

MICROORGANISMOS DIAZOTRÓFICOS MEJORADOS PARA SU USO EN LA AGRICULTURA

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

- 5 Esta solicitud reivindica el beneficio en virtud de 35 U.S.C. 119(e) de la solicitud de patente provisional de Estados Unidos con núm. de serie 63/164361 presentada el 22 de marzo de 2021, incorporada en la presente descripción como referencia en su totalidad.

REFERENCIA AL LISTADO DE SECUENCIAS PRESENTADO ELECTRÓNICAMENTE

- 10 La copia oficial del listado de secuencias se presenta electrónicamente como un listado de secuencias en formato ASCII con un archivo de nombre 21031WOPCT_SeqListing_ST25.txt creado el 21 de marzo de 2022 y que tiene un tamaño de 46.0 KB y se presenta simultáneamente con la memoria descriptiva. El listado de secuencias comprendido en este documento en formato ASCII es parte de la memoria descriptiva y se incorpora en la presente descripción como referencia
15 en su totalidad.

CAMPO

- La presente descripción se refiere a microorganismos aislados y biológicamente puros que tienen aplicación, entre otras cosas, en la agricultura. Los microorganismos descritos pueden utilizarse en
20 sus estados aislados y biológicamente puros, así como también formularse en composiciones aceptables en la agricultura. También se describen métodos para usar los microorganismos aislados o composiciones aceptables en la agricultura en aplicaciones agrícolas.

ANTECEDENTES

- 25 De acuerdo con el Programa Mundial de Alimentos de las Naciones Unidas, hay cerca de 900 millones de personas desnutridas en el mundo. La epidemia de desnutrición es particularmente sorprendente en las naciones en desarrollo del mundo, donde uno de cada seis niños es bajo peso. La escasez de alimentos disponibles puede atribuirse a muchos factores socioeconómicos; sin embargo, independientemente de la causa última, el hecho es que hay escasez de alimentos
30 disponibles para alimentar a una población mundial en crecimiento, que se espera alcance los 9 mil millones de personas para 2050. Las Naciones Unidas estiman que los rendimientos agrícolas deben aumentar entre un 70-100 % para alimentar a la población global proyectada en 2050.

Estas alarmantes cifras de población mundial y desnutrición resaltan la importancia de la eficiencia y la productividad agrícolas para sostener la creciente población mundial. Los avances tecnológicos logrados por la agricultura moderna de cultivos en hileras, que ha conducido a rendimientos de cultivos nunca antes vistos, son impresionantes. Sin embargo, a pesar de los avances logrados por las innovaciones tecnológicas, tales como los cultivos genéticamente modificados y los nuevos compuestos pesticidas y herbicidas novedosos, existe la necesidad de mejorar el rendimiento de los cultivos para satisfacer las demandas de una población global que aumenta exponencialmente.

Los científicos han estimado que si se pudiera cerrar la “brecha de rendimiento” agrícola global (que es la diferencia entre el mejor rendimiento observado y los resultados en otros lugares), la producción agrícola en todo el mundo aumentaría entre un 45-70 %. Es decir, si todos los agricultores, independientemente de su ubicación en el mundo, pudieran lograr el rendimiento más alto posible esperado para sus respectivas regiones, entonces se podría abordar la gran mayoría de las deficiencias en la producción de alimentos en todo el mundo. Sin embargo, es difícil resolver el problema de cómo lograr mayores rendimientos en un panorama en todo el mundo heterogéneo.

A menudo, las brechas de rendimiento pueden explicarse por agua inadecuada, prácticas agrícolas deficientes, fertilizantes inadecuados y la falta de disponibilidad de herbicidas y pesticidas. Sin embargo, aumentar enormemente el uso mundial de agua, fertilizantes, herbicidas y pesticidas no solo sería económicamente inviable para la mayor parte del mundo, sino que tendría consecuencias ambientales negativas.

Por lo tanto, cumplir con las expectativas de rendimiento agrícola global, simplemente al ampliar los sistemas agrícolas actuales de altos insumos—utilizados en la mayor parte del mundo desarrollado—simplemente no es factible.

Por lo tanto, existe una necesidad urgente en la técnica de métodos mejorados para aumentar el rendimiento de los cultivos e impartir características beneficiosas a las especies de plantas deseadas.

La tecnología descrita en la presente descripción son bacterias fijadoras de nitrógeno ambiental que se han editado génicamente, por ejemplo, mediante el uso de técnicas de recombinación homóloga sin cicatrices, para aumentar la cantidad de nitrógeno atmosférico que se fija.

Estas cepas bacterianas editadas génicamente imparten fenotipos mejorados a las plantas, por ejemplo, cultivos no leguminosos, para mejorar la cantidad de nitrógeno disponible para la planta y aumentar el rendimiento final.

SUMARIO

Se incluyen microorganismos aislados y biológicamente puros que tienen aplicación, pero no se limitan a, en la agricultura. Los microorganismos descritos pueden utilizarse en sus estados aislados y biológicamente puros, así como también formularse en composiciones aceptables en la agricultura. Además se proporcionan consorcios microbianos agrícolamente beneficiosos, que comprenden al menos dos miembros de los microorganismos descritos, así como también métodos para utilizar dichos consorcios en aplicaciones agrícolas. En algunos aspectos se contempla la modificación genómica de los microbios (individuales, consorcios y/o comunidades), para la mejora de características microbianas y la mejora de plantas asociadas a microbios.

- 5
- 10 En la presente descripción se presentan cepas editadas genómicamente exitosas de la bacteria formadora de esporas grampositiva *Paenibacillus*, en múltiples especies diferentes, tanto en el subgrupo I como en el subgrupo II del género. Se evaluaron varias ediciones diferentes, que incluyen eliminaciones, truncamientos e inactivaciones, de varios loci diferentes dentro del genoma de *Paenibacillus*, que incluyen los dos sitios de unión a GlnR aguas arriba del operón *nif* (sitio I y sitio II, respectivamente), así como también el locus génico de CueR.

15 La presente descripción aborda esta importante cuestión de cómo mejorar el rendimiento de las plantas, lo que cierra de esta manera la brecha de rendimiento mundial, junto con proporcionar formas de impartir otras características beneficiosas a las especies de plantas. Las nuevas cepas editadas genómicamente de *Paenibacillus* descritas en la presente descripción mejoran el

20 rendimiento de la planta al permitir que la planta tenga mayor y/o mejor disponibilidad, fijación, captación, adquisición, tolerancia, distribución, regulación, procesamiento de nitrógeno, y/o cualquier pluralidad y/o combinación de cualquiera de las anteriores.

En algunas modalidades, la planta es una planta de cultivo no leguminosa.

En algunas modalidades, la planta es una dicotiledónea. En algunas modalidades, la planta es una

25 planta vegetal, de hierbas, ornamental o frutal. En algunas modalidades, la planta se selecciona del grupo que consiste en: kale, espinaca, lechuga, zanahoria, papa, remolacha, rábano, tomate, brócoli, coliflor, calabaza, mostaza, baya, pimiento, verduras, judías trepadoras, melón, pepino, albahaca, uva y okra.

En algunas modalidades, la planta es una monocotiledónea. En algunas modalidades, la planta es

30 una monocotiledónea C3. En algunas modalidades, la planta es una monocotiledónea C4. En algunas modalidades, la planta se selecciona del grupo que consiste en: maíz, trigo, arroz, sorgo, caña de azúcar, cebolla, bambú, palma, ajo, jengibre, lirio, narciso, iris, orquídea, campanilla azul,

tulipán, amaryllis, banana, plátano, banano, jengibre, cúrcuma, cardamomo, espárrago, piña, ciperáceas, juncáceas, puerro, hierbas forrajeras, césped, trigo sarraceno, quinoa, chía, y mijo.

La solución para aumentar el rendimiento de los cultivos y aumentar el rendimiento ofrecido por la presente descripción no es perjudicial para los recursos de la tierra, ya que no depende del aumento del consumo de agua o del aumento de la entrada de productos químicos sintéticos en un sistema. Más bien, la presente descripción utiliza microbios para impartir propiedades beneficiosas, que incluyen mayores rendimientos a las plantas convenientes.

Por lo tanto, la descripción ofrece una solución ambientalmente sostenible que permite a los agricultores aumentar los rendimientos de cultivos importantes, que no depende de una mayor utilización de herbicidas y pesticidas sintéticos.

En modalidades, la descripción proporciona una plataforma agrícola eficiente y ampliamente aplicable que utiliza microbios y consorcios microbianos (una pluralidad de microbios, en algunos aspectos una pluralidad que mejora la salud o el fenotipo deseado de la planta, tal como una característica agronómica, con el que está asociado) que promueven una o más propiedades convenientes de la planta.

Los microbios descritos en la presente descripción mejoran el rendimiento de las plantas, tales como las plantas de cultivo, tanto por mecanismos directos como indirectos. En algunos aspectos, el microbio se vuelve simbiótico con la planta. En algunos aspectos, el microbio produce un compuesto (por ejemplo, un metabolito, una toxina, una proteína, un lipopéptido u otra composición) que confiere un beneficio a la planta o que la planta puede usar para mejorar las características. En algunos aspectos, el microbio mejora la solubilidad de una o más composiciones, tales como un nutriente, lo que beneficia de esta manera a la planta. En algunos aspectos, el microbio imparte una tolerancia a la planta a una sustancia exógena tal como un herbicida o un pesticida. En algunos aspectos, el microbio produce una composición que es perjudicial para una plaga de plantas, tal como un insecto. En algunos aspectos, el microbio fija nitrógeno, lo que mejora de esta manera el estado nutricional de la planta. Se contemplan otros aspectos más allá de los aspectos ilustrativos no limitantes enumerados anteriormente.

En algunas modalidades, se utiliza un único microbio. En algunos aspectos, el único microbio se aísla y purifica. En algunos aspectos, el único microbio es una especie taxonómica de bacterias.

En algunos aspectos, el único microbio es una cepa identificable de una especie taxonómica de bacterias. En algunos aspectos, el único microbio es una nueva cepa recién descubierta de una especie taxonómica de bacterias.

En algunos aspectos, el único microbio—ya sea una especie o cepa taxonómicamente identificable—se combina con uno o más microbios de una especie o cepa diferente. En determinados aspectos, la combinación de dos o más microbios forma un consorcio o consorcios. Los términos consorcio y consorcios se utilizan indistintamente.

- 5 En determinados aspectos, la descripción proporciona el desarrollo de consorcios microbianos altamente funcionales que ayudan a promover el desarrollo y la expresión de una característica fenotípica o genotípica deseada de la planta. En algunas modalidades, los consorcios de la presente descripción poseen atributos funcionales que no se encuentran en la naturaleza, cuando los microbios individuales viven solos. Es decir, en varias modalidades, la combinación de especies
- 10 microbianas particulares en consorcios conduce a que la combinación microbiana posea atributos funcionales que no posee ningún miembro individual de los consorcios cuando se considera solo. En algunas modalidades, este atributo funcional que poseen los consorcios microbianos es la capacidad de impartir una o más propiedades beneficiosas a una especie de planta, por ejemplo: mayor crecimiento, mayor rendimiento, mayor utilización de nutrientes (por ejemplo, nitrógeno,
- 15 fosfato y similares), mayor eficiencia en la utilización de nitrógeno, mayor tolerancia al estrés, mayor tolerancia a la sequía, mayor velocidad fotosintética, mayor eficiencia en el uso del agua, mayor resistencia a los patógenos, modificaciones en la arquitectura de la planta que no necesariamente afectan el rendimiento de la planta, sino más bien abordan la funcionalidad de la planta, etc. Se contemplan además propiedades beneficiosas de resistencia y/o tolerancia a plagas,
- 20 que comprenden un efecto adverso contra un nemátodo, insecto, u otra plaga. La capacidad para impartir estas propiedades beneficiosas a una planta no la poseen, en algunas modalidades, los microbios individuales como ocurrirían en la naturaleza. Más bien, en algunas modalidades, es por la mano del hombre que combina estos microbios en consorcios que se desarrolla una composición funcional, dicha composición funcional que posee atributos y
- 25 propiedades funcionales que no existen en la naturaleza. En algunas modalidades, los consorcios pueden incluir microbios que se han editado, alterado o modificado genéticamente a través de la modificación de composiciones celulares que incluyen ADN, ARN, proteínas y/o sus combinaciones mediante técnicas conocidas por los expertos en la técnica. Sin embargo, en otras modalidades, la descripción proporciona microbios individuales aislados y
- 30 biológicamente puros que son capaces de impartir propiedades beneficiosas a unas especies de plantas deseada, sin la necesidad de combinar dichos microbios en consorcios.

En algunas modalidades, el microbio es una cepa del género *Paenibacillus* que se ha modificado genéticamente para mejorar las capacidades de fijación de nitrógeno.

Por lo tanto, la descripción ofrece una solución ambientalmente sostenible que permite a los agricultores aumentar los rendimientos de cultivos importantes, que no depende de una mayor

5 utilización de fertilizantes, herbicidas y/o pesticidas sintéticos. Por ejemplo, en un aspecto, la presente descripción describe microbios aislados que se modifican genéticamente para mejorar la capacidad de fijación de nitrógeno del microbio. En algunas modalidades, un gen *nif* endógeno de los microbios aislados se modifica genéticamente para mejorar la capacidad de fijación de nitrógeno del microbio. En algunas modalidades, un gen *glnR* endógeno que codifica la proteína
10 GlnR se modifica genéticamente para mejorar la capacidad de fijación de nitrógeno del microbio.

