

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 632 152**

51 Int. Cl.:

**C12R 1/01** (2006.01)

**A01H 3/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.12.2012 PCT/US2012/070036**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.06.2013 WO13090884**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.12.2012 E 12805902 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.04.2017 EP 2791366**

54 Título: **Cepas de Bradyrhizobium**

30 Prioridad:

**16.12.2011 US 201161576470 P**

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

**11.09.2017**

73 Titular/es:

**NOVOZYMES BIOAG A/S (50.0%)**

**Krogshoejvej 36**

**2880 Bagsvaerd, DK y**

**NOVOZYMES BIOLOGICALS, INC. (50.0%)**

72 Inventor/es:

**KANG, YAOWEI;**

**TRAN, ANH y**

**SEMONES, SHAWN**

74 Agente/Representante:

**TOMAS GIL, Tesifonte Enrique**

ES 2 632 152 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 de *Bradyrhizobium*

5 Referencia a un depósito de material biológico

[0001] Esta solicitud contiene una referencia a un depósito de material biológico, estando el depósito incorporado aquí por referencia. Para la información completa véase la tabla 1.

10 Campo de la invención  
la

[0002] La presente invención se refiere a la bacteria aislada *Bradyrhizobium* con características mejoradas, incluyendo pero no limitado a resistencia mejorada a la desecación.

15 Antecedentes de la invención

[0003] Para mantener un crecimiento saludable, las plantas deben extraer una variedad de elementos de la tierra donde crecen. Estos elementos incluyen nitrógeno y los denominados micronutrientes (por ejemplo, cobre, hierro y zinc), pero muchas tierras carecen de tales elementos o solo los contienen en formas que no se pueden absorber fácilmente por las plantas (se considera generalmente que los elementos esenciales no se pueden absorber fácilmente por las plantas a menos que estos estén presentes de forma disuelta en el suelo). El nitrógeno es un elemento esencial para la mayoría de las plantas, puesto que desempeña un papel en la síntesis de aminoácidos, proteínas, nucleótidos, ácidos nucleicos, clorofila, coenzimas y en el crecimiento y salud en general de la planta. Para contrarrestar estas deficiencias, se aplican normalmente a los suelos fuentes de los elementos insuficientes, para mejorar los índices de crecimiento y rendimiento de plantas de cultivo. Por ejemplo, frecuentemente se añaden nitrato y/o amonio a la tierra para contrarrestar una falta de nitrógeno disponible.

[0004] En el campo de la ciencia del cultivo, es muy conocido que muchas plantas de cultivo requieren que el suelo proporcione cantidades relativamente grandes de nitrógeno a la planta. Las excepciones destacadas a esas plantas que requieren nitrógeno son plantas de la familia de legumbres.

[0005] Específicamente, plantas leguminosas son singulares en comparación con las plantas no leguminosas en su capacidad para fijar nitrógeno atmosférico en el amoníaco. La capacidad de preparar el nitrógeno atmosférico en una fuente de nitrógeno utilizable por la planta obvia la necesidad de que la planta obtenga nitrógeno del suelo. La fijación de nitrógeno, sin embargo, requiere una relación simbiótica entre la planta leguminosa y bacteriana nativa dentro del suelo. Identification of Plant Genes Involved in Plant-Microbe Interactions. Stacey, G. & Keen, T. (Ed.), Plant-Microbe Interactions (4th ed.) (Ch. 6). St. Paul: APS Press.

[0006] La simbiosis se consigue generalmente a través de una señal bidireccional compleja entre la planta y el microbio y el microbio y la planta. Típicamente, factores de planta, tales como flavonoides y sustancias similares a los flavonoides, producen la colonización de las bacterias en el nódulo de raíz de la planta leguminosa. (Gresshoff, 1999). Una vez las bacterias han colonizado el nódulo de raíz, las bacterias efectúan cambios morfológicos en la planta, es decir enrollamiento del cabello de raíz y el desarrollo de un órgano de raíz nuevo - el nódulo. (Gresshoff, 1999). El nódulo permite el establecimiento de un ambiente fisiológico nuevo para las bacterias que provocan el nódulo para diferenciar en un endosimbionte que fija nitrógeno, o bacteriodes, para la planta colonizada. (Gresshoff, 1999).

[0007] Para asistir con el intercambio simbiótico de señal bidireccional entre la planta y microbio, bacterias, tales como *Bradyrhizobia sp.*, son frecuentemente recubiertas en una semilla. Para prolongar la viabilidad del microbio en la semilla, es deseable que el microbio sea tolerante a la desecación y condiciones medioambientales generalmente.

[0008] Sugawara Masayuki et al., Applied and Environmental Microbiology, vol. 76, no. 4, Feb 2010, pages 1071-1081 muestra formas de biosíntesis de trehalosa y su efecto en la tolerancia de desecación, pero no revela las cepas aisladas específicas de *Bradyrhizobium japonicum* de la presente invención o la resistencia de desecación relativa específica mejorada.

[0009] Streeter J G, Journal of Applied Microbiology 2003, vol. 95, no. 3, pages 484-491 muestra el efecto de la trehalosa en la supervivencia de *B. japonicum* después de la desecación, pero no revela las cepas aisladas específicas de *Bradyrhizobium japonicum* de la presente invención o la resistencia a la desecación mejorada relativa específica.

[0010] Cytryn Eddie J et al., Journal of Bacteriology, vol. 189, no. 19, October 2007, pages 751-6762 muestra perfiles de expresión genética en *B. japonicum* en respuesta a la tensión provocada por desecación, pero no

revela las cepas aisladas específicas *Bradyrhizobium japonicum* de la presente invención o la resistencia de desecación mejorada relativa específica.

5 [0011] Mary P et al., Soil Biology and Biochemistry, vol. 26, no. 9, pages 1125-1132 muestra que esto es una variación natural en la tolerancia a la desecación a humedades diferentes de B. Japonicum, pero no revelan las cepas *Bradyrhizobium japonicum* aisladas específicas de la presente invención o la resistencia de desecación mejorada relativa específica.

10 [0012] Allí permanece una necesidad para microbios con resistencia de desecación mejorada.

Resumen de la invención

15 [0013] Aquí están descritas cepas bacterianas que tienen resistencia de desecación mejorada, especialmente cuando las cepas nuevas se comparan con su cepa parental, por ejemplo, *Bradyrhizobium* sp., cepa parental USDA 532C.

Los inventores han aislado y evaluado un número significativo de cepas bacterianas en cuanto a sus propiedades de resistencia a la desecación.

20 [0014] Como descrito en todo, las cepas aisladas son las cepas del género *Bradyrhizobium* spp. En particular, las cepas aisladas son las cepas de *Bradyrhizobium japonicum*. Aún más particularmente, las cepas aisladas son las cepas aisladas *Bradyrhizobium japonicum* seleccionadas del grupo consistente en:

25 La cepa depositada bajo el número de acceso NRRL B-50608;  
La cepa depositada bajo el número de acceso NRRL B-50609;  
La cepa depositada bajo el número de acceso NRRL B-50610;  
La cepa depositada bajo el número de acceso NRRL B-50612, o una combinación de al menos dos o más de las cepas depositadas anteriores.

30 [0015] Aquí también se describen composiciones que comprenden un portador y una o más de las cepas bacterianas descritas aquí. En una forma de realización, la composición comprende una o más moléculas de señal de planta. En una forma de realización, la composición comprende al menos un lipo-quitooligosacárido (LCO). En otra forma de realización la composición comprende al menos un quitooligosacárido (CO). En otra forma de realización más, la composición comprende al menos un flavonoide. En todavía otra forma de realización más, la composición comprende ácido jasmónico o un derivado del mismo. En otra forma de realización, la composición comprende ácido linoleico o un derivado del mismo. En aún otra forma de realización, la composición comprende ácido linolénico o un derivado del mismo. En todavía otra forma de realización, la composición comprende una karriquina.

40 [0016] Además, se ha descrito aquí es un método para estimular el crecimiento de una planta o parte de planta que comprende la puesta en contacto de una planta o parte de planta con una o más de las cepas bacterianas descritas aquí. El método comprende la introducción en la tierra de un inóculo de una o más de las cepas bacterianas descritas aquí. En otra forma de realización, el método comprende la introducción en la tierra de un inóculo de una o más cepas bacterianas como un recubrimiento de semilla.

45 [0017] También se ha descrito aquí es un método para estimular la fijación de nitrógeno en una planta(s) que comprende el cultivo de una planta(s) en una tierra que contiene(n) una o más de las cepas bacterianas descritas aquí. En una forma de realización, la planta(s) es(son) una planta(s) leguminosa(s), planta(s) no leguminosa(s), o combinaciones de las mismas. En otra forma de realización, la planta es una planta seleccionada del grupo consistente en soja, judía, alfalfa, trébol, maíz, tomates de lechuga, patatas, pepinos, y combinaciones de los mismos.

50 [0018] También se han descrito aquí semillas recubiertas con las cepas bacterianas descritas aquí.

55 Breve descripción de los dibujos

[0019]

Fig. 1 es una representación gráfica de la selección preliminar mutantes resistentes a la desecación comparados cuando se comparan con la resistencia a la desecación de la cepa parental USDA 532C.

60 Fig. 2 es una representación gráfica de la segunda selección de mutantes resistentes a la desecación comparados cuando se comparan con la resistencia a la desecación de la cepa parental USDA 532C.

Fig. 3 es una representación gráfica de la tercera selección de mutantes resistentes a la desecación comparados cuando se comparan con la resistencia a la desecación de la cepa parental USDA 532C.

65 Fig. 4 es una representación gráfica de la cuarta selección de mutantes resistentes a la desecación comparados cuando se comparan con la resistencia a la desecación de la cepa parental USDA 532C.

Fig. 5 es una representación en gráfico de barras de la resistencia a la desecación de mutantes seleccionados

resistentes a la desecación comparados cuando se comparan con la resistencia a la desecación de la cepa parental USDA 532C a cero (0) y catorce (14) días.

Fig. 6 es una representación en gráfico de barras de la resistencia a la desecación de mutantes seleccionados resistentes a la desecación comparados cuando se comparan con la resistencia a la desecación de la cepa parental USDA 532C a siete (7) y catorce (14) días.

Descripción detallada de la invención

[0020] Las cepas bacterianas descritas han sido aisladas y evaluadas en cuanto a su capacidad para solubilizar fósforo. Este se describe en detalle en la sección de "ejemplos" provista debajo. Las formas de realización descritas se refieren además a composiciones, recubrimientos de semilla, métodos para aumentar la disponibilidad de fósforo para ser absorbido por la planta del suelo, y métodos para aumentar la absorción de fósforo en plantas que comprenden el crecimiento de las plantas en un suelo que contiene una fuente de fósforo.

Definiciones:

[0021] Como se utiliza en este caso, las formas singulares "un", "una" y "el" se destinan a incluir las formas plurales también, a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

[0022] Como se utiliza en este caso, el término "cultivo biológicamente puro" debe significar un cultivo esencialmente libre de contaminación biológica y que tiene una uniformidad genética tal que subcultivos diferentes tomados de allí mostrarán genotipos y fenotipos sustancialmente idénticos (por ejemplo, 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 98%, al menos 99%, hasta 100% puro).

[0023] Como se utiliza en este caso, el término "aislar, aislado, aislamiento, etc." debe significar que el material de referencia es retirado del ambiente donde se encuentra normalmente.

[0024] Como se utiliza en este caso, el término "inóculo" debe significar cualquier forma de células bacterianas, o esporas, que sean capaces de propagarse en o sobre el suelo cuando las condiciones de temperatura, humedad, etc., son favorables para el crecimiento bacteriano.

[0025] Como se utiliza en este caso, el término "espora" tiene su significado normal, que es conocido y se entiende por los expertos en la técnica y generalmente se refiere a un microorganismo en su estado latente, protegido.

[0026] Como se utiliza en este caso, el término "fuente" de un elemento particular debe significar un compuesto de ese elemento que, al menos en las condiciones de suelo en consideración, no hace al elemento completamente disponible para la absorción por la planta.

[0027] Como se utilizan en este caso, los términos "cantidad efectiva", "concentración efectiva", o "dosificación efectiva" deben significar la cantidad, concentración, o dosificación de uno o más aislados bacterianos suficientes para provocar un aumento del crecimiento de una planta o parte de planta o un aumento en la fijación de nitrógeno.

La dosificación eficaz real en valor absoluto depende de los factores incluyendo, pero no limitado a, el tamaño (por ejemplo, el área, la superficie total, etc.) del terreno para aplicación de los aislados bacterianos, interacciones sinérgicas o antagonísticas entre los otros ingredientes activos o inertes que pueden aumentar o reducir la actividad de los aislados bacterianos, y la estabilidad de los aislados bacterianos en composiciones y/o tratamientos de semilla.

La "cantidad efectiva", "concentración efectiva", o "dosificación efectiva" de la composición bacteriana puede ser determinada, por ejemplo, por un experimento de respuesta de dosis rutinaria.

[0028] Como se utiliza en este caso, los términos "portador" o "portador agronómicamente aceptable" deben referirse a cualquier material que se pueden usar para entregar los activos (por ejemplo, una cepa bacteriana) a una semilla, suelo, planta o parte de planta.

[0029] Como se utiliza en este caso, el término "portador compatible con suelo" debe referirse a cualquier material que se pueda añadir a un suelo sin provocar/tener un efecto adverso en el crecimiento de la planta, estructura del suelo, drenaje del suelo o similares.

[0030] Como se utiliza en este caso, el término "portador compatible con suelo" se debe referir a cualquier material que se puede añadir a una semilla sin causar/tener un efecto adverso en la semilla, la planta que crece a partir de la semilla, germinación de semilla, o similares.

[0031] Como se utiliza en este caso, el término "ingrediente(s) agrícolamente beneficioso(s)" debe referirse a

cualquier agente o combinación de agentes capaces de provocar o proporcionar un efecto beneficioso y/o útil en la agricultura.

5 [0032] Como se utiliza en este caso, "al menos un ingrediente biológicamente activo" debe significar ingredientes biológicamente activos (por ejemplo, moléculas de señal, otros microorganismos, etc.) diferentes de uno o más aislados bacterianos descritos aquí.

10 [0033] Como se utiliza en este caso, el término "deseccación" debe significar un estado de sequedad extrema, por ejemplo, condiciones sin humedad y/o agua. Los términos "resistencia a la desecación" y/o "tolerancia a la desecación" se destinan a comprender la capacidad de un organismo para resistir y/o sobrevivir y/o soportar condiciones de sequedad extrema.

15 [0034] Como se utilizan en este caso, los términos "fijación de nitrógeno", "fijación de nitrógeno atmosférico", o "fijar nitrógeno", etc. deben abarcar procesos biológicos en los que el nitrógeno molecular o nitrógeno en la atmósfera se convierte en uno o más compuestos de nitrógeno (N), incluyendo pero no limitado a, amoníaco, sales amónicas, urea, y nitratos.

20 [0035] Como se utilizan en este caso, el término "organismo de fijación de nitrógeno" debe referirse a cualquier organismo (por ejemplo; diazotrofos) capaz de convertir nitrógeno molecular o nitrógeno en la atmósfera en uno o más compuestos de nitrógeno (N), incluyendo pero no limitado a amoníaco, sales amónicas, urea, y nitratos.

[0036] Como se utilizan en este caso, los términos "solubilización de fosfato", o "solubilizar fosfato", etc. deben significar la conversión de fosfato insoluble (por ejemplo, fosfato de roca, etc.) en una forma de fosfato soluble.

25 [0037] Como se utiliza en este caso, el término "organismo de solubilización de fosfato" debe referirse a cualquier organismo capaz de convertir el fosfato insoluble en una forma de fosfato soluble.

30 [0038] Como se utiliza en este caso, los términos "planta(s)" y "parte(s) de planta" se deben referirse a todas las plantas y poblaciones de plantas tales como plantas silvestres no deseadas y plantas de cultivo deseadas (incluyendo plantas de cultivo de origen natural). Las plantas de cultivo pueden ser plantas, que se pueden obtener por cultivo de planta convencional y métodos de optimización o por métodos de ingeniería genética y biotecnológica o por combinaciones de estos métodos, con las plantas transgénicas y que incluyen los cultivos de planta protegibles o no protegibles por derechos de los cultivadores de plantas.  
 35 Las partes de plantas se deben entender como que significan todas las partes y órganos de plantas por encima y por debajo del suelo, tales como brote, hoja, flor y raíz, constituyendo ejemplos que se pueden mencionar hojas, agujas, tallos, varillas, flores, cuerpos de fruta, frutas, semillas, raíces, nódulos, tubérculos, y rizomas. Las partes de planta también incluyen material cosechado y material de propagación vegetativa y generativa (por ejemplo, recortes, tubérculos, rizomas, vástagos y semillas, etc. ).

40 [0039] Como se utiliza en este caso, el término "nódulo" debe incluir, pero no está limitado a, nódulos determinados, nódulos no determinados, o una combinación de los mismos. Ejemplos de nódulos determinados y nódulos no determinados 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, loto, o Phaseolus y son redondos y esféricos en la forma. (Denison; 2000) Los nódulos determinados crecen solo para un periodo de tiempo limitado - típicamente unas pocas semanas. (Denison; 2000) A diferencia de los nódulos determinados, los nódulos indeterminados se encuentran en especies de *Medicago*, *Trifolium*, y *Pisium*, tienen una forma alargada y crecen continuamente. (Denison; 2000) El término "ocupación de nódulo" es un término conocido en la técnica. McDermott T.R. & Graham ,P.H., Appl. and Environ. Microbiol. 55(10): 2493-2498. Es bien conocido en la técnica que, a pesar de la rara excepción, un nódulo único contendrá solo una cepa bacteriana. 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. & Thorton, 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; and Vincent, J.M. & Waters, L.M., 1953, J. Gen. Microbiol. 9: 357-370.

