(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 752 451**

(51) Int. Cl.:

A01N 63/00 (2006.01)
C12R 1/20 (2006.01)
C12N 1/00 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.12.2012 PCT/US2012/069579**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **20.06.2013 WO13090628**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.12.2012 E 12857082 (7)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.08.2019 EP 2790513**

(54) Título: **Microbios que promueven el crecimiento de plantas y usos de los mismos**

(30) Prioridad:

13.12.2011 US 201161570237 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
06.04.2020

(73) Titular/es:

MONSANTO TECHNOLOGY LLC (100.0%)
800 North Lindbergh Blvd.
St. Louis, MO 63167, US

(72) Inventor/es:

BULLIS, DAVID, T.;
GRANDLIC, CHRISTOPHER, J.;
MCCANN, RYAN y
KEROVUO, JANNE, S.

(74) Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 752 451 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

Microbios que promueven el crecimiento de plantas y usos de los mismos

Campo de la invención

La presente invención se refiere al campo de la agricultura sostenible. Específicamente, la divulgación proporciona composiciones microbianas y procedimientos útiles para la producción de plantas de cultivo. En particular, las composiciones y procedimientos divulgados en la presente memoria son útiles para mejorar el crecimiento de las plantas y/o suprimir el desarrollo de patógenos de plantas y enfermedades patógenas.

Antecedentes de la invención

La microflora que rodea las plantas es muy diversa, incluyendo bacterias, hongos, levaduras, algas. Algunos de estos microorganismos pueden ser perjudiciales para las plantas, y a menudo se los conoce como patógenos, mientras que otros pueden ser beneficiosos para las plantas al promover el crecimiento de las plantas y la productividad de los cultivos. Los avances recientes en la microbiología del suelo y la biotecnología vegetal han dado lugar a un mayor interés en el uso de agentes microbianos en la agricultura, la horticultura, la silvicultura y la gestión ambiental. En particular, varios microorganismos que se sabe que están presentes en el nicho ecológico del suelo, generalmente conocido como rizosfera y rizoplano, han recibido considerable atención con respecto a su capacidad para promover el crecimiento de las plantas. De hecho, el suelo rizoesférico representa un buen reservorio de microbios para el aislamiento potencial de microbios beneficiosos. La rizosfera vegetal puede contener miles de millones de microorganismos en un gramo de suelo. En teoría, los inoculantes microbianos, sin intervención humana, tienen una baja tasa de supervivencia y eficacia en su entorno natural del suelo debido a la insuficiencia de unidades formadoras de colonias por gramo de suelo. Por lo tanto, desde la década de 1960, se han desarrollado y comercializado varios biofertilizantes que tienen una mayor concentración de potencial de inóculo de colonias en un intento por reducir la necesidad de fertilizantes químicos.

Además, la investigación realizada en los últimos años ha demostrado que los microorganismos pueden usarse como agentes de control biológico para aumentar la productividad y la eficiencia agrícola. Estos estudios han demostrado que diversos microorganismos pueden suprimir los patógenos de las plantas y/o complementar el crecimiento de las plantas, ofreciendo así una alternativa atractiva a los plaguicidas químicos que son menos favorecidos debido a su impacto potencialmente negativo en la salud humana y la calidad del medio ambiente.

Los microorganismos que pueden colonizar las raíces de las plantas y estimular el crecimiento de las plantas se conocen generalmente como microbios que promueven el crecimiento de las plantas (PGPM). En las últimas dos décadas, se han reportado muchas especies de PGPM que tienen una influencia positiva en el crecimiento de una amplia variedad de plantas de cultivo. Los PGPM a menudo son simbiontes universales de plantas superiores y pueden mejorar el potencial de adaptación de sus huéspedes a través de una serie de mecanismos, como la fijación de nitrógeno molecular, la movilización de nutrientes recalcitrantes del suelo (por ejemplo, hierro, fósforo, azufre), la síntesis de fitohormonas y vitaminas, y la descomposición de materiales vegetales en suelos que a menudo aumentan la materia orgánica del suelo. Además, ciertos microbios pueden facilitar el crecimiento de la planta al controlar las especies microbianas patógenas para la planta (es decir, fitopatógenos). Por ejemplo, algunos microbios beneficiosos pueden controlar la pudrición de la raíz en las plantas al competir con los hongos por el espacio en la superficie de la raíz de la planta. En otros casos, la competencia entre varias cepas microbianas en la microflora nativa de una planta puede estimular el crecimiento de las raíces y aumentar la absorción de nutrientes minerales y agua para mejorar el rendimiento de la planta. Por lo tanto, los biofertilizantes pueden desarrollarse como productos basados en microorganismos que viven naturalmente en el suelo. Al aumentar la población de microorganismos beneficiosos en el suelo a través de la inoculación artificial, estos microorganismos del suelo pueden aumentar su actividad biológica y, por lo tanto, proporcionar a las plantas nutrientes importantes y factores beneficiosos que mejoran su crecimiento.

La inoculación de plantas cultivadas con PGPM se considera generalmente como un enfoque agrícola prometedor, ya que permite controlar las plagas sin utilizar plaguicidas en grandes cantidades. A medida que crecen las preocupaciones ambientales sobre la calidad del agua subterránea con el exceso de fertilizantes y la exposición a plaguicidas en los alimentos, se hacen necesarias alternativas biológicas. Por lo tanto, desarrollar un tratamiento biológico compatible con fertilizantes y plaguicidas o incluso reducir la cantidad de estos compuestos químicos podría ser un avance significativo en la industria agrícola. Se ha establecido que la estimulación del crecimiento de las plantas por PGPM a menudo está estrechamente relacionada con la capacidad de los PGPM para colonizar las raíces de las plantas. Sin embargo, se ha prestado relativamente poca atención al desarrollo de procedimientos de selección eficientes para obtener cepas microbianas con alta capacidad de colonización de raíces. La falta de tales procedimientos de selección ralentiza el estudio de las simbiosis entre plantas y bacterias y el despliegue de PGPM en la agricultura.

Por lo tanto, existe una necesidad continua de identificar nuevos PGPM y/o probar su compatibilidad con los productos de gestión de cultivos existentes disponibles comercialmente. Además, también se necesita investigación adicional para comparar cepas de cultivo puro versus cepas mixtas complementarias de microorganismos que

forman consorcios sinérgicos. Dichos consorcios mixtos podrían tener un mayor potencial para un desempeño consistente con una mejor capacidad competitiva en diferentes condiciones ambientales y de crecimiento.

Sumario de la invención

En la presente memoria se proporcionan cepas y cultivos microbianos. También se proporcionan composiciones microbianas y procedimientos de uso de las mismas para mejorar el crecimiento y/o rendimiento de una planta. También se proporcionan procedimientos para el tratamiento de semillas de plantas mediante el uso de las composiciones microbianas divulgadas en este documento. Además, se proporcionan procedimientos para prevenir, inhibir o tratar el desarrollo de patógenos de plantas o el desarrollo de enfermedades fitopatógenas. La divulgación también proporciona combinaciones de endófitos de plantas que no se producen de forma natural que se pueden obtener infectando artificialmente una planta con una cepa microbiana o un cultivo de la invención. También se proporcionan semillas, tejido reproductivo, tejido vegetativo, tejidos regenerativos, partes de la planta o progenie de las combinaciones de plantas endófitas no naturales, en las que tales semillas, tejido reproductivo, tejido vegetativo, tejidos regenerativos, partes de la planta o progenie de las mismas incluyen la cepa microbiana. La divulgación proporciona además un procedimiento para preparar composiciones agrícolas.

En un aspecto, la presente divulgación proporciona una cepa microbiana aislada de *Pantoea agglomerans* y cultivos enriquecidos de la misma, en la que la cepa microbiana es SGI-003-H11 (depositada como NRRL B-50483). La cepa microbiana puede comprender una secuencia de nucleótidos que exhibe al menos el 99 %, por ejemplo, 99.5 % de identidad de secuencia con la secuencia de nucleótidos ribosómicos 16S de SEQ ID NO: 1. La cepa microbiana también puede tener una actividad promotora del crecimiento de la planta como se describe aquí.

También se proporcionan composiciones microbianas que incluyen una cepa microbiana de la invención o un cultivo de la misma. Dichas composiciones microbianas según algunas realizaciones preferentes pueden comprender una cantidad efectiva en términos agrícolas de un compuesto o composición adicional, en el que el compuesto o composición adicional puede ser un fertilizante, un acaricida, un bactericida, un fungicida, un insecticida, un microbicida, un nematicida o un plaguicida. En algunas otras realizaciones preferentes, las composiciones microbianas pueden incluir además un vehículo. En otras realizaciones preferentes más, el vehículo puede ser una semilla de planta. En ciertas realizaciones de este aspecto, la composición microbiana se prepara como una formulación que puede ser una emulsión, un coloide, un polvo, un gránulo, una pella, un polvo, un aerosol, una emulsión o una solución. En algunas otras realizaciones preferentes, las composiciones microbianas pueden ser formulaciones de recubrimiento de semillas. En otro aspecto más, también se proporcionan semillas de plantas que están recubiertas con una composición microbiana de acuerdo con la presente invención.

En otro aspecto, se proporcionan procedimientos para tratar semillas de plantas. Tales procedimientos incluyen exponer o poner en contacto las semillas de la planta con una cepa microbiana de acuerdo con la presente invención o un cultivo de la misma.

En otro aspecto de la invención, se proporcionan en la presente memoria procedimientos para potenciar el crecimiento y/o rendimiento de una planta. Tal procedimiento implica aplicar una cantidad efectiva de una cepa microbiana de acuerdo con la presente invención o un cultivo de la misma a la planta, o al entorno de la planta. En algunas otras realizaciones, el procedimiento implica cultivar una cepa microbiana de acuerdo con la presente invención o un cultivo del mismo en un medio de crecimiento o suelo de una planta huésped antes o simultáneamente con el crecimiento de la planta huésped en dicho medio de crecimiento o suelo. En realizaciones preferentes, la planta puede ser una planta de maíz o una planta de trigo. En algunas otras realizaciones, la cepa microbiana o el cultivo de la misma pueden establecerse como un endófito en la planta.

En otro aspecto de la presente invención, se proporcionan procedimientos para prevenir, inhibir o tratar el desarrollo de un patógeno vegetal. Dichos procedimientos incluyen cultivar una cepa microbiana según la invención o un cultivo de la misma en un medio de crecimiento o suelo de una planta huésped antes o simultáneamente con el crecimiento de la planta huésped en dicho medio de crecimiento o suelo. En algunas realizaciones preferentes, el patógeno de la planta puede ser un microorganismo del género *Colletotrichum, Fusarium, Gibberella, Monographella, Penicillium* o *Stagnospora*. En algunas realizaciones particularmente preferentes, el patógeno de la planta puede ser *Colletotrichum graminicola, Fusarium graminearum, Gibberella zeae, Monographella nivalis, Penicillium sp.* o *Stagnospora nodurum*.

Otro aspecto adicional de la invención proporciona procedimientos para prevenir, inhibir o tratar el desarrollo de la enfermedad patogénica de una planta. Dichos procedimientos incluyen aplicar a la planta, o al entorno de la planta, una cantidad efectiva de una cepa microbiana según la invención o un cultivo de la misma. En algunas realizaciones preferentes, la cepa microbiana o un cultivo de la misma puede aplicarse al suelo, una semilla, una raíz, una flor, una hoja, una porción de la planta o la planta completa.

Otro aspecto de la invención proporciona procedimientos para preparar una composición agrícola. Dichos procedimientos implican la inoculación de la cepa microbiana de acuerdo con la presente invención o un cultivo de la misma en o sobre un sustrato y permitirle crecer.

La invención proporciona una cepa aislada particular y un cultivo enriquecido de un microorganismo del género *Pantoea*. El microorganismo puede comprender una secuencia de ADN que codifica un gen 16S ARNr que tiene al menos el 99 %, por ejemplo, 99,5 % de identidad de secuencia para una secuencia que codifica el gen 16S ARNr divulgado en SEQ ID NO: 1.

Estos y otros objetos y características de la invención serán más evidentes a partir de la siguiente descripción detallada de la invención y las reivindicaciones.

Descripción detallada de la invención

Bactericida: el término "bactericida", como se usa en la presente memoria, se refiere a la capacidad de una composición o sustancia para aumentar la mortalidad o inhibir la velocidad de crecimiento de las bacterias.

Control biológico: el término "control biológico" y su forma abreviada "biocontrol", como se usa en este documento, se define como el control de un patógeno o insecto o cualquier otro organismo indeseable mediante el uso de al menos un segundo organismo que no sea el hombre. Un ejemplo de los mecanismos conocidos de control biológico es el uso de microorganismos que controlan la pudrición de la raíz por hongos que compiten por el espacio en la superficie de la raíz, o microorganismos que inhiben el crecimiento o matan al patógeno. La "planta huésped" en el contexto del control biológico es la planta que es susceptible a la enfermedad causada por el patógeno. En el contexto del aislamiento de un organismo, como una bacteria o especie fúngica, de su entorno natural, la "planta huésped" es una planta que apoya el crecimiento de la bacteria u hongo, por ejemplo, una planta de una especie, de la cual la bacteria u hongo es endófita.

Una "cantidad efectiva", como se usa en la presente memoria, es una cantidad suficiente para lograr resultados beneficiosos o deseados. Se puede administrar una cantidad efectiva en una o más administraciones. En términos de tratamiento, inhibición o protección, una cantidad efectiva es la cantidad suficiente para mejorar, estabilizar, revertir, retrasar o retardar la progresión de la infección o estados de enfermedad objetivo. La expresión "microorganismo eficaz" usada en la presente memoria en referencia a un microorganismo pretende significar que la cepa en cuestión exhibe un grado de promoción del crecimiento y/o rendimiento de la planta o un grado de inhibición de una enfermedad patogénica que excede, a un nivel estadísticamente significativo, el de un control no tratado. En algunos casos, la expresión "una cantidad efectiva" se usa en la presente memoria en referencia a esa cantidad de tratamiento microbiano que es necesaria para obtener un resultado beneficioso o deseado en relación con el que ocurre en un control no tratado en condiciones adecuadas de tratamiento como se describe en la presente memoria. Para el propósito de la presente divulgación, la tasa real de aplicación de una formulación líquida generalmente variará de un mínimo de 1×10^3 a 1×10^{10} células viables/ml y preferiblemente de 1×10^6 a 5×10^9 células viables/ml. En la mayoría de las condiciones, las cepas de la invención descritas en los siguientes ejemplos serían óptimamente efectivas a tasas de aplicación en el intervalo de 1×10^6 a 1×10^9 células viables/ml, suponiendo un modo de aplicación que lograría un contacto sustancialmente uniforme de menos alrededor del 50 % de los tejidos vegetales. Si los microorganismos se aplican como una formulación sólida, la velocidad de aplicación debe controlarse para dar como resultado un número comparable de células viables por unidad de área de superficie del tejido vegetal, tal como se obtiene mediante las velocidades de tratamiento líquido mencionadas anteriormente. Típicamente, las composiciones microbianas de la presente invención son biológicamente efectivas cuando se administran a una concentración superior a 10^6 UFC/g (unidades formadoras de colonias por gramo), preferiblemente superior a 10^7 UFC/g, más preferiblemente 10^8 UFC/g, y la mayoría preferiblemente a 10^9 UFC/g.

Composición: Una "composición" pretende significar una combinación de agente activo y al menos otro compuesto, vehículo o composición, que puede ser inerte (por ejemplo, un agente o marcador detectable o vehículo líquido) o ingrediente activo, tal como un fertilizante.

Una "planta de control", como se usa en la presente divulgación, proporciona un punto de referencia para medir cambios en el fenotipo de la planta en cuestión, puede ser cualquier célula vegetal, semilla, componente vegetal, tejido vegetal, órgano vegetal o planta completa. Una planta de control puede comprender, por ejemplo, (a) una planta o célula de tipo salvaje, es decir, del mismo genotipo que el material de partida para la alteración genética que resultó en la planta o célula en cuestión; (b) una planta o célula del genotipo como material de partida pero que se ha transformado con una construcción nula (es decir, una construcción que no tiene ningún efecto conocido sobre el rasgo de interés, tal como una construcción que comprende un gen indicador); (c) una planta o célula que es un segregante no transformado entre la progenie de una planta o célula en cuestión; (d) una planta o célula que es genéticamente idéntica a la planta o célula en cuestión pero que no está expuesta al mismo tratamiento (por ejemplo, tratamiento con fertilizantes) que la planta o célula en cuestión; (e) la planta o célula en cuestión, en condiciones en las que el gen de interés no se expresa; o (f) la planta o célula en cuestión, en condiciones en las que no ha sido expuesta a un tratamiento particular, como, por ejemplo, un fertilizante o una combinación de fertilizantes y/u otros productos químicos.

Cultivo, cultivo aislado, cultivo biológicamente puro y cultivo enriquecido: como se usa en la presente memoria, una cepa aislada de un microbio es una cepa que se ha retirado de su medio natural. Como tal, el término "aislado" no refleja necesariamente el grado en que el microbio ha sido purificado. Pero en diferentes realizaciones, un cultivo "aislado" se ha purificado al menos 2x o 5x o 10x o 50x o 100x de la materia prima de la que está aislado. Como

ejemplo, si un cultivo se aísla del suelo como materia prima, el organismo puede aislarse hasta el punto de que su concentración en una cantidad dada de material purificado o parcialmente purificado (por ejemplo, suelo) es al menos 2x o 5x o 10x o 50x o 100x que en la materia prima original. Un "cultivo sustancialmente puro" de la cepa de microbio se refiere a un cultivo que no contiene sustancialmente otros microbios que la cepa o cepas de microbio deseadas. En otras palabras, un cultivo sustancialmente puro de una cepa de microbio está sustancialmente libre de otros contaminantes, que pueden incluir contaminantes microbianos, así como contaminantes químicos indeseables. Además, como se usa en la presente memoria, una cepa "biológicamente pura" pretende significar la cepa separada de los materiales con los que normalmente está asociada en la naturaleza. Nótese que una cepa asociada con otras cepas, o con compuestos o materiales con los que normalmente no se encuentra en la naturaleza, todavía se define como "biológicamente pura". Un monocultivo de una cepa particular es, por supuesto, "biológicamente puro". En diferentes realizaciones, un cultivo "biológicamente puro" se ha purificado al menos 2x o 5x o 10x o 50x o 100x del material con el que normalmente está asociado en la naturaleza. Como ejemplo, si un cultivo se asocia normalmente con el suelo en la naturaleza, el organismo puede ser biológicamente puro en la medida en que su concentración en una cantidad dada de material purificado o parcialmente purificado con el que normalmente se asocia en la naturaleza (por ejemplo, el suelo) es al menos 2x o 5x o 10x o 50x o 100x que en el material original sin purificar. Como se usa en la presente memoria, el término "cultivo enriquecido" de una cepa microbiana aislada se refiere a un cultivo microbiano en el que la población microbiana total del cultivo contiene más del 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o 95 % de la cepa aislada.

Cultivo: El término "cultivo", como se usa en la presente memoria, se refiere a la propagación de organismos sobre o en medios de diversos tipos.

Como se usa en la presente memoria, un "endófito" es un endosimbionte que vive dentro de una planta durante al menos parte de su vida sin causar una enfermedad aparente. Los endófitos se pueden transmitir verticalmente (directamente de progenitores a hijos) u horizontalmente (de individuo a individuo no relacionado). Los endófitos fúngicos de transmisión vertical son típicamente asexuales y se transmiten de la planta materna a la descendencia a través de hifas fúngicas que penetran en las semillas del huésped. Los endófitos bacterianos también se pueden transferir verticalmente de semillas a plántulas (Ferreira et al., FEMS Microbiol. Lett. 287: 8-14, 2008). Por el contrario, los endófitos transmitidos horizontalmente son típicamente sexuales y se transmiten a través de esporas que pueden ser propagadas por el viento y/o insectos vectores. Los endófitos microbianos de las plantas de cultivo han recibido considerable atención con respecto a su capacidad para controlar enfermedades e infestaciones de insectos, así como su potencial para promover el crecimiento de las plantas.

Patógeno fúngico: Para los fines de esta invención, se entiende que el uso del término patógeno fúngico u hongo está destinado a incluir tanto la etapa sexual (teleomórfica) de este organismo como también la etapa asexual (anamórfica), también denominadas etapas fúngicas perfectas e imperfectas, respectivamente. Por ejemplo, la etapa anamórfica de *Fusarium graminearum* es *Gibberella zeae*.

Fungicida: Como se usa en la presente memoria, "fungicida" se refiere a la capacidad de una composición o sustancia para disminuir la velocidad de crecimiento de hongos o para aumentar la mortalidad de los hongos.

Mutante: Como se usa en la presente memoria, el término "mutante" o "variante" en referencia a un microorganismo se refiere a una modificación de la cepa parental en la que la actividad biológica deseada es similar a la expresada por la cepa parental. Por ejemplo, en el caso de *Burkholderia*, la "cepa parental" se define aquí como la cepa original de *Burkholderia* antes de la mutagénesis. Los mutantes o variantes pueden ocurrir en la naturaleza sin la intervención del hombre. También se pueden obtener mediante tratamiento con o mediante una variedad de procedimientos y composiciones conocidos por los expertos en la materia. Por ejemplo, una cepa parental puede tratarse con una sustancia química como N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina, etilmetanosulfona, o mediante irradiación con rayos gamma, rayos X o radiación UV.

Nematicida: El término "nematicida", como se usa en la presente memoria, se refiere a la capacidad de una sustancia o composición para aumentar la mortalidad o inhibir la velocidad de crecimiento de los nematodos.

Patógeno: El término "patógeno", como se usa en la presente memoria, se refiere a un organismo tal como un alga, un arácnido, una bacteria, un hongo, un insecto, un nematodo, una planta parásita, un protozoo, una levadura o un virus capaz de producir una enfermedad en una planta o animal. El término "fitopatógeno" como se usa en la presente memoria se refiere a un organismo patógeno que infecta una planta.