En algunas modalidades, la presente descripción se refiere a un microbio aislado genéticamente modificado, que incluye una o más modificaciones genéticas seleccionadas de: una modificación genética a un gen *glnR* endógeno que codifica GlnR; y una modificación genética a una secuencia reguladora de un gen *nif* endógeno. La modificación genética al gen *glnR* endógeno que codifica

15 GlnR en los microbios genéticamente modificados se caracteriza por proporcionar un gen *glnR* mutante que produce una variante de proteína GlnR. Adicionalmente, la modificación genética a la secuencia reguladora dentro del gen *nif* endógeno se caracteriza por proporcionar una afinidad de unión mejorada a GlnR, en comparación con una secuencia reguladora genéticamente no modificada. La una o más modificaciones genéticas se caracterizan por proporcionar una actividad
20 de fijación de nitrógeno mejorada al microbio genéticamente modificado, en comparación con una cepa del microbio genéticamente no modificada.

En algunas modalidades, los microbios aislados genéticamente modificados descritos en la presente descripción se caracterizan por tener una expresión constitutiva del gen *nif*, independientemente de la concentración de nitrógeno local en el ambiente que rodea el microbio.

25 Por ejemplo, en algunas modalidades, los microbios aislados genéticamente modificados descritos en la presente descripción se caracterizan por tener una expresión constitutiva del gen *nif* en condiciones limitantes del nitrógeno. En algunas modalidades, los microbios aislados genéticamente modificados descritos en la presente descripción se caracterizan por tener una expresión constitutiva del gen *nif* en condiciones de abundancia de nitrógeno.

30 La presente descripción también se refiere a procesos para preparar un microbio aislado genéticamente modificado, donde el proceso incluye modificar genéticamente un gen *glnR* endógeno que codifica GlnR, modificar genéticamente una secuencia reguladora dentro de un gen

nif endógeno, o una de sus combinaciones; y aislar el microbio. La etapa de modificar genéticamente el gen *glnR* endógeno que codifica GlnR incluye editar el gen *glnR* endógeno para producir un gen mutante que codifica una variante de proteína GlnR. La etapa de modificar genéticamente la secuencia reguladora dentro de un gen *nif* endógeno incluye reemplazar la

5 secuencia reguladora con una secuencia de ADN caracterizada por proporcionar una afinidad de unión mejorada a GlnR, en comparación con la secuencia reguladora natural. Adicionalmente, el microbio se caracteriza por tener actividad de fijación de nitrógeno, donde la modificación genética del gen *glnR* endógeno que codifica GlnR, y/o la modificación genética de la secuencia reguladora dentro del gen *nif* endógeno, proporciona una actividad de fijación de nitrógeno

10 mejorada, en comparación con una cepa del microbio genéticamente no modificada.

La presente descripción se refiere además a composiciones agrícolas que incluyen una o más cepas de los microbios aislados genéticamente modificados descritos en la presente descripción y un portador aceptable en la agricultura. En algunas modalidades, las composiciones agrícolas incluyen uno o más agentes agrícolamente beneficiosos adicionales (p. ej., fertilizantes, biofertilizantes,

15 bionematicidas, bioestimulantes, pesticidas sintéticos, y/o herbicidas sintéticos).

También se describen en la presente descripción métodos para impartir uno o más rasgos beneficiosos a una planta, donde los métodos incluyen aplicar una cantidad efectiva en la agricultura de uno o más de los microbios aislados genéticamente modificados o composiciones agrícolas descritas en la presente descripción.

20 En algunas modalidades, la cepa de *Paenibacillus* se describe en la Tabla 1a, la Tabla 1b o la Tabla 1c. En algunas modalidades, la cepa de *Paenibacillus* comprende una secuencia de polinucleótidos que comparte al menos 90 % de identidad con una o más de las SEQ ID NO. 1-66. En algunas modalidades, la cepa de *Paenibacillus* es una especie seleccionada del grupo que consiste en:

25 *polymyxa*, *tritici*, *albidus*, *anaericanus*, *azotifigens*, *borealis*, *donghaensis*, *ehimensis*, *graminis*, *jilunlii*, *odorifer*, *panacisoli*, *phoenicis*, *pocheonensis*, *rhizoplanae*, *silage*, *taohuashanense*, *thermophilus*, *typhae* y *wynnii*. En algunas modalidades, la cepa de *Paenibacillus* es del subgrupo I. En algunas modalidades, la cepa de *Paenibacillus* es del subgrupo II.

Cualquier cepa descrita en la presente descripción puede combinarse además con uno o más microbios adicionales, que pueden formar unos consorcios microbianos. Los consorcios

30 microbianos pueden ser cualquier combinación de uno o más microbios individuales. En determinadas modalidades, los consorcios microbianos comprenden dos microbios, o tres

microbios, o cuatro microbios, o cinco microbios, o seis microbios, o siete microbios, u ocho microbios, o nueve microbios, o 10 microbios o más de 10 microbios.

Otro objeto de la descripción es diseñar un consorcio microbiano, que sea capaz de realizar actividades multidimensionales en común. En determinados aspectos, los microbios que comprenden el consorcio actúan sinérgicamente. En aspectos, el efecto que tiene el consorcio microbiano sobre una determinada característica de la planta es mayor que el efecto que se observaría si se hubiera utilizado individualmente cualquier miembro microbiano individual del consorcio. Es decir, en algunos aspectos, el consorcio muestra un efecto mayor que el aditivo sobre una característica de la planta deseada, en comparación con el efecto que se encontraría si cualquier miembro individual del consorcio se hubiera utilizado por sí mismo.

En algunos aspectos, los consorcios conducen al establecimiento de otras interacciones planta-microbio, por ejemplo, al actuar como colonizadores primarios o poblaciones fundadoras que establecen la trayectoria para el futuro desarrollo del microbioma.

En modalidades, la descripción se dirige a combinaciones sinérgicas (o mezclas) de aislados microbianos.

En algunos aspectos, los consorcios enseñados en la presente descripción proporcionan una amplia gama de aplicaciones agrícolas, que incluyen: mejoras en el rendimiento de granos, frutas y flores; mejoras en el crecimiento de las partes de la planta; capacidad mejorada para utilizar los nutrientes (por ejemplo, nitrógeno, fosfato y similares), resistencia mejorada a la enfermedad; efectos bioplaguicidas que incluyen resistencia mejorada a hongos, insectos y nemátodos; capacidad mejorada de supervivencia en climas extremos; y mejoras en otras características fenotípicas deseadas de la planta. Significativamente, estos beneficios para las plantas y/o efectos adversos sobre plagas y/o patógenos específicos pueden obtenerse sin ningún efecto secundario riesgoso para el medio ambiente.

En algunos aspectos, los microbios individuales de la descripción, o los consorcios que comprenden los mismos, pueden combinarse en una composición aceptable en la agricultura.

En algunas modalidades, las composiciones agrícolas de la presente descripción incluyen, entre otros: humectantes, agentes compatibilizantes, agentes antiespumantes, agentes de limpieza, agentes secuestrantes, agentes reductores de deriva, agentes neutralizantes, tampones, inhibidores de la corrosión, colorantes, odorantes, agentes de proliferación, auxiliares de penetración, agentes adhesivos, aglutinantes, agentes dispersantes, agentes espesantes, estabilizadores, emulsionantes,

depresores del punto de congelación, agentes antimicrobianos, fertilizantes, pesticidas, nematocidas, insecticidas, herbicidas, portadores inertes, polímeros y similares.

En una modalidad de la presente descripción, los microbios (que incluyen especies únicas aisladas, o cepas, consorcios o composiciones de las mismas, tales como metabolitos), se suministran en forma de recubrimientos de semillas u otras aplicaciones a la semilla. En modalidades, el recubrimiento de semilla puede aplicarse a una semilla desnuda y sin tratar. En otras modalidades, el recubrimiento de semillas puede aplicarse a una semilla previamente tratada. Por lo tanto, en algunas modalidades, la presente descripción enseña un método para tratar una semilla que comprende aplicar una cepa bacteriana aislada o un consorcio microbiano a una semilla. En determinadas modalidades, la cepa bacteriana aislada o el consorcio microbiano se aplica como una composición agrícola que incluye un portador aceptable en la agricultura. En algunas modalidades, las composiciones agrícolas pueden formularse como: un empapado de suelo, una pulverización foliar, un tratamiento por inmersión, un tratamiento en surcos, una enmienda de suelo, gránulos, un tratamiento al voleo, un tratamiento de control de enfermedades poscosecha o un tratamiento de semilla. En algunas modalidades, las composiciones agrícolas pueden aplicarse solas en programas de pulverización o en rotación con otros productos agrícolas. En algunas modalidades, las composiciones agrícolas pueden ser compatibles con la mezcla en tanque. En algunas modalidades, las composiciones agrícolas pueden ser compatibles con la mezcla en tanque con otros productos agrícolas. En algunas modalidades, las composiciones agrícolas pueden ser compatibles con equipos usados para aplicaciones terrestres, aéreas y de riego.

En algunas modalidades, los microbios aplicados pueden volverse endófitos y, en consecuencia, pueden estar presentes en la planta en crecimiento que se trató y su descendencia posterior. En otras modalidades, los microbios podrían aplicarse al mismo tiempo que un cotratamiento con tratamientos de semillas.

En una modalidad de la presente descripción, los microbios se suministran en forma de gránulos, o tapón, o empapado de suelo que se aplica al medio de cultivo vegetal. En otras modalidades, los microbios se suministran en forma de aplicación foliar, tal como una pulverización foliar o composición líquida. La pulverización foliar o la aplicación líquida pueden aplicarse a una planta en crecimiento o a un medio de cultivo, por ejemplo, suelo.

En otras modalidades, los microbios (que incluyen especies únicas aisladas, o cepas o consorcios, o composiciones de los mismos, tales como metabolitos) se suministran como fertilizantes, pesticidas u otras enmiendas que pueden aplicarse al suelo. En algunas modalidades, los microbios

se suministran como fertilizantes, pesticidas u otras enmiendas que se aplican al suelo antes de la siembra. En algunas modalidades, los microbios se suministran como fertilizantes, pesticidas u otras enmiendas que se aplican al suelo al mismo tiempo que se planta. En algunas modalidades, los microbios se suministran como fertilizantes, pesticidas u otras enmiendas que se aplican al suelo después de la siembra.

En otras modalidades de la presente descripción, los microbios (que incluyen especies únicas aisladas o cepas, o consorcios) y/o composiciones de los mismos (por ejemplo, metabolitos) se suministran en forma de una aplicación de control de enfermedades poscosecha.

En modalidades, las composiciones agrícolas de la descripción pueden formularse como: (1) soluciones; (2) polvos humectables; (3) polvos para espolvorear; (4) polvos solubles; (5) emulsiones o concentrados en suspensión; (6) aderezos de semillas, (7) tabletas; (8) gránulos dispersables en agua; (9) gránulos solubles en agua (liberación lenta o rápida); (10) gránulos o suspensiones microencapsulados; (11) como componentes de riego, y (12) como componente de fertilizantes, pesticidas y otras enmiendas compatibles, entre otros. En determinados aspectos, las composiciones pueden diluirse en un medio acuoso antes de la aplicación por pulverización convencional. Las composiciones de la presente descripción pueden aplicarse al suelo, planta, semilla, rizósfera, rizovaina u otra área en la que sería beneficioso aplicar las composiciones microbianas.

Todavía otro objeto de la descripción se refiere a las composiciones agrícolas que se formulan para proporcionar una población o consorcio bacteriano de unidades formadoras de colonias (UFC) elevadas. En algunos aspectos, las composiciones agrícolas tienen adyuvantes que proporcionan una vida útil pertinente. En las modalidades, la concentración de UFC de las composiciones agrícolas enseñadas es mayor que la concentración a la que los microbios existirían de manera natural, fuera de los métodos descritos. En otra modalidad, la composición agrícola contiene las células microbianas en una concentración de 10^2 - 10^{12} UFC por gramo de portador o 10^5 - 10^9 UFC por gramo de portador. En un aspecto, las células microbianas se aplican como una cubierta de semillas directamente a una semilla a una concentración de 10^5 - 10^9 UFC. En otros aspectos, las células microbianas se aplican como un recubrimiento de semillas encima de otro recubrimiento de semillas a una concentración de 10^5 - 10^9 UFC. En otros aspectos, las células microbianas se aplican como cotratamiento junto con otro tratamiento de semilla a una tasa de 10^5 - 10^9 UFC.

En aspectos, la descripción está dirigida a formulaciones microbianas agrícolas que promueven el crecimiento vegetal. En aspectos, la descripción proporciona que los microbios aislados enseñados y los consorcios que comprenden los mismos se formulan como un bioinoculante agrícola. Los bioinoculantes enseñados pueden aplicarse a plantas, semillas o suelo, o combinarse con fertilizantes, pesticidas y otras enmiendas compatibles. Pueden encontrarse ejemplos adecuados de bioinoculantes formulados que comprenden microbios aislados en la patente de EE.UU. núm. 7,097,830, que se incorpora en la presente descripción como referencia.

Las formulaciones microbianas descritas pueden: reducir la necesidad de fertilizantes que contengan nitrógeno, solubilizar minerales, proporcionar protección bioplaguicida a las plantas, proteger las plantas contra patógenos (por ejemplo, hongos, insectos y nemátodos), y poner a disposición de la planta valiosos nutrientes, tales como nitrógeno y/o fosfato, lo que reduce y elimina, por lo tanto, la necesidad de usar pesticidas químicos y fertilizantes químicos.