55 [0040] Como se utiliza en este caso, el término "crecimiento mejorado de planta" debe referirse a un rendimiento aumentado de la planta (por ejemplo, biomasa aumentada, número de frutos aumentado, o una combinación de los mismos como medido por bushels por acre), número aumentado de raíces, masa de raíz aumentada, volumen de raíz aumentado, área de hoja aumentada, pie de planta aumentado, vigor de planta aumentado,  
 60 peso aumentado de una planta (por ejemplo, peso total en seco de una planta o parte de planta, peso fresco total o una planta o parte de planta, etc.), o combinaciones de los mismos.

65 [0041] Como se utiliza en este caso, "competitividad mejorada" y/o "nodulación mejorada" se define para significar cepa(s) bacteriana(s) que posee(n) un porcentaje de ocupación del nódulo de, por ejemplo, al menos el 50%, al menos el 55%, al menos el 60%, al menos el 65%, al menos el 70%, al menos el 75%, al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 91%, al menos el 92%, al menos el 93%, al

menos el 94%, al menos el 95%, al menos el 96%, al menos el 97%, al menos el 98%, al menos el 99%, hasta el 100% de ocupación del nódulo.

5 [0042] Como se utiliza en este caso, el término "tolerancia a la temperatura" debe significar la gama de temperaturas a la que puede(n) crecer una cepa(s) bacteriana(s), por ejemplo, las temperaturas máximas y mínimas en las que puede crecer una cepa bacteriana.

10 [0043] Como se utiliza en este caso, el término "cepa(s) comercialmente disponible(s)" debe significar 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 Enviro. Microbiol. 55 (10): 2532-2536.

[0044] Como se utiliza en este caso, el término "micronutriente(s)" debe referirse a nutrientes que se necesitan para el crecimiento de las plantas, la salud de las plantas, y/o desarrollo de las plantas.

15 [0045] Como se utiliza en este caso, el término "biostimulante(s)" debe referirse en cualquier sustancia capaz de mejorar procesos metabólicos o fisiológicos dentro de plantas y tierras.

[0046] Como se utiliza en este caso, el término "agente(s) humectante(s)" debe referirse a cualquier sustancia capaz de bajar y/o reducir la tensión superficial del agua.

20

### CEPAS

[0047] En una forma de realización, la cepa(s) aislada(s) descrita(s) aquí es una cepa(s) bacteriana(s) de fijación de nitrógeno. En otra forma de realización, la cepa(s) es una cepa(s) *Bradyrhizobium* sp.

25 En otro aspecto, la cepa es derivada de una cepa de *Bradyrhizobium*, incluyendo pero no limitada a una cepa seleccionada del grupo consistente en *Bradyrhizobium bete*, *Bradyrhizobium canariense*, *Bradyrhizobium elkanii*, *Bradyrhizobium iriomotense*, *Bradyrhizobium japonicum*, *Bradyrhizobium jicamae*, *Bradyrhizobium liaoningense*, *Bradyrhizobium pachyrhizi*, y *Bradyrhizobium yuanmingense*. En otra forma de realización más, la(s) cepa(s) es una cepa(s) *Bradyrhizobium japonicum*.

30

[0048] En otra forma de realización, la cepa(s) aislada(s) es una cepa(s) de *Bradyrhizobium* sp. que tiene un índice de supervivencia bacteriana mejorado/aumentado en un ambiente sustancialmente libre de humedad cuando el índice de supervivencia de la cepa(s) de *Bradyrhizobium* aislado se compara con el índice de supervivencia de una cepa(s) parental(es), por ejemplo, cepa parental *Bradyrhizobium japonicum* USDA de 35 532C, sobre un periodo de tiempo, por ejemplo, al menos 1 día, al menos 2 días, al menos 3 días, al menos 4 días, al menos 5 días, al menos 6 días, al menos 1 semana, al menos 2 semanas, al menos 3 semanas, al menos 4 semanas, al menos 1 mes, al menos 2 meses, al menos 3 meses, al menos 4 meses, al menos 5 meses, al menos 6 meses, al menos 1 año o más.

40 [0049] En otra forma de realización más, la cepa(s) aislada(s) es una cepa(s) de *Bradyrhizobium* sp. que teniendo un índice de supervivencia mejorado/aumentado en un ambiente sustancialmente libre de humedad, donde un índice de supervivencia aumentado en un ambiente sustancialmente libre de humedad incluye un índice de supervivencia bacteriana aumentado en un ambiente que está libre de humedad en al menos el 70%, por ejemplo, al menos el 75%, al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 91%, al menos el 92%, al menos el 93%, al menos el 94%, al menos el 95%, al menos el 96%, al menos el 97%, al menos el 98%, al menos el 99%, hasta un 100% de ambiente libre de humedad, cuando el índice de supervivencia de la(s) cepa(s) aislada(s) de *Bradyrhizobium* se ha comparado con el índice de supervivencia de una cepa(s) parental(es), por ejemplo, la cepa parental *Bradyrhizobium japonicum* USDA 532C.

50 [0050] En otra forma de realización la(s) cepa(s) aislada(s) es una cepa(s) de *Bradyrhizobium* sp. que tiene las siguientes características mejoradas/superiores en comparación con las cepas disponibles comercialmente, por ejemplo, cepa comercial *Bradyrhizobium japonicum* USDA 532C, donde las características mejoradas/superiores incluyen, pero no se limitan a:

- 55 A. Competitividad mejorada para la colonización de una planta de soja; y  
B. Eficacia mejorada en fomentar el crecimiento de la planta de soja.

[0051] En otra forma de realización más, la cepa(s) aislada(s) es una cepa(s) de *Bradyrhizobium* sp. que tiene competitividad mejorada/superior para colonizar una planta. En otra forma de realización más, la(s) cepa(s) aislada(s) es una cepa(s) de *Bradyrhizobium* sp. que tiene eficacia mejorada/superior en fomentar el crecimiento de la planta.

60 En otra forma de realización más, la cepa(s) aislada(s) es una cepa(s) de *Bradyrhizobium* sp. que tiene competitividad mejorada/superior para colonizar una planta y eficacia mejorada/superior en fomentar el crecimiento de planta.

65 [0052] En otro aspecto de la presente invención, la cepa(s) aislada es una cepa(s) de *Bradyrhizobium* sp. que tiene tolerancia mejorada/superior a la temperatura.

[0053] En otro aspecto más de la presente invención, la cepa(s) aislada(s) es una cepa(s) de *Bradyrhizobium* sp. que tiene resistencia natural al glifosato.

5 [0054] En otra forma de realización más, las cepas son cepas de *Bradyrhizobium japonicum* seleccionadas del grupo consistente en:

La cepa depositada bajo el número de acceso NRRL B-50608;

La cepa depositada bajo el número de acceso NRRL B-50609;

10 La cepa depositada bajo el número de acceso NRRL B-50610; y

La cepa depositada bajo el número de acceso NRRL B-50612.

[0055] En una forma de realización particular, la(s) cepa(s) puede ser una o más de las cepas depositadas mencionadas anteriormente (por ejemplo, incluyendo al menos dos de las cepas anteriores, al menos tres de las cepas anteriores, al menos cuatro de las cepas anteriores, hasta e incluyendo todas las cepas anteriores).

[0056] En una forma de realización, la cepa es la cepa depositada bajo el número de acceso NRRL B-50608.

En una forma de realización, la cepa es la cepa depositada bajo el número de acceso NRRL B-50609.

En una forma de realización, la cepa es la cepa depositada bajo el número de acceso NRRL B-50610.

20 En una forma de realización, la cepa es la cepa depositada bajo el número de acceso NRRL B-50612.

[0057] En otra forma de realización, el cultivo(s) bacteriano(s) tiene propiedades/características idénticas a al menos una de las cepas depositadas o una combinación de al menos dos de las cepas anteriores depositadas, incluyendo más de dos, tal como, al menos tres de las cepas anteriores, al menos cuatro de las cepas anteriores, hasta incluyendo todas las cepas anteriores. Propiedades/características del cultivo bacteriano incluyen, pero no se limitan a cepas bacterianas que tienen resistencia mejorada y/o superior a la desecación. En otra forma de realización más, la(s) cepa(s) es una cepa(s) de *Bradyrhizobium* que tiene resistencia a la desecación mejorada y/o superior cuando la resistencia a la desecación se compara con la tolerancia y/o resistencia a la desecación de una cepa(s) parental de bacterias, por ejemplo, cepa parental *Bradyrhizobium japonicum* USDA 532C.

[0058] En otro aspecto, la cepa(s) bacteriana(s) aislada(s) de la presente invención incluye cepa(s) que están muy íntimamente relacionadas con cualquiera de las cepas anteriores con base en la identidad de secuencia de ADN 16S. Véase Stackebrandt E, et al., "Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology," *Int J Syst Evol Microbiol.* 52(3):1043-7 (2002) con relación al uso de la identidad de secuencia 16S de ADN para la determinación de la relación en bacterias. En una forma de realización, al menos una cepa es al menos en 95% idéntica a cualquiera de las cepas anteriores basándose en la identidad de secuencia 16S de ADN, al menos 96% idéntica a cualquiera de las cepas anteriores basándose en la identidad de secuencia 16S de ADN, al menos 97% idéntica a cualquiera de las cepas anteriores basándose en la identidad de secuencia 16S de ADN, al menos 98% a cualquiera de las cepas anteriores basándose en la identidad de secuencia de ADN 16S, al menos 98.5% idénticos a cualquiera de las cepas anteriores basándose en la identidad de secuencia 16S de ADN, al menos 99% idéntica a cualquiera de las cepas anteriores basándose en la identidad de secuencia 16S de ADN o al menos 99.5% a cualquiera de las cepas anteriores basándose en la identidad de secuencia 16S de ADN.

[0059] La bacteria de *Bradyrhizobium* descrita aquí, y en particular, las cepas depositadas bajo los números de acceso NRRL B-50608, NRRL B-50609, NRRL B-50610, y NRRL B-50612, se pueden cultivar según métodos conocidos en la técnica.

[0060] El material resultante se puede utilizar directamente en una composición, como un tratamiento de semillas, o las esporas se pueden cosechar concentradas por centrifugación, formuladas, y luego secadas usando secado de aire, liofilización, o técnicas de secado de lecho de fluido (Friesen T., Hill G., Pugsley T., Holloway G., and Zimmerman D. 2005, *Experimental determination of viability loss of Penicillium bilaiae* conidia during convective air-drying *Appl Microbiol Biotechnol* 68: 397-404) para producir un polvo humedecible.

[0061] Las cepas depositadas mencionadas anteriormente se depositaron el 1 de octubre 2012, como indicado en más detalle debajo en la sección de "Materiales & Métodos", bajo los términos del Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos a los fines del procedimiento en materia de patentes de la Colección Americana de Cultivos Tipo, P.O. 1549, Manassas, VA 20108, USA.

60 COMPOSICIONES:

[0062] En otro aspecto, la invención se refiere a una composición que comprende un portador y un inóculo de una o más de las cepas depositadas (bien en forma de esporas o cepas en un estado vegetativo) descritas aquí. En formas de realización determinadas, la composición puede estar en forma de un líquido, un lodo, un sólido, o un polvo (polvo humedecible o polvo seco). En otra forma de realización, la composición puede tener la forma de

un recubrimiento de semilla. Composiciones en forma de líquido, de lodo, o en polvo (por ejemplo, polvo humedecible) pueden ser adecuadas para revestimiento de semillas. Cuando se usa para revestir semillas, la composición se puede aplicar a las semillas y se puede dejar secar.

En formas de realización donde la composición es un polvo (por ejemplo, un polvo humedecible), puede ser necesario añadir un líquido, tal como agua, al polvo antes de aplicarlo a una semilla.

Ejemplos de otros portadores incluyen salvado humedecido, seco tamizado y aplicado a semillas antes de recubrirse con un adhesivo, por ejemplo, goma arábica.

Portadores:

[0063] Los portadores descritos aquí permitirán que la cepa(s) bacteriana(s) depositada(s) sigan siendo eficaces (por ejemplo, capaces de fijar nitrógeno) y sigan siendo viables una vez formuladas.

Ejemplos no limitativos de portadores descritos aquí incluyen líquidos, lodos, o sólidos (incluyendo polvos humedecibles o polvos secos). En una forma de realización, el portador es un portador compatible con el suelo como se ha descrito aquí.

[0064] En una forma de realización, el portador es un portador líquido. Ejemplos no limitativos de líquidos útiles como portadores para las composiciones descritas aquí incluyen agua, una solución acuosa, o una solución no acuosa. En una forma de realización, el portador es agua. En otra forma de realización el portador es una solución acuosa, tal como agua de azúcar. En otra forma de realización, el portador es una solución no acuosa. Si se usa un portador líquido, el portador líquido (por ejemplo; agua) puede además incluir medios de crecimiento para cultivo de las cepas bacterianas depositadas.

Ejemplos no limitativos de medios de crecimiento adecuados para las cepas bacterianas depositadas incluyen arabinosa-gluconato (AG), manitol de extracto de levadura (YEM), medios G16, o cualquier medio conocido por los expertos en la técnica como compatible con, y/o que proporciona nutrientes de crecimiento para las cepas bacterianas depositadas.

[0065] En otra forma de realización, el portador es un lodo.

En una forma de realización, el lodo puede comprender un agente adherente, un líquido, o una combinación de los mismos. Está previsto que el agente adherente puede ser cualquier agente capaz de pegar el inóculo (por ejemplo, una o más de las cepas depositadas) a un sustrato de interés (por ejemplo, una semilla). Ejemplos no limitativos de agentes adherente incluyen alginato, aceite mineral, jarabe, goma arábica, miel, metilcelulosa, leche, engrudo para empapelar, y combinaciones de los mismos. Ejemplos no limitativos de líquidos apropiados para un lodo incluyen agua o agua de azúcar.

[0066] En otra forma de realización, el portador es una materia sólida. En una forma de realización particular, el sólido es un polvo. En una forma de realización el polvo es un polvo humedecible. En otra forma de realización, el polvo es un polvo seco. En otra forma de realización, la materia sólida es un gránulo. Ejemplos no limitativos de materias sólidas útiles como portadores para las composiciones descritas aquí incluyen turba, trigo, paja de trigo, paja de trigo molida, salvado (por ejemplo, salvado humedecido, salvado no humedecido), vermiculita, celulosa, almidón, tierra (pasteurizada o no pasteurizada), yeso, talco, arcillas (por ejemplo, caolín, bentonita, montmorillonita), y geles de sílice.

Ingredientes opcionales beneficiosos agrícolamente:

[0067] Las composiciones descritas aquí pueden comprender uno o más ingredientes opcionales.

Ejemplos no limitativos de ingredientes opcionales incluyen uno o más ingredientes biológicamente activos, micronutrientes, bioestimulantes, conservantes, polímeros, agentes humectantes, surfactantes, o combinaciones de los mismos.

Ingrediente(s) biológicamente activo(s):

[0068] Las composiciones descritas aquí pueden incluir opcionalmente uno o más ingredientes biológicamente activos, como se ha descrito aquí. Ejemplos no limitativos de ingredientes biológicamente activos incluyen moléculas de señal (por ejemplo, lipo-quitooligosacáridos, (LCO) quitooligosacáridos (CO), compuestos quitinosos, flavonoides, ácido jasmónico o derivados de los mismos, ácido linoleico o derivados del mismo, ácido linolénico o derivados del mismo, kerrikinas, etc.) y microorganismos beneficiosos (por ejemplo, *Rhizobium* spp., *Bradyrhizobium* spp., *Sinorhizobium* spp., *Azorhizobium* spp., etc. ).

Molécula(s) de señal:

[0069] En una forma de realización, las composiciones descritas aquí incluyen una o más moléculas de señal. En una forma de realización, una o más moléculas de señal son uno o más LCOs. En otra forma de realización, una o más moléculas de señal son uno o más compuestos quitinosos. En otra forma de realización más, una o más moléculas de señal son uno o más COs. En otra forma de realización más, una o más moléculas de señal son uno o más flavonoides o derivados de los mismos. En aún otra forma de realización más, una o más

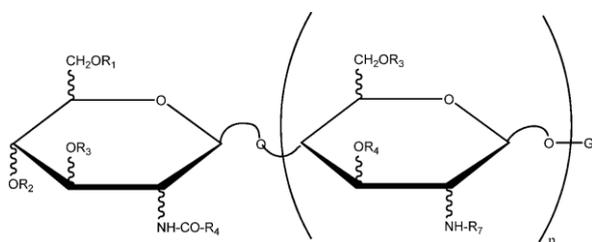
moléculas de señal son uno o más inductores de gen nod no flavonoide (por ejemplo, ácido jasmónico, ácido linoleico, ácido linolénico, y derivados de los mismos). En aún otra forma de realización más, una o más moléculas de señal son una o más karrikinas o derivados de las mismas.

5 En aún otra forma de realización más, una o más moléculas de señal son uno o más LCOs, uno o más compuestos quitinosos, uno o más COs, uno o más flavonoides y derivados de los mismos, uno o más inductores de gen nod no flavonoides y derivados del mismo, una o más karrikinas y derivados de las mismas, o cualquier combinación de molécula de señal de los mismos.

