

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 649 937**

51 Int. Cl.:

A01N 63/00 (2006.01)

A01P 3/00 (2006.01)

C07K 14/32 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.12.2011 PCT/US2011/065936**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.06.2012 WO12087980**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.12.2011 E 11807827 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.08.2017 EP 2654433**

54 Título: **Mutantes tipo papel de lija de Bacillus y procedimientos de uso de los mismos para mejorar el crecimiento vegetal, promover la salud de plantas y controlar enfermedades y plagas**

30 Prioridad:

06.07.2011 US 201161505023 P

25.07.2011 US 201161511522 P

21.12.2010 US 201061425742 P

04.11.2011 US 201161556039 P

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

16.01.2018

73 Titular/es:

**BAYER CROPSCIENCE LP (100.0%)
2 T.W. Alexander Drive
Research Triangle Park, NC 27709, US**

72 Inventor/es:

**GUILHABERT-GOYA, MAGALIE;
HOVINGA, SARAH F.;
JOO, DANIEL M.;
MARGOLIS, JONATHAN S.;
MILLS, SARAH J.;
THOMAS, VARGHESE;
CURTIS, DAMIAN;
ROYALTY, REED NATE y
WHITSON, ROY**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 649 937 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

Mutantes tipo papel de lija de *Bacillus* y procedimientos de uso de los mismos para mejorar el crecimiento vegetal, promover la salud de plantas y controlar enfermedades y plagas.

Campo de la invención

- 5 La presente invención se relaciona con el campo de mutantes bacterianos y con su capacidad para mejorar el crecimiento vegetal, promover la salud de las plantas y controlar enfermedades y plagas de plantas.

Antecedentes de la invención

10 El género *Bacillus* comprende numerosas bacterias formadoras de endosporas que presentan múltiples usos en los campos de la agricultura y la nutrición animal, entre otros. Actualmente se comercializan diversas cepas de *Bacillus* para su uso como promotores del crecimiento vegetal y/o como agentes de biocontrol contra plagas y enfermedades de insectos (véase, por ejemplo, Masaaki Morikawa, "Beneficial Biofilm Formation by Industrial Bacteria *Bacillus subtilis* and Related Species", *Journal of Bioscience and Bioengineering* (2006) 101(1): 1-8; Kloepper, y col., "Induced Systemic Resistance and Promotion of Plant Growth by *Bacillus* spp", *Phytopathology* (2004) 94(11): 1259-1266). Estas alternativas orgánicas, amigables para el medio ambiente, han encontrado una gran aceptación entre 15 agrónomos y horticultores debido a su eficacia como promotores del crecimiento vegetal y como bioplaguicidas.

Bacillus subtilis es una bacteria del suelo, Gramo-positiva, que a menudo se encuentra en la rizósfera de las plantas. *B. subtilis*, al igual que muchas especies de bacterias, puede presentar dos modos de crecimiento distintivos, un modo de crecimiento que nada libremente, planctónico, y un modo de biopelícula sésil en el cual un agregado de 20 células secreta una matriz extracelular para adherirse entre sí y/o a una superficie (Branda, y col., "Fruiting Body Formation by *Bacillus subtilis*", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (2001) 98: 11621-11626; Hamon y Lazazzera, "The Sporulation Transcription Factor Spo0A is Required for Biofilm Development in *Bacillus subtilis*", *Mol. Microbiol.* (2001) 52: 847-860). Las vías utilizadas por bacterias tales como *B. subtilis* para construir biopelículas son extremadamente diversas, que varían enormemente dentro y entre diferentes especies y bajo diferentes condiciones ambientales (Bais, y col., "Biocontrol of *Bacillus subtilis* Against Infection of *Arabidopsis* Roots by *Pseudomonas syringae* is Facilitated by Biofilm Formation and Surfactin Production", *Plant Physiol.*, (2004) 134: 307-319; Lemon y col., "Biofilm Development with an Emphasis on *Bacillus subtilis*", (2008) *Current Topics in Microbiology and Immunology* (2008) 322: 1-16). Recientemente se ha reconocido de alguna manera que la formación de biopelículas por cepas específicas de *B. subtilis* y especies relacionadas puede ayudar a controlar una infección causada por patógenos de plantas (Morikawa (2006), citado anteriormente).

30 La morfología y composición química de las biopelículas varían entre especies y cepas. La morfología y la producción de ácido γ -poliglutámico de las colonias mucoides que se observan en las cepas salvajes de *Bacillus subtilis* se han correlacionado con una formación mejorada de biopelículas, en tanto la morfología de colonias plana, seca de las cepas domésticas (o de laboratorio) se ha correlacionado con una formación disminuida de biopelículas. Véase Stanley, N. y Lazazzera, B. "Defining the Genetic Differences Between Wild and Domestic Strains of *Bacillus subtilis* that Affect Poly- γ -DL-Glutamic Acid Production and Biofilm Formation", *Molecular Microbiology* (2005) 57(4): 35 1143-1158 a 1145. En la publicación de Branda (citado anteriormente, 2001) se describen las deficiencias en biopelículas con una morfología de colonias no mucoide, tales como colonias planas, pequeñas, secas, que crecían lateralmente y eventualmente se fusionaban entre sí, lo que conduce a colonias pequeñas carentes de estructuras aéreas. Sin embargo, en la publicación de Stanley se describe una cepa híbrida de *Bacillus subtilis* que tiene una mutación de pérdida de función en el locus *swrA*, que formaba colonias planas, secas y mostraba una formación 40 mejorada de biopelículas. (La cepa híbrida era una combinación obtenida por unión de una cepa que contiene el ADN de una cepa salvaje que es responsable de la morfología de colonias mucoide.) Los Solicitantes han encontrado que las cepas salvajes de *Bacillus* con mutaciones de reducción o pérdida de función del locus *swrA* producen colonias planas, secas que forman biopelículas robustas y, además, que los productos de fermentación 45 formulados que consisten de dichas células mejoran la salud de las plantas, conducen a una colonización de raíces más robusta en comparación con las cepas que contienen al gen *swrA* de tipo salvaje, y al control de enfermedades y plagas de las planas, tales como nematodos.

Tanto la agricultura comercial como la jardinería doméstica se podrán beneficiar con la disponibilidad de fuentes diferentes y mejoradas de cepas de *Bacillus* para su uso en el mejoramiento del crecimiento vegetal, la promoción 50 de la salud de las plantas, el control de las plagas y enfermedades de plantas y el suministro de alternativas de los nematocidas químicos. La presente invención provee una nueva clase de tales cepas bacterianas y procedimientos mejorados de uso de los mismos que comprenden manipulación de la formación de biopelículas.

Sumario de la invención

55 La presente invención provee composiciones que comprenden una variante de bacterias formadoras de esporas donde dicha variante tiene una mutación en el gen *swrA* que da como resultado una capacidad de movimiento en enjambre [*swarming*] deteriorada y una mayor promoción de la salud de las plantas y que también puede causar las siguientes características en comparación con una cepa que contiene un gen *swrA* de tipo salvaje: una morfología de células o colonias tipo papel de lija que consiste en células o colonias planas, secas, altamente compactas y muy

quebradizas; una colonización de raíces más robusta; y/o formación de cadenas largas de células durante la fase exponencial temprana en cultivo líquido. Dicha mutación se denomina mutación *swrA* en la presente y las células con dicha mutación *swrA* son células *swrA*⁻.

5 En dichas composiciones de variantes de bacterias formadoras de esporas, las células *swrA*⁻ comprenden al menos aproximadamente un 3,5 % de las células totales en la composición y al menos un 70 % de las células *swrA*⁻ son esporas. La presente invención provee además composiciones tales en donde las células *swrA*⁻ comprenden al menos un 10 % de las células totales en la composición o comprenden al menos un 50 % de las células totales en la composición. La presente invención provee además aquellas composiciones en las que al menos aproximadamente un 80 %, al menos aproximadamente un 85
10 % o al menos aproximadamente un 90 % de las células *swrA*⁻ y/o de las células totales en la composición son esporas.

En algunas realizaciones, las bacterias formadoras de esporas pertenecen al género *Bacillus*. En aún otras, son especies de *Bacillus* pertenecientes al clado *Bacillus subtilis* (véase la figura 6). En aún otras, las especies se seleccionan del grupo que consiste en *B. pumilus*, *B. atrophaeus*, *B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis* y *B. licheniformis*.
15 En aún otras, la especie de *Bacillus* es *Bacillus subtilis* QST713.

La presente invención provee composiciones que comprenden células *swrA*⁻ tal como se caracterizan en las reivindicaciones.

La presente invención implica usos y composiciones que comprenden células bacterianas formadoras de esporas que tienen una mutación en un ortólogo de *swrA* en donde la mutación reduce la capacidad de movimiento en enjambre de las células bacterianas en comparación con células bacterianas isogénicas que no contienen a la mutación. En una realización, la capacidad de movimiento en enjambre se mide por el crecimiento sobre una superficie no líquida.
20

Las células bacterianas formadoras de esporas que tienen la mutación en el ortólogo de *swrA* proceden de una especie de *Bacillus* perteneciente al clado de *Bacillus subtilis*. En una realización, las células bacterianas formadoras de esporas son salvajes.
25

Las células bacterianas formadoras de esporas que tienen la mutación en el ortólogo de *swrA* tienen diversas características en comparación con células bacterianas isogénicas que no tienen la mutación, incluyendo al menos uno de los siguientes: (i) la formación de una biopelícula más robusta; (ii) una biopelícula que es plana, seca y gruesa; y (iii) formación de cadenas largas en un cultivo líquido como respuesta a fuerzas de corte (que crean un entorno altamente turbulento).
30

En otras realizaciones, la biopelícula más robusta comprende además una o más de las siguientes características en comparación con células isogénicas que no contienen a la mutación: (i) células vegetativas que tienen un diámetro que es al menos aproximadamente un 1,5 veces mayor, (ii) células que tienen un recubrimiento celular adicional, (iii) una región grande blanca (transparente a electrones) cuando se visualiza con un microscopio electrónico de transmisión, (iv) el aspecto de la biopelícula de AQ30002 que se muestra en las **figuras 12, 13 o 14** y (v) células que forman cadenas largas en un cultivo líquido.
35

En el presente documento se describen ortólogos de *swrA* que tiene al menos aproximadamente un 90 % de identidad con un gen *swrA* de tipo salvaje de la misma especie de *Bacillus* que las células bacterianas que comprenden la mutación. El ortólogo de *swrA* tiene al menos aproximadamente un 95 % de identidad, al menos aproximadamente un 96 % de identidad, al menos aproximadamente un 97 % de identidad, al menos aproximadamente un 98 % de identidad o al menos aproximadamente un 99 % de identidad con un gen *swrA* de tipo salvaje de la misma especie de *Bacillus* que las células bacterianas que tienen la mutación. El gen *swrA* de tipo salvaje con al menos aproximadamente un 99 % de identidad de secuencia con el ortólogo de *swrA* es de la misma cepa que las células bacterianas que tienen la mutación. El ortólogo de *swrA* tiene al menos aproximadamente un 90 % de identidad con la secuencia de nucleótidos *swrA* proporcionada en las SEQ ID NO. 1.
40
45

En otra realización de la divulgación, la mutación en el ortólogo de *swrA* es en una posición correspondiente a una o más de las posiciones 26-34 del gen *swrA* que se muestra en la SEQ ID NO. 1 o en una posición correspondiente a una o más de las posiciones 1-3 del gen *swrA* como se muestra en la SEQ ID NO. 1. En una variación, la mutación es una inserción o delección.

50 En una realización, las composiciones de células bacterianas formadoras de esporas descritas previamente comprenden al menos un 3,5 % de las células bacterianas totales en la composición y/o al menos aproximadamente un 70 % de las células bacterianas formadoras de esporas en la composición son esporas.

En otra realización, la invención abarca composiciones que comprenden células bacterianas formadoras de esporas *swrA*⁻, en donde las células *swrA*⁻ comprenden al menos un 3,5 % de las células bacterianas totales en la composición y/o en donde al menos aproximadamente un 70 % de las células bacterianas formadoras de esporas son esporas. En algunas realizaciones, se ha reducido la actividad *swrA* por un medio distinto de una mutación del gen *swrA*. La actividad *swrA* se pueden reducir usando diversos agentes, incluyendo moléculas pequeñas, drogas,
55

sustancias químicas, compuestos, ARNs, ribozimas, oligonucleótidos antisentido, anticuerpos inhibidores de *swrA*, péptidos inhibidores de *swrA*, aptámeros o aptámeros especulares. En una realización, la mutación del gen *swrA* en las células *swrA*⁻ es en una posición correspondiente a una o más de las posiciones 26-34 del gen *swrA* que se muestra en la SEQ ID NO. 1 o en una posición correspondiente a una o más de las posiciones 1-3 del gen *swrA* que se muestra en la SEQ ID NO. 1. En una variación, la mutación es una inserción o delección. En otro aspecto, las células *swrA*⁻ son el resultado de una inactivación del gen *swrA*.

Las células bacterianas formadoras de esporas de la presente invención son células bacterianas *Bacillus subtilis* QST713 que tienen una mutación en el gen *swrA* y composiciones de las mismas tal como se caracterizan en las reivindicaciones. En un aspecto de la divulgación, las células bacterianas de *Bacillus subtilis* QST713 comprenden al menos un cambio de un par de bases de ácido nucleico en un codón de inicio y/o al menos una inserción de un par de bases de ácido nucleico o delección en un gen *swrA*. En otros aspectos de la divulgación, la inserción o delección en el gen *swrA* tiene lugar en uno o más de los pares de bases en las posiciones 26-34 de la SEQ ID NO. 1. En aún otro aspecto de la divulgación, las células *swrA*⁻ de *Bacillus subtilis* QST713 se seleccionan del grupo que consiste en la cepa AQ30002 (también conocida como QST30002) y la cepa AQ30004 (también conocida como QST30004), depositada con los N.º de Acceso NRRL B-50421 y NRRL B-50455, respectivamente. En aún otro aspecto de la divulgación, la *Bacillus subtilis* QST713 que tiene la mutación en el gen *swrA* es de tipo salvaje para *epsC*, *sfp* y *degQ*. En otro aspecto de la divulgación, la *Bacillus subtilis* QST713 que tiene la mutación es isogénica de otra manera con *Bacillus subtilis* QST713. En algunas realizaciones de la divulgación, composiciones de las células QST713 de *Bacillus subtilis* que tienen la mutación comprenden al menos aproximadamente un 3,5 % de las células bacterianas totales en la composición.

La presente invención provee composiciones que comprenden una o más cepas de *B. subtilis* seleccionadas del grupo que consiste en AQ30002 (también conocida como QST30002) y AQ30004 (también conocida como QST30004), depositadas con los N.º de Acceso NRRL B-50421 y NRRL B-50455, respectivamente.

En una realización de la divulgación, las células bacterianas formadoras de esporas que tienen la mutación en el ortólogo de *swrA* son de una especie de *Bacillus* del clado de *Bacillus subtilis* y comprenden un ortólogo de *sfp* de tipo salvaje. En otra realización de la divulgación, estas células bacterianas comprenden además un ortólogo de *degQ* de tipo salvaje y un ortólogo de *epsC* de tipo salvaje. En un aspecto de la divulgación, el ortólogo de *sfp*, el ortólogo de *degQ* y el ortólogo de *epsC* tienen cada uno al menos aproximadamente un 90 % de identidad de secuencia con un gen *sfp* gene, un gen *degQ* un gen y un gen *epsC*, respectivamente, de cualquiera entre *B. pumilus*, *B. atrophaeus*, *B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis* y *B. licheniformis*, *B. aerophilus*, *B. stratosphericus*, *B. safensis*, *B. altitudinus*, *B. vallismortis*, *B. halotolerans*, *B. mojaviensis*, *B. sonorensis* y *B. aerius*. En aún otro aspecto, dicha al menos aproximadamente 90 % de identidad de secuencia es con el gen *sfp*, el gen *degQ* y el gen *epsC* de cualquiera entre la cepa 3610 de *B. subtilis*, la cepa FZB42 de *B. amyloliquefaciens*, SAFR-032 de *B. pumilus*, la cepa 14580 de *B. licheniformis* o la cepa 1942 de *B. atrophaeus*. En aún otro aspecto de la divulgación, el ortólogo de *sfp* tiene al menos aproximadamente un 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO. 11, el ortólogo de *epsC* tiene al menos aproximadamente un 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO. 12 y el ortólogo *degQ* tiene al menos aproximadamente un 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO. 13. En aún otro aspecto, la identidad de secuencia descrita en este párrafo es al menos aproximadamente un 95 %, al menos aproximadamente un 96 %, al menos aproximadamente un 97 %, al menos aproximadamente un 98 % o al menos aproximadamente un 99 %.

De acuerdo con la invención, las células *swrA*⁻ derivan de *Bacillus subtilis* QST713, en la que dichas células *swrA*⁻ tienen una delección en la posición 26 de la SEQ ID NO:1, como se regeja en la SEQ ID NO. 3.

La presente invención provee además cualquiera de las bacterias formadoras de esporas o composiciones de la presente invención que además comprenden una formulación inerte u otro ingrediente de formulación, tales como polisacáridos (almidones, maltodextrinas, metilcelulosas, proteínas, tal como proteína del suero, péptidos, gomas), azúcares (lactosa, trehalosa, sacarosa), lípidos (lecitina, aceites vegetales, aceites minerales), sales (cloruro de sodio, carbonato de calcio, citrato de sodio) y silicatos (arcillas, sílice amorfa, sílices de humo/precipitadas, sales de silicato). En algunas realizaciones, tales como aquellas en las cuales las composiciones se aplican a la tierra, las composiciones de la presente invención comprenden un vehículo, tal como agua o un material mineral u orgánico, tal como turba, que facilita la incorporación de las composiciones en la tierra. En algunas realizaciones, tales como aquellas en donde se usa la composición para el tratamiento de semillas o como una inmersión radicular, el vehículo es un aglutinante o adhesivo que facilita la adherencia de la composición a la semilla o raíz. En otra realización en donde las composiciones se usan como un tratamiento de semillas, el ingrediente de formulación es un colorante. En otras composiciones, el ingrediente de formulación es un conservante.

La presente invención provee además cualquiera de las composiciones de la presente invención que además comprenden al menos un ingrediente o agente activo adicional además de las células *swrA*⁻. Dichos otros ingredientes o agentes activos pueden ser una sustancia química u otra cepa bacteriana. Los ejemplos de ingredientes o agentes activos adecuados incluyen, pero en un sentido no limitativo, un herbicida, un fungicida, un bactericida, un insecticida, un nematocida, un mitocida, un regulador del crecimiento vegetal, un estimulante del crecimiento vegetal y un fertilizante.

La presente invención provee además composiciones en las que las células *swrA*⁻ comprenden entre aproximadamente 1×10^2 ufc/g y aproximadamente 1×10^{10} ufc/g en la composición. La presente invención provee además aquellas composiciones en las que las células *swrA*⁻ comprenden al menos 1×10^6 ufc/g, o comprenden al menos 1×10^7 ufc/g o comprenden al menos 1×10^8 ufc/g o comprenden al menos 1×10^9 ufc/g.

5 La presente invención incluye los productos de fermentación de bacterias formadoras de esporas de la presente invención y composiciones que comprenden a dichos productos de fermentación. En un aspecto, estos productos de fermentación incluyen células bacterianas formadoras de esporas, sus metabolitos y el caldo de fermentación residual. En otros aspectos, las células bacterianas formadoras de esporas del producto de fermentación son mayormente esporas. En otro aspecto, las composiciones que comprenden los productos de fermentación
10 comprenden además ingredientes de formulación inertes e ingredientes de formulación, según se describe en la presente. En algunas realizaciones, el caldo de fermentación concentrado se lava, por ejemplo, mediante un proceso de diafiltración, para eliminar el caldo de fermentación residual y los metabolitos de modo tal que el producto de fermentación es principalmente esporas.

15 La presente invención también provee procedimientos de tratamiento de una planta para mejorar la salud de las plantas (tal como por promoción de la salud de las plantas, aumento de la resistencia al estrés abiótico o aumento del vigor de las plantas) y/o para controlar una enfermedad de las plantas y/o para controlar una plaga de plantas, en donde el procedimiento comprende aplicar dichas una o más de las composiciones de la presente invención o las bacterias formadoras de esporas de la presente invención a la planta, a una parte de la planta y/o al locus que rodea a la planta, tal como al medio de crecimiento de una planta. Así, por ejemplo, la presente invención provee además
20 procedimientos en donde las composiciones de la presente invención se aplican a la tierra. Por ejemplo, la composición se puede aplicar antes, durante o después que la planta o parte de planta toma contacto con la tierra. Como ejemplos adicionales, los procedimientos de la presente invención incluyen, pero en un sentido no limitativo, aplicar la composición usando un procedimiento de aplicación, tal como riego de la superficie de la tierra, introducción con una caña, inyección, quemigación o aplicación en surcos.

25 Los procedimientos de la presente invención se pueden usar en cualquier parte de la planta. Los ejemplos de dichas partes de plantas incluyen, pero en un sentido no limitativo, semillas, raíces, tallos subterráneos, tubérculos, bulbos, gajos y rizomas.

Las composiciones y bacterias formadoras de esporas de la presente invención son de utilidad para controlar
30 nematodos parásitos de plantas, tales como, por ejemplo, nematodos de los nudos de la raíz, quísticos, de lesiones y en anillo, incluyendo *Meloidogyne* spp., *Heterodera* spp., *Globodera* spp., *Pratylenchus* spp. y *Criconebella* sp. En algunas realizaciones, los blancos son nematodos de los nudos de la raíz, tal como *M. incognita* (nematodo de los nudos de la raíz del algodón), *M. javanica* (nematodo de los nudos de la raíz javanés), *M. hapla* (nematodo de los nudos de la raíz del norte) y *M. arenaria* (nematodo de los nudos de la raíz del cacahuete). En algunas realizaciones, los síntomas y/o los nematodos se reducen en al menos aproximadamente un 5 %, al menos aproximadamente un
35 10 %, al menos aproximadamente un 20 %, al menos aproximadamente un 30 %, al menos aproximadamente un 40 %, al menos aproximadamente un 50 %, al menos aproximadamente un 60 %, al menos aproximadamente un 70 %, al menos aproximadamente un 80 % o al menos aproximadamente un 90 %.

En otro aspecto, los usos, los procedimientos, las bacterias formadoras de esporas que tienen una mutación en el
40 ortólogo de *swrA* y las composiciones que se describen en la presente aumentan el rendimiento de los cultivos entre aproximadamente un 10 % y aproximadamente un 20 %, entre aproximadamente un 10 % y aproximadamente un 30 %, entre aproximadamente un 10 % y aproximadamente un 40 %, entre aproximadamente un 10 % y aproximadamente un 90 %, entre aproximadamente un 20 % y aproximadamente un 80 %, entre aproximadamente un 30 % y aproximadamente un 70 %, entre aproximadamente un 40 % y aproximadamente un 60 % o
45 aproximadamente un 5 % o más, aproximadamente un 10 % o más, aproximadamente un 20 % o más, aproximadamente un 30 % o más, aproximadamente un 40 % o más, aproximadamente un 50 % o más, aproximadamente un 60 % o más, aproximadamente un 70 % o más, aproximadamente un 80 % o más o aproximadamente un 90 % o más, en comparación con una planta, cultivo, fruto o verdura no tratada. En aún otro aspecto, los procedimientos y las composiciones que se describen en la presente aumentan el rendimiento de los cultivos en aproximadamente un 5 %, aproximadamente un 10 %, aproximadamente un 20 %, aproximadamente un
50 30 %, aproximadamente un 40 %, aproximadamente un 50 %, aproximadamente un 60 % aproximadamente un 70 %, aproximadamente un 80 % o aproximadamente un 90 % en comparación con una planta, cultivo, fruto o vegetales no tratados.

Las plantas representativas que se pueden tratar usando las composiciones de la presente invención incluyen, pero
55 en un sentido no limitativo, las siguientes monocotiledóneas y dicotiledóneas: vegetales de bulbos; granos de cereales (tales como trigo, cebada, arroz); maíz, frutos cítricos (tales como pomelo, limón y naranja); algodón y otros cultivos de fibras; curcubitáceas; vegetales con frutos; vegetales de hojas (tales como apio, lechuga de cabeza y hoja y espinaca); legumbres (tales como soja, habas verdes, garbanzos, lentejas); cultivos de semillas oleaginosas; cacahuete; frutos carnosos (tales como manzanas y peras); frutos con carozo (tales como almendras, pacana y nueces); vegetales de raíces; vegetales de tubérculos; vegetales de bulbos; tabaco, frutillas y otras bayas; cultivos de coles (tales como brócoli, col); uvas; plantas usadas para la producción de biomasa (tales como *Miscanthus*, bambú), ananá; y plantas con flores, plantas en lechos y plantas ornamentales (tal como helecho y *Hosta*). Las
60

composiciones de la presente invención también se usan para tratar plantas perennes, incluyendo cultivos de plantación tales como banana y café y aquellos que están presentes en bosques, parques o jardines.

5 Cuando se usa como un tratamiento de semillas, las composiciones de la presente invención se aplican a una dosis de entre aproximadamente 1×10^2 y aproximadamente 1×10^9 ufc/semilla, dependiendo del tamaño de la semilla. En algunas realizaciones, la dosis de aplicación es de entre 1×10^3 y aproximadamente 1×10^7 ufc/semilla.

10 Cuando se usa como un tratamiento de tierra, las composiciones y células bacterianas formadoras de esporas de la presente invención se pueden aplicar como un riego de la superficie de la tierra, por introducción con una caña, inyección y/o aplicación en surcos o mezclados con el agua de irrigación. La dosis de aplicación para los tratamientos mediante riego de superficie de la tierra, que se puede aplicar en el momento de la siembra, durante o después de la siembra, o después del trasplante y en cualquier etapa del crecimiento vegetal, es de entre aproximadamente 4×10^{11} y aproximadamente 8×10^{12} ufc por acre. En algunas realizaciones, la dosis de aplicación es de entre aproximadamente 1×10^{12} y aproximadamente 6×10^{12} ufc por acre. La dosis de aplicación para los tratamientos en surcos, aplicada en el momento de la siembra, es de entre aproximadamente $2,5 \times 10^{10}$ y aproximadamente 5×10^{11} ufc por 1000 pies de fila. En algunas realizaciones, la dosis de aplicación es de entre aproximadamente 6×10^{10} y aproximadamente 4×10^{11} ufc por 1000 pies de fila. Los expertos en la materia podrán ajustar las dosis para los tratamientos a voleo (donde las aplicaciones se aplican a menor dosis pero más frecuentes) y otros tratamientos menos comunes de la tierra.

15 Las composiciones y las células bacterianas formadoras de esporas de la presente invención se pueden mezclar con otros aditivos químicos y no químicos, adyuvantes y/o tratamientos, en donde tales tratamientos incluyen, pero en un sentido no limitativo, fungicidas, insecticidas, miticidas, nematocidas, fertilizantes, nutrientes, minerales, auxinas, estimulantes del crecimiento químicos y no químicos y similares.

20 La presente invención provee un cultivo sustancialmente puro y/o un cultivo biológicamente puro de una célula tipo papel de lija aislada de una mezcla de diferentes tipos celulares. Por ejemplo, la invención cultivos sustancialmente puros y/o cultivos biológicamente puros, en donde la mezcla de diferentes tipos celulares comprende QST713, depositados como NRRL, N° Acceso B21661. La presente invención provee cultivos sustancialmente puros y/o cultivos biológicamente puros de las cepas de *B. subtilis* AQ30002 (también conocida como QST30002) o AQ30004 (también conocida como QST30004), depositadas con los N° Acceso NRRL B-50421 y NRRL B-50455, respectivamente.

25 La presente divulgación provee cultivos sustancialmente puros y/o cultivos biológicamente puros de una cepa de *B. subtilis* que presenta todas las características fisiológicas y morfológicas de las cepas de *B. subtilis* AQ30002 (también conocida como QST30002) o AQ30004 (también conocida como QST30004), depositadas con los N° Acceso NRRL B-50421 y NRRL B-50455, respectivamente.

30 La presente divulgación también provee la progenie de cultivos sustancialmente puros y/o cultivos biológicamente puros de cualquiera de los cultivos de la presente invención, en donde el cultivo tiene todas las características fisiológicas y morfológicas de las cepas de *B. subtilis* AQ30002 (también conocida como QST30002) o AQ30004 (también conocida como QST30004), depositadas con los N° Acceso NRRL B-50421 y NRRL B-50455, respectivamente.

35 La presente invención también provee composiciones que comprenden un cultivo sustancialmente puro y/o un cultivo biológicamente puro de una o más de las células *swrA* de la presente invención, tal como se describe en las reivindicaciones.

Descripción breve de los dibujos

40 La **figura 1** muestra una comparación de morfologías de colonias en las variantes QST713 de tipo salvaje y QST713 tipo papel de lija, cultivadas sobre placas de agar con nutrientes. A diferencia de las colonias de tipo salvaje, las morfologías de colonias de las variantes tipo papel de lija son altamente compactas y altamente hidrofóbicas.

45 La **figura 2** muestra imágenes de las células AQ30002 *swrA*⁻ y QST713 *swrA*⁺ de tipo salvaje durante la fase de crecimiento exponencial en cultivo líquido.

50 La **figura 3** muestra imágenes de las células de AQ30002 *swrA*⁻ ("30002") y de QST713 de tipo salvaje *swrA*⁺ ("713") en cultivo líquido sometidas a fuerzas de corte. Las imágenes superiores muestran el crecimiento celular sin una punta de pipeta insertada en el medio de cultivo a un aumento de 40x, en tanto las imágenes inferiores muestran crecimiento celular con una punta de pipeta insertada en el medio de cultivo a un aumento de 10x.

55 La **figura 4** muestra la cuantificación de colonias de tipo papel de lija en lotes comerciales representativos de SERENADE[®]ASO.

La **figura 5A** muestra la alineación de diversos ADN genómicos *swrA* que abarcan al transcripto *swrA* predicho. Bsub_168 = *B. subtilis*, cepa 168; Bsub_3610 = *B. subtilis*, cepa 3610; QST713 = QST713, de tipo salvaje; AQ30002 y AQ30004 = cepas representativas de la presente invención; Bamy_FZB42 = *B. amyloliquefaciens*, cepa FZB42; Bpum_SAFR-032 = *B. pumilus*, cepa SAFR-032; y Blic_14580 = *B. licheniformis*, cepa 14580.

La **figura 5B** muestra la alineación de diversos ADN genómicos *swrA* que abarcan al transcripto *swrA* predicho.

Las abreviaturas tienen los mismos significados que en la figura 5A, y Batr_1942 = *B. atrophaeus*, cepa 1942 y Bpum_2808 = *B. pumilus*, cepa 2808.

La **figura 5C** muestra la alineación de diversas proteínas *swrA* obtenidas de sus transcriptos *swrA* predichos. Las abreviaturas tienen el mismo significado que en las figuras 5A y 5B, y Bpum_7061 = *B. pumilus* 7061.

La **figura 6** muestra un árbol filogenético de especies pertenecientes al clado de *Bacillus subtilis* (es decir, *B. subtilis* y todos los parentescos cercanos evaluados por comparación de ADNr 16S) incluyendo las especies más distantes como raíces del árbol. Las especies para las cuales está disponible la secuencia completa del genoma están marcadas con asteriscos. Un solo asterisco (“*”) indica además que la especie no tiene un ortólogo de *swrA*, en tanto las especies marcadas con un asterisco doble (“**”) contienen un ortólogo de *swrA*. Se presume que las otras especies no marcadas del clado de *B. subtilis* tienen un ortólogo de *swrA*s basado a su relación filogenética cercana, pero actualmente no se encuentran disponibles los datos de las secuencias genómicas para estas especies.

La **figura 7** muestra imágenes de placas de ensayo del movimiento en enjambre de LB-agar 0,7 % para QST713 *swrA*⁺ (“QST713”), AQ30002 *swrA*⁻ (“AQ30002”) y diversas construcciones basadas en estas cepas.

La **figura 8** muestra las calificaciones promedio de colonización de raíces para QST713 *swrA*⁺ (“QST713”), AQ30002 *swrA*⁻ (“AQ30002”) y diversas construcciones basadas en estas cepas y demuestra que la complementación con *swrA* de tipo salvaje en las células AQ30002 *swrA*⁻ reduce la capacidad de colonización de raíces.

La **figura 9** muestra imágenes de biopelículas de raíces capturadas con microscopía óptica digital que muestran la similitud de biopelículas entre AQ30002_endoPro_*swrA*_ICE (cepa complementada) y **QST713** *swrA*⁺ (“**QST713**”) y la similitud entre AQ30002_pPen_*swrA*_ICE (complementación parcial) y **AQ30002** *swrA*⁻ (“**AQ30002**”).

La **figura 10** representa los resultados de crecimiento de dos réplicas de cada uno de QST713 *swrA*⁺ de tipo salvaje y AQ30002 *swrA*⁻ tipo papel de lija en medio stock de cerdo a 30 °C.

La **figura 11** representa los resultados de un ensayo de robustez de las películas de dos réplicas de cada uno de los cultivos de QST713 *swrA*⁺ de tipo salvaje (“713 wt”) y AQ30002 *swrA*⁻ (“AQ30002”).

La **figura 12** muestra imágenes de colonización de raíces con *Bacillus subtilis*, AQ30002 *swrA*⁻ (“AQ30002”) y QST713 *swrA*⁺ de tipo salvaje (“QST713 wt”).

La **figura 13** muestra imágenes de microscopía electrónica de barrido (SEM) de biopelículas de recubrimiento de superficies radiculares de *Bacillus subtilis* QST713 *swrA*⁺ de tipo salvaje (“QST713”) y AQ30002 *swrA*⁻ (“AQ30002”).

La **figura 14** muestra imágenes de microscopía óptica de secciones delgadas y gruesas de raíces tratadas con agua, *Bacillus subtilis*, QST713 *swrA*⁺ de tipo salvaje (“QST713”) y AQ30002 *swrA*⁻ (“30002”).

La **figura 15** representa los resultados de un estudio en invernadero para medir la promoción del crecimiento vegetal en maíz tratado con AQ30002 *swrA*⁻ (“AQ30002”), QST713 (“QST713”, que es una mezcla de células *swrA*⁺ de tipo salvaje y *swrA*⁻ tipo papel de lija en las proporciones halladas en el producto SERENADE[®], véase, por ejemplo, el Ejemplo 3 y la figura 4) o otras cepas de *Bacillus*. Se muestran plantas de maíz 2 semanas después del tratamiento de semillas con dosis de aplicación normalizadas en 64 onzas/acre con dosis de ufc equivalentes usadas para los productos experimentales.

La **figura 16** representa los resultados de un estudio en invernadero para medir la promoción del crecimiento vegetal en trigo tratado con AQ30002 *swrA*⁻ (“AQ30002”), QST713 (“QST713”, que es una mezcla de células *swrA*⁺ de tipo salvaje y *swrA*⁻ tipo papel de lija en las proporciones halladas en el producto SERENADE[®], véase, por ejemplo, el Ejemplo 3 y la figura 4) o otras cepas de *Bacillus*. Se muestran plantas de trigo 2 semanas después del tratamiento de semillas que consistía de un embebimiento de semillas con dosis de aplicación normalizadas en 64 onzas/acre con las dosis de ufc equivalentes usadas para los productos experimentales.

La **figura 17** representa los resultados de un estudio en invernadero para medir la promoción del crecimiento vegetal en trigo tratado con AQ30002 *swrA*⁻ (“AQ30002”), QST713 (“QST713”, que es una mezcla de células *swrA*⁺ de tipo salvaje y *swrA*⁻ tipo papel de lija en las proporciones halladas en el producto SERENADE[®], véase, por ejemplo, el Ejemplo 3 y la figura 4) o otras cepas de *Bacillus* producidas usando un medio basado en soja. Se muestran plantas de tomate 2 semanas después del tratamiento de semillas que consistía de un embebimiento de semillas con dosis de aplicación normalizadas en 64 onzas/acre con las dosis de ufc equivalentes usadas para los productos experimentales.

La **figura 18** representa los resultados de un estudio en invernadero para medir los pesos secos de raíces y brotes de maíz tratado con AQ30002 (“AQ30002”), QST713 (“QST713”, que es una mezcla de células *swrA*⁺ de tipo salvaje y *swrA*⁻ tipo papel de lija en las proporciones halladas en el producto SERENADE[®], véase, por ejemplo, el Ejemplo 3 y la figura 4) u otras cepas de *Bacillus* producidas usando un medio basado en soja.

La **figura 19** representa los resultados de un estudio en invernadero para medir los pesos secos de raíces y brotes de trigo tratado con AQ30002 (“AQ30002”), QST713 (“QST713”, que es una mezcla de células *swrA*⁺ de tipo salvaje y *swrA*⁻ tipo papel de lija en las proporciones halladas en el producto SERENADE[®], véase, por ejemplo, el Ejemplo 3 y la figura 4) u otras cepas de *Bacillus* producidas usando un medio basado en soja.

La **figura 20** representa los resultados de un estudio en invernadero para medir los pesos secos de raíces y brotes de tomate tratado con AQ30002 (“AQ30002”), QST713 (“QST713”, que es una mezcla de células *swrA*⁺ de tipo salvaje y *swrA*⁻ tipo papel de lija en las proporciones halladas en el producto SERENADE[®], véase, por ejemplo, el Ejemplo 3 y la figura 4) u otras cepas de *Bacillus* producidas usando un medio basado en soja.

La **figura 21** representa los resultados de un estudio a campo para medir el rendimiento del procesamiento de tomates de plantas tratadas con las cepas de *Bacillus subtilis* QST713 (una mezcla de células *swrA*⁺ de tipo

salvaje y *swrA*⁻ tipo papel de lija en las proporciones halladas en el producto SERENADE®, véase, por ejemplo, el Ejemplo 3 y la figura 4) (“QST713”) o AQ30002 *swrA*⁻ (“AQ30002”) solas o en combinación con estimulante del crecimiento vegetal (PGS). Las cepas se produjeron usando un medio basado en soja. Las pruebas se condujeron en Escalon, California. Los tratamientos indicados con “Exp” representan condiciones experimentales alternativas. Las mediciones con la misma letra no son estadísticamente diferentes a P = 0,05 usando análisis de la varianza (ANOVA).

La **figura 22** representa el porcentaje de vuelco (ruptura del tallo debajo de la mazorca) de un estudio a campo para medir las plantas de maíz tratadas con las cepas de *Bacillus subtilis* QST713 (una mezcla de células *swrA*⁺ de tipo salvaje y *swrA*⁻ tipo papel de lija en las proporciones halladas en el producto SERENADE®, véase, por ejemplo, el Ejemplo 3 y la figura 4) (“QST713”) o AQ30002 *swrA*⁻ (“AQ30002”) solas o en combinación con un estimulante del crecimiento vegetal (PGS). Las cepas se produjeron usando un medio basado en soja. Las pruebas se condujeron en Paynesville, Minnesota. Los tratamientos indicados con “Exp” representan condiciones experimentales alternativas. Las mediciones con la misma letra no son estadísticamente diferentes a P = 0,10 usando análisis de la varianza (ANOVA).

La **figura 23** muestra una imagen de raíces de soja de plantas tratadas con AQ30002 *swrA*⁻ (“QRD154”) y un inoculante bacteriano en surcos en el momento de la siembra.

La **figura 24** muestra una imagen de raíces de soja de una planta no tratada.

La **figura 25** representa los resultados de un estudio a campo para medir el control de podredumbre del tallo con *Pythium* en maíz con las cepas de *Bacillus subtilis* QST713 (una mezcla de células *swrA*⁺ de tipo salvaje y *swrA*⁻ tipo papel de lija en las proporciones halladas en el producto SERENADE®, véase, por ejemplo, el Ejemplo 3 y la figura 4) (“QST713”) o AQ30002 *swrA*⁻ (“AQ30002”) solas o en combinación con un estimulante del crecimiento vegetal (PGS). Las pruebas se condujeron en Paynesville, Minnesota. Los tratamientos indicados con “Exp” representan condiciones experimentales alternativas. Las mediciones con la misma letra no son estadísticamente diferentes a P = 0,05 usando análisis de la varianza (ANOVA).

La **figura 26** representa los resultados de un estudio en invernadero para comparar la actividad de QST713 (una mezcla de células *swrA*⁺ de tipo salvaje y *swrA*⁻ tipo papel de lija en las proporciones halladas en el producto SERENADE®, véase, por ejemplo, el Ejemplo 3 y la figura 4) (“QST713”) y AQ30002 *swrA*⁻ (“AQ30002”) contra la pérdida de humectación causada por *Pythium ultimum* y *Rhizoctonia solani*. Cada barra representa el promedio de cuatro mediciones, donde las barras de error indican las desviaciones estándar.

La **figura 27** provee un transcurso en el tiempo que muestra la actividad de QST713 (una mezcla de células *swrA*⁺ de tipo salvaje y *swrA*⁻ tipo papel de lija en las proporciones halladas en el producto SERENADE®, véase, por ejemplo, el Ejemplo 3 y la figura 4) (“QST713”) y AQ30002 *swrA*⁻ (“AQ30002”) contra el marchitamiento de pimiento causado por *Phytophthora capsici* sobre un período de 8 días en un ensayo en invernadero. Nótese que se superponen las curvas del control no infestado (“UIC”) y de un fungicida químico.

La **figura 28** muestra plantas de tomate tratadas con dosis crecientes de AQ30002 *swrA*⁻ (“AQ30002”) y de QST713 (una mezcla de células de *swrA*⁺ de tipo salvaje y *swrA*⁻ tipo papel de lija en las proporciones halladas en el producto SERENADE®, véase, por ejemplo, el Ejemplo 3 y la figura 4) (“QST713”).

La **figura 29** es una comparación de hojas individuales de plantas de tomate tratadas con dosis crecientes de AQ30002 *swrA*⁻ (“AQ30002”) y QST713 (una mezcla de células *swrA*⁺ de tipo salvaje y *swrA*⁻ tipo papel de lija en las proporciones halladas en el producto SERENADE®, véase, por ejemplo, el Ejemplo 3 y la figura 4) (“QST713”).

La **figura 30** representa el contenido de clorofila en plantas de tomate tratadas con dosis crecientes de AQ30002 *swrA*⁻ (“AQ30002”) y QST713 (una mezcla de células *swrA*⁺ de tipo salvaje y *swrA*⁻ tipo papel de lija en las proporciones halladas en el producto SERENADE®, véase, por ejemplo, el Ejemplo 3 y la figura 4) (“QST713”).

La **figura 31** representa el área de superficie foliar promedio (de cinco réplicas) de plantas tratadas con 3610WT y 3610*swrA*⁻ (designadas 3610*swrA* en el gráfico).