En algunas modalidades, los microbios aislados y biológicamente puros de la presente descripción pueden utilizarse en un método para impartir una o más propiedades o características beneficiosas a una especie de planta deseada.

En algunas modalidades, la composición aceptable en la agricultura que contiene microbios aislados y biológicamente puros de la presente descripción puede utilizarse en un método para impartir una o más propiedades o características beneficiosas a una especie de planta deseada.

En algunas modalidades, los consorcios de la presente descripción pueden utilizarse en un método para impartir una o más propiedades o características beneficiosas a una especie de planta deseada.

En algunas modalidades, la composición aceptable en la agricultura que contiene consorcios de la presente descripción puede utilizarse en un método para impartir una o más propiedades o características beneficiosas a una especie de planta deseada.

En algunos aspectos, los microbios aislados y biológicamente puros de la presente descripción, y/o los consorcios de la presente descripción, se derivan de un proceso de selección microbiana acelerada (proceso “AMS”). El proceso AMS utilizado en algunos aspectos de la presente descripción se describe, por ejemplo, en: (1) solicitud de patente internacional NO PCT/NZ2012/000041, publicada el 20 de septiembre de 2012, como Publicación internacional NO WO 2012125050 A1, y (2) solicitud de Patente Internacional NO PCT/NZ2013/000171, publicada el 27 de marzo de 2014, como Publicación Internacional NO WO 2014046553 A1, cada una de estas solicitudes PCT se incorpora en la presente descripción por referencia en su totalidad para todos los propósitos.

Sin embargo, en otras modalidades, los microbios de la presente descripción no se derivan de un proceso de selección microbiana acelerada. En algunos aspectos, los microbios utilizados en las modalidades de la descripción se eligen entre miembros de microbios presentes en una base de datos. En aspectos particulares, los microbios utilizados en las modalidades de la descripción se eligen de los microbios presentes en una base de datos en función de las características particulares de dichos microbios.

La presente descripción establece que un elemento vegetal o parte de planta puede aumentarse de manera efectiva, al recubrir dicho elemento vegetal o parte de planta con un microbio aislado o consorcios microbianos, en una cantidad que normalmente no se encuentra en el elemento vegetal o parte de planta.

Algunas modalidades descritas en la presente descripción son métodos para preparar una composición de semillas agrícolas, o recubrimiento de semillas, que comprenden: poner en contacto la superficie de una semilla con una formulación que comprende una población microbiana purificada que comprende al menos un microbio aislado que es heterólogo o rara vez está presente en la semilla. Modalidades adicionales implican preparar una composición de plantas agrícolas, que comprende: poner en contacto la superficie de una planta con una formulación que comprende una población microbiana purificada que comprende al menos un microbio aislado que es heterólogo para la planta. En otros aspectos, la formulación o microbio(s) se introduce(n) en el interior de la semilla, por ejemplo, en el cotiledón o el embrión otro tejido de la semilla.

En algunos aspectos, la aplicación de un microbio aislado, unos consorcios microbianos, un exudado, un metabolito y/o una composición agrícola de la descripción a una semilla o planta modula una característica de importancia agronómica. La característica de importancia agronómica puede ser, por ejemplo, resistencia a las enfermedades, tolerancia a la sequía, tolerancia al calor, tolerancia al frío, tolerancia a la salinidad, tolerancia a los metales, tolerancia a los herbicidas, tolerancia a los productos químicos, eficiencia mejorada en el uso del agua, utilización mejorada del nitrógeno, resistencia mejorada al estrés por nitrógeno, fijación mejorada del nitrógeno, utilización mejorada de nutrientes (por ejemplo, fosfato, potasio y similares), resistencia a plagas, resistencia a herbívoros, resistencia a patógenos, niveles reducidos de patógenos (por ejemplo, a través de la excreción de metabolitos que perjudican la supervivencia de los patógenos), mayor rendimiento, mayor rendimiento en condiciones de agua limitada, mejora de la salud, mejora del vigor, mejora del crecimiento, mejora de la capacidad fotosintética, mejora de la nutrición, contenido alterado de proteínas, contenido alterado de aceite, aumento de la biomasa, aumento de

la longitud de los brotes, aumento de la longitud de la raíz, arquitectura mejorada de la raíz, aumento del peso de la semilla, germinación más rápida de la semilla, composición alterada de carbohidratos de la semilla, composición alterada del aceite de la semilla, número de vainas, senescencia retrasada, permanencia verde y composición alterada de proteínas de la semilla. En algunos aspectos se modulan al menos 2, 3, 4 o más características de importancia agronómica. En algunos aspectos, la modulación es un efecto positivo sobre una de las características agronómicas antes mencionadas.

En algunos aspectos, los microbios aislados, consorcios y/o composiciones agrícolas de la descripción pueden aplicarse a una planta para modular o alterar una característica de la planta tal como contenido alterado de aceite, contenido alterado de proteínas, composición alterada de carbohidratos de la semilla, composición alterada del aceite de la semilla, composición alterada de proteínas de la semilla, tolerancia a los productos químicos, tolerancia al frío, senescencia retrasada, resistencia a las enfermedades, tolerancia a la sequía, peso de la mazorca, mejora del crecimiento, mejora de la salud, tolerancia al calor, tolerancia a los herbicidas, resistencia a herbívoros, fijación mejorada del nitrógeno, utilización mejorada del nitrógeno, arquitectura mejorada de la raíz, eficiencia mejorada en el uso del agua, aumento de la biomasa, disminución de la biomasa, aumento de la longitud de la raíz, disminución de la longitud de raíz, aumento del peso de la semilla, aumento de la longitud de los brotes, disminución de la longitud de brote, mayor rendimiento, mayor rendimiento en condiciones de agua limitada, masa del grano, contenido de humedad del grano, tolerancia a los metales, número de mazorcas, número de granos por mazorca, número de vainas, mejora de la nutrición, resistencia a patógenos, resistencia a plagas, mejora de la capacidad fotosintética, tolerancia a la salinidad, permanencia verde, mejora del vigor, aumento del peso seco de semillas maduras, aumento del peso fresco de semillas maduras, aumento del número de semillas maduras por planta, aumento del contenido de clorofila, aumento del número de vainas por planta, aumento de la longitud de las vainas por planta, reducción del número de hojas marchitas por planta, reducción del número de hojas severamente marchitas por planta y aumento del número de hojas no marchitas por planta, una modulación detectable en el nivel de un metabolito, una modulación detectable en el nivel de un transcrito y una modulación detectable en el proteoma con relación a una planta de referencia.

En algunas modalidades, las formulaciones agrícolas enseñadas en la presente descripción comprenden al menos un miembro seleccionado del grupo que consiste en un portador compatible con la agricultura, un agente de pegajosidad, un estabilizador microbiano, un fungicida, un agente

antibacteriano, un herbicida, un nematocida, un insecticida, un regulador del crecimiento vegetal, un rodenticida y un nutriente.

Los métodos descritos en la presente descripción pueden incluir poner en contacto una semilla o planta con al menos 100 UFC o esporas, al menos 300 UFC o esporas, al menos 1,000 UFC o esporas, al menos 3,000 UFC o esporas, al menos 10,000 UFC o esporas, al menos 30,000 UFC o esporas, al menos 100,000 UFC o esporas, al menos 300,000 UFC o esporas, al menos 1,000,000 UFC o esporas o más, de los microbios enseñados en la presente descripción.

Los métodos descritos en la presente descripción pueden incluir poner en contacto una semilla o planta con una composición que incluye metabolitos producidos por un solo microbio o consorcio microbiano descrito en la presente descripción. En algunos aspectos, los métodos incluyen poner en contacto una semilla o planta con una composición que incluye al menos 1 mg de metabolitos producidos por un solo microbio o consorcio microbiano descrito en la presente descripción. En algunos aspectos, los métodos incluyen poner en contacto una semilla o planta con una composición que incluye al menos 10 mg de metabolitos producidos por un solo microbio o consorcio microbiano descrito en la presente descripción. En algunos aspectos, los métodos incluyen poner en contacto una semilla o planta con una composición que incluye al menos 100 mg de metabolitos producidos por un solo microbio o consorcio microbiano descrito en la presente descripción. En algunos aspectos, los métodos incluyen poner en contacto una semilla o planta con una composición que incluye al menos 1 g de metabolitos producidos por un solo microbio o consorcio microbiano descrito en la presente descripción. En algunos aspectos, los métodos incluyen poner en contacto una semilla o planta con una composición que incluye al menos 10 g de metabolitos producidos por un solo microbio o consorcio microbiano descrito en la presente descripción. En algunos aspectos, los métodos incluyen poner en contacto una semilla o planta con una composición que incluye al menos 100 g de metabolitos producidos por un solo microbio o consorcio microbiano descrito en la presente descripción. En algunos aspectos, los métodos incluyen poner en contacto una semilla o planta con una composición que incluye al menos 1 kg de metabolitos producidos por un solo microbio o consorcio microbiano descrito en la presente descripción. En algunos aspectos, los métodos incluyen poner en contacto una semilla o planta con una composición que incluye más de 1 kg de metabolitos producidos por un solo microbio o consorcio microbiano descrito en la presente descripción.

En algunas modalidades de los métodos descritos en la presente descripción, un microbio aislado de la descripción está presente en una formulación en una cantidad efectiva para ser detectable

dentro de y/o sobre un tejido diana de una planta agrícola. Por ejemplo, el microbio se detecta en una cantidad de al menos 100 UFC o esporas, al menos 300 UFC o esporas, al menos 1,000 UFC o esporas, al menos 3,000 UFC o esporas, al menos 10,000 UFC o esporas, al menos 30,000 UFC o esporas, al menos 100,000 UFC o esporas, al menos 300,000 UFC o esporas, al menos 1,000,000 UFC o esporas, o más, en y/o sobre un tejido diana de una planta. Alternativamente o además, los microbios de la descripción pueden estar presentes en una formulación en una cantidad efectiva para aumentar la biomasa y/o el rendimiento de una planta a la que se le ha aplicado tal formulación, en al menos 1 %, al menos 2 %, al menos 3 %, al menos 5 %, al menos 10 %, al menos 15 %, al menos 20 %, al menos 30 %, al menos 40 %, al menos 50 %, al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 100 % o más, cuando se comparó con una planta agrícola de referencia a la que no se han aplicado las formulaciones de la descripción. Alternativamente o además, los microbios de la descripción pueden estar presentes en una formulación en una cantidad efectiva para modular de manera detectable una característica agronómica de interés de una planta a la que se le ha aplicado tal formulación, en al menos 1 %, al menos 2 %, al menos 3 %, al menos 5 %, al menos 10 %, al menos 15 %, al menos 20 %, al menos 30 %, al menos 40 %, al menos 50 %, al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 100 % o más, en comparación con una planta agrícola de referencia a la que no se han aplicado las formulaciones de la descripción.

En algunas modalidades de los métodos descritos en la presente descripción, uno o más metabolitos aislados de los microbios o consorcios de la descripción están presentes en una formulación en una cantidad efectiva para ser detectables dentro de y/o sobre un tejido diana de una planta agrícola. Por ejemplo, los metabolitos se detectan en una cantidad de al menos 1 mg, al menos 10 mg, al menos 50 mg, al menos 100 mg, al menos 200 mg, al menos 400 mg, al menos 600 mg, al menos 800 mg, al menos 1 g, o más, en y/o sobre un tejido diana de una planta. Alternativamente o además, los metabolitos aislados de los microbios y consorcios de la descripción pueden estar presentes en una formulación en una cantidad efectiva para aumentar la biomasa y/o el rendimiento de una planta a la que se le ha aplicado tal formulación, en al menos 1 %, al menos 2 %, al menos 3 %, al menos 5 %, al menos 10 %, al menos 15 %, al menos 20 %, al menos 30 %, al menos 40 %, al menos 50 %, al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 100 % o más, en comparación con una planta agrícola de referencia a la que no se han aplicado las formulaciones de la descripción. Alternativamente o además, los metabolitos aislados de los microbios y consorcios de la descripción pueden estar presentes en una formulación

en una cantidad efectiva para modular de manera detectable una característica agronómica de interés de una planta a la que se le ha aplicado tal formulación, en al menos 1 %, al menos 2 %, al menos 3 %, al menos 5 %, al menos 10 %, al menos 15 %, al menos 20 %, al menos 30 %, al menos 40 %, al menos 50 %, al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 100 % o más, en comparación con una planta agrícola de referencia a la que no se han aplicado las formulaciones de la descripción.

En algunas modalidades, las composiciones agrícolas enseñadas en la presente descripción son estables al almacenamiento. En algunos aspectos, los microbios enseñados en la presente descripción se liofilizan. En algunos aspectos, los microbios enseñados en la presente descripción se secan por pulverización. En algunos aspectos, los microbios enseñados en la presente descripción se colocan en una formulación líquida. En algunos aspectos, los microbios enseñados en la presente descripción están presentes en gránulos,

También se describen en la presente descripción una pluralidad de microbios aislados confinados dentro de un objeto seleccionado del grupo que consiste en: botella, tarro, ampolla, empaque, recipiente, bolsa, caja, papelera, sobre, caja de cartón, contenedor, silo, contenedor de envío, cama de camión y caja.