LCOs:

10 [0070] Compuestos de lipo-quitooligosacárido (LCOs), también conocido en la técnica como señales simbióticas Nod o factores Nod, consisten en una estructura de oligosacárido de residuos de  $\beta$ -1,4-enlazado N-acetil-D-glucosamina ("GlcNAc") con una cadena de acilo graso N-enlazada condensada en el extremo que no reduce. Los LCO's difieren en el número de residuos de GlcNAc en la estructura, en la longitud y grado de saturación de la cadena de acilo graso, y en las sustituciones de residuos de azúcar de reducción y no reducción.

15 Un ejemplo de un LCO está presentado abajo como la fórmula I:

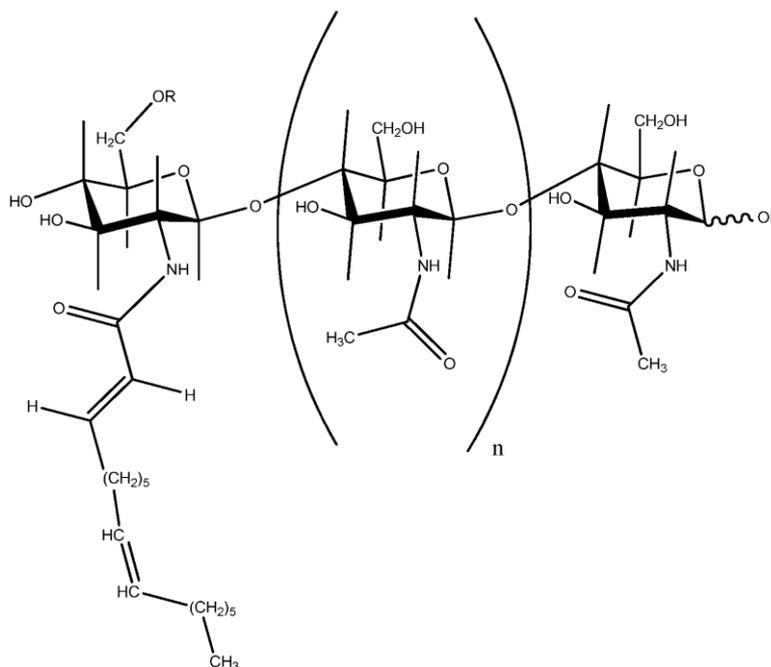


20 Donde:

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

25 R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>5</sub>, R<sub>6</sub> y R<sub>7</sub>, que puede ser idéntico o diferente, representan H, CH<sub>3</sub> CO--, C<sub>x</sub> H<sub>y</sub> CO-- donde x es un número entero entre 0 y 17, y y es un número entero entre 1 y 35, o cualquier otro grupo de acilo tal como por ejemplo un carbamilo, R<sub>4</sub> representa una cadena mono-, di- o alifática triinsaturada que contiene al menos 12 átomos de carbono, y n es un número entero entre 1 y 4. LCOs pueden ser obtenidos (aislados y/o purificados) a partir de bacterias tales como *Rhizobia*, por ejemplo, *Rhizobium* spp., *Bradyrhizobium* spp., *Sinorhizobium* spp. y *Azorhizobium* spp. La estructura LCO es característica para cada una de estas especies bacterianas, y cada cepa puede producir múltiples LCO con estructuras diferentes.

30 Por ejemplo, LCOs específicos a partir de *S. meliloti* se han descrito también en el documento US 5,549,718 como que tienen la fórmula II:



35

donde R representa H o CH<sub>3</sub> CO-- y n es igual a 2 o 3.

[0071] LCOs aún más específicos incluyen NodRM, NodRM-1; NodRM-3. Cuando acetilados (el R=CH<sub>3</sub> CO--), ellos se vuelven AcNodRM-1, y AcNodRM-3, respectivamente (US Patent 5,545,718).

[0072] LCOs a partir de *Bradyrhizobium japonicum* son descritos en las Patentes Estadounidenses US 5,175,149 y 5,321,011. En términos generales, son fitohormonas de pentasacáridos que comprenden metilfucosa.

Varios de estos LCOs derivado de *B. japonicum* son descritos: BjNod-V (C<sub>18:1</sub>); BjNod-V (Ac, C<sub>18:1</sub>), BjNod-V (C<sub>16:1</sub>); y BjNod-V (Ac, C<sub>16:0</sub>), con "V" que indica la presencia de cinco n-acetilglucosaminas; "CA" una acetilación; el número después de "C" indica el número de carbonos en la cadena lateral de ácido graso; y el número después del ":" el número de enlaces dobles.

[0073] Se pueden obtener los LCOs usados en las composiciones de la invención (es decir, aislados y/o purificados) a partir de cepas bacterianas que producen LCOs, 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 LCOs.

[0074] También están comprendidas en la presente invención composiciones que usan LCOs obtenidos (es decir, aislados y/o purificados) a partir de un micorrizal fungus, tales como hongos del grupo *Glomerocycota*, por ejemplo, *Glomus intraradicus*. Las estructuras de LCOs representativos obtenidos de estos hongos se describen en los documentos WO 2010/049751 y WO 2010/049751 (los LCOs descritos aquí también se designan como "Myc factors").

[0075] También comprendido en las composiciones de la presente invención está el uso de compuestos de LCO sintético, tales como los descritos en el documento WO 2005/063784, y los LCOs recombinantes producidos a través de ingeniería genética. La estructura básica de LCO de origen natural puede contener modificaciones o sustituciones encontradas en LCOs de origen natural, tales como los descritos en Spaink, Crit. Rev. Plant Sci. 54:257-288 (2000) and D'Haese, et al., Glycobiology 12:79R-105R (2002).

Moléculas precursoras de oligosacárido (COs, que como se describen abajo, son también útiles como moléculas de señal de planta en la presente invención) para la construcción de LCOs, también se puede 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).

[0076] Los LCOs se pueden utilizar en varias formas de pureza y se pueden usar solos o en forma de un cultivo de bacterias u hongos que producen LCO.

Métodos para proporcionar LCOs sustancialmente puros incluyen sencillamente eliminar las células microbianas de una mezcla de LCOs y el microbio, o continuar aislando y purificando las moléculas de LCO a través de una separación de fase de solvente de LCO seguida de cromatografía de HPLC como se describe, por ejemplo, en la patente US 5,549,718. La purificación se puede mejorar por HPLC repetido, y las moléculas purificadas de LCO se pueden liofilizar para almacenamiento a largo plazo.

#### COs:

[0077] Los quitoooligosacáridos (COs) se conocen en la técnica como estructuras de glucosamina de N actilo β-1-4 enlazadas identificadas como oligómeros de quitina, también como N-acetilquitoooligosacáridos. Los CO's tienen decoraciones de cadena lateral única y diferente que la hacen diferente de las moléculas de quitina [(C<sub>8</sub>-H<sub>13</sub>NO<sub>5</sub>)<sub>n</sub>, CAS nº 1398-61-4], y moléculas de quitosano [(C<sub>5</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>4</sub>)<sub>n</sub>, CAS nº 9012-76-4]. Bibliografía representativa que describe la estructura y producción de COs es como sigue:

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. Chapter 27, "The Molecular Immunology of Complex Carbohydrates" in Advances in Experimental Medicine and Biology, Springer Science; Wan, et al., Plant Cell 21:1053-69 (2009); PCT/F100/00803 (9/21/2000); and Demont-Caulet, et al., Plant Physiol. 120(1):83-92 (1999). Los COs pueden ser sintéticos o recombinantes. Los métodos para la preparación de COs recombinantes se conocen en la técnica. Véase, por ejemplo, Samain, et al. (supra.); Cottaz, et al., Meth. Eng. 7(4):311-7 (2005) and Samain, et al., J. Biotechnol. 72:33-47 (1999).

#### Compuestos quitinosos:

[0078] Las quitinas y los quitosanos, que son los componentes principales 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-2yl]metoximetil]-2-[[5-acetilamino-4,6-dihidroxi-2-(hidroximetil)oxan-3-yl]metoximetil]-4-hidroxi-6-(hidroximetil)oxan-3-yl]etanamida), and quitosán, (IUPAC: 5-amino-6-[5-amino-6-[5-amino-4,6-dihidroxi-2(hidroximetil)oxan-3-yl]oxi-4-hidroxi-2-(hidroximetil)oxan-3-yl]oxi-2(hidroximetil)oxane-3,4-diol)

[0079] Estos compuestos se pueden obtener comercialmente, por ejemplo, de Sigma-Aldrich, o se pueden preparar a partir de insectos, cubiertas de crustáceos, o paredes de células fúngicas. Los métodos para la preparación de quitina y quitosano se conocen en la técnica, y se han descrito, por ejemplo, en la patente US 4,536,207 (preparación a partir de cubiertas de crustáceos), Pochanavanich, et al., Lett. Appl. Microbiol. 35:17-21 (2002) (preparación a partir de paredes de células fúngicas), y la patente US 5,965,545 (preparación a partir de cubiertas de cangrejo e hidrólisis de quitosano comercial). Se pueden obtener quitosanos y quitinas desacetiladas 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.

Las composiciones de quitina y quitosano formuladas para el tratamiento de semillas están disponibles también comercialmente. Los productos comerciales incluyen, por ejemplo, ELEXA® (Plant Defense Boosters, Inc.) y BEYOND™ (Agridhouse, Inc.).

Flavonoides:

[0080] Los flavonoides son compuestos fenólicos que tienen la estructura general de dos anillos aromáticos conectados por un puente de tres carbonos. Los 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. Las clases de flavonoides incluyen chalconas, antocianidinas, cumarinas, flavonas, flavanoles, flavanonas, e isoflavonas. Véase, Jain, et al., J. Plant Biochem. & Biotechnol. 11:1-10 (2002); Shaw, et al., Environmental Microbiol. 11:1867-80 (2006).

[0081] Flavonoides representativos que pueden ser útiles en las composiciones de la presente invención incluyen luteolina, apigenina, tangeritina, quercetina, canferol, miricetina, fisetina, isoramnetina, pachipodol, ramnazina, hesperetina, naringenina, formononetina, eriodictiol, homoeriodictiol, taxifolina, dihidroquercetina, dihidrocanferol, genisteína, daidceína, gliciteína, catequina, galocatequina, catequina 3-gallato, galocatequina 3-gallato, epicatequina, epigallocatequina, epicatequina 3-gallato, epigallocatequina 3-gallato, cianidina, delphinidina, malvidina, pelargonidina, peonidina, petunidina, o derivados de los mismos. Compuestos flavonoides están disponibles comercialmente, por ejemplo, de Natland International Corp., Research Triangle Park, NC; MP Biomedicals, Irvine, CA; LC Laboratories, Woburn MA. Los compuestos flavonoides se pueden aislar a partir de plantas o semillas, por ejemplo, como se describe en las patentes US 5,702,752, 5,990,291; y 6,146,668. Los compuestos flavonoides también se pueden producir por organismos genéticamente modificados, tal como levadura, como se describe en Ralston, et al., Plant Physiology 137:1375-88 (2005).

Inductor(es) no flavonoides de gen-Nod:

[0082] El ácido jasmónico (JA, [1R-[1 $\alpha$ ,2 $\beta$ (Z)]]-3-oxo-2-( ácido pentenil)ciclopentaneacético) 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.

El ácido jasmónico y su éster de metilo, jasmonato de metilo (MeJA), conocidos colectivamente como jasmonatos, son compuestos a base de octadecanoides que se dan naturalmente en las plantas.

El ácido jasmónico se produce por las raíces de plantas de trigo, y por microorganismos fúngicos tal como *Botryodiplodia theobromae* y *Gibbrella fujikuroi*, levadura (*Saccharomyces cerevisiae*), y cepas patógenas y no patógenas de *Escherichia coli*.

Ácido linoleico y ácido linolénico se producen en el curso de la biosíntesis de ácido jasmónico. De los jasmonatos, ácido linoleico y ácido linoleico (y sus derivados) se ha reportado que son inductores de la expresión génica nod o producción de LCO por rizobacterias. Véase, por ejemplo. Mabood, Fazli, Jasmonates induce the expression of nod genes in Bradyrhizobium japonicum, May 17, 2001; and Mabood, Fazli, "Linoleic and linolenic acid induce the expression of nod genes in Bradyrhizobium japonicum," USDA 3, May 17, 2001.

[0083] Derivados útiles de ácido linoleico, ácido linolénico, y ácido jasmónico que puede ser útiles en las 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 han sustituido por un grupo --COR, donde R es un grupo --OR<sup>1</sup>, donde R<sup>1</sup> es: un grupo alquilo, tal como un grupo alquilo no ramificado C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> o ramificado, por ejemplo, un grupo metilo, etilo o propilo; un grupo de alquenilo, tal como un grupo C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub> alquenilo no ramificado o ramificado; un grupo alquinilo, tal como un grupo alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub> no ramificado o ramificado; un grupo de arilo que tiene, por ejemplo, 6 a 10 átomos de carbono; o un grupo de heteroarilo que tiene, por ejemplo, de 4 a 9 átomos de carbono, donde los heteroátomos en el grupo de heteroarilo pueden ser, por ejemplo, N, O, P, o S. 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 NR<sup>2</sup>R<sup>3</sup>, donde R<sup>2</sup> y R<sup>3</sup> son independientemente: hidrógeno; un grupo alquilo, tal como un grupo alquilo no ramificado C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> o ramificado, por ejemplo, un grupo metilo, etilo o propilo; un grupo alquenilo, tal como un grupo alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub> no ramificado o ramificado; un grupo de alquinilo, tal como un grupo alquinilo no ramificado

o ramificado C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>; un grupo arilo que tiene, por ejemplo, de 6 a 10 átomos de carbono; o un grupo heteroarilo que tiene, por ejemplo, de 4 a 9 átomos de carbono, donde los heteroátomos en el grupo heteroarilo pueden ser, por ejemplo, N, O, P, o S. Los ésteres se pueden preparar por métodos conocidos, tal como la adición nucleofílica catalizada por ácido, donde el ácido carboxílico se reacciona con un alcohol en presencia de una

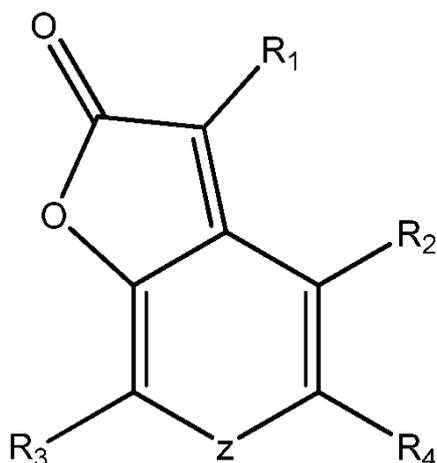
5 cantidad catalítica de un ácido mineral.  
Las amidas también se pueden preparar también por métodos conocidos, tal como al reaccionar el ácido carboxílico con la amina apropiada en presencia de un agente de acoplamiento tal como (DCC) diciclohexil carbodiimida, bajo condiciones neutras.

10 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 aceptables metabólicamente 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). Estas sales se pueden preparar fácilmente mediante la mezcla de 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 se puede recoger por filtración o se puede recuperar por otros medios tal como por evaporación del solvente.

#### Karrikina(s):

20 [0084] Las karrikinas son 4H-piranos vinílogos por ejemplo, 2H-furo[2,3-c]pirano-2-onas incluyendo derivados y sus análogos. Ejemplos de estos compuestos se representan por la estructura siguiente:



25 Donde; Z es O, S o NR<sub>5</sub> R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, y R<sub>4</sub> son cada uno independientemente H, alquilo, alquenoilo, alquinilo, fenilo, bencilo, hidroxilo, hidroxialquilo, alcoxi, feniloxi, benziloxi, CN, COR<sub>6</sub>, COOR<sub>7</sub>, halógeno, NR<sub>6</sub>R<sub>7</sub>, o NO<sub>2</sub> y R<sub>5</sub>, R<sub>6</sub>, y R<sub>7</sub> son cada uno independientemente H, alquilo o alquenoilo, o una sal derivada de estos biológicamente aceptable.

30 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 hidrocloreuro, hidrobromuro, sulfato o bisulfato, fosfato o fosfato de hidrógeno, acetato, benzoato, succinato, fumarato, maleato, lactato, citrato, tartrato, gluconato; metanosulfonato, benzenosulfonato y ácido sulfónico de P-tolueno.

35 Sales metálicas aceptables adicionales biológicamente pueden incluir sales de metal alcalino, con bases, ejemplos de los cuales incluyen sales de potasio y sodio.