Porcentaje de identidad de secuencia: El "porcentaje de identidad de secuencia", como se usa en este documento, se determina comparando dos secuencias alineadas localmente óptimamente sobre una ventana de comparación definida por la longitud de la alineación local entre las dos secuencias. La secuencia de aminoácidos en la ventana de comparación puede comprender adiciones o eliminaciones (por ejemplo, huecos o salientes) en comparación con la secuencia de referencia (que no comprende adiciones o eliminaciones) para la alineación óptima de las dos secuencias. La alineación local entre dos secuencias solo incluye segmentos de cada secuencia que se consideran suficientemente similares de acuerdo con un criterio que depende del algoritmo utilizado para realizar la alineación (por ejemplo, BLAST). El porcentaje de identidad de secuencia se calcula determinando el número de posiciones en las que se produce una base de ácido nucleico o residuo de aminoácido idéntico en ambas secuencias para producir

el número de posiciones coincidentes, dividiendo el número de posiciones coincidentes por el número total de posiciones en la ventana de comparación y multiplicando el resultado por 100. El algoritmo de homología local de Smith and Waterman (1981) Add. APL. Math. 2:482 puede realizar la alineación óptima de las secuencias para la comparación, mediante el algoritmo de alineación de homología global de Needleman and Wunsch (J Mol. Biol. 48: 443, 1970), mediante la búsqueda del procedimiento de similitud de Pearson and Lipman (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 2444, 1988), mediante implementaciones heurísticas de estos algoritmos (NCBI BLAST, WU-BLAST, BLAT, SIM, BLASTZ), o mediante inspección. Dado que se han identificado dos secuencias para comparación, GAP y BESTFIT se emplean preferiblemente para determinar su alineación óptima. Por lo general, se utilizan los valores predeterminados de 5,00 para el peso de la brecha y 0,30 para la longitud del peso de la brecha. La expresión "identidad de secuencia sustancial" entre las secuencias de polinucleótidos o polipéptidos se refiere a polinucleótidos o polipéptidos que comprenden una secuencia que tiene al menos 50 % de identidad de secuencia, preferiblemente al menos 70 %, preferiblemente al menos 80 %, más preferiblemente al menos 85 %, más preferiblemente al menos 90 %, incluso más preferiblemente al menos 95 %, y lo más preferiblemente al menos 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia en comparación con una secuencia de referencia que usa los programas. Además, la homología de secuencia por pares o la similitud de secuencia, como se usa, se refiere al porcentaje de residuos que son similares entre dos secuencias alineadas. Las familias de residuos de aminoácidos que tienen cadenas laterales similares se han definido bien en la técnica. Estas familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares sin carga (por ejemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadenas laterales no polares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano), cadenas laterales ramificadas beta (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina).

Las secuencias de aminoácidos y ácidos nucleicos de consulta se pueden buscar en secuencias de aminoácidos o ácidos nucleicos sujetos que residen en bases de datos públicas o privadas. Dichas búsquedas pueden realizarse utilizando el programa National Center for Biotechnology Information Basic Local Alignment Search Tool (NCBI BLAST v 2.18). El programa NCBI BLAST está disponible en Internet en el National Center for Biotechnology Information (blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi). Por lo general, se pueden usar los siguientes parámetros para NCBI BLAST: Opciones de filtro establecidas en "predeterminado", la Matriz de comparación establecida en "BLOSUM62", los Costes de separación establecidos en "Existencia: 11, Extensión: 1", el Tamaño de palabra establecido en 3, la Expectativa (umbral E) establecida en 1e-3, y la longitud mínima de la alineación local establecida en 50 % de la longitud de la secuencia de consulta. La identidad y similitud de secuencia también se puede determinar utilizando el software GenomeQuest™ (Gene-IT, Worcester Mass. Estados Unidos).

El término "plaga" como se usa en la presente memoria se refiere a un organismo no deseado que puede incluir bacterias, hongos, plantas (por ejemplo, malezas), nematodos, insectos y otros animales patógenos. "Plaguicida", como se usa en la presente memoria, se refiere a la capacidad de una sustancia o composición para disminuir la velocidad de crecimiento de una plaga, es decir, un organismo no deseado, o para aumentar la mortalidad de una plaga.

Progenie: Como se usa en la presente memoria, "progenie" incluye descendientes de una planta o línea de planta particular. La progenie de una planta instantánea incluye semillas formadas en F_1, F_2, F_3, F_4, F_5, F_6 y plantas de generación posterior, o semillas formadas en BC_1, BC_2, BC_3 y plantas de generación posterior, o semillas formadas en F_1BC_1, F_1BC_2, F_1BC_3, y plantas de generación posterior. La designación F_1 se refiere a la progenie de un cruce entre dos progenitores que son genéticamente distintos. Las designaciones F_2, F_3, F_4, F_5 y F_6 se refieren a las generaciones posteriores de progenie polinizadas por sib o autopolinizadas a partir de una planta F_1.

Variante: como se usa en la presente memoria en referencia a un ácido nucleico y polipéptido, el término "variante" se usa en la presente memoria para denotar una molécula de polipéptido, proteína o polinucleótido con algunas diferencias, generadas sintéticamente o de forma natural, en sus secuencias de aminoácidos o ácidos nucleicos en comparación con un polipéptido o polinucleótido de referencia, respectivamente. Por ejemplo, estas diferencias incluyen sustituciones, inserciones, eliminaciones o cualquier combinación deseada de dichos cambios en un polipéptido o polinucleótido de referencia. Las variantes de polipéptidos y proteínas pueden consistir además en cambios en la carga y/o modificaciones postraducción (tales como glucosilación, metilación o fosforilación).

El término "variante", cuando se usa aquí en referencia a un microorganismo, es una cepa microbiana que tiene características de identificación de la especie a la que pertenece, mientras que tiene al menos una variación de secuencia de nucleótidos o un rasgo identificablemente diferente con respecto a la cepa parental, donde el rasgo tiene una base genética (heredable). Por ejemplo, para una cepa de *Bacillus thuringiensis* 020_A01 que tiene una actividad promotora del crecimiento de las plantas, los rasgos identificables incluyen 1) la capacidad de suprimir el desarrollo de fitopatógenos fúngicos, incluyendo *Fusarium graminearum, Gibberella zeae, Stagnospora nodurum, Colletotrichum graminicola*; 2) la capacidad de mejorar el rendimiento de semillas en trigo; y 3) tener un gen de ARNr 16S con secuencia de nucleótidos con una identidad de secuencia mayor que 95 %, mayor que 96 %, mayor que 97 %, mayor que 98 % o mayor que 99 % con el gen 16S ARNr de *Bacillus thuringiensis* 020_A01; se puede usar para confirmar una variante como *Bacillus thuringiensis* 020_A01.

Rendimiento: Como se usa en la presente memoria, el término "rendimiento" se refiere a la cantidad de material vegetal cosechable o producto derivado de la planta, y normalmente se define como el producto medible de valor económico de un cultivo. Para las plantas de cultivo, "rendimiento" también significa la cantidad de material cosechado por acre o unidad de producción. El rendimiento puede definirse en términos de cantidad o calidad. El material cosechado puede variar de un cultivo a otro, por ejemplo, puede ser semillas, biomasa aérea, raíces, frutas, fibras de algodón, cualquier otra parte de la planta o cualquier producto derivado de la planta que sea de valor económico. El término "rendimiento" también abarca el potencial de rendimiento, que es el rendimiento máximo obtenible. El rendimiento puede depender de varios componentes de rendimiento, que pueden controlarse mediante ciertos parámetros. Estos parámetros son bien conocidos por los expertos en la materia y varían de un cultivo a otro. El término "rendimiento" también abarca el índice de cosecha, que es la relación entre la biomasa cosechada sobre la cantidad total de biomasa.

La discusión de los procedimientos generales dados aquí tiene fines ilustrativos.

Microorganismos que promueven el crecimiento de las plantas

Diversos microorganismos asociados a plantas pueden impactar positivamente en la salud y fisiología de las plantas en una variedad de formas. Estos microbios beneficiosos generalmente se denominan microorganismos que promueven el crecimiento de las plantas (PGPM). La expresión "actividad promotora del crecimiento de las plantas", como se usa en la presente memoria, abarca una amplia gama de propiedades mejoradas de las plantas, que incluyen, por ejemplo, una mejor fijación de nitrógeno, un mejor desarrollo de las raíces, una mayor área de las hojas, un mayor rendimiento de las plantas, una mayor germinación de semillas, una mayor fotosíntesis, o un aumento en la biomasa acumulada de la planta. La mejora puede ser un aumento de al menos un 10 % o un aumento de al menos un 25 % o un aumento de al menos un 50 % o un aumento de al menos un 75 % o un aumento de al menos un 100 % en la propiedad que se está midiendo. Por lo tanto, como ejemplos, los microbios pueden producir un aumento porcentual indicado anteriormente en la fijación de nitrógeno, o un aumento indicado anteriormente en el peso total de la raíz, o en el área de la hoja o en el rendimiento del producto vegetal (por ejemplo, un aumento porcentual indicado anteriormente en el peso del producto vegetal) , o un mayor porcentaje de semillas que germinan en 10 días o 14 días o 30 días, o la tasa de fotosíntesis (por ejemplo, determinada por el consumo de CO_2) o la biomasa acumulada de la planta (por ejemplo, determinada por el peso de la planta). El producto vegetal es el artículo, generalmente pero no necesariamente, un artículo alimenticio producido por la planta. El rendimiento puede determinarse utilizando cualquier procedimiento conveniente, por ejemplo, fanegas o libras de producto vegetal producido por acre de plantación. Hasta la fecha, se ha informado que cepas aisladas de más de dos docenas de géneros de microorganismos tienen actividad promotora del crecimiento de las plantas y/o actividad de biocontrol, y todavía se están descubriendo nuevos géneros y especies con actividades similares. Además, dentro de algunos géneros bacterianos, se han identificado múltiples especies y subespecies de agentes de biocontrol y se pueden encontrar en múltiples escalas espaciales, desde el nivel global hasta el nivel de granja, e incluso en plantas individuales. Además, se ha informado que algunos aislamientos microbianos individuales pueden mostrar biocontrol y/o actividad promotora del crecimiento de las plantas no solo en las plantas o cultivos de los que se obtuvieron sino también en otros cultivos. Esto indica la naturaleza generalista de algunos genotipos, especialmente aquellos con una amplia distribución geográfica. Como se discutió anteriormente, si se introduce en cantidades suficientes y se activa durante una duración suficiente, una sola población microbiana puede tener un impacto significativo en la salud de las plantas.

Se han postulado varios mecanismos para proporcionar una explicación del impacto positivo de los PGPM en la mejora del crecimiento de las plantas. Los efectos beneficiosos de los microorganismos en el crecimiento de las plantas pueden ser directos o indirectos.

La expresión "microorganismo promotor directo del crecimiento de la planta", para el propósito de la presente divulgación, se refiere a un microorganismo que puede mejorar el crecimiento de la planta en ausencia de patógenos. Como se analiza con más detalle a continuación, ejemplos de promoción directa del crecimiento de las plantas incluyen (a) biofertilización, (b) estimulación del crecimiento de la raíz, (c) rizorremediación y (d) control del estrés de la planta. Además, se ha informado de varios PGPM que promueven el crecimiento de las plantas indirectamente a través de mecanismos de control biológico, es decir, al reducir el nivel de enfermedad, por ejemplo, la antibiosis, la inducción de resistencia sistémica y la competencia con los patógenos por nutrientes y nichos.

Biofertilizantes: Los fertilizantes microbianos suministran nutrientes a la planta y, por lo tanto, pueden promover el crecimiento de la planta en ausencia de presión del patógeno. Los ejemplos de aislamientos microbianos que pueden promover directamente el crecimiento y/o rendimiento de las plantas incluyen las bacterias *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* que fijan N_2 y que, mediante la fijación simbiótica de nitrógeno, pueden formar nódulos en las raíces de las plantas leguminosas, en las que convierten el N_2 atmosférico en amoníaco que, a diferencia del N_2 atmosférico, puede ser utilizado por la planta como fuente de nitrógeno. Otros ejemplos incluyen las especies de Azospirillum, que son fijadores de N_2 de vida libre que pueden fertilizar y aumentar el rendimiento de los cultivos de cereales como el trigo, el sorgo y el maíz. A pesar de la capacidad de fijación de N_2 de *Azospirillum*, el aumento del rendimiento causado por la inoculación de *Azospirillum* a menudo se atribuye a un mayor desarrollo de la raíz y, por lo tanto, a mayores tasas de absorción de agua y minerales. A este respecto, se ha informado que varias rizobacterias como *Azotobacter* spp. son capaces de producir una amplia gama de fitohormonas (por ejemplo,

auxinas, citoquininas) y enzimas (por ejemplo, pectinasa). Se ha demostrado que muchas de estas fitohormonas y enzimas están íntimamente involucradas en el proceso de infección de las asociaciones simbióticas de bacterias y plantas que tienen una influencia reguladora en la nodulación de *Rhizobium*.

En muchos casos, los PGPM también pueden afectar el crecimiento y desarrollo de la planta al modificar la absorción de nutrientes. Pueden alterar las tasas de absorción de nutrientes, por ejemplo, por efectos directos en las raíces, por efectos en el medio ambiente que a su vez modifican el comportamiento de las raíces y compitiendo directamente por los nutrientes (Gaskin et al., Agricult. Ecosyst. Environ. 12: 99-116, 1985). Algunos factores por los cuales los PGPM pueden desempeñar un papel en la modificación de la eficiencia del uso de nutrientes en los suelos incluyen, por ejemplo, la geometría de la raíz, la solubilidad de los nutrientes, la disponibilidad de nutrientes mediante la producción de forma de iones congénitos de la planta, la división de los nutrientes en la planta y la eficiencia de la utilización. Por ejemplo, un bajo nivel de fosfato soluble puede limitar el crecimiento de las plantas. Algunos microbios que promueven el crecimiento de las plantas son capaces de solubilizar fosfato de fosfatos unidos orgánicos o inorgánicos, lo que facilita el crecimiento de las plantas. Varias enzimas de origen microbiano, como las fosfatasas inespecíficas, las fitasas, las fosfonatasas y las C-P liasa, liberan fósforo soluble de los compuestos orgánicos en el suelo. Por ejemplo, se ha descubierto que una mayor solubilización de fósforo inorgánico en el suelo mejora la absorción de fósforo en las plántulas de canola usando Pseudomonas putida, así como una mayor oxidación de azufre y absorción de azufre (Grayston and Germida, Can. J. Microbiol. 37: 521-529, 1991; Banerjee, Phytochemicals and Health, vol. 15, 18 de mayo, 1995).

Fitoestimuladores: Algunos microorganismos pueden producir sustancias que estimulan el crecimiento de la planta en ausencia de patógenos. Por ejemplo, la producción de hormonas vegetales es una característica de muchos microorganismos asociados a plantas. Para las cinco fitohormonas clásicas, es decir, auxina, etileno, ácido abscísico, citoquinina y giberelina, la síntesis como metabolito secundario se ha demostrado para al menos una especie bacteriana y/o fúngica (para revisión, ver, por ejemplo, Kim et al., Appl. Environ. Microbiol., Vol. 77, 5: 1548-1555, 2011). Algunos microorganismos también pueden producir metabolitos secundarios que afectan la producción de fitohormonas en las plantas. Probablemente, el ejemplo más conocido es la hormona auxina, que puede promover el crecimiento de la raíz. Otros ejemplos incluyen pseudomonas de las que se ha informado que producen ácido indolacético (IAA) y aumentan las cantidades de IAA en las plantas, lo que tiene un profundo impacto en la producción de biomasa vegetal (Brown, Annual Rev. Phytopathology, 68: 181-197, 1974) Por ejemplo, Tien et al. (Applied Environmental Microbiol., 37: 1016-1024, 1979) informaron que la inoculación de soluciones nutritivas alrededor de las raíces de mijo perla con *Azospirillum brasiliense* resultó en un aumento del peso de los brotes y raíces, un mayor número de raíces laterales y todas las raíces laterales estaban densamente cubiertas con pelos radiculares. Las plantas que recibieron combinaciones de IAA, giberelinas y cinetina mostraron un aumento en la producción de raíces laterales similar a la causada por *Azospirilla*. Aunque el significado biológico de estas fitohormonas y materiales similares a las hormonas vegetales no se comprende completamente, la actividad estimuladora del crecimiento de estos microorganismos se atribuye comúnmente a su producción de estos materiales.

Además, otras hormonas, así como ciertos compuestos orgánicos volátiles (VOC) y el cofactor pirrolquinolina quinona (PQQ) también estimulan el crecimiento de las plantas. Por ejemplo, algunas rizobacterias, como las cepas de las especies bacterianas *B. subtilis, B. amyloliquefaciens* y *Enterobacter cloacae*, promueven el crecimiento de las plantas mediante la liberación de VOC. El nivel más alto de promoción del crecimiento se ha observado con 2,3-butanodiol y 3-hidroxi-2-butanona (también conocido como acetoína) como inductores de resistencia sistémica inducida. El cofactor PQQ ha sido descrito como un promotor del crecimiento de las plantas, que actúa como antioxidante en las plantas. Algunos informes sugieren que el efecto puede ser indirecto porque PQQ es un cofactor de varias enzimas, por ejemplo, involucradas en la actividad antifúngica y la inducción de resistencia sistémica.

Controladores de estrés: Los microorganismos que promueven el crecimiento de las plantas que contienen la enzima ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) desaminasa facilitan el crecimiento y el desarrollo de las plantas al disminuir los niveles de etileno de las plantas. Dichos microorganismos toman el precursor de etileno ACC y lo convierten en 2-oxobutanoato y NH_3. Se han reportado varios tipos de estrés aliviados por productores de ACC desaminasa, como, por ejemplo, el estrés por efectos de bacterias fitopatógenas, el estrés por hidrocarburos poliaromáticos, el estrés por metales pesados como Cd^{2+} y Ni^{2+}, y el estrés por sal y sequía.

Además, se ha informado que varias cepas de PGPM que indujeron aumentos en el rendimiento de la patata producen sideróforos extracelulares que se unen a Fe^{3+}, haciéndolo menos disponible para cierto miembro de la microflora natural (Kloepper et al., Nature 286: 885-886, 1980). Estas rizobacterias excretan cofactores microbianos quelantes férricos de bajo peso molecular y alta afinidad que mejoran específicamente su adquisición de hierro al unirse a los receptores de sideróforos unidos a la membrana. Uno de los sideróforos producidos por algunos PGPM de pseudomona se conoce como pseudobactina que inhibe el crecimiento de *Erwinia cartovora* (organismo causal de la podredumbre blanda de la patata) (ver, por ejemplo, Kloepper et al., Current Microbiol. 4: 317-320, 1980) La adición de pseudobactina al medio de crecimiento inhibió la infección por podredumbre blanda y también redujo el número de hongos patógenos en la planta de patata junto con un aumento significativo en el rendimiento de la patata. La mayor parte de la evidencia para apoyar la teoría del control biológico de sideróforos por PGPM proviene del trabajo con las pioverdinas, una clase de sideóforos que comprende los pigmentos fluorescentes de pseudomonas fluorescentes [Demange et al., en Iron Transport in Microbes, Plants and Animals (Winkleman et al.,

eds.), págs. 167-187, 1987]. Según la teoría del sideróforo, las pioverdinas demuestran cierta especificidad de cepa funcional que se debe al reconocimiento selectivo de los receptores de sideróforo de la membrana externa (Bakker et al., Soil Biology and Biochemistry 19: 443-450, 1989).

Cultivos aislados

Como se describe con más detalle en la sección de Ejemplos de la presente divulgación, los solicitantes han descubierto varios microorganismos que son promotores efectivos del crecimiento y rendimiento de la planta. En muchos casos, los microorganismos aislados también son efectivos para suprimir el desarrollo de varias enfermedades fitopatógenas. Los aislamientos microbianos se seleccionaron de un grupo de aproximadamente 5.000 cepas microbianas obtenidas de muestras ambientales recolectadas de varias ubicaciones en todo Estados Unidos. La selección inicial de los microorganismos se basó en la capacidad de los microorganismos para colonizar las raíces de las plantas y producir compuestos químicos y enzimas que se consideran importantes para su interacción con las plantas. Los microorganismos también se sometieron a bioensayos por su capacidad para suprimir el desarrollo de diversos fitopatógenos fúngicos en un ensayo de antagonismo in vitro. Los microorganismos microbianos seleccionados se sometieron a bioensayos en estudios de invernadero en variedades comerciales de trigo y maíz para determinar la capacidad de las cepas microbianas para promover el crecimiento de las plantas y su capacidad para preservar el potencial de rendimiento de las semillas.

El análisis taxonómico determinó además que los microorganismos representativos descritos en la presente divulgación están estrechamente relacionados con los géneros bacterianos *Bacillus*, *Burkholderia*, *Herbaspirillum*, *Pantoea* y *Pedobacter*.

Depósito de material biológico

Los cultivos purificados de cepas microbianas descritas en la presente divulgación se depositaron en la Agricultural Research Service Culture Collection ubicada en 1815 N. University Street, Peoria, IL 61604, Estados Unidos (NRRL) de conformidad con el Tratado de Budapest a los fines del procedimiento de patentes y sus reglamentos (Tratado de Budapest). Los números de acceso para estos depósitos son los siguientes:

Tabla 1: Aislamientos microbianos y números de acceso correspondientes

Identificación de la cepa	Números de acceso	Taxonomía Provisional
SGI-003-H11	NRRL B-50483	*Pantoea agglomerans* 003_H11
SGI-020-A01	NRRL B-50484	*Bacillus thuringiensis* 020_A01
SGI-026-G06	NRRL B-50485	*Burkholderia metallica* 026_G06
SGI -026-G07	NRRL B-50486	*Burkholderia vietnamiensis* 026_G07

Las cepas microbianas se han depositado en condiciones que aseguran que el acceso al cultivo estará disponible durante la tramitación de esta solicitud de patente a una determinada por el Commissioner of Patents and Trademarks a lo cual tiene derecho bajo 37 C.F.R. §1.14 y 35 U.S.C. §122. Los depósitos representan cultivos sustancialmente puros de las cepas depositadas.

Los microorganismos preferidos tienen todas las características de identificación de las cepas depositadas y, en particular, las características de identificación de poder promover el crecimiento y/o rendimiento de la planta como se describe en este documento, y las características de identificación como capaces de suprimir el desarrollo de fitopatógeno fúngico como se describe en la presente memoria. En particular, los microorganismos preferidos se refieren a los microorganismos depositados como se describe anteriormente, y las cepas derivadas de los mismos.