En algunos aspectos, la combinación de una especie de planta seleccionada con un microbio descrito—unidad taxonómica operativa (OTU), cepa o composición que comprende cualquiera de los mencionados anteriormente—conduce a un rendimiento mejorado de los cultivos y la generación de productos de los mismos. Por lo tanto, en un aspecto, la presente descripción proporciona una combinación sintética de una semilla de una primera planta y una preparación de microbio(s) que se recubre sobre la superficie de la semilla de la primera planta, de manera que el microbio está presente en un nivel más alto en la superficie de la semilla que el que está presente en la superficie de una semilla de referencia sin recubrir. En otro aspecto, la presente descripción proporciona una combinación sintética de una parte de una primera planta y una preparación de microbio(s) que se recubre sobre la superficie de la parte de la primera planta, de manera que el microbio está presente en un nivel en la superficie de la parte de la primera planta, que está presente en la superficie de una parte de la planta de referencia sin recubrir. Los métodos antes mencionados pueden usarse solos o en paralelo con tecnologías transgénicas y de fitomejoramiento.

En algunas modalidades, la cepa de *Paenibacillus* se describe en la Tabla 1a, la Tabla 1b o la Tabla 1c. En algunas modalidades, la cepa de *Paenibacillus* comprende una secuencia de polinucleótidos

que comparte al menos 90 % de identidad con una o más de las SEQ ID NO. 1-52. En algunas modalidades, la cepa de *Paenibacillus* es una especie seleccionada del grupo que consiste en: *polymyxa*, *tritici*, *albidus*, *anaericanus*, *azotifigens*, *borealis*, *donghaensis*, *ehimensis*, *graminis*, *jilunlii*, *odorifer*, *panacisoli*, *phoenicis*, *pocheonensis*, *rhizoplanae*, *silage*, *taohuashanense*, *thermophilus*, *typhae* y *wynnii*. En algunas modalidades, la cepa de *Paenibacillus* es del subgrupo I. En algunas modalidades, la cepa de *Paenibacillus* es del subgrupo II.

En algunas modalidades, la cepa bacteriana aislada tiene características morfológicas y fisiológicas sustancialmente similares a las de una cepa bacteriana aislada de la presente descripción. En algunas modalidades, la cepa bacteriana aislada tiene características genéticas sustancialmente similares a las de una cepa bacteriana aislada de la presente descripción. En algunas modalidades, la cepa bacteriana aislada es un mutante, de origen natural o artificial, de una cepa bacteriana aislada de la presente descripción. En algunas modalidades, la cepa bacteriana aislada es una cepa bacteriana editada, alterada o modificada genéticamente. En algunas modalidades, una cepa bacteriana aislada de la presente descripción está en un cultivo sustancialmente puro. En algunas modalidades, una cepa bacteriana aislada de la presente descripción está en un cultivo puro. En algunas modalidades, una cepa bacteriana aislada de la presente descripción está en una fracción celular, extracto o sobrenadante.

En algunas modalidades, se contemplan la progenie y/o mutantes de una cepa bacteriana aislada de la presente descripción. En algunas modalidades, se contemplan la progenie, mutantes y/o versiones genéticamente modificadas de una cepa bacteriana aislada de la presente descripción.

En algunas modalidades, se contempla una preparación sin células o inactivada de una cepa bacteriana aislada de la presente descripción, o un mutante de dicha cepa bacteriana aislada. En algunas modalidades, se contempla una preparación sin células o inactivada de una cepa bacteriana aislada de la presente descripción, o un mutante o variante editada, alterada o modificada genéticamente de dicha cepa bacteriana aislada. En algunas modalidades, se contempla un metabolito producido por una cepa bacteriana aislada de la presente descripción, o un mutante de dicha cepa bacteriana aislada. En algunas modalidades, se contempla un metabolito producido por una cepa bacteriana aislada de la presente descripción, o un mutante o variante modificada genéticamente de dicha cepa bacteriana aislada.

En algunas modalidades, una composición agrícola comprende una cepa bacteriana aislada y un portador aceptable en la agricultura. La cepa bacteriana aislada puede estar presente en la

composición de 1×10^2 a 1×10^{12} UFC por gramo. La composición agrícola puede formularse como un recubrimiento de semillas.

En algunas modalidades, un método para impartir al menos una característica beneficiosa a una especie de planta comprende aplicar una cepa bacteriana aislada a la planta o al medio de cultivo en donde se encuentra dicha planta. En algunas modalidades, un método para impartir al menos una característica beneficiosa a una especie de planta comprende aplicar una composición agrícola de la presente descripción a la planta o al medio de cultivo en donde se encuentra la planta.

En algunas modalidades, la planta es una planta de cultivo no leguminosa. En algunas modalidades, la planta es una monocotiledónea. En algunas modalidades, la planta es una monocotiledónea C3. En algunas modalidades, la planta es una monocotiledónea C4. En algunas modalidades, la planta se selecciona del grupo que consiste en: maíz, trigo, arroz, sorgo, caña de azúcar, cebolla, bambú, palma, ajo, jengibre, lirio, narciso, iris, orquídea, campanilla azul, tulipán, amaryllis, banana, plátano, banano, jengibre, cúrcuma, cardamomo, espárrago, piña, ciperáceas, juncáceas, puerro, hierbas forrajeras, trigo sarraceno, quinoa, chía, y mijo.

En algunas modalidades, la presente descripción enseña un método para hacer crecer una planta que tiene al menos una característica beneficiosa. En algunas modalidades, el método comprende aplicar una cepa bacteriana aislada o un consorcio microbiano a la semilla de una planta; sembrar o plantar la semilla; y cultivar la planta. En determinadas modalidades, la cepa bacteriana aislada o el consorcio microbiano se aplica como una composición agrícola que además incluye un portador aceptable en la agricultura.

En algunas modalidades, el consorcio microbiano tiene características morfológicas y fisiológicas sustancialmente similares a las del consorcio microbiano de la presente descripción. En algunas modalidades, el consorcio microbiano tiene características genéticas sustancialmente similares a las del consorcio microbiano de la presente descripción. En algunas modalidades, el consorcio microbiano se encuentra en un cultivo sustancialmente puro. En algunas modalidades, se contempla una generación posterior de cualquier microbio del consorcio microbiano. En algunas modalidades, se contempla un mutante de cualquier microbio del consorcio microbiano. En algunas modalidades, se contempla una variante editada, alterada o modificada genéticamente de cualquier microbio del consorcio microbiano. En algunas modalidades, se contempla una preparación sin células o inactivada del consorcio microbiano, o un mutante o variante editada, alterada o modificada genéticamente de cualquier microbio en el consorcio microbiano. En algunas modalidades, se contempla un metabolito producido por el consorcio microbiano, o un mutante o

variante editada, alterada o modificada genéticamente de cualquier microbio en el consorcio microbiano.

En algunas modalidades, una composición agrícola comprende un consorcio microbiano y un portador aceptable en la agricultura. El consorcio microbiano de la composición agrícola puede estar presente en la composición de 1×10^3 a 1×10^{12} células bacterianas por gramo. En algunas modalidades, la composición agrícola se formula como un recubrimiento de semillas. En algunas modalidades, un método para impartir al menos una característica beneficiosa a una especie de planta comprende aplicar un consorcio microbiano a dicha planta, o a un medio de cultivo en donde se encuentra dicha planta. En algunas modalidades, un método para impartir al menos una característica beneficiosa a una especie de planta, que comprende aplicar la composición agrícola a la planta o a un medio de cultivo en donde se encuentra dicha planta.

En cualquiera de los métodos, el microbio puede incluir una secuencia de ácido nucleico de ARNr 16S que tiene al menos 97 % de identidad de secuencia con una secuencia de ácido nucleico de ARNr 16S de una bacteria seleccionada de los organismos proporcionados en la Tabla 1a, la Tabla 1b y/o la Tabla 1c.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS Y EL LISTADO DE SECUENCIAS

La descripción puede entenderse más completamente a partir de la siguiente descripción detallada y el Listado de secuencias, que forma parte de esta solicitud.

Las descripciones de secuencias y listado de secuencias adjuntas cumplen con las reglas que rigen las descripciones de secuencias de nucleótidos y aminoácidos en las solicitudes de patentes, tal como se establece en 37 CFR §§ 1.821 y 1.825.

Las descripciones de las cepas originales, las cepas editadas y las secuencias descritas en la presente descripción se proporcionan en las Tablas 1a, 1b y 1c.

Tabla 1a: Cepas originales, taxon y fuente de *Paenibacillus*

Las designaciones de las especies se proporcionan mediante la determinación del ARNr 16S, así como también la determinación de la secuenciación del genoma completo (WGS). Las variaciones pueden atribuirse a factores tales como la calidad de la secuenciación, el contenido de la base de datos de referencia, el algoritmo bioinformático, el flujo taxonómico, etc.

*Nota: Los identificadores de cepas pueden comprender además un prefijo opcional, como se muestra en la tabla. Por ejemplo, la cepa 54805 puede denominarse opcionalmente como el sinónimo PM54805.

	Prefijo opcional*	Cepa #	País donde se obtuvo	Fuente vegetal	Fuente del tejido	Especie según 16S	Especie según WGS
5	PM	54805	NZ	Trigo	rizosfera	<i>polymyxa</i>	<i>polymyxa</i>
	CM	1118	US	Soya	Nódulo	<i>polymyxa</i>	<i>polymyxa</i>
	CM	17899	US	Sorgo	rizosfera	<i>odorifer</i>	<i>odorifer</i>
	CM	17908	US	Sorgo	rizosfera	<i>polymyxa</i>	<i>odorifer</i>
	CM	17911	US	Sorgo	rizosfera	<i>borealis</i>	<i>sp.</i>
10	CM	17911	US	Sorgo	rizosfera	<i>sp.</i>	<i>sp.</i>
	CM	17944	US	Sorgo	rizosfera	<i>tritici</i>	<i>sp.</i>
	CM	17964	US	Sorgo	rizosfera	<i>polymyxa</i>	<i>odorifer</i>
	CM	17973	US	Sorgo	rizosfera	<i>polymyxa</i>	<i>odorifer</i>
	CM	18033	US	Sorgo	rizosfera	<i>polymyxa</i>	<i>odorifer</i>
15	CM	18047	US	Sorgo	rizosfera	<i>tritici</i>	<i>sp.</i>
	CM	18054	US	Sorgo	rizosfera	<i>tritici</i>	<i>sp.</i>
	CM	2649	US	Elote	endosfera	<i>graminis</i>	<i>sp.</i>
	CM	2651	US	Elote	endosfera	<i>borealis</i>	<i>albidus</i>
	PM	53953	NZ	Lucerna (Alfalfa)	rizosfera	<i>polymyxa</i>	<i>polymyxa</i>
20	PM	55083	NZ	Trigo	rizosfera	<i>polymyxa</i>	<i>polymyxa</i>
	PM	55136	NZ	Trigo	rizosfera	<i>polymyxa</i>	<i>polymyxa</i>
	PM	55470	NZ	Maíz (elote)	rizosfera	<i>polymyxa</i>	<i>polymyxa</i>
	PM	68890	NZ	Lechuga	rizosfera	<i>polymyxa</i>	<i>polymyxa</i>
	PM	70995	NZ	Maíz (elote)	rizosfera	<i>polymyxa</i>	<i>polymyxa</i>
25	PM	77155	NZ	Sorgo	rizosfera	<i>polymyxa</i>	<i>polymyxa</i>
	PM	77155	NZ	Sorgo	rizosfera	<i>polymyxa</i>	<i>polymyxa</i>
	PM	77357	NZ	Sorgo	rizosfera	<i>polymyxa</i>	<i>polymyxa</i>
	PM	77359	NZ	Sorgo	rizosfera	<i>polymyxa</i>	<i>polymyxa</i>
	CM	8051	US	Soya	rizosfera	<i>polymyxa</i>	<i>polymyxa</i>
30	CM	8619	US	Otros	rizosfera	<i>polymyxa</i>	<i>polymyxa</i>

Tabla 1b: Cepas editadas de *Paenibacillus*

Tipos de edición: A = inactivación de NifH; B = inactivación de GlnR; C = truncamiento de C25 en GlnR; D = inactivación del sitio II de unión a GlnR; E = duplicación del sitio II de unión a GlnR (en la región del sitio II); F = duplicación & inactivación del sitio II de unión a GlnR; G = truncamiento de C25 en CueR; H = inactivación de CueR; I = truncamiento de C25 en CueR & inactivación del sitio II de unión a GlnR; J = inactivación de CueR & inactivación del sitio II de unión a GlnR; K = truncamiento de C25 en CueR & inactivación y duplicación del sitio II de unión a GlnR; L = inactivación y duplicación del sitio II de unión a GlnR & inactivación de NifH.

*Nota: Los identificadores de cepas pueden comprender además un prefijo opcional, como se muestra en la tabla. Por ejemplo, la cepa original (PM)53593 con tipo de edición D sería “(PE)53953-G3”, con los prefijos “PM” (ver la Tabla 1a) y “PE” para las cepas originales y editadas, respectivamente, que son designaciones adicionales opcionales.