Ejemplos de compuestos adoptados por la estructura y que pueden ser adecuados para usar en la presente invención incluyen lo siguiente:

40 3-metil-2H-furo[2,3-c]pirano-2-ona (donde R<sub>1</sub>CH<sub>3</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub>=H), 2H-furo[2,3-c]pirano-2-ona (donde R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub>=H), 7-metil-2H-furo[2,3-c]pirano-2-ona (donde R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>4</sub>=H, R<sub>3</sub>=CH<sub>3</sub>), 5-metil-2H-furo[2,3-c]pirano-2-ona (donde R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>=H, R<sub>4</sub>=CH<sub>3</sub>), 3,7-dimetil-2H-furo[2,3-c]pirano-2-ona (donde R<sub>1</sub>, R<sub>3</sub>=CH<sub>3</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>4</sub>=H), 3,5-dimetil-2H-furo[2,3-c]pirano-2-ona (donde R<sub>1</sub>, R<sub>4</sub>=CH<sub>3</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>=H), 3,5,7-trimetil-2H-furo[2,3-c]pirano-2-ona (donde R<sub>1</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub>=CH<sub>3</sub>, R<sub>2</sub>=H), 5-metoximetil-3-metil-2H-furo[2,3-c]pirano-2-ona (donde R<sub>1</sub>=CH<sub>3</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>=H, R<sub>4</sub>=CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>), 4-bromo-3,7-dimetil-2H-furo[2,3-c]pirano-2-ona (donde R<sub>1</sub>, R<sub>3</sub>=CH<sub>3</sub>, R<sub>2</sub>=Br, R<sub>4</sub>=H), 3-metilfuro[2,3-c]piridina-2(3H)-ona (donde Z=NH, R<sub>1</sub>=CH<sub>3</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub>=H), 3,6-dimetilfuro[2,3-c]piridina-2(6H)-ona (donde Z=N-CH<sub>3</sub>, R<sub>1</sub>=CH<sub>3</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub>=H). Véase, la patente U.S. 7,576,213. Estas moléculas se conocen también como karrininas. Véase, Halford, "Smoke Signals," en Chem. Eng. News (April 12, 2010), en las págs- 37-38 (informando que las karrininas o butenolidas que están contenidas en el humo actúan como estimulantes del crecimiento y fomentan la germinación de semillas después de un fuego forestal, y pueden fortalecer semillas, tales como maíz, tomates,

lechuga y cebollas que habían sido almacenados). Estas moléculas son objeto de la patente U.S. 7,576,213

Microorganism(os) beneficiosos:

5 [0085] En una forma de realización, las composiciones descritas aquí pueden comprender uno o más microorganismos beneficiosos.

Uno o más microorganismos beneficiosos pueden tener una o más propiedades beneficiosas (por ejemplo, producir una o más moléculas de señal descritas aquí, mejorar la absorción de agua y nutrientes, mejorar el crecimiento, mejorar la germinación de semillas, mejorar la aparición de plantas de semillero, romper el letargo o inactividad de una planta, etc. ).

[0086] En una forma de realización, el(los) microorganismo(s) beneficioso(s) comprenden una o más bacterias que producen una o más de las moléculas de señal descritas aquí. En otra forma de realización más, las bacterias son bacterias del género *Rhizobium* spp. (e.g., *R. cellulosilyticum*, *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. meliloti*, *R. mongolense*, *R. miluonense*, *R. sullae*, *R. tropici*, *R. undicola*, and/or *R. yanglingense*), *Azorhizobium* spp. (e.g., *A. caulinodans* and/or *A. doebereineriae*), *Sinorhizobium* spp. (e.g., *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. saheli*, *S. terangae*, and/or *S. xinjiangense*), *Mesorhizobium* spp., (*M. albiziae*, *M. amorphae*, *M. chacoense*, *M. ciceri*, *M. huakuii*, *M. loti*, *M. mediterraneum*, *M. pluifarium*, *M. septentrionale*, *M. temperatum*, and/or *M. tianshanense*), y combinaciones de los mismos.

En una forma de realización particular, el microorganismo beneficioso es seleccionado del grupo consistente en *R leguminosarum*, *R melliloti*, *S. melliloti*, y combinaciones de los mismos. En otra forma de realización, el microorganismo beneficioso es *R leguminosarum*. En otra forma de realización, el microorganismo beneficioso es *R melliloti*. En otra forma de realización, el microorganismo beneficioso es *S. melliloti*.

[0087] En otra forma de realización, uno o más microorganismos beneficiosos comprenden uno o más microorganismos de solubilización de fosfato. Los microorganismos de solubilización de fosfato incluyen cepas bacterianas y fúngicas. En una forma de realización, el microorganismo de solubilización de fosfato incluye especies de un género seleccionado del grupo consistente en

*Acinetobacter* spp. (e.g., *Acinetobacter calcoaceticus*, etc.), *Arthrobacter* spp, *Arthrobotrys* spp. (e.g., *Arthrobotrys oligospora*, etc.), *Aspergillus* spp. (e.g., *Aspergillus niger*, etc.), *Azospirillum* spp. (e.g., *Azospirillum halopraeferans*, etc.), *Bacillus* spp. (e.g., *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus atrophaeus*, *Bacillus circulans*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis*, etc.), *Burkholderia* spp. (e.g., *Burkholderia cepacia*, *Burkholderia vietnamiensis*, etc.), *Candida* spp. (e.g., *Candida krissii*, etc.), *Chryseomonas* spp. (e.g., *Chryseomonas luteola*, etc.), *Enterobacter* spp.(e.g., *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter asburiae*, *Enterobacter* spp., *Enterobacter taylorae*, etc.), *Eupenicillium* spp. (e.g., *Eupenicillium parvum*, etc.), *Exiguobacterium* spp., *Klebsiella* spp., *Kluyvera* spp. (e.g., *Kluyvera cryocrescens*, etc.), *Microbacterium* spp., *Mucor* spp. (e.g., *Mucor ramosissimus*, etc.), *Paecilomyces* spp. (e.g., *Paecilomyces hepialid*, *Paecilomyces marquandii*, etc.), *Paenibacillus* spp. (e.g., *Paenibacillus macerans*, *Paenibacillus mucilaginosus*, etc.), *Penicillium* spp. (e.g., *Penicillium bilaiae* (formerly known as *Penicillium bilaii*), *Penicillium albidum*, *Penicillium aurantiogriseum*, *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium citreonigrum*, *Penicillium citrinum*, *Penicillium digitatum*, *Penicillium frequentas*, *Penicillium fuscum*, *Penicillium gastrivorus*, *Penicillium glabrum*, *Penicillium griseofulvum*, *Penicillium implicatum*, *Penicillium janthinellum*, *Penicillium lilacinum*, *Penicillium minioluteum*, *Penicillium montanense*, *Penicillium nigricans*, *Penicillium oxalicum*, *Penicillium pinetorum*, *Penicillium pinophilum*, *Penicillium purpurogenum*, *Penicillium radicans*, *Penicillium radicum*, *Penicillium raistrickii*, *Penicillium rugulosum*, *Penicillium simplicissimum*, *Penicillium solitum*, *Penicillium variabile*, *Penicillium velutinum*, *Penicillium viridicatum*, *Penicillium glaucum*, *Penicillium fussiporus*, and *Penicillium expansum*, etc.), *Pseudomonas* spp. (e.g., *Pseudomonas corrugate*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas lutea*, *Pseudomonas poae*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas stutzeri*,

[0088] *Pseudomonas trivialis*, etc.), *Serratia* spp.(e.g., *Serratia marcescens*, etc.), *Stenotrophomonas* spp. (e.g., *Stenotrophomonas maltophilia*, etc.), *Streptomyces* spp., *Streptosporangium* spp., *Swaminathania* spp.(e.g., *Swaminathania salitolerans*, etc.), *Thiobacillus* spp. (e.g., *Thiobacillus ferrooxidans*, etc.), *Torulospora* spp. (e.g., *Torulospora globosa*, etc.), *Vibrio* spp. (e.g., *Vibrio proteolyticus*, etc.), *Xanthobacter* spp. (e.g., *Xanthobacter agilis*, etc.), *Xanthomonas* spp. (e.g., *Xanthomonas campestris*, etc.), y combinaciones de los mismos.

[0089] En una forma de realización particular, uno o más microorganismos de solubilización de fosfato es una cepa del hongo *Penicillium*. En otra forma de realización, una o más especies de *Penicillium* es *P. bilaiae*, *P. gastrivorus*, o combinaciones de los mismos.

[0090] En otra forma de realización el microorganismo beneficioso es una o más micorrizas. En particular, una o más micorrizas es una endomicorriza (también llamadas micorrizas vesículo-arbusculares, VAMs, micorrizas arbusculares, o AMs), una ectomicorriza, o una combinación de los mismos.

[0091] En una forma de realización, una o más micorrizas es una endomicorriza de la división *Glomeromycota* y

los géneros *Glomus* y *Gigaspora*. En otra forma de realización más, la endomicorriza es una cepa de *Glomus aggregatum*, *Glomus brasilianum*, *Glomus clarum*, *Glomus deserticola*, *Glomus etunicatum*, *Glomus fasciculatum*, *Glomus intraradices*, *Glomus monosporum*, or *Glomus mosseae*, *Gigaspora margarita* o una combinación de las mismas.

5

[0092] En otra forma de realización, una o más micorrizas es una ectomicorriza de la división *Basidiomycota*, *Ascomycota*, and *Zygomycota*. En otra forma de realización más, la ectomicorriza es una cepa de *Laccaria bicolor*, *Laccaria laccata*, *Pisolithus tinctorius*, *Rhizopogon amylopogon*, *Rhizopogon fulvigleba*, *Rhizopogon luteolus*, *Rhizopogon villosuli*, *Scleroderma cepa*, *Scleroderma citrinum*, o una combinación de las mismas.

10

[0093] En otra forma de realización más, una o más micorrizas es una micorriza ecroide, una micorriza arbutoide, o una micorriza monotropeide.

15

Las ectomicorrizas y arbusculares forman micorrizas ericoides con muchas plantas que pertenecen a la orden de las Ericales, mientras que algunas Ericales forman micorrizas arbutoides y monotropoides. Todas las orquídeas son micoheterotróficas en alguna fase durante su ciclo vital y forman micorrizas de orquídea con una gama de hongos basidiomicetos. En una forma de realización, la micorriza puede ser una micorriza ericoide, preferiblemente de la división *Ascomycota*, tal como *Hymenoscyphous ericae* u *Oidiodendron* sp. En otra forma de realización, la micorriza también puede ser una micorriza arbutoide, preferiblemente de la división *Basidiomycota*. En otra forma de realización, la micorriza puede ser una micorriza monotropeide, preferiblemente de la división *Basidiomycota*.

20

En todavía otra forma de realización, la micorriza puede ser una micorriza de orquídea, preferiblemente del género *Rhizoctonia*.

#### Micronutriente(s):

25

[0094] En otra forma de realización más, las composiciones descritas aquí pueden comprender uno o más micronutrientes beneficiosos. Ejemplos no limitativos de micronutrientes para usar en las composiciones descritas aquí incluyen vitaminas, (por ejemplo, vitamina A, complejo de vitamina B (es decir, las vitaminas vitamia B<sub>2</sub>, vitamina B<sub>3</sub>, vitamina B<sub>5</sub>, vitamina B<sub>6</sub>, vitamina B<sub>7</sub>, vitamina B<sub>8</sub>, vitamina B<sub>9</sub>, vitamina B<sub>12</sub>, colina) vitamina C, vitamina D, vitamina E, vitamina K, carotenoides ( $\alpha$ -caroteno,  $\beta$ -caroteno, criptoxantina, luteína, licopeno, zeaxantina, etc.), macrominerales (por ejemplo, fósforo, calcio, magnesio, potasio, sodio, hierro, etc.), oligoelementos (por ejemplo, boro, cobalto, cloruro, cromo, cobre, fluoruro, yodo, hierro, manganeso, molibdeno, selenio, zinc, etc.), ácidos orgánicos (por ejemplo, ácido acético, ácido cítrico, ácido láctico, ácido málico, taurina, etc.), y combinaciones de los mismos. En una forma de realización particular, las composiciones pueden comprender fósforo, boro, cloro, cobre, hierro, manganeso, molibdeno, zinc o combinaciones de los mismos.

30

35

[0095] En formas de realización determinadas, donde las composiciones descritas aquí pueden comprender fósforo, está previsto que se puede proporcionar cualquier fuente adecuada de fósforo.

40

En una forma de realización, el fósforo se puede derivar de una fuente. En otra forma de realización, fuentes adecuadas de fósforo incluyen fuentes de fósforo capaces de solubilizar por uno o más microorganismos (por ejemplo, *Penicillium bilaiae*, etc. ).

40

[0096] En una forma de realización, el fósforo se puede derivar de una fuente de fosfato de roca. En otra forma de realización el fósforo se puede derivar de fertilizantes que comprenden una o más fuentes con fósforo. Los fertilizantes de fosfato fabricados disponibles comercialmente son de muchos tipos.

45

Algunos comunes son aquellos que contienen fosfato de roca, fosfato de monoamonio, fosfato de diamonio, fosfato de monocalcio, super fosfato, super fosfato triple, y/o polifosfato de amonio.

50

Todos estos fertilizantes se producen por el procesamiento químico de fosfatos de roca natural insoluble en instalaciones de fabricación de abono a gran escala y el producto es costoso. Mediante la presente invención es posible reducir la cantidad de estos fertilizantes aplicados al suelo mientras se mantiene la misma cantidad de absorción de fósforo por el suelo.

50

[0097] En otra forma de realización más, el fósforo se puede derivar de una fuente de fósforo orgánico.

55

En otra forma de realización particular, la fuente de fósforo puede incluir un fertilizante orgánico.

55

Un fertilizante orgánico se refiere a una mejora del suelo derivada de fuentes naturales que garantiza, al menos, los porcentajes mínimos de nitrógeno, fosfato, y potasa. Ejemplos no limitativos de fertilizantes orgánicos incluyen productos derivados de animales y plantas, polvos de roca, algas, inoculantes, y acondicionadores. Estos están frecuentemente disponibles en centros de jardinería y a través de compañías de suministro hortícola. En particular, la fuente orgánica de fósforo es de harina de hueso, harina de carne, estiércol animal, compost, lodo de depuradora, o guano, o combinaciones de los mismos.

60

[0098] En otra forma de realización más, el fósforo se puede derivar de una combinación de fuentes de fósforo incluyendo, pero no limitada a, fosfato de roca, fertilizantes que comprenden una o más fuentes con fósforo (por ejemplo, fosfato de monoamonio, fosfato de diamonio, fosfato de monocalcio, super fosfato, super osfato triple, polifosfato de amonio, etc.) una o más fuentes de fósforo orgánico, y combinaciones de los mismos.

65

Bioestimulante(s):

[0099] En una forma de realización, las composiciones descritas aquí pueden comprender uno o más bioestimulantes beneficiosos. Los bioestimulantes pueden mejorar los procesos metabólicos o fisiológicos tales como la respiración, fotosíntesis, absorción de ácido nucleico, absorción iónica, suministro de nutrientes, o una combinación de los mismos. Ejemplos no limitativos de bioestimulantes incluyen extractos de alga (por ejemplo, *ascophyllum nodosum*), ácidos húmicos (por ejemplo, humato de potasio), ácidos fúlvicos, mioinositol, glicina, y combinaciones de los mismos. En otra forma de realización, las composiciones comprenden extractos de alga, ácidos húmicos, ácidos fúlvicos, mioinositol, glicina, y combinaciones de los mismos.

Polímero(s):

[0100] En una forma de realización, las composiciones descritas aquí pueden comprender además uno o más polímeros. Usos no limitativos de polímeros en la industria agrícola incluyen el suministro agroquímico, la eliminación de metal pesado, retención de agua y/o suministro de agua, y combinaciones de los mismos. Pouci, et al., Am. J. Agri. & Biol. Sci., 3(1):299-314 (2008). En una forma de realización, uno o más polímeros es un polímero natural (por ejemplo, agar, almidón, alginato, pectina, celulosa, etc.), un polímero sintético, un polímero biodegradable (por ejemplo, policaprolactona, poliláctido, poli (alcohol de vinilo), etc.), o una combinación de los mismos.

[0101] Para una lista no limitativa de polímeros útiles para las composiciones descritas aquí, véase Pouci, et al., Am.

J. Agri. & Biol. Sci. 3(1):299-314 (2008).

En una forma de realización, las composiciones descritas aquí comprenden celulosa, derivados de celulosa, metilcelulosa, derivados de metilcelulosa, almidón, agar, alginato, pectina, polivinilpirrolidona, y combinaciones de los mismos.

Agente(s) humectante(s):

[0102] En una forma de realización, las composiciones descritas aquí pueden comprender además uno o más agentes humectantes. Los agentes humectantes se usan comúnmente en suelos, particularmente suelos hidrofóbicos, para mejorar la infiltración y/o penetración de agua en un suelo.

El agente humectante puede ser un adyuvante, aceite, surfactante, tampón, acidificador, o combinación de los mismos. En una forma de realización, el agente humectante es un surfactante. En una forma de realización, el agente humectante consiste en uno o más tensioactivos no iónicos, uno o más surfactantes aniónicos, o una combinación de los mismos. En otra forma de realización, el agente humectante consiste en uno o más tensioactivos no iónicos.

[0103] Surfactantes adecuados para las composiciones descritas aquí se proporcionan en la sección de "surfactantes".

Surfactante(s):

[0104] Surfactantes adecuados para las composiciones descritas aquí pueden ser surfactantes no iónicos (por ejemplo, semipolares y/o aniónicos y/o catiónicos y/o zwitteriónicos). Está previsto que el surfactante(s) provocará a la actividad de una o más cepas depositadas y/o uno o más microorganismos beneficiosos tan poco daño como sea posible. Los surfactantes pueden humedecer y emulsionar suelo(s) y/o barro(s). Está previsto que los surfactantes usados en composición descrita tengan baja toxicidad para los microorganismos contenidos en la formulación. Está además previsto que los surfactantes usados en la composición descrita tengan una fitotoxicidad baja (es decir, el grado de toxicidad de una sustancia o combinación de sustancias que hay en una planta).

Se pueden usar un surfactante único o una mezcla de diferentes surfactantes.

Surfactantes aniónicos

[0105] Surfactantes aniónicos o mezclas de tensioactivos no iónicos y aniónicos también se puede usar en las composiciones.