Composiciones microbiológicas

Las composiciones microbiológicas de la presente invención que comprenden cepas microbianas aisladas o cultivos de las mismas pueden estar en una variedad de formas, que incluyen cultivos inmóviles, cultivos completos, reservas almacenadas de células, micelio y/o hifas (particularmente reservas de glicerol), bandas de agar, tapones de agar almacenados en glicerol/agua, caldos liofilizados y caldos secos como liofilizado o micelios secados sobre papel de filtro o semillas de grano. Como se define en otra parte dla presente memoria, "cultivo aislado" o equivalentes gramaticales como se usa en la presente divulgación y en la técnica se entiende que significa que el cultivo referido es un fluido de cultivo, gránulo, raspado, muestra seca, liofilizado o sección (por ejemplo, hifas o micelios); o un soporte, recipiente o medio tal como una placa, papel, filtro, matriz, paja, pipeta o punta de pipeta, fibra, aguja, gel, hisopo, tubo, vial o partícula que contenga un solo tipo de organismo. Un cultivo aislado de un antagonista microbiano puede ser un fluido de cultivo o un raspado, pella, preparación seca, liofilizado o sección del microorganismo, o un soporte, recipiente o medio que contenga el microorganismo, en ausencia de otros organismos.

La presente divulgación proporciona además composiciones que contienen al menos una cepa microbiana aislada o cultivos de la misma de la presente invención y un vehículo. El vehículo puede ser uno o más de varios vehículos que confieren una variedad de propiedades, tales como mayor estabilidad, humectabilidad o dispersabilidad. Se pueden incluir agentes humectantes tales como tensioactivos naturales o sintéticos, que pueden ser tensioactivos no iónicos o iónicos, o una combinación de los mismos, en una composición de la invención. También se pueden usar emulsiones de agua en aceite para formular una composición que incluye al menos un microorganismo aislado de la presente invención (véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos 7,485,451). Las formulaciones adecuadas que pueden prepararse incluyen polvos humectables, gránulos, geles, bandas de agar o gránulos, espesantes, partículas microencapsuladas, líquidos tales como fluidos acuosos, suspensiones acuosas y emulsiones de agua en aceite. La formulación puede incluir productos de granos o legumbres (por ejemplo, granos o judías molidos, caldo o harina derivados de granos o judías), almidón, azúcar o aceite. El vehículo puede ser un vehículo agrícola. En ciertas realizaciones preferentes, el vehículo es una semilla, y la composición puede aplicarse o disponerse como recubrimiento sobre la semilla o dejar que la semilla se sature.

El vehículo agrícola puede ser suelo o medio de crecimiento de plantas. Otros vehículos agrícolas que pueden usarse incluyen agua, fertilizantes, aceites de origen vegetal, humectantes o combinaciones de los mismos. Alternativamente, el vehículo agrícola puede ser un sólido, como tierra de diatomeas, marga, sílice, alginato, arcilla, bentonita, vermiculita, cajas de semillas, otros productos vegetales y animales, o combinaciones, incluidos gránulos, gránulos o suspensiones. Las mezclas de cualquiera de los ingredientes antes mencionados también se contemplan como vehículos, como *pesta* (harina y arcilla de caolín), agar o gránulos a base de harina en marga, arena o arcilla. Las formulaciones pueden incluir fuentes de alimentos para los organismos cultivados, como cebada, arroz u otros materiales biológicos como semillas, partes de plantas, bagazo de caña de azúcar, cascos o tallos del procesamiento de granos, material vegetal molido ("desechos de jardín") o madera de desechos de obra, aserrín o fibras pequeñas del reciclaje de papel, tela o madera. Los expertos en la materia conocerán otras formulaciones adecuadas.

En forma líquida, por ejemplo, soluciones o suspensiones, los microorganismos de la presente invención pueden mezclarse o suspenderse en agua o en soluciones acuosas. Los diluyentes o vehículos líquidos adecuados incluyen agua, soluciones acuosas, destilados de petróleo u otros vehículos líquidos.

Las composiciones sólidas se pueden preparar dispersando los microorganismos de la invención en un vehículo sólido adecuadamente dividido, como turba, trigo, salvado, vermiculita, arcilla, talco, bentonita, tierra de diatomeas, tierra de Fuller o tierra pasteurizada. Cuando tales formulaciones se usan como polvos humectables, se pueden usar agentes dispersantes biológicamente compatibles tales como agentes dispersantes y emulsionantes no iónicos, aniónicos, anfóteros o catiónicos.

Las composiciones contempladas en la presente memoria pueden mejorar el crecimiento y el rendimiento de plantas de cultivo, tales como trigo, cebada, avena y maíz y, cuando se usan en cantidades suficientes, actuar como fertilizante microbiano. Estas composiciones, de manera similar a otros agentes biofertilizantes, pueden tener un alto margen de seguridad porque típicamente no queman ni dañan la planta.

Como se describe con gran detalle a lo largo de la presente divulgación, la mejora del crecimiento y el rendimiento de la planta puede realizarse mediante la aplicación de una o más de las composiciones microbiológicas divulgadas a una planta huésped o partes de la planta huésped. Las composiciones se pueden aplicar en una cantidad efectiva para mejorar el crecimiento o rendimiento de la planta en relación con ello en un control no tratado. Los componentes activos se usan en una concentración suficiente para mejorar el crecimiento de la planta objetivo cuando se aplica a la planta. Como será evidente para una persona experta en la técnica, las concentraciones efectivas pueden variar dependiendo de diversos factores tales como, por ejemplo, (a) el tipo de planta o producto agrícola; (b) la condición fisiológica de la planta o producto agrícola; (c) la concentración de patógenos que afectan la planta o el producto agrícola; (d) el tipo de lesión por enfermedad en la planta o producto agrícola; (e) condiciones climáticas (por ejemplo, temperatura, humedad); y (f) la etapa de la enfermedad de las plantas. Las concentraciones típicas son aquellas superiores a 1×10^2 UFC/ml de vehículo. Las concentraciones preferidas varían de 1×10^4 a 1×10^9 UFC/ml, como las concentraciones que varían de 1×10^6 a 1×10^8 UFC/ml. Las concentraciones más preferidas son las de 37,5 a 150 mg de masa bacteriana seca por mililitro de vehículo (composición líquida) o por gramo de vehículo (formulación seca).

La cantidad de uno o más de los microorganismos en las composiciones puede variar dependiendo de la formulación final, así como del tamaño o tipo de la planta o semilla utilizada. Preferiblemente, el uno o más microorganismos en las composiciones están presentes en 2 % p/p a 80 % p/p de la formulación completa. Más preferiblemente, el uno o más microorganismos empleados en las composiciones es de 5 % p/p a 65 % p/p y lo más preferiblemente de 10 % p/p a 60 % p/p en peso de la formulación completa.

Como apreciarán los expertos en la materia, las composiciones microbiológicas de la invención pueden aplicarse a la planta objetivo usando una variedad de procedimientos convencionales tales como espolvorear, revestir, inyectar, frotar, rodar, sumergir, pulverizar, o cepillar, o cualquier otra técnica apropiada que no dañe significativamente la planta objetivo por tratar. Los procedimientos particularmente preferidos incluyen la inoculación del medio de

crecimiento o del suelo con suspensiones de células microbianas y el recubrimiento de semillas de plantas con células y/o esporas microbianas.

Típicamente, las composiciones de la invención son químicamente inertes; por lo tanto, son compatibles con prácticamente cualquier otro componente del programa de aplicación. También se pueden usar en combinación con sustancias que afectan el crecimiento de las plantas, como fertilizantes y reguladores del crecimiento de las plantas, siempre que dichos compuestos o sustancias sean biológicamente compatibles. También se pueden usar en combinación con agentes activos plaguicidas biológicamente compatibles como, por ejemplo, herbicidas, nematocidas, fungicidas e insecticidas.

Cuando se usan como biofertilizantes en sus formulaciones disponibles comercialmente y en las formas de uso, preparadas a partir de estas formulaciones, las cepas y composiciones microbianas activas de acuerdo con la presente invención pueden estar presentes además en forma de una mezcla con sinergistas. Los sinergistas son compuestos por los cuales la actividad de las composiciones activas aumenta sin que sea necesario que el sinergista agregado sea activo por sí mismo.

Cuando se usan como biofertilizantes en sus formulaciones disponibles comercialmente y en las formas de uso, preparadas a partir de estas formulaciones, las cepas y composiciones microbianas activas según la invención pueden estar presentes además en forma de una mezcla con inhibidores que reducen la degradación de las composiciones activas después de la aplicación en el hábitat de la planta, en la superficie de partes de plantas o en tejidos vegetales.

Las cepas y composiciones microbianas activas de acuerdo con la invención, como tales o en sus formulaciones, también pueden usarse como una mezcla con fertilizantes, acaricidas, bactericidas, fungicidas, insecticidas, microbicidas, nematicidas, plaguicidas o combinaciones de cualesquiera de los mismos, por ejemplo, para ampliar el espectro de acción o para prevenir el desarrollo de resistencias a los plaguicidas de esta manera. En muchos casos, se producen efectos sinérgicos, es decir, la actividad de la mezcla puede exceder la actividad de los componentes individuales. También se contempla una mezcla con otros compuestos activos conocidos, tales como reguladores del crecimiento, protectores y/o semioquímicos.

Preferiblemente, las composiciones pueden incluir además al menos un fertilizante químico o biológico. La cantidad de al menos un fertilizante químico o biológico empleado en las composiciones puede variar dependiendo de la formulación final, así como del tamaño de la planta y la semilla por tratar. Preferiblemente, el al menos un fertilizante químico o biológico empleado es del 0,1 % p/p a 80 % p/p con base en la formulación completa. Más preferiblemente, el al menos un fertilizante químico o biológico está presente en una cantidad de 1 % p/p a 60 % p/p y lo más preferiblemente de 10 % p/p a 50 % p/p.

Las composiciones microbiológicas de la presente invención incluyen preferiblemente al menos un fertilizante biológico. Los fertilizantes biológicos de ejemplo que son adecuados para su uso en la presente memoria y pueden incluirse en una composición microbiológica de acuerdo con la presente invención para promover el crecimiento y/o rendimiento de las plantas incluyen microbios, animales, bacterias, hongos, material genético, plantas y productos naturales de organismos vivos. En estas composiciones, el microorganismo de la presente invención se aísla antes de la formulación con un organismo adicional. Por ejemplo, los microbios tales como las especies de *Achromobacter, Ampelomyces, Aureobasidium, Azospirillum, Azotobacter, Bacillus, Beauveria, Bradyrhizobium, Candida, Chaetomium, Cordyceps, Cryptococcus, Dabaryomyces, Delftia, Erwinia, Exophilia, Gliocladium, Herbaspirillum, Lactobacillus, Mariannaea, Microccocus, Paecilomyces, Paenibacillus, Pantoea, Pichia, Pseudomonas, Rhizobium, Saccharomyces, Sporobolomyces, Stenotrophomonas, Streptomyces, Talaromyces* y T*richoderma* pueden proporcionarse en una composición con los microorganismos de la presente invención. Uso de las composiciones microbiológicas de acuerdo con la presente invención en combinación con los microorganismos microbianos divulgados en las Publicaciones de Solicitud de Patente de los Estados Unidos US20030172588 y US20030211119; patentes de los Estados Unidos 7,084,331; 7,097,830 y 7,842,494 y también se prefiere particularmente la publicación de solicitud PCT WO2010109436.

Preferiblemente, las composiciones pueden incluir además al menos un plaguicida químico o biológico. La cantidad de al menos un plaguicida químico o biológico empleado en las composiciones puede variar dependiendo de la formulación final, así como del tamaño de la planta y la semilla por tratar. Preferiblemente, el al menos un plaguicida químico o biológico empleado es de 0,1 % p/p a 80 % p/p basado en la formulación completa. Más preferiblemente, el al menos un plaguicida químico o biológico está presente en una cantidad de 1 % p/p a 60 % p/p y lo más preferiblemente de 10 % p/p a 50 % p/p.

Una variedad de plaguicidas químicos es evidente para un experto en la técnica y puede usarse. Plaguicidas químicos de ejemplo incluyen los de las clases de carbamato, organofosfato, organoclorado y piretroides. También se incluyen agentes de control químico tales como benomilo, bórax, captafol, captan, corotalonil, formulaciones que contienen cobre; formulaciones que contienen diclona, dicloran, yodo, zinc; fungicidas que inhiben la biosíntesis de ergosterol tal como blastididin, cimoxanil, fenarimol, flusilazol, folpet, imazalil, ipordiona, maneb, manocozeb, metalaxil, oxicarboxin, miclobutanil, oxitetraciclina, PCNB, pentaclorofenol, procloraz, propiconazol, quinometionato,

arsenito de sodio, DNOC de sodio, sodio hipoclorito, fenilfenato de sodio, estreptomicina, azufre, tebuconazol, terbutrazol, tiabendazol, tiofanato de metilo, triadimefón, triciclazol, triforina, validimicina, vinclozolina, zineb y ziram.

Las composiciones microbiológicas de la presente invención incluyen preferiblemente al menos un plaguicida biológico. Los plaguicidas biológicos de ejemplo que son adecuados para su uso en la presente memoria y pueden incluirse en una composición microbiológica de acuerdo con la presente invención para prevenir una enfermedad patogénica de plantas incluyen microbios, animales, bacterias, hongos, material genético, plantas y productos naturales de organismos vivos. En estas composiciones, el microorganismo de la presente invención se aísla antes de la formulación con un organismo adicional. Por ejemplo, microbios como especies de *Ampelomyces, Aureobasidium, Bacillus, Beauveria, Candida, Chaetomium, Cordyceps, Cryptococcus, Dabaryomyces, Erwinia, Exophilia, Gliocladium, Mariannaea, Paecilomyces, Paenibacillus, Pantoea, Pichia, Pseudomonas, Sporobolomyces, Talaromyces* y *Trichoderma* pueden proporcionarse en una composición con los microorganismos de la presente invención, siendo particularmente preferidas las cepas fúngicas del género *Muscodor*. El uso de las composiciones microbiológicas de acuerdo con la presente invención en combinación con los antagonistas microbianos divulgados en las Patentes de los Estados Unidos 7,518,040; 7,601,346 y 6,312,940 también es particularmente preferido.

Ejemplos de hongos que se pueden combinar con cepas microbianas y composiciones de la presente invención en una composición incluyen especies de *Muscodor, Aschersonia aleyrodis, Beauveria bassiana* ("muscarina blanca"), *Beauveria brongniartii, Chladosporium herbarum, Cordyceps clavulata, Cordyceps entomorrhiza, Cordyceps facis, Cordyceps gracilis, Cordyceps melolanthae, Cordyceps militaris, Cordyceps Myrmecophila, Cordyceps ravenelii, Cordyceps sinensis, Cordyceps sphecocephala, Cordyceps subsessilis, Cordyceps unilateralis, Cordyceps variabilis, Cordyceps washingtonensis, Culicinomyces clavosporus, Entomophaga grylli, Entomophaga maimaiga, Entomophaga muscae, Entomophaga praxibulli, Entomophthora plutellae, Fusarium lateritium, Hirsutella citriformis, Hirsutella thompsoni, Metarhizium anisopliae* ("muscarina verde"), *Metarhizium flaviride, Muscodor albus, Neozygitesfloridana, Nomuraea rileyi, Paecilomyces farinosus, Paecilomyces fumosoroseus, Pandora neoaphidis, Tolypocladium cylindrosporum, Verticillium lecanii, Zoophthora radicans* y especies de micorrizas como *Laccaria bicolor*. Otras especies micoplaguicidas serán evidentes para los expertos en la materia.

En la presente ,memoria también se divulgan procedimientos para tratar una planta mediante la aplicación de cualquiera de una variedad de formulaciones habituales en una cantidad efectiva al suelo (es decir, en el surco), a una parte de la planta (es decir, empapar) o en la semilla antes de plantar (es decir, recubrimiento o tratamiento de semillas). Las formulaciones habituales incluyen soluciones, concentrado emulsionable, polvos humectables, concentrado en suspensión, polvos solubles, gránulos, concentrado en suspensión-emulsión, materiales naturales y sintéticos impregnados con compuesto activo y cápsulas de liberación controlada muy finas en sustancias poliméricas. Las composiciones microbianas pueden formularse en polvos que están disponibles en una formulación lista para usar o se mezclan en el momento del uso. En cualquier caso, el polvo puede mezclarse con el suelo antes o en el momento de la siembra. En un caso alternativo, uno o ambos del agente promotor del crecimiento de la planta o del agente de biocontrol es una formulación líquida que se mezcla en el momento del tratamiento. Un experto en la materia entiende que una cantidad efectiva de estas composiciones depende de la formulación final de la composición, así como del tamaño de la planta o del tamaño de la semilla por tratar.

Dependiendo de la formulación final y el procedimiento de aplicación, también se pueden introducir uno o más aditivos adecuados en las composiciones de la presente invención. Adhesivos como carboximetilcelulosa y polímeros naturales y sintéticos en forma de polvos, gránulos o látex, como goma arábiga, quitina, alcohol polivinílico y acetato de polivinilo, así como fosfolípidos naturales, como cefalinas y lecitinas, y fosfolípidos sintéticos, pueden ser añadidos a las presentes composiciones.

Preferiblemente, las composiciones microbiológicas se formulan en una única solución estable, o emulsión, o suspensión. Para las soluciones, los compuestos químicos activos se disuelven típicamente en solventes antes de agregar el agente biológico. Los disolventes líquidos adecuados incluyen compuestos aromáticos a base de petróleo, como xileno, tolueno o alquilnaftalenos, hidrocarburos alifáticos, como ciclohexano o parafinas, por ejemplo, fracciones de petróleo, aceites minerales y vegetales, alcoholes, como butanol o glicol, así como sus éteres y ésteres, cetonas, tales como metil etil cetona, metil isobutil cetona o ciclohexanona, solventes fuertemente polares, tales como dimetilformamida y dimetil sulfóxido. Para la emulsión o suspensión, el medio líquido es agua. El agente químico y el agente biológico pueden suspenderse en líquidos separados y mezclarse en el momento de la aplicación. En un caso preferido de suspensión, el agente químico y el agente biológico se combinan en una formulación lista para usar que exhibe una vida útil razonablemente larga. En uso, el líquido se puede rociar o se puede aplicar foliarmente como un rociado atomizado o en el surco al momento de plantar el cultivo. La composición líquida se puede introducir en una cantidad efectiva en la semilla (es decir, recubrimiento o tratamiento de la semilla) o en el suelo (es decir, en el surco) antes de la germinación de la semilla o directamente al suelo en contacto con las raíces utilizando una variedad de técnicas conocidas en el arte que incluyen riego por goteo, rociadores, inyección en suelo o empapado del suelo.

Opcionalmente, se pueden agregar estabilizadores y tampones, incluidos sales de metales alcalinos y alcalinotérreos y ácidos orgánicos, tales como ácido cítrico y ácido ascórbico, ácidos inorgánicos, tales como ácido clorhídrico o ácido sulfúrico. Los biocidas también se pueden agregar y pueden incluir formaldehídos o agentes liberadores de formaldehído y derivados del ácido benzoico, como el ácido p-hidroxibenzoico.

Patógenos

Ejemplos de enfermedades fitopatógenas que son adecuadas para aplicaciones de los procedimientos y materiales de la presente invención incluyen enfermedades causadas por una amplia gama de hongos patógenos. Los procedimientos de la presente invención se aplican preferiblemente contra hongos patógenos que son importantes o interesantes para la agricultura, horticultura, biomasa vegetal para la producción de moléculas de biocombustibles y otros productos químicos, y/o silvicultura. De particular interés son las especies patógenas de *Pseudomonas* (por ejemplo, *Pseudomonas solanacearum*), *Xylella fastidiosa; Ralstonia solanacearum, Xanthomonas campestris, Erwinia amylovora*, especies de *Fusarium*, especies de *Phytophthora* (por ejemplo, *P. infestans*), especies de *Botrytis*, especies de *Leptosphaeria*, mildiu polvoso (*Ascomycota*) y royas (*Basidiomycota*).

Ejemplos de patógenos de plantas de interés incluyen, por ejemplo, *Acremonium strictlyum, Agrobacterium tumefaciens, Alternaria alternata, Alternaria solani, Aphanomyces euteiches, Aspergillus fumigatus, Athelia rolfsii, Aureobasidium pullulans, Bipolaris zeicola, Botrytis cinerea, Calonectria kyotensis, Cephalosporium maydis, Cercospora medicaginis, Cercospora sojina, Colletotrichum coccodes, Colletotrichum fragariae, Colletotrichum graminicola, Coniella diplodiella, Coprinopsis psychromorbida, Corynespora cassiicola, Curvularia pallescens, Cylindrocladium crotalariae, Diplocarpon earlianum, Diplodia gossyina, Diplodia spp., Epicoccum nigrum, Erysiphe cichoracearum, Fusarium graminearum, Fusarium oxysporum, Fusarium oxysporum f.sp. tuberosi, Fusarium proliferatum var. proliferatum, Fusarium solani, Fusarium verticillioides, Ganoderma boninense, Geotrichum candidum, Glomerella tucumanensis, Guignardia bidwellii, Kabatiella zeae, Leptosphaerulina briosiana, Leptotrochila medicaginis, Macrophomina, Macrophomina phaseolina, Magnaporthe grisea, Magnaporthe oryzae, Microsphaera manshurica, Monilinia fructicola, Mycosphaerella fijiensis, Mycosphaerella fragariae, Nigrospora oryzae, Ophiostoma ulmi, Pectobacterium carotovorum, Pellicularia sasakii (Rhizoctonia solani), Peronospora manshurica, Phakopsora pachyrhizi, Phoma foveata, Phoma medicaginis, Phomopsis longicolla, Phytophthora cinnamomi, Phytophthora erythroseptica, Phytophthora fragariae, Phytophthora infestans, Phytophthora medicaginis, Phytophthora megasperma, Phytophthora palmivora, Podosphaera leucotricha, Pseudopeziza medicaginis, Puccinia graminis subsp. Tritici (UG99), Puccinia sorghi, Pyricularia grisea, Pyricularia oryzae, Pythium ultimum, Rhizoctonia solani, Rhizoctonia zeae, Rosellinia sp., Sclerotinia sclerotiorum, Sclerotinina trifoliorum, Sclerotium rolfsii, Septoria glycines, Septoria lycopersici, Setomelanomma turcica, Sphaerotheca macularis, Spongospora subterranea, Stemphylium sp, Synchytrium endobioticum, Thecaphora (Angiosorus), Thielaviopsis, Tilletia indica, Trichoderma viride, Ustilago maydis, Verticillium albo-atrum, Verticillium dahliae, Verticillium dahliae, Xanthomonas axonopodis, Xanthomonas oryzae pv. Oryzae.*

Preferiblemente, los procedimientos y materiales divulgados en la presente memoria son útiles para suprimir el desarrollo de los patógenos *Aspergillus fumigatus*, *Botrytis cinerea, Cerpospora betae, Colletotrichum sp., Curvularia spp., Fusarium sp., Ganoderma boninense, Geotrichum candidum, Gibberella sp., Monographella sp., Mycosphaerella fijiensis, Phytophthora palmivora, Phytophthora ramorum, Penicillium sp., Pythium ultimum, Rhizoctonia solani, Rhizopus spp., Schizophyllum spp., Sclerotinia sclerotiorum, Stagnospora sp., Verticillium dahliae*, o *Xanthomonas axonopodis*. Se prefiere particularmente que los procedimientos y materiales se puedan usar para suprimir el desarrollo de varios patógenos de plantas de importancia comercial, incluidos patógenos de *Fusarium graminearum* NRRL-5883, *Monographella nivalis* ATCC MYA-3968, *Gibberella zeae* ATCC-16106, *Stagnospora nodurum* ATCC-26369, *Colletotrichum graminicola* ATCC-34167 y *Penicillium sp.*.