5			ID de la edición (G#)											
	Cepa original #	Prefijo de ID de la edición*	Tipo de edición A	Tipo de edición B	Tipo de edición C	Tipo de edición D	Tipo de edición E	Tipo de edición F	Tipo de edición G	Tipo de edición H	Tipo de edición I	Tipo de edición J	Tipo de edición K	Tipo de edición L
	53953	PE				3								
	55083	PE			14, 15, 16		11	3						
10	55136	PE				6	9, 10							
	8619	CE	46, 47, 79, 80			19, 20, 21, 22, 30, 31, 32	52, 53	36, 38, 39, 50	29	25, 26	58, 59, 60	88	91	63, 64
	68890	PE		32, 33	12, 24, 25, 26	3, 4, 5	19, 20, 21	8						
	77359	PE				3, 4, 5	17, 18	21						
15	77155	PE	14, 15, 16	49	46	3, 4, 5, 11, 21, 22	27, 28	8, 9, 31, 32						
	70995	PE				4								
	54805	PE				8, 9, 10		3, 4						
	17899	CE			13									
20	17911	CE			12									
	55470	PE					4, 5							
	77357	PE					4, 5	8, 9						
	55146	PE						6						

Tabla 1c: Secuencias

25	SEQ ID NO:	Nombre	Tipo	Especie del género
	1	Cepa 54805 16S	ADN	<i>Paenibacillus polymyxa</i>
30	2	Cepa 1118 16S	ADN	<i>Paenibacillus polymyxa</i>
	3	Cepa 17899 16S	ADN	<i>Paenibacillus odorifer</i>
	4	Cepa 17908 16S	ADN	<i>Paenibacillus polymyxa</i>
	5	Cepa 17911 16S-1	ADN	<i>Paenibacillus borealis</i>
	6	Cepa 17911 16S-2	ADN	<i>Paenibacillus sp.</i>
	7	Cepa 17944 16S	ADN	<i>Paenibacillus tritici</i>
	8	Cepa 17964 16S	ADN	<i>Paenibacillus polymyxa</i>
	9	Cepa 17973 16S	ADN	<i>Paenibacillus polymyxa</i>
	10	Cepa 18033 16S	ADN	<i>Paenibacillus polymyxa</i>
	11	Cepa 18047 16S	ADN	<i>Paenibacillus tritici</i>

5	12	Cepa 18054 16S	ADN	<i>Paenibacillus tritici</i>
	13	Cepa 2649 16S	ADN	<i>Paenibacillus graminis</i>
	14	Cepa 2651 16S	ADN	<i>Paenibacillus borealis</i>
	15	Cepa 55083 16S	ADN	<i>Paenibacillus polymyxa</i>
	16	Cepa 55136 16S	ADN	<i>Paenibacillus polymyxa</i>
10	17	Cepa 68890 16S	ADN	<i>Paenibacillus polymyxa</i>
	18	Cepa 77155 16S-1	ADN	<i>Paenibacillus polymyxa</i>
	19	Cepa 77155 16S-2	ADN	<i>Paenibacillus polymyxa</i>
	20	Cepa 77359 16S	ADN	<i>Paenibacillus polymyxa</i>
	21	Cepa 8051 16S	ADN	<i>Paenibacillus polymyxa</i>
15	22	Cepa 8619 16S	ADN	<i>Paenibacillus polymyxa</i>
	23	Cepa WLY78 16S	ADN	<i>Paenibacillus polymyxa</i>
	24	Secuencia del gen <i>glnR</i> de tipo silvestre de la cepa 17911	ADN	<i>Paenibacillus borealis</i>
	25	Secuencia de <i>glnR</i> mutante de truncamiento de la cepa 17911	ADN	<i>Paenibacillus borealis</i>
	26	Secuencia del gen <i>glnR</i> de tipo silvestre de la cepa 17899	ADN	<i>Paenibacillus odorifer</i>
20	27	Secuencia de <i>glnR</i> mutante de truncamiento de la cepa 17899	ADN	<i>Paenibacillus odorifer</i>
	28	Secuencia del gen <i>glnR</i> de tipo silvestre de la cepa 8619	ADN	<i>Paenibacillus polymyxa</i>
	29	Secuencia de <i>glnR</i> mutante de truncamiento de la cepa 8619	ADN	<i>Paenibacillus polymyxa</i>
	30	Secuencia del promotor de nif de tipo silvestre de la cepa 8619	ADN	<i>Paenibacillus polymyxa</i>
	31	Secuencia del promotor de nif modificado de la cepa 8619	ADN	<i>Paenibacillus polymyxa</i>
25	32	Secuencia del promotor de nif modificado de la cepa 8619	ADN	<i>Paenibacillus polymyxa</i>
	33	Consenso del sitio I de unión a GlnR	ADN	<i>Artificial</i>
	34	Sitio I de unión a GlnR de la cepa WLY78	ADN	<i>Paenibacillus polymyxa WLY78</i>
	35	Sitio I de unión a GlnR de la cepa 8619	ADN	<i>Paenibacillus polymyxa</i>
	36	Sitio I de unión a GlnR de la cepa 17911	ADN	<i>Paenibacillus borealis</i>
30	37	Sitio I de unión a GlnR de la cepa 17899	ADN	<i>Paenibacillus odorifer</i>
	38	Sitio I de unión a GlnR de la cepa 2651	ADN	<i>Paenibacillus borealis</i>
	39	Sitio I de unión a GlnR de la cepa 2649	ADN	<i>Paenibacillus graminis</i>
	40	Sitio I de unión a GlnR de la cepa 1118	ADN	<i>Paenibacillus polymyxa</i>
	41	Sitio I de unión a GlnR de la cepa 8051	ADN	<i>Paenibacillus polymyxa</i>
	42	Sitio I de unión a GlnR de la cepa 17908	ADN	<i>Paenibacillus polymyxa</i>
	43	Sitio I de unión a GlnR de la cepa 17964	ADN	<i>Paenibacillus polymyxa</i>
	44	Sitio I de unión a GlnR de la cepa 17973	ADN	<i>Paenibacillus polymyxa</i>
	45	Sitio I de unión a GlnR de la cepa 18033	ADN	<i>Paenibacillus polymyxa</i>
	46	Sitio I de unión a GlnR de la cepa 17944	ADN	<i>Paenibacillus tritici</i>

	47	Sitio I de unión a GlnR de la cepa 18047	ADN	<i>Paenibacillus tritici</i>
	48	Sitio I de unión a GlnR de la cepa 18054	ADN	<i>Paenibacillus tritici</i>
	49	<i>Paenibacillus</i> sp. Sitio I de unión a GlnR	ADN	<i>Paenibacillus</i> sp.
	50	Consenso del sitio II de unión a GlnR	ADN	<i>Artificial</i>
5	51	Sitio II de unión a GlnR de la cepa WLY78	ADN	<i>Paenibacillus polymyxa</i> WLY78
	52	Sitio II de unión a GlnR de la cepa 8619	ADN	<i>Paenibacillus polymyxa</i>
	53	Sitio II de unión a GlnR de la cepa 17911	ADN	<i>Paenibacillus borealis</i>
	54	Sitio II de unión a GlnR de la cepa 17899	ADN	<i>Paenibacillus odorifer</i>
	55	Sitio II de unión a GlnR de la cepa 2651	ADN	<i>Paenibacillus borealis</i>
	56	Sitio II de unión a GlnR de la cepa 2649	ADN	<i>Paenibacillus graminis</i>
	57	Sitio II de unión a GlnR de la cepa 1118	ADN	<i>Paenibacillus polymyxa</i>
10	58	Sitio II de unión a GlnR de la cepa 8051	ADN	<i>Paenibacillus polymyxa</i>
	59	Sitio II de unión a GlnR de la cepa 17908	ADN	<i>Paenibacillus polymyxa</i>
	60	Sitio II de unión a GlnR de la cepa 17964	ADN	<i>Paenibacillus polymyxa</i>
	61	Sitio II de unión a GlnR de la cepa 17973	ADN	<i>Paenibacillus polymyxa</i>
	62	Sitio II de unión a GlnR de la cepa 18033	ADN	<i>Paenibacillus polymyxa</i>
	63	Sitio II de unión a GlnR de la cepa 17944	ADN	<i>Paenibacillus tritici</i>
	64	Sitio II de unión a GlnR de la cepa 18047	ADN	<i>Paenibacillus tritici</i>
15	65	Sitio II de unión a GlnR de la cepa 18054	ADN	<i>Paenibacillus tritici</i>
	66	<i>Paenibacillus</i> sp. Sitio II de unión a GlnR	ADN	<i>Paenibacillus</i> sp.

Los microorganismos descritos en esta solicitud se depositan en la Colección de cultivos del servicio de investigación agrícola (NRRL), que es una autoridad de depósito internacional, ubicada en 1815 North University Street, Peoria, IL 61604, USA.

20 Los depósitos se realizan bajo los términos del Tratado de Budapest sobre el reconocimiento internacional del depósito de microorganismos para los fines del procedimiento de patente. Los depósitos se realizan de acuerdo con, y para satisfacer, los criterios establecidos en 37 CFR §§ 1.801-1.809 y el manual de procedimientos de examen de patentes §§ 2402-2411.05.

25 La cepa 8619-G25 se depositó en la NRRL el 11 de marzo de 2022 con el núm. de depósito B68109.

La cepa 8619-G50 se depositó en la NRRL el 11 de marzo de 2022 con el núm. de depósito B68108.

La cepa 8619-G53 se depositó en la NRRL el 11 de marzo de 2022 con el núm. de depósito B68107.

30 La cepa 8619-G88 se depositó en la NRRL el 11 de marzo de 2022 con el núm. de depósito B68104.

La cepa 17899-G13 se depositó en la NRRL el 11 de marzo de 2022 con el núm. de depósito B68110.

La cepa 55083-G14 se depositó en la NRRL el 11 de marzo de 2022 con el núm. de depósito B68106.

5 La cepa 68890-G12 se depositó en la NRRL el 11 de marzo de 2022 con el núm. de depósito B68103.

La cepa 77155-G3 se depositó en la NRRL el 11 de marzo de 2022 con el núm. de depósito B68105.

10 La cepa 77155-G46 se depositó en la NRRL el 11 de marzo de 2022 con el núm. de depósito B68102.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Aunque se cree que los siguientes términos serán bien entendidos por un experto en la técnica, los siguientes se exponen para facilitar la explicación del tema en cuestión descrito en la presente.

15 El término “un” o “una” se refiere a uno o más de esa entidad, es decir, puede referirse a un referente plural. Como tal, los términos “un” o “una”, “uno o más” y “al menos uno” se usan indistintamente en la presente descripción. Además, la referencia a “un elemento” por el artículo indefinido “un” o “una” no excluye la posibilidad de que esté presente más de uno de los elementos, a menos que el contexto requiera claramente que haya uno y solo uno de los elementos.

20 Como se usa en la presente descripción, los términos “microorganismo” o “microbio” deben tomarse en sentido amplio. Estos términos se usan indistintamente e incluyen, pero no se limitan a, los dos dominios procarióticos, bacterias y arqueas, así como también hongos y protistas eucarióticos. En algunas modalidades, la descripción se refiere a los “microbios” de la Tabla 1A, o los “microbios” de varias otras tablas o párrafos presentes en la descripción. Esta caracterización
25 puede referirse no solo a los géneros bacterianos taxonómicos identificados de las tablas, sino también a las especies taxonómicas identificadas, así como también a las diversas cepas bacterianas nuevas y recién identificadas de dichas tablas.

Como se usa en la presente descripción, el término “microbio” o “microorganismo” se refiere a cualquier especie o taxón de microorganismos, que incluye, pero no se limita a, arqueas, bacterias,
30 microalgas, hongos (que incluye las especies de moho y levadura), micoplasmas, microsporas, nanobacterias, oomicetos y protozoos. En algunas modalidades, un microbio o microorganismo abarca células individuales (por ejemplo, microorganismos unicelulares) o más de una célula (por

ejemplo, microorganismo pluricelular). Por lo tanto, una "población de microorganismos" puede referirse a múltiples células de un único microorganismo, en donde las células comparten una derivación genética común.

Como se usa en la presente descripción, el término "bacteria" o "bacterias" se refiere en general a cualquier organismo procariótico, y puede hacer referencia a un organismo del reino Eubacteria (Bacteria), reino Archaeobacteria (Archaea) o ambos. En algunos casos, los géneros bacterianos u otras clasificaciones taxonómicas pueden estar en flujo taxonómico, han sido reasignadas debido a diversas razones (tales como, entre otras, el campo en evolución de la secuenciación del genoma completo), y/o pueden variar en función de la metodología, y se entiende que tales variaciones de nomenclatura están dentro del alcance de cualquier taxonomía reivindicada. Por ejemplo, determinadas especies del género *Erwinia* se han descrito en la bibliografía como pertenecientes al género *Pantoea* (Zhang, Y., Qiu, S. Examining phylogenetic relationships of *Erwinia* and *Pantoea* species using whole genome sequence data. *Antonie van Leeuwenhoek* 108, 1037–1046 (2015)).