Surfactantes aniónicos son surfactantes que tienen una fracción hidrofílica en un estado aniónico o cargado negativamente en la solución acuosa. Las composiciones descritas aquí pueden comprender uno o más surfactantes aniónicos. El surfactante(es) aniónico(s) puede ser o bien surfactantes aniónicos hidrosolubles, surfactantes aniónicos insolubles en agua, o una combinación de surfactantes aniónicos hidrosolubles y surfactantes aniónicos insolubles en agua. Ejemplos no limitativos de surfactantes aniónicos incluyen ácidos sulfónicos, ésteres de ácidos sulfúricos, ácidos carboxílicos, y sales derivadas.

Ejemplos no limitativos de surfactantes aniónicos hidrosolubles incluyen alquilsulfatos, alquil éter sulfatos, alquila mido éter sulfatos, alquil arilo poliéter sulfatos, alquil arilo sulfatos, alquil arilo sulfonatos, monoglicérido sulfatos, de alquilo sulfonatos, alquilamida sulfonatos, alquilo arilo sulfonatos, sulfonatos de benceno, sulfonatos de

tolueno, sulfonatos de xileno, sulfonatos de cumeno, alquilbencenosulfonatos, alquildifenilóxido sulfonato, alfaolefina sulfonatos, alquil naftalen sulfonato, sulfonatos de parafina, sulfonatos de lignina, alquil sulfosuccinatos, sulfosuccinatos etoxilados, alquiléter sulfosuccinatos, sulfosuccinatos de alquilamida, alquilo sulfosuccinamate, alquilo sulfoacetatos, alquilo fosfatos, éster de fosfato, fosfatos de alquiléter, sarconsinatos de acilo, isetonatos de acilo, N-acil tauratos, N-acil-N-alquiltauratos, carboxilatos de alquilo, o una combinación de los mismos.

#### Surfactantes no iónicos

[0106] Surfactantes no iónicos son surfactantes que no tienen ninguna carga eléctrica cuando se disuelven o dispersan en un medio acuoso.

En al menos una forma de realización de la composición descrita aquí, se usan uno o más surfactantes no iónicos puesto que estos proporcionan las acciones de humidificación y emulsión deseadas y no inhiben significativamente la estabilidad y actividad de las esporas. El surfactante(s) no iónico puede ser o bien surfactantes no iónicos hidrosolubles, surfactantes no iónicos insolubles en agua, o una combinación de surfactantes no iónicos hidrosolubles y surfactantes no iónicos insolubles en agua.

#### Surfactantes no iónicos no hidrosolubles

[0107] Ejemplos no limitativos de surfactantes no iónicos insolubles en agua incluyen alquilo y arilo: éteres de glicerol, éteres de glicol, etanolamidas, sulfoanilamidas, alcoholes, amidas, etoxilatos de alcohol, ésteres de glicerol, ésteres de glicol, etoxilatos de éster de glicerol y ésteres de glicol, poliglicósidos de alquilo basados en azúcar, ácidos grasos polioxietilenados, condensados de alcanolamina, alcanolamidas, glicoles terciarios acetilénicos, mercaptanos polioxietilenados, ésteres de ácido carboxílico, glicoles de polioxipropileno polioxietilenado, ésteres grasos de sorbitán, o combinaciones de los mismos.

También están incluidos copolímeros en bloque de EO/PO (EO es óxido de etileno, Po es óxido de propileno), EO son polímeros y copolímeros, poliaminas, y polivinilpolidonas.

#### Tensioactivos no iónicos hidrosolubles

[0108] Ejemplos no limitativos de surfactantes no iónicos hidrosolubles incluyen etoxilados de alcohol de ácido graso de sorbitán y etoxilados de éster de ácido graso de sorbitán.

#### Combinación de surfactantes no iónicos

[0109] En una forma de realización, las composiciones descritas aquí comprenden al menos uno o más surfactantes no iónicos. En una forma de realización, las composiciones comprenden al menos un surfactante no iónico insoluble de agua y al menos un surfactante no iónico soluble en agua. En todavía otra forma de realización, las composiciones comprenden una combinación de tensioactivos no iónicos teniendo cadenas de hidrocarburo de sustancialmente la misma longitud.

#### Otros surfactantes

[0110] En otra forma de realización, las composiciones descritas aquí también pueden comprender surfactantes de organosilicona, antiespumantes basados en silicona usados como surfactantes en antiespumantes a base de aceite mineral y basados en silicona.

En otra forma de realización más, las composiciones descritas aquí pueden comprender también sales de metal alcalino de ácidos grasos (por ejemplo, sales de metal alcalino hidrosoluble de ácidos grasos y/o sales de metal alcalino insoluble de agua de ácidos grasos).

#### Herbicida(s):

[0111] En una forma de realización, las composiciones descritas aquí pueden comprender además uno o más herbicidas. En una forma de realización particular, el herbicida puede ser un herbicida pre-emergente, un herbicida post-emergente, o una combinación de los mismos.

[0112] Herbicidas adecuados incluyen herbicidas químicos, herbicidas naturales (por ejemplo, bioherbicidas, herbicidas orgánicos, etc.), o combinaciones de los mismos.

Ejemplos no limitativos de herbicidas adecuados incluyen bentazona, acifluorfen, clorimurón, lactofen, clomazona, fluazifop, glufosinato, glifosato, setoxidim, imazetapir, imazamox, fomesafen, flumiclorac, imazaquin, cletodim, pendimetalina; 3,4-Dimetil-2,6-dinitro-N-pentan-3-yl-anilina N-(1-etilpropil)-2,6-dinitro-3,4-xilidina pronamida; propizamida; 3,5-Dicloro-N-(1,1-dimetilpropinil)benzamida; 3,5-Dicloro-N-(1,1-dimeil-2-propinil)benzamida; N-(1,1-Dimetilpropinil)-3,5-diclorobenzamida; S-etil N-etiltiociclohexanocarbamate; trifluralina; 2,6-Dinitro-N,N-dipropil-4-(trifluorometil)anilina; glifosato; N-(fosfonometil)glicina; y derivados de los mismos.

En una forma de realización, el uno o más herbicidas para uso conforme a esta divulgación incluyen pronamida (comercialmente designada como Kerb®); propizamida; 3,5-Dicloro-N-(1,1-dimetilpropinil)benzamida; 3,5-Dicloro-

N-(1,1-dimetil-2-propinil)benzamida; N-(1,1-Dimetilpropinil)-3,5-diclorobenzamida; cicloato, S-etil N-etiltiociclohexanocarbamato (designado comercialmente como Ro-Neet®); trifluralina; 2,6-Dinitro-N,N-dipropil-4-(trifluorometil)anilina; glifosato; N-(fosfonometil)glicina; y derivados de los mismos. Productos comerciales que contienen cada uno de estos compuestos son fácilmente disponibles. La concentración de herbicidas en la composición corresponderá generalmente al índice de uso etiquetado para un herbicida particular.

#### Fungicida(s):

[0113] En una forma de realización, las composiciones descritas aquí pueden comprender además uno o más fungicidas. Fungicidas útiles para las composiciones descritas aquí mostrarán adecuadamente actividad contra una gama amplia de patógenos, incluyendo pero no limitado a *Phytophthora*, *Rhizoctonia*, *Fusarium*, *Pythium*, *Phomopsis* or *Sclerotinia* and *Phakopsora* y combinaciones de los mismos.

[0114] Ejemplos no limitativos de fungicidas comerciales que se pueden ser adecuados para las composiciones descritas aquí incluyen PROTÉGÉ, RIVAL or ALLEGIANCE FL or LS (Gustafson, Piano, TX), WARDEN RTA (Agrilance, St. Paul, MN), APRON XL, APRON MAXX RTA or RFC, MAXIM 4FS or XL (Syngenta, Wilmington, DE), CAPTAN (Arvesta, Guelph, Ontario) and PROTREAT (Nitragin Argentina, Buenos Aires, Argentina). Ingredientes activos en estos y otros fungicidas comerciales incluyen, pero no están limitados a fludioxonil, mefenoxam, azoxistrobina y metalaxil. Los fungicidas comerciales son usados de la forma más adecuada de acuerdo con las instrucciones del fabricante en las concentraciones recomendadas.

#### Insecticida(s):

[0115] En una forma de realización, las composiciones descritas aquí puede comprender además uno o más insecticidas.

Insecticidas útiles para las composiciones descritas aquí mostrarán adecuadamente actividad contra una gama amplia de insectos incluyendo, pero no limitado a gusanos alambre, gusano cortador, larvas, gusano de la raíz de maíz, gusanos de semilla de maíz, alticinos, chinches, pulgones, escarabajos de hoja, chinches hediondos y combinaciones de los mismos.

[0116] Ejemplos no limitativos de insecticidas comerciales que son adecuados para las composiciones descritas aquí incluyen CRUISER (Syngenta, Wilmington, DE), GAUCHO Y PONCHO (Gustafson, Piano, TX) Ingredientes activos en estos y otros insecticidas comerciales incluyen tiametoxam, clotianidina, e imidacloprida. Los insecticidas comerciales se usan de la forma más adecuada de acuerdo con las instrucciones del fabricante en las concentraciones recomendadas.

#### MÉTODOS

[0117] En otro aspecto, se divulgan los métodos del uso de cepas depositadas y composiciones descritas aquí.

[0118] En una forma de realización se describe un método para mejorar el crecimiento de las plantas. El método comprende la puesta en contacto de una planta o parte de planta con un inóculo de una o más cepas bacterianas seleccionadas del grupo consistente en:

La cepa depositada bajo el número de acceso NRRL B-50608;

La cepa depositada bajo el número de acceso NRRL B-50609;

La cepa depositada bajo el número de acceso NRRL B-50610;

La cepa depositada bajo el número de acceso NRRL B-50612 o

Una mezcla de dos o más de las cepas.

[0119] En una forma de realización particular, el inóculo puede comprender una o más de las cepas depositadas anteriormente mencionadas (por ejemplo, incluyendo al menos dos de las cepas anteriores, al menos tres de las cepas anteriores, al menos cuatro de las cepas anteriores, hasta e incluyendo todas las cepas anteriores).

[0120] En una forma de realización, el inóculo comprende la cepa depositada bajo el número de acceso NRRL B-50608. En una forma de realización, el inóculo comprende la cepa depositada bajo el número de acceso NRRL B-50609. En una forma de realización, el inóculo comprende la cepa depositada bajo el número de acceso NRRL B-50610. En una forma de realización, el inóculo comprende la cepa depositada bajo el número de acceso NRRL B-50612.

[0121] En otra forma de realización más, el paso de contactar una planta o parte de planta con un inóculo de una o más cepas bacterianas depositadas comprende el contacto de una planta o parte de planta con una o más de las composiciones descritas aquí. Se puede hacer que el inóculo(s) o composiciones contacten con la planta o parte de planta según métodos conocidos por los expertos en la técnica. Ejemplos no limitativos incluyen la introducción en surco, semillas de recubrimiento, etc. En una forma de realización particular, la fase de puesta en contacto comprende la introducción en surco del inóculo o composiciones descritas aquí.

En una forma de realización particular, la fase de puesta en contacto comprende la introducción sobre la semilla

(recubrimiento de semilla) del inóculo o composiciones descritas aquí.

[0122] En formas de realización determinadas, la etapa de contactar una planta o parte de planta con un inóculo de una o más de las cepas bacterianas depositadas comprende la introducción del inóculo en la tierra en una cantidad de  $1 \times 10^1 - 1 \times 10^8$ , más preferiblemente  $1 \times 10^6 - 1 \times 10^{12}$  unidades formadoras de colonias por hectárea.

En otras formas de realización determinadas, la etapa de contactar una planta o parte de planta con un inóculo de una o más de las cepas bacterianas depositadas comprende la introducción de las cepas bacterianas depositadas como una semilla recubierta con  $1 \times 10^1 - 1 \times 10^8$ , más preferiblemente  $1 \times 10^2 - 1 \times 10^6$ , de unidades formadoras de colonias por semilla.

[0123] En otro aspecto, el método comprende el crecimiento de plantas en un suelo que comprende una o más de la cepa bacteriana.

El método comprende:

A) tratar el suelo con un inóculo de una o más cepas bacterianas seleccionadas del grupo consistente en:

La cepa depositada bajo el número de acceso NRRL B-50608;

La cepa depositada bajo el número de acceso NRRL B-50609;

La cepa depositada bajo el número de acceso NRRL B-50610;

La cepa con el número de registro de depósito NRRL B-50612 o una mezcla de dos o más de las cepas; y

b) dejar crecer una planta en el suelo tratado.

[0124] En una forma de realización particular, el inóculo puede comprender una o más de las cepas depositadas anteriormente mencionadas (por ejemplo, incluyendo al menos dos de las cepas anteriores, al menos tres de las cepas anteriores, al menos cuatro de las cepas anteriores, hasta e incluyendo todas las cepas anteriores).

[0125] En una forma de realización, el inóculo comprende la cepa depositada bajo el número de acceso NRRL B-50608. En una forma de realización, el inóculo comprende la cepa depositada bajo el número de acceso NRRL B-50609. En una forma de realización, el inóculo comprende la cepa depositada bajo el número de acceso NRRL B-50610.

En una forma de realización, el inóculo comprende la cepa depositada bajo el número de acceso NRRL B-50612.

[0126] La etapa del tratamiento de la tierra con un inóculo de una o más de las cepas bacterianas depositadas comprende el tratamiento de la tierra con una o más de las composiciones descritas aquí.

El inóculo(s) o composiciones se pueden introducir en la tierra según métodos conocidos por los expertos en la técnica. Ejemplos no limitativos incluyen el tratamiento en surco, semillas de recubrimiento, etc. En una forma de realización particular, la etapa de tratamiento comprende el tratamiento en surco del inóculo o composiciones descritas aquí. En una forma de realización particular, la etapa de tratamiento comprende el tratamiento en semilla (revestimiento de semilla) del inóculo o las composiciones descritas aquí.

[0127] En una forma de realización particular, la etapa de tratar la tierra con un inóculo de uno o más de las cepas bacterianas depositadas comprende el tratamiento de la tierra con uno o más de las composiciones descritas aquí.

En formas de realización determinadas, la etapa de tratar la tierra con un inóculo de una o más de las cepas bacterianas depositadas comprende el tratamiento de la tierra con un inóculo en una cantidad de  $1 \times 10^1 - 1 \times 10^8$ , más preferiblemente  $1 \times 10^6 - 1 \times 10^{12}$  de unidades formadoras de colonias por hectárea. En otras formas de realización determinadas, la etapa de tratar la tierra con un inóculo de una o más de las cepas bacterianas depositadas comprende la introducción de las cepas bacterianas depositadas como una semilla recubierta con  $1 \times 10^1 - 1 \times 10^8$ , más preferiblemente  $1 \times 10^2 - 1 \times 10^6$  de unidades formadoras de colonias por semilla.

[0128] En otra forma de realización, el método comprende además la etapa de plantar una planta o parte de planta.

La etapa de plantación puede ocurrir antes, después o durante la etapa de tratamiento. En una forma de realización, la etapa de plantación ocurre antes de la etapa de tratamiento. En otra forma de realización, la etapa de plantación ocurre durante la etapa de tratamiento (por ejemplo, la etapa de plantación ocurre simultáneamente con la etapa de tratamiento, la etapa de plantación ocurre sustancialmente de forma simultánea con la etapa de tratamiento, etc. ). En otra forma de realización más, la etapa de plantación ocurre después de la fase de tratamiento.

[0129] En otra forma de realización, el método comprende además la etapa de someter al suelo a uno o más de los ingredientes beneficiosos agrícolamente descritos aquí.

En una forma de realización, la etapa de someter al suelo a uno o más de los ingredientes beneficiosos agrícolamente ocurre antes, durante, después, o simultáneamente con la etapa de tratamiento.

En una forma de realización, la etapa de someter al suelo a uno o más ingredientes beneficiosos agrícolamente ,como se describe en este caso, ocurre antes de la etapa del tratamiento. En otra forma de realización, la etapa de someter al suelo a uno o más ingredientes beneficiosos agrícolamente como se describe en este caso, ocurre durante la etapa del tratamiento. En otra forma de realización más, la etapa de someter al suelo a uno o más

ingredientes beneficiosos agrícolamente como se describe en este caso ocurre después de la fase de tratamiento.

En otra forma de realización más, la fase de someter al suelo a uno o más ingredientes beneficiosos agrícolamente, como se describe en este caso, ocurre simultáneamente con la etapa de tratamiento (por ejemplo, tratando la tierra con una o más de las composiciones descritas aquí, etc. ).

[0130] En otra forma de realización más, la invención incluye un método para tratar semillas que comprende la aplicación a las semillas de un inóculo de una o más cepas bacterianas seleccionadas del grupo consistente en:

La cepa depositada bajo el número de acceso NRRL B-50608;

La cepa depositada bajo el número de acceso NRRL B-50609;

La cepa depositada bajo el número de acceso NRRL B-50610;

La cepa depositada bajo el número de acceso NRRL B-50612 o una mezcla de dos o más de las cepas.

[0131] En una forma de realización particular, el método para tratar semillas puede comprender una o más de las cepas depositadas mencionadas anteriormente (por ejemplo, incluyendo al menos dos de las cepas anteriores, al menos tres de las cepas anteriores, al menos cuatro de las cepas anteriores, hasta e incluyendo todas las cepas anteriores).