Formulación para recubrimiento de semillas

En una realización particularmente preferente, las composiciones microbianas de la presente invención se formulan como un tratamiento de semillas. Se contempla que las semillas pueden recubrirse de manera sustancialmente uniforme con una o más capas de las composiciones microbianas divulgadas en la presente memoria usando procedimientos convencionales de mezcla, pulverización o una combinación de los mismos mediante el uso de equipos para aplicación de tratamientos que están específicamente diseñados y fabricados de manera precisa, segura y para aplicar eficientemente a las semillas productos para tratamiento de semillas. Dicho equipo utiliza diversos tipos de tecnología de revestimiento, como revestimientos rotativos, revestimientos en tambor, técnicas de lecho fluidizado, lechos con boquilla, neblinas rotativas o una combinación de los mismos. Tratamientos líquidos de semillas como los que se pueden aplicar a través de un disco giratorio "atomizador" o una boquilla de pulverización que distribuye uniformemente el tratamiento de semillas sobre la semilla a medida que se mueve a través del patrón de pulverización. Preferiblemente, la semilla se mezcla o se revuelve durante un período de tiempo adicional para lograr una distribución de tratamiento y secado adicionales. Las semillas pueden imprimarse o no imprimarse antes de recubrirlas con las composiciones de la invención para aumentar la uniformidad de la germinación y la emergencia. Alternativamente, se puede dosificar una formulación de polvo seco sobre la semilla en movimiento y dejar que se mezcle hasta que esté completamente distribuida.

Otro aspecto de la invención proporciona semillas tratadas con las composiciones microbianas objeto. Las semillas pueden tener al menos parte del área superficial recubierta con una composición microbiológica de acuerdo con la presente invención. Las semillas tratadas con microorganismos pueden tener una concentración de esporas microbianas o una concentración de células microbianas de 10^6 a 10^9 por semilla. Las semillas también pueden tener más esporas o células microbianas por semilla, como, por ejemplo, 10^{10}, 10^{11} o 10^{12} esporas por semilla. Las esporas y/o células microbianas pueden disponerse como recubrimiento libremente sobre las semillas o,

preferiblemente, pueden formularse en una composición líquida o sólida antes de ser dispuestas como recubrimiento sobre las semillas. Por ejemplo, una composición sólida que comprende los microorganismos se puede preparar mezclando un vehículo sólido con una suspensión de las esporas hasta que los vehículos sólidos se impregnen con la espora o la suspensión celular. Esta mezcla se puede secar para obtener las partículas deseadas.

Se contempla que las composiciones microbianas sólidas o líquidas de la presente invención pueden contener además agentes funcionales capaces de proteger las semillas de los efectos nocivos de herbicidas selectivos, tales como carbón activado, nutrientes (fertilizantes) y otros agentes capaces de mejorar el germinación y calidad de los productos o una combinación de los mismos.

Los procedimientos y composiciones de revestimiento de semillas que se conocen en la técnica pueden ser particularmente útiles cuando se modifican mediante la adición de una de las realizaciones de la presente invención. Dichos procedimientos y aparatos de recubrimiento para su aplicación se divulgan, por ejemplo, en las Patentes Estadounidenses 5,918,413; 5,554,445; 5,389,399; 4,759,945; y 4.465.017. Las composiciones para revestimiento de semillas se divulgan, por ejemplo, en la Publicación de Solicitud de Patente de los Estados Unidos US20100154299, las Patentes de los Estados Unidos 5.939.356; 5.876.739, 5.849.320; 5.791.084, 5.661.103; 5.580.544, 5.328.942; 4.735.015; 4.634.587; 4.372.080, 4.339.456; y 4,245,432.

Se puede añadir una variedad de aditivos a las formulaciones de tratamiento de semillas que comprenden las composiciones de la invención. Se pueden agregar aglutinantes e incluir aquellos compuestos preferiblemente de un polímero adhesivo que puede ser natural o sintético sin efecto fitotóxico sobre la semilla que se va a recubrir. El aglutinante puede seleccionarse de acetatos de polivinilo; copolímeros de acetato de polivinilo; copolímeros de etileno y acetato de vinilo (EVA); alcoholes polivinílicos; copolímeros de poli(alcohol vinílico); celulosas, incluyendo etilcelulosas, metilcelulosas, hidroximetilcelulosas, hidroxipropilcelulosas y carboximetilcelulosa; polivinilpirrolidonas; polisacáridos, incluyendo almidón, almidón modificado, dextrinas, maltodextrinas, alginato y quitosanos; grasas; aceites; proteínas, que incluyen gelatina y zeínas; goma arábiga; lacas; cloruro de vinilideno y copolímeros de cloruro de vinilideno; lignosulfonatos de calcio; copolímeros acrílicos; polivinilacrilatos; óxido de polietileno; polímeros y copolímeros de acrilamida; polihidroxietil acrilato, monómeros de metilacrilamida; y policloropreno.

Se puede emplear cualquiera de una variedad de colorantes, incluyendo cromóforos orgánicos clasificados como nitroso; nitro; azo, que incluye monoazo, bisazo y poliazo; acridina, antraquinona, azina, difenilmetano, indamina, indofenol, metina, oxazina, ftalocianina, tiazina, tiazol, triarilmetano, xanteno. Otros aditivos que se pueden agregar incluyen oligoelementos como sales de hierro, manganeso, boro, cobre, cobalto, molibdeno y zinc. Se puede aplicar un polímero u otro agente de control de polvo para retener el tratamiento en la superficie de la semilla.

Además de las células o esporas microbianas, el recubrimiento puede comprender además una capa de adherente. El adherente debe ser no tóxico, biodegradable y adhesivo. Ejemplos de tales materiales incluyen poli(acetatos de vinilo); copolímeros de acetato de polivinilo; alcoholes polivinílicos; copolímeros de poli(alcohol vinílico); celulosas, tales como metilcelulosas, hidroximetilcelulosas e hidroximetilpropilcelulosas; dextrinas; alginatos; azúcares; melaza; polivinilpirrolidonas; polisacáridos; proteínas; grasas; aceites; goma arábiga; gelatinas; jarabes y almidones. Se pueden encontrar más ejemplos en, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos 7,213,367 y la Publicación de Solicitud de Patente de los Estados Unidos US20100189693.

Se pueden incluir también en la formulación del tratamiento de semillas diversos aditivos, tales como adherentes, dispersantes, tensioactivos e ingredientes de nutrientes y tampones. Otros aditivos convencionales para el tratamiento de semillas incluyen agentes de recubrimiento, agentes humectantes, agentes tamponantes y polisacáridos. Al menos un vehículo aceptable en términos agrícolas se puede agregar a la formulación de tratamiento de semillas, como agua, sólidos o polvos secos. Los polvos secos pueden derivarse de una variedad de materiales tales como carbonato de calcio, yeso, vermiculita, talco, humus, carbón activado y diversos compuestos de fósforo.

La composición de recubrimiento de semillas puede comprender al menos una carga que es un componente orgánico o inorgánico, natural o sintético con el que los componentes activos se combinan para facilitar su aplicación sobre la semilla. Preferiblemente, la carga es un sólido inerte como arcillas, silicatos naturales o sintéticos, sílice, resinas, ceras, fertilizantes sólidos (por ejemplo, sales de amonio), minerales naturales del suelo, como caolinas, arcillas, talco, cal, cuarzo, atapulgita, montmorillonita, bentonita o tierras de diatomeas, o minerales sintéticos, como sílice, alúmina o silicatos, en particular silicatos de aluminio o magnesio.

La formulación para tratamiento de semillas puede incluir además uno o más de los siguientes ingredientes: otros plaguicidas, incluidos compuestos que actúan solo debajo del suelo; fungicidas, tales como captan, thiram, metalaxil, fludioxonil, oxadixil e isómeros de cada uno de esos materiales; herbicidas, incluidos compuestos seleccionados de glifosato, carbamatos, tiocarbamatos, acetamidas, triazinas, dinitroanilinas, éteres de glicerol, piridazinonas, uracilos, fenoxis, ureas y ácidos benzoicos; protectores herbicidas tales como benzoxazina, derivados de benzhidrilo, N, N-dialil dicloroacetamida, diversos compuestos de dihaloacilo, oxazolidinilo y tiazolidinilo, etanona, compuestos de anhídrido naftálico y derivados de oxima; fertilizantes químicos; fertilizantes biológicos; y agentes de biocontrol tales como otras bacterias y hongos naturales o recombinantes de los géneros Rhizobium, Bacillus, Pseudomonas, Serratia, Trichoderma, Glomus, Gliocladium y micorrizas. Estos ingredientes pueden agregarse como una capa

separada en la semilla o, alternativamente, pueden agregarse como parte de la composición para recubrimiento de semillas.

Preferiblemente, la cantidad de la composición u otros ingredientes utilizados en el tratamiento de la semilla no debería inhibir la germinación de la semilla, ni causar daño fitotóxico a la semilla.

La formulación que se usa para tratar la semilla puede estar en forma de suspensión; emulsión; suspensión de partículas en un medio acuoso (por ejemplo, agua); polvo humectable; gránulos humectables (fluidos secos); y gránulos secos. Si se formula como una suspensión o pasta, la concentración del ingrediente activo en la formulación es preferiblemente de 0,5 % al 99 % en peso (p/p), preferiblemente del 5-40 %.

Como se mencionó anteriormente, se pueden incorporar otros ingredientes inactivos o inertes convencionales en la formulación. Tales ingredientes inertes incluyen: agentes adhesivos convencionales; agentes dispersantes tales como metilcelulosa, por ejemplo, sirven como agentes dispersantes/adhesivos combinados para uso en tratamientos de semillas; polivinil alcohol; lecitina, dispersantes poliméricos (por ejemplo, polivinilpirrolidona/acetato de vinilo); espesantes (por ejemplo, espesantes de arcilla para mejorar la viscosidad y reducir la sedimentación de las suspensiones de partículas); estabilizadores de emulsión; tensioactivos; compuestos anticongelantes (por ejemplo, urea), tintes y colorantes. Otros ingredientes inertes útiles se pueden encontrar en McCutcheon's, vol. 1, "Emulsifiers and Detergents", MC Publishing Company, Glen Rock, N.J., Estados Unidos, 1996. Se pueden encontrar ingredientes inertes adicionales útiles en la presente invención en McCutcheon's, vol. 2, "Functional Materials", MC Publishing Company, Glen Rock, N.J., Estados Unidos, 1996.

Las formulaciones de revestimiento de la presente invención se pueden aplicar a semillas mediante una variedad de procedimientos, que incluyen mezclar en un recipiente (por ejemplo, una botella o bolsa), aplicación mecánica, volteo, pulverización e inmersión. Se puede usar una variedad de material activo o inerte para poner en contacto las semillas con composiciones microbianas de acuerdo con la presente invención, tales como materiales para recubrimiento en película convencionales que incluyen materiales de recubrimiento en película a base de agua como SEPIRET™ (Seppic, Inc., N.J.) y OPACOAT™ (Berwind Pharm. Services, P.A.).

La cantidad de una composición de acuerdo con la presente invención que se usa para el tratamiento de la semilla variará dependiendo del tipo de semilla y el tipo de ingredientes activos, pero el tratamiento comprenderá poner en contacto las semillas con una cantidad efectiva en términos agrícolas de la composición de la invención. Como se discutió anteriormente, una cantidad efectiva significa la cantidad de la composición de la invención que es suficiente para afectar los resultados beneficiosos o deseados. Se puede administrar una cantidad efectiva en una o más administraciones.

Además de la capa de recubrimiento, la semilla puede tratarse con uno o más de los siguientes ingredientes: otros plaguicidas que incluyen fungicidas y herbicidas; protectores herbicidas; fertilizantes y/o agentes de biocontrol. Estos ingredientes pueden agregarse como una capa separada o alternativamente pueden agregarse en la capa de recubrimiento.

Las formulaciones de revestimiento de semillas de la presente invención se pueden aplicar a las semillas usando una variedad de técnicas y máquinas, tales como técnicas de lecho fluidizado, el procedimiento de molino de rodillos, tratadores de semillas rotostáticos y revestimientos por tambor. Otros procedimientos, como los lechos con boquilla también pueden ser útiles. Las semillas pueden ser predimensionadas antes del recubrimiento. Después del recubrimiento, las semillas generalmente se secan y luego se transfieren a una máquina de dimensionamiento para su dimensionamiento. Tales procedimientos son conocidos en la técnica.

Las semillas tratadas con microorganismos también pueden envolverse con una capa de recubrimiento en película para proteger el recubrimiento. Tales recubrimientos son conocidos en la técnica y pueden aplicarse utilizando técnicas de recubrimiento en película por tambor y lecho fluidizado.

Las composiciones de acuerdo con la presente invención se pueden introducir en una semilla mediante el uso de imprimación en matriz sólida. Por ejemplo, una cantidad de una composición de la invención se puede mezclar con un material de matriz sólida y luego la semilla se puede poner en contacto con el material de matriz sólida durante un período para permitir que la composición se introduzca en la semilla. La semilla se puede separar opcionalmente del material de matriz sólida y almacenarse o usarse, o la mezcla de material de matriz sólida más semilla se puede almacenar o plantar directamente. Los materiales de matriz sólida que son útiles en la presente invención incluyen poliacrilamida, almidón, arcilla, sílice, alúmina, tierra, arena, poliurea, poliacrilato o cualquier otro material capaz de absorber o adsorber la composición de la invención durante un tiempo y liberar esa composición en o sobre la semilla. Es útil asegurarse de que la composición de la invención y el material de la matriz sólida sean compatibles entre sí. Por ejemplo, el material de matriz sólida debe elegirse de modo que pueda liberar la composición a una velocidad razonable, por ejemplo, durante un período de minutos, horas o días.

En principio, se puede tratar cualquier semilla de planta capaz de germinar para formar una planta. Semillas adecuadas incluyen las de cereales, café, cultivos de Cole, cultivos de fibra, flores, frutas, leguminosas, cultivos oleaginosos, árboles, cultivos de tubérculos, vegetales, así como otras plantas de especies monocotiledóneas y dicotiledóneas. Preferiblemente, las semillas de cultivo por recubrir incluyen semillas de judías, zanahorias, maíz,

algodón, pastos, lechuga, cacahuete, pimienta, patata, colza, arroz, centeno, sorgo, soja, remolacha azucarera, girasol, tabaco y tomate. Más preferiblemente, las semillas de cebada o trigo (trigo de primavera o trigo de invierno) se recubren con las presentes composiciones.

Preparación de las composiciones microbianas.

Los cultivos de los microorganismos se pueden preparar para usar en las composiciones microbianas de la invención usando técnicas estándar de secado estático y fermentación líquida conocidas en la técnica. El crecimiento se efectúa comúnmente en un biorreactor.

Un biorreactor se refiere a cualquier dispositivo o sistema que soporta un entorno biológicamente activo. Como se describe en la presente memoria, un biorreactor es un recipiente en el que pueden crecer microorganismos que incluyen el microorganismo de la invención. Un biorreactor puede tener cualquier forma o tamaño apropiado para cultivar los microorganismos. Un biorreactor puede variar en tamaño y escala de 10 ml hasta litros hasta metros cúbicos y puede estar hecho de acero inoxidable o cualquier otro material apropiado como se conoce y usa en la técnica. El biorreactor puede ser un biorreactor de tipo por lotes, un tipo alimentado por lotes o un biorreactor de tipo continuo (por ejemplo, un reactor con agitación continuo). Por ejemplo, un biorreactor puede ser un quimiostato como se conoce y utiliza en la técnica de la microbiología para el cultivo y la recolección de microorganismos. Se puede obtener un biorreactor de cualquier proveedor comercial (Véase también Bioreactor System Design, Asenjo & Merchuk, CRC Press, 1995).

Para operaciones a pequeña escala, se puede usar un biorreactor por lotes, por ejemplo, para probar y desarrollar nuevos procesos, y para procesos que no pueden convertirse en operaciones continuas.

Los microorganismos cultivados en un biorreactor pueden suspenderse o inmovilizarse. El crecimiento en el biorreactor es generalmente en condiciones aeróbicas a temperaturas y pH adecuados para el crecimiento. Para los organismos de la invención, el crecimiento celular se puede lograr a temperaturas entre 5 y 37° C, con temperatura preferida en los intervalos de 15 a 30 °C, 15 a 28 °C, 20 a 30 °C, o 15 a 25° C. El pH del medio nutriente puede variar entre 4,0 y 9,0, pero el intervalo operativo preferido es generalmente ligeramente ácido a neutro a pH 4,0 a 7,0, o 4,5 a 6,5, o pH 5,0 a 6,0. Típicamente, el rendimiento celular máximo se obtiene en 20-72 h después de la inoculación.

Las condiciones óptimas para el cultivo de los microorganismos dependerán, por supuesto, de la cepa particular. Sin embargo, en virtud de las condiciones aplicadas en el proceso de selección y los requisitos generales de la mayoría de los microorganismos, una persona con conocimientos ordinarios en la técnica podría determinar los nutrientes y condiciones esenciales. Los microorganismos se cultivarían típicamente en cultivos líquidos aeróbicos en medios que contienen fuentes de carbono, nitrógeno y sales inorgánicas que pueden ser asimiladas por el microorganismo y que soportan el crecimiento celular eficiente. Las fuentes de carbono preferidas son hexosas como la glucosa, pero pueden sustituirse por otras fuentes que se asimilan fácilmente, como los aminoácidos. Muchos materiales inorgánicos y proteicos pueden usarse como fuentes de nitrógeno en el proceso de crecimiento. Las fuentes de nitrógeno preferidas son los aminoácidos y la urea, pero otras incluyen amoníaco gaseoso, sales inorgánicas de nitrato y amonio, vitaminas, purinas, pirimidinas, extracto de levadura, extracto de carne, peptona proteosa, harina de soja, hidrolizados de caseína y solubles de destilación. Entre los minerales inorgánicos que se pueden incorporar al medio nutritivo se encuentran las sales habituales capaces de producir calcio, zinc, hierro, manganeso, magnesio, cobre, cobalto, potasio, sodio, molibdato, fosfato, sulfato, cloruro y borato. Se prefiere el medio líquido de dextrosa para cepas de hongos y la premezcla de caldo R2A para cepas bacterianas.

Combinación planta-endófito

También se divulgan combinaciones de plantas y endófitos creadas mediante la introducción artificial de un endófito microbiano de la invención en una planta que está libre de microorganismos endófitos. El endófito microbiano introducido en la planta puede ser un microorganismo endofítico que tiene una actividad promotora del crecimiento de la planta, una actividad de control biológico o una combinación de ambas actividades. En la técnica se conoce una variedad de procedimientos que anteriormente se consideraban efectivos para la introducción de un endófito microbiano en especies de gramíneas de cereales. Los ejemplos de tales procedimientos incluyen los descritos en las Publicaciones de Solicitud de Patente de los Estados Unidos 20030195117, 20010032343 y la Patente de los Estados Unidos No. 7,084,331.

Después de la infección artificial, se prefiere que una secuencia de ADN del microorganismo endofítico aislado se amplifique por PCR y el endófito se confirme llevando a cabo una búsqueda de homología para la secuencia de ADN amplificada. Además, se prefiere que un gen foráneo que expresa un medio identificable se introduzca en el microorganismo endofítico mencionado anteriormente, y la presencia de la colonización del microorganismo endofítico mencionado anteriormente que infecta a la planta se confirma mediante los medios identificables anteriores utilizando el gen foráneo.

Plantas adecuadas para los procedimientos de la invención

En principio, los procedimientos y composiciones de acuerdo con la presente invención pueden desplegarse para cualquier especie de planta. Las especies de plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas son particularmente adecuadas. Los procedimientos y composiciones se usan preferiblemente con plantas que son importantes o interesantes para la agricultura, horticultura, para la producción de biomasa utilizada en la producción de moléculas de combustible líquido y otros productos químicos, y/o silvicultura.