El término "16S" se refiere a la secuencia de ADN de la secuencia de ARN ribosomal (ARNr) 16S de una bacteria. La secuenciación del gen ARNr 16S es un método bien establecido para estudiar la filogenia y la taxonomía de las bacterias. [00166] Como se usa en la presente descripción, el término "hongo" u "hongos" se refiere en general a cualquier organismo del reino Hongos. La clasificación taxonómica histórica de los hongos ha sido de acuerdo con la presentación morfológica. A partir de mediados de 1800, se reconoció que algunos hongos tienen un ciclo de vida pleomórfico y que se usaban diferentes designaciones de nomenclatura para diferentes formas del mismo hongo. En 1981, el congreso de Sydney de la Asociación Internacional de Micología estableció reglas para la denominación de hongos de acuerdo con su estado como anamorfo, teleomorfo u holomorfo (Taylor, J.W. One Fungus = One Name: DNA and fungal nomenclature twenty years after PCR. *IMA Fungus* 2, 113–120 (2011)). Con el desarrollo de la secuenciación genómica, se hizo evidente que la clasificación taxonómica basada en la filogenética molecular no se alineaba con la nomenclatura basada en la morfología (Shenoy, B.D., Jeewon, R. y Hyde, K.D. (2007). Impact of DNA sequence-data on the taxonomy of anamorphic fungi. *Fungal Diversity* 26: 1-54.). Como resultado, en 2011 el Congreso Botánico Internacional adoptó una resolución que aprobaba el Código Internacional de Nomenclatura para Algas, Hongos y Plantas (Código de Melbourne) (2012), con el resultado declarado de designar "Un Hongo = Un Nombre" (Hawksworth, D.L. Managing and coping with names of pleomorphic fungi in a period of transition. *IMA Fungus* 3, 15–24 (2012)).

El término "separador transcrito interno" ("ITS") se refiere al ADN separador (ADN no codificante) situado entre los genes de ARNr ribosomal (ARNr) de subunidad pequeña y ARNr de subunidad grande (LSU) en el cromosoma o la región transcrita correspondiente en el transcrito del precursor de ARNr policistrónico. La secuenciación de genes ITS es un método bien establecido para estudiar la filogenia y la taxonomía de los hongos. En algunos casos, la secuencia "subunidad larga" ("LSU") se usa para identificar hongos. La secuenciación de genes LSU es un método bien establecido para estudiar la filogenia y la taxonomía de los hongos. Algunos microbios fúngicos de la presente invención pueden describirse mediante una secuencia ITS y algunos pueden describirse mediante una secuencia LSU. Ambos se entienden igualmente descriptivos y precisos para determinar la taxonomía.

El término "consorcios microbianos" o "consorcio microbiano" se refiere a un subconjunto de una comunidad microbiana de especies microbianas individuales, o cepas de una especie, que pueden describirse como que realizan una función común, o pueden describirse como participantes en, o que conduce a, o se correlaciona con, un parámetro reconocible o característica fenotípica de la planta. La comunidad puede comprender una o más especies, o cepas de una especie, de microbios. En algunos casos, los microbios coexisten simbióticamente dentro de la comunidad.

El término "comunidad microbiana" significa un grupo de microbios que comprende dos o más especies o cepas. A diferencia de los consorcios microbianos, una comunidad microbiana no tiene que llevar a cabo una función común, o no tiene que participar, conducir o correlacionarse con un parámetro reconocible o una característica fenotípica de la planta.

El término "selección microbiana acelerada" o "AMS" se usa indistintamente con el término "selección microbiana dirigida" o "DMS" y se refiere a la metodología de selección iterativa que se utilizó, en algunas modalidades de la descripción, para derivar las especies microbianas reivindicadas o consorcios de dichas especies.

Como se usa en la presente descripción, "aislar", "aislado", "microbio aislado" y términos similares significan que uno o más microorganismos se han separado de al menos uno de los materiales con los que está asociado en un medio ambiente particular (por ejemplo, suelo, agua, tejido vegetal).

Por lo tanto, un "microbio aislado" no existe en su medio ambiente que ocurre de manera natural; más bien, es a través de las diversas técnicas descritas en la presente descripción que el microbio se ha eliminado de su medio ambiente natural y colocado en un estado de existencia no natural. Así,

la cepa aislada puede existir como, por ejemplo, un cultivo biológicamente puro, o como esporas (u otras formas de la cepa) en asociación con un portador agrícola.

En determinados aspectos de la descripción, los microbios aislados existen como cultivos aislados y biológicamente puros. Un experto en la técnica apreciará que un cultivo aislado y biológicamente puro de un microbio particular indica que dicho cultivo está sustancialmente libre (dentro de la razón científica) de otros organismos vivos y contiene solo el microbio individual en cuestión. El cultivo puede contener concentraciones variables de dicho microbio. La presente descripción señala que los microbios aislados y biológicamente puros a menudo “se diferencian necesariamente de los materiales menos puros o impuros.” Véase, p. ej., *In re Bergstrom*, 427 F.2d 1394, (CCPA 1970)(sobre prostaglandinas purificadas), véase también, *In re Bergy*, 596 F.2d 952 (CCPA 1979)(sobre microbios purificados), véase también, *Parke-Davis y Co. v. H.K. Mulford y Co.*, 189 F. 95 (S.D.N.Y. 1911) (*Learned Hand* sobre adrenalina purificada), ratificado parcialmente, revocado parcialmente, 196 F. 496 (2d Cir. 1912), cada uno de los que se incorporan en la presente descripción como referencia. Además, en algunos aspectos, la descripción proporciona determinadas medidas cuantitativas de la concentración, o limitaciones de pureza, que deben encontrarse dentro de un cultivo microbiológico aislado y biológicamente puro. La presencia de estos valores de pureza, en determinadas modalidades, es un atributo adicional que distingue a los microbios descritos actualmente de aquellos microbios que existen en un estado natural. Véase, por ejemplo, *Merck y Co. v. Olin Mathieson Chemical Corp.*, 253 F.2d 156 (4ta Cir. 1958) (que analiza las limitaciones de pureza para la vitamina B12 producida por microbios), incorporado en la presente descripción como referencia.

Como se usa en la presente descripción, “aislados individuales” debe entenderse como una composición o cultivo que comprende un predominio de un único género, especie o cepa de microorganismo, después de la separación de uno o más microorganismos. La frase no debe interpretarse para indicar hasta qué punto se ha aislado o purificado el microorganismo. Sin embargo, los “aislados individuales” pueden comprender sustancialmente solo un género, especie o cepa de microorganismo.

Con respecto a los microbios, el término “modificado” significa que el microbio se ha cambiado de alguna manera, en comparación con el estado natural en el que se encontró. En este contexto, “modificado” es sinónimo de “genomodificado”, e indica que la mano del hombre participó en la creación de la modificación. En algunos casos, la modificación incluye el cambio de un polinucleótido dentro del microbio, por ejemplo en su genoma. Las modificaciones pueden incluir

la delección, inserción, reemplazo, y/o alteración química de al menos un nucleótido, y pueden dar como resultado un cambio en el fenotipo del microbio (p. ej., regulación en aumento de una vía particular, regulación en descenso de una vía particular, inactivación de una función de gen o proteína) y/o un cambio en el fenotipo de otro, organismo heterólogo con el cual el microbio asociado está asociado o se convierte en asociado.

El término “medio de cultivo”, como se usa en la presente descripción, es cualquier medio que sea adecuado para soportar el crecimiento de una planta. A manera de ejemplo, los medios pueden ser naturales o artificiales, que incluyen, pero no se limitan a: tierra, mezclas para macetas, corteza, vermiculita, soluciones hidropónicas solas y aplicadas a sistemas sólidos de soporte de plantas y geles de cultivo de tejidos. Se apreciará que los medios pueden usarse solos o en combinación con uno o más medios. También puede usarse con o sin la adición de nutrientes exógenos y sistemas de soporte físico para raíces y follaje.

En una modalidad, el medio de cultivo es un medio natural tal como suelo, arena, lodo, arcilla, humus, regolito, roca o agua. En otra modalidad, el medio de cultivo es artificial. Dicho medio de cultivo artificial puede construirse para imitar las condiciones de un medio natural; sin embargo, esto no es necesario. Los medios de crecimiento artificiales pueden estar hechos de uno o más de cualquier cantidad y combinación de materiales, que incluyen arena, minerales, vidrio, roca, agua, metales, sales, nutrientes, agua. En una modalidad, el medio de cultivo es estéril. En otra modalidad, el medio de cultivo no es estéril.

El medio puede modificarse o enriquecerse con compuestos o componentes adicionales, por ejemplo, un componente que pueda ayudar en la interacción y/o selección de grupos específicos de microorganismos con la planta y entre sí. Por ejemplo, podrían estar presentes antibióticos (tales como la penicilina) o esterilizantes (por ejemplo, sales de amonio cuaternarias y agentes oxidantes) y/o las condiciones físicas (tales como la salinidad, los nutrientes de las plantas (por ejemplo, minerales orgánicos e inorgánicos (tales como fósforo, sales nitrogenadas, amoniaco, potasio y micronutrientes tales como cobalto y magnesio), pH y/o temperatura) podrían modificarse.

El término “planta” incluye genéricamente plantas completas, órganos vegetales, tejidos vegetales, semillas, células vegetales, semillas y progenie de las mismas. Las células vegetales incluyen, sin limitación, células de semillas, cultivos en suspensión, embriones, regiones meristemáticas, tejido calloso, hojas, raíces, brotes, gametofitos, esporofitos, polen y microsporas. Como se usa en la presente descripción, el término “elemento vegetal” se refiere a células vegetales, protoplastos vegetales, cultivos de tejidos de células vegetales a partir de los cuales pueden regenerarse plantas,

callos de plantas, grupos de plantas y células vegetales que están intactas en plantas o partes de plantas, tales como embriones, polen, óvulos, semillas, hojas, flores, ramas, frutos, granos, orejas, mazorcas, cáscaras, tallos, raíces, puntas de raíces, anteras y similares, así como también las partes mismas. La progenie, las variantes y los mutantes de las plantas regeneradas también se incluyen dentro del alcance de la invención, siempre y cuando estas partes comprendan los polinucleótidos introducidos.

Un “elemento vegetal” pretende hacer referencia a una planta completa o un componente de planta, que puede comprender tejidos diferenciados y/o no diferenciados, por ejemplo, pero no se limita a, tejidos vegetales, partes y tipos de células. En una modalidad, un elemento vegetal es uno de los siguientes: planta completa, plántula, tejido meristemático, tejido fundamental, tejido vascular, tejido dérmico, semilla, hoja, raíz, brote, tallo, flor, fruto, estolón, bulbo, tubérculo, cormo, keiki, brote, yema, tejido tumoral y diversas formas de células y cultivo (por ejemplo, células individuales, protoplastos, embriones, tejido calloso). El término “órgano vegetal” se refiere al tejido vegetal o un grupo de tejidos que constituyen una parte morfológica y funcionalmente distinta de una planta. Como se usa en la presente descripción, una “parte vegetal” es sinónimo de una “porción” de una planta, y se refiere a cualquier parte vegetal, y puede incluir distintos tejidos y/u órganos, y puede usarse indistintamente con el término “tejido” todo el tiempo.

De manera similar, un “elemento reproductivo vegetal” pretende hacer referencia genéricamente a cualquier parte de una planta que sea capaz de iniciar otras plantas a través de la reproducción sexual o asexual de esa planta, por ejemplo, pero no se limita a: semilla, plántula, raíz, brote, esqueje, vástago, injerto, estolón, bulbo, tubérculo, cormo, keiki o yema. El elemento vegetal puede estar en una planta o en un órgano vegetal, cultivo de tejido o cultivo celular.

“Progenie” comprende cualquier generación subsiguiente de un organismo, producida mediante reproducción sexual o asexual.

Se entiende por “grano” la semilla madura producida por cultivadores comerciales con fines distintos al cultivo o la reproducción de la especie.

El término “monocotiledónea” o “monocot” se refiere a la subclase de plantas angiospermas también conocidas como “monocotiledóneas”, cuyas semillas típicamente comprenden solo una hoja embrionaria o cotiledón. El término incluye referencias a plantas completas, elementos vegetales, órganos vegetales (por ejemplo, hojas, tallos, raíces, etc.), semillas, células vegetales y progenie de las mismas.

El término “dicotiledónea” o “dicot” se refiere a la subclase de plantas angiospermas también conocidas como “dicotiledóneas”, cuyas semillas típicamente comprenden dos hojas embrionarias o cotiledones. El término incluye referencias a plantas completas, elementos vegetales, órganos vegetales (por ejemplo, hojas, tallos, raíces, etc.), semillas, células vegetales y progenie de las mismas.

Como se usa en la presente descripción, el término “cultivar” se refiere a una variedad, cepa o raza de planta que se ha producido mediante técnicas hortícolas o agronómicas y que normalmente no se encuentra en poblaciones silvestres.

Tal como se usa en la presente descripción, “mejorada” debe tomarse ampliamente para abarcar la mejora de una característica de una planta, en comparación con una planta control, o en comparación con una cantidad promedio conocida asociada con la característica en cuestión. Por ejemplo, la biomasa vegetal “mejorada” asociada con la aplicación de un microbio beneficioso, o consorcios, de la descripción puede demostrarse al comparar la biomasa de una planta tratada por los microbios enseñados en la presente descripción con la biomasa de una planta control no tratada.

Alternativamente, se podría comparar la biomasa de una planta tratada por los microbios enseñados en la presente descripción con la biomasa promedio normalmente alcanzada por la planta dada, como se representa en publicaciones científicas o agrícolas conocidas por los expertos en la técnica. En la presente descripción, “mejorada” no exige necesariamente que los datos sean estadísticamente significativos (por ejemplo, $p < 0.05$); más bien, cualquier diferencia cuantificable que demuestre que un valor (por ejemplo, el valor promedio del tratamiento) es diferente de otro (por ejemplo, el valor promedio del control) puede elevarse al nivel de “mejorada.”

Como se usa en la presente descripción, “inhibir y suprimir” y términos similares no deben interpretarse como que requieren una inhibición o supresión completa, aunque esto puede ser conveniente en algunas modalidades.

