590;
 la cepa con el número de acceso de depósito NRRL B-50594 y una combinación de al menos dos o más de las cepas.
- 30 49. Método para aumentar el crecimiento de la planta, que comprende tratar una semilla, plántula, raíz, planta, suelo, o
 combinaciones de los mismos con una composición según cualquiera de los párrafos 1-39.
50. Método según el párrafo 49, donde la semilla, plántula, raíz, o planta es leguminosa.
- 35 51. Método según el párrafo 50, donde la semilla, plántula, raíz, o planta es una semilla de soja, plántula, raíz, o planta.
52. Método según cualquiera de los párrafos 49-51, donde dicha composición se añade al suelo en una cantidad de 1×10^8 a 1×10^{13}
 40 unidades formadoras de colonias por hectárea, preferiblemente, 2×10^{11} a 6×10^{11} unidades formadoras
 de colonias por hectárea.
53. Método según cualquiera de los párrafos 49-52, donde dicha composición es introducida como un recubrimiento de
 semilla comprendiendo 1×10^2 a 1×10^8 , preferiblemente 1×10^4 a 1×10^5 unidades formadoras de colonias por semilla.
- [0119] La invención aquí descrita y reivindicada no está limitada en su alcance por las formas de realización específicas
 45 aquí descritas, ya que estas formas de realización se prevén como ilustraciones de diferentes aspectos de la invención.
 Cualquier forma de realización equivalente se destina a estar dentro del campo de esta invención.
 De hecho, varias modificaciones de la invención además de aquellas mostradas y descritas aquí se volverán aparentes
 para los expertos en la técnica de la descripción precedente.
 Tales modificaciones están también destinadas a caer dentro del campo de las reivindicaciones anexas.
 50 En caso de conflicto, la presente divulgación incluidas las definiciones predominarán.

LISTADO DE SECUENCIAS

- [0120]
 55 <110> Kang, Yaowei
 Semones, Shawn
 Smith, Jessica
 Woods, Kristi
 <120> Cepas bacterianas competitivas y eficaces
 60 <130> 12091-WO-PCT
 <160> 2

<170> Versión de PatentIn 3.5
<210> 1
<211> 27
<212> ADN
5 <213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Cebador 209p5
<400> 1
Ttgggttgag catgccacc cggacgg 27
10 <210> 2
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
15 <223> Cebador 209p3
<400> 2
Gtctcagttg ccgagccac ggcgc 25