Por lo tanto, la invención tiene uso en una amplia gama de plantas, preferiblemente plantas superiores pertenecientes a las clases angiospermas y gimnospermas. Las plantas de las subclases de *Dicotylodenae* y *Monocotyledonae* son particularmente adecuadas. Las plantas dicotiledóneas pertenecen a las órdenes de los *Aristochiales, Asterales, Batales, Campanulales, Capparales, Caryophyllales, Casuarinales, Celastrales, Cornales, Diapensales, Dilleniales, Dipsacales, Ebenales, Ericales, Eucomiales, Euphorbiales, Fabales, Fagales, Gentianales, Geraniales, Haloragales, Hamamelidales, Illiciales, Juglandales, Lamiales, Laurales, Lecythidales, Leitneriales, Magniolales, Malvales, Myricales, Myrtales, Nymphaeales, Papeverales, Piperales, Plantaginales, Plumbaginales, Podostemales, Polemoniales, Polygalales, Polygonales, Primulales, Proteales, Rafflesiales, Ranunculales, Rhamnales, Rosales, Rubiales, Salicales, Santales, Sapindales, Sarraceniaceae, Scrophulariales, Theales, Trochodendrales, Umbellales, Urticales, y Violales.* Las plantas monocotiledóneas pertenecen a las órdenes de los *Alismatales, Arales, Arecales, Bromeliales, Commelinales, Cyclanthales, Cyperales, Eriocaulales, Hydrocharitales, Juncales, Lilliales, Najadales, Orchidales, Pandanales, Poales, Restionales, Triuridales, Typhales, y Zingiberales.* Las plantas que pertenecen a la clase de las *Gymnospermae* son *Cycadales, Ginkgoales, Gnetales y Pinales*.

Las especies adecuadas pueden incluir miembros del género *Abelmoschus, Abies, Acer, Agrostis, Allium, Alstroemeria, Ananas, Andrographis, Andropogon, Artemisia, Arundo, Atropa, Berberis, Beta, Bixa, Brassica, Calendula, Camellia, Camptotheca, Cannabis, Capsicum, Carthamus, Catharanthus, Cephalotaxus, Chrysanthemum, Cinchona, Citrullus, Coffea, Colchicum, Coleus, Cucumis, Cucurbita, Cynodon, Datura, Dianthus, Digitalis, Dioscorea, Elaeis, Ephedra, Erianthus, Erythroxylum, Eucalyptus, Festuca, Fragaria, Galanthus, Glycine, Gossypium, Helianthus, Hevea, Hordeum, Hyoscyamus, Jatropha, Lactuca, Linum, Lolium, Lupinus, Lycopersicon, Lycopodium, Manihot, Medicago, Mentha, Miscanthus, Musa, Nicotiana, Oryza, Panicum, Patataver, Parthenium, Pennisetum, Petunia, Phalaris, Phleum, Pinus, Poa, Poinsettia, Populus, Rauwolfia, Ricinus, Rosa, Saccharum, Salix, Sanguinaria, Scopolia, Secale, Solanum, Sorghum, Spartina, Spinacea, Tanacetum, Taxus, Theobroma, Triticosecale, Triticum, Uniola, Veratrum, Vinca, Vitis,* y *Zea.*

Los procedimientos y composiciones de la presente invención se usan preferiblemente en plantas que son importantes o interesantes para la agricultura, horticultura, biomasa para la producción de moléculas de biocombustibles y otros productos químicos, y/o silvicultura. Los ejemplos incluyen, por ejemplo, *Panicum virgatum* (zacate), *Sorghum bicolor* (sorgo, hierba de Sudán), *Miscanthus giganteus* (miscanthus), *Saccharum* sp. (caña de energía), *Populus balsamifera* (álamo), *Zea mays* (maíz), *Glycine max* (haba de soja), *Brassica napus* (canola), *Triticum aestivum* (trigo), *Gossypium hirsutum* (algodón), Oryza sativa (arroz), *Helianthus annuus* (girasol), *Medicago sativa* (alfalfa), *Beta vulgaris* (remolacha azucarera), *Pennisetum glaucum* (mijo perla), *Panicum* spp., *Sorghum* spp., *Miscanthus* spp., *Saccharum* spp., *Erianthus* spp., *Populus* spp., *Andropogon gerardii* (tallo azul grande), *Pennisetum purpureum* (pasto elefante), *Phalaris arundinacea* (caña hierba de canario, *Cynodon dactylon* (hierba de Bermuda), *Festuca arundinacea* (festuca alta), *Spartina pectinata* (hierba cordal de la pradera), *Arundo donax* (caña gigante), *Secale cereale* (centeno), *Salix* spp. (sauce), *Eucalyptus* spp. (eucalipto), *Triticosecale* spp. (triticum - trigo X centeno), *Bambú, Carthamus tinctorius* (cártamo), *Jatropha curcas* (*Jatropha*), *Ricinus communis* (ricino), *Elaeis guineensis* (palma de aceite), *Phoenix dactylifera* (palmera datilera), *Archontophoenix cunninghamiana* (palma del rey), *Syagrus romanzoffiana* (palma de la reina), *Linum usitatissimum* (linaza), *Brassica juncea, Manihot esculenta* (casava), *Lycopersicon esculentum* (tomate), *Lactuca saliva* (lechuga), *Musa paradisiaca* (plátano), *Solanum tuberosum* (patata), *Brassica oleracea* (brócoli, coliflor, brotes de Bruselas), *Camellia sinensis* (te), *Fragaria ananassa* (fresa), *Theobroma cacao* (cacao), *Coffea arabica* (café), *Vitis vinifera* (uva), *Ananas comosus* (piña), *Capsicum annum* (pimiento picante), *Allium cepa* (cebolla), *Cucumis melo* (melón), *Cucumis sativus* (pepino), *Cucurbita maxima* (calabaza), *Cucurbita moschata* (calabaza), *Spinacea oleracea* (espinacas), *Citrullus lanatus* (sandía), *Abelmoschus esculentus* (okra), *Solanum melongena* (berenjena), *Patataver somniferum* (dormidera), *Patataver orientale*, *Taxus baccata*, *Taxus brevifolia*, *Artemisia annua*, *Cannabis saliva*, *Camptotheca acuminate*, *Catharanthus roseus*, *Vinca rosea*, *Cinchona officinalis*, *Coichicum autumnale*, *Veratrum californica*, *Digitalis lanata*, *Digitalis purpurea*, *Dioscorea* spp., *Andrographis paniculata*, *Atropa belladonna*, *Datura stomonium*, *Berberis* spp., *Cephalotaxus* spp., *Ephedra sinica*, *Ephedra* spp., *Erythroxylum coca*, *Galanthus wornorii, Scopolia* spp., *Lycopodium serratum* (*Huperzia serrata*), *Lycopodium* spp., *Rauwolfia serpentina*, *Rauwolfia* spp., *Sanguinaria canadensis*, *Hyoscyamus* spp., *Calendula officinalis, Chrysanthemum parthenium*, *Coleus forskohlii*, *Tanacetum parthenium*, *Parthenium argentatum* (guayule), *Hevea* spp. (caucho), *Mentha spicata* (menta), *Mentha piperita* (menta), *Bixa orellana, Alstroemeria* spp., *Rosa* spp. (rosa), *Dianthus caryophyllus* (clavel), *Petunia* spp. (petunia), *Poinsettia pulcherrima* (poinsettia), *Nicotiana tabacum* (tabaco), *Lupinus albus* (lupino), *Uniola paniculata* (avena), *hopillo* (Agrostis spp.), *Populus tremuloides* (álamo temblón), *Pinus* spp. (pino), *Abies* spp. (abeto), *Acer* spp. (arce), *Hordeum vulgare* (cebada), *Poapratensis* (poa), *Lolium* spp. (lolium), *Phleum pratense* (fleo), y coníferas. Son de interés las plantas cultivadas para la producción de energía, llamadas cultivos energéticos, como los cultivos energéticos a base de celulosa como *Panicum virgatum* (mijo rayado), *Sorghum bicolor* (sorgo, hierba de Sudán), *Miscanthus giganteus* (miscanthus), *Saccharum* sp. (caña de energía), *Populus balsamifera* (álamo), *Andropogon gerardii* (tallo azul grande), *Pennisetum purpureum* (pasto elefante), *Phalaris arundinacea* (alpiste de cinta), *Cynodon*

dactylon (hierba de Bermuda), *Festuca arundinacea* (festuca alta), *Spartina pectinata* (cuerda de las praderas), *Medicago sativa* (alfalfa), *Arundo donax* (caña gigante), *Secale cereale* (centeno), *Salix* spp. (sauce), *Eucalyptus* spp. (eucalipto), *Triticosecale* spp. (triticum-trigo X centeno), y *Bamboo*; y cultivos energéticos a base de almidón como *Zea mays* (maíz) y *Manihot esculenta* (mandioca); y cultivos energéticos a base de azúcar como *Saccharum* sp. (Caña de azúcar), *Beta vulgaris* (remolacha azucarera), y *Sorghum bicolor (L.) Moench* (sorgo dulce); y cultivos energéticos productores de biocombustibles como *Glycine max* (haba de soja), *Brassica napus* (canola), *Helianthus annuus* (girasol), *Carthamus tinctorius* (cártamo), *Jatropha curcas* (*Jatropha*), *Ricinus communis* (castor), *Elaeis guineensis* (Palma africana), *Elaeis oleifera* (Palma aceitera americana), *Cocos nucifera* (coco), *Camelina sativa* (lino salvaje), *Pongamia pinnata* (Pongam), *Olea europaea* (olivo), *Linum usitatissimum* (linaza), *Crambe abyssinica* (Col rizada abisinio), y *Brassica juncea.*

La discusión de los procedimientos generales dados aquí tiene fines ilustrativos.

También debe entenderse que los siguientes ejemplos se ofrecen para ilustrar la invención. Los ejemplos no cubiertos por el alcance de las reivindicaciones tienen fines ilustrativos.

Ejemplos

Ejemplo 1: Aislamiento de microorganismos a partir de muestras ambientales.

Identificación de rizobacterias formadoras de esporas usando un procedimiento de raíces sometidas a sonicación y diluciones en serie. Los siguientes microorganismos se aislaron utilizando un procedimiento de "raíces sometidas a sonicación, diluciones en serie" como se describe a continuación: los aislamientos SGI-026-G06 y SGI-026-G07, que se aislaron de una muestra de hierba con forma de aguja; el aislado SGI-041-B03, que se aisló de una muestra de centeno salvaje; y el aislado SGI-020-A01, que se aisló de un tejido de raíz de trigo cultivado en una muestra de suelo compuesto.

Se desarrolló un procedimiento de enriquecimiento para identificar específicamente rizobacterias formadoras de esporas. En resumen, los extractos de raíz sometidos a sonicación se trataron térmicamente para matar las células vegetativas y luego se colocaron en un medio rico. Los microorganismos que sobrevivieron al tratamiento térmico y formaron colonias se consideraron formadores de esporas. Se encontró que este procedimiento es particularmente efectivo para la selección de bacterias Gram-positivas. Las raíces recién muestreadas se utilizaron como material de partida para estos enriquecimientos. Las secciones finas que se encuentran en la punta de las raíces son las más jóvenes, pueden tener una alta densidad de vello en la raíz y, por lo general, tienen altas densidades de rizobacterias. Se usó una cuchilla estéril para seccionar estas áreas de las raíces en segmentos de 5 a 10 cm, que luego se lavaron con agua miliQ estéril para eliminar grandes partículas de tierra. Cuando fue necesario, se realizó un lavado más riguroso colocando las raíces en un tubo Falcon de 50 ml con 25 ml de solución salina tamponada con fosfato estéril 1 × (es decir, tampón PBS) y agitando en vórtex durante 1 minuto. Posteriormente, cada muestra de raíz se suspendió en 20 ml de tampón PBS estéril y se sometió a sonicación en hielo durante dos intervalos de 1 minuto a 8 W usando un Fisher Scientific Sonic Dismembrator. Para el tratamiento térmico, típicamente 1 ml de la suspensión de células de raíz sometida a sonicación se transfirió a un tubo Eppendorf estéril incubado en un baño de agua a 80 °C durante 20 min. Las suspensiones celulares tratadas térmicamente se dejaron enfriar a temperatura ambiente antes de diluirse en serie a concentraciones de 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6} y 10^{-7}. 100 µl de cada dilución de 10 veces se extendieron sobre placas de cultivo que contenían un medio microbiológico solidificado con agar y 100 mg/l de cicloheximida para inhibir el crecimiento de hongos. En algunos casos, fue necesario realizar una dilución de 1/10 o 1/100 antes del enchapado para obtener la densidad de CFU adecuada para la recolección de colonias. Las colonias aisladas se recogieron utilizando puntas de pipeta estériles, dispuestas en placas de microtitulación de 96 pozos, cada una con 150 µl de medio líquido 2 × YT por pozo. Las placas de microtitulación se incubaron durante 1-2 días a 30 °C para obtener una alta densidad celular para su posterior caracterización y archivo.

Aislamiento de bacterias formadoras de biopelículas. Los siguientes aislamientos microbianos se aislaron utilizando un procedimiento "formador de biopelículas" como se describe a continuación: el aislado SGI-003-H11, que se aisló de una muestra de raíz de planta de yuca; el aislado SGI-034-C09, que se aisló de una muestra de raíz de hierba; y el aislado SGI-034-E10, que era de una muestra de planta de zanahoria silvestre.

Procedimiento formador de biopelícula: En este procedimiento, se aislaron bacterias formadoras de biopelícula de segmentos de raíz sometidos a sonicación, como describen Fall et al. (Syst. Appl. Microbiol. 27,372-379, 2004). Como se describió anteriormente, las bacterias que forman biopelículas en la superficie de una raíz suelen ser bacterias colonizadoras de raíces muy buenas. En general, cuando tales bacterias están presentes en altas densidades, pueden tener una influencia significativa en la salud de las plantas y pueden excluir competitivamente los patógenos invasores. En resumen, se usó la sonicación para eliminar las células bacterianas y fúngicas que están unidas libremente a la raíz, dejando solo aquellos microbios que estaban fuertemente adheridos a la superficie de la raíz. Se seleccionaron bacterias formadoras de biopelículas Gram-positivas y Gram-negativas utilizando este procedimiento.

Se utilizaron raíces recién muestreadas como material de partida para estos enriquecimientos. Las secciones finas que se encuentran en la punta de las raíces eran los tejidos más jóvenes, tenían una alta densidad de vello de raíz y típicamente tenían altas densidades de rizobacterias. Se usó una cuchilla estéril para seccionar estas áreas de las raíces en segmentos de 5 a 10 cm, que luego se lavaron colocándolos en un tubo Falcon de 50 ml con 25 ml de 1 × PBS y se agitó en vórtex durante 1 minuto. Los restos del lavado se dejaron sedimentar, y luego se usó un fórceps estéril para transferir los segmentos de raíz lavados a tubos Falcon de 50 ml llenos con 25 ml de 1 × PBS, y se sometieron a sonicación en hielo usando un Fisher Scientific Sonic Dismembrator durante dos 30 s. intervalos con una pausa de 30 s entre ráfagas. Las muestras de raíz sometidas a sonicación se transfirieron a placas de Petri de plástico estéril y se dejaron secar completamente sin tapas dentro de un gabinete de bioseguridad. Cada segmento de raíz se colocó luego en una placa de CMA separada que contenía 1 % de agar (10 g/l de digestión de caseína, 10 g/l de manitol, 10 g/l de agar). A veces, se usaba una pinza estéril para empujar el segmento de raíz hacia el medio de agar. Posteriormente, las placas se incubaron a 37 °C y se monitorizó el crecimiento microbiano. Típicamente después de 1-2 días, surgieron múltiples crecimientos microbianos desde la raíz sobre los medios CMA. Se utilizó una punta de pipeta estéril para recoger crecimientos con morfologías únicas a lo largo del segmento y cada uno de estos crecimientos se transfirió al centro de una placa de CMA que contenía 0,3 % de agarosa. Las placas de CMA se incubaron posteriormente durante 1-2 días a 37 °C y se monitorizó su crecimiento. Típicamente, los aislamientos formadores de biopelículas mostraron crecimiento dendrítico en este medio.

Se usó un asa estéril para transferir biomasa y purificar por rayado cada aislado de las placas de CMA en placas de CMKA (agar al 2 %, 1,2 g/l de K_2HPO_4). El medio CMKA restringe el crecimiento de biopelículas y permite la selección de colonias individuales para reserva.

Ejemplo 2: Crecimiento y almacenamiento de los aislados microbianos.

Las bacterias aisladas se almacenaron como un cultivo puro. Se transfirió una colonia bacteriana a un vial que contenía medio líquido de caldo R2A (Tecknova) y se dejó crecer a 30 °C con agitación a 250 rpm durante dos días. El cultivo se transfirió luego a viales que contenían 15 % de glicerol y se almacenó a -80 °C.

Ejemplo 3: Extracción, secuenciación y taxonomía de ADN

Se transfirió una alícuota de 20 µl de suspensión de células bacterianas a una placa de PCR de 96 pozos que contenía 20 µl de un tampón de lisis 2x (Tris HCL 100 mM, pH 8,0, EDTA 2 mM, pH 8,0, SDS al 1 %, 400 µg/ml de proteinasa K). Las condiciones de lisis fueron las siguientes: incubación a 55 °C durante 30 min, seguida de incubación a 94 °C durante 4 min. Se usó una alícuota del producto de lisis como fuente de plantilla de ADN para la amplificación por PCR.

Para la amplificación de la región de ARNr 16S, cada mezcla de PCR se preparó en una reacción de volumen final de 20 µl que contenía 4 µl de la reacción de lisis bacteriana, 2 µM de cada cebador de PCR, Tween-20 al 6 % y 10 µl de 2x ImmoMix (Bioline USA Inc, Taunton, MA). Los cebadores utilizados para la amplificación por PCR fueron M13-27F (5'-TGTAAAACGACGGCCAGTTAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' SEQ ID NO: 8) y 1492R con cola en M13 (5'-CAGGAAACAGCTATGACCGGTTACCTTGTTACGACTT-3'; SEQ ID NO: 9); La PCR se realizó en un termociclador personal PTC-200 (MJ-Research, MA, Estados Unidos) De la siguiente manera: 94 °C durante 10 min; 94 °C por 30 s, 52 °C por 30 s, 72 °C por 75 s por 30 ciclos; 72 °C durante 10 min. Se ejecutó una alícuota de 2 ul de cada producto de PCR en un gel de agarosa al 1,0 % para confirmar una única banda del tamaño esperado. Las bandas positivas se aislaron, se purificaron y se enviaron para secuenciación por PCR. La secuenciación se realizó en las direcciones de cebado de avance y reverso por el Instituto J. Craig Venter en San Diego, California, utilizando tecnologías 454.

La búsqueda de homología para la secuencia de nucleótidos determinada se realizó usando la base de datos DDBJ/GenBank/EMBL. Posteriormente, se analizó la relación filogenética de la secuencia de nucleótidos de los 16 genes de ARNr entre las cepas bacterianas aisladas descritas en este documento, bacterias de los géneros y especies que exhiben altas homologías de secuencia con las cepas bacterianas aisladas y otras amplias variedades de géneros y especies bacterianas, utilizando el programa de construcción de árboles filogenéticos ClustalW. La identidad y similitud de secuencia también se determinaron utilizando el software GenomeQuest™ (Gene-IT, Worcester Mass. Estados Unidos). El resultado del análisis de secuencia reveló que los aislamientos bacterianos SGI-003_H11, SGI-020_A01, SGI-026_G06, SGI-026_G07, SGI-034_C09, SGI-034_E10, SGI-041_B03 pueden considerarse relacionados con las especies de *Pantoea agglomerans, Bacillus thuringiensis, Burkholderia metallica, Burkholderia vietnamiensis, Bacillus pumilus, Herbaspirillum sp., Pedobacter sp.*, respectivamente, con base en >98 % de homologías de secuencia de cada una de las secuencias de 16S ARNr con los microorganismos respectivos.

Ejemplo 4: Características bioquímicas de los aislados bacterianos

Las bacterias aisladas se estudiaron adicionalmente por propiedades importantes en su interacción con las plantas. Las propiedades estudiadas incluyeron fijación de nitrógeno, secreción de sideróforos, solubilización de fósforo inorgánico, producción de desaminasa de ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC), producción de 2,3-butanodiol y producción de auxina de la hormona de crecimiento vegetal. Los resultados de los ensayos bioquímicos in vitro se muestran en la Tabla 2.

Fijación de nitrógeno:

Las suspensiones de células bacterianas se sembraron por rayado en un medio sólido de la siguiente composición que no incluía una fuente de nitrógeno: KOH 4,0 g/l; K_2HPO_4 0,5 g/l; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,2 g/l; NaCl 0,1 g/l; $CaCl_2$ 0,02 g/l; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,005 g/l; $NaMoO_4 \cdot 2H_2O$ 0,002 g/l; $MnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,01 g/l; ácido málico 5,0 g/l; goma Gellan 0,1-1,0 g/l; y opcionalmente 0,5 % v/v de azul de bromotimol, pH 7,0. Las concentraciones de goma o agar Gellan se pueden variar según sea necesario para lograr el espesor medio deseado; típicamente se usaron 0,5 g/l. Las rayas se incubaron a 30 °C durante 2-5 días. Estas placas fueron monitorizadas diariamente y las colonias fueron seleccionadas a medida que aparecían. En algunos casos, períodos de crecimiento más largos (hasta dos semanas o más) permitieron la captura de aislados de crecimiento más lento. Estas placas rayadas se seleccionaron típicamente en colonias usando puntas de pipeta de barrera para aerosoles de 20 o 200 µl en placas de cultivo celular de 96 pozos llenas con 150 µl/pozo de medio 2YT. Alternativamente, se aislaron colonias de placas directamente en medio sin N para confirmar sus capacidades de crecimiento sin N. Los resultados, tal como se resumen en la Tabla 2, indicaron que solo el aislado SGI-026-G07 mostró actividad fijadora de nitrógeno a un nivel detectable.

Secreción de sideróforos:

Este ensayo se usó para identificar aislados bacterianos que producían sideróforos, que son compuestos quelantes de Fe^{3+} de alta afinidad, in vitro. Típicamente, los aislamientos microbianos se cultivaron en un medio mínimo que estaba esencialmente libre de Fe. Toda la cristalería utilizada durante este ensayo se lavó con ácido y se enjuagó tres veces con agua milliQ para eliminar el Fe residual que puede alterar los resultados del ensayo. La composición del medio MM9 fue la siguiente: K_2HPO_4 0,5 g/l; NH_4Cl 1,0 g/l; $MgSO_4 \cdot H_2O$ 0,2 g/l; NaCl 0,5 g/l; TUBOS Tampón 7,55 g/l; glucosa 10,0 g/l; ácido glucónico 2,5 g/l; ácido málico 2,5 g/l; ácidos Casamino 0,5 g/l. El medio se ajustó a pH 7,0 con KOH 5N y se esterilizó usando un filtro de 0,2 µM (Corning).