Como se usa en la presente descripción, el término “genotipo” se refiere a la composición genética de una célula individual, cultivo celular, tejido, organismo (por ejemplo, una planta), o un grupo de organismos.

Las composiciones y los métodos en la presente descripción pueden proporcionar una “característica agronómica” o “característica de importancia agronómica” o “característica de interés agronómico” mejorada para una planta, que puede incluir, pero no se limita a, lo siguiente: resistencia a enfermedades, tolerancia a la sequía, tolerancia al calor, tolerancia al frío, tolerancia a la salinidad, tolerancia a los metales, tolerancia a los herbicidas, eficiencia mejorada en el uso del

agua, utilización mejorada del nitrógeno, fijación mejorada del nitrógeno, resistencia a plagas, resistencia a herbívoros, resistencia a patógenos, mejora del rendimiento, mejora de la salud, mejora del vigor, mejora del crecimiento, mejora de la capacidad fotosintética, mejora de la nutrición, contenido alterado de proteínas, contenido alterado de aceite, aumento de la biomasa, aumento de la longitud de los brotes, aumento de la longitud de la raíz, arquitectura mejorada de la raíz, modulación de un metabolito, modulación del proteoma, aumento del peso de la semilla, composición alterada de carbohidratos de la semilla, composición alterada de proteínas de la semilla, composición alterada del aceite de la semilla, composición alterada de nutrientes de la semilla, en comparación con una planta de isolina que no comprende una modificación derivada de los métodos o composiciones en la presente descripción

Se entiende por “característica agronómica potencial” la capacidad de un elemento vegetal para exhibir un fenotipo, preferentemente una característica agronómica mejorada, en algún momento durante su ciclo de vida, o transmitir dicho fenotipo a otro elemento vegetal con el que está asociado en la misma planta.

Como se usa en la presente descripción, el término “marcador molecular”, “marcador” o “marcador genético” se refiere a un indicador que se usa en métodos para visualizar las diferencias en las características de las secuencias de ácidos nucleicos. Ejemplos de tales indicadores son marcadores de polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP), marcadores de polimorfismo de longitud de fragmento amplificado (AFLP), polimorfismos de un solo nucleótido (SNP), mutaciones de inserción, marcadores de microsatélites (SSR), regiones amplificadas caracterizadas por secuencia (SCAR), marcadores de secuencia polimórfica amplificada (CAPS) o marcadores de isoenzimas o combinaciones de los marcadores descritos en la presente descripción que define una ubicación genética y cromosómica específica. El mapeo de marcadores moleculares en los alrededores de un alelo es un procedimiento que puede ser realizado por una persona promedio experta en técnicas de biología molecular.

Como se usa en la presente descripción, el término “característica” se refiere a una característica o fenotipo. Por ejemplo, en el contexto de algunas modalidades de la presente descripción, el rendimiento de un cultivo se relaciona con la cantidad de biomasa comercializable producida por una planta (por ejemplo, fruta, fibra, grano). Las características convenientes también pueden incluir otras características de la planta, que incluyen, pero no se limitan a: eficiencia en el uso del agua, eficiencia en el uso de nutrientes, producción, cosechabilidad mecánica, madurez de la fruta, vida útil, resistencia a plagas/enfermedades, madurez temprana de la planta, tolerancia al estrés,

etc. Una característica puede heredarse de forma dominante o recesiva, o de forma dominante parcial o incompleta. Una característica puede ser monogénica (es decir, determinada por un único locus) o poligénica (es decir, determinado por más de un locus) o también puede resultar de la interacción de uno o más genes con el medio ambiente.

- 5 Como se usa en la presente descripción, el término “fenotipo” se refiere a las características observables de una célula individual, cultivo celular, organismo (por ejemplo, una planta), o grupo de organismos que resulta de la interacción entre la composición genética de ese individuo (es decir, genotipo) y el medio ambiente.

10 Como se usa en la presente descripción, una “secuencia de nucleótidos sintética” o “secuencia de polinucleótidos sintética” es una secuencia de nucleótidos que no se sabe que se produce en la naturaleza o que no se produce de manera natural. Generalmente, una secuencia de nucleótidos sintética de este tipo comprenderá al menos una diferencia de nucleótidos cuando se compara con cualquier otra secuencia de nucleótidos de manera natural.

15 Como se usa en la presente descripción, el término “ácido nucleico” se refiere a una forma polimérica de nucleótidos de cualquier longitud, ya sea ribonucleótidos o desoxirribonucleótidos, o análogos de los mismos. Este término se refiere a la estructura primaria de la molécula y, por lo tanto, incluye ADN de cadena doble y sencilla, así como también ARN de cadena doble y sencilla. También incluye ácidos nucleicos modificados tales como ácidos nucleicos metilados y/o protegidos, ácidos nucleicos que contienen bases modificadas, modificaciones de la cadena principal y similares. Los términos “ácido nucleico” y “secuencia de nucleótidos” se usan
20 indistintamente.

Como se usa en la presente descripción, el término “gen” se refiere a cualquier segmento de ADN asociado con una función biológica. Por lo tanto, los genes incluyen, pero no se limitan a, secuencias codificantes y/o secuencias reguladoras requeridas para su expresión. Los genes
25 también pueden incluir segmentos de ADN no expresados que, por ejemplo, forman secuencias de reconocimiento para otras proteínas. Los genes pueden obtenerse de una variedad de fuentes, que incluyen la clonación de una fuente de interés o la síntesis de información de secuencias conocidas o predichas y pueden incluir secuencias diseñadas para tener los parámetros deseados.

30 Como se usa en la presente descripción, el término “homólogo” u “homólogos”, “homólogo” u “ortólogo” se conoce en la técnica y se refiere a secuencias relacionadas que comparten un ancestro común o un miembro de la familia y se determinan en función del grado de identidad de la secuencia. Los términos “homología,” “homólogo,” “sustancialmente similar” y

“sustancialmente correspondiente” se usan indistintamente en la presente descripción. Se refieren a fragmentos de ácido nucleico en donde los cambios en una o más bases nucleotídicas no afectan la capacidad del fragmento de ácido nucleico para mediar la expresión génica o producir un fenotipo determinado. Estos términos también se refieren a modificaciones de los fragmentos de ácido nucleico de la presente descripción, tal como la eliminación o inserción de uno o más nucleótidos que no alteran sustancialmente las propiedades funcionales del fragmento de ácido nucleico resultante con relación al fragmento inicial no modificado. Por lo tanto, se entiende, como apreciarán los expertos en la técnica, que la descripción abarca más que las secuencias ilustrativas específicas. Estos términos describen la relación entre un gen encontrado en una especie, subespecie, variedad, cultivo o cepa y el gen correspondiente o equivalente en otra especie, subespecie, variedad, cultivo o cepa. Para los fines de esta descripción, se comparan las secuencias homólogas. Se piensa, se cree o se sabe que las “secuencias homólogas” o “homólogos” u “ortólogos” están relacionadas funcionalmente. Una relación funcional puede indicarse en cualquiera de varias formas, que incluyen, pero no se limitan a: (a) grado de identidad de secuencia y/o (b) la misma o similar función biológica. Preferentemente, se indican tanto (a) como (b). La homología puede determinarse mediante el uso de programas informáticos fácilmente disponibles en la técnica, tales como los que se analizan en Current Protocols in Molecular Biology (FM Ausubel y otros, eds., 1987) Suplemento 30, sección 7,718, tabla 7,71. Algunos programas de alineación son MacVector (Oxford Molecular Ltd, Oxford, Reino Unido), ALIGN Plus (Scientific and Educational Software, Pensilvania) y AlignX (Vector NTI, Invitrogen, Carlsbad, CA). Otro programa de alineación es Sequencher (Gene Codes, Ann Arbor, Míchigan), mediante el uso de parámetros predeterminados.

Como se usa en la presente descripción, el término “cambio de nucleótido” se refiere a, por ejemplo, sustitución, eliminación, inserción, alteración química de nucleótidos, o cualquiera de los anteriores, como se entiende bien en la técnica.

Como se usa en la presente descripción, el término “modificación de proteína” se refiere a, por ejemplo, sustitución de aminoácidos, modificación, eliminación y/o inserción de aminoácidos, como se entiende bien en la técnica.

Tal como se usa en la presente descripción, el término “al menos una porción” o “fragmento” de un ácido nucleico o polipéptido significa una porción que tiene las características de tamaño mínimo de tales secuencias, o cualquier fragmento más grande de la molécula de longitud completa, hasta y que incluye la molécula de longitud completa. Un fragmento de un

polinucleótido de la descripción puede codificar una porción biológicamente activa de un elemento regulador genético. Puede prepararse una porción biológicamente activa de un elemento regulador genético al aislar una porción de uno de los polinucleótidos de la descripción que comprende el elemento regulador genético y evaluar la actividad como se describe en la presente descripción. De manera similar, una porción de un polipéptido puede tener 4 aminoácidos, 5 aminoácidos, 6 aminoácidos, 7 aminoácidos y así, hasta llegar al polipéptido de longitud completa. La longitud de la porción a usar dependerá de la aplicación particular. Una porción de un ácido nucleico útil como sonda de hibridación puede ser tan corta como 12 nucleótidos; en algunas modalidades, es de 20 nucleótidos. Una porción de un polipéptido útil como un epítipo puede tener tan solo 4 aminoácidos. Una porción de un polipéptido que realiza la función del polipéptido de longitud completa generalmente tendría más de 4 aminoácidos.

El término “cebador”, como se usa en la presente descripción, se refiere a un oligonucleótido que es capaz de hibridarse con la diana de amplificación, que permite que se una al ADN polimerasa, lo que sirve de esta manera como un punto de inicio de la síntesis de ADN cuando se coloca en condiciones en las que la síntesis del producto de extensión del cebador es inducido, es decir, en presencia de nucleótidos y un agente de polimerización tal como la ADN polimerasa y a una temperatura y pH adecuados. El cebador (amplificación) es preferentemente monocatenario para una eficiencia máxima en la amplificación. Preferentemente, el cebador es un oligodesoxirribonucleótido. El cebador debe ser lo suficientemente largo para cebar la síntesis de productos de extensión en presencia del agente para la polimerización. Las longitudes exactas de los cebadores dependerán de muchos factores, que incluyen la temperatura y la composición (contenido de A/T frente a G/C) del cebador. Un par de cebadores bidireccionales consiste de un cebador directo y uno inverso, como se usa comúnmente en la técnica de la amplificación de ADN, tal como en la amplificación por PCR.

Los términos “rigurosidad” o “condiciones de hibridación estrictas” se refieren a las condiciones de hibridación que afectan la estabilidad de los híbridos, por ejemplo, temperatura, concentración de sal, pH, concentración de formamida y similares. Estas condiciones se optimizan empíricamente para maximizar la unión específica y minimizar la unión no específica del cebador o la sonda a su secuencia de ácido nucleico diana. Los términos tal como se usan incluyen la referencia a las condiciones en las que una sonda o un cebador se hibridarán con su secuencia diana, en un grado detectable mayor que otras secuencias (por ejemplo, al menos 2 veces sobre el fondo). Las condiciones estrictas son dependientes de la secuencia y serán diferentes en diferentes

circunstancias. Las secuencias más largas hibridan específicamente a temperaturas más altas. Generalmente, las condiciones estrictas se seleccionan para que sean aproximadamente 5 °C más bajas que el punto de fusión térmica (T_m) para la secuencia específica a una fuerza iónica y un pH definidos. La T_m es la temperatura (bajo una fuerza iónica y un pH definidos) a la que el 50 % de una secuencia diana complementaria se hibrida con una sonda o cebador perfectamente coincidente. Típicamente, las condiciones estrictas serán aquellas en las que la concentración de sal es inferior a aproximadamente 1.0 M de iones Na^+ , típicamente de aproximadamente 0.01 a 1.0 M de concentración de iones Na^+ (u otras sales) a un pH de 7.0 a 8.3 y la temperatura es de al menos aproximadamente 30 °C para sondas o cebadores cortos (por ejemplo, 10 a 50 nucleótidos) y al menos unos 60 °C para sondas o cebadores largos (por ejemplo, mayor de 50 nucleótidos). También pueden lograrse condiciones estrictas con la adición de agentes desestabilizadores tales como la formamida. Las condiciones ilustrativas de baja rigurosidad o “condiciones de rigurosidad reducida” incluyen la hibridación con una solución tampón de formamida al 30 %, NaCl 1 M, SDS al 1 % a 37 °C y un lavado en $2\times\text{SSC}$ a 40 °C. Las condiciones ilustrativas de rigurosidad alta incluyen hibridación en formamida al 50 %, NaCl 1 M, SDS al 1 % a 37 °C y un lavado en $0.1\times\text{SSC}$ a 60 °C. Los procedimientos de hibridación se conocen bien en la técnica y están descritos, por ejemplo, Ausubel y otros, 1998 y Sambrook y otros, 2001. En algunas modalidades, las condiciones estrictas son la hibridación en tampón de Na_2HPO_4 0.25 M (pH 7.2) que contiene Na_2EDTA 1 mM, dodecilsulfato de sodio al 0.5-20 % a 45 °C, tal como 0.5 %, 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 11 %, 12 %, 13 %, 14 %, 15 %, 16 %, 17 %, 18 %, 19 % o 20 %, seguido por un lavado en $5\times\text{SSC}$, que contiene dodecilsulfato de sodio al 0.1 % (p/v), a una temperatura de 55 °C a 65 °C.