La **figura 32** representa las lecturas de clorofila de plantas tratadas con 3610WT y 3610 *swrA*⁻ (indicadas en la figura como 3610*swrA*). Los resultados son un promedio de los niveles de clorofila en la primera hoja verdadera de cinco plántulas de tomate seleccionadas al azar.

La **figura 33** representa la actividad de 3610WT y 3610*swrA*⁻ (designadas 3610*swrA* en el gráfico) contra *Phytophthora capsici* de pimiento.

La **figura 34** muestra el efecto del tratamiento con caldo completo de AQ30002 *swrA*⁻ (“AQ30002”) sobre la formación de agallas en raíces infestadas con nematodos de los nudos de la raíz.

La **figura 35** muestra el efecto de tratamiento con AQ30002 *swrA*⁻ (“AQ30002”) a diversas dosis sobre plántulas infestadas con nematodos de los nudos de la raíz. Específicamente, los resultados muestran la extensión de formación de agallas en la raíz y los efectos sobre la penetración y el desarrollo de nematodos.

La **figura 36** representa los huevos de nematodos de los nudos de la raíz por planta tratada con diversos lotes de AQ30002 *swrA*⁻ (“AQ30002”) en comparación con las plantas no tratadas (designadas UTC en la figura).

Descripción detallada de la invención

La siguiente descripción incluye información que puede ser de utilidad en la comprensión de la presente invención.

El producto SERENADE® (N° registro de U.S. EPA 69592-12) contiene una cepa única, patentada de *Bacillus subtilis* (cepa QST713) y muchos lipopéptidos diferentes que funcionan sinérgicamente destruyendo los patógenos de la enfermedad y proveen una actividad antimicrobiana superior. El producto SERENADE® se usa para proteger a

plantas tales como verduras, frutas, frutos secos y cultivos de vid contra enfermedades tales como tizón del fuego, *Botrytis*, podredumbre ácida, roya, *Sclerotinia*, mildiú pulverulento, manchado bacteriano y moho blanco. El producto SERENADE® se encuentra disponible como formulaciones líquidas o secas que se pueden aplicar como un tratamiento foliar y/o en tierra. Las copias de las etiquetas maestras de U.S. EPA para los productos SERENADE®, incluyendo SERENADE® ASO, SERENADE® MAX y SERENADE® SOIL, se encuentran disponibles al público en *National Pesticide Information Retrieval System's (NPIRS)* USEPA/OPP *Pesticide Product Label System (PPLS)*.

SERENADE® ASO (suspensión orgánica acuosa) contiene 1,34 % de QST713 seco como ingrediente activo y 98,66 % de otros ingredientes. SERENADE® ASO está formulado para contener un mínimo de 1×10^9 ufc/g de QST713 en tanto se ha determinado que la cantidad máxima de QST713 es de $3,3 \times 10^{10}$ ufc/g. Los nombres comerciales alternativos para SERENADE® ASO incluyen SERENADE® BIOFUNGICIDE, SERENADE® SOIL y SERENADE® GARDEN DISEASE. Por información adicional, véanse las etiquetas maestros de U.S. EPA para SERENADE® ASO del 4 de enero, 2010, y SERENADE® SOIL, cada una de las cuales se incorpora por completo en la presente a modo de referencia.

SERENADE® MAX contiene 14,6 % de QST713 seco como ingrediente activo y 85,4 % de otros ingredientes. SERENADE® MAX está formulado para contener un mínimo de $7,3 \times 10^9$ ufc/g de QST713 en tanto se ha determinado que la cantidad máxima de QST713 es de $7,9 \times 10^{10}$ ufc/g. Por información adicional, véase la etiqueta maestra U.S. EPA para SERENADE® MAX, que se incorpora por completo en la presente a modo de referencia.

La cepa QST713 de *Bacillus subtilis* de tipo salvaje, sus mutantes, sus sobrenadantes, y sus metabolitos de lipopéptidos, y los procedimientos para su uso en el control de patógenos de plantas e insectos se describen con detalle en las Patentes de los EE.UU. N°: 6.060.051; 6.103.228; 6.291.426; 6.417.163; y 6.638.910; cada de las cuales se incorpora específicamente y por completo en la presente a modo de referencia por todo cuanto enseña. En estas Patentes de los EE.UU., la cepa se denomina AQ713, que es sinónimo de QST713. La cepa QST713 de *Bacillus subtilis* fue depositada en NRRL el 7 de mayo, 1997 bajo los términos del Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos con el Propósito de Procedimientos de Patentes con el N° de Acceso B21661. Toda referencia en esta memoria descriptiva a QST713 se refiere a la cepa QST713 de *Bacillus subtilis* (también conocida como AQ713) presente en el producto SERENADE®, depositado en NRRL, N° Acceso B21661, o preparada en biorreactores bajo condiciones que simulan la producción del producto SERENADE®.

En el momento de la presentación de la Solicitud de Patente de los EE.UU. N°: 09/074.870 en 1998, que corresponde a las patentes anteriores, la cepa se designó *Bacillus subtilis* en base a procedimientos clásicos, fisiológicos, bioquímicos y morfológicos. Desde entonces, ha evolucionado la taxonomía de las especies de *Bacillus*, en especial a la luz de los avances de la genética y de las tecnologías de secuenciación, de modo tal que la designación de especies se basa en gran medida en la secuencia de ADN en lugar de los procedimientos usados en 1998. Después de alinear las secuencias de proteína de FZB42 de *B. amyloliquefaciens*, 168 y QST713 de *B. subtilis*, aproximadamente un 95 % de las proteínas halladas en FZB42 de *B. amyloliquefaciens* son un 85 % o más idénticas a las proteínas halladas en QST713; en tanto solamente un 35 % de las proteínas en 168 de *B. subtilis* son un 85 % o más idénticas a las proteínas de QST713. Sin embargo, aún con la mayor confianza en la genética, aún persisten ambigüedades taxonómicas en la literatura científica relevante y los documentos reguladores, que reflejan la comprensión en desarrollo de la taxonomía de *Bacillus* durante los últimos 15 años. Por ejemplo, un producto plaguicida basado en la cepa FZB24 de *B. subtilis*, que está tan estrechamente relacionado con QST 713 como FZB42, se clasifica en los documentos de U.S. EPA como *B. subtilis* var. *amyloliquefaciens*. Dadas estas complejidades en la nomenclatura, esta especie particular de *Bacillus* se designa de diversas maneras, dependiendo del documento, como *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens* y *B. subtilis* var. *amyloliquefaciens*. Por ello, se ha retenido la designación de *B. subtilis* de QST713 en lugar de cambiarlo por *B. amyloliquefaciens*, según lo esperado actualmente basado solamente en comparación de secuencias y taxonomía inferida.

Según se explica con mayor detalle en la presente, como resultado de la presente invención, ahora se sabe que los cultivos de QST713 son en realidad una mezcla de células de tipo salvaje y un porcentaje relativamente pequeño de variantes de tipos celulares que se han denominado "células tipo papel de lija". Por consiguiente, en base a la presente invención, ahora se sabe que QST713 tal como en el producto SERENADE® o en células QST713 cultivadas en un biorreactor consiste de una población mixta de células de tipo salvaje y células tipo papel de lija a la misma relación o a relaciones similares a las halladas en el producto SERENADE® (véase, por ejemplo, la figura 4). Según se describe con detalle en la presente, se hace referencia a las variantes como células tipo "papel de lija" en base a la morfología de sus colonias, como se describe en la figura 1. Las células tipo papel de lija forman colonias sobre un agar nutriente que morfológicamente y fisiológicamente parecen altamente compactas, hidrofóbicas, planas, secas y muy "quebradizas" y que son muy difíciles de eliminar del agar. La adherencia celular se puede observar cualitativamente o se puede medir por la tinción violeta cristal como se describe en Stanley, y col., citado anteriormente. Además de esta morfología de colonias distinta sobre un agar nutriente, las células tipo papel de lija forman biopelículas densas, compactas (o biopelículas más robustas) sobre superficies tales como raíces, según se muestra en las imágenes o de raíces tratadas con 30002 en las figuras 12, 13 y 14. En una realización, las células tipo papel de lija presentan una robustez de película mejorada, como se evalúa según se describe en el Ejemplo 8. En otra realización, las células tipo papel de lija forman cadenas largas de células además de algunas células individuales y cadenas más cortas en un cultivo líquido durante la fase exponencial temprana, como se muestra en

la **figura 2**, pero no se aglomeran ni forman biopelículas en un cultivo líquido. En aún otra realización, las células tipo papel de lija muestran un desarrollo de biopelículas mejorado, comenzando a formar biopelículas como respuesta a fuerzas de corte, aún en un cultivo líquido. En aún otra realización, las células tipo papel de lija tienen un recubrimiento celular adicional, según se describe en el Ejemplo 9 y como se muestra en la imagen de raíces colonizadas 30002 en la **figura 14**. En una realización, se realizan observaciones en base a comparaciones con células isogénicas que son de tipo salvaje para el gen *swrA*. En otra realización, se efectúan observaciones basadas en comparaciones con células de la misma especie que son de tipo salvaje para los genes u ortólogos de los mismos, requeridas para la formación de biopelículas; es decir, *sfp*, *swrA*, *epsC* y *degQ*. El término “isogénico”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a cualesquiera dos células o individuos (por ejemplo, cepas) que tienen el mismo genotipo. En base a la presente invención, ahora se sabe que QST713 tal como en el producto SERENADE® (véase, por ejemplo, el Ejemplo 1, **la figura 1 y la figura 2**) o en células QST713 cultivadas en un biorreactor consista de una población mixta de células de tipo salvaje y células tipo papel de lija a la misma relación o a relaciones similares a las halladas en SERENADE® (véase, por ejemplo, el Ejemplo 3 y la figura 4).

La motilidad en enjambre es un mecanismo activo que permite que las bacterias viajen rápidamente y *en masa* sobre superficies sólidas (J. Henrichsen, “Bacterial Surface Translocation: A Survey and a Classification”, *Bacteriol. Rev.* (1972) 36: 478-503). Se han asociado numerosos genes y operones diferentes con la capacidad de moverse en enjambre en *Bacillus*. Kearns, y col., (“Genes Governing Swarming in *Bacillus subtilis* and Evidence for a Phase Variation Mechanism Controlling Surface Motility,” *Molecular Microbiology* (2004) 52(2): 357-369) descubrieron la cepa de laboratorio 168 y la cepa de laboratorio relacionada PY79 de *B. subtilis*, cada una de las cuales tiene una mutación de desplazamiento de marco en un gen que designaron *swrA* que conduce al deterioro de la motilidad en enjambre. Los nombres alternativos para *swrA* en la literatura científica incluyen *yvzd* y *swrAA*. La mutación *swrA* (es decir, *swrA*) en estas dos cepas de laboratorio es una inserción de un par de bases A:T en una extensión homopolimérica de ocho pares de bases A:T en el nucleótido 34 (toda la numeración de las secuencias de nucleótidos de *swrA* es con respecto a la numeración de los autores en la **figura 5**). Se prevé que esta inserción interrumpa la función del gen porque causa una mutación de desplazamiento de marco y una proteína truncada. La secuencia de tipo salvaje (funcional; es decir, *swrA*⁺) (es decir, sin la inserción) se encontró en la cepa 3610 no domesticada y en cepas que han recuperado la capacidad para moverse en enjambre. Los Solicitantes establecieron que las células tipo papel de lija de QST713 tienen una mutación en el gen *swrA*, como se describe con detalle en el Ejemplo 5. Estas células *swrA*⁻ tienen la capacidad de moverse en enjambre. Sorprendentemente, cuando se aplican a plantas o a la tierra, mejoran la salud de las plantas.

También hay otros genes, *sfp*, *epsC*, *swrA*, *degQ* y un gen plasmídico denominado *rapP*, relacionados con la formación de biopelículas. Véase, McLoon, A., y col., “Tracing the Domestication of a Biofilm-Forming Bacterium” *Journal of Bacteriology*, abril de 2011, 2027-2034. La cepa doméstica de *Bacillus subtilis* designada “168” forma una biopelícula deteriorada con colonias suaves, delgadas y no tiene la capacidad de moverse en enjambre. El término “doméstica”, tal como se usa en el presente documento para describir cepas bacterianas, se refiere a cepas derivadas, mutantes, seleccionadas por sus propiedades que las vuelve adecuadas para un estudio en laboratorio, por ejemplo, gran competencia para importar e integrar material genético, auxotrofia, falta de movimiento en enjambre o formación de películas. Por el contrario, el término “salvaje”, tal como se usa en el presente documento para describir cepas bacterianas, se refiere a cepas que fueron aisladas de la naturaleza y que no fueron seleccionados activamente para una manipulación en laboratorio sencilla. En la publicación de McLoon se describen experimentos conducidos para reparar las capacidades de formación de biopelículas y el movimiento en enjambre de la cepa 168. Primero se reparó la mutación *sfp*, luego la mutación *epsC*, luego la mutación *swrA* y después la mutación *degQ*. En cada paso se restablecía progresivamente la formación de biopelícula, volviendo casi equivalente a la formación de biopelícula en la cepa de tipo salvaje de *Bacillus subtilis* designada 3610. Finalmente, el gen *rapP* se insertó sobre un plásmido en la cepa por lo demás completamente reparada dando como resultado una formación de biopelícula que no era diferenciable de la de 3610. McLoon, y col., describen en la página 2032, “Concluimos que una cepa que contiene los alelos de tipo salvaje de *sfp*, *epsC* y *swrA* es más robusta en la formación de biopelículas que una cepa correspondiente que es mutante para *swrA* y por ende que *swrA* también contribuye en una formación de biopelículas robusta”. Sorprendentemente, de acuerdo con la presente invención, una cepa que carece de la función *swrA* forma una biopelícula más robusta que la cepa parental que tiene un *swrA* de tipo salvaje, a diferencia del hallazgo de McLoon. McLoon, y col., no describen una célula en la cual el único gen mutante formador de biopelículas es *swrA* y, por ello, no describen el fenotipo de biopelícula mejorado que se describe en la presente.

El término “tipo salvaje” se refiere al fenotipo de la forma típica de una especie tal como aparece en la naturaleza y/o como aparece en una forma aislada conocida que se ha designado como de “tipo salvaje”. Los sinónimos de “tipo salvaje” reconocidos en la presente incluyen “tipo salvaje”, “de tipo salvaje”, “+” y “wt”. El tipo salvaje generalmente se define como un producto del alelo estándar, “normal” de uno o más genes específicos en uno o más loci, a diferencia del producido por un alelo no estándar, “mutante” o “variante”. En general, y tal como se usa en el presente documento, el alelo más prevalente (es decir, el que tiene la frecuencia genética más alta) de una cepa o forma aislada particular de *Bacillus* es considerado como el de tipo salvaje. Tal como se usa en el presente documento, “QST713 de tipo salvaje” o “QST713 *swrA*⁺ de tipo salvaje” y sinónimos de los mismos (por ejemplo, “QST713 *swrA*⁺”, “QST tipo salvaje”, “QST713 wt”, etc.) se refieren a QST713 de *B. subtilis* con un gen *swrA* funcional (es decir, *swrA*⁺) capaz de expresar la proteína *swrA* codificada. Por lo tanto, estos términos se refieren a

5 células clonales QST713 de tipo salvaje que son 100 % *swrA*⁺. Una QST713 de tipo salvaje también es de tipo salvaje (es decir, contiene copias funcionales) para otros genes identificados en la literatura como relacionados con la formación de biopelículas: *epsC*, *degQ* y *sfp*. La SEQ ID NO. 11 es la secuencia de nucleótidos del gen *sfp* en la cepa QST713 de tipo salvaje. La SEQ ID NO. 121 es la secuencia de nucleótidos del gen *epsC* en la cepa QST713 de tipo salvaje. La SEQ ID NO. 13 es la secuencia de nucleótidos del gen *degQ* en la cepa QST713 de tipo salvaje.

Todos los microorganismos y las cepas particulares que se describen en la presente, a menos que específicamente se indique de otra manera, fueron separados de la naturaleza y se hacen crecer bajo condiciones artificiales, tal como en cultivos o por medio de procesos de elaboración llevados a escala, tal como una fermentación, como se describe en la presente.

10 El listado de secuencias provisto con esta Solicitud provee secuencias de diversas especies y cepas de *Bacillus*, como también se muestra en las figuras 5A, 5B y 5C. En la siguiente Tabla 1 se correlacionan las SEQ ID N° con las cepas. Todas las secuencias son secuencias de nucleótidos, excepto la SEQ ID NO. 2, que es una secuencia de aminoácidos.

Tabla 1

SEQ ID NO.	CEPA
1, 11, 12 y 13	QST713 de <i>B. subtilis</i>
2	QST713 de <i>B. subtilis</i>
3	AQ30002 de <i>B. subtilis</i>
4	AQ30004 de <i>B. subtilis</i>
5	FZB42 de <i>B. amyloliquefaciens</i>
6	SAFR-032 de <i>B. pumilus</i>
7	3610 de <i>B. subtilis</i>
8	2808 de <i>B. pumilus</i>
9	1942 de <i>B. atrophaeus</i>
10	14580 de <i>B. licheniformis</i>

15 La presente divulgación se relaciona con bacterias formadoras de esporas que contienen un gen *swrA* y, más particularmente, con variantes de tales bacterias que contienen una o más mutaciones en el gen *swrA* que da como resultado un gen *swrA* no funcional que no puede expresar la proteína *swrA* codificada y/o que no puede codificar una proteína *swrA* funcional, en donde dicha mutación y variantes con dicha mutación se denominan *swrA*⁻ en la presente. La presente invención también abarca bacterias formadoras de esporas en donde la actividad *swrA* se ha reducido por un medio distinto de una mutación del gen *swrA*, tal como inhibición de la actividad *swrA* en otros puntos en la progresión desde la activación de la transcripción del gen *swrA*, la transcripción del gen *swrA*, procesamiento del mensaje de post-transcripción, traducción de uno o más ARNm de *swrA*, procesamiento de proteínas de post-traducción, hasta la actividad real de la actual proteína. Esta divulgación contempla cualquier agente o sistema capaz de inhibir la actividad *swrA*, incluyendo moléculas pequeñas, drogas, sustancias químicas, compuestos, ARNs, ribozimas, oligonucleótidos antisentido, anticuerpos inhibidores de *swrA*, péptidos inhibidores de *swrA*, mutantes negativos dominantes, aptámeros o aptámeros especulares. Las células en las cuales se ha reducido la actividad *swrA* por un medio distinto de una mutación del gen *swrA* también se denominan *swrA*⁻. Las células *swrA*⁻ de la presente invención tienen una capacidad de movimiento en enjambre deteriorada y una capacidad aumentada para mejorar la salud de las plantas en comparación con las células con un gen *swrA* de tipo salvaje. En algunas realizaciones, las células *swrA*⁻ pierden toda o sustancialmente toda capacidad de movimiento en enjambre. En algunas realizaciones, la capacidad de movimiento en enjambre está reducida en comparación con la capacidad de movimiento en enjambre en células bacterianas isogénicas que no contienen una mutación en el ortólogo de *swrA*. En algunas realizaciones, la capacidad de movimiento en enjambre está reducida en al menos aproximadamente un 20 %, en al menos aproximadamente un 30 %, en al menos aproximadamente un 40 %, en al menos aproximadamente un 50 %, en al menos aproximadamente un 60 %, en al menos aproximadamente un 70 %, en al menos aproximadamente un 80 % o en al menos aproximadamente un 90 %. La capacidad de movimiento en enjambre puede determinarse mediante el procedimiento que se describe en el Ejemplo 7 y se compara cuantitativamente midiendo el diámetro de crecimiento bacteriano sobre una placa "agar de movimiento en enjambre" inoculada en el centro. Véase la **figura 7**.

45 En otras realizaciones, además de presentar las características anteriores, las células *swrA*⁻ presentan una o más de las siguientes características en comparación con las células con un gen *swrA* de tipo salvaje: morfología de células o de colonias tipo papel de lija, según se describió previamente; formación de biopelículas adherentes densas, compactas, sobre superficies tales como raíces; y formación de algunas cadenas de células largas durante la fase exponencial temprana en un cultivo líquido con ausencia de aglomeración o formación de biopelículas, que

demuestra una capacidad para responder a las señales del medio ambiente (es decir, exposición a superficies sólidas) en la formación de biopelículas. Las células *swrA*⁻ forman una biopelícula densa, compacta sobre superficies tales como raíces y tienen una mayor adherencia a superficies no líquidas tales como raíces, lo que en la presente se conoce como “biopelícula más robusta”. En un aspecto, la superficie no líquida es una superficie sólida; en otros es una superficie semisólida. La adherencia relativa a las raíces se puede analizar por una falta de interrupción de la biopelícula cuando las raíces se cultivan en agar, se retiran del agar y se visualizan por microscopía óptica, según se describe en el Ejemplo 9. En otra realización, la biopelícula más robusta comprende células que tienen un recubrimiento celular adicional y/o una región blanca grande (transparente a electrones) cuando se visualiza con microscopio electrónico de transmisión. Véanse las imágenes de 30002 en la **figura 14**. En un aspecto de esta realización, el diámetro promedio de las células en la biopelícula más robusta es al menos aproximadamente 1,5 veces mayor o al menos aproximadamente 2 veces mayor que el diámetro promedio de células que no contienen a la mutación *swrA*. Véanse imágenes de 30002 en la **figura 14**. En algunas realizaciones, la morfología celular de la biopelícula formada sobre superficies no líquidas, tales como raíces, se analiza mediante el procedimiento que se describe en el Ejemplo 9. En aún otra realización, las células *swrA*⁻ también pueden presentar un desarrollo mejorado de la biopelícula cuando se las expone a fuerzas de corte en un cultivo líquido. Dichas fuerzas de corte se describen en el Ejemplo 1. Las células bacterianas apropiadas que se pueden usar como células control en comparación con las características de las células bacterianas *swrA*⁻ pueden variar. Por ejemplo, en una realización las comparaciones de las propiedades anteriores se efectúan entre células bacterianas que contienen la mutación y células bacterianas isogénicas que no contienen a la mutación. En otra realización, la comparación se efectúa entre células bacterianas que contienen a la mutación y células bacterianas de la misma especie que no contienen a la mutación que también comprenden a los alelos de tipo salvaje de los genes formadores de biopelículas *sfp*, *epsC* y *degQ*.

En algunas realizaciones estas bacterias formadoras de esporas *swrA*⁻ pertenecen a la familia *Bacillaceae*. En aún otras realizaciones, son del género *Bacillus*. En dicha realización, las células bacterianas formadoras de esporas o *Bacillus* con la mutación *swrA* pueden (i) pertenecer al clado de *Bacillus subtilis*, como se definirá más adelante, (ii) contener una o más mutaciones en un ortólogo de *swrA* y (iii) tener una menor capacidad de movimiento en enjambre y una mayor capacidad para mejorar la salud de las plantas y, opcionalmente, una o más de las demás características descritas en el párrafo precedente. El término “clado de *Bacillus subtilis*”, tal como se usa en el presente documento, se describe parcialmente en la figura 6 e incluye las especies que han sido completamente secuenciadas y para quienes se ha determinado que probablemente tienen un ortólogo de *swrA* y aquellas especies para las cuales no se disponen actualmente de los datos de la secuencia genómica pero que presumiblemente tienen un ortólogo de *swrA* en base a sus relaciones filogenéticas cercanas. Además el término “clado de *Bacillus subtilis*” abarca aquellas especies de *Bacillus* no identificadas en la presente que contienen un ortólogo de *swrA* mediante análisis bien conocidos por los expertos en la materia, incluyendo el procedimiento de mejor acierto BLAST recíproco.

Las secuencias homólogas son ortólogas se fueron separadas por un evento de especiación: cuando una especie diverge en dos especies separadas, se dice que las copias divergentes de un solo gen en la especie resultante son ortólogas. Los ortólogos son genes en diferentes especies que son similares entre sí porque se originaron por descendencia vertical de un solo gen del último ancestro común. La evidencia más fuerte que dos genes similares son ortólogos es el resultado de un análisis filogenético del linaje genético. Los genes que pertenecen a un clado son ortólogos y comprenden un grupo de genes ortólogos que descendieron de un ancestro común. Los ortólogos a menudo, pero no siempre, cumplen la misma función. El procedimiento del mejor acierto BLAST recíproco es la estrategia usada con más frecuencia para identificar potenciales pares ortólogos. Este procedimiento asume que si dos proteínas similares de dos especies producen recíprocamente el mejor acierto BLAST en el proteoma del otro, entonces constituyen un par ortólogo. Véase Rivera, M.C., y col., “Genomic Evidence for Two Functionally Distinct Gene Classes”, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (95): 6239-44 (mayo de 1998). Por ejemplo, el análisis del par de *swrA* de especies cruzadas de los Solicitantes reveló que *swrA* en *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis*, *B. atrophaeus* y *B. pumilus* produjo el mejor acierto BLAST recíproco, aún cuando el porcentaje de identidad global de la proteína *swrA* entre las dos especies, *B. amyloliquefaciens* y *B. pumilus*, era tan bajo como un 70 %.

En una realización, las especies del clado de *Bacillus subtilis* incluyen pero en un sentido no limitativo *B. pumilus*, *B. atrophaeus*, *B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis* y *B. licheniformis*, *B. aerophilus*, *B. stratosphericus*, *B. safensis*, *B. altitudinus*, *B. vallismortis*, *B. halotolerans*, *B. mojaviensis*, *B. sonorensis*, *B. aerius* y (ii) variantes y cepas de QST713 *swrA*⁺ de tipo salvaje de *Bacillus subtilis* con una o más mutaciones en el gen *swrA*.

Las mutaciones *swrA* de la presente divulgación incluyen, pero en un sentido no limitativo, una o más inserciones de pares de bases de ácido nucleico, una o más deleciones de pares de bases de ácido nucleico, uno o más cambios de ácido nucleico, incluyendo cambios en el codón de inicio, una o más inserciones de transposones, *knockdowns* y/o inactivaciones de un gen *swrA* de tipo salvaje. Los expertos en la materia comprenderán que el gen incluye regiones reguladoras, tales como promotores, regiones transcritas y otras regiones de secuencias funcionales. La mutación *swrA* de acuerdo con la invención reivindicada es una deleción en la posición 26 de la SEQ ID NO:1, tal como se refleja en la SEQ ID NO: 3.

Las poblaciones de bacterias formadoras de esporas pueden ser evaluadas por el contenido de células naturales que tienen una mutación en el ortólogo de *swrA*, según se describe en el Ejemplo 24. Como alternativa, se pueden

utilizar numerosas técnicas genéticas y de biología molecular para disminuir la expresión de *swrA* a los niveles de transcripción y traducción para producir células *swrA*⁻ con una capacidad reducida de moverse en enjambre y robusta para formar biopelículas. En algunas realizaciones, dichas células *swrA*⁻ pueden presentar una o más de las otras propiedades (alguna formación de cadenas pero ninguna aglomeración o formación de biopelículas en cultivo líquido y morfología celular alterada en biopelículas de raíces) descritas previamente. Se pueden manipular mediante ingeniería genética ARN antisentido, ARNi y ribozimas e introducirlo en la célula para disminuir la expresión de *swrA* u otros genes que actúan como reguladores positivos, tales como sigmaD y sigmaA. Se sabe que estos factores de transcripción reconocen y se unen directamente a los promotores *swrA* (Calvio, y col., "Autoregulation of *swrAA* and Motility in *Bacillus subtilis*", *Journal of Bacteriology* (2008) 190: 5720-5728). También se pueden aprovechar reguladores negativos de *swrA* para disminuir la expresión de *swrA*. Por ejemplo, se puede sobreexpresar FlgM, el factor anti-sigma específico de sigmaD (Fredrick y Helmann, "FlgM is a primary regulator of sigmaD activity, and its absence restores motility to a *sinR* mutant", *Journal of Bacteriology* (1996) 178: 7010-7013), para disminuir la expresión de *swrA*. Otra estrategia comprende el uso de una mutación antimórfica o una mutación dominante negativa. Dado que *swrA* podría funcionar como un dímero o un multímero (Dan Kearns, comunicación personal, 2011), un *swrA* heteromérico que consiste en unidades de *swrA* mutadas y de tipo salvaje ya no sería funcional. Los ejemplos de técnicas de ingeniería genética usadas para disminuir la expresión de *swrA* se muestran en el Ejemplo 25.

El término "posición", cuando se usa de acuerdo con la presente invención, significa la posición de un nucleótido en una secuencia de ácido nucleico de un aminoácido dentro de una secuencia de aminoácidos representada en la presente. El término "correspondiente" se usa en la presente para indicar que una posición no se limita a ser determinada por la cantidad de nucleótidos o aminoácidos precedentes. Por ejemplo, la posición de un nucleótido dado de acuerdo con la presente invención que puede ser suprimido puede variar debido a deleciones de nucleótidos adicionales en otra parte de un gen *swrA* tal como en la región no traducida 5' (UTR) incluyendo el promotor y/o cualquier otra secuencia o gen regulador. Por lo tanto, cuando en la presente se usa "posición correspondiente" o "una posición correspondiente a" una posición correspondiente de una secuencia de nucleótidos o de una secuencia de aminoácidos se refiere a una posición que, cuando la secuencia en cuestión se alinea, por ejemplo, con la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO. 1 o la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO. 2 (por ejemplo, la secuencia de referencia) mediante procedimientos estándar, presenta una homología significativa con la posición indicada o, a veces, con porciones de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO. 1 o con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO. 2. Las diferentes especies de, por ejemplo, *Bacillus*, si bien son similares en la secuencia de nucleótidos del gen *swrA* y/o la proteína *swrA*, no son idénticas a la secuencia de referencia y, en particular, pueden contener nucleótidos o aminoácidos diferentes, menos numerosos o más numerosos que la secuencia de referencia. Las extensiones de la secuencia en cuestión que son similares a las SEQ ID NO. 1 o 2, por ejemplo, pueden determinarse fácilmente mediante técnicas estándar de alineación *in silico* usando un software establecido, por ejemplo usando ClustalW, con los parámetros definidos en "estándar" o prefijados".

La mutación *swrA* en una variante de bacterias formadoras de esporas tiene lugar en una posición de nucleótido que causa un cambio de aminoácido correspondiente a por lo menos una de las siguientes posiciones conservadas de la proteína que se muestra en la SEQ ID NO. 2: posiciones 1-17, posiciones 19-20, posición 22, posiciones 25-29, posiciones 31-33, posiciones 36-39, posiciones 41-48, posiciones 50-51, posición 53, posición 56, posición 58, posición 60, posiciones, 61, posiciones 64-65, posiciones 67-69, posición 71-86, posición 88, posición 95, posición 97, posiciones 99-113 y posición 116. Estas posiciones conservadas se designan con un asterisco en la alineación que se muestra en la figura 5C. En aún otras realizaciones, la mutación tiene lugar en una posición de nucleótido que causa un cambio de aminoácido correspondiente a un cambio en al menos una de las siguientes posiciones conservadas de la proteína: las posiciones 1-17, las posiciones 71-86 y las posiciones 99-113. Además, dicho cambio de nucleótido (para que sea una mutación *swrA*) debería deteriorar la capacidad del movimiento en enjambre de las células y/o mejorar su capacidad para promover la salud de las plantas en comparación con las células que contienen al gen *swrA* de tipo salvaje. En algunas realizaciones, dicha mutación también dará como resultado las siguientes características en comparación con las células de tipo salvaje: una morfología celular tipo papel de lija, una colonización de raíces más robusta y/o formación de cadenas largas con ausencia de aglomeración en un cultivo líquido, según se describió previamente.

La mutación de *swrA* se produce en una posición correspondiente a las posiciones 1-100, 1-50, 1-40 o 7-40 de cualquiera de las SEQ ID NO. 1 y 5-10.

En algunas realizaciones, las células *swrA*⁻ tienen un gen *swrA* que tiene un porcentaje de identidad con el gen *swrA* de la SEQ ID NO. 1 de al menos aproximadamente un 60 %, de al menos aproximadamente un 70 %, de al menos aproximadamente un 80 %, de al menos aproximadamente un 90 % o de al menos aproximadamente un 95 %. En realizaciones particulares, la versión de tipo salvaje de tales bacterias *swrA*⁻ con al menos entre aproximadamente un 60 % y aproximadamente un 95 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO. 1 tiene una proteína *swrA* que es ortóloga de la SEQ N°: 2.

En una realización, el microorganismo tiene una mutación en la posición correspondiente a una o más de las posiciones 26-34 (una extensión homopolimérica de 8 pares de bases A:T) o de las posiciones 1-3 (el codón de inicio) del gen *swrA* como se muestra en la SEQ ID NO. 1. En algunos casos, esta mutación es una inserción o

delección. Un ejemplo de una delección en las posiciones 26-34 es el gen *swrA* mutado que se muestra en la SEQ ID NO. 3. En la SEQ ID NO. 4 se muestra un ejemplo de una mutación donde el codón de inicio es mutado en un codón que no es de inicio, que produce un transcrito *swrA* no funcional para la traducción.

5 En otra realización, las células *swrA*⁻ contienen un gen *swrA*⁻ que presenta identidad de secuencia con un gen *swrA* de tipo salvaje de la misma especie de *Bacillus* y, en algunas realizaciones, de la misma cepa, de al menos aproximadamente un 85 %, de al menos aproximadamente un 90 % o de al menos aproximadamente un 95 %. En algunas realizaciones, las células *swrA*⁻ tienen un gen *swrA*⁻ que tiene identidad de secuencia con un gen *swrA* de tipo salvaje gene de la misma especie de *Bacillus* y dichas especies de *Bacillus* se encuentran dentro del clado de *Bacillus subtilis*. En algunas realizaciones, la especie de *Bacillus* es *pumilus*, *atrophaeus*, *amyloliquefaciens*, *subtilis*,
10 *licheniformis*, *aerophilus*, *stratosphericus*, *safensis*, *altitudinus*, *vallismortis*, *halotolerans*, *mojavensis*, *sonorensis* o *aerius*. En aún otras realizaciones, las células *swrA*⁻ contienen un gen *swrA* mutante que tienen una identidad de secuencia con una o más de las secuencias que se muestran en las SEQ ID NO. 1 y 5-10 de al menos aproximadamente un 85 %, de al menos aproximadamente un 90 % o de al menos aproximadamente un 95 %.

15 En una realización, las células bacterianas formadoras de esporas, incluyendo las que pertenecen al clado de *Bacillus subtilis*, que tienen una mutación en el ortólogo de *swrA*, comprenden un ortólogo *sfp* de tipo salvaje. En otras realizaciones, dichas células bacterianas formadoras de esporas también comprenden ortólogos de *degQ* y *epsC* de tipo salvaje. En aún otras realizaciones, las células bacterianas formadoras de esporas de cualquiera de las realizaciones anteriores son *Bacillus subtilis* o *Bacillus amyloliquefaciens*. Los genes *sfp*, *epsC* y *degQ* de QST713 de tipo salvaje se proveen en la presente como las SEQ ID NO. 11, 12 y 13, respectivamente. Los ortólogos de los genes *sfp*, *epsC* y *degQ* de otras especies, incluyendo las especies de *Bacillus* y cepas en las cuales se proveen secuencias de nucleótidos *swrA* en la presente (en el listado de secuencias y/o en las figuras 5A, B y C) se encuentran disponibles al público en GenBank y en diversas publicaciones, incluyendo la publicación de McLoon citada previamente. En una realización, los ortólogos *degQ*, *epsC* y *sfp* de tipo salvaje presentan al menos
20 aproximadamente un 90 % o al menos aproximadamente un 95 % o al menos aproximadamente un 96 % o al menos aproximadamente un 97 % o al menos aproximadamente un 98 % o al menos aproximadamente un 99 % de identidad de secuencia con uno de los genes *degQ*, *epsC* y *sfp*, respectivamente, en FZB42 de *B. amyloliquefaciens*, SAFR-032 de *B. pumilus*, 3610 de *B. subtilis*, 1942 de *B. atrophaeus* y 14580 de *B. licheniformis*. En un aspecto para determinar la identidad de secuencia, las células bacterianas formadoras de esporas que contienen a la mutación en el ortólogo de *swrA* son de las mismas especies que una de las cepas a las que se hizo referencia previamente.

30 El porcentaje de células *swrA*⁻ en una composición particular de la presente invención variará dependiendo del propósito específico y de los procedimientos de aplicación usados para la composición. Las células totales en las composiciones y los procedimientos de la presente invención pueden incluir diferentes tipos celulares (por ejemplo, una combinación de células bacterianas y no bacterianas) o pueden incluir células bacterianas de dos o más especies o pueden incluir células de *Bacillus* de dos o más especies de *Bacillus*, o pueden ser células de *B. subtilis*
35 de dos o más genotipos o cepas diferentes, o pueden ser células de *B. amyloliquefaciens* de dos o más genotipos o cepas diferentes o pueden ser células con una o más mutaciones *swrA*⁻ diferentes.

En algunas realizaciones, el porcentaje de células *swrA*⁻ en las células totales en las composiciones y en los procedimientos de la presente invención será de al menos un 3,5 % o al menos un 3,6 % o al menos un 3,7 % o al menos un 3,8 % o al menos un 3,9 % o al menos un 4 % o al menos un 5 % o al menos un 6 % o al menos un 7 % o al menos un 8 % o al menos un 9 % o al menos un 10 %, o al menos un 15 % o al menos un 20 % o al menos un 25 % o al menos un 30 % o al menos un 35 % o al menos un 40 % o al menos un 45 % o al menos un 50 % o al menos un 55 % o al menos un 60 % o al menos un 65 % o al menos un 70 % o al menos un 75 % o al menos un 80 % o al menos un 85 % o al menos un 90 % o al menos un 95 % o al menos un 98 % o al menos un 99 % o un 100 %. En algunas realizaciones de la presente invención, todas las células presentes en una composición particular o usadas en un procedimiento particular son células *swrA*⁻ (es decir, un 100 % de células *swrA*⁻).
45

En algunas realizaciones, el porcentaje de células *swrA*⁻ en las células totales en la composición y en los procedimientos de la presente invención serán de entre aproximadamente un 3,5 % y aproximadamente un 99,9 %. En otra realización, el porcentaje será de entre aproximadamente un 5 % y aproximadamente un 99 %. En otra realización, el porcentaje será de entre aproximadamente un 10 % y aproximadamente un 99 %.

50 En algunas realizaciones, la cantidad de unidades formadoras de colonias ("ufc") por gramo ("g") de células *swrA*⁻ en las composiciones y en los procedimientos de la presente invención será de al menos 1×10^7 ufc/g o al menos 1×10^8 ufc/g o al menos 1×10^9 ufc/g o al menos 2×10^9 ufc/g, o al menos 3×10^9 ufc/g o al menos 4×10^9 ufc/g o al menos 5×10^9 ufc/g o al menos 6×10^9 ufc/g o al menos 7×10^9 ufc/g, o al menos 8×10^{10} ufc/g, o al menos $8,5 \times 10^{10}$ ufc/g, o al menos 9×10^{10} ufc/g, o al menos $9,5 \times 10^{10}$ ufc/g, o al menos 1×10^{11} ufc/g, o al menos 2×10^{11} ufc/g,
55 o al menos 3×10^{11} ufc/g, o al menos 4×10^{11} ufc/g, o al menos 5×10^{11} ufc/g, o al menos 6×10^{11} ufc/g, o al menos 7×10^{11} ufc/g, o al menos 8×10^{11} ufc/g, o al menos 9×10^{11} ufc/g, o al menos 1×10^{12} ufc/g, o al menos 1×10^{13} ufc/g, o al menos 1×10^{14} ufc/g.

En otras realizaciones, la cantidad total de células *swrA*⁻ en las composiciones y en los procedimientos de la presente invención se basa en el peso seco relativo o real de las células *swrA*⁻ en las composiciones totales.

En algunas realizaciones, la cantidad total de células *swrA* en las composiciones y los procedimientos de la presente invención se basa en las ufc/g de las células *swrA* en las composiciones.

La presente invención también abarca procedimientos para mejorar la salud de las plantas, mejorar el crecimiento vegetal y/o controlar las plagas y enfermedades de plantas mediante la administración a una planta o una parte de planta, tal como una semilla, raíz, rizoma, bulbo, gajo o tubérculo, o por aplicación a un locus sobre el cual crece una planta o partes de una planta, tal como tierra, de una o más de las nuevas variantes y cepas de bacterias formadoras de esporas, incluyendo las de *Bacillus* descritas previamente; o preparaciones sin células de las mismas; o metabolitos de las mismas.

La “salud de las plantas”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a una condición de una planta que se determina según varios aspectos solamente o combinados entre sí. Un indicador importante para la condición de la planta es el rendimiento de los cultivos. Los términos “cultivo” y “fruto” se interpretarán como cualquier producto de una planta que se utiliza luego después de la cosecha, por ejemplo frutas en el sentido real, verduras, frutos secos, granos, semillas, madera (por ejemplo, en el caso de plantas de silvicultura), flores (por ejemplo, en el caso de las plantas de jardinería, ornamentales), etc.; es decir, cualquier cosa de valor económico producido por la planta. Otro indicador de la condición de la planta es el vigor. El vigor de la planta también se puede manifestar según diversos aspectos, algunos de los cuales comprenden el aspecto visual, por ejemplo, color de la hoja, color y aspecto de los frutos, cantidad de hojas basales muertas y/o extensión de las laminas foliares, el peso de las plantas, la altura de las plantas, la extensión de las plantas (vuelco), número, fuerza y productividad de retoños, longitud del panículo, extensión del sistema radicular, fuerza de las raíces, extensión de nodulación, en particular de nodulación de rizobios, momento de la germinación, emergencia, floración, madurez de los granos y/o senescencia, contenido de proteínas, contenido y similares. Otro indicador para la condición de la planta es la tolerancia o resistencia de la planta a factores de estrés biótico y abiótico.

De acuerdo con la presente invención, un “mayor rendimiento” de una planta, en particular de una planta para agricultura, silvicultura y/u ornamental, significa que el rendimiento de un producto de la respectiva planta aumenta en una cantidad mensurable con respecto al rendimiento del mismo producto de la planta producida bajo las mismas condiciones, pero sin la aplicación de la composición de la invención. De acuerdo con la presente invención, se prefiere que el rendimiento aumente en al menos un 0,5 %, o en al menos un 1 %, o en al menos un 2 %, o en al menos un 4 %, o en al menos un 5 % o en al menos un 10 % cuando se compara con los controles apropiados.

En otra realización preferida, la presente invención provee el uso de la composición de la invención para incrementar el rendimiento y/o mejorar el vigor de una planta, por ejemplo, de una planta de agricultura, silvicultura y/u ornamental.