Este ensayo se realizó típicamente en un formato de alto rendimiento usando una estación de manejo de líquidos Beckman FX y placas de cultivo celular de 96 pozos con 150 µl de medio de crecimiento MM9 por pozo. Los cultivos y los medios se distribuyeron y transfirieron asépticamente utilizando una herramienta de pasador resistente a autoclave bajo una campana de flujo laminar. Después de la transferencia, los cultivos se incubaron a 30 °C durante 5 días. Después de la incubación, los sobrenadantes del cultivo se recogieron por centrifugación utilizando una placa de filtro de 96 pozos de 0,22 µM. Se transfirieron diez microlitros de sobrenadante filtrado de cada pozo a una placa de ensayo Falcon. Se preparó una curva estándar usando desferrioxamina (DFO) diluida en medio MM9. Se agregaron doscientos microlitros de la solución de ensayo CAS [HDTMA 10 mM, Fe(III)-Solución: $FeCl_3$ 1 mM·$6H_2O$, HCl 10 mM, CAS 2 mM] a cada uno de los sobrenadantes y pozos estándar, seguido de incubación a temperatura ambiente durante 20-30 min. La absorbancia de la solución de ensayo CAS azul a 630 nm (SpectroMax M2) es inversamente proporcional a la concentración de sideróforo en cada pozo (es decir, la solución de ensayo debería cambiar a una naranja intensa con mayores cantidades de sideróforos).

Solubilización de fósforo inorgánico:

La capacidad de los aislamientos microbianos para solubilizar fosfato mineral in vitro se evaluó como sigue. Las bacterias por analizar se tiñeron en un medio de crecimiento de fosfato de agar [Hidroxilapatita - $Ca_{10}(PO_4)_5(OH)_2$ 5,0g/l; NH_4Cl 1,0 g/l; $MgSO_4 \cdot H_2O$ 0,2 g/l; NaCl 0,.5 g/l; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,01g/l; $Na_2MoO_4 \cdot 7H_2O$ 0,01g/l; $MnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,01 g/l; glucosa 5,0 g/l; ácido glucónico 2,5 g/l; ácido málico 2,5 g/l; ácidos Casamino 0,5 g/l; goma Gellan 20,0 g/l; pH 7,2)], y su crecimiento fue monitorizado diariamente. El medio de cultivo tenía una apariencia opaca debido a la presencia de fosfato de calcio. Se observaría el crecimiento bacteriano y la pérdida del color del medio si las bacterias tienen la capacidad de disolución del fosfato de calcio. Los aislados que tienen la capacidad de solubilizar el fosfato en fase mineral producirían un halo transparente en el medio opaco que rodea la colonia. Como se resume en la Tabla 2, la capacidad de solubilizar fosfato mineral no era detectable en ninguno de los microorganismos probados según lo determinado por el ensayo in vitro descrito aquí.

Producción de ACC desaminasa:

Uno de los principales mecanismos utilizados por las rizobacterias promotoras del crecimiento de las plantas (PGPM) para facilitar el crecimiento y el desarrollo de las plantas es la disminución de los niveles de etileno mediante la desaminación del ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC), el precursor inmediato del etileno en plantas. La ACC desaminasa cataliza la hidrólisis del ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) en α-cetobutirato y amoníaco. La presencia del producto α-cetobutirato se puede determinar indirectamente a través de una reacción con 2,4-dinitrofenilhidrazina en HCl para formar un derivado de fenilhidrazona. Después de una adición de NaOH, la cantidad de fenhidrazona en solución puede determinarse espectrofotométricamente midiendo su absorbancia a 540 nm (Penrose and Glick, Physiol Plant. May; 118: 10-1, 2003). Este ensayo se realizó típicamente en un formato de alto rendimiento utilizando placas de cultivo celular de 96 pozos. Cada pozo contenía 150 µl de medio de crecimiento de sales de DF suplementado con 2,0 g/l $(NH_4)_2SO_4$. Los cultivos y los medios se distribuyeron y transfirieron asépticamente utilizando una herramienta de pasador resistente a autoclave bajo una campana de flujo laminar. Después de la transferencia, los cultivos se incubaron a 30 °C durante 2 días. Después de alcanzar la turbidez, los cultivos se transfirieron por segunda vez utilizando una herramienta de alfiler estéril debajo de una

campana de flujo laminar en placas de 96 pozos que contenían 150 µl por pozo de medio de crecimiento de sales DF suplementado con ACC 5 mM como única fuente de nitrógeno, seguido mediante una incubación de 4 días a 30 °C. La absorbancia de cada cultivo a 600 nm se midió usando un espectrofotómetro. Los aislamientos que mostraron un crecimiento robusto en estas condiciones (DO >0,2) se llevaron a cabo para un análisis adicional de la actividad de desaminasa ACC como se describe en Penrose and Glick, 2003, supra.

Los resultados de la prueba, tal como se resumen en la Tabla 2, indicaron que los siguientes aislamientos produjeron cantidades significativas de ACC desaminasa: SGI-003-H11, SGI-026-G06, SGI-026-G07 y SGI-041-B03.

Producción de 2,3-butanodiol:

La capacidad de los aislamientos bacterianos para sintetizar 2,3-butanodiol in vitro se evaluó de la siguiente manera usando la espectroscopía de masas con cromatografía de gases capilar como se describe por Ryu et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 100: 4927-4932, 2003). Este ensayo se realizó típicamente en un formato de alto rendimiento utilizando placas de cultivo celular de 96 pozos con 150 µl de medio de crecimiento de sales DF por pozo. También se puede usar un Titer-tek cuando se prepara una gran cantidad de placas para pantallas primarias de grandes colecciones de aislamientos. Los cultivos y los medios se distribuyeron y transfirieron asépticamente utilizando una herramienta de pasador resistente a autoclave bajo una campana de flujo laminar. Después de la transferencia, los cultivos se incubaron a 30 °C durante 5 días. Después de la incubación, los sobrenadantes del cultivo se recogieron por centrifugación utilizando una placa de filtro de 96 pozos de 0,22 µM. Cincuenta microlitros de sobrenadante filtrado de cada pozo se transfirieron a los pozos correspondientes de una placa profunda de 96 pozos que contenía 450 µl de metanol al 50 % por pozo usando una pipeta multicanal L200 y se sellaron con un sello de placa adhesiva, seguido de un ensayo de cuantificación de 2,3-butanodiol utilizando el protocolo descrito por Ryu et al. (2003, supra). Los resultados de la prueba, tal como se resume en la Tabla 2, indicaron que los siguientes aislamientos produjeron cantidades significativas de 2,3-butanodiol: SGI-003-H11, SGI-034-C09 y SGI-041-B03.

Producción de auxina:

Las auxinas son hormonas que pueden afectar directamente el crecimiento de las plantas. Este ensayo se realizó para determinar si los aislamientos bacterianos producían auxinas, ya que se sabe que muchos aislamientos de rizosfera y bacterias endofíticas poseen vías bioquímicas que sintetizan el ácido auxina indol-3-acético (IAA) y sus derivados. El triptófano es a menudo un precursor en esta síntesis; y, por lo tanto, este ensayo cuantificó la producción de IAA (auxina) a partir de aislados bacterianos cultivados en un medio suplementado con una baja concentración del aminoácido triptófano.

Este ensayo se realizó típicamente en un formato de alto rendimiento utilizando placas de cultivo celular de 96 pozos con 150 µl de medio de crecimiento YT por pozo. Al preparar una gran cantidad de placas para pantallas primarias de grandes colecciones de aislamientos, se utilizó un Titer-tek. Los cultivos y los medios se distribuyeron y transfirieron asépticamente utilizando una herramienta de pasador resistente a autoclave bajo una campana de flujo laminar. Después de la transferencia, los cultivos se incubaron a 30 °C durante 5 días. Después de la incubación, los sobrenadantes del cultivo se recogieron por centrifugación utilizando una placa de filtro de 96 pozos de 0,22 µM. Diez microlitros de sobrenadante filtrado de cada pozo se transfirieron a una placa de ensayo Falcon. Se agregaron doscientos microlitros de la solución de ensayo de Salkowsky (Gordon and Weber, Plant Physiol. 26: 192-195, 1951) a cada uno de los pozos sobrenadantes y estándar, seguido de incubación a temperatura ambiente durante 15-20 min. La reacción se controló mediante la absorbancia de la placa en el SpectroMax M2 a 535 nm ya que el cambio de color de amarillo a púrpura/rosa de la solución de ensayo de Salkowsky fue proporcional a la concentración de auxina (IAA) en cada pozo. Los resultados de la prueba, como se resume en la Tabla 2, indicaron que los siguientes aislamientos produjeron cantidades significativas de la fitohormona auxina: SGI-003-H11, SGI-020-A01, SGI-034-C09, SGI-034-C09 y SGI- 041-B03.

Tabla 2: Características bioquímicas de los aislados bacterianos (ND: no detectable).

Aislamientos bacterianos		**Actividad bioquímica**				
Identificación de aislamiento	Taxonomía provisional	Producción de auxinas	ACC-desaminasa	2,3-butanodiol	N-fijación	Solubilización de fósforo
003_H11	*Pantoea agglomerans*	Sí	Sí	Sí	ND	ND
020_A01	*Bacillus thuringiensis*	Sí	ND	ND	ND	ND
026_G06	*Burkholderia metallica*	ND	Sí	ND	ND	ND
026_G07	*Burkholderia vietnamiensis*	ND	Sí	ND	Sí	ND

Aislamientos bacterianos		**Actividad bioquímica**				
Identificación de aislamiento	Taxonomía provisional	Producción de auxinas	ACC-desaminasa	2,3-butanodiol	N-fijación	Solubilización de fósforo
034_C09	*Bacillus pumilus*	Sí	ND	Sí	ND	ND

(continuación)

Aislamientos bacterianos		**Actividad bioquímica**				
Identificación de aislamiento	Taxonomía provisional	Producción de auxinas	ACC-desaminasa	2,3-butanodiol	N-fijación	Solubilización de fósforo
034_E10	*Herbaspirillum sp.*	ND	ND	ND	ND	ND
041_B03	*Pedobacter sp.*	Sí	Sí	Sí	ND	ND

Ejemplo 5: Actividad de biocontrol de los aislados bacterianos contra fitopatógenos fúngicos.

Se usó un ensayo de antagonismo in vitro para evaluar la capacidad de las cepas bacterianas aisladas para suprimir el desarrollo de varios patógenos fúngicos de plantas, incluyendo patógenos *Fusarium graminearum* NRRL-5883, *Monographella nivalis* ATCC MYA-3968, *Gibberella zeae* ATCC-16106, *Stagnospora nodurum* ATCC-26369, *Colletotrichum graminicola* ATCC-34167 y un *Penicillium sp*.. El ensayo se realizó en medio de agar patata dextrosa (PDA). Se cultivaron cepas aisladas de bacterias en agar de caldo de soja Tryptic de un quinto de potencia (TSBA/5) durante 24 h antes del uso.

Para cada patógeno fúngico, se produjo un inóculo conidial picando hifas a una colonia del hongo en crecimiento activo y transfiriendo las hebras hifales al medio de agar PDA. Después de incubar las placas durante 7 días a 25 ºC usando un fotoperíodo de 12 h/día, se lavaron los conidios fúngicos de las placas PDA usando un tampón de fosfato débil (tampón de fosfato al 0,004 %, pH 7,2, con $MgCl_2$ al 0,019 %). Luego se asperjó inmediatamente una suspensión de conidias fúngicas en el tampón de fosfato débil (aproximadamente 1 x 10^5 conidias/ml) sobre la superficie de agar, y las placas rociadas se incubaron a 25 °C durante 48-72 h antes de su uso en pruebas de antagonismo.

Para iniciar las pruebas de antagonismo, las células de cepas microbianas aisladas se inocularon en puntos a distancias iguales dentro del perímetro de la placa. Después de cinco días, las cepas bacterianas se puntuaron como antibiosis positivas cuando existía un área visiblemente despejada (es decir, zona de inhibición del crecimiento) que carecía de crecimiento micelar alrededor del perímetro de las colonias microbianas. Los resultados de los ensayos de antagonismo, como se resume en la Tabla 3, demostraron que cada uno de los microorganismos divulgados en la presente memoria inhibió el desarrollo de varios fitopatógenos fúngicos, incluidos *Fusarium graminearum, Monographella nivalis, Gibberella zeae, Stagnospora nodurum, Colletotrichum graminicola, Penicillium sp*.

Tabla 3: Actividad de biocontrol de los aislados bacterianos contra fitopatógenos fúngicos.

Aislamientos bacterianos		**Supresión del crecimiento de hongos patógenos** (zona de inhibición puntuada después de 5 días de incubación)					
Identificación de aislamiento	Taxonomía Provisional	*Fusarium graminearum*	*Monographella nivalis*	*Gibberella zeae*	*Stagnospora nodurum*	*Colletotrichum graminicola*	*Penicillium sp.*
003_H11	*Pantoea agglomerans*	No	Sí	No	No	No	No
020_A01	*Bacillus thuringiensis*	Sí	No	Sí	Sí	Sí	No
026_G06	*Burkholderia metallica*	No	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí
026_G07	*Burkholderia vietnamiensis*	No	Sí	No	No	No	No
034_C09	*Bacillus pumilus*	No	No	No	Sí	No	No
034_E10	*Herbaspirillum* sp.	No	No	No	Sí	No	No
041_B03	*Pedobacter* sp.	No	Sí	No	Sí	Sí	Sí

Ejemplo 6: Mejora del potencial de rendimiento de trigo

Los efectos de la inoculación bacteriana en el crecimiento y rendimiento de las plantas se estudiaron en un invernadero con el aislado SGI-020-A01. Las suspensiones de células microbianas se prepararon como sigue. Medio 2YT, o medio de crecimiento similar, se inocularon cultivos de caldo a partir de las existencias de glicerol o placas rayadas del aislado. Típicamente, antes de su uso en la cámara de crecimiento, invernadero o campo, se iniciaron cultivos bacterianos 48-72 h para permitir que los cultivos alcancen una fase exponencial tardía. Los aislamientos que tienen tiempos de duplicación más largos se iniciaron con mayor anticipación. Los cultivos se incubaron a 30 °C en un agitador rotatorio a 200 rpm. Después del crecimiento, las células se sedimentaron a 10.000 x g durante 15 minutos a 4 ºC y se resuspendieron en tampón $MgSO_4$ 10 mM (pH 7,0). Las densidades celulares se normalizaron para cada aislado sobre una base de UFC/ml. Típicamente, se prepararon suspensiones de ~10^9 CFU/ml para cada aislado y se transportaron en hielo al sitio de inoculación. Las inoculaciones se realizaron diluyendo estas suspensiones celulares 1/20 en agua de riego hasta una densidad final de 5 x 10^7 UFC/ml. Para ensayos en macetas de 1 litro, se distribuyeron 20 ml de esta suspensión celular diluida de manera uniforme sobre la superficie de cada maceta replicada.

El ensayo de invernadero se realizó con un suelo de campo deficiente en nutrientes. Después de eliminar rocas grandes y escombros, el suelo del campo se mezcló a fondo para garantizar la homogeneidad. Después del llenado, el suelo en cada una de las macetas se presionó ~2 cm para obtener una capa de siembra firme. Las semillas de un cultivar de trigo comercial (trigo de primavera rojo duro; Howe Seeds, Inc.) se sembraron en macetas de 1 litro que contenían medio de suelo de campo (macetas de plástico de diámetro cónico de 10,5 cm x 12,5 cm). Se distribuyeron dos gramos de semillas de trigo de primavera (aproximadamente 70 semillas) de manera uniforme en cada maceta y se aplicaron 50 ml de tierra de campo y se extendieron uniformemente sobre la capa de semillas. Después de la aparición uniforme del coleóptilo de trigo y la posterior aparición de la primera hoja, la población de plantas se inoculó con 20 ml de 10^9 UFC/ml de SGI-020-A01. Las plantas de controles negativos recibieron solo 20 ml de tampón de inóculo. Cada condición se realizó en 8 niveles replicados, cada uno con cuatro macetas de 1 litro (n=4 por nivel). Los niveles se distribuyeron aleatoriamente en cuatro bloques experimentales. Las semillas y las plantas se mantuvieron luego en un invernadero durante 60 días a temperatura ambiente (en un intervalo de aproximadamente 8 °C a aproximadamente 22 °C) con ciclos de luz diurna de aproximadamente 11,5 h de luz solar/12 h de oscuridad durante todo el ensayo. Las plantas se regaron uniformemente por el fondo hasta el nivel de hidratación apropiado dependiendo de la temperatura y la etapa de crecimiento. Aproximadamente 30 días después de la siembra, se apostaron aproximadamente 70 individuos por maceta y se unieron libremente para evitar la contaminación cruzada y minimizar los efectos posicionales debido a la variación en las plantas que caen en otras macetas. Aproximadamente 60 días después de la siembra, las plantas se dejaron secar en preparación para la cosecha. Las testas de trigo se cosecharon aproximadamente a los 80 d después de la siembra. Cada testa de trigo se eliminó cortando justo debajo de la testa. Las testas de trigo dentro de cada replica de maceta se agruparon, se pesaron y posteriormente se usaron como una estimación del potencial de rendimiento. Todas las plantas de la población se cosecharon el mismo día y los tratamientos se cosecharon en un orden aleatorio para eliminar grandes diferencias de tiempo entre cosechas entre tratamientos. Como resultado, las plantas de trigo tratadas con el aislado SGI-020-A01 mostraron un aumento del 40 % en el potencial de rendimiento en comparación con las plantas de control no tratadas (2,95 g/maceta frente a 2,10 g/maceta). Los promedios y las desviaciones estándar se documentaron en las 8 réplicas y se realizó un ANOVA (Análisis de varianza). La eficacia del aislado microbiano SGI-020-A01 para mejorar el potencial de rendimiento de trigo se cuantificó analizando el rendimiento de la testa de trigo en peso para cada réplica de maceta. Los valores de $p < 0.05$ se consideraron significativos.

Ejemplo 7: Mejora de la producción de biomasa en el maíz

Los efectos de la inoculación bacteriana en el crecimiento y rendimiento de la planta se estudiaron en experimentos de invernadero con cada uno de los siguientes aislamientos bacterianos: SGI-034-C09, SGI-034-E10, SGI-003-H11, SGI-041-B03, SGI -026-G06 y SGI-026-G07. Las pruebas de invernadero se realizaron con un suelo de campo deficiente en nutrientes. Después de remover rocas grandes y escombros, el suelo del campo se mezcló completamente con tierra para macetas (70:30) para asegurar la homogeneidad. Después del llenado, el suelo en cada una de las macetas se presionó ~2 cm para obtener una capa de siembra firme. Se sembraron semillas de un cultivo comercial de maíz (Dow AgroSciences) en macetas de 1 litro (macetas cónicas de 10,5 cm x 12,5 cm), cada una de las cuales contenía medio de suelo. Se distribuyeron dos granos de maíz de manera uniforme en cada maceta en orientación embrionaria, seguido de la aplicación de 50 ml de tierra de campo, que se extendió uniformemente sobre la capa de semillas. Después de la germinación, se realizó el sacrificio de una plántula por maceta si fuera necesario para que cada maceta contuviera solo una planta.

Después de la aparición uniforme de coleóptilo de maíz y la posterior aparición de la primera hoja, la población de plantas se inoculó con ~20 ml de 10^9 UFC/ml de un aislado microbiano seleccionado del grupo de SGI-034-C09, SGI-034-E10, SGI-003-H11, SGI-041-B03, SGI-026-G06 y SGI-026-G07. Las suspensiones de células microbianas se prepararon como se describe en el Ejemplo 6 anterior. Las plantas de controles negativos recibieron solo 20 ml de tampón de inóculo.

Cada condición se realizó en 8 niveles replicados, cada uno con dos macetas de 1 litro (n=2 por nivel). Los niveles se distribuyeron aleatoriamente en cuatro bloques experimentales. Las semillas y las plantas se mantuvieron en un

invernadero durante 60 días a temperatura ambiente (de 8 °C a 22 °C) con ciclos de luz diurna de aproximadamente 11,5 h de luz solar/12 h de oscuridad durante todo el ensayo. Las plantas se regaron uniformemente por el fondo hasta el nivel de hidratación apropiado dependiendo de la temperatura y la etapa de crecimiento. La biomasa aérea del maíz se cosechó aproximadamente a los 60 días después de la siembra.

Todas las plantas de la población se cosecharon el mismo día y los tratamientos se cosecharon en un orden aleatorio para eliminar grandes diferencias de tiempo entre cosechas entre tratamientos. Las plantas de maíz fueron analizadas para determinar la diferencia en la biomasa total. Como se documenta en la Tabla 4, las plantas de maíz tratadas con cada uno de los aislados microbianos mostraron un aumento significativo en la biomasa total en comparación con las plantas de control no tratadas. Los promedios y las desviaciones estándar se documentaron en las 8 réplicas y se realizó un ANOVA (Análisis de varianza).

Tabla 4: Eficacia de los aislamientos microbianos para mejorar la biomasa vegetal total.