REIVINDICACIONES

1. Cultivo biológicamente puro de *Bradyrhizobia japonicum* seleccionado del grupo consistente en:
 5 la cepa con el número de acceso de depósito NRRL B-50592;
 la cepa con el número de acceso de depósito NRRL B-50593;
 la cepa con el número de acceso de depósito NRRL B-50586;
 la cepa con el número de acceso de depósito NRRL B-50588;
 la cepa con el número de acceso de depósito NRRL B-50587;
 10 la cepa con el número de acceso de depósito NRRL B-50589;
 la cepa con el número de acceso de depósito NRRL B-50591;
 la cepa con el número de acceso de depósito NRRL B-50590;
 la cepa con el número de acceso de depósito NRRL B-50594;
 la cepa con el número de acceso de depósito NRRL B-50726;
 la cepa con el número de acceso de depósito NRRL B-50727;
 15 la cepa con el número de acceso de depósito NRRL B-50728;
 la cepa con el número de acceso de depósito NRRL B-50729 y
 la cepa con el número de acceso de depósito NRRL B-50730.
2. Cepas de *Bradyrhizobium* según la reivindicación 1, donde dichas cepas son capaces de promover la fijación del nitrógeno en una planta.
 20
3. Cepas de *Bradyrhizobium* según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, donde dichas cepas son tolerantes al crecimiento a una temperatura de sustancialmente 35 °C.
4. Cepas de *Bradyrhizobium* según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde dichas cepas son seleccionadas del grupo que consiste en:
 25 la cepa con el número de acceso de depósito NRRL B-50591;
 la cepa con el número de acceso de depósito NRRL B-50589;
 la cepa con el número de acceso de depósito NRRL B-50586;
 30 la cepa con el número de acceso de depósito NRRL 50594; y una combinación de al menos dos o más de las cepas.
5. Cepas de *Bradyrhizobium* según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, donde dichas cepas de *Bradyrhizobium* son naturalmente resistentes al glifosato.
6. Cepas de *Bradyrhizobium* según la reivindicación 5, donde dichas cepas son seleccionadas del grupo que consiste en:
 35 la cepa con el número de acceso de depósito NRRL B-50590;
 la cepa con el número de acceso de depósito NRRL B-50594 y una combinación de al menos dos o más de las cepas.
7. Cepas de *Bradyrhizobium* según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, donde dichas cepas tienen competitividad mejorada para la colonización de una planta.
 40
8. Cepas de *Bradyrhizobium* según cualquiera de las reivindicaciones 1-7, donde dichas cepas tienen eficacia mejorada en la promoción del crecimiento de la planta.
9. Cepas de *Bradyrhizobium* según cualquiera de las reivindicaciones 1-8, donde la competitividad mejorada incluye una ocupación del nódulo al menos del 51%, por ejemplo, al menos del 55%, al menos del 60%, al menos del 65%, al menos del 70%, al menos del 75%, al menos del 80%, al menos del 85%, al menos del 85%, al menos del 90%, al menos del 91%, al menos del 92%, al menos del 93%, al menos del 94%, al menos del 95%, al menos del 96%, al menos del 97%, al menos del 98%, al menos del 99%, o una ocupación del nódulo del 100%.
 45
10. Cepas de *Bradyrhizobium* según cualquiera de las reivindicaciones 1-9, donde la eficacia mejorada en la promoción del crecimiento de la planta incluye al menos uno de rendimiento de planta aumentado medido en cuanto a fanegas/acre, número aumentado de frutos, número aumentado de raíces, longitud aumentada de raíz, masa aumentada de raíz, volumen aumentado de raíz, área aumentada de la hoja, porte aumentado de la planta, vigor aumentado de la planta, y/o capacidad de fijación de nitrógeno (N₂) aumentada cuando se compara con una cepa disponible comercialmente, por ejemplo, USDA 532C.
 50
 55
11. Cepas de *Bradyrhizobium* según cualquiera de las reivindicaciones 1-10, donde la eficacia mejorada en la promoción del crecimiento de la soja incluye un aumento en el peso en seco total de vainas de soja en dicha planta de soja cuando dicho peso en seco total de vainas de soja se compara con el peso en seco total de vainas de soja en una planta de soja sometida a una cepa disponible comercialmente, por ejemplo, cepa comercial USDA 532C.
 60

12. Composición que comprende una cepa de *Bradirhizobia japonicum* seleccionada del grupo consistente en:
 la cepa con el número de acceso de depósito NRRL B-50592;
 la cepa con el número de acceso de depósito NRRL B-50593;
 5 la cepa con el número de acceso de depósito NRRL B-50586;
 la cepa con el número de acceso de depósito NRRL B-50588;
 la cepa con el número de acceso de depósito NRRL B-50587;
 la cepa con el número de acceso de depósito NRRL B-50589;
 10 la cepa con el número de acceso de depósito NRRL B-50591;
 la cepa con el número de acceso de depósito NRRL B-50590;
 la cepa con el número de acceso de depósito NRRL B-50594;
 la cepa con el número de acceso de depósito NRRL B-50726;
 la cepa con el número de acceso de depósito NRRL B-50727;
 15 la cepa con el número de acceso de depósito NRRL B-50728;
 la cepa con el número de acceso de depósito NRRL B-50729;
 la cepa con el número de acceso de depósito NRRL B-50730 y una combinación de al menos dos o más de las cepas y un portador agronómicamente adecuado.
13. Composición según la reivindicación 12, donde dicha composición incluye una o varias moléculas señal.
- 20 14. Composición según la reivindicación 13, donde la molécula señal de la planta es un lipoquitooligosacárido, un compuesto quitinoso, un flavonoide, o una karrikina.
- 25 15. Composición según la reivindicación 13, donde la molécula señal de la planta es ácido jasmónico, ácido linoleico, ácido lionlénico o un derivado.
16. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 12-15, donde la composición incluye al menos un agente agronómicamente beneficioso.
- 30 17. Composición según la reivindicación 16, donde el agente agronómicamente beneficioso es al menos un microorganismo de solubilización de fosfato.
18. Método para aumentar el crecimiento de la planta, que comprende tratar una semilla, plántula, raíz, planta, suelo, o combinaciones de los mismos con una composición según cualquiera de las reivindicaciones 1-17.
- 35 19. Método según la reivindicación 18, donde la semilla, plántula, raíz, o planta es leguminosa.
20. Método según la reivindicación 19, donde la semilla, plántula, raíz, o planta es una semilla de soja, plántula, raíz, o planta.
- 40 21. Método según cualquiera de las reivindicaciones 18-20, donde dicha composición se añade al suelo en una cantidad de 1×10^8 a 1×10^{13} unidades formadoras de colonias por hectárea, preferiblemente, 2×10^{11} a 6×10^{11} unidades formadoras de colonias por hectárea.
- 45 22. Método según cualquiera de las reivindicaciones 18-21, donde dicha composición es introducida como un recubrimiento de semilla comprendiendo 1×10^2 a 1×10^8 , preferiblemente 1×10^4 a 1×10^5 unidades formadoras de colonias por semilla.