La presente invención provee además un procedimiento para incrementar el rendimiento y/o mejorar el vigor de una planta, que comprende tratar la planta, el locus donde la planta está creciendo o donde se espera que crezca (es decir, el locus de la planta), y/o los propágulos a partir de los cuales crece la planta con las composiciones o bacterias formadoras de esporas de la invención. En algunas realizaciones, la o las plantas tratadas cultivadas en el locus de una planta tratada se hacen crecer en un entorno que es físicamente estresante para las plantas en cultivo. Dichas condiciones pueden ser temperaturas frías (por ejemplo, 15 °C o menos), condiciones de sequía, tierra pobre en nutrientes (por ejemplo, con niveles reducidos de nitrógeno y/o potasio y/o fosfato u otros micronutrientes inorgánicos) y/o una mayor salinidad, no óptima, de la tierra. De acuerdo con la presente invención, “vigor mejorado de plantas” significa que determinadas características del cultivo aumentan o mejoran en una cantidad mensurable o notable en el mismo factor de la planta producida bajo las mismas condiciones, pero sin la aplicación de la composición de la presente invención. Un vigor mejorado de las plantas se puede caracterizar, entre otros, mediante las siguientes propiedades mejoradas de las plantas: (a) vitalidad mejorada de la planta, (b) calidad mejorada de la planta y/o de productos de la planta, por ejemplo, un mayor contenido de proteínas, (c) aspecto visual mejorado, (d) retardo de la senescencia, (e) crecimiento radicular mejorado y/o un sistema radicular más desarrollado (por ejemplo, determinado por la masa seca radicular), (f) nodulación mejorada, en particular la nodulación de rizobios, (g) paniculas más largas, (h) lámina foliar más grande, (i) menos hojas basales muertas, (j) mayor contenido de clorofila, (k) período fotosintéticamente activo prolongado, (l) densidad de plantas en pie aumentado o mejorado, (m) menor vuelco de plantas, (n) mayor peso de la planta, (o) mayor altura de la planta, (p) aumento de retoños, (q) retoños más fuertes y/o más productivos, (r) menos retoños no productivos, (s) mayor actividad de fotosíntesis y/o mayor contenido de pigmentos y por lo tanto un color de hojas más verde, (t) germinación más temprana y/o mejorada, (u) emergencia mejorada y/o más uniforme y/o más temprana, (v) mayor crecimiento de brotes, (w) floración más temprana, (x) fructificación más temprana, (y) madurez más temprana de los granos, (z) menor uso de fertilizantes, (aa) menor necesidad de semillas.

Las composiciones de la presente invención también son de utilidad para controlar patógenos de plantas, tales como hongos patógenos de plantas, incluyendo, por ejemplo, diversos patógenos transmitidos por la tierra y/o transmitidos por semillas, tales como *Aphanomyces cochlioides*, *Cylindrocladium parasiticum*, *Fusarium avenaceum*, *Fusarium culmorum*, *Phytophthora capsici*, *Phytophthora cinnamomi*, *Pythium ultimum*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Sclerotinia minor*, *Sclerotium rolfsii*, *Ustilago hordei*, *Stagonospora nodorum*, *Aspergillus fumigatus*, *Verticillium dahliae*, *Tapesia yallunde*, *Alternaria alternate* y *Penicillium expansum*. En una realización, los patógenos transmitidos por la tierra controlados son *P. capsici*, *S. rolfsii* y *C. parasiticum*.

Las composiciones de la presente invención también son de utilidad para control plagas de plantas, incluyendo nematodos parásitos de plantas, tales como, por ejemplo, nematodos de los nudos de la raíz, quísticos, de lesiones y en anillo, incluyendo *Meloidogyne* spp., *Heterodera* spp., *Globodera* spp., *Pratylenchus* spp. y *Criconebella* sp. Las composiciones también son de utilidad para controlar *Tylenchulus semipenetrans*, *Trichodorus* spp., *Longidorus* spp., *Rotylenchulus* spp., *Xiphinema* spp., *Belonolaimus* spp. (tales como *B. longicaudatus*), *Criconemoides* spp., *Tylenchorhynchus* spp., *Hoplolaimus* spp., *Rotylenchus* spp., *Helicotylenchus* spp., *Radopholus* spp. (tales como *R. citrophilus* y *R. similis*), *Ditylenchus* spp. y otros nematodos parásitos de plantas. En algunas realizaciones los blancos son nematodos quísticos, tales como *Heterodera glycines* (nematodo quístico de soja), *Heterodera schachtii* (nematodo quístico de remolacha), *Heterodera avenae* (nematodo quístico de cereales), *Meloidogyne incognita* (nematodo de los nudos de la raíz de algodón (o del sur)), *Globodera rostochiensis* y *Globodera pallida* (nematodo quístico de papa). En otras realizaciones, los blancos son nematodos de los nudos de la raíz, tal como *M. incognita* (nematodo de los nudos de la raíz del algodón), *M. javanica* (nematodo de los nudos de la raíz javanés), *M. hapla* (nematodo de los nudos de la raíz del norte) y *M. arenaria* (nematodo de los nudos de la raíz del cacahuete).

El término "control", tal como se usa en el presente documento, significa matar o inhibir el crecimiento de microorganismos o, con respecto a plagas de plantas, tales como nematodos, matar, reducir la cantidad y/o reducir el crecimiento, la alimentación o el desarrollo fisiológico normal, incluyendo, para los nematodos de los nudos de la raíz, la capacidad para penetrar las raíces y para desarrollarse dentro de las raíces. Una cantidad eficaz es una cantidad capaz de reducir mensurablemente (i) el crecimiento de microorganismos o, (ii) con respecto a plagas de plantas, el crecimiento, la alimentación, la movilidad, la capacidad reductora de la plaga o, (iii) con respecto a plagas de nematodos parásitos de plantas, específicamente, la penetración en raíces, la maduración en raíces y/o desarrollo fisiológico normal general y los síntomas debidos a una infección por nematodos. En algunas realizaciones, se reducen los síntomas y/o patógenos de plantas o plagas de plantas, tales como nematodos, en al menos aproximadamente un 5 %, al menos aproximadamente un 10 %, al menos aproximadamente un 20 %, al menos aproximadamente un 30 %, al menos aproximadamente un 40 %, al menos aproximadamente un 50 %, al menos aproximadamente un 60 %, al menos aproximadamente un 70 %, al menos aproximadamente un 80 % o al menos aproximadamente un 90 %.

Las nuevas variantes y cepas de *Bacillus* de la presente invención pueden estar presentes en las composiciones de la presente invención como esporas (que son latentes), como células vegetativas (que están en crecimiento), como células en estado de transición (que están en transición de la fase de crecimiento a la fase de esporulación) o como una combinación de todos de estos tipos de células. En algunas realizaciones, la composición comprende principalmente esporas. En algunas realizaciones, el porcentaje de células *swrA* que son esporas comprenden al menos aproximadamente un 70 %; al menos aproximadamente un 80 %, al menos aproximadamente un 81 %, al menos aproximadamente un 82 %, al menos aproximadamente un 83 %, al menos aproximadamente un 84 %, al menos aproximadamente un 85 %, al menos aproximadamente un 86 %, al menos aproximadamente un 87 %, al menos aproximadamente un 88 %, al menos aproximadamente un 89 %, al menos aproximadamente un 90 %, al menos aproximadamente un 95 %.

Los metabolitos de las nuevas variantes y cepas de *Bacillus* de la presente invención incluyen lipopéptidos, tal como iturinas, surfactinas, plipastatinas, fengicinas y agrastatinas y otros compuestos con propiedades antibacterianas. Los metabolitos de lipopéptidos de QST713 se describen con detalle en las Patentes de los EE.UU. N°: 6.291.426 y 6.638.910. Véase, también, Marc Ongena y Philippe Jacques, "Bacillus Lipopeptides: Versatile Weapons for Plant Disease Biocontrol", *Trends in Microbiology* (1 de marzo, 2008) Volumen 16, N° 3, 115-125.

Las composiciones de la presente invención se pueden obtener mediante cultivo las nuevas variantes y cepas de *Bacillus* de acuerdo con procedimientos bien conocidos en el arte, incluyendo el uso de los medios y otros procedimientos descritos en la Patente de los EE.UU. N°: 6.060.051. Los procesos de cultivos microbianos a gran escala convencionales incluyen fermentación sumergida, fermentación en estado sólido o cultivo sobre superficie líquida. A los fines de la fermentación, a medida que se van agotando los nutrientes, las células de *Bacillus* comienzan la transición de la fase de crecimiento a la fase de esporulación, de manera tal que el producto de fermentación final comprende mayormente esporas, metabolitos y medio de fermentación residual. La esporulación forma parte del ciclo de vida natural de las células de *Bacillus*, incluyendo *Bacillus subtilis*, y en general es iniciado por la célula como respuesta a la limitación de nutrientes. La fermentación está configurada para obtener niveles altos de unidades formadoras de colonias de *Bacillus* y para promover la esporulación. Las células, esporas y metabolitos bacterianos del medio de cultivo que resultan de la fermentación se pueden usar directamente o se pueden concentrar usando procedimientos industriales convencionales, tales como centrifugación, filtración por flujo tangencial, filtración profunda y evaporación. En la presente, tanto el caldo de fermentación como el caldo concentrado se denominan "productos de fermentación". Las composiciones de la presente invención incluyen los productos de fermentación. En algunas realizaciones, el caldo de fermentación concentrado se lava, por ejemplo, mediante un proceso de diafiltración, para eliminar el caldo de fermentación residual y los metabolitos.

El caldo de fermentación o el caldo concentrado se pueden secar con o sin la adición de vehículos usando procesos o procedimientos de secado convencionales tales como secado por aspersion, secado por congelamiento, secado en bandeja, secado en lecho fluido, secado en tambor o evaporación.

Los productos secos resultantes se pueden procesar adicionalmente, tal como por molienda o granulación, para alcanzar un tamaño de partícula específico o un formato físico específico. También se pueden agregar vehículos, que se describirán más adelante, después del secado.

5 Las preparaciones sin células del caldo de fermentación de las nuevas variantes y cepas de *Bacillus* de la presente invención se pueden obtener mediante cualquier medio conocido en el arte, tal como extracción, centrifugación y/o filtración del caldo de fermentación. Los expertos en la materia podrán apreciar que las denominadas preparaciones sin células no carecerán de células sino que mayormente no contienen células o esencialmente no contienen células, dependiendo de la técnica usada (por ejemplo, velocidad de centrifugación) para eliminar las células. La preparación sin células resultante se puede secar y/o formular con componentes que ayudan en su aplicación a las plantas o al medio de crecimiento vegetal. Los procedimientos de concentración y las técnicas de secado descritas previamente para el caldo de fermentación también son aplicables a las preparaciones sin células.

10 Los metabolitos de *Bacillus subtilis* se pueden obtener de acuerdo con los procedimientos descritos en la Patente de los EE.UU. N°: 6.060.051. El término "metabolitos" tal como se usa en el presente documento se refiere a metabolitos semi-puros y puros o esencialmente puros, o a metabolitos que no se separaron de *Bacillus subtilis*. En algunas realizaciones, después de obtener una preparación sin células por centrifugación del caldo de fermentación, los metabolitos se pueden purificar mediante filtración de exclusión por tamaño tal como las resinas Sephadex incluyendo LH-20, G10 y G15 y G25 que agrupa a los metabolitos en diferentes fracciones basado en el corte de peso molecular, tal como un peso molecular menor que aproximadamente 2000 daltons, menor que aproximadamente 1500 daltons, menor que aproximadamente 1000 daltons y así sucesivamente, ya que los lipopéptidos son de entre 800 daltons y 1600 daltons.

Los procedimientos de concentración y las técnicas de secado descritos previamente para la formulación del caldo de fermentación también son aplicables a los metabolitos.

25 Las composiciones de la presente invención pueden incluir ingredientes de formulación inertes que se agregan a las composiciones que comprenden células, preparaciones sin células o metabolitos para mejorar la eficacia, la estabilidad y utilidad y/o para facilitar el procesamiento, el envasado y la aplicación de uso final. Dichos ingredientes de formulación inertes pueden incluir vehículos, agentes de estabilización, nutrientes o agentes modificadores de las propiedades físicas, que se pueden agregar individualmente o combinados. En algunas realizaciones, los vehículos pueden incluir materiales líquidos tales como agua, aceite y otros solventes orgánicos o inorgánicos y materiales sólidos tales como minerales, polímeros o complejos de polímeros derivados biológicamente o mediante síntesis química. En algunas realizaciones, el vehículo es un aglutinante o un adhesivo que facilita la adherencia de la composición a una parte de planta, tal como una semilla o raíz. Véase, por ejemplo, Taylor, A.G., y col., "Concepts and Technologies of Selected Seed Treatments" *Annu. Rev. Phytopathol.* 28: 321-339 (1990). Los agentes de estabilización pueden incluir agentes anti-aglutinantes, agentes anti-oxidantes, desecantes, protectores o conservantes. Los nutrientes pueden incluir fuentes de carbono, nitrógeno y fósforo, tales como azúcares, polisacáridos, aceite, proteínas, aminoácidos, ácidos grasos y fosfatos. Los modificadores de las propiedades físicas pueden incluir agentes de carga, agentes humectantes, espesantes, modificadores del pH, modificadores de la reología, dispersantes, adyuvantes, agentes tensioactivos, agentes anticongelantes o colorantes. En algunas realizaciones, la composición que comprende células, una preparación sin células o metabolitos producidos por fermentación se pueden usar directamente con o sin agua como diluyente sin ninguna otra preparación de formulación. En algunas realizaciones, los ingredientes de formulación inertes se agregan después de concentrar el caldo de fermentación y durante y/o después del secado.

45 En algunas realizaciones, las composiciones de la presente invención se usan para tratar una amplia variedad de cultivos de la agricultura y/o de la horticultura, incluyendo los que se cultivan por sus semillas, para la producción, en el paisajismo y los que se cultivan para la producción de semillas. Las plantas representativas que se pueden tratar usando las composiciones de la presente invención incluyen, pero en un sentido no limitativo, las siguientes: *Brassica*, verduras de bulbo, granos de cereales, cítricos, algodón, curcubitáceas, verduras de frutos, verduras de hoja, legumbres, cultivos de semillas oleaginosas, cacahuete, frutas carnosas, verduras de raíz, verduras de tubérculos, verduras de bulbo, frutas con carozo, tabaco, frutillas y otras bayas, y diversas ornamentales.

50 Las composiciones de la presente invención se pueden administrar como un rociado foliar, como un tratamiento de semillas/raíces/tubérculos/rizomas/bulbos/tallo bulboso/gajo y/o como un tratamiento de la tierra. Las semillas/raíces/tubérculos/rizomas/bulbos/tallos bulbosos/gajos se pueden tratar antes de la siembra, durante la siembra o después de la siembra. Cuando se usa como un tratamiento de semillas, las composiciones de la presente invención se aplican a una dosis de entre aproximadamente 1×10^2 y aproximadamente 1×10^7 ufc/semilla, dependiendo del tamaño de la semilla. En algunas realizaciones, la dosis de aplicación es de entre aproximadamente 1×10^3 y aproximadamente 1×10^6 ufc por semilla. Cuando se usa como un tratamiento de tierra, las composiciones de la presente invención se pueden aplicar como un riego de la superficie de la tierra, por introducción con una caña, inyección y/o aplicación en surcos o mezclados con el agua de irrigación. La dosis de aplicación para los tratamientos mediante riego de superficie de la tierra, que se puede aplicar en el momento de la siembra, durante o después de la siembra, o después del trasplante y en cualquier etapa del crecimiento vegetal, es de entre aproximadamente 4×10^{11} y aproximadamente 8×10^{12} ufc por acre. En algunas realizaciones, la dosis de aplicación es de entre aproximadamente 1×10^{12} y aproximadamente 6×10^{12} ufc por acre. En algunas

realizaciones, la dosis de aplicación es de entre aproximadamente 6×10^{12} y aproximadamente 8×10^{12} ufc por acre. La dosis de aplicación para los tratamientos en surcos, aplicada en el momento de la siembra, es de entre aproximadamente $2,5 \times 10^{10}$ y aproximadamente 5×10^{11} ufc por 1000 pies de fila. En algunas realizaciones, la dosis de aplicación es de entre aproximadamente 6×10^{10} y aproximadamente 4×10^{11} ufc por 1000 pies de fila. En otras realizaciones, la dosis de aplicación es de entre aproximadamente $3,5 \times 10^{11}$ ufc por 1000 pies de fila y aproximadamente 5×10^{11} ufc por 1000 pies de fila. Los expertos en la materia podrán ajustar las dosis para los tratamientos a voleo (donde las aplicaciones se aplican a menor dosis pero más frecuentes) y otros tratamientos menos comunes de la tierra.

Las composiciones de la presente invención se pueden mezclar con otros aditivos químicos y no químicos, adyuvantes y/o tratamientos, en donde tales tratamientos incluyen, pero en un sentido no limitativo, fungicidas, insecticidas, miticidas, nematocidas, fertilizantes, nutrientes, minerales, auxinas, estimulantes del crecimiento químicos y no químicos y similares. En algunas realizaciones, las composiciones de la presente invención comprenden además insecticidas, miticidas, nematocidas, fertilizantes, nutrientes, minerales, auxinas, estimulantes del crecimiento y similares. En otras realizaciones, las composiciones de la presente invención se aplican en rotación con otros tratamientos; por ejemplo, como parte de un programa de rociado. En aún otras realizaciones, las composiciones de la presente invención se aplican a las plantas al mismo tiempo que los otros tratamientos.

En algunas realizaciones en las cuales las composiciones se usan para controlar enfermedades de plantas y/o para mejorar la salud de las plantas, las composiciones se mezclan, comprenden además o se aplican al mismo tiempo o como parte de un programa de tratamiento con al menos un fungicida. Los fungicidas usados comúnmente incluyen, pero en un sentido no limitativo, estrobilurinas, carboxamidas, sulfanilidas, fenilsulfamidas, azoles, heterociclos nitrogenosos, dicarboximidas, ftalimidas, carbamatos, tiocarbamatos, formaidinas, antibióticos, aromáticos, guanidinas, compuestos organoclorados, organometálicos, compuestos organofosforados, compuestos de nitrofenilo, compuestos de heterocicliil azufre, ureas, compuestos inorgánicos y otros (por ejemplo, benzamacril, carvona, extracto de aceites esenciales de plantas, aceite de hoja de cedro, aceite de neem, cloropicrina, DBCP, drazoxolona, fenaminosulf, metoxolona, ácido oxolínico, espiroxamina, cimoxanilo, metrafenona. Prohexadiona calcio, ticiofeno, ditano, clorotalanilo, diclorofeno, diclorán, nitrotal-isopropilo, bronopol, difenilamina, mildiomicina, oxin-cobre, ciflufenamida (por ejemplo, N-(ciclopropilmetoxiimino-(6-difluorometoxi-2,3-difluorofenil)-metil)-2-fenilacetamida), UK-2A (antibiótico aislado de *Streptomyces* sp. 517-02), RANMAN™ (Ishihara Sangyo Kaisha, Ltd), y productos basados en microbios, incluyendo, pero en un sentido no limitativo, productos basados en *Bacillus subtilis*, productos basados en *Bacillus pumilus*, tales como los basados en QST2808™ de *Bacillus pumilus*, disponibles de AgraQuest, Inc. como SONATA® o BALLAD® y productos basados en *Streptomyces*, tales como los productos basados en AQ4800™ de *Streptomyces* sp. Se puede consultar información detallada sobre AQ4800™ (AgraQuest), SONATA® y BALLAD® (AgraQuest) en las Patentes de los EE.UU. N°: 6.524.577; 6.852.317; 6.245.551; 6.586.231; y 6.635.245. Cada una de las patentes, publicaciones de patente citadas aquí se incorpora por completo en la presente a modo de referencia, incluyendo todos los dibujos/fotografías que forman parte de las mismas.

Las estrobilurinas incluyen, pero en un sentido no limitativo, azoxistrobina, dimoxistrobina, enestroburina, fluoxastrobina, kresoxim-metilo, metominostrobin, picoxistrobina, piraclostrobina, piroxastrobina, trifloxistrobina, orisastrobina, (2-cloro-5-[1-(3-metilbenciloxiimino)-etil]bencil)-carbamato de metilo, (2-cloro-5-[1-(6-metilpiriden-2-ilmtoxiiimino)etil]bencil)carbamato de metilo, 2-(orto-(2,5-dimetilfeniloximetil)fenil)-3-metoxiacrilato de metilo; metiléster del ácido 3-metoxi-2-(2-(N-(4-metoxifenil)-ciclopropancarboximidoilsulfanilmetil)-fenil)-acrílico de la 2-(2-(6-(3-cloro-2-metil-fenoxi)-5-fluoro-pirimidin-4-iloxi)fenil)-2-metoxiimino-N-metil-acetamida.

Las carboxamidas incluyen, pero en un sentido no limitativo, carboxanilidas (por ejemplo, bixafeno, boscalida, carboxina, fenhexamida, furametpir, isopirazam, isotianilo, metsulfovax, oxicarboxina, piracarbólida, pentiopirad, sedaxano (isómeros cis y trans racémicos), tifulzamida, tiadinilo, N-(4'-bromobifenil-2-il)-4-difluorometil-2-metiliazol-5-carboxamida, N-(4'-trifluorometil-bifenil-2-il)-4-difluorometil-2-metiliazol-5-carboxamida, N-(4'-cloro-3'-fluorobifenil-2-il)-4-difluoro-metil-2-metiliazol-5-carboxamida, N-(3',4'-dicloro-4-fluorobifenil-2-il)-3-difluorometil-1-metilpirazol-4-carboxamida, N-(2-(1,3-dimetilbutil)-fenil)-1,3-dimetil-5-fluoro-1H-pirazol-4-carboxamida, N-(4'-cloro-3',5-difluorobifenil-2-il)-3-difluorometil-1-metil-1H-pirazol-4-carboxamida, N-(4'-cloro-3',5-difluorobifenil-2-il)-3-trifluorometil-1-metil-1H-pirazol-4-carboxamida, N-(3',4'-dicloro-4-fluorobifenil-2-il)-3-difluorometil-1-metilpirazol-4-carboxamida, N-(4'-(3,3-dimetilbutin-1-il)-1,1'-bifenil-2-il)-3-difluorometil-1-metilpirazol-4-carboxamida, N-(4'-(3,3-dimetilbutin-1-il)-1,1'-bifenil-2-il)-3-trifluorometil-1-metilpirazol-4-carboxamida, N-(4'-(3,3-difluorobutin-1-il)-1,1'-bifenil-2-il)-3-trifluorometil-1-metilpirazol-4-carboxamida, N-(4'-(3,3-difluorobutin-1-il)-1,1'-bifenil-2-il)-3-trifluorometil-1-metilpirazol-4-carboxamida, 2-cloro-N-(4'-(3,3-dimetilbutin-1-il)-1,1'-bifenil-2-il)-3-piridincarboxamida, N-(2-cianofenil)-3,4-dicloroisotiazol-5-carboxamida, N-(cis-2-biciclopropil-2-il-fenil)-3-difluorometil-1-metil-1H-pirazol-4-carboxamida, N-(trans-2-biciclopropil-2-il-fenil)-3-difluorometil-1-metil-1H-pirazol-4-carboxamida, benalaxilo, metalaxil, mefenoxam, ofurace y oxadixilo), morfolidas de ácido carboxílico (por ejemplo, dimetomorf y flumorf), benzamidas (por ejemplo, ácido benzohidroxámico, flumetover, fluopicolida, fluopiram, tioximida, triclamida, zarilamida, N-acetonilbenzamidas, incluyendo zoxamida y otros compuestos relacionados, descritos y/o reivindicados en la Patente de los EE.UU. N°: 5.304.572, y N-(3-etil-3,5,5-trimetil-ciclohexil)-3-formil-amino-2-hidroxibenzamida), benzanilidas (por ejemplo, benodanilo, flutolanilo, mebenilo, mepronilo, salicilanilida, y tecloftalam), furanilidas (por ejemplo, fenfuram, furalaxilo, furcarbanilo y metfuroxam), furamidas (por ejemplo, ciclafuramid y furmeciclox), nicotinamidas (por ejemplo, 2-cloro-N-(1,1,3-trimetil-indan-4-il)-nicotinamida, N-(1-(5-bromo-3-cloro-piridin-2-il)etil)-2,4-dicloro-nicotinamida, 2-amino-4-

metil-tiazol-5-carboxamida, y N-((5-bromo-3-cloropiridin-2-il)-metil)-2,4-dicloro-nicotinamida), sulfonamida (por ejemplo, N-(4-cloro-2-nitrofenil)-N-etil-4-metil-bencensulfonamida), pentiopirad, isopirazam, 1-metil-pirazol-4-ilcarboxamida y otras carboxamidas (por ejemplo, cloraniformetán, carpropamida, ciflufenamida diclocimet, etaboxam, fenoxanilo, mandipropamida, siltiofam, N-(2-(4-[3-(4-clorofenil)prop-2-iniloxi]-3-metoxifenil)etil)-2-metansulfonilamino-3-metil-butiramida, oxitetracilina, N-(2-(4-[3-(4-clorofenil)prop-2-iniloxi]-3-metoxifenil)etil)-2-etansulfonilamino-3-metilbutiramida, amida del ácido N-(6-metoxi-piridin-3-il)ciclopropancarboxílico).

Las sulfananilidas incluyen, pero en un sentido no limitativo, flusulfamidas.

Las fenilsulfamidas incluyen, pero en un sentido no limitativo, diclofuanida y tolifluanida.

Los azoles incluyen, pero en un sentido no limitativo, triazoles (por ejemplo, azaconazol, bitertanol, bromuconazol, ciproconazol, difenoconazol, diniconazol, diniliconazol-M, enilconazol, epoxiconazol, etaconazol, fenbuconazol, flusilazol, fluotrimazol, fluquinconazol, flutriafol, furconazol, furconazol-cis, hexaconazol, imibenconazol, ipconazol, metconazol, miclobutanil, palcobutrazol, penconazol, propiconazol, protioconazol, quinconazol, simeconazol, tebuconazol, tetraconazol, triadimenol, triadimefona, triazbutilo, triticonazol; uniconazol, 1-(4-clorofenil)-2-([1,2,4]triazol-1-il)-cicloheptanol y amisulbrom), imidazoles (por ejemplo, climbazol, clotrimazol, ciazofamid, fenapanilo, gliodina, imazalilo, oxpoconazol, pefurazoato, procloraz, triazóxido, triflumizol, y 2-cloro-5-((4-cloro-2-metil-5-(2,4,6-trifluorofenil))imidazol-1-il)piridina), benzimidazoles (por ejemplo, benomil, carbendazim, clofenazol, cipendazol, debacarb, fuberidazol, mercarbinizid, rabenazol y tiabendazol), azolpirimidinas (por ejemplo, 5-cloro-7-(4-metil-piperidin-1-il)-6-(2,4,6-trifluorofenil)-[1,2,4]-triazol-[1,5a]-pirimidina, 6-(3,4-diclorofenil)-5-metil[1,2,4]triazol[1,5-a]pirimidin-7-ilamina, 6-(4-ter-butilfenil)-5-metil[1,2,4]triazol[1,5-a]pirimidin-7-ilamina, 5-metil-6-(3,5,5-trimetilhexil)[1,2,4]triazol[1,5-a]pirimidin-7-ilamina, 5-metil-6-octil-[1,2,4]triazol[1,5-a]pirimidin-7-ilamina, 5-etil-6-octil-[1,2,4]triazol[1,5-a]pirimidin-2,7-diamina, 6-etil-5-octil-1,2,4]triazol[1,5-a]pirimidin-7-ilamina, 5-etil-6-octil-[1,2,4]triazol[1,5-a]pirimidin-7-ilamina, 5-etil-6-(3,5,5-trimetilhexil)-[1,2,4]triazol[1,5-a]pirimidin-7-ilamina, 6-octil-5-propil-[1,2,4]triazol[1,5-a]pirimidin-7-ilamina, 5-metoximetil-6-octil-[1,2,4]triazol[1,5-a]pirimidin-7-ilamina, 6-octil-5-trifluorometil-[1,2,4]-triazol[1,5-a]-pirimidin-7-ilamina, 5-trifluorometil-6-(3,5,5-trimetilhexil)-[1,2,4]triazol[1,5-a]pirimidin-7-ilamina y 2-butoxi-6-iodo-3-propilcromen-4-ona) y otros azoles (por ejemplo, bentalurón, etridiazol e himexazol).

Los heterociclos nitrogenosos incluyen, pero en un sentido no limitativo, piridinas (por ejemplo, butiobato, dipiritona, fluazinam, piridinitrilo, pirifeno, piroxiclor, piroxifur, 2,3,5,6-tetracloro-4-metansulfonilpiridina, 3,4,5-tricloro-piridin-2,6-di-carbonitrilo y 3-[5-(4-clorofenil)-2,3-dimetilisoxazolidin-3-il]piridina), pirimidinas (por ejemplo, bupirimato, ciprodinilo, diflumetorim, dimetirimol, etirimol, ferimzona, fenarimol, mepanipirim, nuarimol, triarimol y pirimetanil), piperazina (por ejemplo, triforina), piperidinas (por ejemplo, fenpropidina y piperalina), pirroles (por ejemplo, fludioxonilo y fenciclonilo), morfolininas (por ejemplo, aldiform, benzamorf, dodemorf, fenpropimorf y tridemorf), nitrapirina, quinolininas (por ejemplo, etoxiquina, halacrinato, sulfato de 8-hidroxiquinolina, quinacetol y quinoxifeno), quinonas (por ejemplo, benquinox, cloranilo, diclona y ditianón), quinoxalinas (por ejemplo, cinometionat, clorquinox y tioquinox) y otros heterociclos nitrogenosos (por ejemplo, acibenzolar-S-metilo, anilazina, diclomezina fenamidona, flutianilo, octilniona, probenazol, proquinazid, piroquilón, tiadifluor, triciclazol, N,N-dimetil-3-(3-bromo-6-fluoro-2-metilindol-1-sulfonil)-[1,2,4]triazolsulfonamida, 3-(4-clorofenil)-1-(2,2,2-trifluoretil)-1,2,4-triazin-6(1H)-ona, 3-(4-clorofenil)-1-(2,2,2-trifluoretil)-4,5-dihidro-1,2,4-triazin-6(1H)-ona, 6-(4-clorofenil)-2-(2,2,2-trifluoretil)-1,2,4-triazin-3(1H)-ona, 6-(4-clorofenil)-2-(2,2,2-trifluoretil)-4,5-dihidro-1,2,4-triazin-3(1H)-ona).

Las dicarboximidinas incluyen, pero en un sentido no limitativo, clozolinato, diclozolina, iprodiona, isovalediona, miclozolina, procimidona, vinclozolina, famoxadona y fluoroimida.

Las ftalimidinas incluyen, pero en un sentido no limitativo, captafol, captán, ditalimfos, folpet y triclorfenfim.

Los carbamatos incluyen, pero en un sentido no limitativo, dietofencarb, flubentiavalicarb, iprovalicarb, propamocarb, furofanato, tiofanato, 3-(4-clorofenil)-3-(2-isopropoxycarbonilamino-3-metilbutirilamino)-propionato de metilo, N-(1-(1-(4-cianofenil)etansulfonil)-but-2-il)carbamato de 4-fluorofenilo y 3-iodo-2-propinilbutilcarbamato (iodocarb).

Los tiocarbamatos incluyen, pero en un sentido no limitativo, metasulfocarb y protiocarb.

Los ditiocarbamatos incluyen, pero en un sentido no limitativo, aztiram, carbamorf, cufraneb, cuprobam, dazomet, disulfuram, ferbam, mancozeb, maneb, milneb, metiram, metam, nabam, propineb, tecoram, tiram, zineb y ziram.

Las formamidinas incluyen, pero en un sentido no limitativo, N'-(4-(4-cloro-3-trifluorometil-fenoxi)-2,5-dimetilfenil)-N-etil-N-metil-formamidina, N'-(4-(4-fluoro-3-trifluorometilfenoxi)-2,5-dimetil-fenil)-N-etil-N-metil-formamidina, N'-(2-metil-5-trifluorometil-4-(3-trimetil-silanil-propoxi)fenil)-N-etil-N-metil-formamidina y N'-(5-difluorometil-2-metil-4-(3-trimetil-silanilpropoxi)fenil)-N-etil-N-metil-formamidina.

Los antibióticos incluyen, pero en un sentido no limitativo, aureofungina, blastidina-S, griseofulvina, kasugamicina, natamicina, polioxina, polioxorim, estreptomycin y validamicina A.

Los aromáticos incluyen, pero en un sentido no limitativo, bifenilo, cloroneb y cresol.

Las guanidinas incluyen, pero en un sentido no limitativo, dodina, triacetato de iminoctadina, tris(albesilato) de iminoctadina y acetato de guazatina.

Los compuestos organoclorados incluyen, pero en un sentido no limitativo, bitionol, clorotalonilo, ftalida, hexaclorobenceno, pencicurón, pentaclorofenol, perclorociclohex-2-en-1-ona y quintozeno (PCNB).

5 Los organometálicos incluyen, pero en un sentido no limitativo, sales de fentina, decafenina y óxido de tributilestaño.

Los compuestos organofosforados incluyen, pero en un sentido no limitativo, ampropilfos, edifenfos, fenitropan, fosetil, fosetil-aluminio, hexiltiofos, iprobenfos, fosdifen, triamfos, pirazofos, tolclofos-metilo, ácido fosforoso y sus sales.

10 Los compuestos de nitrofenilo incluyen, pero en un sentido no limitativo, binapacril, clorodinitronaftaleno, diclorán, dinocap, dinobutona, meptildinocap, dinocón, dinopentón, dinosulfón, dinoterbón, DNOC, sultropen y tecnazeno (TCNB).

Los compuestos de heterociclil azufre incluyen, pero en un sentido no limitativo, isoprotilano y ditanona.

Las ureas incluyen, pero en un sentido no limitativo, pencicurón y quinazimid.

15 Los fungicidas inorgánicos incluyen, pero en un sentido no limitativo, mezcla Bordeaux, acetato de cobre, hidróxido de cobre, óxido de cobre, oxiclورو de cobre, sulfato básico de cobre, azufre, bicarbonato de sodio y bicarbonato de potasio.

En algunas realizaciones en donde las composiciones se usan para mejorar la salud de las plantas, las composiciones se mezclan o comprenden además al menos un fertilizante, nutriente, mineral, auxina, estimulante del crecimiento y similares, denominados más adelante como composiciones para la salud de las plantas.

20 Una composición/compuesto para la salud de las plantas es una composición/compuesto que comprende una o más sustancias químicas naturales o sintéticas, u organismos biológicos, capaces de mantener y/o promover la salud de las plantas. Dicha composición/compuesto puede mejorar la salud, el vigor, la productividad, la calidad de flores y frutas de las plantas y/o estimular, mantener o mejorar la resistencia de las plantas a estresores/presiones bióticas y/o abióticas.

25 Las composiciones y/o los compuestos tradicionales para la salud de las plantas incluyen, pero en un sentido no limitativo, reguladores del crecimiento vegetal (también conocidos como estimulantes del crecimiento vegetal, composiciones reguladoras del crecimiento vegetal, agentes reguladores del crecimiento vegetal, reguladores del crecimiento vegetal) y agentes activadores de plantas (también conocidos como activadores de plantas, potenciadores de plantas, agentes para combatir plagas). En la presente invención, la composición para la salud de las plantas puede ser natural o sintética.

30 Los reguladores del crecimiento vegetal incluyen, pero en un sentido no limitativo, fertilizantes, herbicidas, hormonas vegetales, inoculantes bacterianos y derivados de los mismos.

35 Un fertilizante es una composición que típicamente provee, en proporciones variables, los tres principales nutrientes de las plantas: nitrógeno, fósforo, potasio, conocido abreviadamente como N-P-K; o los nutrientes secundarios de las plantas (calcio, azufre, magnesio) o elementos traza (o micronutrientes) que cumplen un rol en la nutrición de plantas o animales: boro, cloro, manganeso, hierro, zinc, cobre, molibdeno y (en algunos países) selenio. Los fertilizantes pueden ser orgánicos o no orgánicos. Los fertilizantes orgánicos naturales incluyen, pero en un sentido no limitativo, abono, humus de lombrices, turba, algas marinas, lodo de desechos y guano. Los cultivos de cobertura también se emplean para enriquecer la tierra como un abono verde a través de la fijación del nitrógeno de la atmósfera por los nódulos bacterianos sobre las raíces; así como el contenido de fósforo (por movilización de nutrientes) del suelo. Los fertilizantes orgánicos procesados de fuentes naturales incluyen compost (de desechos vegetales), harina de sangre y harina de hueso (de las instalaciones de producción de carne orgánica) y extractos de algas marinas (alginatos y otros). Los fertilizantes también se pueden dividir en macronutrientes y micronutrientes en base a sus concentraciones en la materia seca vegetal. Los macronutrientes son consumidos en cantidades mayores y normalmente están presentes como números enteros o décimas de porcentajes en los tejidos vegetales (en una base de materia seca), incluyendo los tres ingredientes primarios de nitrógeno (N), fósforo (P) y potasio (K), (conocidos como fertilizantes o compuestos fertilizantes N-P-K cuando los elementos se mezclan intencionalmente). Hay muchos micronutrientes que se requieren a concentraciones que varían en un rango de entre 5 y 100 partes por millón (ppm) en masa. Los micronutrientes vegetales incluyen hierro (Fe), manganeso (Mn), boro (B), cobre (Cu), molibdeno (Mo), níquel (Ni), cloro (Cl) y zinc (Zn).

50 Las hormonas vegetales a (también conocidas como fitohormonas) y derivados de las mismas incluyen, pero en un sentido no limitativo, ácido abscísico, auxinas, citoquininas, giberelinas, brassinólidos, ácido salicílico, jasmonatos, hormonas de péptidos vegetales, poliaminas, óxido nítrico y estrigolactonas.

Los agentes activadores vegetales son sustancias naturales o sintéticas que pueden estimular, mantener o mejorar la resistencia de las plantas a estresores/presiones bióticas y/o abióticas, que incluyen, pero en un sentido no limitativo, acibenzolar, probenazol, isotianilo, ácido salicílico, ácido azelaico, himexazol, brassinólida, forclorfenurón, benzotiadiazol (por ejemplo, ACTIGARD® 50WG), microbios o generadores de respuestas derivados de microbios, Otros agentes activadores de plantas se describen en las Patentes de los EE.UU. N.º: 6.849.576; 5.950.361; 6.884.759; 5.554.576; 6.100.092; 6.207.882; 6.355.860; y 5.241.296; 6.369.296. 5.527.783 y 6.987.130.

También se pueden usar microbios, o compuestos químicos y péptidos/proteínas (por ejemplo, generadores de respuestas) derivados de microbios, como agentes activadores de plantas. Los ejemplos no limitativos de generadores de respuestas son: β -glucanos ramificados, oligómeros de quitina, enzimas pectolíticas, actividad generadora de respuestas independiente de una actividad enzimática (por ejemplo, endoxilanasas, elicinas, PaNie), productos del gen *avr* (por ejemplo, AVR4, AVR9), proteínas virales (por ejemplo, proteínas del recubrimiento vial, Harpinas), flagelina, toxina de proteínas o péptidos (por ejemplo, victorina), glucoproteínas, fragmentos de glucopéptidos de invertasa, siringólidos, factores Nod (lipoquitooligosacáridos), FACs (conjugados de ácidos grasos-aminoácidos), ergosterol, toxinas bacteriana (por ejemplo, coronatina) y micotoxinas análogas de esfinganina (por ejemplo, fumonisina B1). Otros generadores de respuestas se describen en Howe y col., *Plant Immunity to Insect Herbivores*, *Annual Review of Plant Biology*, 2008, vol. 59, páginas 41-66; Stergiopoulos, *Fungal Effector Proteins*, *Annual Review of Phytopathology*, 2009, vol. 47, páginas 233-263; y Bent y col., *Elicitors, Effectors, and R Genes: The New Paradigm and a Lifetime Supply of Questions*, *Annual Review of Plant Biology*, 2007, vol. 45, páginas 399-436.