Tratamiento	Biomasa vegetal (g)	Valor p	Aumento de biomasa (%)
No tratado	58,6	N/A	N/A
SGI-034-C09	106,3	<,0001	181 %
SGI-034-E10	103,6	<,0001	177 %
SGI-003-H11	100,7	<,0001	172 %
SGI-041-B03	99,5	0,0001	170 %
SGI-026-G06	98,3	0,0002	168 %
SGI -026-G07	97,3	0,0003	166 %

Ejemplo 8: Tratamiento de recubrimiento de semillas de trigo y semillas de maíz

Se llevaron a cabo experimentos de tratamiento de semillas a pequeña escala siguiendo un procedimiento descrito en Sudisha et al. (Phytoparasitica, 37: 161-169, 2009) con modificaciones menores. Típicamente, se preparó una solución madre de biopolímero agregando 1 g de goma arábiga en polvo (MP Biomedical) a 9 ml de agua y mezclando hasta homogeneidad. Culturas turbias de células microbianas en crecimiento activo o preparaciones de esporas microbianas se lavaron con PBS y se ajustaron a un OD600 de ~5,0. Se sedimentaron tres ml de la suspensión celular ajustada mediante centrifugación en un tubo Falcon de 50 ml. El sobrenadante resultante se decantó, se reemplazó con 3 ml de solución madre de biopolímero y la suspensión resultante se mezcló a fondo. Típicamente, se añadieron aproximadamente 25 g de semillas al tubo Falcon y se agitaron o agitaron vigorosamente para asegurar una distribución uniforme de la suspensión de goma/célula. Las semillas recubiertas se extendieron a través de pesas de plástico para secar en una campana de flujo laminar hasta que ya no estaban pegajosas, generalmente 3 h con mezcla periódica. Las semillas recubiertas se almacenaron luego a 4 °C y se analizaron periódicamente para determinar su estabilidad. Una variedad de semillas de trigo y semillas de maíz fueron recubiertas y probadas de la manera descrita anteriormente, incluyendo variedades comunes de trigo de primavera roja dura Briggs, Faller, Glenn, Hank, RB07, Samson; variedades de trigo duro rojo de invierno Jerry, McGill, Overland; y la variedad de semillas de maíz DKC62-61, así como un cultivar de maíz comercial (Dow AgroSciences).

Se realizaron pruebas de viabilidad en los microbios utilizados en la formulación del recubrimiento de semillas usando un procedimiento estándar de recuento en placa. Típicamente, se analizó una cantidad predeterminada de semillas recubiertas para detectar la presencia de microbios viables lavando las semillas en una alícuota de tampón apropiado y colocando cantidades equivalentes de tampón en medio de agar nutritivo. Las unidades formadoras de colonias viables se determinaron después de 1-4 días de incubación a 30 °C. La prueba de viabilidad mostró que entre 1×10^4 y 4×10^7 unidades formadoras de colonias viables por semilla estaban presentes después de aproximadamente cinco semanas de almacenamiento a 4 °C. Cuando las semillas se recubrieron con esporas microbianas, la viabilidad de la mayoría de los microbios probados se mantuvo estable durante al menos cuatro meses, incluidos los envíos interestatales múltiples a través de los Estados Unidos, dentro y fuera de los contenedores refrigerados. Cuando se almacenaron bajo refrigeración (4 °C), los microbios sobrevivieron en la cubierta de las semillas con poca pérdida de viabilidad durante los períodos de prueba. Los resultados indicaron que las semillas recubiertas con las composiciones divulgadas en la presente memoria podrían almacenarse durante períodos prolongados bajo refrigeración y sugirieron que los microbios sobrevivirían durante períodos de temperaturas más altas para su distribución. Además, la tasa de germinación de las semillas recubiertas se probó y se determinó que era esencialmente idéntica a las semillas de control, que eran semillas recubiertas con goma arábiga solamente o semillas sin recubrir.

Ejemplo 9: Formulación en estado sólido de las composiciones microbianas

Esta sección describe una formulación de ejemplo de un fertilizante microbiano donde las bacterias están encapsuladas y el fertilizante está en forma sólida. Las perlas de alginato se preparan de la siguiente manera:

Se agrega un mililitro de glicerol al 30 % a una solución de alginato de sodio al 1, 1,5 o 2 %, dependiendo de las propiedades del alginato (relación M/G) para obtener un volumen final de 25 ml. Las células bacterianas de un cultivo de 250 ml obtenidas de uno de los aislamientos bacterianos de la invención o de una combinación de dos o más aislamientos se sedimentan por centrifugación, luego se lavan con una solución salina (NaCl al 0,85 %, p/v), se suspenden en 25 ml de mezcla de alginato, y se mezcla bien. Esta suspensión celular se agrega luego gota a gota en una solución acuosa de $CaCl_2$ estéril preenfriada al 1,5 o 2 % (p/v) bajo agitación suave para obtener las perlas de alginato bacteriano. Estas perlas se dejan endurecer durante 2-4 h a temperatura ambiente. Las perlas se recogen por tamizado y se lavan varias veces con agua estéril y se almacenan a 4 °C. Para preservar la formulación, las perlas húmedas frescas se pueden congelar a aproximadamente -80 °C antes de la liofilización a aproximadamente -45 °C durante 15 h. Las perlas secas liofilizadas se pueden almacenar en recipientes apropiados, como botellas de vidrio estériles.

Para estimar los recuentos viables, las bacterias encapsuladas pueden liberarse de las perlas resuspendiendo 100 mg de perlas en solución salina tamponada con fosfato (pH 7,0) durante 30 minutos seguido de homogeneización. El número total de bacterias liberadas se determina mediante el procedimiento estándar de recuento en placa después de incubar a 30 °C durante 48 h. A intervalos de un mes, las densidades celulares en las perlas se enumeran utilizando un procedimiento similar.

Ejemplo 10: Compatibilidad de las composiciones microbianas con fungicidas comerciales.

A medida que aumentan las preocupaciones ambientales sobre el uso de plaguicidas en la agricultura, las alternativas biológicas se perciben cada vez más como inevitables. Sin embargo, las nuevas formulaciones biológicas también deben permitir que los organismos sobrevivan y expresen su impacto beneficioso específico. Los fungicidas químicos son generalmente tóxicos no solo para los microorganismos nocivos sino también para los beneficiosos. Sin embargo, la posibilidad de supervivencia de estos agentes microbianos podría haber mejorado cuando se aplica a tasas reducidas.

En el presente estudio, se usa material vehículo a base de turba para la inoculación tanto del fungicida tratado como de la semilla del cultivo desnudo. La tolerabilidad bacteriana del fungicida generalmente se evalúa de la siguiente manera: a) semillas desnudas inoculadas con bacterias cultivadas en un medio de crecimiento bacteriano apropiado tal como placas de agar de tripticasa de soja (TSA; Triptona 15 g/l; Soja 5 g/l, cloruro de sodio 5 g/l, y agar 15 g/1), b) semillas inoculadas con bacterias tratadas con fungicida cultivadas en placas TSA comunes, y, c) semillas inoculadas con bacterias tratadas con fungicida cultivadas en bolsas de crecimiento estériles. Por lo general, se utilizan tres concentraciones de fungicida en cada uno de los experimentos: la dosis recomendada por el fabricante y dos dosis más bajas (al 75 % y 50 % de la dosis recomendada). Las semillas inoculadas con bacterias tratadas con fungicidas se almacenan después de la inoculación y se usan a diferentes intervalos de tiempo (2 h, 4 h y 6 h) para examinar el impacto en la germinación de las semillas. Tanto la germinación de la semilla como la presencia bacteriana se controlan en placas de Petri. Para el estudio de la bolsa de crecimiento, se usan semillas tratadas con fungicida (dosis recomendada) y se midieron las longitudes de raíz e hipocotilo a los 7 días de crecimiento de las plántulas.

Algunos aislamientos de rizobacterias divulgados en la presente memoria son compatibles con varios fungicidas usados comúnmente según lo determinado por el crecimiento bacteriano en placas de TSA enriquecidas con fungicida. En general, tanto las semillas desnudas como las tratadas con fungicida, recubiertas con turba inoculada, no muestran variaciones significativas en la germinación en comparación con el control no inoculado. Además, se observan efectos promotores del crecimiento en la longitud total de las raíces y plántulas en todos los tratamientos de rizobacterias en comparación con el control no inoculado.

Ejemplo 11: Desarrollo de cultivares de origen no natural y programa de reproducción

Las bacterias endófitas divulgadas en la presente memoria se introducen en plantas de cultivo, incluidos cereales, de genotipos y origen geográfico variados, que carecen de tales hongos endofíticos, para crear combinaciones planta-endófito con características agronómicas mejoradas, usando procedimientos análogos a los conocidos en la técnica, que incluyen los descritos en la publicación de Solicitud de Patente de los Estados Unidos 20030195117 y 20010032343; y la Patente de los Estados Unidos 7,084,331, entre otras. Por lo tanto, se pueden crear y seleccionar combinaciones sintéticas de plantas y endófitas en un programa de desarrollo de reproducción/cultivo basado en su capacidad para formar y mantener una combinación mutualista que resulte en un beneficio agronómico. La calificación de las características agronómicas de la combinación también se puede utilizar en dicho programa de reproducción. Estas características pueden incluir tolerancia a la sequía, acumulación de biomasa, resistencia a la infestación por insectos, palatabilidad para el ganado (por ejemplo, herbívoros), facilidad de reproducción y rendimiento en semillas. Dichas combinaciones pueden diferir en los niveles de acumulación de metabolitos microbianos que son tóxicos para las plagas y las malezas, incluidos los niveles de alcaloides del cornezuelo de centeno, los niveles de lolina, los niveles de peramina o los niveles de lolitrem, a la vez muestran las características agronómicas deseadas de las plantas de cultivo, incluida la resistencia a la alimentación de insectos o la infestación

, resistencia al estrés abiótico, palatabilidad para el ganado, acumulación de biomasa, facilidad de reproducción y rendimiento de semillas.

Ejemplo 12: Estudio de rendimiento

Las semillas de maíz (Zea mays) se recubrieron con diferentes tratamientos microbianos y se sembraron en un campo preparado. Cada tratamiento se repitió 5 veces en diseño de bloques completos al azar. Una sola réplica consistió en cuatro camas (filas) de 9,1 m (30 pies) de largo, se sembraron 60 semillas (separadas por 15 cm (6 pulgadas)) en cada cama. Para fines de observación, los datos se tomaron solo de las dos filas del medio.

La emergencia de la planta se registró dos veces como se muestra en la Tabla 5 a continuación como el porcentaje de plantas en la réplica que habían brotado. Diez plantas en las dos filas centrales de cada maceta fueron marcadas con una cinta de plástico para registrar las estadísticas vitales como la altura de la planta, la medición de clorofila y el peso de las plantas.

Las alturas de las plantas (midiendo la punta de la hoja más alta/más larga) registradas 31 y 56 días después de la siembra indicaron que la altura de la planta entre los tratamientos no fue significativamente diferente. La mayoría de las plantas estaban secas y las hojas se habían encogido para el día 110 después de la siembra, por lo tanto, en algunos casos, las plantas parecían (medidas) más cortas que en la medición anterior, pero en general, la altura de la planta no difirió entre los tratamientos. En la quinta semana de siembra, se midió el contenido de clorofila (en unidades SPAD) de las hojas inferiores (aproximadamente 60 cm sobre el suelo) y las hojas superiores (segunda hoja completamente expandida desde la parte superior) de diez plantas marcadas de cada maceta. El contenido de clorofila entre los tratamientos no difirió significativamente. En el día 110 y 111 de siembra, se cosechó el cultivo. Se cortaron diez plantas marcadas de cada maceta a nivel del suelo y sobre las partes del suelo de las plantas se pesaron (peso total de la planta o WPtWt), se extrajeron las mazorcas de maíz y se midió la longitud de la mazorca (longitud de la mazorca con granos) (región llena de granos comercializables solamente), luego se sacaron los granos de la mazorca y se midió su peso para el peso del grano por espiga (KnlWt/espiga).

Poco después de que finalizara la cosecha manual de 10 plantas por maceta, se trajo una cosechadora mecánica, Gleaner® K2 (Allis-Chalmers Mfrg, Milwaukee, WI). Esta máquina eliminó mecánicamente las plantas restantes de dos filas centrales de cada maceta, quitó los granos de las mazorcas, y tomó la medida de la humedad y el peso del grano (10 espigas + cosecha de la máquina). El rendimiento total proyectado con un contenido de humedad de 15,5 % (kg (libras) de grano de maíz por ha (acre)) basado en el peso (kg (lb)) de granos (incluidos los granos de mazorcas cosechadas a máquina + mazorcas cosechadas manualmente) fue 11621 kg por ha (10368,14 libras por acre) o 2640 l por ha (185,15 bushels por acre) para SGI-003-H11 (*Pantoea agglomerans*). Este fue el rendimiento más alto entre todos los tratamientos de organismos y significativamente diferente de los tratamientos para *Bacillus amyloliquefaciens* SGI-015_F03. El otro gran productor fue el tratamiento con *Bacillus thuringiensis* SGI-020_A01.

En conclusión, todas las plantas en los diferentes tratamientos emergieron y crecieron de manera similar en las condiciones de campo provistas con la misma cantidad de fertilizante, herbicida preemergente (con extracción manual de malezas más adelante en la temporada) y riego semanal durante el crecimiento y estación cálida, y control de plagas, especialmente del gusano del maíz. Con todas las condiciones iguales, el tratamiento con SGI-003-H11 (*Pantoea agglomerans*) produjo el mayor rendimiento sobre el tratamiento de control no microbiano. Por lo tanto, 003_H11 produjo un rendimiento de aproximadamente un 17 % más alto que el grupo de control. Por lo tanto, en diversas realizaciones de la invención, la aplicación de una cantidad eficaz del organismo según cualquiera de los procedimientos descritos en la presente memoria produce al menos 10 % o al menos 12,5 % o al menos 15 % o aproximadamente 17 % más de rendimiento que un grupo de control, que en algunos casos puede determinarse por kg (libras) de producto vegetal (por ejemplo, mazorcas de maíz) por ha (acre) o 1 (bushels) de producto vegetal por ha (acre). Los organismos enumerados en la Tabla 5 son SGI-003-H11 (*Pantoea agglomerans*); SGI-015-F03 (*Bacillus amyloliquefaciens*); y SGI-020-A01 (*Bacillus thuringiensis*).

Tabla 5

Organismo	Aparición	Aparición	Altura	Altura	Altura
Dato	6/20	6/24	7/11	8/5	9/28
Control	97,00	94,50	103,64	277,22	267,82
SGI-003-H11	89,50	93,34	103,32	273,58	272,04
SGI-015-F03	95,67	96,67	105,02	282,02	276,08
SGI-020-A01	94,83	95,33	102,04	268,94	264,80

Organismo	Hoja superior	Hoja inferior	Peso total de la planta	Longitud de espiga con grano
Dato	7/18	7/18	9/28	9/28
Control	43,24	60,85	493,24	14,98
SGI-003-H11	44,17	59,43	494,92	14,29
SGI-015-F03	44,90	63,96	473,40	14,45
SGI-020-A01	46,45	63,84	488,30	14,20

Organismo	Peso granos/espiga (g)	Peso granos/espiga(kg (lb))	10 espigas+máquina	10 espigas+máquina
Dato	9/28	9/28	9/29	9/29
Control	168,62	0,17 (0,37)	157.81	8837,63
SGI-003-H11	171,96	0,17 (0,38)	185,15	10368,14
SGI-015-F03	156,24	0,15 (0,34)	161,17	9025,62
SGI-020-A01	158,68	0,16 (0,35)	163,09	9133,16

Listado de secuencias

<110> SYNTHETIC GENOMICS, INC.

BULLIS, DAVID T.

GRANDLIC, CHRISTOPHER J.

MCCANN, RYAN

KEROVUO, JANNE S.

<120> MICROBIOS QUE PROMUEVEN EL CRECIMIENTO DE PLANTAS Y USOS DE LOS MISMOS

<130> SGI1540-1WO

<160> 11

<170> PatentIn Version 3.5

<210> 1

<211> 1436

<212> ADN

<213> *Pantoea agglomerans*

<220>

<221> características_misceláneas

aislado bacteriano SGI SGI-003_H11

<220>

<221> características_misceláneas

<223> codifica un ARN ribosómico 16S

<220>

<221> características_misceláneas

<222> (62)..(63)

<223> n es a, c, g, o t

<400> 1

gctggcggca ggcctaacac atgcaagtcg agcggtagca cagagagctt gctctcgggt 60

gnngagcggc ggacgggtga gtaatgtctg ggaaactgcc tgatggaggg ggataactac 120

tggaaacggt agctaatacc gcataacgtc gcaagaccaa agtgggggac cttcgggcct 180

catgccatca gatgtgccca gatgggatta gctagtaggt gaggtaatgg ctcacctagg 240

cgacgatccc tagctggtct gagaggatga ccagccacac tggaactgag acacggtcca 300

gactcctacg ggaggcagca gtggggaata ttgcacaatg ggcgcaagcc tgatgcagcc 360

atgccgcgtg tatgaagaag gccttcgggt tgtaaagtac tttcagcgag gaggaaggcg 420

ataaggttaa taaccttgtc gattgacgtt actcgcagaa gaagcaccgg ctaactccgt 480

gccagcagcc gcggtaatac ggagggtgca agcgttaatc ggaattactg ggcgtaaagc 540

gcacgcaggc ggtctgtcaa gtcggatgtg aaatccccgg gctcaacctg ggaactgcat 600

ccgaaactgg caggctagag tcttgtagag gggggtagaa ttccaggtgt agcggtgaaa 660

tgcgtagaga tctggaggaa taccggtggc gaaggcggcc ccctggacaa agactgacgc 720

tcaggtgcga aagcgtgggg agcaaacagg attagatacc ctggtagtcc acgctgtaaa 780

cgatgtcgac ttggaggttg ttcccttgag gagtggcttc cggagctaac gcgttaagtc 840
gaccgcctgg ggagtacggc cgcaaggtta aaactcaaat gaattgacgg gggcccgcac 900

aagcggtgga gcatgtggtt taattcgatg caacgcgaag aaccttacct actcttgaca 960

tccagagaac ttagcagaga tgctttggtg ccttcgggaa ctctgagaca ggtgctgcat 1020

ggctgtcgtc agctcgtgtt gtgaaatgtt gggttaagtc ccgcaacgag cgcaaccctt 1080

atcctttgtt gccagcggtt cggccgggaa ctcaaaggag actgccagtg ataaactgga 1140

ggaaggtggg gatgacgtca agtcatcatg gcccttacga gtagggctac acacgtgcta 1200

caatggcata tacaaagaga agcgacctcg cgagagcaag cggacctcat aaagtatgtc 1260

gtagtccgga tcggagtctg caactcgact ccgtgaagtc ggaatcgcta gtaatcgtgg 1320

atcagaatgc cacggtgaat acgttcccgg gccttgtaca caccgcccgt cacaccatgg 1380

gagtgggttg caaaagaagt aggtagctta accttcggga gggcgcttac cacttt 1436

<210> 2

<211> 1440

<212> ADN

<213> *Bacillus thuringiensis*

<220>

<221> características_misceláneas

<223> Aislado bacteriano SGI SGI-020_A01

<220>

<221> características_misceláneas

<223>codifica un ARN ribosómico 16S

<400> 2

```
cgtgcctaat acatgcaagt cgagcgaatg gattaagagc ttgctcttat gaagttagcg      60

gcggacgggt gagtaacacg tgggtaacct gcccataaga ctgggataac tccgggaaac     120

cggggctaat accggataat attttgaact gcatggttcg aaattgaaag gcggcttcgg     180

ctgtcactta tggatggacc cgcgtcgcat tagctagttg gtgaggtaac ggctcaccaa     240

ggcaacgatg cgtagccgac ctgagagggt gatcggccac actgggactg agacacggcc     300

cagactccta cgggaggcag cagtagggaa tcttccgcaa tggacgaaag tctgacggag     360

caacgccgcg tgagtgatga aggctttcgg gtcgtaaaac tctgttgtta gggaagaaca     420

agtgctagtt gaataagctg gcaccttgac ggtacctaac cagaaagcca cggctaacta     480

cgtgccagca gccgcggtaa tacgtaggtg gcaagcgtta tccggaatta ttgggcgtaa     540

agcgcgcgca ggtggtttct taagtctgat gtgaaagccc acggctcaac cgtggagggt     600

cattggaaac tgggagactt gagtgcagaa gaggaaagtg gaattccatg tgtagcggtg     660

aaatgcgtag agatatggag gaacaccagt ggcgaaggcg actttctggt ctgtaactga     720

cactgaggcg cgaaagcgtg gggagcaaac aggattagat accctggtag tccacgccgt     780

aaacgatgag tgctaagtgt tagagggttt ccgcccttta gtgctgaagt taacgcatta     840
agcactccgc ctggggagta cggccgcaag gctgaaactc aaaggaattg acgggggccc     900

gcacaagcgg tggagcatgt ggtttaattc gaagcaacgc gaagaacctt accaggtctt     960

gacatcctct gaaaacccta gagatagggc ttctccttcg ggagcagagt gacaggtggt    1020

gcatggttgt cgtcagctcg tgtcgtgaga tgttgggtta agtcccgcaa cgagcgcaac    1080

ccttgatctt agttgccatc attaagttgg gcactctaag gtgactgccg gtgacaaacc    1140

ggaggaaggt ggggatgacg tcaaatcatc atgcccctta tgacctgggc tacacacgtg    1200

ctacaatgga cggtacaaag agctgcaaga ccgcgaggtg gagctaatct cataaaaccg    1260

ttctcagttc ggattgtagg ctgcaactcg cctacatgaa gctggaatcg ctagtaatcg    1320

cggatcagca tgccgcggtg aatacgttcc cgggccttgt acacaccgcc cgtcacacca    1380

cgagagtttg taacacccga agtcggtggg gtaacctttt tggagccagc cgcctaaggt    1440
```