[0132] En una forma de realización, el método de tratamiento de semillas comprende la aplicación a la semilla de la cepa depositada bajo el número de acceso NRRL B-50608. En una forma de realización, el método del tratamiento de semillas comprende la aplicación a la semilla la cepa depositada bajo el número de acceso NRRL B-50609. En una forma de realización, el método del tratamiento de semillas comprende la aplicación a la semilla la cepa depositada bajo el número de acceso NRRL B-50610. En una forma de realización, el método del tratamiento de semillas comprende la aplicación a la semilla la cepa depositada bajo el número de acceso NRRL B-50612.

[0133] En otra forma de realización más, el método comprende además la etapa de la aplicación a las semillas de uno o más ingredientes beneficiosos agrícolamente para la semilla.

En otra forma de realización, el método comprende la aplicación a las semillas de cualquiera de las composiciones descritas aquí para las semillas.

[0134] En otra forma de realización más, el método comprende el almacenamiento de semillas con un inóculo de al menos una o más de las cepas bacterianas aisladas en un ambiente libre sustancialmente de humedad durante un periodo de tiempo, por ejemplo, de al menos 1 día, al menos 2 días, al menos 3 días, al menos 4 días, al menos 5 días, al menos 6 días, al menos 1 semana, al menos 2 semanas, al menos 3 semanas, al menos 4 semanas, al menos 1 mes, al menos 2 meses, al menos 3 meses, al menos 4 meses, al menos 5 meses, al menos 6 meses, al menos 1 año o más. En un aspecto del método, las semillas son semillas de plantas leguminosas.

En otro aspecto, las semillas de plantas leguminosas son semillas de soja.

[0135] Los métodos descritos aquí son potencialmente útiles para mejorar las condiciones de crecimiento, lo que lleva a un aumento de la absorción de fósforo y/o rendimiento para cualquier tipo de planta. En una forma de realización particular la planta es seleccionada del grupo consistente en no legumbres, legumbres, Brassica spp., cereales, frutas, verduras, nueces, flores, y turba. Particularmente, los cereales son trigo, maíz, arroz, avena, centeno, cebada.

Particularmente, las legumbres son lentejas, garbanzos, alubias, semillas de soja, guisantes, y alfalfa.

[0136] En otra forma de realización particular las plantas son seleccionadas del grupo consistente en alfalfa, arroz, trigo, cebada, centeno, avena, algodón, girasol, cacahuete, maíz, patata, batata, judía, guisante, garbanzos, lenteja, achicoria, lechuga, endibia, repollo, coles de Bruselas, remolacha, chirivía, nabo, coliflor, brécol, nabo, rábano, espinaca, cebolla, ajo, berenjena, pimienta, apio, zanahoria, calabacín, calabaza, zapallo, pepino, manzana, pera, melón, cítrico fresa, uva, frambuesa, piña, soja, tabaco, tomate, sorgo, y caña de azúcar.

#### Recubrimientos de semilla

[0137] En otro aspecto, las semillas son recubiertas de una o más cepas bacterianas seleccionadas del grupo consistente en:

La cepa depositada bajo el número de acceso NRRL B-50608;

La cepa depositada bajo el número de acceso NRRL B-50609;

La cepa depositada bajo el número de acceso NRRL B-50610;

La cepa depositada bajo el número de acceso NRRL B-50611;

La cepa depositada bajo el número de acceso NRRL B-50612 o

Una mezcla de dos o más de las cepas.

[0138] En una forma de realización particular, la semilla(s) es recubierta de uno o más de las cepas depositadas anteriormente mencionadas (por ejemplo, incluyendo al menos dos de las cepas anteriores, al menos tres de las

cepas anteriores, al menos cuatro de las cepas anteriores, hasta e incluyendo todas las cepas anteriores).

5 [0139] En una forma de realización, la semilla(s) es recubierta con la cepa depositada bajo el número de acceso NRRL B-50608. En una forma de realización, la semilla(s) es recubierta con la cepa depositada bajo el número de acceso NRRL B-50609. En una forma de realización, la semilla(s) es recubierta con la cepa depositada bajo el número de acceso NRRL B-50610. En una forma de realización, la semilla(s) es recubierta con la cepa depositada bajo el número de acceso NRRL B-50611. En una forma de realización, la semilla(s) es recubierta con la cepa con el número de registro de depósito NRRL B-50612.

10 [0140] En una forma de realización, las semillas se pueden tratar con cualquiera de la(s) composición(es) descrita(s) aquí de diferentes maneras, pero preferiblemente por pulverización o goteo.  
El tratamiento de pulverización y goteo se puede realizar por la formulación de las composiciones descritas aquí y por pulverización o goteo de la composición(es) sobre una semilla(s) por medio de un sistema de tratamiento continuo (que se calibra para aplicar el tratamiento a un índice predefinido en proporción al flujo continuo de semillas), tal como un tratador tipo tambor. También se pueden usar los sistemas de lote, donde se suministra a una mezcladora un tamaño de lote predeterminado de semilla y composición(es) como se describe en este caso. Los sistemas y aparatos para realizar estos procesos son disponibles comercialmente de numerosos proveedores, por ejemplo, Bayer CropScience (Gustafson).

20 [0141] En otra forma de realización, el tratamiento implica el recubrimiento de semillas.  
Un proceso de este tipo implica el recubrimiento de la pared interna de un contenedor redondo con la composición(es) descrita aquí, la adición de semillas, girar después el contenedor para hacer que las semillas contacten con la pared y la composición(es), un proceso conocido en la técnica como "revestimiento de contenedor".

25 Las semillas se pueden revestir por combinaciones de métodos de recubrimiento. El remojo implica típicamente el uso de formas líquidas de las composiciones descritas. Por ejemplo, semillas se pueden empapar durante aproximadamente 1 minuto hasta aproximadamente 24 horas (por ejemplo, durante al menos 1 min, 5 min, 10 min, 20 min, 40 min, 80 min, 3 horas, 6 horas, 12 horas, 24 horas).

30 [0142] En formas de realización determinadas, una semilla(s) recubierta con una o más de las composiciones descritas aquí comprenderá  $1 \times 10^1$  -  $1 \times 10^8$ , más preferiblemente  $1 \times 10^2$  -  $1 \times 10^6$  de unidades de formación de colonias de una o más de las cepas bacterianas depositadas por semilla.

Ejemplos

35 [0143] Los ejemplos siguientes se proporcionan para uso ilustrativo y no se destinan a limitar el ámbito de la invención como se reivindica aquí. Cualquier variación en los ejemplos ilustrativos que se le ocurran al experto en la materia deben caer dentro del campo de la presente invención.

40 Materiales & métodos

Depósito de Material biológico

45 [0144] El siguiente material biológico ha sido depositado según los términos del Tratado de Budapest en el Microbial Genomics and Bioprocessing Research Unit (NRRL) National Center for Agricultural Utilization Research 1815 N. University Street, Peoria, IL 61604, USA y se le ha dado el siguiente número de acceso:

Tabla 1: Depósito de material biológico

Identificación	Número de Acceso	Fecha de depósito
<i>Bradyrhizobia japonicum</i>	NRRL B-50612	30 Nov. 2011
<i>Bradyrhizobia japonicum</i>	NRRL B-50611	30 Nov. 2011
<i>Bradyrhizobia japonicum</i>	NRRL B-50610	30 Nov. 2011
<i>Bradyrhizobia japonicum</i>	NRRL B-50609	30 Nov. 2011
<i>Bradyrhizobia japonicum</i>	NRRL B-50608	30 Nov. 2011

50 [0145] Las cepas han sido depositadas bajo condiciones que aseguran que el acceso al cultivo estará disponible durante la pendencia de esta solicitud de patente para aquel que según el Comisionado de Patentes y Marcas tenga derecho a ello según 37 C.F.R. §1.14 and 35 U.S.C. §122. El depósito representa un cultivo puro de la cepa depositada. El depósito está disponible según sea necesario por las leyes extranjeras de patentes en países donde se han presentado equivalentes de la solicitud de que se trata o su descendencia.  
55 Sin embargo, se debe entender que la disponibilidad de un depósito no constituye una licencia para practicar la presente invención en la derogación de derechos de patente concedidos por acción gubernamental.

Medios

[0146]

Tabla 2: Componentes del medio G16.

5

<b>G16 Constituyentes (g/L agua desionizada destilada (DDW))</b>	<b>g/L</b>
Fosfato potásico dibásico $K_2HPO_4$	0.550
Heptahidrato de sulfato magnésico $MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.200
Dihidrato de cloruro de calcio $CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0.130
Extracto de levadura de oxoid (LP0021)	0.750
Cloruro amónico $NH_4Cl$	0.200
Monohidrato monosódico de ácido L-glutámico	0.250
Sacarosa	1.500
Dextrosa anhidro	4.500
Hierro (III) cloruro hexahidrato $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ Stock (80g/L DDW) almacenado a 4°C hasta 6 meses)	0.200
Sólidos de maíz remojado (Sigma)	0.400
Stock de oligoelementos (véase abajo)*	365 µl
Stock de vitaminas (véase abajo) **	365 µl
pH	6.800

Tabla 3: Almacén de stock de oligoelementos a 4°C para hasta 6 meses.

<b>Constituyente (g/L DDW)</b>	<b>g/L</b>
Níquel (II) Cloruro Hexahidrato $NiCl_2 \cdot 6H_2O$	0.69
Pentahidrato de sulfato cúprico $CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0.22
Ácido bórico $H_3BO_3$	7.87
monohidrato de sulfato manganésico $MnSO_4 \cdot H_2O$	5.06
Heptahidrato de sulfato de Zinc $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0.61
Molibdato de sodio $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0.61
Cobalto (II) hexahidrato $CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0.66
*Los oligoelementos se agregan con todos los otros componentes antes de la esterilización	

10 Tabla 4: Stock de vitaminas - filtro esterilizado seguido del almacenamiento a 4°C para hasta 6 meses.

<b>Constituyente (g/L DDW)</b>	<b>g/L</b>
Hidrocloreto de tiamina	1.38
Ácido pantoténico	0.55
**Las vitaminas son agregadas después de que los medios han sido esterilizados y enfriados, típicamente durante el tiempo de la inoculación.	

Tabla 5: Componentes de medio de manitol de extracto de levadura (YEM).

15

<b>Constituyentes de Agar de manitol de extracto de levadura (YEMA) (g/L DDW)</b>	<b>g/L o mL/L</b>
Manitol	10.0g
Extracto de levadura de oxoid (LP0021)	0.50g
Cloruro sódico NaCl	0.10g
STOCK - fosfato potásico dibásico $K_2HPO_4$ (50g/1000ml)	10mL
STOCK - heptahidrato de sulfato magnésico $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (20g/1000ml)	10mL
pH	6.8

Ejemplo I: Determinar 99.99% de índice de muerte para USDA 532C

20 [0147] El experimento(s) siguiente, consistente en tres (3) estudios, fue realizado para determinar el 99.99% de índice de muerte para la cepa parental *Bradyrhizobia japonicum* USDA 532C.

25 [0148] La cepa parental USDA 532C creció en dos tubos de cultivo desechables 10ml G16 (tablas 2-4) y YEM (tabla 5) (VWR, 18x150mm, #47729-583) durante dos días y se cosechó para obtener la concentración máxima de células. Esto se consiguió por la combinación de ambos tubos de cultivo en un tubo y concentración de las células hasta 2ml.

Aproximadamente cincuenta semillas de soja (variedad Stine RR 1108-4) fueron esterilizadas en superficie en tubo centrífugo estéril desechable de 50ml, (Fisher Brand, #06-443-18) conteniendo 5% de solución blanqueante doméstica durante 30 segundos y se enjuagaron con agua desionizada estéril (DI).

5 La etapa de esterilización fue repetida cinco veces. Las semillas fueron inmediatamente colocadas en una placa de Petri esterilizada y secadas bajo la cubierta laminar. Una vez que las semillas estaban completamente secas y transferidas a un matraz de 250ml, 1.5ml de cultivo concentrado de cepa parental USDA 532C se añadieron a las semillas.

10 Las semillas fueron rodadas en el matraz para revestir uniformemente las semillas y se dejaron secar bajo la cubierta. El matraz que contenía las semillas se envolvió en papel azul de esterilización y se dejó en la cubierta hasta que se completó el experimento. Fueron tomados puntos temporales a tiempo cero, cada dos días durante una semana, y cada semana hasta que ocurrió la muerte celular completa. Los resultados se proporcionan en la tabla 6.

15 Tabla 6: CFU por semilla y porcentaje de índice de muerte para el estudio 1.

Número de días	CFU por semilla	porcentaje de índice de muerte
0	$3.06 \times 10^8$	0.00
3	$3.72 \times 10^7$	87.86
7	$4.20 \times 10^6$	98.63
14	$3.07 \times 10^6$	99.00
18	$6.43 \times 10^5$	99.79
24	$2.87 \times 10^5$	99.91
37	$2.64 \times 10^4$	99.99

[0149] Como se muestra en la tabla 6, la CFU inicial por semilla para la cepa parental USDA 532C era  $3.06 \times 10^8$  y en los días 37 la CFU era de  $2.64 \times 10^4$ .

20 El porcentaje de índice de muerte desde el tiempo 0 hasta 37 días fue calculado como de 99.99%.

[0150] El procedimiento fue repetido excepto que se usó G16 como el medio de crecimiento inicial. Los resultados se proporcionan en la tabla 7.

25 Tabla 7: CFU por semilla y porcentaje de índice de muerte para el estudio 2.

Número de días	CFU por semilla	Porcentaje de índice de muerte
0	$2.01 \times 10^9$	0.00
2	$3.13 \times 10^8$	84.41
6	$3.26 \times 10^7$	98.38
10	$9.14 \times 10^6$	99.55
16	$3.50 \times 10^6$	99.83
22	$1.40 \times 10^6$	99.93
29	$3.38 \times 10^5$	99.98
37	$6.23 \times 10^4$	100.00

[0151] Como se muestra en la tabla 7, cuando se usó G16 como el medio de crecimiento inicial, llevó de 29 a 37 días que el porcentaje de índice de muerte alcanzara el 99.99%.

30 [0152] Se completó un tercer estudio de desecación para determinar si los medios G16 y YEM afectaron al índice de desecación de la cepa parental USDA 532C. Los resultados se proporcionan en las tablas 8 y 9 respectivamente.

35 Tabla 8: CFU por semilla y porcentaje de índice de muerte para la cepa madre USDA 532C crecida en el medio G16.

Número de días	CFU por semilla	Porcentaje de índice de muerte
0	$2.95 \times 10^9$	0.00
2	$8.69 \times 10^7$	97.06
7	$2.93 \times 10^7$	99.01
14	$1.68 \times 10^7$	99.43
21	$2.11 \times 10^6$	99.93
28	$7.50 \times 10^4$	100.00

40 Tabla 9: CFU por semilla y porcentaje de índice de muerte para la cepa parental USDA 532C crecida en el medio YEM.

Número de días	CFU por semilla	Porcentaje de índice de muerte
0	$2.90 \times 10^8$	0.00
2	$3.46 \times 10^6$	98.81
7	$1.81 \times 10^6$	99.38
14	$1.31 \times 10^6$	99.55
21	$7.33 \times 10^5$	99.75
28	$7.00 \times 10^4$	99.98

[0153] Como se muestra en las tablas 8 y 9, no había ninguna diferencia en el índice de desecación para la cepa parental USDA 532C cuando creció en G16 o YEM.

5 El índice de muerte de 99.99% se observó para el tercer estudio a los aproximadamente 28 días que es similar al observado en los estudios uno (1) y dos (2) supra.

**Ejemplo II: Determinar el índice de muerte de USDA 532C usando metanosulfonato de etilo (EMS)**

10 [0154] Se realizó el(los) siguiente(s) experimento(s) para determinar el índice de aplicación del mutagen, metanosulfonato de etilo (EMS) que daría un porcentaje de índice de muerte de 99.9-99.99 para la cepa parental USDA 532C.

Esta determinación del índice se hará parte del protocolo de mutagénesis usado para generar mutantes putativos resistentes a la desecación aunque el método de mutagénesis se puede desarrollar en cuanto a la eficacia.

15 Preparación de inóculos:

[0155] La cepa Parental USDA 532C creció en seis tubos de cultivo desechables de 10ml de YEM durante dos días y 5ml del cultivo fueron inoculados en cuatro matraces de 250ml que contenían 50ml del medio YEM.

20 Los matraces se incubaron durante dos días a 30°C en un agitador.

El cultivo de los matraces se centrifugó posteriormente en tubos estériles desechables de 50ml a 8,000rpm durante diez minutos en un tubo de centrifuga Sorvall Plus® de RC 6 y se combinó en un tubo. El granulado fue resuspendido en 4ml de medio fresco YEM y se separó en cuatro tubos de microcentrifugas de 1.5ml. Los tubos representarían cada uno índices de aplicación diferentes usados para el proceso de mutagénesis.

25 Proceso de mutagénesis:

[0156] Una vez el cultivo se había dividido en partes alícuotas en tubos separados y el mutagen EMS (Sigma, C3H8O3S, FW 124.16, #M0880-1G) se añadió a cada tubo, los tubos fueron agitados en vortex enérgicamente y colocados en un matraz vacío de 250ml. El matraz que contenía los tubos de reacción se incubó durante 30 minutos a 30°C en un agitador.

30 Inmediatamente después del periodo de incubación, los tubos fueron lavados cinco veces con 0,16M de solución de tiosulfato de sodio (STS, Fisher Chemical, Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>\*5H<sub>2</sub>O, FW 248.18, #S445-3)) para inactivar el mutagen. Después del lavado, las células en los tubos de reacción fueron cortadas con aguja de jeringa de calibre 21 (BD 1ml 21G1 Latex Free Syringe PrecisionGlide® Needle, 0.8mmx25mm, #309624) y las diluciones fueron completadas y colocadas en placas YEMA. Las cuentas celulares estaban disponibles después de cinco días de incubación a 30°C y se calculó el porcentaje de muerte del índice de aplicación de EMS.