Se describen más ejemplos no limitativos de composiciones/compuestos para la salud de las plantas en las Patentes de los EE.UU. N.º: 4.751.226; 4.889.551; 4.456.467; 5.763.366; 4.219.351; 4.394.151; 4.913.725; RE33976; 4.959.093; 6.645.916; 4.152.429; 4.462.821; 4.704.160; 3.979.201; 4.505.736; 4.422.865; 5.919.448; 4.431.442; 4.824.473; 4.185.990; 5.837.653; 4.701.207; 4.717.732; 4.716.174; 4.720.502; 4.717.734; 6.261.996; 4.701.463; 4.728.657; 4.636.514; 4.717.733; 4.731.372; 5.168.059; 4.261.730; 5.861.360; 4.066.435; 4.210.439; 5.006.148; 4.906.280; 4.160.660; 4.439.224; 5.123.951; 4.094.664; 4.902.815; 4.036.629; 4.534.785; 4.212.664; 4.880.622; 4.144.047; 4.336.060; 4.308.054; 4.515.618; 4.525.200; 4.579.582; 5.554.580; 4.840.660; 4.268.299; 4.534.786; 5.589.438; 4.596.595; 5.468.720; 6.083.882; 6.306.797; 4.226.615; 4.509.973; RE29439; 4.025.331; 6.242.381; 4.326.878; 4.259.104; 5.518.994; 5.446.013; 3.713.805; 4.75.5213; 4.397.678; 4.762.549; 6.984.609; 4.808.207; 4.943.310; 4.481.026; 7.270.823; 4.592.772; 5.346.879; 5.627.134; 4.439.225; 4.931.082; 4.554.010; 4.057.413; 4.072.495; 4.364.768; 7.544.821; 5.523.275; 5.525.576; 7.404.959; 4.619.685; 4.157.255; 5.688.745; 6.569.809; 4.606.756; 4.537.623; 5.965.488; 4.243.405; 4.978.386; 5.654.255; 5.849.666; 7.078.369; 6.884.758; 5.076.833; 6.649.568; 4.954.157; 4.519.163; 4.154.596; 4.246.020; 4.356.022; 4.093.664; 4.808.209; 4.726.835; 4.879.291; 4.776.874; 4.892.576; 4.859.231; 4.130.409; 4.530.715; 4.936.907; 4.964.894; 4.921.529; 4.494.982; 5.228.899; 4.992.093; 4.059.431; 4.765.823; 4.059.432; 4.969.948; 6.750.222; 4.171.213; 5.668.082; 4.672.112; 4.067.722; 4.732.605; 5.481.034; 5.015.283; 4.812.159; 3.905.799; 4.371.388; 4.427.436; 4.293.331; 3.979.204; 5.436.225; 6.727.205; 4.148.624; 4.737.498; 3.938.983; 5.656.571; 4.863.505; 4.227.918; 4.595.406; 4.976.771; 4.857.545; 4.999.043; 3.960.539; 5.617.671; 3.912.492; 4.217.129; 4.170.462; 4.486.219; 5.801.123; 5.211.738; 4.067.721; 5.854.179; 4.585.722; 5.510.321; 6.114.284; 4.588.435; 7.005.298; 4.504.304; 4.451.281; 3.940.414; 5.925.596; 6.331.506; 4.391.629; 5.006.153; 4.857.649; 5.922.599; 5.709.871; 4.741.768; 4.723.984; 4.752.321; 5.741.521; 5.700.760; 4.888.048; 4.113.463; 5.086.187; 4.711.658; 4.960.453; 4.846.883; 4.959.097; 5.371.065; 4.620.867; 5.154.751; 4.090.862; 6.906.006; 4.292.072; 4.349.377; 4.586.947; 4.239.528; 6.284.711; 4.043.792; 6.939.831; 5.030.270; 4.844.730; 6.410.483; 5.922.648; 6.069.114; 6.861.389; 4.806.143; 4.886.544; 4.923.502; 6.071.860; 5.131.940; 4.193.788; RE31550; 4.127.402; 4.799.950; 4.963.180; 4.337.080; 4.637.828; 4.525.203; 4.391.628; 4.908.353; 4.560.738; 4.685.957; 5.637.554; 5.312.740; 3.985.541; 4.770.692; 4.787.930; 4.240.823; 5.428.002; 6.458.746; 3.989.525; 5.902.772; 4.588.821; 4.681.900; 5.679.621; 6.995.015; 5.110.345; 5.332.717; 5.222.595; 5.351.831; 4.904.296; 4.104.052; 4.622.064; 4.902.332; 4.747.869; 5.053.072; 5.186.736; 4.349.378; 5.223.017; 4.889.946; 5.323.906; 5.529.976; 4.946.493; 4.961.775; 5.253.759; 4.311.514; 4.380.626; 5.635.451; 4.975.112; 5.658.854; 6.410.482; 7.479.471; 5.015.284; 4.925.480; 4.638.004; 4.124.369; 5.039.334; 5.090.992; 5.710.104; 4.909.832; 4.744.817; 4.764.202; 4.668.274; 4.547.214; 4.808.213; 4.507.140; 4.904.298; 6.316.388; 6.265.217; 5.869.424; 5.110.344; 4.330.322; 5.292.533; 4.047.923; 4.764.624; 4.560.403; 4.557.754; 5.346.068; 4.770.688; 5.073.185; 4.973.690; 4.772.309; 4.911.746; 4.594.094; 4.518.415; 4.786.312; 7.198.811; 6.376.425; 4.895.589; 4.960.456; 4.897.107; 4.891.057; 4.102.667; 5.763.495; 4.606.753; 4.602.929; 4.740.231; 4.812.165; 5.324.710; 5.701.699; 6.465.394; 5.783.516; 4.334.909; 5.466.460; 5.559.218; 4.678.496; 5.679.620; 5.977.023; 7.326.826; 4.729.783; 4.377.407; 4.602.938; 5.211.736; 5.106.409; 4.802.909; 4.871.387; 4.846.873; 4.936.892; 5.714.436; 6.239.071; 4.507.141; 4.936.901; 5.026.418; 4.734.126; 4.999.046; 4.554.017; 4.554.007; 4.943.311; 4.401.458; 5.419.079; 4.789.394; 4.871.389; 5.198.254; 5.747.421; 5.073.187; 5.258.360; 4.153.442; 4.808.722; 4.565.875; 5.298.480; 4.233.056; 4.849.007; 5.112.386; 5.221.316; 5.470.819; 4.614.534; 4.615.725; 5.496.794; 4.772.310; 4.640.706; 4.894.083; 6.767.865; 5.022.916; 4.797.152; 4.957.535; 4.880.457; 4.735.651; 5.160.364; 4.647.302; 4.818.271; 5.710.103; 6.508.869; 5.858.921; 4.599.448; 4.938.791; 4.491.466; 4.812.162; 7.427.650; 4.684.396; 4.201.565; 4.636.247; 4.925.482; 4.486.218; 6.570.068; 5.045.108; 4.336.059; 4.983.208; 4.954.162; 4.921.528; 4.826.531; 4.661.145; 4.935.049; 4.515.619; 4.810.283; 4.988.382; 4.584.008; 4.227.915; 4.875.922; 4.988.383; 4.886.545; 5.602.076; 4.229.442; 4.525.201; 5.034.052; 5.104.443; 3.620.919; 4.164.405; 5.703.016; 5.102.443; 4.618.360; 6.569.808; 4.919.704; 4.584.013; 4.775.406; 5.631.208; 4.909.835; 4.178.166; 4.183.742; 6.225.260; 5.318.945; 4.623.382; 5.053.073; 4.693.745; 4.875.930; 5.696.053; 4.221.584; 4.975.459; 4.601.746;

4.185.991; 4.871.390; 4.863.503; 5.073.184; 5.262.389; 5.061.311; 4.966.622; 6.228.808; 5.057.146; 4.849.009; 4.939.278; 4.481.365; 4.333.758; 4.741.754; 4.411.685; 4.455.162; 7.291.199; 5.252.542; 4.470.840; 4.227.911; 4.959.093; y 5,123,951.

5 Los inoculantes bacterianos son composiciones que comprenden bacterias beneficiosas que se usan para inocular la tierra, a menudo en el momento de la siembra. Dichos inoculantes bacterianos incluyen bacterias fijadoras de nitrógeno o bacterias de rizobios. *Bradyrhizobia japonicum* se usa comúnmente para la inoculación de soja y *Bradyrhizobia* sp. (*Vigna*) o (*Arachis*) para cacahuete. Otros rizobios se usan con otros cultivos: *Rhizobium leguminosarum* para arvejas, lentejas y habas y alfalfa y trébol y *Rhizobium loti*, *Rhizobium leguminosarum* y *Bradyrhizobium* spp. para diversas legumbres. En una realización, las composiciones de la presente invención se mezclan o comprenden además al menos un inoculante bacteriano y luego se aplican a la tierra o a las semillas. En otra realización, las composiciones y el inoculante bacteriano se aplican a una planta, a una parte de una planta o al locus de la planta o a una parte de planta al mismo tiempo o sucesivamente.

15 En algunas realizaciones, las composiciones de la presente invención se mezclan, comprenden además o se aplican al mismo tiempo o como parte de un programa de rociado con insecticidas. Los insecticidas adecuados incluyen insecticidas neonicotinoides tales como 1-(6-cloro-3-piridilmetil)-N-nitroimidazolidin-2-ilidnamina (imidacloprid), 3-(6-cloro-3-piridilmetil)-1,3-tiazolidin-2-ilidencianamida (tiacloprid), 1-(2-cloro-1,3-tiazol-5-ilmetil)-3-metil-2-nitroguanidina (clotianidina), nitempiran, N¹-[(6-cloro-3-piridil)metil]-N²-ciano-N¹-metilacetamidina (acetamiprid), 3-(2-cloro-1,3-tiazol-5-ilmetil)-5-metil-1,3,5-oxadiazinan-4-iliden(-nitro)amina (tiametoxam) y 1-metil-2-nitro-3-(tetrahydro-3-furilmetil)guanidina (dinotefurano).

20 En algunas realizaciones en las cuales las composiciones se usan para controlar nematodos, las composiciones comprenden además o se mezclan o se aplican al mismo tiempo o como parte de un programa de tratamiento con al menos un nematocida. El término "nematocida", tal como se usa en el presente documento, incluye agentes de control de nematodos, tales como los que matan nematodos y los que inhiben el crecimiento y/o el desarrollo de nematodos. El segundo nematocida puede ser un nematocida químico o biológico. El término "nematocida químico", tal como se usa en el presente documento, excluye a los fumigantes, y el término "fumigantes" abarca sustancias químicas plaguicidas de amplio espectro que se aplican a la tierra de pre-siembra y que difunden por la tierra (en aire-tierra y/o agua-tierra) y se pueden aplicar como gases, tales como bromuro de metilo, líquidos volátiles, tal como cloropicrina, o sólidos volátiles, tal como dazomet.

30 En algunas realizaciones, el nematocida químico o biológico es un producto formulado disponible comercialmente y se mezcla en tanque con las composiciones de la presente invención. En otras realizaciones, el nematocida químico o biológico se mezcla con las composiciones basadas en *Bacillus* de la presente invención antes de la formulación de modo que los componentes activos forman finalmente un producto formulado.

35 Los nematocidas químicos usados en tales mezclas son carbamatos, carbamatos de oxima y nematocidas organofosforados. Los nematocidas de carbamato incluyen benomilo, carbofurano, (FURADAN[®]), carbosulfán y cloetocarb. Los carbamatos de oxima incluyen alanicarb, aldicarb (TEMIK[®] o como parte del tratamiento de semillas AVICTA[®] Complete Pak de Syngenta), aldoxicarb (STANDAK[®]), oxamilo (VYDATE[®]), tiodicarb (parte del sistema aplicado a semillas AERIS[®] de Bayer CropScience) y tirpato. Los nematocidas organofosforados incluyen fensulfotión (DANSANIT[®]), etoprop. (MOCAP[®]), diamidafos, fenamifos, fostietan, fosfamidón, cadusafos, clorpirifos, diclofentión, dimetoato, fostiazato, heterofos, isamidofos, isazofos, forato, fosfocarb, terbufos, tionazina, triazofos, imicafos y mecarfón. Los nombres entre paréntesis que le siguen a cada compuesto son formulaciones comerciales representativas de cada una de las sustancias químicas anteriores. Otros nematocidas químicos de utilidad para tales mezclas incluyen espirotetramat (MOVENTO[®]), el nematocida MON37400 y fipronilo.

45 Los nematocidas biológicos incluyen mezclas de quitina y urea; extractos de compost y tés (tanto aireados como no aireados); composiciones que comprenden al hongo *Myrothecium verrucaria* y/o metabolitos del mismo (disponible comercialmente como DITERA[®]); composiciones que comprenden al hongo *Paecilomyces*, incluyendo *P. lilacinus* (disponible comercialmente como, por ejemplo, MELOCON[®] o BIOACT[®]); las bacterias *Pasteuria*, incluyendo *P. usgae*, composiciones que comprenden dichas bacterias (disponible comercialmente como, por ejemplo, ECONEM[®]); bacterias de *Bacillus* sp., incluyendo *Bacillus firmus* (incluyendo CNMC I-1582, depositada con la *Collection Nationale de Cultures de Microorganismes*, Institute Pasteur, Francia, el 29 de mayo, 1995 y disponible comercialmente como, por ejemplo, VOTIVO), *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus pumilus* (incluyendo la cepa depositada en NRRL como N° B-30087 el 14 de enero, 1999, y sus mutantes) y *Bacillus cereus* y composiciones que comprenden una o más de las bacterias anteriores; *Streptomyces* sp. nematocida, tal como *Streptomyces lydicus* y composiciones que comprenden a dichas bacterias (disponibles comercialmente como ACTINOVATE[®]) y hongos nematófagos, incluyendo *Duddingtonia flagrans*, tal como la cepa T-89, deposita en la colección de microorganismos de GNC VB "Vector" (establecimiento Koltsovo, región de Novosibirsk) bajo el N° F-882, *Paecilomyces lilacinus* y *Arthrobotrys oligospora*. Los nematocidas biológicos también incluyen nematocidas basados en vegetales, tal como productos basados en las plantas de neem (incluyendo semillas o aceite de las plantas) o azadiractina, un metabolito secundario de las semillas de neem, productos basados en aceite de sésamo (tal como DRAGONFIRE[®]), carvacrol, y productos basados en extractos vegetales (tal como NEMA-Q[®], obtenido del árbol *Quillaja saponaria* de Chile). Los nematocidas biológicos también incluyen compuestos aislados producidos por bacterias, tal como las mectinas, una familia de compuestos químicos que son producidos por *Streptomyces*

avermectilis, incluyendo abamectina (que consiste en una combinación de abamectina B_{1a} y B_{1b}) y avermectina B_{2a}, y las proteínas harpina, identificadas originalmente en *Erwinia amylovora*, incluyendo harpina_{EA} y harpina_{qB}.

Las composiciones basadas en *Bacillus* de la presente invención se pueden aplicar independientemente o en combinación con uno más fungicidas, insecticidas, miticidas, nematocidas, fertilizantes, nutrientes, minerales, auxinas, estimulantes del crecimiento y/o productos para la salud de las plantas químicos y no químicos. En algunas realizaciones, las células *swrA*⁻ se co-formulan con al menos un fungicida, insecticida, miticida, nematocida, fertilizante, nutriente, mineral, auxina, estimulante del crecimiento y/u otro producto para la salud de las plantas y el producto co-formulado se aplica a la planta, parte de planta o al locus de una planta. En algunas otras realizaciones, las composiciones de la presente invención se mezclan en tanque con formulaciones disponibles comercialmente del fungicida, insecticida, miticida, nematocida, fertilizante, nutriente, mineral, auxina, estimulante del crecimiento y/u otro producto para la salud de las plantas y se aplican a la planta, a partes de plantas y/o a loci de plantas. En otras realizaciones, las composiciones de la presente invención se aplican a plantas, partes de plantas y/o loci de plantas inmediatamente antes o después de la aplicación de formulaciones disponibles comercialmente del fungicida, insecticida, miticida, nematocida, fertilizante, nutriente, mineral, auxina, estimulante del crecimiento y/u otro producto para la salud de las plantas. En otras realizaciones, las composiciones de la presente invención se aplican a plantas, partes de plantas y/o loci de plantas en rotación con la aplicación de formulaciones disponibles comercialmente del fungicida, insecticida, miticida, nematocida, fertilizante, nutriente, mineral, auxina, estimulante del crecimiento y/u otro producto para la salud de las plantas. En un caso, las composiciones basadas en *Bacillus subtilis* se aplican como un tratamiento de semillas o como un tratamiento en surcos o de embebimiento, como se describen con más detalle en la presente. En algunos casos de las realizaciones anteriores, las formulaciones disponibles comercialmente del fungicida, insecticida, miticida o nematocida se aplican a una dosis que es menor que la dosis recomendada en la etiqueta del producto para el uso de dicho fungicida, insecticida, miticida o nematocida como un tratamiento independiente. En un aspecto de esta realización, el fungicida, insecticida, miticida y/o nematocida es una sustancia química. En aún otro aspecto, la sustancia química es una sustancia que tiene problemas de toxicidad y también puede estar pasando por una "eliminación" por las agencias gubernamentales relevantes en uno o más países.

En otras realizaciones, las composiciones de la presente invención se aplican a plantas, partes de plantas y/o loci de plantas después de la aplicación de un fumigante. Los fumigantes se pueden aplicar mediante inyección por tubo, generalmente un mínimo de 8 pulgadas debajo de la superficie del suelo. Las formulaciones líquidas de fumigantes también se pueden aplicar por quemigación por goteo en superficie para mover al fumigante hasta una profundidad de 8 pulgadas o más por debajo de la superficie de la tierra. Los lechos de tierra tratada se cubren con una carpa de plástico para retener al fumigante en el suelo por varios días. Esto se efectúa antes de la siembra y se deja airear antes de la siembra. Las composiciones basadas en *Bacillus* que se describen en la presente se aplicarían después de dicho período de aireado ya sea antes, durante o después de la siembra. En algunos casos, los fumigantes se aplican a una dosis que es menor que la dosis recomendada en la etiqueta del producto.

Los fumigantes, incluyendo los nematocidas fumigantes, incluyen hidrocarburos halogenados, tal como cloropicrina (CLOR-O-PIC[®]), bromuro de metilo (METH-O-GAS[®]) y combinaciones de los mismos (tal como BROM-O-GAS[®] y TERR-O-GAS[®]), 1,3-dicloropropeno (TELONE[®] II, TELONE[®] EC, CURFEW[®]) y combinaciones de 1,3-dicloropropeno con cloropicrina (TELONE[®] C-17, TELONE[®] C-35 e INLINE[®]), yoduro de metilo (MIDAS[®]); liberadores de isocianato de metilo, tal como metilditiocarbamato de sodio (VAPAM[®], TIERRAPREP[®], METAM-SODIUM[®]); combinaciones de 1,3 dicloropropeno e isotiocianato de metilo (VORLEX[®]); y liberadores de disulfuro de carbono, tal como tetratiocarbonato de sodio (ENZON[®]) y disulfuro de dimetilo o DMDS (PALADINO[®]). Las formulaciones comerciales de cada uno de los fumigantes anteriores se indican entre paréntesis después de los nombres químicos.

Las composiciones de la presente invención también se pueden aplicar como parte de un programa de manejo de plagas integrado ("IPM"). Dichos programas se describen en diversas publicaciones, en especial en las extensiones cooperativas universitarias. Con respecto a los nematodos, dichos programas incluyen rotación de cultivos con cultivos que no albergan al nematodo blanco, prácticas de cultivo y labranza, y uso de transplantes. Por ejemplo, las composiciones basadas en *Bacillus* que se describen en la presente se podrían aplicar después de una estación de crecimiento con mostaza u otro cultivo supresor de nematodos.

En algunas realizaciones, la aplicación de las composiciones de la presente invención a plantas, partes de plantas o loci de plantas está precedida por la identificación de un locus que necesita tratamiento. Para el control de nematodos, dicha identificación se puede efectuar por identificación visual de las plantas que aparecen cloróticas, achaparradas, necróticas o marchitas (es decir, que parecen tener deficiencias de nutrientes) típicamente acoplado con antecedentes de problemas con nematodos; toma de muestras de plantas; y/o toma de muestras de tierra. La toma de muestras de plantas se puede efectuar durante la estación de crecimiento o inmediatamente después de la cosecha final. Las plantas se retiran de la tierra y se examinan sus raíces para determinar la naturaleza y extensión del problema con nematodos en un campo. Para los nematodos de los nudos de la raíz, la severidad de las agallas de las raíces se determina midiendo la proporción del sistema radicular afectado por agallas. Las agallas causadas por los nematodos de los nudos de la raíz se pueden distinguir de los nódulos de las bacterias de la tierra fijadoras de nitrógeno porque las agallas no se separan fácilmente de la raíz. Los niveles de la población en tierra de nematodos de los nudos de la raíz aumentan con la severidad de las agallas de la raíz. En algunos casos, la detección de cualquier nivel de formación de agallas en las raíces sugiere un problema de nematodos de los nudos

de la raíz para plantar cualquier cultivo susceptible, en especial en o cerca del área de toma de muestras. Los nematodos quísticos también se pueden identificar con la toma de muestras de plantas y el escrutinio de las raíces por la presencia de quistes.

5 La toma de muestras de tierra ofrece un medio para determinar la cantidad de nematodos y/o de huevos de nematodos que infesta un determinado volumen de tierra o de raíces. La toma de muestras de tierra se puede efectuar cuando se sospecha de la existencia de un problema, al final de la cosecha o en cualquier momento antes de sembrar un nuevo cultivo, incluyendo antes de la destrucción del cultivo correspondiente al cultivo anterior. Los programas de extensión cooperativa universitaria ofrecen servicios de toma de muestras de tierra, incluyendo la Universidad de Florida, la Universidad del estado de Oregon y Universidad de Nebraska-Lincoln. Además, dichos programas proporcionan lineamientos acerca de la recolección de muestras. Por ejemplo, en un procedimiento de toma de muestras predictivo de post-cosecha, las muestras se recolectan a una profundidad en el suelo de entre 6 y 10 pulgadas de 10 a 20 locaciones de campo en un área de 5 o 10 acres (dependiendo del valor del cultivo; muestras de menos acres en el caso de cultivos de mayor valor) en un patrón regular en zigzag. En un procedimiento de evaluación de plantas establecidas, se remueven muestras de raíces y de tierra a una profundidad en el suelo de entre 6 y 10 pulgadas de las plantas sospechadas que son sintomáticas pero que no están muertas o muriendo; es decir, la descomposición.

En algunas realizaciones, la identificación comprende determinar si se ha alcanzado el umbral económico de una plaga, tal como un nematodo; es decir, el punto en el cual las pérdidas económicas esperadas sin tratamiento exceden los costos del tratamiento. El umbral económico varía dependiendo del cultivo, la geografía, el clima, el momento de la siembra, el tipo de suelo y/o la temperatura del suelo. Se han publicado numerosos artículos sobre este tema y existen lineamiento de los programas de extensión cooperativa en diferentes áreas. Véase, por ejemplo, Robb, J.G., y col., "Factors Affecting the Economic Threshold for *Heterodera schachtii* Control in Sugar Beet", *Economics of Nematode Control*, enero-junio, 1992; Hafez, Saad L. "Management of Sugar Beet Nematode", Universidad de Idaho, serie de Información actual (CIS) 1071 (1998); y *UC IPM Plague Management Guidelines: Tomato* UC ANR, Publicación 3470, Nematodos A. Ploeg, Nematology, UC Riverside (enero de 2008). La determinación del umbral económico para un cultivo particular en un momento particular del año es bien conocida por un experto en la materia.

En algunas realizaciones, la toma de muestras de tierra revela que la infestación por nematodos causará un rendimiento que es de aproximadamente un 80 %, aproximadamente un 90 % o aproximadamente un 95 % de lo normal para un suelo no infestado.

En algunas realizaciones, el umbral económico de nudos de raíces juveniles por kilogramo de muestra de tierra es de al menos aproximadamente 250, al menos aproximadamente 300, al menos aproximadamente 500, al menos aproximadamente 750, al menos aproximadamente 1000, al menos aproximadamente 2000, al menos aproximadamente 3000, al menos aproximadamente 4000, al menos aproximadamente 5000 o al menos aproximadamente 6000.

En algunas realizaciones, el umbral económico de huevos y larvas de nematodo quístico por 1 cm³ de tierra es de al menos aproximadamente 0,5, al menos aproximadamente 1, al menos aproximadamente 2, al menos aproximadamente 3, al menos aproximadamente 4. De acuerdo con Hafez (1998), citado anteriormente, un quiste puede estimarse como 500 huevos y larvas viables.

En otra realización, la presente invención abarca un procedimiento para producir un producto promotor del crecimiento vegetal que comprende:

- a. cultivar una célula bacteriana que comprende una mutación en un gen *swrA* o un ortólogo del mismo, en donde la mutación reduce la capacidad de movimiento en enjambre de la célula cuando se cultiva sobre una superficie sólida o no líquida en comparación con una célula bacteriana que no contiene la mutación y
- b. cultivar las células bacterianas que contiene a la mutación hasta la esporulación.

En otro aspecto, el procedimiento comprende además secar las células bacterianas del paso (b). En aún otro aspecto, el procedimiento comprende además agregar un vehículo o un ingrediente de formulación inerte. En aún otra realización, el paso de cultivo tiene lugar en un biofermentador. En algunas realizaciones, el biofermentador tiene una capacidad de al menos 2 l.

50 **Información de depósito**

Se ha depositado una muestra de QST713 *swrA*⁺ de tipo salvaje, QST30002 (también conocida como AQ30002) y QST30004 (también conocida como AQ30004) en el *Agricultural Research Service Culture Collection* del *National Center for Agricultural Utilization Research, Agricultural Research Service*, Departamento de Agricultura de los EE.UU., 1815 North University Street, Peoria, IL 61604. A QST713 *swrA*⁺ de tipo salvaje (depositada el 5 de octubre, 2010) se le asignó la siguiente denominación de depósito: NRRL B-50420. A QST30002 (depositada el 5 de octubre, 2010) se le asignó la siguiente denominación de depósito: NRRL B-50421. A QST30004 (depositada el 6 de diciembre, 2010) se le asignó la siguiente denominación de depósito: NRRL B-50455.

Los siguientes ejemplos solamente se ofrecen a efectos puramente ilustrativos y no limitativos de la presente invención.

Ejemplos

Ejemplo 1: Identificación de la morfología del mutante tipo papel de lija

5 Las primeras células de *Bacillus subtilis* con la morfología tipo papel de lija fueron identificadas inesperadamente y aisladas durante un ensayo de rutina de control de calidad (QC) de lotes comerciales de SERENADE®.

10 Las variantes tipo papel de lija presentaron una morfología de colonias diferente sobre placas de cultivo de agar nutriente que las células QST713 de tipo salvaje. Las células tipo papel de lija formaron colonias altamente compactas e hidrofóbicas sobre el medio sólido (véanse las imágenes de las colonias QST713 de tipo salvaje y tipo papel de lija tomadas con un microscopio digital Keyence en la figura 1). A estas variantes se les dio el nombre de “papel de lija” porque su fenotipo presenta colonias planas secas que son compactas, muy “quebradizas” y muy difíciles de eliminar del agar sobre el cual crecen (es decir, son colonias muy adherentes). A partir de este descubrimiento inicial, se aisló inicialmente una sola cepa con la morfología tipo papel de lija y se seleccionó para su caracterización adicional. Esta cepa se designó AQ30002.

15 Además de presentar una morfología de colonias distintiva sobre un medio sólido, también se observó que AQ30002 formaba cadenas de células largas en cultivo líquido durante la fase exponencial temprana. Por el contrario, las células QST713 de tipo salvaje formaron cadenas cortas o permanecían como células individuales durante esta misma etapa de crecimiento (compárense las imágenes de microscopio en la figura 2).

20 AQ30002 también exhibe una respuesta morfológica distintiva al crecimiento en un cultivo líquido de alto corte. AQ30002 y QST713 muestran hábitos muy similares de morfología y crecimiento cuando se cultivan en un cultivo líquido con agitación; sin embargo, si se coloca un objeto (por ejemplo, una punta de pipeta de plástico) en el tubo, la mayor turbulencia producida por el movimiento de este objeto dentro del cultivo parece desencadenar un cambio morfológico en AQ30002 solamente, impidiendo la separación de las células vegetativas después de la división (formación de cadenas) y produciendo grandes aglomerados de filamentos. Este fenotipo se puede observar tanto
25 microscópicamente como por observación directa de los tubos de cultivo después de 8-9 horas de crecimiento. Compárense las imágenes provistas en la figura 3, que se obtuvieron de la siguiente manera. Se dejaron crecer stocks de cultivo en glicerol de AQ30002 y QST713 de tipo salvaje durante la noche sobre placas de agar con nutrientes. Se colocó una colonia de cada placa individualmente en 3 ml de caldo Luria en un tubo con tapa a presión de 8 ml y se colocó una punta de pipeta libre de DNAsa de 1 ml en el tubo inoculado. También se cultivó una
30 colonia de cada placa bajo las mismas condiciones en un tubo sin la punta de pipeta. El tubo se agitó a 37 °C a 260 rpm y se comparó el crecimiento después de 8-9 hs usando microscopía óptica.

Anteriormente se habían identificado numerosos genes de *Bacillus* (por ejemplo, *sinR*) como activadores de la producción de biopelículas o (cuando mutados) como productores constitutivos de biopelículas. Sobre la base de una comunicación personal de Dan Kearns (Indiana University), los mutantes *sinR* son “grumosos” cuando se
35 cultivan en un cultivo líquido, lo cual es consistente con la idea que este mutante produce una biopelícula independiente en todo momento de las señales ambientales. Esta propiedad no sería deseable para el desarrollo comercial y en general sugiere que los genes efectores descendentes en la vía, en la producción de biopelículas, tal como SinR, no serían buenos candidatos comerciales.

40 Por el contrario, *swrA* parece formar parte de una llave celular natural que permite que las células de *Bacillus* se ajusten a su entorno. Aunque *swrA* no se ha descrito con anterioridad como un regulador de biopelículas, se ha reconocido por su rol en el cambio de las células entre dos estados morfológicos distintos en cultivo líquido: células planctónicas individuales o cadenas de células conectadas (Kearns y Losick, “Cell Population Heterogeneity During Growth of *Bacillus subtilis*”, *Genes and Development* (2005): 19, páginas 3083-3094.) De manera consistente con este informe, las células mutantes *swrA* aún responden a las señales del entorno. Cuando se cultivan en un cultivo
45 líquido, estas células crecen como células o cadenas individuales, pero no parecen aglomerarse ni forman una biopelícula. Inesperadamente, cuando se cultivan sobre raíces o un medio de cultivo sólido, estas células comienzan a producir una biopelícula densa, compacta. Esto es consistente con la idea que *swrA* es un cambio genético normal que cambia a las células a la capacidad para producir un tipo de biopelícula distinto y (debido a que actúa tempranamente en la vía) aún permite que las células respondan a las señales del entorno (por ejemplo, un
50 crecimiento no adherente en un cultivo líquido y formación de una biopelícula cuando crecen sobre un medio sólido).

Ejemplo 2: Preparación de caldo completo de QST713 de *Bacillus subtilis* en biorreactores

Se observó que los cultivos de QST713 de *Bacillus subtilis* cultivados en biorreactores contienen una pequeña proporción de variantes de células tipo papel de lija. Se mantienen stocks de cultivo de QST713 de *Bacillus subtilis* congelados en viales pequeños con solución de glicerol. Para producir el caldo completo en un biorreactor, se
55 descongela un vial de cultivo de stock y el contenido es transferido a un frasco esterilizado de un medio de cultivo apropiado tal como el caldo de nutrientes Difco. El cultivo del frasco se incubaba sobre un agitador rotatorio bajo condiciones que promueven el crecimiento del organismo típicamente a temperaturas de entre 25 °C y 37 °C con una velocidad de rotación de entre 100 y 250 rpm. Cuando la densidad de células en el frasco es suficientemente

alto, el contenido se transfiere a medio de crecimiento esterilizado fresco en un biorreactor.

El biorreactor se controla con valores específicos de temperatura, agitación, pH y aireación como para promover el crecimiento del organismo y la expresión de metabolitos activos. Los ajustes típicos del biorreactor incluyen un ajuste de temperatura de entre 25 °C y 37 °C, un ajuste de agitación de entre 200 y 1000 rpm, un pH regulado para permanecer entre 6 y 8, y la aireación definida entre 0,2 y 1,0 VVM. Cuando el crecimiento celular y la producción de metabolitos ha cesado, típicamente dentro de las 24 a 72 horas de incubación, se cosecha el caldo de cultivo y luego es evaluado por recuento celular y pureza. Una vez completadas y aceptadas estas pruebas, el caldo se puede usar en los experimentos de laboratorio.

Como alternativa, se pueden mezclar conservantes y otros aditivos (tales como espesantes y dispersantes) en el caldo del biorreactor para simular el producto comercial para los experimentos de prueba a campo.

Ejemplo 3: Cuantificación de la frecuencia de la mutación de papel de lija en QST713 de *Bacillus subtilis*

Se diluyeron diversos lotes comerciales de SERENADE® ASO producidos por AgraQuest, Inc. (Davis, California) (1/10E+6) y se plaquearon sobre agar nutriente (NA) para resolver las colonias individuales. Se confirmaron las colonias tipo papel de lija como mutantes de QST713 de tipo salvaje por secuenciación de ADNr 16s.

La cantidad de colonias tipo papel de lija se cuantificó como un porcentaje de la cantidad total de colonias producidas. Las colonias tipo papel de lija con la morfología de colonias característica se obtuvieron a frecuencias que variaban entre 0,0 % y 1,3 % de los lotes comerciales de SERENADE® ASO analizados (véase la figura 4) y entre 0,0 % y 3,2 % de los lotes comerciales de SERENADE® MAX analizados.

Como se describió previamente, en la etiqueta maestra de EPA para SERENADE® MAX se especifica que el producto comercial contiene 14,6 % de QST713 seca. Si una muestra comercial de SERENADE® MAX contiene como máximo un 14,6 % de QST713 de tipo salvaje/papel de lija seca y si como máximo solamente un 3,2 % de ello es la variante *swrA*, entonces las muestras comerciales de SERENADE® MAX contienen como máximo $(0,146 \times 0,032) = 0,004672 = 0,4672 \%$ o menos que un 0,5 % de las variantes secas de tipo papel de lija (es decir, *swrA*).

Las células QST713 que derivan de una sola colonia con la morfología de tipo salvaje también se cultivaron en frascos durante la noche en caldo Luria, se diluyeron y se plaquearon sobre agar nutriente con el fin de obtener colonias individuales. Se identificaron las colonias tipo papel de lija y se calculó que la frecuencia de mutación era de 1/16.000. Este valor comprende órdenes de magnitud más altas que la frecuencia de pérdida de función espontánea para otros genes y es consistente con la idea que *swrA* es un locus de variación de fase hipermutable (D.B. Kearns y col., "Genes Governing Swarming in *Bacillus subtilis* and Evidence for a Phase Variation Mechanism Controlling Surface Motility", *Molecular Microbiology* (2004), 52: 357-369). Se secuenció la secuencia de nucleótidos del gen *swrA* a partir de 6 colonias individuales tipo papel de lija. Se encontró que las seis colonias eran *swrA* negativas. Por ello los autores infieren que, en QST713, todas las colonias tipo papel de lija son *swrA* negativas.

Ejemplo 4: Cuantificación de la frecuencia del mutante tipo papel de lija en cepas comerciales de *Bacillus*

También se analizaron diversos productos bioplaguicidas comerciales adicionales que contienen cepas de *Bacillus* para determinar si se podían identificar las células con la morfología tipo papel de lija. Tal como se usa en el presente documento, "tipo papel de lija" o "tipo sp" se refiere a una célula que tiene una morfología de colonias similar a la morfología de colonias de las células QST713 tipo papel de lija (véase, por ejemplo, la figura 1) cuando se cultivan sobre agar nutriente.

Las cepas comerciales se hicieron crecer en cultivo líquido, se diluyeron y se plaquearon sobre agar nutriente (NA) para resolver las colonias individuales como se indicó en el Ejemplo 2. Las frecuencias de las colonias tipo papel de lija en estos productos comerciales variaban entre 0 % y 0,7 % (véase la Tabla 2).

Tabla 2. Frecuencia de células tipo papel de lija en bioplaguicidas comerciales basadas en *Bacillus* representativas

Producto comercial	Especie	N° de colonias	N° de colonias tipo papel de lija	% de colonias tipo papel de lija
Kodiak	GB03; <i>B. subtilis</i>	8.096	4	0,0494
Companion	GB03; <i>B. subtilis</i>	2.957	0	NE
Taegro	FZB24; <i>B. amyloliquefaciens</i>	19.272	5	0,0259
Rhizovital	FZB42; <i>B. amyloliquefaciens</i>	3.784	8	0,2114
FolioActive	KTSB; <i>B. subtilis</i>	27.984	2	0,0071
Yield Shield	GB34; <i>B. pumilus</i>	818	6	0,7335

La morfología de colonias más observa para las colonias que no son tipo papel de lija comprende:

Kodiak[®]: brillante, centro elevado con bordes fruncidos.

Companion[®]: elevado, centro traslúcido 3D, bordes arrugados; el fenotipo alternativo (es decir, morfología distinto de este tipo salvaje se observó como una gran masa.

5 Taegro[®]: redondo, centro elevado con bordes irregulares gruesos; también se observan 3 colonias QST713 de tipo salvaje.

Rhizovital[®]: tipo meseta; denso, centro elevado, no brillante.

FolioActive[®]: brillante, centro elevado con bordes fruncidos; sin la variabilidad de Kodiak[®]; también se observaron 2 colonias QST713 de tipo salvaje.

10 Yield Shield[®]: centro elevado con bordes circundantes planos, anillo pequeño de burbujas dentro del borde circundante; también se observaron 4 colonias QST713 de tipo salvaje.

Los autores analizaron al gen *swrA* en todas las variantes tipo papel de lija de estos productos comerciales e, inesperadamente, todas eran de tipo salvaje (*swrA*⁺). En las células distintas de QST713, la morfología tipo papel de lija, por sí misma, no es suficiente para predecir la mutación *swrA*⁻ y las capacidades para mejorar la salud de las plantas.

Ejemplo 5: Identificación de la mutación genética responsable de la morfología tipo papel de lija

Se usó secuenciación *Shotgun* del genoma completo de múltiples formas aisladas de las variantes QST713 con la morfología tipo papel de lija para identificar la o las mutaciones genéticas responsable del fenotipo de papel de lija. Además de la forma aislada original AQ30002 derivada de QST713, se secuenciaron cuatro mutantes QST713 adicionales con el fenotipo de papel de lija (es decir, AQ30003, AQ30004, AQ30005 y AQ30006).

Usando la tecnología de secuenciación de la generación siguiente provista por Illumina (San Diego, California), se generaron lecturas de secuencia que totalizaban aproximadamente 70x de cobertura del genoma de cada forma aislada y se alinearon con el genoma de la referencia QST713 de tipo salvaje.

Se aprovecharon las herramientas publicadas para la detección de la mutación, tal como MAQ (Li, H., y col., "Mapping Short DNA Sequencing Reads and Calling Variants Using Mapping Quality Scores", *Genome Res.* (2008) 18, 1851-1858) y BWA (Li, H. y Durbin R., "Fast and Accurate Short Read Alignment with Burrows-Wheeler Transform", *Bioinformatics* (2009) 25, 1754-1760) para identificar los potenciales sitios de mutación. Se usaron las siguientes suposiciones basadas en estadística y biológicas para filtrar los falsos positivos:

1. Es altamente improbable que las cinco formas aisladas de papel de lija (es decir, AQ30002 – AQ30006) exhiban la misma mutación exactamente en la misma ubicación.

2. Si las cinco formas aisladas exhibieran exactamente la misma mutación, probablemente se debiera a un error de secuenciación en el genoma de referencia.

3. El fenotipo de papel de lija probablemente sea causada por una sola mutación en un gen.

4. La mutación probablemente es en una región de codificación.

5. La mutación probablemente cause un cambio drástico en la proteína. Se consideraba un cambio de una sola base si cambiaba al codón afectado por un codón de terminación o si cambiaba el codón de inicio por un codón que no fuera de inicio. Se consideraban inserciones y deleciones si causaban una mutación del marco de trabajo

6. No es probable que la mutación sea en un gen esencial.

La incorporación de suposiciones nueva en esta línea de análisis, permitió identificar *swrA* como único gen candidato para la mutación en las células QST713 con la morfología tipo papel de lija.

Los alelos *swrA* mutantes identificados en las variantes tipo papel de lija secuenciadas previamente fueron confirmados posteriormente por secuenciación de Sanger (Sanger, F., y col., "DNA Sequencing with Chain-Terminating Inhibitors", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1977) 74, 5463-5467) de esta región de formas aisladas individuales. En la figura 5 se muestra una alineación de secuencias que compara los transcritos predichos *swrA* de formas aisladas representativas de papel de lija AQ30002 y AQ30004 y de diversas cepas de *Bacillus* de tipo salvaje incluyendo QST713.

La resecuenciación de Sanger confirmó que la secuencia *swrA* en QST713 coincidía con la secuencia de referencia generada por secuenciación de siguiente generación. La figura 5 compara las secuencias de codificación de interés predichas con la secuencia de codificación predicha de *swrA* para Bsub_3610, que es un estándar conocido por los expertos en la materia de la genética de *Bacillus*.

Este análisis también verificó que AQ30002, AQ30003 y AQ30006 contienen todas una deleción de 1 bp en *swrA* que da como resultado un desplazamiento de marco y un codón de terminación prematuro (véase AQ30002 en la **figura 5**) y que en AQ30004 y AQ30005 el codón de inicio *swrA* está mutado por otro codón (no de inicio) (véase AQ30004 en la **figura 5**).

Los ortólogos de *swrA* solamente están presentes en un puñado de especies del género *Bacillus*. Para identificar los miembros del clado de *Bacillus subtilis* que probablemente tengan un gen *swrA*, se alinearon los genes de ARNr 16s

de longitud completa de cada una de las especies de *Bacillus* estrechamente relacionadas usando ClustalW, un programa de alineación de múltiples secuencias. La alineación de ClustalW fue convertida luego en el formato PHYLIP para generar un árbol filogenético (véase la **figura 6**). Luego se consultaron las bases de datos genómicas públicas para identificar las especies que tenían un ortólogo confirmado de secuencias *swrA*, y estas especies (es decir, *B. pumilus*, *B. atrophaeus*, *B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis* y *B. licheniformis*) están indicadas con un asterisco doble en la **figura 6**. *SwrA* es una proteína inusualmente distinta, sin una proteína relacionada identificable fuera de este grupo o ninguna función predicha. Dado que este grupo de especies de *Bacillus* (clado de *B. subtilis*) es monofilético por comparación del ADNr 16s y el gen *swrA* está presente en las 4 ramas del clado, los autores concluyen que este gen surgió tempranamente en este linaje y muy probablemente está presente en todas las especies dentro del grupo.

Kearns, y col., ("Genes Governing Swarming in *Bacillus subtilis* and Evidence for a Phase Variation Mechanism Controlling Surface Motility", *Molecular Microbiology* (2004) 52(2): 357-369) identificaron dos codones de inicio potenciales, TTG y GTG. GTG está 35 bases 5' con respecto a TTG. Después de mutar independientemente cada codón, observaron solamente el TTG mutado anuló la expresión del informante 3' y concluyeron que este era el verdadero codón de inicio. Los autores observaron que hay un desacuerdo en la literatura con respecto a las predicciones de la traducción del codón de inicio para *swrA* (por ejemplo, inicio de traducción *swrA* está predicha en la presente por estar 75 bp 5' (**figura 5**) en el gen *swrA* de la cepa NCIB 3610 de *Bacillus subtilis subsp. subtilis* en GenBank, ID ABV89964,1; también véase la cita en ella, Zeigler, y col., 2008, "The Origins of 168, W23, and Other *Bacillus subtilis* Legacy Strains", *J. Bacteriol.* 190(21): 6983-6995). Aún más, el codón de inicio predicho en Kearns, y col., (2004, *ibid*) no es canónico. Por ello los autores condujeron un análisis de secuencia comparativo entre múltiples especies del clado de *B. subtilis*. Dado que se sabe que la estructura genética está bien conservada entre especies estrechamente relacionadas, tal como el clado de *B. subtilis*, este procedimiento provee una fuerte confirmación de las características genéticas tal como el sitio de inicio de la traducción o la ubicación de secuencias genéticas reguladoras clave.

Los autores compararon hasta 100 bases 5' con respecto del codón de inicio TTG informado en la presente en las cepas QST713 de tipo salvaje, FZB42 (*B. amyloliquefaciens*), AQ2808 (*B. pumilus*) y *B. subtilis Subsp. Spizizenii* (Genbank, ID NC_014479). Los autores encontraron que no había otros codones de inicio, ATG o alternativas que produjeran un marco de lectura que genera un polipéptido *swrA* distinto del codón de inicio TTG informado en la presente. Como es sabido por los expertos en la materia de la genética bacteriana, muchos loci de contingencia, entre los cuales *swrA* parece ser uno, usan codones de inicio alternativos. Véase, por ejemplo, *Annu. Rev. Genet.* (2006) 40: 307-33. Por ello, los autores concluyeron que el verdadero inicio de la traducción es en el codón TTG predicho por Kearns, y col.