<210> 3

<211> 1414

<212> ADN

<213> *Burkholderia metallica*

<220>

<221> características_misceláneas

<223> Aislado bacteriano SGI SGI-026_G06

<220>

<221> características_misceláneas

<223> codifica un ARN ribosómico 16S

<400> 3

```
catgcaagtc gaacggcagc acgggtgctt gcacctggtg gcgagtggcg aacgggtgag      60
taatacatcg gaacatgtcc tgtagtgggg gatagcccgg cgaaagccgg attaataccg     120
catacgatct acggatgaaa gcgggggacc ttcgggcctc gcgctatagg gttggccgat     180
ggctgattag ctagttggtg gggtaaaggc ctaccaaggc gacgatcagt agctggtctg     240
agaggacgac cagccacact gggactgaga cacggcccag actcctacgg gaggcagcag     300
tggggaattt tggacaatgg gcgaaagcct gatccagcaa tgccgcgtgt gtgaagaagg     360
ccttcgggtt gtaaagcact tttgtccgga aagaaatcct tgattctaat acagtcgggg     420
gatgacggta ccggaagaat aagcaccggc taactacgtg ccagcagccg cggtaatacg     480
tagggtgcga gcgttaatcg gaattactgg gcgtaaagcg tgcgcaggcg gtttgctaag     540
accgatgtga aatccccggg ctcaacctgg gaactgcatt ggtgactggc aggctagagt     600
atggcagagg ggggtagaat tccacgtgta gcagtgaaat gcgtagagat gtggaggaat     660
accgatggcg aaggcagccc cctgggccaa tactgacgct catgcacgaa agcgtgggga     720
gcaaacagga ttagataccc tggtagtcca cgccctaaac gatgtcaact agttgttggg     780
gattcatttc cttagtaacg tagctaacgc gtgaagttga ccgcctgggg agtacggtcg     840
caagattaaa actcaaagga attgacgggg acccgcacaa gcggtggatg atgtggatta     900
attcgatgca acgcgaaaaa ccttacctac ccttgacatg gtcggaatcc tgctgagagg     960
cgggagtgct cgaaagagaa ccggcgcaca ggtgctgcat ggctgtcgtc agctcgtgtc    1020
gtgagatgtt gggttaagtc ccgcaacgag cgcaaccctt gtccttagtt gctacgcaag    1080
agcactctaa ggagactgcc ggtgacaaac cggaggaagg tggggatgac gtcaagtcct    1140
catggccctt atgggtaggg cttcacacgt catacaatgg tcggaacaga gggttgccaa    1200
cccgcgaggg ggagctaatc ccagaaaacc gatcgtagtc cggattgcac tctgcaactc    1260
gagtgcatga agctggaatc gctagtaatc gcggatcagc atgccgcggt gaatacgttc    1320
ccgggtcttg tacacaccgc ccgtcacacc atgggagtgg gttttaccag aagtggctag    1380
tctaaccgca aggaggacgg tcaccacggt agga                                1414
```

<210> 4

<211> 1423

<212> ADN

<213> *Burkholderia vietnamiensis*

<220>

<221> características_misceláneas

<223> Aislado bacteriano SGI SGI-026_G07

<220>

<221> características_misceláneas

<223> codifica un ARN ribosómico 16S

<400> 4

```
tgccttacac atgcaagtcg aacggcagca cgggtgcttg cacctggtgg cgagtggcga      60
acgggtgagt aatacatcgg aacatgtcct gtagtggggg atagcccggc gaaagccgga     120
ttaataccgc atacgatcta aggatgaaag cgggggacct tcgggcctcg cgctataggg     180
ttggccgatg gctgattagc tagttggtgg ggtaaaggcc taccaaggcg acgatcagta     240
gctggtctga gaggacgacc agccacactg ggactgagac acggcccaga ctcctacggg     300
aggcagcagt ggggaatttt ggacaatggg cgaaagcctg atccagcaat gccgcgtgtg     360
tgaagaaggc cttcgggttg taaagcactt ttgtccggaa agaaatcctt ggctctaata     420
cagtcggggg atgacggtac cggaagaata agcaccggct aactacgtgc cagcagccgc     480
ggtaatacgt agggtgcaag cgttaatcgg aattactggg cgtaaagcgt gcgcaggcgg     540
tttgctaaga ccgatgtgaa atccccgggc tcaacctggg aactgcattg gtgactggca     600
ggctagagta tggcagaggg gggtagaatt ccacgtgtag cagtgaaatg cgtagagatg     660
tggaggaata ccgatggcga aggcagcccc ctgggccaat actgacgctc atgcacgaaa     720
gcgtggggag caaacaggat tagataccct ggtagtccac gccctaaacg atgtcaacta     780
gttgttgggg attcatttcc ttagtaacgt agctaacgcg tgaagttgac cgcctgggga     840
gtacggtcgc aagattaaaa ctcaaaggaa ttgacgggga cccgcacaag cggtggatga     900
tgtggattaa ttcgatgcaa cgcgaaaaac cttacctacc cttgacatgg tcggaagccc     960
gatgagagtt gggcgtgctc gaaagagaac cggcgcacag gtgctgcatg gctgtcgtca    1020
gctcgtgtcg tgagatgttg ggttaagtcc cgcaacgagc gcaacccttg tccttagttg    1080
ctacgcaaga gcactctaag gagactgccg gtgacaaacc ggaggaaggt ggggatgacg    1140
tcaagtcctc atggccctta tgggtagggc ttcacacgtc atacaatggt cggaacagag    1200
ggttgccaac ccgcgagggg gagctaatcc cagaaaaccg atcgtagtcc ggattgcact    1260
ctgcaactcg agtgcatgaa gctggaatcg ctagtaatcg cggatcagca tgccgcggtg    1320
aatacgttcc cgggtcttgt acacaccgcc cgtcacacca tgggagtggg ttttaccaga    1380
agtggctagt ctaaccgcaa ggaggacggt caccacggta gga                      1423
```

<210> 5

<211> 1441

<212> ADN

<213> *Bacillus pumilus*

<220>

<221> características_misceláneas

<223> Aislado bacteriano SGI SGI-034_C09

<220>

<221> características_misceláneas

<223> codifica un ARN ribosómico 16S

<220>

<221> características_misceláneas

<222> (605)..(605)

<223> n es a, c, g, o t

<400> 5

gcggcgtgcc taatacatgc aagtcgagcg gacagaaggg agcttgctcc cggatgttag 60

cggcggacgg gtgagtaaca cgtgggtaac ctgcctgtaa gactgggata actccgggaa 120

accggagcta ataccggata gttccttgaa ccgcatggtt caaggatgaa agacggtttc 180

ggctgtcact tacagatgga cccgcggcgc attagctagt tggtgaggta acggctcacc 240

aaggcgacga tgcgtagccg acctgagagg gtgatcggcc acactgggac tgagacacgg 300

cccagactcc tacgggaggc agcagtaggg aatcttccgc aatggacgaa agtctgacgg 360

agcaacgccg cgtgagtgat gaaggttttc ggatcgtaaa gctctgttgt tagggaagaa 420

caagtgcaag agtaactgct tgcaccttga cggtacctaa ccagaaagcc acggctaact 480

acgtgccagc agccgcggta atacgtaggt ggcaagcgtt gtccggaatt attgggcgta 540

aagggctcgc aggcggtttc ttaagtctga tgtgaaagcc cccggctcaa ccggggaggg 600

tcatnggaaa ctgggaaact tgagtgcaga agaggagagt ggaattccac gtgtagcggt 660

gaaatgcgta gagatgtgga ggaacaccag tggcgaaggc gactctctgg tctgtaactg 720
acgctgagga gcgaaagcgt ggggagcgaa caggattaga taccctggta gtccacgccg 780

taaacgatga gtgctaagtg ttagggggtt tccgcccctt agtgctgcag ctaacgcatt 840

aagcactccg cctggggagt acggtcgcaa gactgaaact caaaggaatt gacgggggcc 900

cgcacaagcg gtggagcatg tggtttaatt cgaagcaacg cgaagaacct taccaggtct 960

tgacatcctc tgacaaccct agagataggg ctttcccttc ggggacagag tgacaggtgg 1020

tgcatggttg tcgtcagctc gtgtcgtgag atgttgggtt aagtcccgca acgagcgcaa 1080

cccttgatct tagttgccag cattcagttg ggcactctaa ggtgactgcc ggtgacaaac 1140

cggaggaagg tggggatgac gtcaaatcat catgcccctt atgacctggg ctacacacgt 1200

gctacaatgg acagaacaaa gggctgcgag accgcaaggt ttagccaatc ccacaaatct 1260

gttctcagtt cggatcgcag tctgcaactc gactgcgtga agctggaatc gctagtaatc 1320

gcggatcagc atgccgcggt gaatacgttc ccgggccttg tacacaccgc ccgtcacacc 1380

acgagagttt gcaacacccg aagtcggtga ggtaaccttt atggagccag ccgccgaagg 1440

t 1441

<210> 6

<211> 1410

<212> ADN

<213> *Herbaspirillum sp.*

<220>

<221> características_misceláneas

<223> Aislado bacteriano SGI SGI-034_E10

<220>

<221> características_misceláneas

<223> codifica un ARN ribosómico 16S

<400> 6

```
tgcaagtcga aacggcagca taggagcttg ctcctgatgg cgagtggcga acgggtgagt      60
aatatatcgg aacgtgccct agagtggggg ataactagtc gaaagactag ctaataccgc     120
atacgatcta cggatgaaag tgggggatcg caagacctca tgctcctgga gcggccgata     180
tctgattagc tagttggtgg ggtaaaagcc taccaaggca acgatcagta gctggtctga     240
gaggacgacc agccacactg ggactgagac acggcccaga ctcctacggg aggcagcagt     300
ggggaatttt ggacaatggg ggcaaccctg atccagcaat gccgcgtgag tgaagaaggc     360
cttcgggttg taaagctctt ttgtcaggga agaaacggta gtagcgaata actattacta     420
atgacggtac ctgaagaata agcaccggct aactacgtgc cagcagccgc ggtaatacgt     480
agggtgcaag cgttaatcgg aattactggg cgtaaagcgt gcgcaggcgg ttgtgtaagt     540
cagatgtgaa atccccgggc tcaacctggg aattgcattt gagactgcac ggctagagtg     600
tgtcagaggg gggtagaatt ccacgtgtag cagtgaaatg cgtagatatg tggaggaata     660
ccgatggcga aaggcagccc cctgggataa cactgacgct catgcacgaa agcgtgggga     720
gcaaacagga ttagataccc tggtagtcca cgccctaaac gatgtctact agttgtcggg     780
tcttaattga cttggtaacg cagctaacgc gtgaagtaga ccgcctgggg agtacggtcg     840
caagattaaa actcaaagga attgacgggg acccgcacaa gcggtggatg atgtggatta     900
attcgatgca acgcgaaaaa ccttacctac ccttgacatg gatggaatcc tgaagagatt     960
tgggagtgct cgaaagagaa ccatcacaca ggtgctgcat ggctgtcgtc agctcgtgtc    1020
gtgagatgtt gggttaagtc ccgcaacgag cgcaaccctt gtcattagtt gctacgaaag    1080
ggcactctaa tgagactgcc ggtgacaaac cggaggaagg tggggatgac gtcaagtcct    1140
catggccctt atgggtaggg cttcacacgt catacaatgg tacatacaga gggccgccaa    1200
cccgcgaggg ggagctaatc ccagaaagtg tatcgtagtc cggattggag tctgcaactc    1260
gactccatga agttggaatc gctagtaatc gcggatcagc atgtcgcggt gaatacgttc    1320
ccgggtcttg tacacaccgc ccgtcacacc atgggagcgg gttttaccag aagtgggtag    1380
cctaaccgca aggagggcgc tcaccacggt                                     1410
```

<210> 7

<211> 1368

<212> ADN

<213> *Pedobacter sp.*

<220>

<221> características_misceláneas

<223> Aislado bacteriano SGI SGI-041_B03

<220>

<221> características_misceláneas

<223> codifica un ARN ribosómico 16S

<220>

<221> características_misceláneas

<222> (529)..(529)

<223> n es a, c, g, o t

<400> 7

gaaagtggcg cacgggtgcg taacgcgtat gcaacctacc ttcatctggg ggatagcccg 60

gagaaatccg gattaatacc gcataaaatc acagtactgc atagtgcaat gatcaaacat 120

ttatgggaag aagatgggca tgcgtgtcat tagctagttg gcggggtaac ggcccaccaa 180

ggcgacgatg actaggggat ctgagaggat ggcccccccac actggtactg agacacggac 240

cagactccta cgggaggcag cagtaaggaa tattggtcaa tggaggcaac tctgaaccag 300

ccatgccgcg tgcaggaaga ctgccctatg ggttgtaaac tgcttttatc cgggaataaa 360

cctgagtacg tgtacttagc tgaatgtacc ggaagaataa ggatcggcta actccgtgcc 420

agcagccgcg gtaatacgga ggatccaagc gttatccgga tttattgggt ttaaagggtg 480
cgtaggcggc ctgttaagtc aggggtgaaa gacggtagct caactatcng cagtgccctt 540

gatactgatg ggcttgaatg gactagaggt aggcggaatg agacaagtag cggtgaaatg 600

catagatatg tctcagaaca ccgattgcga aggcagctta ctatggtctt attgacgctg 660

aggcacgaaa gcgtggggat caaacaggat tagataccct ggtagtccac gccctaaacg 720

atgaacactc gctgttggcg atacacagtc agcggctaag cgaaagcgtt aagtgttcca 780

cctggggagt acgctcgcaa gagtgaaact caaaggaatt gacgggggcc cgcacaagcg 840

gaggagcatg tggtttaatt cgatgatacg cgaggaacct tacccgggct tgaaagttag 900

tgaatcattt agagataaat gagtgagcaa tcacacgaaa ctaggtgctg catggctgtc 960

gtcagctcgt gccgtgaggt gttgggttaa gtcccgcaac gagcgcaacc cctatgttta 1020

gttgccagca cgttatggtg gggactctaa acagactgcc tgtgcaaaca gagaggaagg 1080

aggggacgac gtcaagtcat catggccctt acgtccgggg ctacacacgt gctacaatgg 1140

atggtacaga gggcagctac atagcaatat gatgcgaatc tcacaaagcc attcacagtt 1200

cggattgggg tctgcaactc gaccccatga agttggattc gctagtaatc gcgtatcagc 1260

aatgacgcgg tgaatacgtt cccgggcctt gtacacaccg cccgtcaagc catggaagtt 1320

gggggtacct aaagtatgta accgcaagga gcgtcctagg gtaaaacc 1368

<210> 8

<211> 39

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> cebador PCR M13-27F

<400> 8

tgtaaaacga cggccagtta gagtttgatc ctggctcag 39

<210> 9

<211> 37

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> cebador PCR 1492R con cola M13

<400> 9

caggaaacag ctatgaccgg ttaccttgtt acgactt 37

<210> 10

<211> 1059

<212> ADN

<213> *Pantoea agglomerans*

<400> 10

atggctatcg acgaaaacaa acagaaagcg ttggcggcag cactgggcca gatcgaaaaa 60

cagttcggta aaggctccat catgcgcctg ggtgaagacc gttccatgga cgtggaaact 120

atctccaccg gttcgctttc cctggatatc gccctcggcg ctggcggtct gccaatgggc 180

cgtatcgtcg aaatctacgg gcctgaatct tccggtaaaa cgacgctgac cctgcaggtt 240

atcgccgccg cgcagcgtga aggtaaaacc tgtgccttta tcgatgcaga gcacgcgctg 300

gatccggtat atgcccgcaa gctgggcgtc gatatcgaca acctgctgtg ctctcagccg 360

gacaccggcg aacaggcgct tgagatctgt gacgcgctgg cgcgctccgg tgcggtagac 420

gtgctggtgg tcgactccgt tgcggcgctg acgccgaaag cggaaatcga aggcgagatc 480

ggcgactctc acatgggcct cgcggcgcgt atgatgagcc aggcaatgcg taagctggcc 540

ggtaacctga agcagtccaa cacgctgctg atcttcatca accagatccg tatgaaaatt 600

ggcgtgatgt tcggtaaccc ggaaaccacc accggcggta acgcgctgaa attctacgcc 660

tccgtgcgtc tggatatccg ccgtatcggt gcggtaaaag atggcgataa cgtcattggt 720

agcgaaaccc gcgtgaaggt cgtgaagaac aaaatcgccg cgccgttcaa gcaggcggag 780

ttccagatcc tctacggcga aggcatcaac ttcttcggcg agctggtcga tctgggcgtg 840

aaagagaagc tgattgaaaa agcgggcgcc tggtatagct acaacggcga caaaattggt 900

cagggtaaag cgaacgctat ctcctggctg aaagagaacc cggctgcggc gaaagagatc 960

gagaagaaag ttcgtgaact gctgctgaac aaccaggatg ccacgccgga cttcgcggtt 1020

gatggtaaaa gcgaagaagc aagcgaacag gatttctga 1059

<210> 11

<211> 352

<212> PRT

<213> *Pantoea agglomerans*

<400> 11

Met Ala Ile Asp Glu Asn Lys Gln Lys Ala Leu Ala Ala Ala Leu Gly
1 5 10 15

Gln Ile Glu Lys Gln Phe Gly Lys Gly Ser Ile Met Arg Leu Gly Glu
20 25 30

Asp Arg Ser Met Asp Val Glu Thr Ile Ser Thr Gly Ser Leu Ser Leu
35 40 45

Asp Ile Ala Leu Gly Ala Gly Gly Leu Pro Met Gly Arg Ile Val Glu
50 55 60

Ile Tyr Gly Pro Glu Ser Ser Gly Lys Thr Thr Leu Thr Leu Gln Val
65 70 75 80

Ile Ala Ala Ala Gln Arg Glu Gly Lys Thr Cys Ala Phe Ile Asp Ala

85 90 95

Glu His Ala Leu Asp Pro Val Tyr Ala Arg Lys Leu Gly Val Asp Ile
100 105 110

Asp Asn Leu Leu Cys Ser Gln Pro Asp Thr Gly Glu Gln Ala Leu Glu
115 120 125

Ile Cys Asp Ala Leu Ala Arg Ser Gly Ala Val Asp Val Leu Val Val
130 135 140

Asp Ser Val Ala Ala Leu Thr Pro Lys Ala Glu Ile Glu Gly Glu Ile
145 150 155 160

Gly Asp Ser His Met Gly Leu Ala Ala Arg Met Met Ser Gln Ala Met
165 170 175

Arg Lys Leu Ala Gly Asn Leu Lys Gln Ser Asn Thr Leu Leu Ile Phe
180 185 190

Ile Asn Gln Ile Arg Met Lys Ile Gly Val Met Phe Gly Asn Pro Glu
195 200 205

Thr Thr Thr Gly Gly Asn Ala Leu Lys Phe Tyr Ala Ser Val Arg Leu
210 215 220

Asp Ile Arg Arg Ile Gly Ala Val Lys Asp Gly Asp Asn Val Ile Gly
225 230 235 240

Ser Glu Thr Arg Val Lys Val Val Lys Asn Lys Ile Ala Ala Pro Phe
245 250 255

Lys Gln Ala Glu Phe Gln Ile Leu Tyr Gly Glu Gly Ile Asn Phe Phe
260 265 270

Gly Glu Leu Val Asp Leu Gly Val Lys Glu Lys Leu Ile Glu Lys Ala
275 280 285

Gly Ala Trp Tyr Ser Tyr Asn Gly Asp Lys Ile Gly Gln Gly Lys Ala
290 295 300

Asn Ala Ile Ser Trp Leu Lys Glu Asn Pro Ala Ala Ala Lys Glu Ile
305 310 315 320

Glu Lys Lys Val Arg Glu Leu Leu Leu Asn Asn Gln Asp Ala Thr Pro
325 330 335

Asp Phe Ala Val Asp Gly Lys Ser Glu Glu Ala Ser Glu Gln Asp Phe
340 345 350

REIVINDICACIONES

1. Una cepa microbiana de *Pantoea agglomerans* aislada depositada como NRRL B-50483 o un cultivo enriquecido de la misma.

2. Una composición que comprende

(A) una cepa o cultivo microbiano de acuerdo con la reivindicación 1, y una cantidad efectiva en términos agrícolas de un compuesto o composición seleccionado del grupo que consiste en un fertilizante, un acaricida, un bactericida, un fungicida, un insecticida, un microbicida, un nematicida, y un plaguicida; o

(B) una cepa o cultivo microbiano de acuerdo con la reivindicación 1, y un vehículo.

3. La composición de acuerdo con la reivindicación 2, en la que

(i) dicho vehículo es una semilla de planta; o

(ii) dicha composición (B) es una formulación para recubrimiento de semillas; o

(iii) dicha composición (B) se prepara como una formulación seleccionada del grupo que consiste en una emulsión, un coloide, un polvo, un gránulo, una pella, un polvo, un aerosol, una emulsión y una solución.

4. Una semilla de planta que tiene un recubrimiento que comprende una composición de acuerdo con la reivindicación 3.

5. Un procedimiento para tratar una semilla de planta, comprendiendo dicho procedimiento una etapa de exposición o contacto de dicha semilla de planta con una cepa o cultivo microbiano de acuerdo con la reivindicación 1.

6. Un procedimiento para mejorar el crecimiento y/o rendimiento de una planta, comprendiendo dicho procedimiento aplicar una cantidad efectiva de una cepa o cultivo microbiano de acuerdo con la reivindicación 1 a la planta, o al entorno de la planta.

7. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 6, en el que

(i) dicha cepa o cultivo microbiano se cultiva en un medio de crecimiento o suelo de una planta huésped antes o al mismo tiempo que el crecimiento de la planta huésped en dicho medio de crecimiento o suelo; o

(ii) dicha planta es una planta de maíz o una planta de trigo; o

(iii) dicha cepa o cultivo microbiano se establece como un endófito en dicha planta.

8. Un procedimiento para prevenir, inhibir o tratar el desarrollo de

(A) un patógeno vegetal, comprendiendo dicho procedimiento el cultivo de una cepa o cultivo microbiano de acuerdo con la reivindicación 1 en un medio de crecimiento o suelo de una planta huésped antes deo simultáneamente con el crecimiento de la planta huésped en dicho medio de crecimiento o suelo; o

(B) una enfermedad patógena de una planta, comprendiendo dicho procedimiento aplicar una cantidad efectiva de una cepa o cultivo microbiano de acuerdo con la reivindicación 1 a la planta, o al entorno de la planta.

9. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 8, en el que dicho patógeno vegetal se selecciona del grupo que consiste en organismos *Colletotrichum, Fusarium, Gibberella, Monographella, Penicillium* y *Stagnospora*.

10. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 8, en el que dicho patógeno vegetal se selecciona del grupo que consiste en . *Colletotrichum graminicola, Fusarium graminearum, Gibberella zeae, Monographella nivalis, Penicillium sp* y *Stagnospora nodurum.*

11. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 8, en el que dicha cepa o cultivo microbiano se aplica al suelo, una semilla, una raíz, una flor, una hoja, una porción de la planta o toda la planta.

12. Un procedimiento para preparar una composición agrícola, comprendiendo dicho procedimiento inocular una cepa o cultivo microbiano de acuerdo con la reivindicación 1 en o sobre un sustrato y permitir que dicha cepa o cultivo microbiano crezca a una temperatura de 1-37 ºC hasta obtener un número de células o esporas de al menos 10^2-10^3 por mililitro o por gramo.