Figura 1A

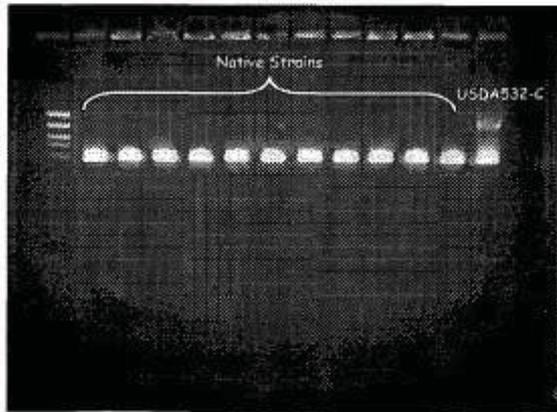


Figura 1B

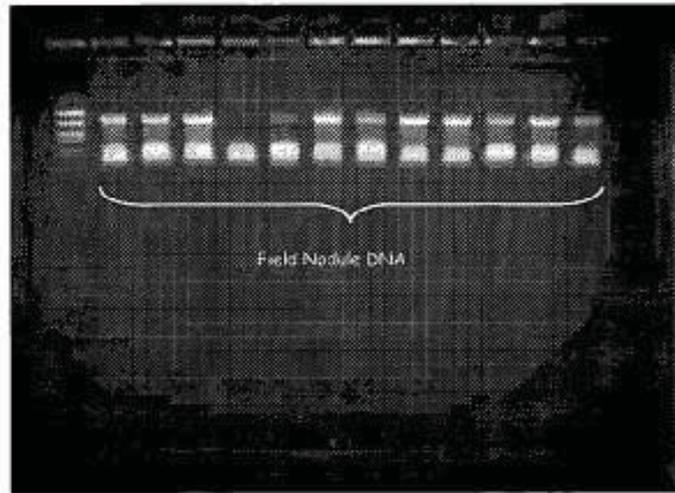


Figura 2A