Ejemplo 6: Pasajes sucesivos de células QST713 tipo papel de lija

Los mutantes QST713 tipo papel de lija con una deleción en la secuencia genética *swrA* (por ejemplo, AQ30002) eran estables después de 15 pasajes en frascos en medio de caldo de soja triptica (TSB) (17 g/l de digestión pancreática de caseína, 3 g/l de digestión papaica de harina de soja, 5 g/l de cloruro de sodio, 2,5 g/l de fosfato de dipotasio, 2,5 g/l de dextrosa). No se encontraron células QST713 de tipo salvaje revertantes cuando las células tipo papel de lija se plaquearon sobre NA después de ser transferidas 15 veces en frascos. Estos resultados demuestran que el mutante de papel de lija es estable y se cría fiel a la forma.

Ejemplo 7: Análisis de complementación de *swrA* en AQ30002

Procedimientos

Se condujeron estudios para confirmar que la mutación *swrA* es responsable del fenotipo de crecimiento vegetal mejorado. Se generaron dos construcciones que contienen al gen *swrA* y al gen *swrA* más 300 nucleótidos 5' con respecto a la región de codificación y designados pPen_*swrA* (es decir, el gen *swrA* bajo el control de transcripción de un promotor constitutivo) y endoPro_*swrA* (es decir, el gen *swrA* bajo el control de transcripción de su propio promotor), respectivamente, a partir de ADN genómico de QST713 *swrA*⁺, usando cebadores que contienen sitios para enzimas de restricción para subclonar los fragmentos de ADN en un vector plasmídico diseñado para que sea compatible con el elemento integrativo y conjugativo (ICE) presente en MMB869 de *Bacillus subtilis* (Wiep Klaas Smits y Alan D. Grossman, "The Transcriptional Regulator Rok Binds A+T-Rich DNA and Is Involved in Repression of a Mobile Genetic Element in *Bacillus subtilis*", *PLoS Genetics* (2010) 6(11): e1001207; Catherine A. Lee, y col., "Identification and Characterization of *int* (integrase), *xis* (excisionase) and Chromosomal Attachment Sites of the Integrative and Conjugative Element ICEBs1 of *Bacillus subtilis*", *Molecular Microbiology* (2007) 66(6): 1356-1369). Se transformó un ADN plasmídico circular concentrado que contiene ya sea i) al gen *swrA* bajo un promotor constitutivo para la construcción pPen_*swrA* o ii) al gen *swrA* bajo su propio promotor para la construcción endoPro_*swrA* en la cepa donante, MMB869 de *Bacillus subtilis*, por competencia natural. MMB869 contiene un elemento integrativo y conjugativo para el transposón de *B. subtilis* (ICE Bs1) (véase Smits y Grossman, precedente) que facilita el movimiento del ADN clonado en el vector plasmídico dentro de especies de *Bacillus*. Esto tiene lugar competencia natural con la construcción de ADN deseada insertada entre dos dominios que son homólogos de las ubicaciones en el genoma de *Bacillus*.

Para permitir una competencia natural, se cultivaron células MMB869 en medio SPC (medio SPC: 10 ml de Spizzen 10X, 1 ml de glucosa 50 %, 4 ml de extracto de levadura 5 %, 2,5 ml de casaminoácidos 1 %, 1,6 ml de triptofano 2,5 mg/ml, 0,5 ml de MgSO₄ 1 M; sales de Spizzen 10X: 2 % de (NH₄)₂SO₄, 14 % de K₂HPO₄ anhidro, 6 % de K₂HPO₄, 1 % de tricitrato de sodio·2H₂O, 0,2 % de Mg₂SO₄·7H₂O), se transfirieron al medio SPII (10 ml de Spizezen 10X, 1 ml de glucosa 50 %, 2 ml de extracto de levadura 5 %, 1 ml de casaminoácidos 1 %, 1,6 ml de triptofano 2,5 mg/ml, 1 ml de CaCl₂ 50 mM, 0,5 ml de MgSO₄ 1 M), se peleteó y se resuspendió en medio SPII. Las células MMB869 se agregaron luego a un volumen pequeño de solución ME (0,200 ml de sales Spizzen 10X, 0,020 ml de EGTA 200 mM, 1,780 ml de agua desionizada, estéril) que contiene al ADN plasmídico purificado. La célula y la mezcla de ADN se incubó a 37 °C durante 1 hora con agitación.

Las células se plaquearon sobre placas de agar de LB-Kanamicina y se cultivaron durante la noche a 37 °C. Se sembraron parches de varias colonias de las placas de LB-Kanamicina sobre placas de LB-cloranfenicol para confirmar que el plásmido se había insertado por medio de un evento de entrecruzamiento doble. Se usaron cepas donantes MMB869 recién transformadas para transferir las construcciones pPen_{swrA} y endoPro_{swrA}, respectivamente, en la cepa AQ30002 *swrA*⁻ por conjugación. Las cepas donantes MMB869 que contienen a las construcciones pPen_{swrA} y endoPro_{swrA} ICE se cultivaron sobre placas de LB-kanamicina durante la noche. Se cultivó AQ30002_{strepR} (AQ30002 que contiene un gen de resistencia a estreptomycin) sobre LB-agar durante la noche. Se transfirieron colonias individuales de las cepas pPen_{swrA} y endoPro_{swrA} de MMB869 a LB + kanamicina. También se transfirió una sola colonia de AQ30002_{strepR} a LB + estreptomycin. Estos tres cultivos se cultivaron hasta una DO600 de ~ 1,0, se diluyeron hasta una DO600 de 0,02 en LB fresco, se cultivaron por ~1 hora a 37 °C, y se agregó xilosa para inducir el recorte de la construcción ICE y la transferencia a AQ30002_{strepR} por conjugación.

Las células se cultivaron por una hora adicional a 37 °C, en cuyo momento la DO600 para estos cultivos era de aproximadamente 0,9. Se combinaron 2,5 ml de las células donantes con 2,5 ml de células AQ30002_{strepR} y se filtraron bajo vacío sobre un filtro de membrana estéril. El filtro se removió del conjunto de filtros, se transfirió usando técnicas estériles sobre placas de SMS-agar (25 ml de sales de Spizzen 10X y 3,75 g de agar en un total de 250 ml de agua desionizada) y se incubaron durante la noche a 30 °C. Las células se recuperaron lavándolas de la placa filtrante con 5 ml de sales de Spizzen 1X (dilución 1:10 de sales de Spizzen 10X en agua desionizada, estéril). Se plaquearon 100 µl de células sobre placas de LB-kanamicina/estreptomycin y se incubaron durante la noche a 37 °C para identificar transconjugados AQ30002_{strepR}. La solución de células remanente se peleteó por centrifugación, se resuspendió en LB y se plaqueó sobre LB-kanamicina/estreptomycin.

Los autores propusieron la hipótesis que la complementación de AQ30002 con la construcción pPen_{swrA} o con la construcción endoPro_{swrA} daría como resultado la pérdida del fenotipo de papel de lija y reversión a un fenotipo mucoide QST713 de tipo salvaje *swrA*⁺. Además de la morfología de colonias, los autores confirmaron la complementación evaluando si la adición, o no, del gen *swrA* rescataba la capacidad de AQ30002 de moverse en enjambre en un ensayo de movimiento en enjambre según se describe en Joyce E. Patrick y Daniel B. Kearns, "Laboratory Strains of *Bacillus subtilis* Do Not Exhibit Swarming Motility", *Journal of Bacteriology* (2009) 191(22): 7129-7133). Véase la figura 7.

Los autores también midieron la colonización de raíces con células AQ30002 que contienen ya sea la construcción pPen_{swrA} o la construcción endoPro_{swrA}. Primero se esterilizó la superficie de semillas de tomate con 70 % de etanol y luego con 10 % de blanqueador. Las semillas se lavaron luego con agua desionizada estéril y se colocaron en cavidades separadas de placas de 48 cavidades que contienen un pequeño volumen de agua estéril. Se dejó que las semillas germinaran bajo luz (intensidad alta, definido en un programa de 8 hs de luz) a temperatura ambiente y se usaron 5-7 días después.

Las raíces de estas semillas germinadas se sumergieron en una suspensión celular en solución amortiguadora salina fosfato (PBS). Para normalizar la concentración de las suspensiones celulares, se usó una DO600nm de 0,01 ya que esta es la DO600nm aproximada de QST713 que da 10E6 ufc/ml. Después de la inmersión, cada semilla germinada se colocó en un tubo de ensayo que contiene 12 ml de medio MS estéril (2,215 g/l de sales de Murashige y Skoog (MS), 1,5 % de sacarosa, 1 % de agar, pH 5,7) y se dejaron crecer por aproximadamente 1 semana bajo luz a temperatura ambiente. La colonización de raíces (formación de biopelículas sobre la raíz) se observó visualmente con un microscopio digital de Keyence y se calificó entre cero (indicando que no hay colonización de raíces) a tres (indicando una colonización agresiva de raíces). En cada experimento, una raíz sumergida en agua estéril sirvió como control negativo.

Resultados

La inserción de la construcción pPen_{gen swrA} ICE en AQ30002_{strepR} (designadas células AQ30002_{pPen_{swrA}_ICE}) creó células bacterianas con una morfología mucoide parcial a una frecuencia muy baja. Se recolectaron transconjugados individuales y se volvieron a sembrar sobre placas individuales de LB-kanamicina/estreptomycin para su confirmación y experimentos futuros. La mayoría de los transconjugantes retuvieron una morfología tipo papel de lija o parecían una mezcla de papel de lija y mucoide. La inserción de la construcción endoPro_{swrA} ICE en AQ30002_{strepR} (designadas células AQ30002_{endoPro_{swrA}_ICE}) creó células bacterianas con un 100 % de morfología mucoide. No se observaron colonias tipo papel de lija. Se

recolectaron formas aisladas individuales y se volvieron a sembrar sobre placas individuales de LB-kanamicina/estreptomocina para su confirmación y experimentos futuros. Estos resultados eran idénticos para la inserción de ICE en AQ30015_strepR, una segunda cepa resistente a estreptomocina derivada de manera independiente de QST 713 con la misma mutación genética en *swrA* que AQ30002 (no se muestran los datos).

- 5 Para confirmar que AQ30002_strepR y AQ30015_strepR retenían la mutación *swrA* original y que las construcciones pPen_*swrA*⁻_ICE y endoPro_*swrA*⁻_ICE contenían versiones de tipo salvaje de *swrA*, se purificó ADN genómico a partir de dos formas aisladas separadas de cada experimento de transconjugación, y se condujo una amplificación por PCR del locus endógeno *swrA* y las construcciones *swrA*⁻_ICE. La secuenciación de estos productos de la PCR confirmó que el locus endógeno *swrA* era mutante y las construcciones *swrA*⁻_ICE eran de tipo salvaje.
- 10 Una caracterización adicional de las células AQ30002_endoPro_*swrA*⁻_ICE incluye el crecimiento en cultivo líquido para comparar la extensión de la formación de cadenas/aglomeración versus AQ30002 así como la comparación de la capacidad de movimiento en enjambre de estas cepas con AQ30002 usando un ensayo cualitativo y un ensayo cuantitativo. Las células AQ30002_endoPro_*swrA*⁻_ICE aparecen turbias y translúcidas en comparación con la naturaleza de gran formación de cadenas/aglomeraciones de AQ30002 cuando se cultivan en un tubo con tapa a presión de 14 ml en medio líquido LB durante la noche a 30°C con agitación a 250 rpm.

15 Para evaluar el movimiento en enjambre, se inoculó una placa de 0,7 % de LB-agar con un ansa de inoculación de un cultivo líquido de toda la noche, se secó y se dejó incubar por aproximadamente 10 horas a 37 °C. Después de la incubación, las células AQ30002_endoPro_*swrA*⁻_ICE se movieron en enjambre por gran parte de la placa de manera similar a células QST713 de tipo salvaje y bastante diferente de las células AQ30002. Las células AQ30002_endoPro_*swrA*⁻_ICE son positivas para el movimiento en enjambre a diferencia de la cepa AQ30002 (figura 7). Las células AQ30002_endoPro_*swrA*⁻_ICE se mueven en enjambre a una dosis similar a QST713 en un ensayo de movimiento en enjambre cuantitativo (no se muestran los datos). Las células AQ30015_endoPro_*swrA*⁻_ICE se comportaron de manera similar en todos los ensayos (no se muestran los datos).

20 Los resultados del ensayo de colonización de raíces acordaban con los de los ensayos de formación de cadenas/aglomeraciones de células y de movimiento en enjambre. En el ensayo de colonización de raíces, las células AQ30002_endoPro_*swrA*⁻_ICE no colonizan las raíces de tomate, así como los tratamientos AQ30002 o AQ30002_strepR (véase la Tabla 3 y la figura 8). Además, cuando se observa la biopelícula de la muestra de cada juego de réplicas, la biopelícula del tratamiento con AQ30002_pPen_*swrA*⁻_ICE parecía coincidir con la biopelícula de AQ30002 y AQ30002_strepR más estrechamente que el tratamiento con AQ30002_endoPro_*swrA*⁻_ICE, que era más parecida a la biopelícula QST713 (como se muestra en la figura 9).

Tabla 3. Resultados del ensayo de colonización de raíces con cuatro replicas para cada tratamiento.

Tratamiento de las raíces de las plantas	Réplica N° 1	Réplica N° 2	Réplica N° 3	Réplica N° 4	Promedio
Agua	0	2	0	0	0,5
QST713	2	2	2	2	2,0
AQ30002	2	2	sin raíz	3	2,3
AQ30002_strepR	3	sin raíz	sin raíz	2	2,5
AQ30002_endoPro_ <i>swrA</i> ⁻ _ICE	2	0	0	0	0,5
AQ30002_pPen_ <i>swrA</i> ⁻ _ICE	3	0	2	2	1,8

Ejemplo 8: Robustez de la película de AQ30002 en cultivos líquidos

35 Los cultivos de bacterias que crecen sobre la superficie de un medio líquido pueden formar una película más o menos continua denominada película. Esta película consiste de células microbianas y una matriz extracelular secretada. Por ello, las películas representan biopelículas de la interfase líquido/aire. Según se describe además en la presente, la robustez de película se puede evaluar experimentalmente pinchando las películas para verificar si se rompen.

40 Se cultivaron dos réplicas de los tubos, designadas wt1 y wt2, a partir de una colonia de la cepa QST713 *swrA*⁺ de tipo salvaje de *B. subtilis* (es decir, células 100 % *swrA*⁺, cultivadas a partir de una sola colonia) y dos réplicas, designadas sp1 y sp2, a partir de una colonia de la cepa AQ30002 *swrA*⁻ de *B. subtilis* hasta la fase media-log en medio de stock de cerdo o medio de cerdo (10 g/l de glucosa, 8 g/l de extracto de levadura, 8 g/l d Stock de cerdo, pH 8,5). QST713 *swrA*⁺ de tipo salvaje y AQ30002 *swrA*⁻ mostraron índices de crecimiento similares en el medio de stock de cerdo (véanse las curvas de crecimiento en la figura 10).

45 QST713 *swrA*⁺ de tipo salvaje y AQ30002 *swrA*⁻ también tenían una susceptibilidad similar a antibióticos, patrones de crecimiento similares a temperaturas que varían en un rango entre 15 °C y 65 °C, un crecimiento similar sobre agar de sangre y perfiles metabólicos similares determinados con la tecnología de BioLog Phenotype Microarray

(Hayward, California) (no se suministran datos).

Las dos cepas se cultivaron en 20 ml de medio de stock de cerdo a 200 rpm a 30 °C. Se diluyeron alícuotas en medio de caldo de soja tripticasa (TSB) (17 g/l de digestión pancreática de caseína, 3 g/l de digestión papaica de harina de soja, 5 g/l de cloruro de sodio, 2,5 g/l de fosfato de dipotasio, 2,5 g/l de dextrosa) en placas de 24 cavidades y se dejaron crecer a temperatura ambiente sobre mesada de laboratorio por 3 días.

Ambas muestras de cada cepa contaban con 4 réplicas de cavidades de modo que para cada cepa se examinaba un total de 8 películas. Cada película se pinchó tres veces hasta que la punta de pipeta alcanzaba ligeramente la base de la placa. La cantidad de películas que permanecieron intactas después de pincharlas se comparó con las que se rompieron. Ambas cepas formaban películas después de 3 días de crecimiento en medio TSB. Las 8 películas formadas por QST713 *swrA*⁺ de tipo salvaje se rompieron después de pincharlas, solamente se rompieron 4 de las 8 películas formadas por AQ30002 *swrA*⁻ (véase la figura 11).

Ejemplo 9: Caracterización de la biopelícula de AQ30002 después de la colonización de raíces

Se esterilizó la superficie de semillas de tomate con 70 % de etanol y 10 % de blanqueador y luego se lavaron con agua desionizada estéril.

Para la germinación estéril, las semillas se colocaron entre dos láminas de papel de filtro estéril y se agregó agua desionizada estéril. Las placas se sellaron con Parafilm y se colocaron bajo luz (con un programa de 12 hs de oscuridad/luz) por 7 días a temperatura ambiente después de lo cual había semillas germinadas.

Las raíces de estas semillas germinadas se sumergieron en una suspensión de células AQ30002 *swrA*⁻ o QST713 *swrA*⁺ de tipo salvaje en solución amortiguadora salina fosfato (PBS). Para normalizar la concentración de las suspensiones celulares, se usó una DO600nm de 0,01 ya que esta es la DO600nm aproximada de QST713 que da 10E6 ufc/ml.

Para permitir un crecimiento y una colonización de raíces estéril, después de la inmersión, cada semilla germinada se colocó en un tubo de ensayo que contiene 12 ml de medio MS estéril (2,215 g/l de sales de Murashige y Skoog (MS), 1,5 % de sacarosa, 1 % de agar, pH 5,7) y se dejaron crecer por aproximadamente 10 semanas bajo luz a temperatura ambiente. La colonización de raíces se observó visualmente con un microscopio digital Keyence.

El control con agua no mostró colonización. Las QST713 *swrA*⁺ de tipo salvaje colonizaron la raíz completa incluyendo la punta, y la biopelícula era muy turbia. AQ30002 *swrA*⁻ también colonizó la raíz completa incluyendo la punta, y la biopelícula ofrecía un aspecto más compacto y parecían unirse más estrechamente a la raíz que la QST713 *swrA*⁺ de tipo salvaje (véase la figura 12).

Para verificar la naturaleza densa, compacta de la biopelícula AQ30002 *swrA*⁻ sobre la superficie de la raíz en comparación con la biopelícula QST713 *swrA*⁺ de tipo salvaje, se prepararon muestras adicionales según se describió previamente. Después de 1 semana de crecimiento bajo luz a temperatura ambiente, se deshidrataron las raíces recubiertas con células QST713 *swrA*⁺ de tipo salvaje o AQ30002 *swrA*⁻ en etanol, se secaron, se recubrieron con oro y se visualizaron con un microscopio electrónico de barrido (SEM). La biopelícula AQ30002 *swrA*⁻ sobre la superficie de la raíz parecía nuevamente significativamente más compacta que la formada por QST713 *swrA*⁺ de tipo salvaje (véase la figura 13). Nótese que este procedimiento subestima la naturaleza difusa de la biopelícula de tipo salvaje dado que esta estructura presentaría un encogimiento y colapso significativamente mayores durante la deshidratación con etanol.

Para caracterizar aún más la biopelícula AQ30002 *swrA*⁻ sobre la superficie de la raíz en comparación con la biopelícula QST713 *swrA*⁺ de tipo salvaje, se inocularon muestras de raíz adicionales y se cultivaron según se describió previamente y se analizaron por microscopía óptica, de la siguiente manera. Las raíces fueron removidas suavemente del agar, se fijaron durante 15 minutos en fijador de Karnovsky y se deshidrató en niveles crecientes de etanol hasta el 100 %. Luego se secaron hasta el punto crítico, se trataron con tetróxido de osmio y se embebieron en resina. Algunos bloques de resina se cortaron en secciones gruesas, se tiñeron con azul metilo, se montaron y visualizaron con microscopio a 10-40x de aumento. El control de agua no presentaba colonización de las raíces. Las células QST713 *swrA*⁺ de tipo salvaje rodearon a la raíz en capas difusas, delgadas, dispersas. La falta de una biopelícula evidente probablemente sea un artefacto de la naturaleza débil, difusa de la biopelícula de tipo salvaje y su pérdida con la separación del agar o durante los pasos de lavado y deshidratación. Por el contrario, las células AQ30002 rodearon a la raíz como una película gruesa, densa. Véase la figura 14. La adherencia de la biopelícula mutante a la superficie de la raíz bajo las mismas condiciones preparativas demuestra que es físicamente más gruesa y más adherente que la estructura de tipo salvaje.

En paralelo, otras muestras de raíz fijadas y embebidas se cortaron en secciones delgadas, se montaron y se visualizaron con un microscopio electrónico de transmisión. En tanto el control con agua no mostró colonización, las células QST713 *swrA*⁺ de tipo salvaje se parecían a las células vegetativas *Bacillus* de los libros de texto. Las células AQ30002 mostraron una morfología completamente diferente. El diámetro de las células AQ30002 era significativamente mayor (0,83 μm +/- 0,066; p<0,05; n=14; prueba de Fisher) que el diámetro de las células QST713 (0,52 μm +/- 0,027; n=11). Además, las células AQ30002 mostraron una morfología mucho más compleja con una

gran región transparente a electrones (blanca) en el centro de las células y lo que parecía ser un recubrimiento o pared celular adicional. Véase la **figura 14**.

Ejemplo 10: Actividad de AQ30002 en la promoción del crecimiento vegetal de tomate, maíz y trigo

5 Se preparó caldo completo de cada una de las cepas de *Bacillus subtilis* QST713 (es decir, una mezcla de células de tipo salvaje y tipo papel de lija como la hallada en SERENADE[®], véase la figura 4), AQ30002 (*swrA*), una variante genética independiente de QST713 (713var) y *Bacillus pumilus* QST2808 (sinónimo de AQ2808) como un embebimiento para semillas. Se inocularon frascos de semillas que contienen caldo Luria (LB) con cada cepa, y estos frascos se cultivaron durante la noche a 30 °C. Al día siguiente, se inocularon alícuotas de cada frasco de semillas en un medio basado en soja y se crecieron hasta su esporulación.

10 Antes del embebimiento de semillas, las concentraciones finales de los caldos completos se diluyeron a la dosis de 64 onzas/acre del producto comercial SERENADE[®] en base a ufc/ml. El término 64 onzas/acre se refiere a la cantidad de unidades formadoras de colonias por semilla, o $2,2 \times 10^8$ ufc/planta. Las cantidades usadas en la presente se calcularon en base a las ufc/ml de los caldos completos.

15 Se llenaron bandejas de siembra (Hummert, N° catálogo 14-3128) con una mezcla para germinación de semillas y en cada celda se sembró una semilla. Se usaron semillas de maíz 'Spring Treat Hybrid', semillas de trigo 'Derkwin' y semillas de tomate 'QualiT 21'. Por lo tanto, las pruebas incluyeron tanto especies monocotiledóneas (es decir, maíz y trigo) como especies dicotiledóneas (es decir, tomate). Cada bandeja de siembra se trató luego con 2 ml de muestra de caldo completo, y los controles no tratados recibieron 2 ml de agua. Estas bandejas se colocaron bajo luces de gran intensidad (~300 Einsteins, definido en un programa de 16 horas luz/8 horas oscuridad) a temperatura ambiente. El riego se efectuó según necesidad. No se usaron fertilizantes.

20 Se observaron las plantas de tomate, maíz y trigo por las características de promoción del crecimiento vegetal dos semanas después del embebimiento de las semillas. A continuación, se cosecharon los tejidos de hojas y raíces, se secaron en bolsas de papel y se pesaron. Las plantas tratadas con AQ30002 parecían todas más verdes, más altas y más saludables en general que las plantas tratadas con agua (véanse las figuras 15, 16 y 17). Los pesos secos de todos los tejidos vegetales tratados con AQ30002 eran significativamente más altos que los de los tejidos correspondientes de plantas no tratadas con la única excepción de las raíces de maíz, donde los pesos secos eran iguales (véanse las **figuras 18, 19 y 20**).

Ejemplo 11: Mejora en el rendimiento del procesamiento de tomates tratados con AQ30002 en el campo

30 Se condujeron dos ensayos a campo independientes cerca de Escalon, California y cerca de San Luis Obispo, California con el procesamiento de plantas de tomate. Los materiales se aplicaron a las plantas como un embebimiento en el momento del transplante. Se cultivaron las cepas de *Bacillus subtilis* QST713 (es decir, una mezcla de células de tipo salvaje y tipo papel de lija como la hallada en SERENADE[®], véase la figura 4) y AQ30002 *swrA* en un medio basado en soja en biorreactores, formuladas para imitar al producto comercial SERENADE[®] ASO, y se aplicaron a concentraciones equivalentes a 3,4 ct/acre de producto comercial. Se aplicó un estimulante del crecimiento vegetal (PGS) a razón de 625 ml/acre, y se aplicó RIDOMIL GOLD[®] SL (Syngenta) que contiene al ingrediente activo mefenoxam a una dosis de 1 pinta/acre. Se usó un diseño de bloque completo randomizado (RCB) con cuatro réplicas por tratamiento. Cada réplica representaba aproximadamente 2 filas x 25 pies.

En el ensayo conducido cerca de Escalon, el rendimiento comercializable total de plantas tratadas con AQ30002 era significativamente mayor que el del control no tratado (UTC) (véase la figura 21).

40 Si bien ninguno de los tratamientos en el estudio conducido cerca de San Luis Obispo produjo un mayor rendimiento comercializable total que el control no tratado (no se muestran los datos), este estudio no es considerado indicativo de la típica mejora posible del rendimiento con un tratamiento de plantas usando AQ30002. Los tomates generalmente no crecen en el área de San Luis Obispo donde el tipo de suelo y el clima difieren considerablemente de las regiones de California donde los tomates se cultivan más comúnmente. Además, el desplazamiento geográfico del estudio de las áreas de cultivo tradicionales de tomate y el momento inadecuado de la cosecha condujeron a resultados cuestionables.

Ejemplo 12: Disminución en el porcentaje de vuelco y menor incidencia de podredumbre del tallo (*Pythium*) en plantas de maíz tratadas con AQ30002 en el campo

50 Se realizó una prueba a campo cerca de Paynesville, Minnesota con plantas de *Zea mays indentata* (maíz dentado) variedad Dekalb 'DK2C26'. Los materiales se aplicaron a las plantas como un tratamiento en surcos o bandas en T diluidas en agua. No se incluyó fertilizante o ningún otro producto en la mezcla de tanque además del caldo completo especificado con o sin un estimulante del crecimiento vegetal (PGS). Se cultivaron las cepas de *Bacillus subtilis* QST713 (es decir, una mezcla de células de tipo salvaje y tipo papel de lija como la hallada en SERENADE[®], véase la **figura 4**) y AQ30002 *swrA* en un medio basado en soja en un biorreactor, formuladas para imitar el producto comercial SERENADE[®] ASO y se aplicaron a concentraciones equivalentes a 3,4 ct/acre de producto comercial. El estimulante del crecimiento vegetal (PGS) se aplicó a razón de 625 ml/acre. Se usó un diseño de bloque completo randomizado (RCB) con cuatro réplicas por tratamiento. Cada réplica representaba 4 filas x 30 pies.

Ninguna de las plantas de maíz tratadas mostró rendimientos significativamente diferentes que el control no tratado (no se suministran datos). Sin embargo, las plantas de maíz tratadas con AQ30002 *swrA*⁻ mostraban significativamente menos vuelco que las tratadas con QST713 o que los controles no tratados (véase la **figura 22**). Además, todos los tratamientos que incluyen AQ30002 *swrA*⁻ redujeron significativamente la incidencia de podredumbre del tallo causada por *Pythium* en comparación con el control no tratado (UTC) (véase la **figura 25**).

En otro ensayo a campo, se aplicó AQ30002 *swrA*⁻ cultivada en un medio basado en soja en un biorreactor y formulada para imitar al producto comercial SERENADE® ASO en surcos en el momento de la siembra de soja a una dosis de 2 cuartos por acre junto con un inoculante bacteriano de bacterias formadoras de nódulos, específicamente, *Bradyrhizobium japonicum*. Las plantas, incluyendo las raíces, se cosecharon después de cuatro meses y se comparó la nodulación de raíces en las muestras no tratadas y tratadas. Véanse los resultados en las figuras 23 y 24.

Ejemplo 13: Actividad de AQ30002 contra enfermedades foliares

Si bien no estaba previsto como un tratamiento para enfermedades foliares, se observó que AQ30002 *swrA*⁻ tenía actividad contra los siguientes patógenos de plantas: *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, *Colletotrichum orbiculare* (antracnosis de pepino), *Botrytis cinerea* (tizón por *Botrytis* de pimiento), *Sphaerotheca fuliginea* (mildió pulverulento de pepino), *Pseudoperonospora cubensis* (mildió lanoso de pepino), *Puccinia recondita* (roya de hoja de trigo), *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (salpicadura bacteriana de tomate) y *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* (mildió pulverulento de cebada) (no se suministran datos).

Ejemplo 14: Actividad de AQ30002 contra enfermedades por la tierra

Se cultivaron las cepas QST713 (es decir, una mezcla de células de tipo salvaje y tipo papel de lija como la hallada en SERENADE®, véase la figura 4) y AQ30002 *swrA*⁻ en biorreactores en un medio basado en soja y se evaluaron los caldos completos contra *Pythium ultimum* y *Rhizoctonia solani* a un 20 % de concentración. Los patógenos de plantas se prepararon en una "bolsa de astillas inoculadas" de Fungi Perfecti que contiene 200 g de vermiculita y 600 ml de caldo de dextrosa de papa (PD). La bolsa se inoculó con una placa completa de aproximadamente una semana de *Pythium ultimum* o *Rhizoctonia solani* y se dejó que crecieran por una semana antes del uso.

La mezcla para germinación de semillas se humedeció con 100 ml de agua desionizada por litro de mezcla y luego se infestó a una dosis de 8 g de inóculo por litro de mezcla para *Rhizoctonia solani* y 64 g/l de mezcla para *Pythium ultimum*. La mezcla inoculada se colocó luego en macetas de 2,5 pulgadas. También se usó una mezcla no infestada como control no infestado (UIC). Después de la infestación y de introducir la mezcla en las macetas, cada maceta en cada tratamiento se embebió con 10 ml de su tratamiento respectivo. Después del embebimiento, en cada maceta se plantaron aproximadamente 65 plántulas de *Brassica* (variedad: 'Johnny's Broccoli for Sprouting,' N° catálogo 2108) usando una cuchara calibrada). Las macetas fueron saturadas con agua, se colocaron bajo luces de gran intensidad y se dejó que crecieran las plantas por una semana antes de la calificación.

Se contaron las plántulas individuales en cada réplica para cada tratamiento y para cada enfermedad de modo que se pudo obtener una cantidad cuantitativa para la germinación de plántulas. Los resultados se compararon con controles no infestados (UIC) y con controles infestados (IC) para determinar la actividad (véase la figura 26). El control de enfermedad se determinó por la cantidad de plántulas que emergió y sobrevivió en la tierra inoculada con el patógeno específico.

Se condujeron ensayos a campo usando AQ30002 y QST713 (es decir, una mezcla de células de tipo salvaje y tipo papel de lija a una relación de alrededor de 200:1, como la hallada en SERENADE®) preparadas según se describió en los Ejemplos 11 y 12 para comparar su eficacia contra diversos patógenos de plantas presentes en el suelo. Se observó que AQ30002 funcionó mejor que QST713, en términos del control de la enfermedad, en estudios para *Rhizoctonia* en cacahuete y coliflor y marchitamiento por *Verticillium* en lechuga. (No se proveen los resultados específicos.) AQ30002 no funcionó mejor que QST713 en todos los estudios, en términos del control de enfermedades.

Se condujo un experimento *in vitro* para evaluar la capacidad de AQ30002 para controlar otra enfermedad por el suelo, *Sclerotium rolfsii*. Los resultados preliminares mostraron que AQ30002 era más activa que QST713 (es decir, una mezcla de células de tipo salvaje y tipo papel de lija como la hallada en SERENADE®) contra esta enfermedad. (No se proveen los resultados.)

Ejemplo 15: Actividad *in planta* de AQ30002 contra *Phytophthora capsici*

Se cultivaron las cepas QST713 (es decir, una mezcla de células de tipo salvaje y tipo papel de lija como la hallada en SERENADE®, véase la figura 4) y AQ30002 *swrA*⁻ en biorreactores en un medio basado en soja y se evaluaron los caldos completos contra *Phytophthora capsici* a un 20 % de concentración. Se cultivó *Phytophthora capsici* sobre agar V-8 y se dejó que liberara las zoosporas del esporangio en agua desionizada estéril. La concentración de zoosporas se diluyó luego a 2x10E4 zoosporas/ml para la inoculación (10 ml/planta).

Se embebieron pimientos de dos semanas (variedad 'California Wonder') plantadas en una mezcla para macetas, en cada caso con 10 ml de tratamiento de caldo completo y al día siguiente se inocularon con *Phytophthora capsici*. Para monitorear el avance de la enfermedad en las plantas de pimiento y la protección lograda mediante el tratamiento con QST713 o AQ30002 *swrA*⁻, las plantas fueron monitoreadas sobre un periodo de 8 días. También se evaluó el fungicida químico Aliette, que contiene tris (O-etil fosfonato de aluminio), a 3,2 mg/ml y a 1,6 mg/ml. El tratamiento con AQ30002 *swrA*⁻ protegió a las plantas por una mayor duración con un mayor número de plantas totales que sobrevivieron que el tratamiento con QST713 (véase la figura 27).

Ejemplo 16: Incremento del contenido de clorofila en plantas tratadas con AQ30002

Se preparó caldo completo de cada una de las cepas de *Bacillus subtilis* QST713 (es decir, una mezcla de células de tipo salvaje y tipo papel de lija como la hallada en SERENADE[®], véase la figura 4) y AQ30002 *swrA*⁻ para su uso como un embebimiento de semillas. Se inoculó el frasco de semillas que contiene caldo Luria (LB) y se dejó crecer durante la noche a 30 °C. Al día siguiente, se inocularon 5 ml del frasco de semillas en un medio basado en soja. El frasco creció hasta completar la esporulación. Antes del tratamiento de semillas, las concentraciones finales de los caldos completos se diluyeron a dosis de 4, 8, 16, 32, 64 y 128 onzas/acre del producto comercial SERENADE[®] en base a ufc/ml.

Se llenaron bandejas de siembra (Hummert, N° catálogo 14-3128) con una mezcla para germinación de semillas y en cada celda se sembró una semilla. Se usaron semillas de tomate QualiT 21'. Cada bandeja de siembra se trató luego con 2 ml de muestra de caldo completo, y los controles no tratados recibieron 2 ml de agua. Estas bandejas se colocaron bajo luces de gran intensidad (~300 Einsteins, definido en un programa de 16 horas luz/8 horas oscuridad) a temperatura ambiente. El riego se efectuó según necesidad. No se usaron fertilizantes.

Se observaron las plantas de tomate por las características de promoción del crecimiento vegetal dos semanas después del embebimiento de las semillas. A continuación, se cuantificó la cantidad de clorofila en las hojas; se tomaron 3 réplicas con sacabocados de 3 hojas al azar en cada tratamiento. Los discos de hoja se trituraron y se extrajeron con 80 % de acetona (ac), y se tomó la DO_{600nm} de los extractos.

Ambos tratamientos, QST713 y AQ30002 *swrA*⁻, mostraron respuestas muy evidentes a la dosis comenzando con aproximadamente 16 onzas/acre hasta 128 onzas/acre que dieron como resultado hojas más verdes y más grandes que el control con H₂O. A las dosis menores (4-16 onzas/acre) los tratamientos con AQ30002 *swrA*⁻ ofrecieron un aspecto más verde que los correspondientes tratamientos con QST713.

Las imágenes de plantas enteras de tomate y de hojas individuales se pueden observar en las figuras 28 y 29, respectivamente, donde se comparan los tratamientos con QST713 y AQ30002 *swrA*⁻. Además de las observaciones visuales, también se comparó el contenido de clorofila entre dosis de caldo completo de QST713 y AQ30002 *swrA*⁻. Aunque no era estadísticamente significativa, había una tendencia constante en las hojas cosechadas de los tratamientos con AQ30002 *swrA*⁻ tenían mayores cantidades de clorofila que los tratamientos con QST713 a las dosis correspondientes (excepto por la de 32 onzas/acre donde ambas tenían la misma cantidad de clorofila). Véase la figura 30.

Ejemplo 17: Actividad de AQ30002 en la promoción del crecimiento vegetal de tomate

Se preparó caldo completo de cada una de las cepas de *Bacillus subtilis* QST713 (es decir, una mezcla de células de tipo salvaje y tipo papel de lija como la hallada en SERENADE[®], véase la figura 4) y AQ30002 *swrA*⁻ para su uso como un tratamiento de semillas *in situ*. Se inoculó un frasco de semillas que contiene caldo Luria (LB) por repique de una colonia fuera de la placa NA, y estos frascos se agitarán a 30 °C y 200 rpm. Al día siguiente, se inocularon 5 ml del frasco de semillas en el Medio 2. El Medio 2 contiene 5 % de peptona, 5 % de dextrosa, 3 % de extracto de levadura, 3 % de extracto de malta, 1,5 % de extracto de semillas de algodón proflo, 10 % de harina de soja y 0,5 % de MgSO₄x 7H₂O).

Antes del tratamiento de las semillas, las concentraciones finales de los caldos completos se diluyeron a la dosis de 64 onzas/acre del producto comercial SERENADE[®] en base a ufc/ml. El término 64 onzas/acre se refiere a la cantidad de unidades formadoras de colonias por semilla, o 2,2 x 10⁸ UFC/planta. Las cantidades usadas en la presente se calcularon en base a las ufc/ml de los caldos completos.

Se llenaron bandejas de siembra (Hummert, N° catálogo 14-3128) con una mezcla para germinación de semillas y en cada celda se sembró una semilla. Se usarán semillas de tomate QualiT 21'. Cada bandeja de siembra se trató luego con 2 ml de muestra de caldo completo, y los controles no tratados recibieron 2 ml de agua. Estas bandejas se colocaron bajo luces de gran intensidad (~300 Einsteins, definido en un programa de 16 horas luz/8 horas oscuridad) a temperatura ambiente. El riego se efectuó según necesidad. No se usaron fertilizantes.

Se observaron las plantas de tomate por las características de promoción del crecimiento vegetal dos semanas después del embebimiento de las semillas. Los autores proponen la hipótesis que las plantas tratadas con AQ30002 tendrían un aspecto más verde, más altos y más saludables en general que las plantas tratadas con agua. Los autores también proponen la hipótesis que los pesos secos de todos los tejidos vegetales tratados con AQ30002 serían significativamente mayor que los de los correspondientes tejidos de las plantas no tratadas. Sin embargo, los

resultados mostraron que el Medio 2 (aplicado a las plantas como control) promovieron la salud de las plantas. Por ello, los solicitantes no pudieron definir conclusiones definitivas a partir de este ensayo.

Ejemplo 18: Actividad in planta de AQ30002 contra *Pythium ultimum* y *Rhizoctonia solani*

5 Se cultivaron las cepas QST713 (es decir, una mezcla de células de tipo salvaje y tipo papel de lija que la hallada en SERENADE[®], véase la figura 4) y AQ30002 *swrA*⁻ en el Medio 2 (5 % de peptona, 5 % de dextrosa, 3 % de extracto de levadura, 3 % de extracto de malta, 1,5 % de extracto de semillas de algodón proflor, 10 % de harina de soja y 0,5 % de MgSO₄x 7H₂O) y los caldos completos fueron evaluados contra *Pythium ultimum* y *Rhizoctonia solani* a un 20 % de concentración de caldo completo. Los patógenos de plantas se prepararon en una “bolsa de astillas inoculadas” de Fungi Perfecti (Olympia, Washington) que contiene 200 g de vermiculita y 600 ml de caldo de dextrosa de papa (PD). La bolsa se inoculó con una placa completa de aproximadamente una semana de *Pythium*

10 *ultimum* o *Rhizoctonia solani* y se dejó que crecieran por una semana antes del uso.

La mezcla para germinación de semillas se humedeció con 100 ml de agua desionizada por litro de mezcla y luego se infestó a una dosis de 8 g de inóculo por litro de mezcla para *Rhizoctonia solani* y 64 g/l de mezcla para *Pythium*

15 *ultimum* y luego se introdujo en macetas de 2,5 pulgadas. También se usó una mezcla no infestada como control no infestado (UIC). Después de la infestación y de introducir la mezcla en las macetas, cada maceta en cada tratamiento se embebió con 10 ml de su tratamiento respectivo. Después del embebimiento, en cada maceta se plantaron aproximadamente 65 plántulas de *Brassica* ('Johnny's Broccoli for Sprouting,' N° catálogo 2108) usando una cuchara calibrada). Las semillas se cubrieron con una capa de mezcla para macetas no infestada, y las macetas se colocaron en una bandeja sin orificios que fue inundado con agua desionizada hasta que todas las macetas

20 estaban saturadas con agua. Las macetas se colocaron bajo luces de gran intensidad y se dejó que crecieran las plantas por una semana antes de la calificación.

Se contaron las plántulas individuales en cada réplica para cada tratamiento en cada enfermedad de modo que se pudo obtener una cantidad cuantitativa para la germinación de plántulas. Los resultados se compararon con controles no infestados (UIC) y con controles infestados (IC) para determinar la actividad. El control de enfermedad

25 se determinó por la cantidad de plántulas que emergió y sobrevivió en la tierra inoculada con el patógeno específico. No hubo diferencia en el control de enfermedades como se observó antes con las mismas cepas cultivadas en medio basado en soja.

Ejemplo 19: Actividad in planta de AQ30002 contra *Phytophthora capsici*

30 Se cultivaron las cepas QST713 (es decir, una mezcla de células de tipo salvaje y tipo papel de lija que la hallada en SERENADE[®], véase la figura 4) y AQ30002 *swrA*⁻ en el Medio 2 (5 % de peptona, 5 % de dextrosa, 3 % de extracto de levadura, 3 % de extracto de malta, 1,5 % de extracto de semillas de algodón proflor, 10 % de harina de soja y 0,5 % de MgSO₄x 7H₂O) y los caldos completos fueron evaluados contra *Phytophthora capsici* a un 20 % de concentración. Las zoosporas de *Phytophthora capsici* se prepararon sobre agar V-8 y se diluyeron a 2 x 10⁴ zoosporas/ml para la inoculación (10 ml/planta).