35 Para calcular el porcentaje de índice de muerte para cada índice de aplicación se usó la siguiente ecuación: ([ cuenta celular 0µl EMS (control) - (cuenta celular de µl EMS (tratamiento)) ÷ cuenta celular 0µl EMS (control )] x 100%). Todos los otros experimentos que siguieron a este experimento usaron esta ecuación para calcular el porcentaje de índice de muerte. Los resultados se proporcionan en la tabla 10.

Tabla 10: Índices iniciales de EMS para determinar el límite superior de mutagénesis para la cepa madre USDA 532C

Índice de aplicación	Cuentas celulares (aproximadamente cfu/ml)
0µl EMS (control)	$10^8$ cfu/ml
1µl EMS	resultados similares a 0µl EMS $10^7$ cfu/mL
10µl EMS	resultados similares a 1µl EMS
100µl EMS	100% de índice de muerte

[0157] Como se muestra en la tabla 10, los índices iniciales de EMS usados eran 0 µl, 1 µl, 10µl y 100µl. No había ninguna diferencia entre 0µl, 1µl, y 10µl EMS, pero 100µl EMS resultaron en 100% de muerte.

50 [0158] Los experimentos fueron repetidos y mejorados para determinar el índice de muerte aceptable. Véanse las tablas 11-17.

Tabla 11: Mejora de los índices de EMS para determinar el 99.9% de índice de muerte para la cepa madre USDA

532C

Índice de aplicación	Cuentas celulares (aproximadamente cfu/ml)	Porcentaje de índice de muerte
0µl EMS (control)	2.49 x 10 <sup>9</sup> cfu/ml	
15µl EMS	2.24 x 10 <sup>9</sup> cfu/ml	10.17%
25µl EMS	1.72 x 10 <sup>9</sup> cfu/ml	30.92%
50µl EMS	1.67 x 10 <sup>1</sup> cfu/ml	100%

5 [0159] Partiendo del hallazgo inicial, la cantidad de EMS usada fue restringida a 0µl, 15µl, 25µl y 50µl de EMS. Como se muestra en la tabla 11, el porcentaje de índice de muerte era de 10.17% a 30.92% para aplicaciones de 15µl y 25µl de EMS y 100% para 50µl.

Tabla 12: Mejora adicional de los índices de aplicación de EMS para la cepa madre USDA 532C

Índice de aplicación	Cuentas celulares (aproximadamente cfu/ml)	Porcentaje de índice de muerte
0µl EMS (control)	4.70 x 10 <sup>9</sup> cfu/ml	
25µl EMS	1.27 x 10 <sup>9</sup> UFC/mL	73.09%
35µl EMS	5.37 x 10 <sup>8</sup> UFC/mL	88.58%
50µl EMS	2.93 x 10 <sup>2</sup> UFC/mL	100%

10 [0160] A partir de la tabla 11 se determinó que 25µl de EMS era todavía demasiado bajo de un índice de muerte. Las cantidades de aplicación para la tabla 12 fueron 0µl, 25µl, 35µl, y 50µl EMS. La aplicación a 25µl de EMS tenía un índice de muerte más alto que los resultados de la tabla 11 debido a la disminución del lavado; por lo tanto, el índice de muerte fue superior a lo previsto.  
 15 Sin embargo, el índice de muerte era todavía demasiado bajo en 88.58% de muerte, aún cuando se usaron 35µl de EMS. Véase la tabla 12.

Tabla 13: Mejora adicional de los índices de aplicación de EMS para la cepa madre USDA 532C

Índice de aplicación	Cuentas celulares (aproximadamente cfu/ml)	Porcentaje de índice de muerte
0µl EMS (control)	3.93 x 10 <sup>9</sup> cfu/ml	
40µl EMS	6.97 x 10 <sup>8</sup> cfu/ml	82.26%
45µl EMS	8.57 x 10 <sup>7</sup> cfu/ml	97.82%
50µl EMS	2.65 x 10 <sup>5</sup> cfu/ml	99.99%

20 [0161] La cantidad de EMS usada fue aumentada a 40µl, 45µl, y 50µl de EMS. Los índices de dosis de EMS resultaron en porcentaje de índice de muerte de 82.26%-99.99%. Véase la tabla 13.

Tabla 14: índice de aplicación repetido usado en la tabla 13.

Índice de aplicación	Cuentas celulares (aproximadamente cfu/ml)	Porcentaje de índice de muerte
0µl EMS (control)	7.07 x 10 <sup>11</sup> cfu/mL	
40µl EMS	1.35 x 10 <sup>9</sup> cfu/mL	99.81%
45µl EMS	5.27 x 10 <sup>8</sup> cfu/mL	99.93%
50µl EMS	2.19 x 10 <sup>6</sup> cfu/mL	100%

30 [0162] Los resultados proporcionados en la tabla 13 fueron repetidos nuevamente en la tabla 14 usando los mismos índices de EMS y esta vez el porcentaje de muerte era de 99.81% para 40µl EMS y de 99.93% para 45µl EMS y del 100% para 50µl EMS. El índice de muerte deseado del 99.9% fue observado cuando se usaron 45µl EMS, de modo que la aplicación será repetida. Véase la tabla 15.

Tabla 15: índice de aplicación repetida usada en la tabla 14.

Índice de aplicación	Cuentas celulares (aproximadamente cfu/ml)	Porcentaje de índice de muerte
0µl EMS (control)	1.51 x 10 <sup>8</sup> cfu/ml	
45µl EMS	3.33 x 10 <sup>4</sup> cfu/ml	99.98%
50µl EMS	4.33 x 10 <sup>1</sup> cfu/ml	100%

35 [0163] El índice de aplicación de 45µl EMS se duplicó para determinar si los resultados de la tabla 14 eran

repetibles.

El índice de muerte para 45µl EMS era de 99.98%. Véase la tabla 15.

### Ejemplo III: Mutagénesis

[0164] El(los) experimento(s) siguiente(s) se realizó(aron) para generar mutantes putativos resistentes a la desecación de cepas de la cepa parental USDA 532C usando la mutagénesis tradicional, por ejemplo, química.

#### Preparación de inóculos:

[0165] Una suspensión celular de la cepa parental USDA 532C se realizó tomando un bucle de células a partir de una placa fresca de USDA 532C usando un bucle de plástico estéril de 10µl (Fisher brand, #22-363-600) y mezclando las células en 1ml de agua esterilizada desionizada (DI) en 1.5ml de tubo de microcentrifuga desechable.

La suspensión celular fue inoculada en dos matraces de 250ml que contenían 50ml de medio YEM para conseguir una densidad óptica final (OD)  $OD_{600nm}$  de 0.01.

Los matraces fueron incubados a 30°C durante tres días y se combinaron los cultivos de los dos matraces.

El cultivo fue centrifugado durante veinte minutos a 8,000 r.p.m. en una centrifugadora Sorvall RC 6 Plus.

El sobrenadante fue desechado y el granulado resuspendido de 30ml DI agua.

OD fue tomado del cultivo concentrado y fue inoculado en diez matraces de 250ml que contenían 50ml de medio YEM a  $OD=0.05$ . Estos matraces fueron incubados a 30°C en un agitador durante dos días antes de usar el cultivo para la mutagénesis.

#### Proceso de mutagénesis:

[0166] Los cultivos de los diez matraces fueron combinados en una botella centrífuga de 1 L. La densidad óptica de los cultivos combinados fue registrada y los cultivos fueron centrifugados durante 20 minutos a 8,000 r.p.m. en la centrífuga Sorvall RC 6 Plus ®. La mayoría del sobrenadante fue desechada dejando aproximadamente 30ml del sobrenadante en la botella centrífuga. El sobrenadante fue mezclado con el granulado y transferido a un tubo de centrífuga desechable estéril de 50ml.

El OD del cultivo concentrado fue tomado y registrado. 1 ml del cultivo concentrado fue colocado en seis tubos de microcentrifuga desechables de 1.5ml. Los tubos de microcentrifuga fueron centrifugados y el sobrenadante fue desechado. Esto se repitió tres veces más o hasta que el tamaño del granulado había alcanzado la marca de 0.1ml en el tubo de microcentrifuga. Las células fueron mezcladas bien con 1ml de un medio fresco de YEM usando una aguja de jeringa estéril de 1ml de calibre 21 antes de la adición del mutagen, metanosulfonato de etilo (EMS). Los índices del mutagen añadido a cada tubo contenía una dosis alta y baja con dosificaciones de medio entre las dosis altas y bajas, como indicado en el Experimento II.

[0167] Inmediatamente después de la adición de EMS, los tubos de reacción fueron colocados en un matraz vacío de 250ml e incubados a 30°C durante 30 minutos.

Tras la incubación, los tubos de reacción fueron centrifugados durante un minuto a 13,200 r.p.m. utilizando la centrifugadora Eppendorf 5415D. El sobrenadante de los tubos de reacción fue desechado.

El mutagen en los tubos de reacción fue inactivado mediante lavado cinco veces con 1 ml de 0.16M de tiosulfato de sodio (STS) y mezclado enérgicamente por la agitación en vortex de los tubos.

Para cada ciclo de lavado, los tubos de reacción fueron centrifugados después de la agitación en vortex y el sobrenadante fue desechado. Después de la quinta vez, los tubos de reacción fueron todos combinados en un tubo desechable sw 15ml para usar en el proceso de enriquecimiento.

### Ejemplo IV: Enriquecimiento y desecación

[0168] El(los) experimento(s) siguiente(s) fueron realizados para enriquecer y desecar las células mutadas de la cepa parental USDA 532C para eliminar las escapadas tipo silvestre y aumentar la población mutante putativa y hacer más fácil aislar el mutante(s) que tengan características resistentes a la desecación.

[0169] La cepa Parental USDA 532C fue sometida al proceso de mutagénesis mencionado en el ejemplo III. La población mutada de la cepa madre USDA 532C fue enriquecida por la inoculación de 0.5ml de la reacción en dos matraces de 50ml YEM y por incubación de las células durante dos días a 30°C en un agitador. Después dos días, los cultivos fueron secados mediante el revestimiento las células sobre semillas de soja y filtros de membrana y sometidos a condiciones de secado. El cultivo desde la etapa de enriquecimiento fue ajustado a  $OD_{600nm}$  de 0.5 antes de ser usado para revestir tanto semillas de soja como filtros de membrana.

#### Recubrimiento de semillas de soja:

[0170] Cuarenta semillas de soja esterilizada fueron recubiertas con 0.5ml del cultivo.

Las semillas fueron colocadas en un matraz estéril de 100ml para secar bajo la cubierta laminar y cubiertas con papel de autoclave. Se tomaron muestras triples de las semillas para obtener una cfu inicial de las semillas.

Para cada muestra, se colocaron tres semillas en un tubo desechable de 15ml que contenía 5ml de agua estéril DI y se dejó que se expandieran en el tubo durante aproximadamente dos horas antes de que la suspensión fuera diluida en serie y extendida sobre placas YEMA.

Las semillas restantes se dejaron en la cubierta, el matraz fue colocado bajo la cubierta durante cuatro días antes de enriquecer las semillas.

[0171] Para enriquecer las semillas, se colocaron veinte semillas en un matraz de 250ml que contenía 50ml de YEM fresco.

Una cfu final fue tomada también cuando las semillas fueron enriquecidas para determinar el porcentaje de índice de muerte de la población celular. El mismo muestreo fue completado para el segundo punto en el tiempo como el punto en el tiempo inicial. Después de que el cultivo que contenía las semillas fue incubado durante dos días, el cultivo fue cosechado eliminando cualquier resto de semilla permitiendo que se resto se instalara antes de retirar el sobrenadante. El sobrenadante del cultivo fue centrifugado y el granulado lavado con agua DI estéril antes de usar el cultivo para revestir conjuntos nuevos de semillas de soja.

Este proceso fue repetido hasta que el porcentaje de índice de muerte calculado del cultivo celular era menor al 80%.

Una vez fue conseguido el 80%, la población celular estaba lista para el aislamiento de los mutantes putativos para el experimento de confirmación.

#### Recubrimiento de filtros de membrana:

[0172] Para controlar la inconsistencia de las semillas de soja y los flujos de contaminación, se usaron filtros de membrana como un medio alternativo para recubrimiento de célula. Para filtros de membrana, se usó 1 ml del cultivo para revestir filtros de membrana tanto durapore (Millipore, 0.22 µm, PVDF, #GVWP02500) como isopore (Millipore, 0.4 µm, polycarbonate, # HTTP02500)

Para cada tipo de filtro, fueron recubiertos quince filtros usando un portafiltro de jeringa de presión fácil de 25mm (VWR; #28144-109) y los filtros fueron colocados en la placa de Petri estéril que contiene dos piezas de papel de Whatman, estéril, cualitativo de 125mm (Whatman, #1001125).

Una vez los filtros fueron secados bajo la cubierta laminar, triplicados iniciales de cfu fueron tomados para cada tipo de filtro por la colocación de un filtro en un tubo desechable de 15ml que contenía 5ml de agua estéril DI y se mezcló por la agitación en vortex.

Después dos horas en remojo en el tubo de 15ml, la suspensión de filtro fue diluida y colocada en placas sobre placas de YEMA. Después de que los filtros se habían secado bajo la cubierta durante tres días, ocho filtros fueron adicionados en un matraz de 250ml con 50ml de YEM fresco y se incubaron a 30°C durante tres días.

[0173] Un cfu final fue tomado al mismo tiempo que fueron enriquecidos los filtros para obtener el cálculo del porcentaje de índice de muerte. Fue usado el mismo método para el cfu final que el cfu inicial.

El proceso del recubrimiento y secado fue repetido hasta que el porcentaje de índice de muerte era menor al 80%.

Después de que se consiguió el 80%, se seleccionaron aislados de colonia individual para otra confirmación.

#### **Ejemplo V: Confirmación de mutantes putativos**

[0174] El(los) experimento(s) siguiente(s) era(n) para confirmar los mutantes putativos resistentes a la desecación por la comparación de su supervivencia sobre la semilla después de la aplicación de la semilla solicitud con la cepa madre original, la cepa de *Bradyrhizobium japonicum* USDA 532C.

[0175] Cuando se observó el 80% de índice de muerte para las semillas o filtros, se escogieron de forma aleatoria colonias individuales del punto en el tiempo final y los mutantes putativos de un conjunto de mutagénesis fueron analizados en cuanto a sus características de tolerancia a la desecación. Las veinte colonias individuales escogidas de cada conjunto de resultados de mutagénesis fueron cultivados individualmente en un matraz de 250ml que contenía 50ml de medio de YEM. Cada cepa mutante putativa fue incubada a 30°C en agitador durante tres días y el OD para cada cepa fue ajustado a 0.5.

Cada cepa fue usada para revestir treinta semillas de soja no esterilizadas con 0.5ml de cultivo en un matraz de 100ml cubierto con papel de autoclave.

Los puntos temporales fueron tomados en T=0, T=3, y T=7 días para el primer ciclo.

Se tomaron muestreos triples de semillas de soja para cada punto temporal, donde cada muestra consistía en tres semillas colocadas en 5ml de agua DI estéril en un tubo desechable de 15ml. Se dejó que las semillas se expandieran durante dos horas antes de que cada muestra fuera diluida y colocada en placas sobre placas de YEMA.

Después de la comparación de la cantidad de células recuperadas de cada punto en el tiempo en relación con la cepa madre USDA 532C, cualquier cepa que se realizara mejor que la cepa madre fue sometida a un segundo ciclo de confirmación. Véase Fig. 1. Para el segundo ciclo, las cepas que tenían la mejor tolerancia a la desecación en comparación con el tipo silvestre fueron evaluadas nuevamente en cuanto a la desecación. Véase la Fig. 2. Los puntos temporales fueron tomados en T=0, T=7, y T=14 días. El conjunto de mutantes putativos del segundo ciclo fue además confirmado en cuanto a la tolerancia a la desecación dos veces más. Véanse las

figuras 3-6.

[0176] Veinte mutantes putativos de la cepa madre USDA 532C fueron aislados y seleccionados en cuanto a la resistencia a la desecación. Véanse figuras 1-3.

5 De las veinte cepas putativas evaluadas, cinco cepas mutantes putativas fueron confirmadas en cuanto a sus características de tolerancia a la desecación cuando se comparan con la tolerancia a la desecación de la cepa madre, la cepa *Bradyrhizobium japonicum* USDA 532C. Véanse Figs 4-6.

Ejemplo VI: prueba de invernadero de cepas mutantes confirmadas

10

[0177] El(los) experimento(s) siguiente(s) fueron realizados para probar las cepas mutantes putativas en el invernadero para probar el rendimiento de las cepas mutantes contra el rendimiento de la cepa madre, USDA 532C.

15

[0178] Las cepas mutantes que presentan la mejor tolerancia a la desecación en comparación con la cepa madre USDA 532C fueron evaluadas en el invernadero en cuanto al rendimiento contra la cepa madre USDA 532C. Las cepas mutante y madre se cultivaron en 50ml de YEM durante dos días antes del recubrimiento de las semillas. Cada cepa fue plantada tres veces diferentes; T=0, T=7, y T=14 días después del recubrimiento de las semillas. Todos los puntos temporales fueron configurados al mismo tiempo pero las semillas fueron plantados en los tiempos específicos.