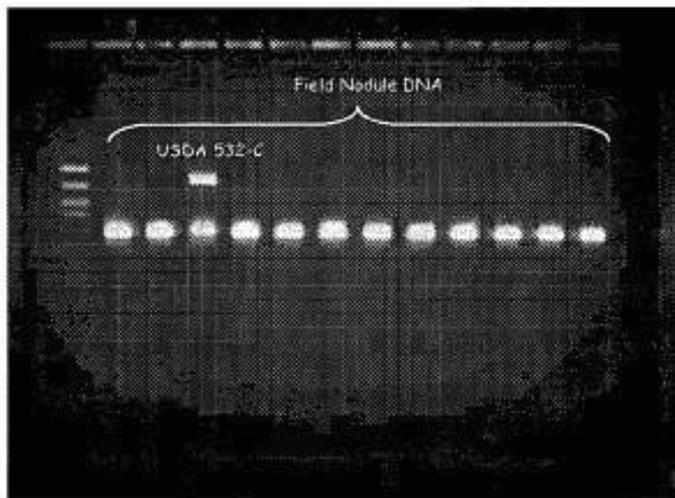


Figura 2B

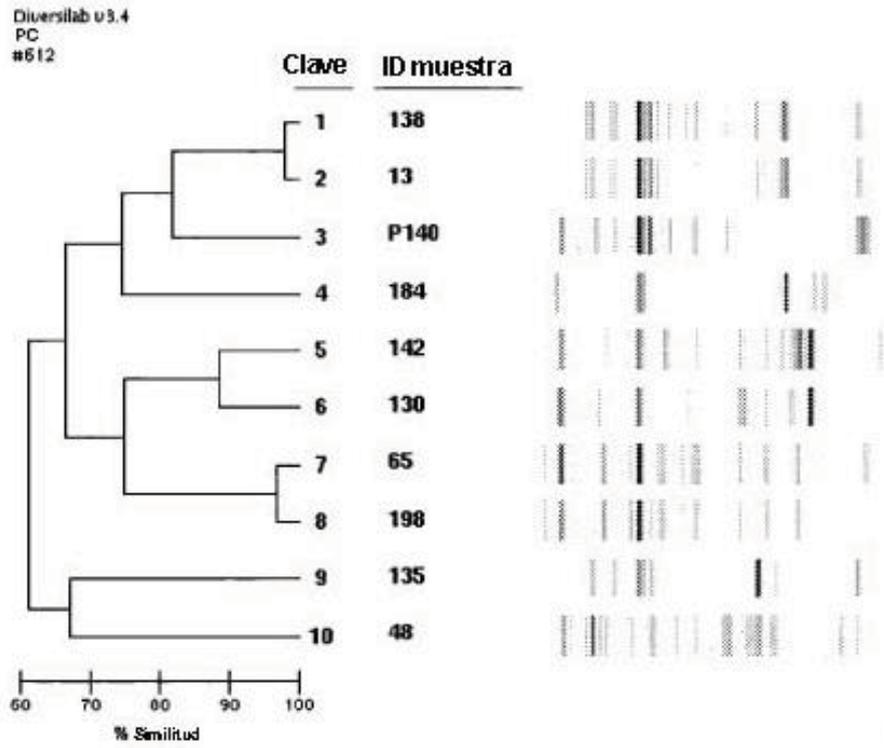


Figura 3A

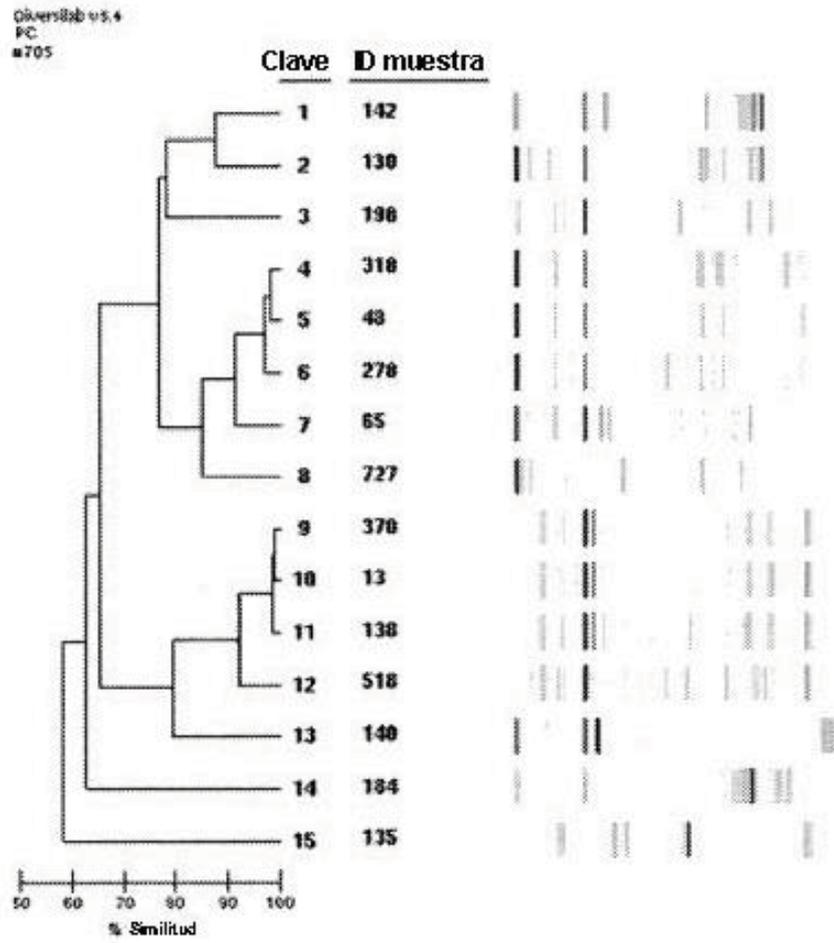


Figura 3B