35 Se embebieron pimientos de dos semanas (variedad 'California Wonder') plantadas en una mezcla para macetas, en cada caso con 10 ml de tratamiento de caldo completo y al día siguiente se inocularon con *Phytophthora capsici*. Una semana después, se calificó la prueba por muerte/no muerte de la cantidad total de pimientos para cada tratamiento. Estas calificaciones se compararon con los controles infestados (IC) y los controles no infestados. Se evaluó el fungicida químico Aliette, que contiene tris (O-etil fosfonato de aluminio), a 3,2 mg/ml y a 1,6 mg/ml.

40 Para monitorear el avance de la enfermedad en las plantas de pimiento y la protección lograda mediante el tratamiento con QST713 o AQ30002, las plantas fueron monitoreadas sobre un período de 8 días. El tratamiento con AQ30002 protegió a las plantas por una mayor duración con un mayor número de plantas totales que sobrevivieron que el tratamiento con QST713 (es decir, una mezcla de células de tipo salvaje y tipo papel de lija como la hallada en SERENADE[®], no se muestran los resultados).

Ejemplo 20: Promoción del crecimiento vegetal en tomate por un mutante de 3610 *swrA*⁻ de *Bacillus subtilis*

Se preparó caldo completo de cada cepa de *Bacillus subtilis* 3610WT (es decir, células de tipo salvaje, denominadas 3610 o 3610WT en la presente) y 3610 *swrA*⁻ como un embebimiento de semillas. La cepa 3610WT de *Bacillus*

50 *subtilis* se describe en Kearns, 2004. El mutante 3610 *swrA*⁻ se refiere al mutante *swrA*⁻ descrito en Kearns, 2004, que tiene una inserción en una extensión contigua de ocho pares de bases A:T que aparecen en la posición 26-34 en 3610. Cada cepa se sembró sobre agar nutriente (NA) 3 días antes de la inoculación en un frasco de semillas. Se inoculó el frasco de semillas que contiene caldo Luria (LB) por repique de una colonia fuera de la placa NA, y estos frascos se agitaron a 30 °C y 200 rpm. Al día siguiente, se inocularon 5 ml del frasco de semillas en un medio basado en soja.

Antes del embebimiento de semillas, las concentraciones finales de los caldos completos se diluyeron a la dosis de

55 64 onzas/acre del producto comercial SERENADE[®] en base a ufc/ml. El término 64 onzas/acre se refiere a la cantidad de unidades formadoras de colonias por semilla, o 2,2 x 10⁸ UFC/planta. Las cantidades usadas en la presente se calcularon en base a las ufc/ml de los caldos completos.

Las bandejas de siembra (Hummert, N° catálogo 14-3128) se llenaron con la mezcla para macetas Sunshine N° 3 (Sun Gro Horticulture) (humedecida y esterilizada por una hora, luego dejado a ventear por tres días), y cada celda se sembró con una semilla. Se usaron semillas de maíz 'Spring Treat Hybrid', semillas de trigo 'Derkwin' y semillas de tomate 'QualiT 21'. Por lo tanto, las pruebas incluyeron tanto especies monocotiledóneas (es decir, maíz y trigo) como especies dicotiledóneas (es decir, tomate). Cada bandeja de siembra se trató luego con 2 ml de muestra de caldo completo, y los controles no tratados recibieron 2 ml de agua. Las bandejas de siembra se regaron por la base por inundación de la bandeja sin orificios y ubicación de las bandejas de siembra en el interior. Estas bandejas se colocaron bajo luces de gran intensidad (~300 Einsteins, definido en un programa de 16 horas luz/8 horas oscuridad) a temperatura ambiente. El riego se efectuó según necesidad. No se usaron fertilizantes.

Se observaron las plantas de tomate por las características de promoción del crecimiento vegetal dos semanas después del embebimiento de las semillas. Luego se cuantificó el área de superficie foliar.

Las plantas tratadas con 3610 WT no mostraron un aspecto más verde o más alto que las plantas tratadas con agua. Por el contrario, las plantas tratadas con 3610 *swrA*⁻ eran más verdes y más altas que las plantas tratadas con 3610WT (no se muestran los datos). Estos resultados fueron confirmados cuantitativamente observando el área de superficie foliar de las plantas tratadas con 3610 *swrA*⁻ (**figura 31**). Las lecturas de clorofila promedio de la primera hoja verdadera de cinco plántulas de tomate seleccionadas al azar no mostraron niveles más altos de clorofila en las plantas tratadas con 3610 *swrA*⁻ (**figura 32**).

Nótese que se condujeron experimentos similares con trigo y maíz. Las plantas tratadas con 3610 WT y las plantas tratadas con 3610 *swrA*⁻ eran comparables en términos de altura y color, en base a observaciones cualitativas, aunque ambas eran más altas y más verdes que los controles tratados con agua. Sin embargo, estos tipos de diferencias son muy sutiles en monocotiledóneas (en un ensayo en invernadero de corto plazo) de modo que probablemente no fueron discernibles con este estudio cualitativo.

Ejemplo 21: Actividad *in planta* de 3610 *swrA*⁻ contra *Phytophthora capsici*

Las cepas 3610WT y 3610 *swrA*⁻, descritas previamente, se cultivaron en frascos en un medio basado en soja y se evaluaron los caldos completos contra *Phytophthora capsici* a un 20 % de concentración. Se cultivó *Phytophthora capsici* sobre agar V-8 por 1-2 semanas. Al finalizar este período, se recortó ¼ pulgada externa de la placa y se descartó usando pinzas estériles. La placa se inundó con agua desionizada estéril hasta el nivel del agar y se dejó a temperatura ambiente bajo luz por 2 días para facilitar la producción de esporangios. Luego se enfrió la placa durante una hora y media a 4 °C y después se dejó a temperatura ambiente durante otra hora para liberar las zoosporas del esporangio. Se cuantificó la concentración zoosporas bajo microscopio con un hemocitómetro por captura de 3 fotografías al azar y promediando el recuento de zoosporas. La concentración de zoosporas se diluyó luego a 2 x 10⁴ zoosporas/ml para la inoculación (10 ml/planta).

Se embebieron pimientos de dos semanas (variedad 'California Wonder') plantadas en una mezcla para macetas, en cada caso con 10 ml de tratamiento de caldo completo y al día siguiente se inocularon con *Phytophthora capsici*. Las plantas se monitorearon sobre un período de 8 días. Estas calificaciones se compararon luego con los controles infestados (IC) y los controles no infestados (véase la **figura 33**). También se evaluó el fungicida químico Aliette, que contiene tris (O-etil fosfonato de aluminio), a 3,2 mg/ml y a 1,6 mg/ml.

El tratamiento con 3610 *swrA*⁻ protegió a las plantas por una mayor duración con un mayor número de plantas totales que sobrevivieron que el tratamiento con 3610 (véase la **figura 33**).

Ejemplo 22: Actividad de AQ30002 contra nematodos

Se condujeron estudios con semillas de pepino var. Sultan para determinar la actividad de AQ30002 contra *Meloidogyne javanica*, nematodo de los nudos de la raíz. Se trataron tubos para centrifuga de 50 ml que contienen 20 g de arena y una semilla no germinada con diferente dosis de caldo completo de AQ30002. Para obtener cultivos de caldo completo de AQ30002, se inocularon frascos de semillas que contienen caldo Luria (LB) con AQ30002 y se dejaron crecer durante la noche a 30 °C. Al día siguiente, se inocularon alícuotas de cada frasco de semillas en 200 ml de un medio basado en soja en un frasco de agitación de 1 l y se dejaron crecer hasta su esporulación. Brevemente, el frasco cultivo con agitación se mantuvo a una temperatura de entre 30 °C y 32 °C y con un ajuste del agitador de entre 200 y 220 rpm. Después de aproximadamente 3 días de incubación, cuando se había detenido el crecimiento y la producción de metabolitos, se cosechó el caldo de cultivo.

Se dejó que las semillas tratadas germinaran y crecieran en invernadero. Cuatro a cinco días después del tratamiento (DAT), se inoculó cada tubo con 100 nematodos de los nudos de la raíz en segunda etapa juvenil. A los 10 DAT se calificaron las plántulas por el porcentaje formación de agallas en raíces sobre una escala de 0-4, que se describe en la Tabla 4.

Las raíces se tiñeron luego con fucsina ácida para observar la penetración y el desarrollo de nematodos y se observaron bajo un microscopio de disección Leica. Para la penetración de nematodos, se contaron los nematodos juveniles totales dentro de cada raíz. Para el desarrollo de nematodos, se contó un total de juveniles gordos incluyendo en la segunda etapa tardía juvenil (J2) y la tercera etapa juvenil (J3). La penetración de los nematodos en

la raíz y el desarrollo de los nematodos después de la penetración se calificaron según se detalla en la **Tabla 4**. Por más detalles sobre las técnicas usadas, véase C.O. Omwega, y col., "A Nondestructive Technique for Screening Bean Germ Plasm for Resistance to *Meloidogyne incognita*", *Plant Disease* (1988) 72(11): 970-972).

Tabla 4. Esquema de calificación de la actividad de antagonista de nematodos de los caldos bacterianos completos.

- 5 El índice de formación de agallas era en base al porcentaje de formación de agallas en raíces. La escala de penetración se calculó como la media del número total de nematodos juveniles con relación a la cantidad de nematodos juveniles en el control no tratado (UTC). La escala de desarrollo refleja la cantidad total de nematodos juveniles gordos (etapa J2 tardía/etapa J3) dentro de la raíz.

Índice de formación de agallas		Escala de penetración		Escala de desarrollo	
0	Ninguna	0	Ninguna	0	Ninguna
1	1-24 %	1	1-10 %	1	1-3
2	25-49 %	2	11-50 %	2	3-10
3	50-74 %	3	51-75 %	3	11-30
4	>75 %	4	76-100 %	4	>30

- 10 La **figura 34** muestra que la aplicación del caldo completo de AQ30002 disminuye la formación de agallas en raíces. La **figura 35** muestra que la aplicación de diversas dosis de AQ30002 disminuye la formación de agallas, la penetración y el desarrollo en comparación con el control no tratado. Nótese que dado que los datos se basan en el sistema de calificación anterior no siempre es posible observar una respuesta a la dosis.

Ejemplo 23: Eficacia de AQ30002 para controlar a los nematodos de los nudos de la raíz en tomates

- 15 Se condujo otro experimento con semillas de tomate para evaluar la eficacia de AQ30002 contra huevos del nematodo de los nudos de la raíz (*M. javanica*). Se prepararon AQ30002-Batch1 y AQ30002-Batch2 en biorreactores en tiempos diferentes. Brevemente, se descongeló un vial de cultivo stock y se transfirió a un frasco esterilizado de caldo nutriente Difco. El cultivo del frasco se incubó luego sobre un agitador rotatorio a una temperatura de entre 28 °C y 32 °C a una velocidad de rotación de entre 200 y 220 rpm para promover el crecimiento celular y obtener una gran densidad de células y luego se agregó a 12 l de un medio de crecimiento basado en soja a un biorreactor de 20 l. El biorreactor se definió en un ajuste de temperatura de entre 30 °C y 32 °C, a un ajuste de agitación de entre 500 y 1000 rpm, a un pH regulado entre 6 y 8, y a una aireación de entre 0,5 y 1,0 VVM. Después de aproximadamente 3 días de incubación, cuando se había detenido el crecimiento y la producción de metabolitos, se cosechó el caldo de cultivo.

- 25 Se trataron plantas de tomate de tres semanas con AQ30002 por embebimiento. Las macetas se mantuvieron luego en invernadero por diez días antes de ser inoculadas con 5000 huevos de nematodos de los nudos de la raíz ("RKN") por maceta. Las plantas se cosecharon cuarenta y dos días después de la inoculación con nematodos. Se recolectaron huevos de las raíces de las plantas de tomate usando una solución de NaOCl 1 % según se describe con detalle en Hussey RS, Barker KR, "A Comparison of Methods of Collecting Inocula of *Meloidogyne* spp., Including a New Technique", *Plant Disease Reporter*, 1973; 57: 1025–1028. La cepa AQ30002 disminuyó la cantidad de huevos de nematodos de los nudos de la raíz observados por planta. Los datos representan los recuentos directos de huevos en lugar de un sistema de calificación. Los resultados, comparados con una muestra no tratada (UTC), se muestran en la **figura 36**.

Ejemplo 24: Selección de mutantes espontáneos *swrA*⁻

- 35 La selección de mutantes espontáneos *swrA*⁻ del clado de cepas de *Bacillus subtilis* se puede conducir de la siguiente manera. Se inoculan 250 ml de medio líquido de caldo Luria (LB) en un frasco de 1 litro con una sola colonia de una placa de agar adecuada. Esto se cultiva durante 16-20 horas a 30 °C a 200 rpm en un agitador orbital. El cultivo resultante se diluirá en serie a 1×10^3 , 1×10^6 y 1×10^9 en solución amortiguadora con fosfato y se plaquearon 100 µl de cada dilución sobre una placa de agar adecuada y se incubaron durante 12-16 horas a 37 °C. Las placas de dilución que permitieron obtener 150–200 colonias individuales se transfieren a un refrigerador a 4 °C durante 24-48 horas. Después de 24-48 horas a 4 °C, las formas aisladas *swrA*⁻ potenciales son evidentes debido a la intensa morfología tipo papel de lija blanca, sobre las placas de agar, en tanto las formas aisladas que son *swrA*⁺ no exhiben esta morfología y a menudo se vuelven translúcidos y difíciles de ver sobre la placa.

- 45 Los potenciales mutantes *swrA*⁻ se recolectan y se cultivan en LB durante la noche a 30 °C a 250 rpm. El aislamiento del ADN genómico se efectúa usando el protocolo de centrifugación con el conjunto de elementos para aislamiento de AND microbiano MoBio ultraClean[®] provisto con el conjunto de elementos MoBio. Los mutantes se identifican por PCR y secuenciación del locus *swrA*, usando el ADN genómico aislado previamente y amplificación por PCR usando el siguiente listado de cebadores para PCR para una especie de *Bacillus* específica o los cebadores generales que son de interés para la cepa que se están examinando.

Bacillus amyloliquefaciens

BA_swrA_PCRF AAACAATGAAAAAGCCGTTCTGG

BA_swrA_PCRR TCCGTGATAATCAAAAGGCC

Bacillus pumilus

5 BP_swrA_PCRF AAAGAATGATCTTCAGCTAC

BP_swrA_PCRR ATTAACAAACAGACCGACCGC

Bacillus licheniformis

BL_swrA_PCRF CATAATGAATAGAATTGACCCG

BL_swrA_PCRR GAAACCCAGCTTGTCTAAAG

10 *Bacillus subtilis*

BS_swrA_PCRF AATGAACTTTTGCAAGTTGCC

BS_swrA_PCRR AATCGATATTCGAGTCCAC

Cepas no identificadas de *Bacillus*

Bac_swrA_PCRF ACGCTKTAYAARTGGCTSAC

15 Bac_swrA_PCRR TCATCCAKAYCGTVACATTDG

El protocolo de PCR y las condiciones de reacción para amplificar el locus *swrA* más aproximadamente 150 nucleótidos de una UTR 3' y 5' se indican a continuación:

Componentes para la reacción de PCR por reacción

20 2,5 µl de ADNg – ≤ 250 ng final
5 µl de solución amortiguadora GoTAQ 5x – 1X final
1 µl de GoTAQ MgCl₂ – 1 mM final
0,5 µl de dNTPs 10mM – 0,2 mM final
0,25 µl de 0,1 nMol cebador directo – 1 pMol final
0,25 µl de cebador inverso 0,1 nMol – 1 pMol final
25 0,25 µl de GoTAQ – 1X final
15,25 µl de H₂O
25 µl de volumen de reacción total

A continuación, se muestran las condiciones adecuadas de ciclado de PCR:

30 94 °C 2:00 min
94 °C 0:30 min
55 °C 0:30 min
72 °C 2:00 min
25 ciclos
72 °C 5:00 min
35 4 °C siempre

El 5 % de la reacción de PCR se visualiza sobre un gel de agarosa 1 % con un colorante y rampa de tamaños de ADN adecuados. Los productos de la PCR son bandas individuales de aproximadamente 700 nucleótidos de longitud. Se usaron 5 µl de ADN amplificado limpio antes de la secuenciación con 2 µl de enzima ExoSap-It. El amplicón limpio se secuencia con el cebador para PCR directo o inverso usando la secuenciación de Sanger. La secuencia del locus *swrA* se compara con una cepa de referencia de tipo salvaje, preferentemente de la misma especie, usando la herramienta de alineación de secuencias ClustalW y se identifica cualquier cambio, delección o inserción de ácido nucleico.

La mutación en el locus *swrA* conduce a una morfología de colonias alterada, una mayor formación de cadenas durante el crecimiento en líquido en comparación con el *swrA*⁺ de tipo salvaje, pérdida de movimiento en enjambre sobre 0,7 % de agar para el movimiento en enjambre de *Bacilli* y/o una formación de biopelícula más robusta sobre la raíz.

Ejemplo 25: Generación de mutantes *swrA*⁻ mediante diversos procedimientos

Se pueden obtener construcciones antisentido para la inactivación de *swrA* en cepas *swrA*⁺ de *Bacillus* por medio de amplificación por PCR del complemento inverso de la región de codificación *swrA* del ADN genómico derivado de QST713 o de otro *Bacilli swrA*⁺. Los cebadores para PCR se diseñan con enzimas de restricción compatibles para la inserción en un vector plasmídico construido previamente endoPro_*swrA* diseñado para que sea compatible con el elemento integrativo y conjugativo (ICE) presente en la cepa MMB869 de *Bacillus subtilis* (Wiep Klaas Smits y Alan D. Grossman, "The Transcriptional Regulator Rok Binds A+T-Rich DNA and Is Involved in Repression of a Mobile Genetic Element in *Bacillus subtilis*", PLoS Genetics (2010) 6(11): e1001207; Catherine A. Lee, y col., "Identification and characterization of *int* (integrase), *xis* (excisionase) and chromosomal attachment sites of the integrative and conjugative element ICEBs1 of *Bacillus subtilis*", *Molecular Microbiology* (2007) 66(6): 1356-1369). La región de codificación *swrA* se inserta desde el plásmido endoPro_*swrA* mediante digestión por restricción y se inserta el complemento inverso del gen *swrA*. La construcción antisentido *swrA* se puede confirmar como insertada

correctamente en el vector plasmídico sin cambios de ácido nucleico introducidos por la PCR mediante secuenciación del ADN plasmídico purificado. Véase el **Ejemplo 7**.

5 La mutación en el locus *swrA* conduce a una morfología de colonias alterada, una mayor formación de cadenas durante el crecimiento en líquido en comparación con el *swrA*⁺ de tipo salvaje, pérdida de movimiento en enjambre sobre 0,7 % de agar para el movimiento en enjambre de *Bacilli* y/o una formación de biopelícula más robusta sobre la raíz.

10 El transposón basado en *mariner* TnYLB-1 (Le Breton, Y., Mohapatra, N.R., y W.G. Haldenwang, 2006. *In Vivo* Random Mutagenesis of *Bacillus subtilis* by Use of TnYLB-1, a *mariner*-Based Transposon, *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 327-333) también se puede usar para generar los mutantes *swrA*⁻. Debido a la presencia de la transposasa Himar-1, *mariner* se reconoce, se recorta y se inserta a sí mismo en dos elementos de inserción invertidos (IS) llevando con el mismo cualquier ADN exógeno que resida entre los elementos IS. TnYLB es un transposón *mariner* modificado para su uso con *Bacillus*. Se inserta un marcador de resistencia a kanamicina entre los elementos IS para una selección rápida de los integrantes. El TnYLB es suministrado sobre el plásmido pMarA (Le Breton y col., 2006 – citado anteriormente). Además de conferir resistencia a kanamicina al huésped *Bacillus*, la inserción habitualmente genera mutaciones de pérdida de función debido a la interrupción de un marco de lectura abierto. Al examinar la pérdida de capacidad del movimiento en enjambre o las morfologías de colonias tipo papel de lija y la confirmación de la inserción del transposón en el locus *swrA*, se pueden generar cepas mutantes *swrA*⁻.

20 El plásmido pMarA que codifica los elementos IS *mariner*, el gen de resistencia a kanamicina, el gen *himar1* fuera de los elementos IS (para asegurar que el elemento sea estable en el genoma) se introduce en una cepa *swrA*⁺ de *Bacillus* por electroporación. El esqueleto del plásmido pMarA contiene un gen de resistencia *mIs* (Macrólido-Lincosamida-Estreptogramina B) para asegurar la pérdida del plásmido pMarA después de la transposición. Tiene un origen sensible a temperatura que permite la selección con *mIs* o kanamicina. La cepa *swrA*⁺ de *Bacillus* que contiene al plásmido pMarA se cultiva en 3 ml de LB + *mIs* durante la noche a temperatura ambiente en un tambor de cultivo. La cepa *swrA*⁺ de *Bacillus* que contiene al plásmido pMarA se plaquea con dilución sobre LB (para determinar las unidades formadoras de colonias totales) y LB con kanamicina 20 µg/ml (para determinar el número de transposantes) y se incuba a 45 °C durante la noche. Las colonias se vuelven a plaquear sobre placas LB con kanamicina y placas *mIs*. Las colonias resistentes a kanamicina/sensibles a *mIs* son retenidas para su análisis posterior. Las inserciones potenciales de transposones en el locus *swrA* tienen una morfología de colonias tipo papel de lija, una menor capacidad de movimiento en enjambre sobre placas de agar LB 0,7 %.

30 Con la identificación de las inserciones de transposones putativos *swrA*, es posible determinar la ubicación exacta de la inserción mediante PCR inversa (iPCR). Se aísla el ADN genómico de los mutantes de transposones y se digiere con una enzima de restricción de gran frecuencia tal como *Sau3* AI o *TaqI*. El ADN digerido se vuelve a liar para formar fragmentos de ADN circularizados. Los fragmentos circularizados que contienen un elemento IS del transposón y el ADN genómico huésped vecino permite obtener exitosamente fragmentos de PCR cuando se usan cebadores diseñados dentro del transposón TnYLB.

Cebadores para iPCR:

2507	AGGAGGAATTCTACGGAAGTGTTAATTTTCATAC
2508	TCCATGCTCGAGGAAGAGC
2509	ACAGAAAGTCTCGAGATCGTC
2510	CTCCTGGATCCTCAATGGCTTTTGGAAATCAG

40 Los productos de la iPCR se purifican y secuencian con el cebador para amplificación que apunta hacia fuera. Se generan marcas de secuencia para cada mutante y se evalúan con blast contra la secuencia genómica próxima al locus *swrA*. Los transposones que contienen al ADN genómico del locus *swrA* probablemente interrumpen la función *swrA*.

La inactivación del locus *swrA* por transposición conduce a una morfología de colonias alterada, una mayor formación de cadenas durante el crecimiento en líquido en comparación con el *swrA*⁺ de tipo salvaje, pérdida de movimiento en enjambre sobre 0,7 % de agar para el movimiento en enjambre de *Bacilli* y/o una formación de biopelícula más robusta sobre la raíz.

45 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> AgraQuest, Inc.
 GUILHABERT-GOYA, Magalie
 HOVINGA, Sarah F.
 50 JOO, Daniel M.
 MARGOLIS, Jonathan S.
 MILLS, Sarah J.

THOMAS, Varghese
 CURTIS, Damian
 ROYALTY, Reed Nate
 WHITSON, Roy

5 <120> MUTANTES TIPO PAPEL DE LIJA DE BACILLUS Y PROCEDIMIENTOS DE USO DE LOS MISMOS
 PARA MEJORAR EL CRECIMIENTO VEGETAL, PROMOVER LA SALUD DE PLANTAS Y CONTROLAR
 ENFERMEDADES

10 <130> 34373/0237-US

<150> 61/425.742
 <151> 21-12-2010

15 <150> 61/505.023
 <151> 06-07-2011

<150> 61/511.522
 <151> 25-07-2011

20 <150> 61/556.039
 <151> 04-11-2011

<160> 13

25 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
 <211> 351
 <212> ADN
 <213> *Bacillus subtilis*

<400> 1

ttgaagaggg caagtatgt gcgtgaaaa aaatattatg aattagtggg acaactaaaa 60

gacagaacaa aagacgtcac atttcatca acaaaagcac taagtctctt tatgctgttc 120

agcagatacc tggtaatta cacaaatgtt gaatgctgtc acgaaatcaa tgaagagtgt 180

gcgaagcatt atttactta cttaatgaaa aaccataaac gtttaggaat taatctgacg 240

gatattaagc ggtccatgct tctgatcagc ggctgtgatcg aggtggaggt tgaccactat 300

ctgaaagatt tctctctctc aaatgiaacg ttgtggatga cggaagagag a 351

35

<210> 2
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> *Bacillus subtilis*

40

<400> 2

Met Lys Arg Ala Ser Ile Val Arg Glu Lys Lys Tyr Tyr Glu Leu Val
 1 5 10 15

Glu Gln Leu Lys Asp Arg Thr Lys Asp Val Thr Phe Ser Ser Thr Lys
 20 25 30

Ala Leu Ser Leu Leu Met Leu Phe Ser Arg Tyr Leu Val Asn Tyr Thr
 35 40 45

Asn Val Glu Cys Val His Glu Ile Asn Glu Glu Cys Ala Lys His Tyr
 50 55 60

Phe Thr Tyr Leu Met Lys Asn His Lys Arg Leu Gly Ile Asn Leu Thr
 65 70 75 80

Asp Ile Lys Arg Ser Met Leu Leu Ile Ser Gly Val Ile Glu Val Glu
 85 90 95

Val Asp His Tyr Leu Lys Asp Phe Ser Leu Ser Asn Val Thr Leu Trp
 100 105 110

Met Thr Glu Glu Arg
 115

<210> 3
 <211> 350
 <212> ADN
 <213> *Bacillus subtilis*

5

<400> 3

ttgaagaggg caagtatgt gcgtagaaaa aatattatga attagtggaa caactaaaag 60

acagaacaaa agacgtcaca ttatcatcaa caaaagcact aagtctctct atgcgttca 120

gcagatacct ggtaaftac acaaatgttg aatgcgttca cgaaateaat gaagagtgty 180

cgaagcatta ttactctac ttaatgaaaa accataaacg tttaggaatt aatctgacgg 240

atattaagcg gtccatgctt ctgacacggc gcgtagatga ggtggaggtt gaccactatc 300

tgaaagattt ctctctctca aatgtaacgt tctggatgac ggaagagaga 350

10

ES 2 649 937 T3

<210> 4
 <211> 351
 <212> ADN
 <213> *Bacillus subtilis*

5

<400> 4

ttcaagaggg caagfattgt gcgtgaaaaa aaatattatg aattagtggg acaactaaaa 60
 gacagaacaa aagacgteac atttcatca acaaaagcac taagtcttct tatgctgttc 120
 agcagatacc tggtaatta cacaaatgtt gaatgcgttc acgaaatcaa tgaagagtgt 180
 gcgaagcatt atttactta cttaatgaaa aaccataaac gtttaggaat taatctgacg 240
 gatattaagc ggtecatgct fctgatcagc ggcgatgacg aggtggaggt tgaccactat 300
 ctgaaagatt tctctctc aaatgtaac ttgtggatga cggaagagag a 351

10 <210> 5
 <211> 351
 <212> ADN
 <213> *Bacillus amyloliquefaciens*

15 <400> 5

ttgaagaggg caagfattgt gcgtgaaaaa aaatattatg aattagtggg acaactaaaa 60
 gaccgaacaa aagacgttac atttcatca acaaaagcac taagtcttct tatgctgttc 120
 agcagatacc tggtaatta cacaaatgtt gaatgtgttc acgatatcaa tgaggagtgt 180
 gcaaaagcatt atttacctta cttaatgaaa aaccataaac gtttaggaat caatctgacg 240
 gafattaaac ggtecatgct fttgatcagc ggtgtaateg aggtggaaat cgaccactat 300
 ctgaaagatt tctctcttc aaatgtgacg ttgtggatga cggaagagag a 351

20 <210> 6
 <211> 351
 <212> ADN
 <213> *Bacillus pumilus*

25 <400> 6

ttgaaaaggg caagfattgt gagagagaaa aaafattacg agttggatga ggagcttaag 60
 agtctgtacg aagatgtgac gtttccgct acaaaagcat taagtctgct catgtgttga 120
 agcaggtact tggtaatta cacaacggta gaatcagtcg acgaaataga tgaagactgt 180

gctgagatat acttcaatta ttaatggat aatcataaga gacttggfat aaacttaacc 240

gacatcaaga gatcgatgca gctgcttggc ggcatactag atgtagatgt caatcactac 300

ttaaagatt ttactgtc gaatgcaca ctttggatga atcaggagaa a 351

5 <210> 7
<211> 351
<212> ADN
<213> *Bacillus subtilis*

10 <220>
<221> mise feature
<222> (345)..(345)
<223> n e s a , c , g o t

<400> 7

ttgaagagg caagtattgt gcgtgaaaaa aaatattatg aattagtgg acaaltaaaa 60

gacagaacac aagacgtaac atttcagct acaaaagcac taagtctct tatgcigtc 120

agcagatati tggcaatta caccaatgtc gaatcagtaa atgacattaa tgaggaatgc 180

gccaaacatt atttaacta cttaatgaaa aaccataagc gattaggaat taatctgaca 240

gatataaaaa ggtcgatgca tctaactcgc gggttatgg atgtggatgi aaaccactat 300

ttaaaggatt ttactatc gaatgcacg ctgtggatga cgcangagag a 351

15 <210> 8
<211> 351
<212> ADN
20 <213> *Bacillus pumilus*

<400> 8

ttgaaaagg caagtattgt gagagagaaa aaatattacg agttggtaga ggagctaaag 60

agtcgtacga aagatgtgac gtttcggct acaaaggcat taagtctact catgctgtta 120

agcaggtaci tggcaatta cacaacggta gaatcagtcg acgagatcga tgaagactgt 180

gctgagafat acttcaatta ttaatggat aatcataaga gacttggfat aaacttaacc 240

gacatcaaga ggtccatgca gctctcggc ggcatactag atgtagatgt gaatcactat 300

ttaaagatt ttactgtc gaatgcaca ctttggatga atcaggagaa a 351

25 <210> 9
<211> 351
<212> ADN
30 <213> *Bacillus atrophaeus*

ES 2 649 937 T3

<400> 9

tigaagaggg caagtattgt gcgtgaaaa aaatactatg aattagtggg acaattaaaa 60
gaccgaacac aagacgtaac atttcagct acaaaagcac taagtctctt aatgctcttt 120
agcagatait tagtcaatta cacaaatgta gaatcagtga acgatattaa tgaggaatgc 180
gccgagcatt attttaatta tttaatgaaa aatcataaac ggttgggaat caatcigaca 240
gacataaac gatcaatgct cctcatcggc ggtgtgttgg acgtcagagt aaaccattat 300
itaaaggatt tctctctgtc taatgtgacg cctggatga atcaggagag a 351

5 <210> 10
<211> 351
<212> ADN
<213> *Bacillus licheniformis*

10 <400> 10

tfgaaaaggg caagtattgt gagagagaaa aaatactatg aattagtggg gcagttaaaa 60
gttcgatcac aagacgttac gtttccgct acaaaggcag taggattgct tatgctgttc 120
agcagatacc tctgtaacta cacttcggtc gaaagtgttg aagatattaa tgaggattgc 180
gcggaacttt attcaacta ctgatggac aaccacaagc ggctcggcat caatctgacc 240
gacatcaagc ggtcaatgca gctyatagga gatattcttg atgtcagagt caatcattac 300
ctgaaagatt ttctttgtc gaatgtgacg ctttggatga gccaggagaa a 351

15 <210> 11
<211> 672
<212> ADN
<213> *Bacillus subtilis*

20 <400> 11

ES 2 649 937 T3

atgaagattt acggagiata tatggaccgc ccgctttctg caggggaaga ggatcggatg 60
atggcggccg tgcgcgccga aaagcgggaa aaatgccggc gctttacca taaggaggat 120
gctcaccgca ccttgatcgg cgacatgctg atccgcaccg ctgcggcgaa ggeftacgga 180
cttgatccgg ccgggattc atccggcgtc caggaatacg gaaagccgta catccccgg 240
cttcgggaca tgcacttaa cafttcccac tccgggcgct ggatcgtgtg cgccattgat 300
tcaaaaccga tggcattga tatgaaaaa atgaagcccg gcacgattga tatgccaaa 360
cggtttttt cgccgacgga atacagtgat ctgcaagcga aacaccccga tcagcagacc 420
gattatttt accatctgtg gfcgatgaaa gaaagcttta tcaagcaggc cggaaaaggg 480
cttccctgc cgcitgattc atcagcgtc cgcctaaag acgacggcca tgtgtccatt 540
gagctcccgg acggacatga acctgtttc atccgcacat atgatcgga cgaggagtat 600
aaactggccg ttgtgcggc gcatccgat ttgtgacg ggattgagat gaaaacgtat 660
gaaaagetgc tg 672

5 <210> 12
<211> 1791
<212> AND
<213> *Bacillus subtilis*
<400> 12

ES 2 649 937 T3

atgatttttga caftggatac gtatctcgtt ttactttcgg ttgttatagg atatacaatt 60
 ttgaggatt cttatcactt ttatgactcc ggagcgttgc tgctgactgc cgtgagcatg 120
 ttgalcagecc atcatgtatg cgttttatg tticaccagt ataagcaggt atggacgtac 180
 acgggaatag gcgagctgct tgatctgctg aaggggatca cgcctgccgc agctgtgaca 240
 gccgcctcc aatacggggg gticcacacg attttgtcc ggetgttggc cgtcagctgg 300
 atggttcagc taftgttcat cggaggaagc cggatgattt cacgggtgct gaaagaaacg 360
 atcggcagga agcaaaatga ctttcccgg gcctgtatca tcggcgcagg tgcgggaggg 420
 acgtgctcg tccgtcagct taccagaaa aacgatctcg gaatcatgcc tgtggcttt 480
 attgatgatg atcagacaaa gcataagctt gaaatcatgg gcttgcctgt catcggcgga 540
 aaagaaagca ttatgccggc ggttcagagg ctuagaalte accatatac caftgccatt 600
 ccgtctctt gcacctatga gcttcagacg ttatacaaa aatgtgtgca gacgggcgcc 660
 cataftaaa tcatgccgca attgatgag atcctgctcg gaacgcaggc tgccggacac 720
 atcagagatg taaaagccga agatctgctc ggcagaaage cggtcacct tgatacgagc 780
 aaaaattcig acagcatcaa gggaaaaacg attctgtgca cgggcgccgg cggctcaatc 840
 ggtctgaga tctgccgcca gatcagcgcg ttcttccgc gggaaatcgt ccttctcgge 900
 cacggggaga acagcaatca ttccgtacat accgagctgt ccgcacgctt cggcaaagag 960
 gtctctttc acgcggagat cggcgatatt caggacagag ataaaatctt tctttgatg 1020
 aaaaaatag agecgcacgt cgtctatcat gcggtctccc ataaacatgt gccgtaatg 1080

ES 2 649 937 T3

gaacataate cggagaage cgttaaaac aacattateg gcacgaaaaa tgcgcggaa 1140
 gcgcggaca tgcgcggaaac ggaacattc gtyctgaitt ctctgacaa agcgggcaat 1200
 ccggccaatg tcatgggggc gcgaaacgg ttgcggaaa tggatcat gaacctcga 1260
 aaggteagca gcaccaaati cgcgcgcgtc cgittcggaa atgigtctgg aagcccgccg 1320
 agcgtcaatc cgatttcaa aaagcagatt gaaaaaggcg gacctctac cgtcacgcac 1380
 ccggcgatga caagataatt taigacgati cccgaagcgt caagactcti cattcaggcg 1440
 ggggcgcttg caaaaggcg gcagatttc gttctggata tgggagaacc cgtcaaaatc 1500
 gtcgatctgg ccaaaaacct gattcattt taagctata cgacagaaca gattccatc 1560
 gaattctcg gcatccgtc gggagaaaag atgtatgaag aattgctga tcataatgaa 1620
 gtacatacgg agcagattt tccyaaaatc catatcggga aagcgggga cgggaattgg 1680
 gccgtactca tccgtttat ggaggaatc agccgtctgc ctgaagaaga gctgagaaaa 1740
 aggtglttg aggcgatcga atcagiacat gaagaagcgg ccgcaggcgt g 1791

<210> 13
 <211> 138
 <212> ADN
 <213> *Bacillus subtilis*

5

<400> 13

gtggaaaaca aattagaaga agtaaagcaa ttattatcc gacttgaaaa tgatafcaga 60
 gaaacaaccg actcaatcag aaacattaac aaaagcattg atcagctcga taaattctca 120
 tatgcaatga aaattct 138

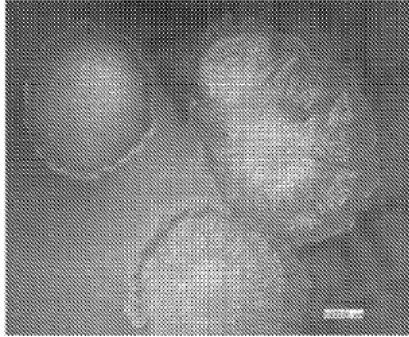
10

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de tratamiento de una planta para mejorar el crecimiento de las plantas, promover la salud de las plantas o controlar una enfermedad de las plantas, en el que el procedimiento comprende aplicar una composición que comprende células derivadas de la cepa bacteriana *Bacillus subtilis* QST713 depositada como el número de acceso NRRL B-50420 que tiene una mutación en un ortólogo de *swrA*, en el que la mutación reduce la capacidad de enjambre de las células bacterianas en comparación con las células bacterianas isogénicas que no tienen la mutación, en el que dicha mutación es una delección en la posición 26 de SEQ ID NO: 1 como se refleja en la SEQ ID NO: 3, en el que dichas células que tienen una mutación en un ortólogo de *swrA* tienen una capacidad mejorada para formar una biopelícula compacta en una raíz en comparación con las células QST713 de tipo salvaje y en el que al menos aproximadamente el 70 % de las células bacterianas son esporas, a la planta, a una parte de la planta y/o a un locus de la planta.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dichas células que tienen la mutación en un ortólogo de *swrA* pertenecen a la cepa AQ30002 (también conocida como QST30002), depositado con el número de acceso NRRL B-50421.
3. El procedimiento de la reivindicación 1 o 2, en el que el procedimiento comprende aplicar la composición al suelo.
4. El procedimiento de la reivindicación 3, en el que la composición se aplica antes, durante o después de que la planta o parte de la planta entre en contacto con el suelo.
5. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la parte de la planta se selecciona del grupo que consiste en una semilla, raíz, cormo, tubérculo, bulbo y rizoma.
6. Uso de células derivadas de la cepa bacteriana *Bacillus subtilis* QST713 depositada como el número de acceso NRRL B-50420 que tiene una mutación en un ortólogo de *swrA*, en el que la mutación reduce la capacidad de enjambre de las células bacterianas en comparación con las células bacterianas isogénicas que no tienen la mutación, en el que dicha mutación es una delección en la posición 26 de SEQ ID NO: 1 como se refleja en la SEQ ID NO: 3, en el que dichas células que tienen una mutación en un ortólogo de *swrA* tienen una capacidad mejorada para formar una biopelícula compacta en una raíz en comparación con las células QST713 de tipo salvaje para mejorar el crecimiento de la planta, promover la salud de la planta o controlar una enfermedad o plaga de la planta.
7. Uso de la reivindicación 6, en el que dichas células que tienen la mutación en un ortólogo de *swrA* pertenecen a la cepa AQ30002 (también conocida como QST30002), depositada como el número de acceso NRRL B-50421.
8. Las células *swrA*⁻ derivadas de *Bacillus subtilis* QST713 depositada como el número de acceso NRRL B-50420 en las que dichas células tienen una capacidad de enjambre reducida en comparación con las células de tipo salvaje isogénicas, en las que dichas células q *swrA*⁻ tienen una delección en la posición 26 de SEQ ID NO: 1 como se refleja en la SEQ ID NO: 3 y en las que dichas células *swrA*⁻ tienen una capacidad mejorada para formar una biopelícula compacta en una raíz en comparación con las células QST713 de tipo salvaje.
9. Las células *swrA*⁻ de la reivindicación 8 que pertenecen a la cepa AQ30002 (también conocida como QST30002), depositado como los números de acceso NRRL B-50421.
10. Una composición que comprende las células *swrA*⁻ de una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 9.
11. La composición de la reivindicación 10, en la que la composición comprende además al menos otro ingrediente activo seleccionado de un herbicida, un fungicida, un bactericida, un insecticida, un nematocida, un mitocida, un regulador del crecimiento de plantas, un estimulante del crecimiento de plantas y un fertilizante, además de las células *swrA*⁻.

Figura 1

Comparación de las morfologías de colonias de QST713 de tipo salvaje y variantes de QST713 de tipo papel de lija cultivadas sobre placas de agar nutriente.



QST713 de tipo salvaje

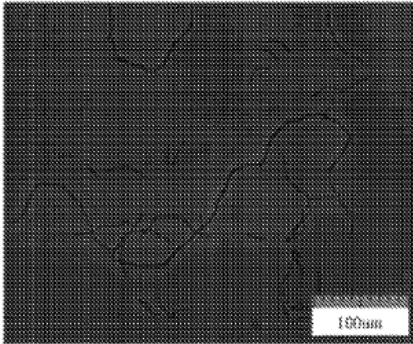


Variante de QST713 de tipo papel de lija

Figura 2

Imágenes de células AQ30002 y QST713 de tipo salvaje durante la fase exponencial.

AQ30002



QST713 de tipo salvaje

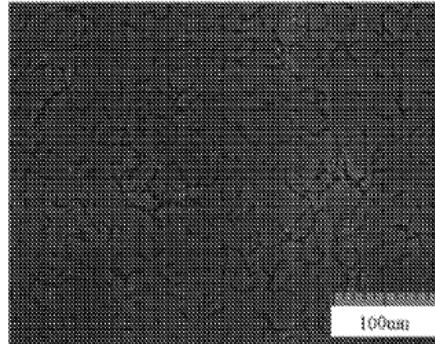


Figura 3

Imágenes de las células de AQ30002 swrA- (“30002”) y de QST713 swrA+ de tipo salvaje (“713”) en cultivo líquido sometidas a fuerzas de corte.