20

Para hacer la configuración para los puntos temporales, treinta semillas de soja fueron recubiertas con 0.5ml de cultivo en matraz de 100ml de  $OD_{600nm}=0.5$  y el punto en el tiempo del día T=0 se permitió que reposara bajo la cubierta durante 30 minutos antes de la plantación.

Los otros dos puntos temporales se dejaron secar completamente y se cubrieron con papel de autoclave.

25

Las semillas de los dos últimos puntos temporales se plantaron a una fecha posterior. En cada punto en el tiempo, se plantaron dos semillas por vasija para diez vasijas por cepa. Las semillas sobrantes fueron usadas para tomar una cfu para comparación con T=0. Después de nueve semanas de crecimiento en el invernadero, las vainas de soja fueron cosechadas de cada planta desde cada punto en el tiempo y los pesos secos se analizaron en cuanto a su significación estadística.

30

[0179] Cuando los pesos de las vainas de soja de las cepas mutantes se compararon con la cepa madre en cualquiera de los puntos temporales, no había ninguna significación estadística al 95% de confianza.

Esto indica que no había ningún diferencia de rendimiento entre las cepas mutante y cepa madre que afectara a la producción de vainas de soja cuando las cepas mutantes fueron usadas para revestir las semillas de soja.

35

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Cultivo biológicamente puro de una cepa *Bradyrhizobium japonicum* seleccionada del grupo consistente en:  
 La cepa depositada bajo el número de acceso NRRL B-50612;  
 La cepa depositada bajo el número de acceso NRRL B-50610;  
 La cepa depositada bajo el número de acceso NRRL B-50609;  
 La cepa depositada bajo el número de acceso NRRL B-50608, o una combinación de al menos dos o más de las  
 10 cepas.
2. Composición que comprende una o más de dicha(s) cepa(s) bacteriana(s) aislada(s) según la reivindicación 1 y un portador agrícolamente adecuado.
- 15 3. Composición según la reivindicación 2, donde la composición incluye al menos un ingrediente agrícolamente beneficioso.
4. Composición según la reivindicación 3, donde dicho al menos un ingrediente agrícolamente beneficioso incluye una o más moléculas de señal de planta.
- 20 5. Composición según la reivindicación 4, donde la molécula de señal de planta es un lipo-quitooligosacárido (LCO).
6. Composición según la reivindicación 4, donde la molécula de señal de planta es un compuesto quitinoso.
- 25 7. Composición según la reivindicación 6, donde el compuesto quitinoso es un quito-oligómero (CO).
8. Composición según la reivindicación 4, donde la molécula de señal de planta es un flavonoide.
- 30 9. Composición según la reivindicación 8, donde el flavonoide es seleccionado del grupo consistente en luteolina, apigenina, tangeritina, quercetina, canferol, miricetina, fisetina, isoramnetina, pachipodol, ramnacina, hesperetina, naringenina, formononetina, eriodictiol, homoeriodictiol, taxifolina, dihidroquercetina, dihidrocanferol, genisteína, daidceína, gliciteína, catequina, galocatequina, catequina 3-gallato, galocatequina 3-gallato, epicatequina, epigallocatequina, epicatequina 3-gallato, epigallocatequina 3-gallato, cianidina, delphinidina, malvidina, pelargonidina, peonidina, petunidina, o derivados de los mismos.
- 35 10. Método para tratar semillas que comprende la aplicación a dichas semillas de un inóculo de una o más de la(s) cepa(s) bacteriana(s) aislada(s) según la reivindicación 1.
- 40 11. Método según la reivindicación 10, donde una composición según cualquiera de las reivindicaciones 2-9 se aplica a una semilla.
12. Método según la reivindicación 11, donde dichas semillas son semillas de plantas leguminosa.
- 45 13. Método según la reivindicación 12, donde dichas semillas de plantas leguminosas son semillas de soja.
14. Semilla recubierta con una composición según cualquiera de las reivindicaciones 2-9.

### Desección de Mutantes Putativos

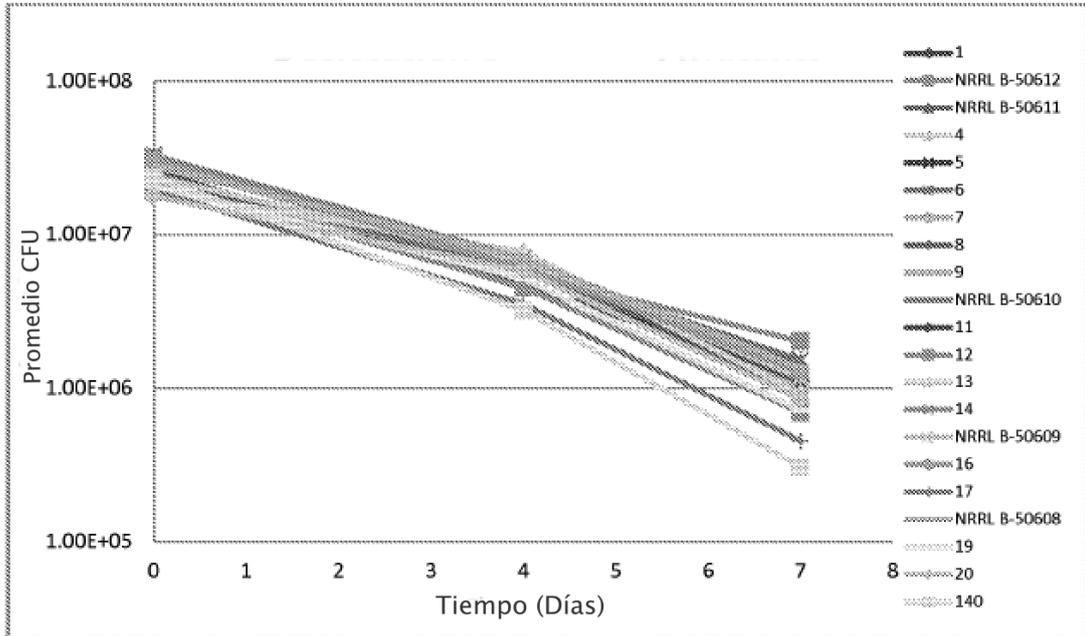


FIG 1

### Desección de Mutantes Putativos

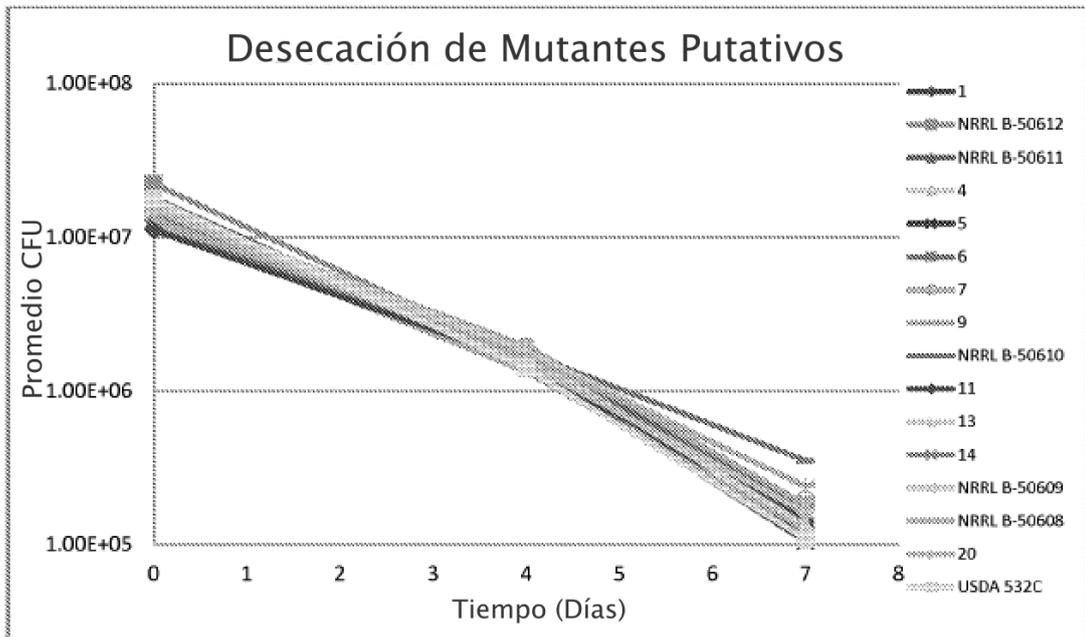


FIG 2

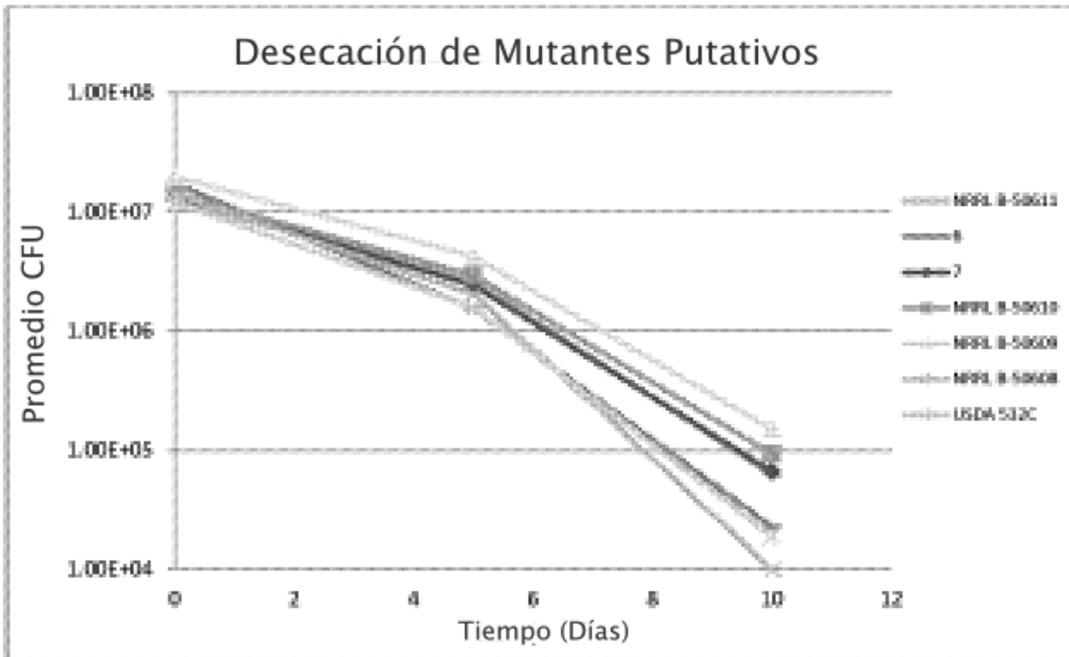


FIG 3

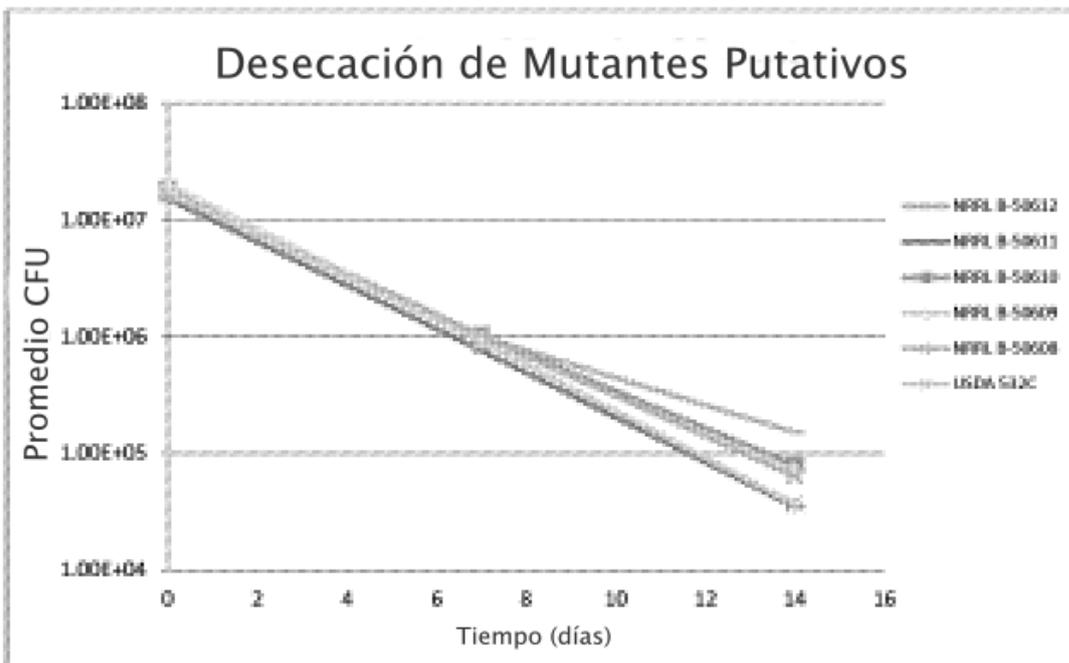


FIG 4

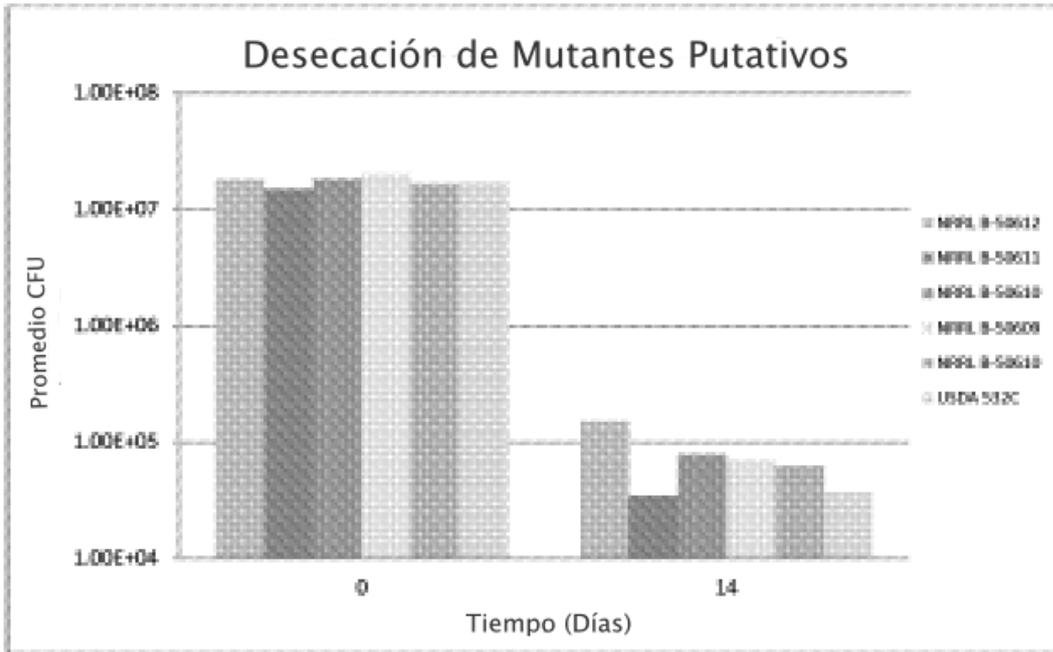


FIG 5

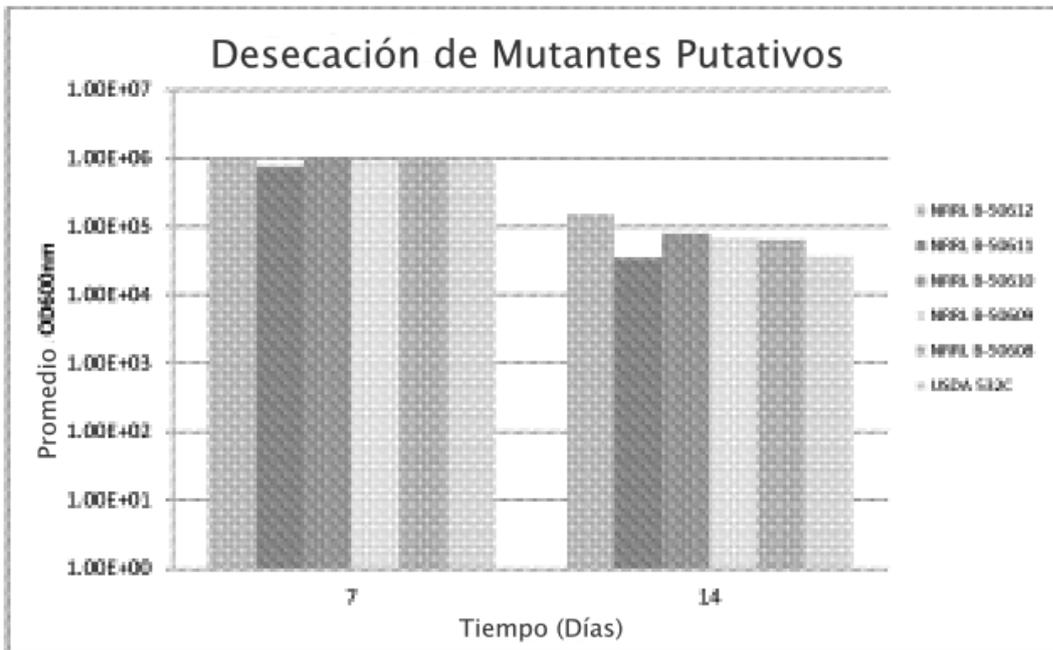


FIG 6