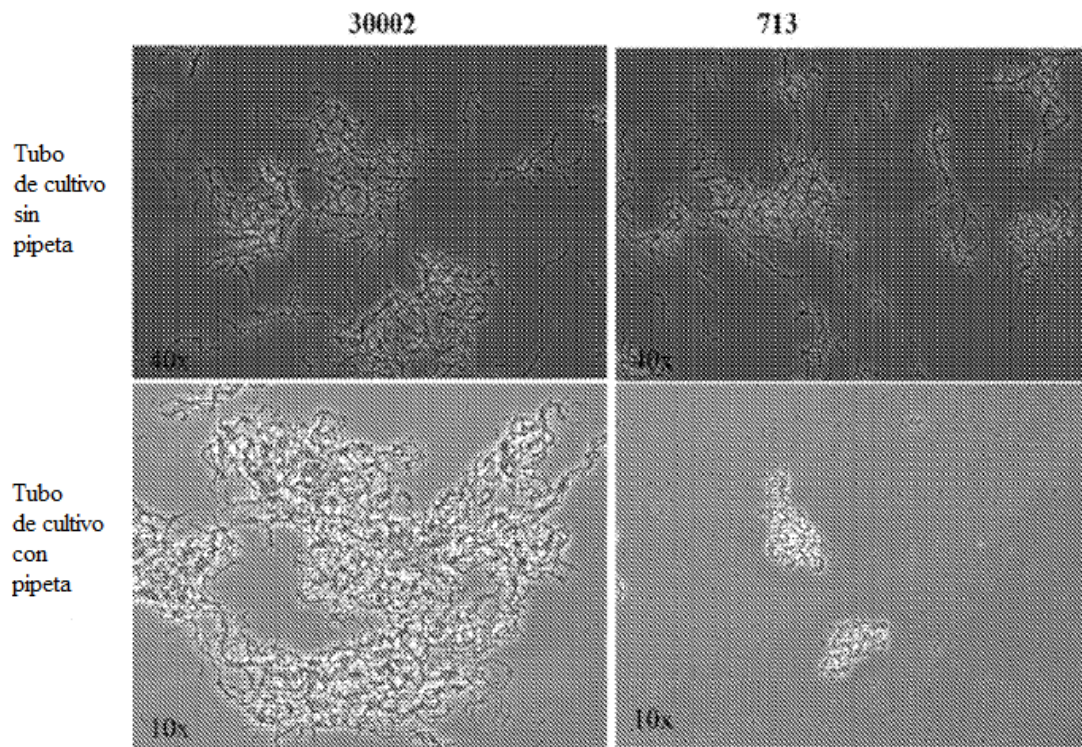


Figura 4

Cuantificación de colonias tipo papel de lija en lotes comerciales representativos de SERENADE®ASO.

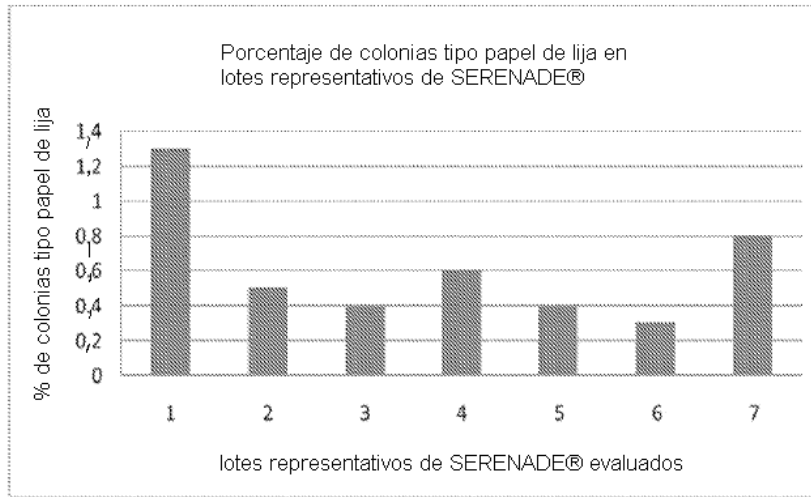


Figura 5A

Alineación de transcritos swrA predichos de diversas especies de Bacillus

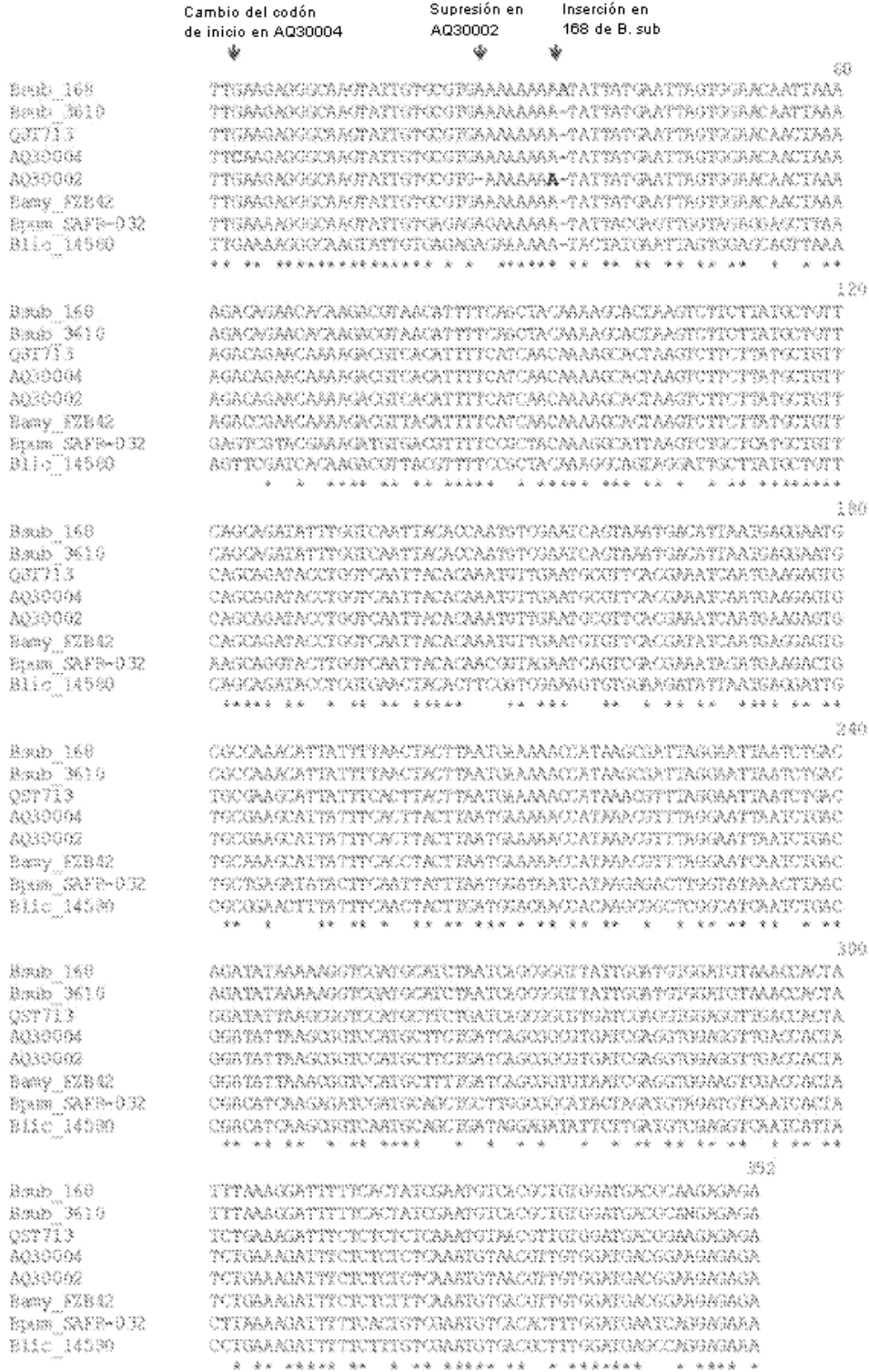


Figura 5B

Alineación de transcritos swrA predichos de diversas especies de Bacillus

	Cambio del codón de inicio en AQ30004	Supresión en AQ30002	Inserción en 168 de <i>B. subtilis</i>	
	▼	▼	▼	
				60
QST713	TTGAAAGAGGGCAAGTATTGTGCGTGAAAAA-	TATTATGAATTAGTGGAAACACTAAA		
AQ30004	TTCAAGAGGGCAAGTATTGTGCGTGAAAAA-	TATTATGAATTAGTGGAAACACTAAA		
AQ30002	TTGAAAGAGGGCAAGTATTGTGCGTG-AAAAA-	TATTATGAATTAGTGGAAACACTAAA		
Bamy_F2B42	TTGAAAGAGGGCAAGTATTGTGCGTGAAAAA-	TATTATGAATTAGTGGAAACACTAAA		
Bsub_3610	TTGAAAGAGGGCAAGTATTGTGCGTGAAAAA-	TATTATGAATTAGTGGAAACACTAAA		
Bsub_168	TTGAAAGAGGGCAAGTATTGTGCGTGAAAAA	ATATATTATGAATTAGTGGAAACACTAAA		
Batr_1942	TTGAAAGAGGGCAAGTATTGTGCGTGAAAAA-	TACTATGAATTAGTGGAAACACTAAA		
Bpum_SAFR-032	TTGAAAAGGGCAAGTATTGTGAGAGAGAAAAA-	TATTACGAGTTGGTAGAGGAGCTTAA		
Bpum_2808	TTGAAAAGGGCAAGTATTGTGAGAGAGAAAAA-	TATTACGAGTTGGTAGAGGAGCTTAA		
	** ** *	*****	** ** *	120
QST713	AGACAGAACAAAAGACGTCACATTTTCATCAACAAAAGCACTAAGTCTTCTATGCTGTT			
AQ30004	AGACAGAACAAAAGACGTCACATTTTCATCAACAAAAGCACTAAGTCTTCTATGCTGTT			
AQ30002	AGACAGAACAAAAGACGTCACATTTTCATCAACAAAAGCACTAAGTCTTCTATGCTGTT			
Bamy_F2B42	AGACCAGAACAAAAGACGTTACATTTTCATCAACAAAAGCACTAAGTCTTCTATGCTGTT			
Bsub_3610	AGACAGAACACAAGACGTAACATTTTCAGCTACAAAAGCACTAAGTCTTCTATGCTGTT			
Bsub_168	AGACAGAACACAAGACGTAACATTTTCAGCTACAAAAGCACTAAGTCTTCTATGCTGTT			
Batr_1942	AGACCAGAACACAAGACGTAACATTTTCAGCTACAAAAGCACTAAGTCTTCTAATGCTCTT			
Bpum_SAFR-032	GAGTCGTACGAAAGATGTGACGTTTTCCGCTACAAAAGCATTAAAGTCTGCTCATGCTGTT			
Bpum_2808	GAGTCGTACGAAAGATGTGACGTTTTCCGCTACAAAAGCATTAAAGTCTGCTCATGCTGTT			
	* * *	*****	** ** *	180
QST713	CAGCAGATACCTGGTCAATTACACAAATGTTGAATGCGTTCAAGAAATCAATGAAAGAGTG			
AQ30004	CAGCAGATACCTGGTCAATTACACAAATGTTGAATGCGTTCAAGAAATCAATGAAAGAGTG			
AQ30002	CAGCAGATACCTGGTCAATTACACAAATGTTGAATGCGTTCAAGAAATCAATGAAAGAGTG			
Bamy_F2B42	CAGCAGATACCTGGTCAATTACACAAATGTTGAATGCGTTCAAGAAATCAATGAAAGAGTG			
Bsub_3610	CAGCAGATATTTGGTCAATTACACCAATGTCGAAATCAGTAAATGACATTAATGAGGAATG			
Bsub_168	CAGCAGATATTTGGTCAATTACACCAATGTCGAAATCAGTAAATGACATTAATGAGGAATG			
Batr_1942	TAGCAGATATTTAGTCAATTACACAAATGTAGAAATCAGTGAACGATATTAATGAGGAATG			
Bpum_SAFR-032	AAGCAGGTACTTGGTCAATTACACAAACGGTAGAAATCAGTCCGACGAATAGATGAAAGACTG			
Bpum_2808	AAGCAGGTACTTGGTCAATTACACAAACGGTAGAAATCAGTCCGACGAGATCGATGAAAGACTG			
	*****	** ** *	** ** *	240
QST713	TGCGAAGCATTATTTCACTTACTTAATGAAAAACCAFAAACGTTTAGGAATTAATCTGAC			
AQ30004	TGCGAAGCATTATTTCACTTACTTAATGAAAAACCAFAAACGTTTAGGAATTAATCTGAC			
AQ30002	TGCGAAGCATTATTTCACTTACTTAATGAAAAACCAFAAACGTTTAGGAATTAATCTGAC			

ES 2 649 937 T3

Bamy_FZB42	TGCRAAGCATTATTTCACCTACTTAATGAAAAACCATTAACCGTTTAGGAATCAATCTGAC
Bsub_3610	CGCCAAACATTATTTTAACTACTTAATGAAAAACCATTAAGCGATTAGGAATTAATCTGAC
Bsub_168	CGCCAAACATTATTTTAACTACTTAATGAAAAACCATTAAGCGATTAGGAATTAATCTGAC
Batr_1942	CGCCGAGCATTATTTTAACTACTTAATGAAAAACCATTAAGCGTTGGGAATCAATCTGAC
Bpum_SAFR-032	TGCTGAGATAACTTCAATTATTTAATGGATAATCATAAGAGACTTGGTATAAACTTAAC
Bpum_2808	TGCTGAGATAACTTCAATTATTTAATGGATAATCATAAGAGACTTGGTATAAACTTAAC
	** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * **
	300
Q8E713	GGATATTAAGCGGTCCATGCTTCTGATCAGCGGCGTGTATCGAGGTGGAGGTTGACCACTA
AQ30004	GGATATTAAGCGGTCCATGCTTCTGATCAGCGGCGTGTATCGAGGTGGAGGTTGACCACTA
AQ30002	GGATATTAAGCGGTCCATGCTTCTGATCAGCGGCGTGTATCGAGGTGGAGGTTGACCACTA
Bamy_FZB42	GGATATTAAGCGGTCCATGCTTCTGATCAGCGGCGTGTATCGAGGTGGAGGTTGACCACTA
Bsub_3610	AGATATTAAGCGGTCCATGCTTCTGATCAGCGGCGTGTATCGAGGTGGAGGTTGACCACTA
Bsub_168	AGATATTAAGCGGTCCATGCTTCTGATCAGCGGCGTGTATCGAGGTGGAGGTTGACCACTA
Batr_1942	AGACATAAAGCGGTCCATGCTTCTGATCAGCGGCGTGTATCGAGGTGGAGGTTGACCACTA
Bpum_SAFR-032	CGACATCAAGAGTCCATGCTTCTGATCAGCGGCGTGTATCGAGGTGGAGGTTGACCACTA
Bpum_2808	CGACATCAAGAGTCCATGCTTCTGATCAGCGGCGTGTATCGAGGTGGAGGTTGACCACTA
	** ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * **

Figura 5C

Alineación de proteínas swrA de diversas especies de Bacillus

```

                                                                 60
Bamy_Q8T713      MKRASIVREKKYYELVEQLKDRTKQVTFSSATKALSLLMLFSRYLVNVTNVECVHEINEEC
Bamy_FZB42      MKRASIVREKKYYELVEQLKDRTKQVTFSSATKALSLLMLFSRYLVNVTNVECVHDINEEC
Bsub_3610       MKRASIVREKKYYELVEQLKDRTKQVTFSSATKALSLLMLFSRYLVNVTNVECVNDINEEC
Batr_1942       MKRASIVREKKYYELVEQLKDRTKQVTFSSATKALSLLMLFSRYLVNVTNVECVNDINEEC
Bpum_SAFR-032   MKRASIVREKKYYELVEELKSRTKQVTFSSATKALSLLMLFSRYLVNVTNVECVDEIDEDC
Bpum_7061       MKRASIVREKKYYELVEELKSRSKQVTFSSATKALSLLMLFSRYLVNVTNVECVDEIDEDC
Blic_14580      MKRASIVREKKYYELVEQLKVRQVTFSSATKAVGLLMLFSRYLVNVTNVECVDEINEDC
*****:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*
                                                                 117
Bamy_Q8T713      AKHYFTYLMKMKRKLGINLTDIERSMLLISGVLEVEVDHYLKDPSLSNVTLMNTEER
Bamy_FZB42      AKHYFTYLMKMKRKLGINLTDIERSMLLISGVLEVEVDHYLKDPSLSNVTLMNTEER
Bsub_3610       AKHYFTYLMKMKRKLGINLTDIERSMLLISGVLEVEVDHYLKDPSLSNVTLMNTEER
Batr_1942       AKHYFTYLMKMKRKLGINLTDIERSMLLISGVLEVEVDHYLKDPSLSNVTLMNTEER
Bpum_SAFR-032   AKHYFTYLMKMKRKLGINLTDIERSMLLISGVLEVEVDHYLKDPSLSNVTLMNTEER
Bpum_7061       AKHYFTYLMKMKRKLGINLTDIERSMLLISGVLEVEVDHYLKDPSLSNVTLMNTEER
Blic_14580      AKHYFTYLMKMKRKLGINLTDIERSMLLISGVLEVEVDHYLKDPSLSNVTLMNTEER
*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*

```


Figura 6

Árbol filogenético de especies dentro del clado de *Bacillus subtilis* con ortólogos de *swrA*

El genoma de especies marcadas con un solo asterisco fue completamente secuenciado pero no contiene un gen *swrA*. Las especies marcadas con un doble asterisco fueron completamente secuenciadas y se ha confirmado que contienen un gen *swrA*. Se presume que las otras especies, no marcadas con ningún asterisco, tienen un ortólogo de *swrA*s basado en sus relaciones filogenéticas cercanas, pero actualmente no se encuentran disponibles los datos de las secuencias genómicas para estas especies.

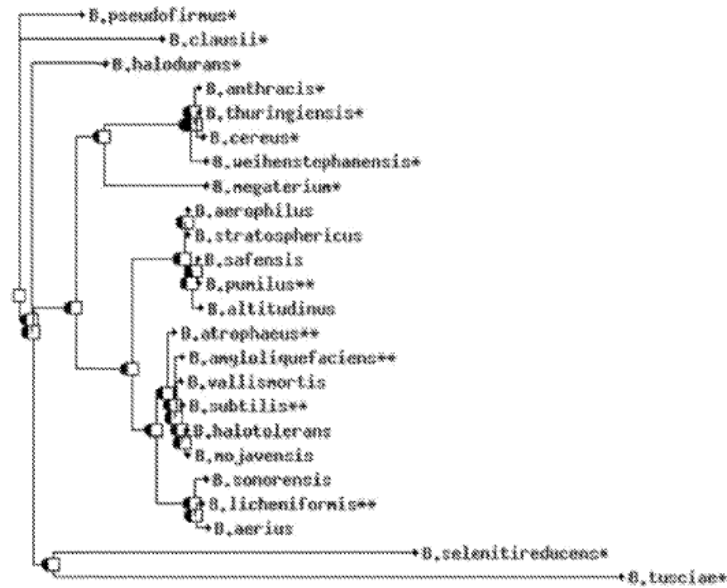


Figura 7

Imágenes de placas de ensayo del movimiento en enjambre de LB-agar 0,7% para QST713 *swrA*+ (“QST713”), AQ30002 *swrA*- (“AQ30002”) y diversas construcciones basadas en estas cepas.

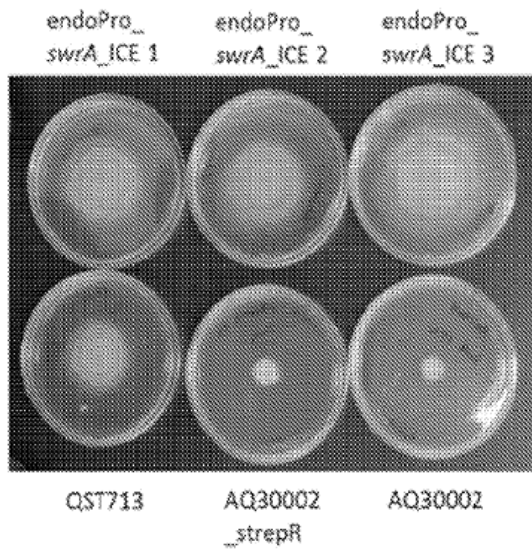


Figura 8

Calificaciones promedio de colonización de raíces para QST 713 *swrA*+ (“QST713”), AQ30002 *swrA*- (“AQ30002”) y diversas construcciones basadas en estas cepas demostrando así que la complementación con *swrA* de tipo salvaje en las células AQ30002 *swrA*- reduce la capacidad de colonización de raíces.

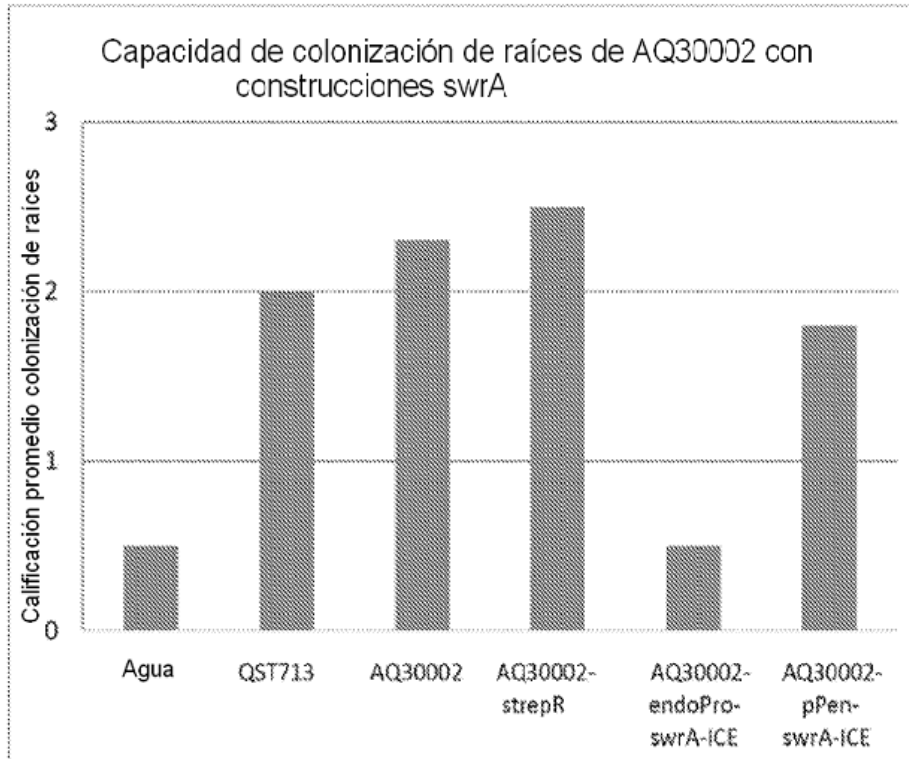


Figura 9

Imágenes de biopelículas de raíces capturadas con microscopía óptica digital que muestran la similitud de biopelículas entre AQ30002_endoPro_swrA_ICE (cepa complementada) y QST 713 *swrA*+ (“QST 713”) y la similitud entre AQ30002_pPen_swrA_ICE (complementación parcial) y AQ30002 *swrA*- (“AQ30002”).

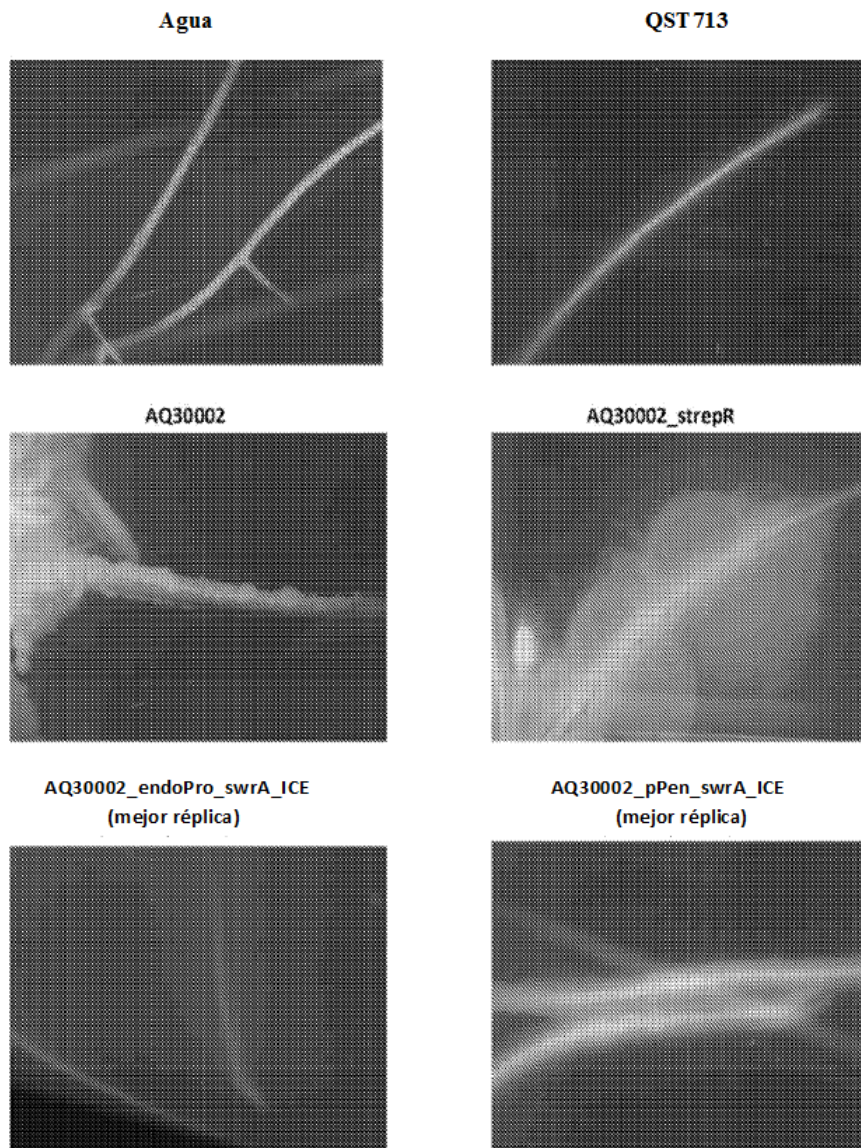


Figura 10

Crecimiento de QST713 *swr4+* de tipo salvaje (réplicas: wt1 y wt2) y AQ30002 *swr4-* (réplicas: sp1 y sp2) en medio stock de cerdo a 30 °C.

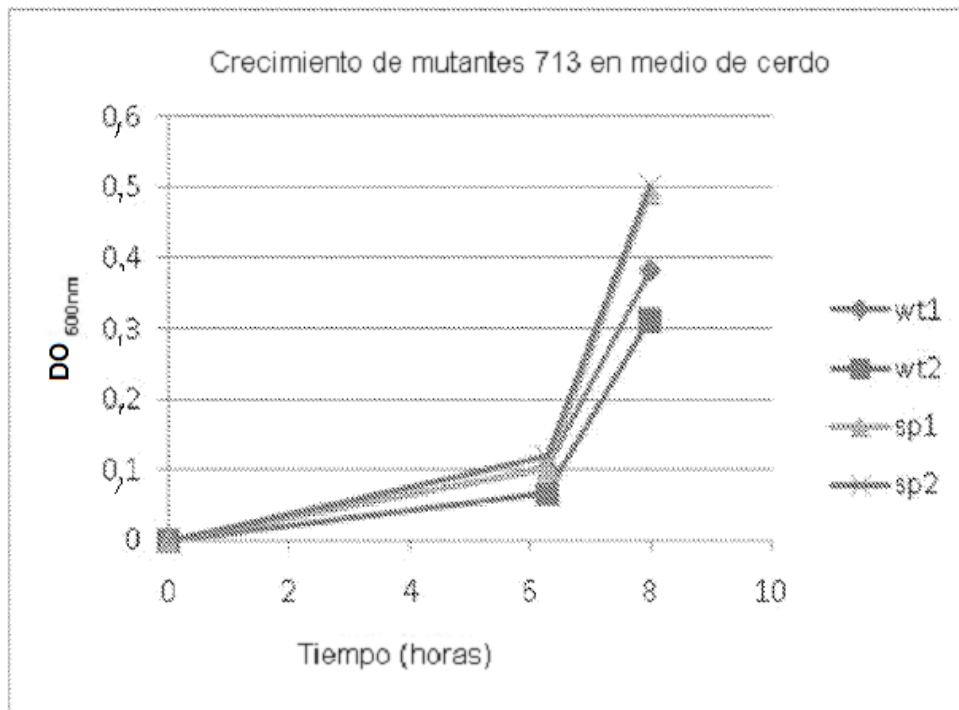
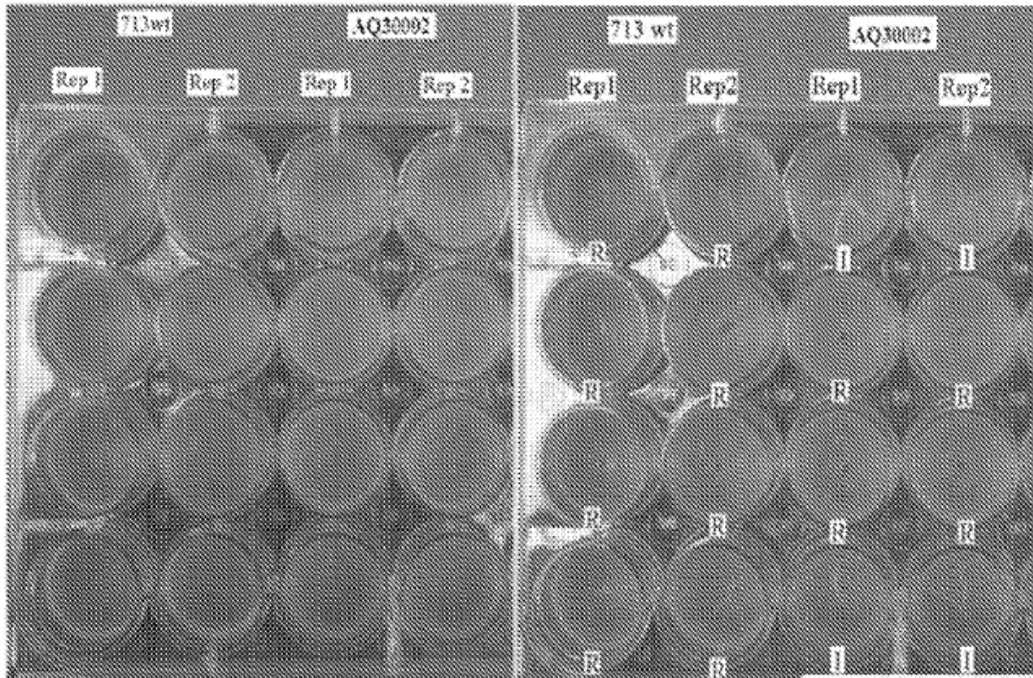


Figura 11

Robustez de películas de cultivos de QST 713 *swrA* + ("713 wt") y AQ30002 *swrA*- ("AQ30002").

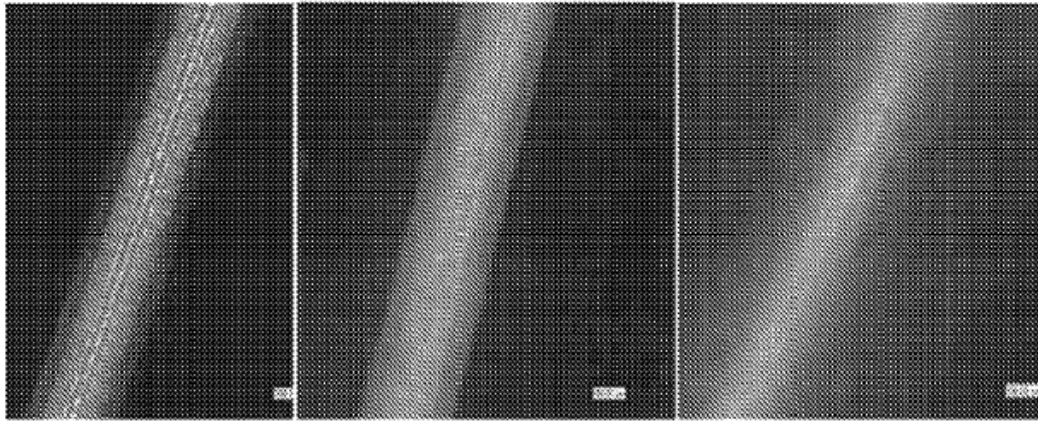


Antes de la sonda

Después de la sonda; R= con ruptura; I= intacto

Figura 12

Imágenes de colonización de raíces con *Bacillus subtilis*, AQ30002 *swrA*- ("AQ30002") y QST713 *swrA*+ de tipo salvaje ("QST713 wt").



Raíz tratada con agua

Raíz tratada con AQ30002

Raíz tratada con QST713 wt

Figura 13

Imágenes de microscopía electrónica de barrido (SEM) de biopelículas de recubrimiento de superficies radiculares de *Bacillus subtilis* QST 713 *swrA*+ de tipo salvaje (“QST713”) y AQ30002 *swrA*- (“AQ30002”).

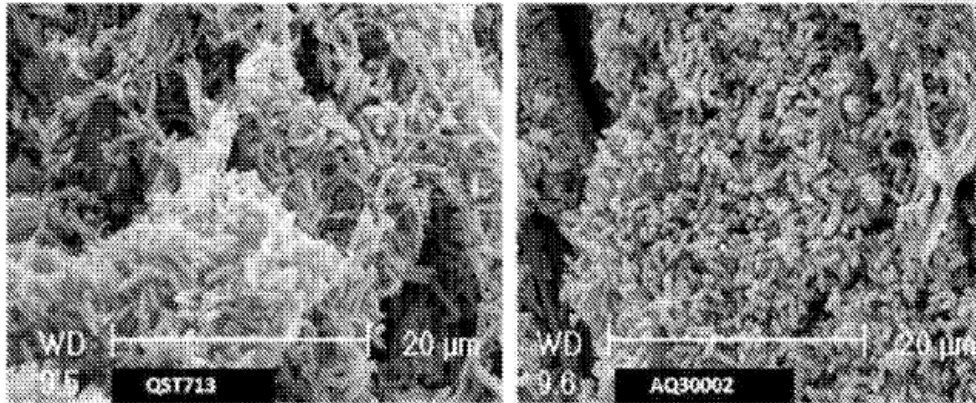


Figura 14

Imágenes de microscopía óptica de secciones delgadas y gruesas de raíces tratadas con agua, *Bacillus subtilis*, QST713 *swrA*+ de tipo salvaje (“QST713”) y AQ30002 *swrA*- (“30002”).

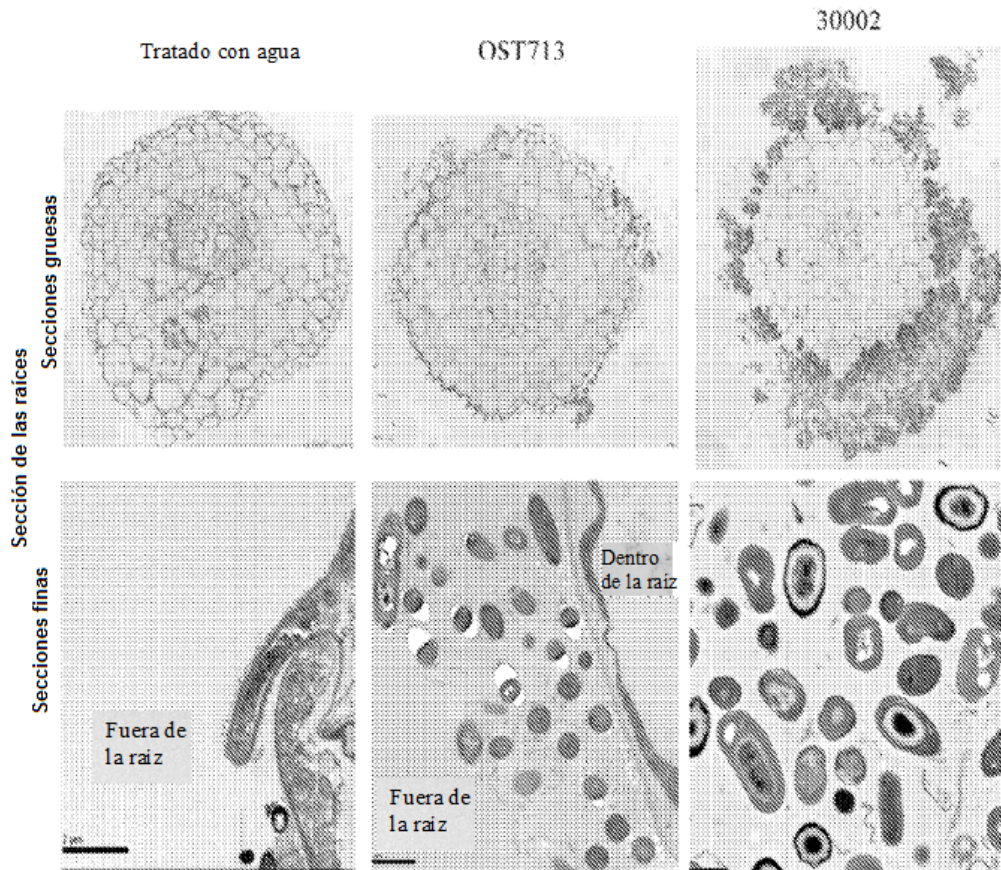


Figura 15

Promoción del crecimiento en maíz tratado con AQ30002 *swrA*- (“AQ30002”), QST713 (una mezcla de células *swrA*+ de tipo salvaje y *swrA*- tipo papel de lija con las relaciones halladas en SERENADE®) (“QST713”) u otras cepas de *Bacillus*.

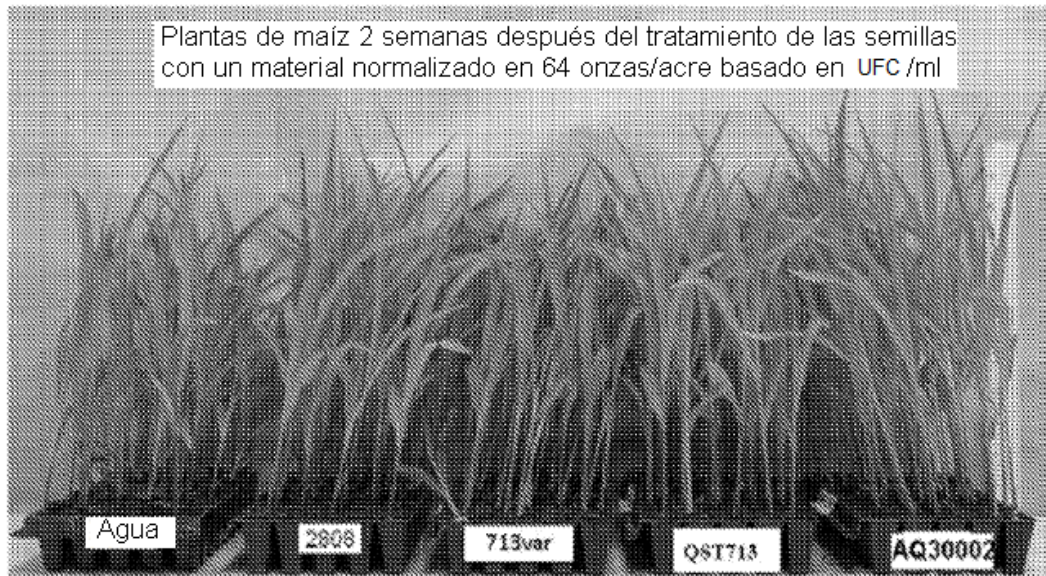


Figura 16

Promoción del crecimiento de plantas en trigo tratado con células AQ30002 *swrA*- ("AQ30002"), QST713 (una mezcla de *swrA*+ de tipo salvaje y *swrA*- tipo papel de lija con las relaciones halladas en SERENADE®) ("QST 713"), u otras cepas de *Bacillus*.

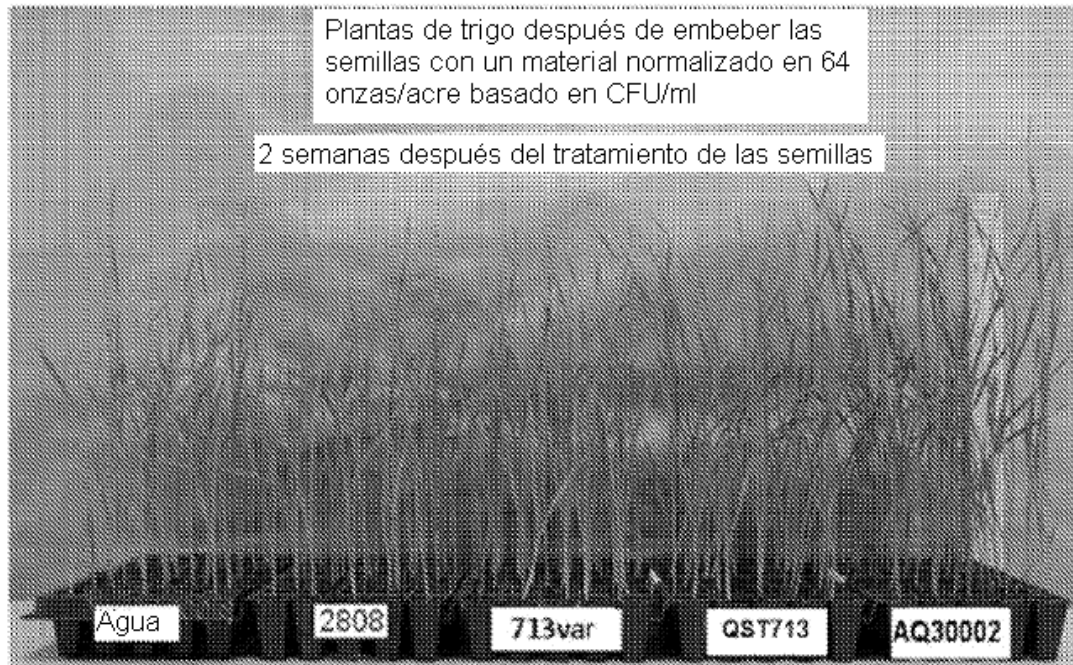


Figura 17

Promoción del crecimiento de plantas en tomates tratados con células AQ30002 *swrA*- (“AQ30002”), QST 713 (una mezcla de *swrA*+ de tipo salvaje y *swrA*- tipo papel de lija con las relaciones halladas en SERENADE®) (“QST713”), u otras cepas de *Bacillus*.

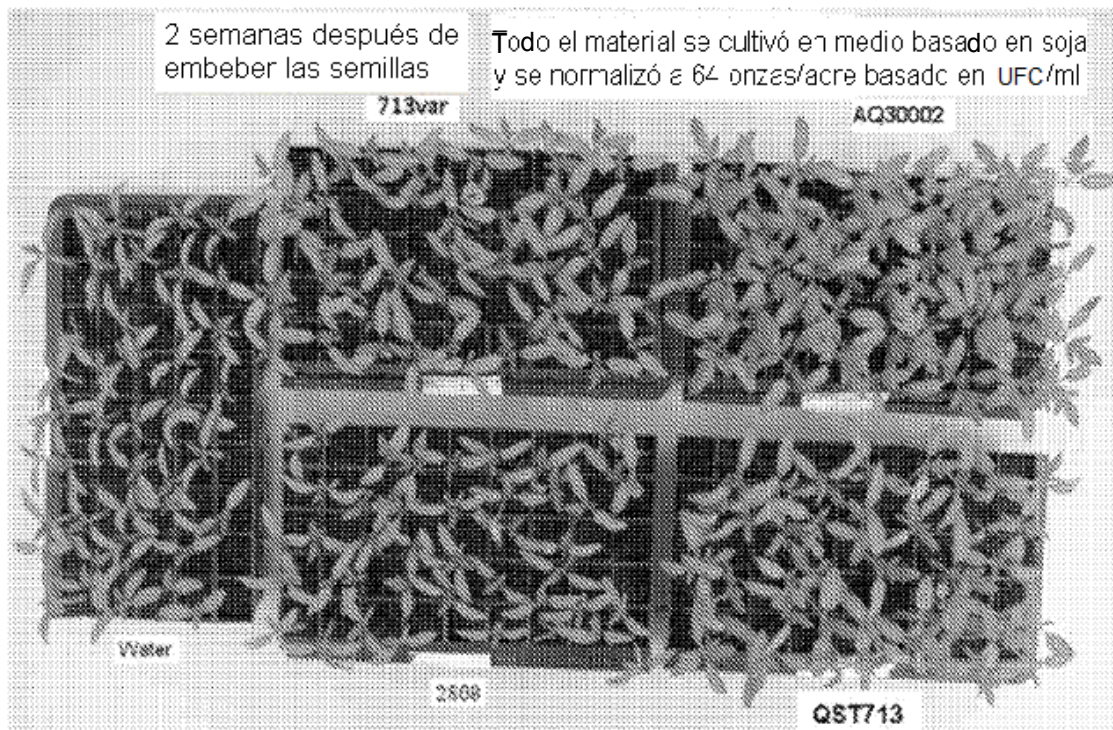


Figura 18

Pesos secos de raíces y brotes de maíz tratado con células AQ30002 *swrA*- (“AQ30002”), QST713 (una mezcla de *swrA*+ de tipo salvaje y *swrA*- tipo papel de lija con las relaciones halladas en SERENADE®) (“QST 713”) u otras cepas de Bacillus.

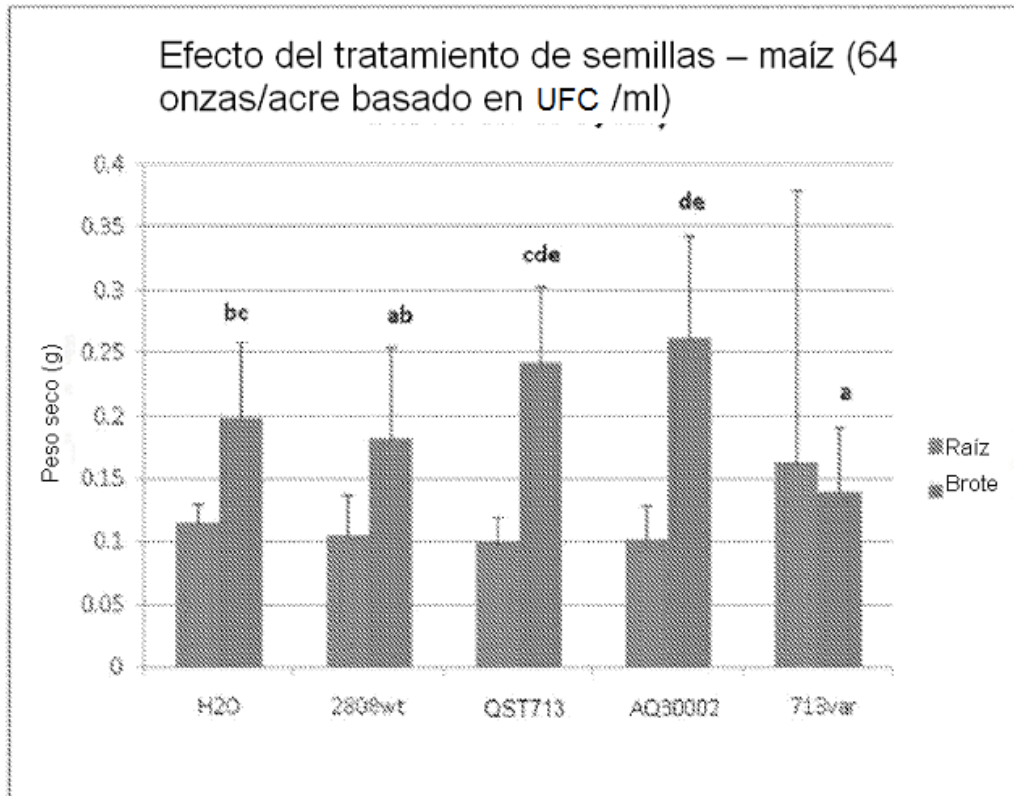


Figura 19

Pesos secos de las raíces y brotes de trigo tratado con AQ30002 swrA- ("AQ30002"), QST713 (una mezcla de células swrA+ salvaje y swrA- como se encuentran en SERENADE®) ("QST713") u otras cepas de *Bacillus*

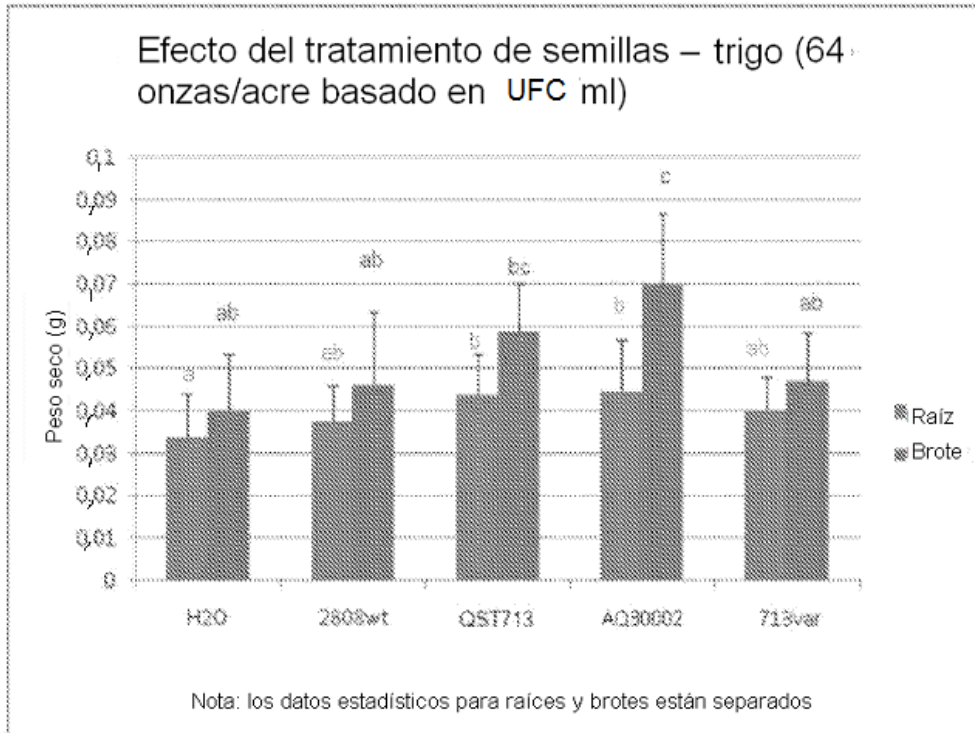


Figura 20

Pesos secos de raíces y brotes de tomate tratado con A Q30002 *swrA*- (“A Q30002”), QST713 (una mezcla de *swrA*+ de tipo salvaje y *swrA*- tipo papel de lija células con las relaciones halladas en SERENADE®) (“QST713”) u otras cepas de *Bacillus*.

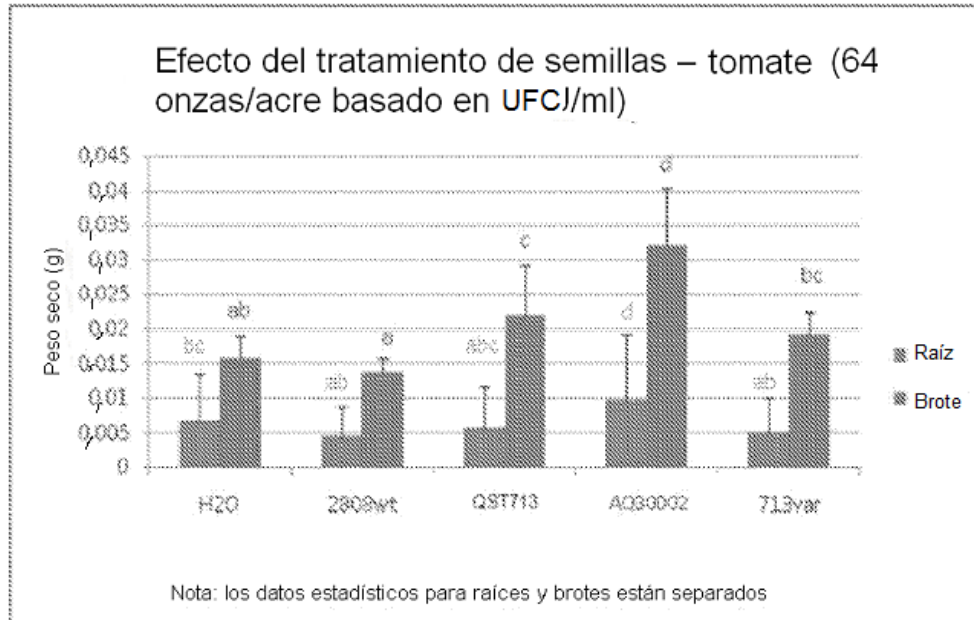


Figura 21

Rendimiento del procesamiento de tomates de plantas tratadas con las cepas de *Bacillus subtilis* QST713 (una mezcla de células de *swrA+* de tipo salvaje y *swrA-* tipo papel de lija con las relaciones halladas en SERENADE®) (“QST713”) o AQ30002 *swrA-* (“AQ30002”) solas o en combinación con un estimulante del crecimiento vegetal (PGS). Escalon, California.

Los tratamientos indicados con “Exp” representan condiciones experimentales alternativas. La mediciones con la misma letra no son estadísticamente diferentes a un valor de P = 0,05.

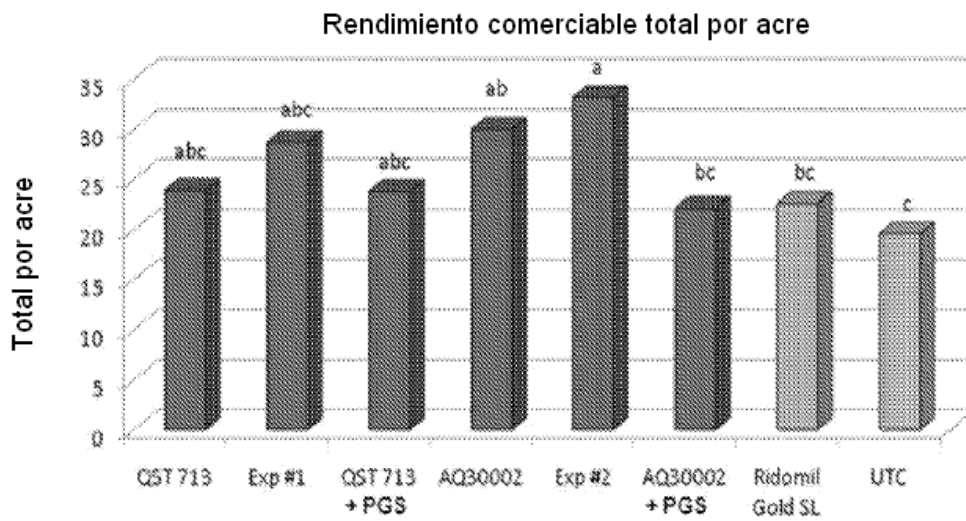


Figura 22

Vuelco de plantas de maíz tratadas con las cepas de *Bacillus subtilis* QST713 (una mezcla de células swrA+ de tipo salvaje y swrA- tipo papel de lija con las relaciones halladas en SERENADE®) ("QST713") o AQ30002 swrA- ("AQ30002") solas o en combinación con un estimulante del crecimiento vegetal (PGS). Paynesville, Minnesota.

Los tratamientos indicados con "Exp" representan condiciones experimentales alternativas. La mediciones con la misma letra no son estadísticamente diferentes a un valor de P = 0,10.

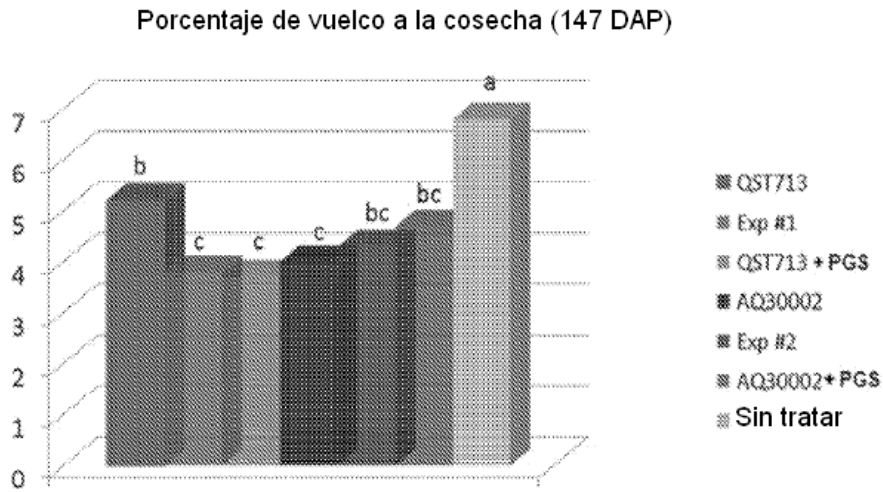


Figura 23

Imagen de raíces de soja de plantas tratadas con AQ30002 *swrA*- ("QRD154") y un inoculante bacteriano en surcos en el momento de la siembra.



Figura 24

Imagen de raíces de soja de plantas no tratadas.

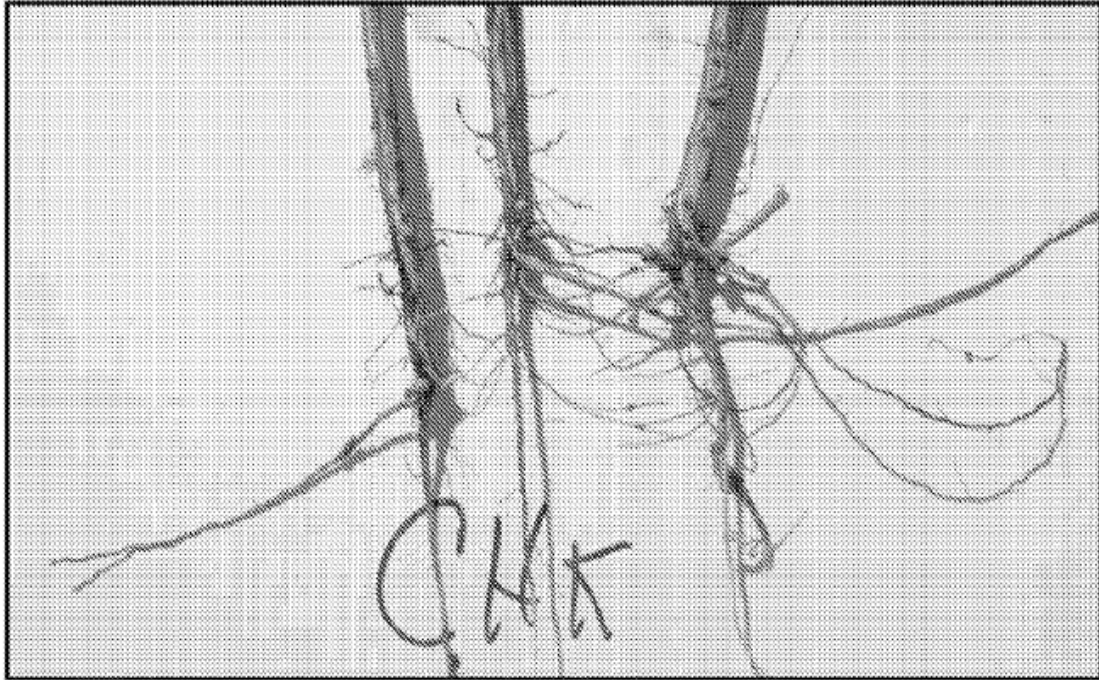


Figura 25

Control de podredumbre del tallo de maíz de *Pythium* por las cepas de *Bacillus subtilis* QST 713 (una mezcla de células *swrA+* de tipo salvaje y *swrA-* tipo papel de lija con las relaciones halladas en SERENADE®) ("QST 713") y AQ30002 *swrA-* ("AQ30002") aplicadas con y sin un estimulante del crecimiento vegetal (PGS). Paynesville, Minnesota.

Los tratamientos indicados con "Exp" representan condiciones experimentales alternativas. La mediciones con la misma letra no son estadísticamente diferentes a un valor de P = 0,10.

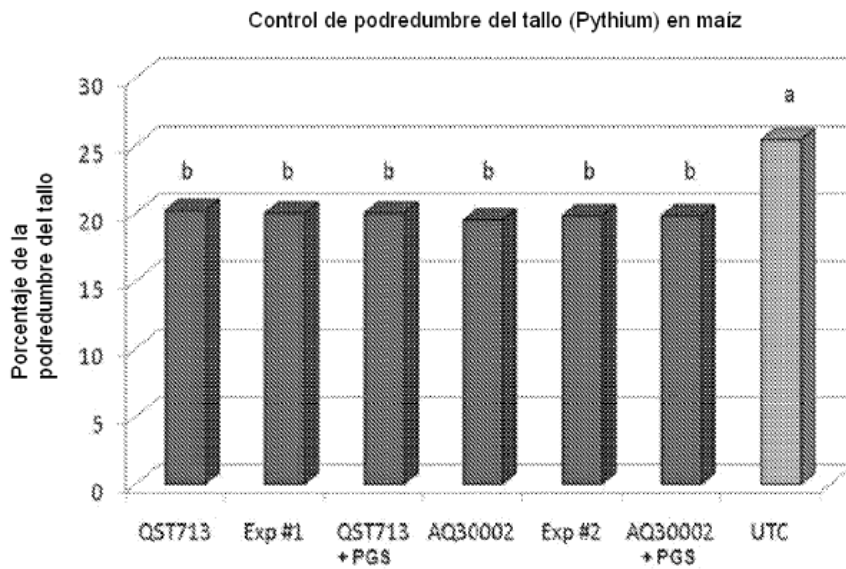


Figura 26

Actividad de QST713 (una mezcla de células *swrA*+ de tipo salvaje y *swrA*- tipo papel de lija con las relaciones halladas en SERENADE®) (“QST 713”) y AQ30002 *swrA*- (“AQ30002”) contra la pérdida de humectación causada por *Pythium ultimum* y *Rhizoctonia solani*.

Cada barra representa el promedio de cuatro mediciones, donde las barras de error indican las desviaciones estándar.

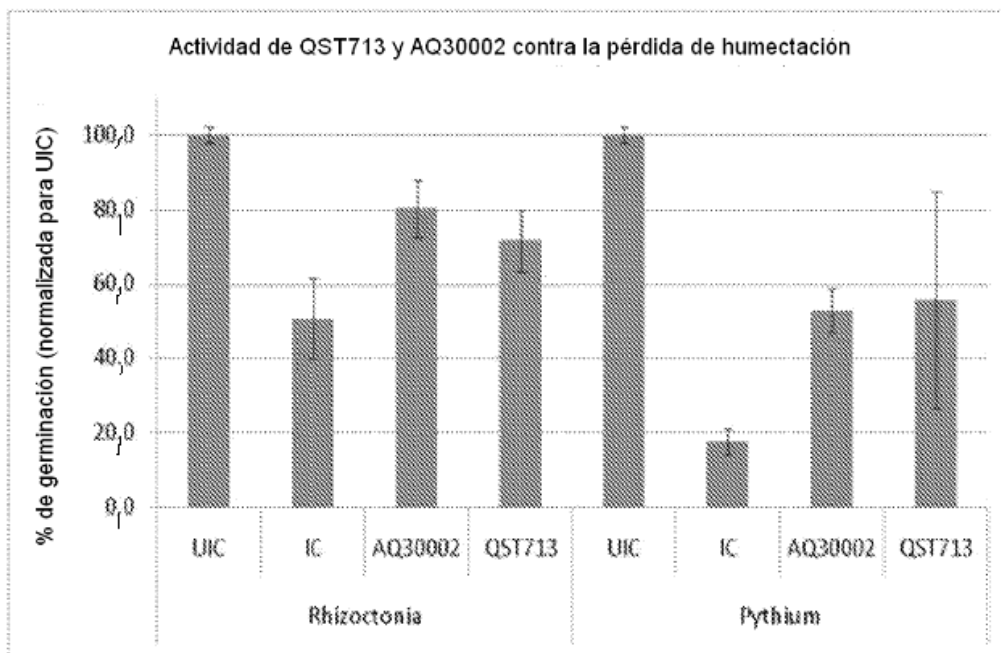


Figura 27

Transcurso en el tiempo que muestra la actividad de QST713 (una mezcla de células *swrA*+ de tipo salvaje y *swrA*- tipo papel de lija con las relaciones halladas en SERENADE®) ("QST713") y AQ30002 *swrA*- ("AQ30002") contra el tizón de pimiento causado por *Phytophthora capsici* sobre un período de 8 días.

Nótese que se superponen las curvas del control no infestado (UIC) y de un fungicida químico.

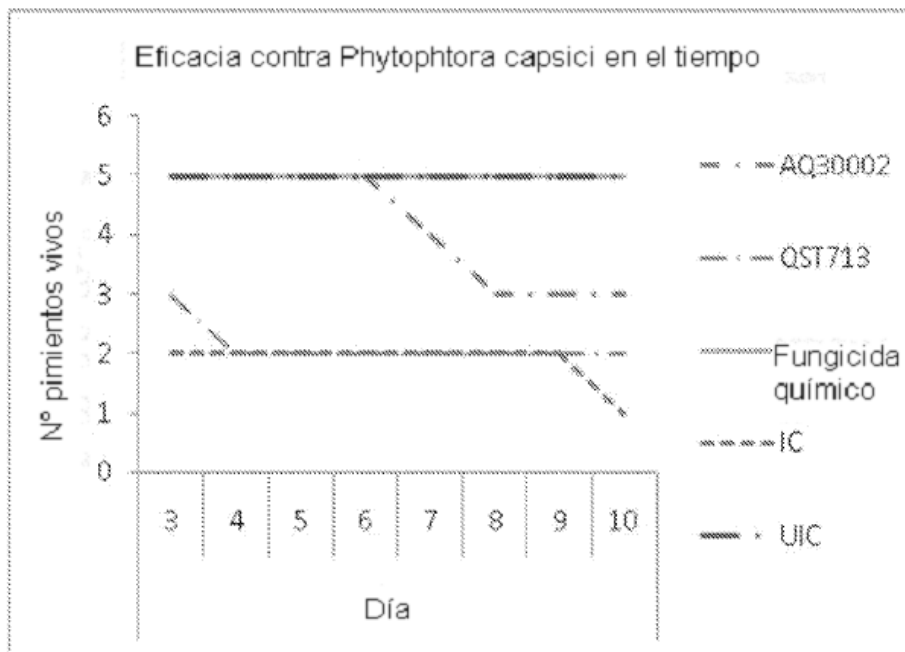


Figura 28

Plantas de tomate tratadas con dosis crecientes de AQ30002 *swrA*⁻ (“AQ30002”) y QST713 (una mezcla de células *swrA*⁺ de tipo salvaje y *swrA*⁻ tipo papel de lija con las relaciones halladas en SERENADE[®]) (“QST713”).

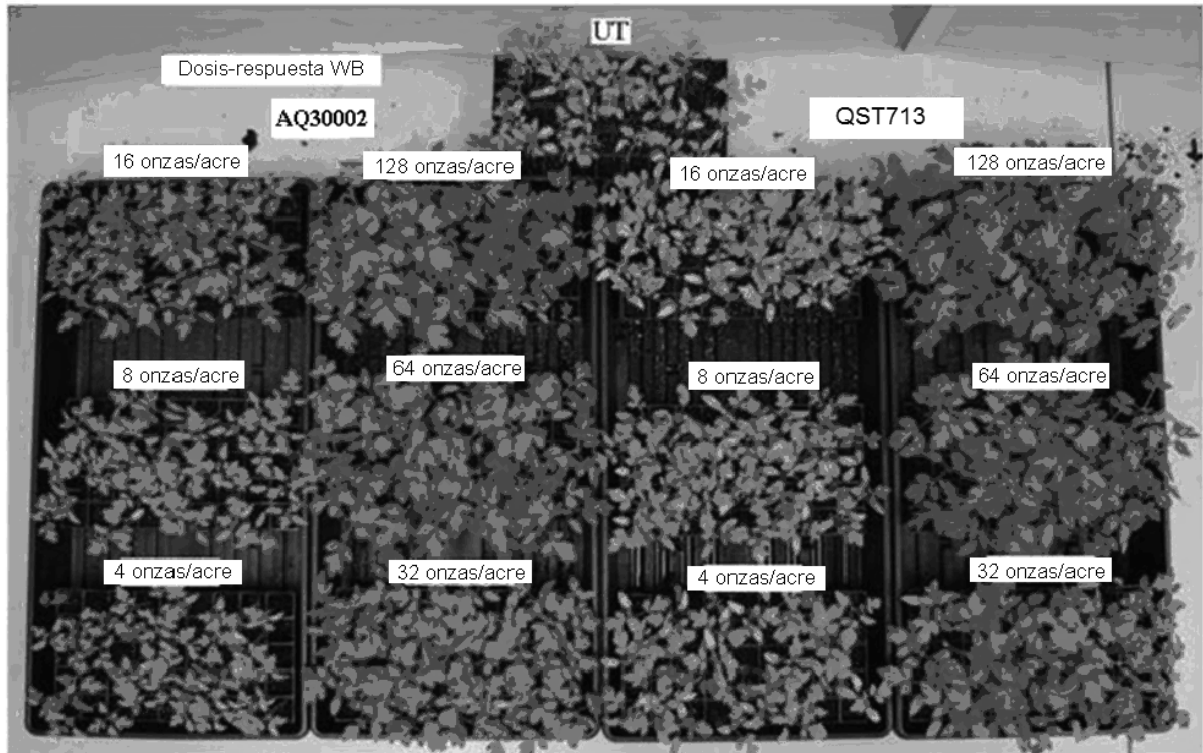


Figura 29

Hojas individuales de plantas de tomate tratadas con dosis crecientes de AQ30002 (“AQ30002”) y QST713 (una mezcla de células *swrA*+ de tipo salvaje y *swrA*- tipo papel de lija con las relaciones halladas en SERENADE®) (“QST713”).

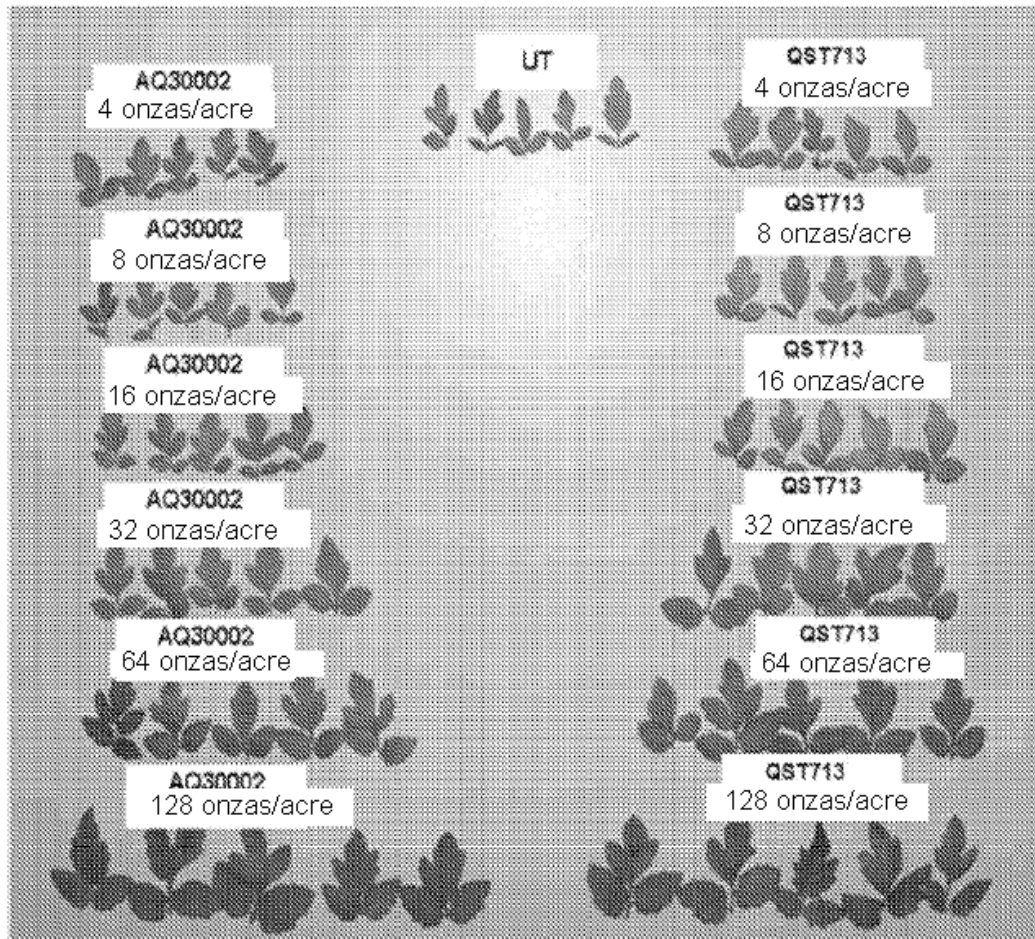


Figura 30

Contenido de clorofila de plantas de tomate tratadas con dosis crecientes de AQ30002 (“AQ30002”) y QST713 (una mezcla de células *swrA*+ de tipo salvaje y *swrA*- tipo papel de lija con las relaciones halladas en SERENADE®) (“QST713”).

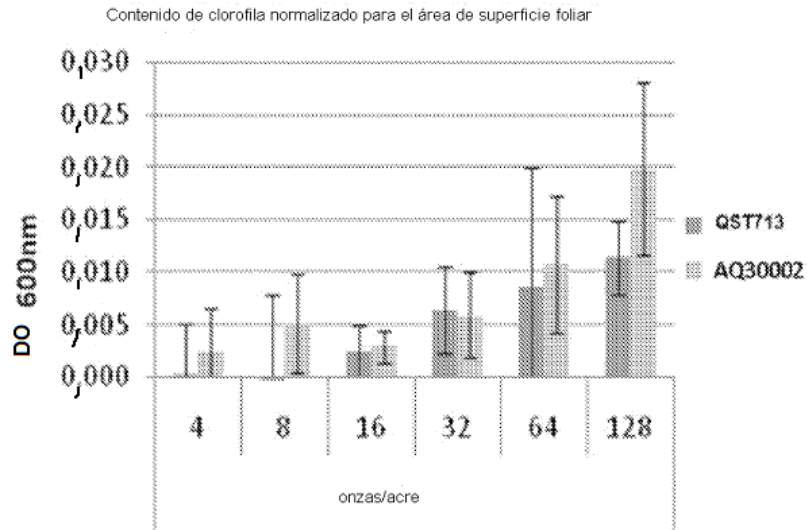


Figura 31

La Figura 31 representa el área de superficie foliar promedio (de cinco réplicas) de plantas tratadas con 3610WT y 3610 Δ swrA- (designadas 3610swrA en el gráfico). El área de superficie foliar se expresa en mm².

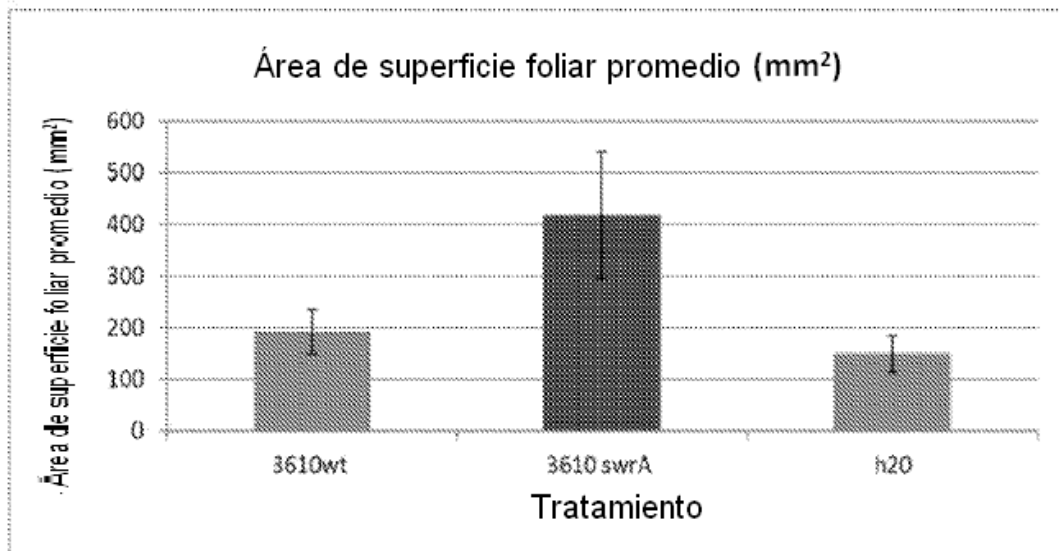


Figura 32

Lecturas de clorofila de plantas tratadas con 3610WT y 3610 *swrA*- (indicadas en la figura como 3610*swrA*). Los resultados son un promedio de los niveles de clorofila en la primera hoja verdadera de cinco plántulas de tomate seleccionadas al azar.

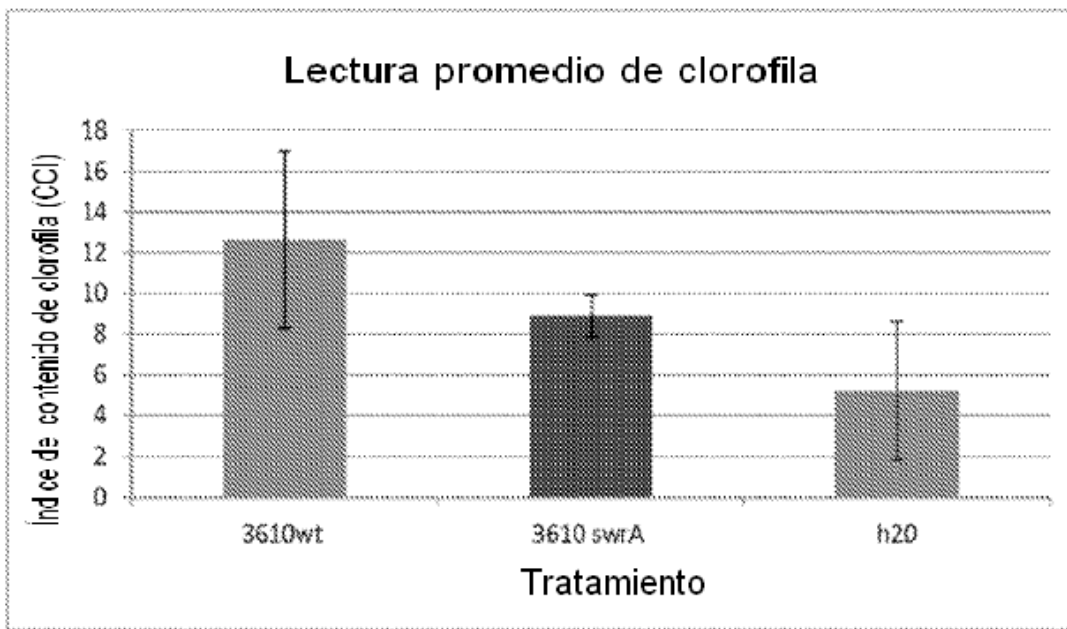


Figura 33

Actividad de 3610WT y 3610*swrA*- (designadas 3610*swrA* en el gráfico) contra *Phytophthora capsici* en pimientos.

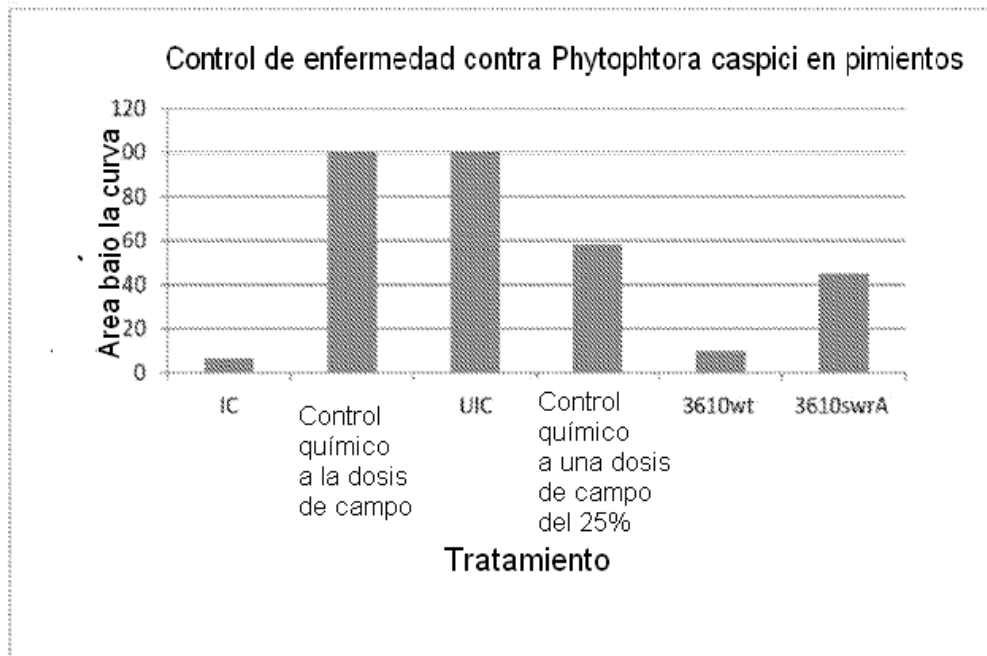


Figura 34

Efecto del tratamiento con caldo completo de AQ30002 *swrA*- ("AQ30002") sobre la formación de agallas en raíces infestadas con nematodos de los nudos de la raíz.

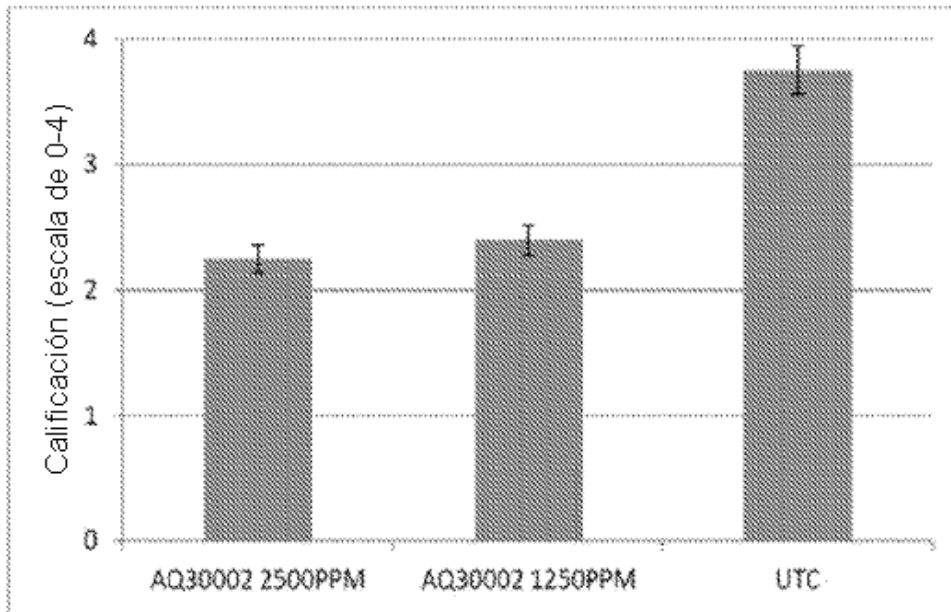


Figura 35

Efecto del tratamiento con AQ30002 *swrA*- (“AQ30002”) a diversas dosis sobre plántulas infestadas con nematodos de los nudos de la raíz. Específicamente, los resultados muestran la extensión de formación de agallas en la raíz y los efectos sobre la penetración y el desarrollo de nematodos.

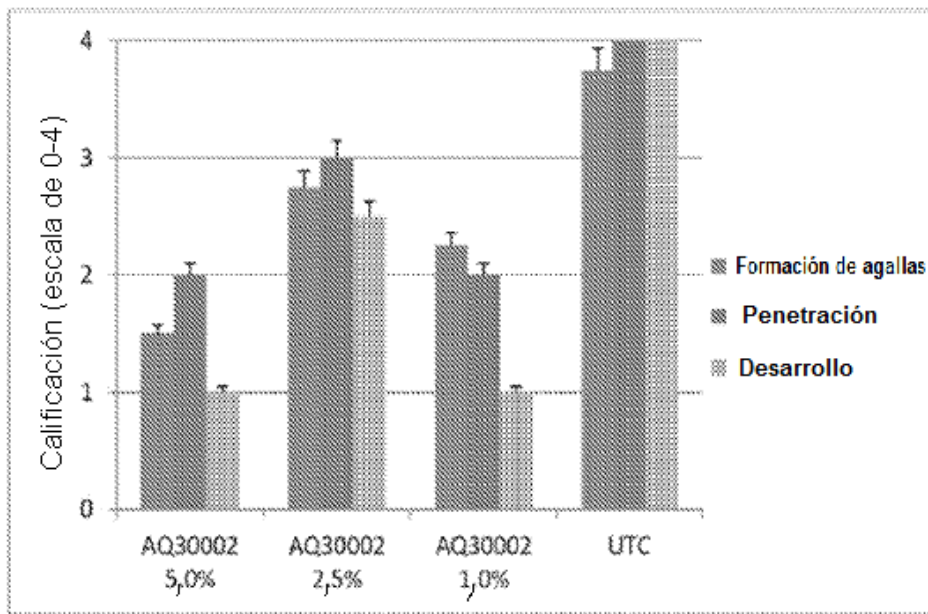


Figura 36

Huevos de nematodos de los nudos de la raíz por planta tratada con diversos lotes de AQ30002 *swrA*- (“AQ30002”) en comparación con las plantas no tratadas (designadas UTC en la figura).