En algunas modalidades, la célula o el organismo tiene al menos una característica heteróloga. Como se usa en la presente descripción, el término “característica heteróloga” se refiere a un fenotipo impartido a una célula u organismo por una molécula exógena u otro organismo (por ejemplo, un microbio), segmento de ADN, polinucleótido heterólogo o ácido nucleico heterólogo. Diversos cambios en el fenotipo son de interés para la presente descripción, que incluyen, pero no se limitan a, la modificación de la composición de ácidos grasos en una planta, la alteración del contenido de aminoácidos de una planta, la alteración del mecanismo de defensa contra patógenos de una planta, el aumento del rendimiento de una planta de una característica económicamente importante (por ejemplo, rendimiento de grano, rendimiento de forraje, etc.) y similares. Estos resultados pueden lograrse al proporcionar la expresión de productos heterólogos o aumento de la

expresión de productos endógenos en plantas mediante el uso de los métodos y composiciones de la presente descripción

Una “combinación sintética” puede incluir una combinación de una planta y un microbio de la descripción. La combinación puede lograrse, por ejemplo, al recubrir la superficie de una semilla de una planta, tal como una planta agrícola, o el tejido de la planta huésped (raíz, tallo, hoja, etc.), con un microbio de la descripción. Además, una “combinación sintética” puede incluir una combinación de microbios de diversas cepas o especies. Las combinaciones sintéticas tienen al menos una variable que distingue la combinación de cualquier combinación que ocurra en la naturaleza. Esa variable puede ser, entre otras, una concentración de microbios en una semilla o tejido vegetal que no ocurre de manera natural, o una combinación de microbio y planta que no ocurren de manera natural, o una combinación de microbios o cepas que no ocurren de manera natural juntos. En cada uno de estos casos, la combinación sintética demuestra la mano del hombre y posee atributos estructurales y/o funcionales que no están presentes cuando los elementos individuales de la combinación se consideran de forma aislada.

En algunas modalidades, un microbio puede ser “endógeno” a una semilla o planta. Como se usa en la presente descripción, un microbio se considera “endógeno” a una planta o semilla, si el microbio se deriva del espécimen de planta de la que proviene. Es decir, si el microbio se encuentra de manera natural asociado a dicha planta. En modalidades en las que se aplica un microbio endógeno a una planta, entonces el microbio endógeno se aplica en una cantidad que difiere de los niveles que se encuentran en la planta en la naturaleza. Por lo tanto, un microbio que es endógeno a una planta determinada todavía puede formar una combinación sintética con la planta, si el microbio está presente en dicha planta en un nivel que no se produce de manera natural.

En algunas modalidades, una composición (tal como un microbio) puede ser “heteróloga” (también denominada “exógena”) a otra composición (tal como una semilla o una planta), y en algunos aspectos se refiere en la presente descripción como una “composición heteróloga”. Como se usa en la presente descripción, un microbio se considera “heterólogo” a una planta o semilla, si el microbio no se deriva del espécimen de planta de la que proviene. Es decir, si el microbio no se encuentra de manera natural asociado a dicha planta. Por ejemplo, un microbio que normalmente está asociado con el tejido foliar de una planta de maíz se considera exógeno a un tejido foliar de otra planta de maíz que de manera natural carece de dicho microbio. En otro ejemplo, un microbio

que normalmente está asociado con una planta de maíz se considera exógeno a una planta de trigo que de manera natural carece de dicho microbio.

Una composición está “dispuesta heterológamente” cuando se aplica mecánica o manualmente, se inocula artificialmente, se asocia con o se dispone sobre o dentro de un elemento vegetal, plántula, planta o sobre o dentro de un medio de cultivo vegetal o sobre o dentro de una formulación de tratamiento para que el tratamiento exista sobre o dentro del elemento vegetal, plántula, planta, medio de cultivo vegetal o formulación de una manera que no se encuentra en la naturaleza antes de la aplicación del tratamiento, por ejemplo, dicha combinación que no se encuentra en la naturaleza en esa variedad vegetal, en esa etapa del desarrollo de la planta, en ese tejido vegetal, en esa abundancia, o en ese medio ambiente de crecimiento (por ejemplo, sequía). En algunas modalidades, se contempla de tal manera que se seleccione del grupo que consiste en: la presencia del microbio; presencia del microbio en un número diferente de células, concentración o cantidad; la presencia del microbio en un elemento vegetal diferente, tejido, tipo celular u otra ubicación física dentro o sobre la planta; la presencia del microbio en diferentes períodos de tiempo, por ejemplo, fase de desarrollo de la planta o elemento vegetal, hora del día, etapa de la estación y sus combinaciones. En algunas modalidades, “dispuesto heterológamente” significa que el microbio se aplica a un tejido o tipo celular diferente del elemento vegetal que aquel en el que se encuentra de manera natural el microbio. En algunas modalidades, “dispuesto heterológamente” significa que el microbio se aplica a una etapa de desarrollo del elemento vegetal, plántula o planta en la que dicho microbio no está asociado de manera natural, pero puede estar asociado a otras etapas. Por ejemplo, si normalmente se encuentra un microbio en la etapa de floración de una planta y no en otra etapa, puede considerarse que un microbio aplicado en la etapa de plántula estará dispuesto heterológamente. En algunas modalidades, un microbio está dispuesto heterológamente; el microbio se encuentra normalmente en el tejido de la raíz de un elemento vegetal pero no en el tejido foliar, y el microbio se aplica a la hoja. En otro ejemplo no limitante, si un microbio se encuentra de manera natural en la capa de mesófilo del tejido foliar pero se aplica a la capa epitelial, se consideraría que el microbio estará dispuesto heterológamente. En algunas modalidades, “dispuesto heterológamente” significa que la semilla, plántula o planta no contiene niveles detectables del microbio en ese mismo elemento vegetal, plántula o planta. En algunas modalidades, “dispuesto heterológamente” significa que el microbio que se aplica está en una mayor concentración, número o cantidad de la semilla, plántula o planta, que la que se encuentra de manera natural en dicho elemento vegetal, plántula o planta. Por ejemplo, un microbio está

dispuesto heterológamente cuando está presente en una concentración que es al menos 1.5 veces mayor, entre 1.5 y 2 veces mayor, 2 veces mayor, entre 2 y 3 veces mayor, 3 veces mayor, entre 3 y 5 veces mayor, 5 veces mayor, entre 5 y 7 veces mayor, 7 veces mayor, entre 7 y 10 veces mayor, 10 veces mayor, o incluso mayor que 10 veces mayor número, cantidad o concentración que la concentración que estaba presente antes de la disposición de dicho microbio. En otro ejemplo no limitante, un microbio que se encuentra de manera natural en un tejido de un árbol cupresáceo se consideraría heterólogo al tejido de una planta de maíz, trigo, algodón, soja. En otro ejemplo, un microbio que se encuentra de manera natural en el tejido foliar de una planta de maíz, trigo de primavera, algodón o soja se considera heterólogo de un tejido foliar de otra planta de maíz, trigo de primavera, algodón o soja que de manera natural carece de dicho microbio o comprende el microbio en una cantidad diferente.

Los microbios también pueden estar “dispuestos heterológamente” en un tejido vegetal determinado. Esto significa que el microbio se coloca sobre un tejido vegetal que no se encuentra de manera natural. Por ejemplo, si un microbio dado solo ocurre de manera natural en las raíces de una planta dada, entonces ese microbio podría aplicarse de manera exógena al tejido de una planta sobre el suelo y, de esta manera, estaría “dispuesto heterológamente” sobre dicho tejido vegetal. Como tal, se considera que un microbio está dispuesto heterológamente cuando se aplica a una planta que no tiene el microbio presente de manera natural o que no tiene el microbio presente de manera natural en el número que se aplica.

Las composiciones y métodos en la presente descripción pueden proporcionar una “característica agronómica” “modulada” o “característica de importancia agronómica” a una planta hospedera, que puede incluir, pero no se limita a, lo siguiente: contenido alterado de aceite, contenido alterado de proteínas, composición alterada de carbohidratos de la semilla, composición alterada del aceite de la semilla y composición alterada de proteínas de la semilla, tolerancia a los productos químicos, tolerancia al frío, senescencia retrasada, resistencia a las enfermedades, tolerancia a la sequía, peso de la mazorca, mejora del crecimiento, mejora de la salud, tolerancia al calor, tolerancia a los herbicidas, resistencia a herbívoros, fijación mejorada del nitrógeno, utilización mejorada del nitrógeno, arquitectura mejorada de la raíz, eficiencia mejorada en el uso del agua, aumento de la biomasa, aumento de la longitud de la raíz, aumento del peso de la semilla, aumento de la longitud de los brotes, mayor rendimiento, mayor rendimiento en condiciones de agua limitada, masa del grano, contenido de humedad del grano, tolerancia a los metales, número de mazorcas, número de granos por mazorca, número de vainas, mejora de la nutrición, resistencia a

patógenos, resistencia a plagas, mejora de la capacidad fotosintética, tolerancia a la salinidad, permanencia verde, mejora del vigor, aumento del peso seco de semillas maduras, aumento del peso fresco de semillas maduras, aumento del número de semillas maduras por planta, aumento del contenido de clorofila, aumento del número de vainas por planta, aumento de la longitud de las vainas por planta, reducción del número de hojas marchitas por planta, reducción del número de hojas severamente marchitas por planta y aumento del número de hojas no marchitas por planta, una modulación detectable en el nivel de un metabolito, una modulación detectable en el nivel de un transcrito y una modulación detectable en el proteoma, en comparación con una planta de isolina cultivada a partir de una semilla sin dicha formulación de tratamiento de semillas. Por el término “modulado”, se pretende hacer referencia a un cambio en una característica agronómica que cambia en virtud de la presencia del microbio(s), exudado, caldo, metabolito, etc. En aspectos, la modulación proporciona la impartición de una característica beneficiosa.

Microbios y microorganismos

Como se usa en la presente descripción, el término “microorganismo” debe tomarse en sentido amplio. Incluye, pero no se limita a, bacterias y arqueas procariotas, así como también hongos y protistas eucariotas.

En una modalidad particular, el microorganismo es un endófito, o un epífito, o un microorganismo que habita en la rizósfera o rizovaina de la planta. Es decir, el microorganismo puede encontrarse presente en el material del suelo adherido a las raíces de una planta o en el área inmediatamente adyacente a las raíces de la planta.

En una modalidad, el microorganismo es un endófito. Los endófitos pueden beneficiar a las plantas hospederas al evitar que los organismos patógenos las colonicen. La colonización extensiva del tejido vegetal por endófitos crea un “efecto de barrera”, donde los endófitos locales superan y evitan que los organismos patógenos tomen el control. Los endófitos también pueden producir productos químicos que inhiben el crecimiento de los competidores, que incluyen los organismos patógenos.

En determinadas modalidades, el microorganismo no puede cultivarse. Debe entenderse que esto significa que no se sabe que el microorganismo sea cultivable o que sea difícil de cultivar mediante el uso de métodos conocidos por un experto en la técnica.

Los microorganismos de la presente descripción pueden recolectarse u obtenerse de cualquier fuente o estar contenidos dentro y/o asociados con material recolectado de cualquier fuente.

- En una modalidad, un microorganismo o una combinación de microorganismos, puede proporcionar un beneficio probable o previsto a una planta. Por ejemplo, el microorganismo puede predecirse que: mejorará la fijación del nitrógeno; liberar fosfato de la materia orgánica del suelo; liberar fosfato de las formas inorgánicas de fosfato (por ejemplo, fosfato de roca); “fijar carbono” en la microesfera de la raíz; vivir en la rizosfera de la planta, de esta manera, asiste a la planta en absorber nutrientes del suelo circundante y luego proporciona estos más fácilmente a la planta; aumentar el número de nódulos en las raíces de las plantas y, de esta manera, aumentar el número de bacterias fijadoras de nitrógeno simbióticas (por ejemplo, especies de *Rhizobium*) por planta y la cantidad de nitrógeno fijado por la planta; provocar respuestas defensivas de la planta tales como ISR (resistencia sistémica inducida) o SAR (resistencia sistémica adquirida) que ayudan a la planta a resistir la invasión y propagación de microorganismos patógenos; competir con microorganismos perjudiciales para el crecimiento o la salud de las plantas por antagonismo o utilización competitiva de recursos tales como nutrientes o espacio; cambiar el color de una o más partes de la planta, o cambiar el perfil químico de la planta, su olor, sabor o una o más cualidades.
- Los microorganismos de la descripción pueden aislarse en cultivos sustancialmente puros o mixtos. Pueden estar concentrados, diluidos o proporcionados en las concentraciones naturales en las que se encuentran en el material de origen. Por ejemplo, los microorganismos de los sedimentos salinos pueden aislarse para su uso en esta descripción al suspender el sedimento en agua dulce y al permitir que el sedimento caiga a la parte inferior. El agua que contiene la mayor parte de los microorganismos podrá eliminarse por decantación después de un período adecuado de sedimentación y aplicarse directamente al medio de cultivo vegetal o concentrarse por filtración o centrifugación, diluirse hasta una concentración adecuada y aplicarse al medio de cultivo vegetal con la gran parte de la sal eliminada. A manera de ejemplo adicional, los microorganismos de fuentes mineralizadas o tóxicas pueden tratarse de manera similar para recuperar los microbios para su aplicación al material de crecimiento vegetal para minimizar el potencial de daño a la planta.
- En algunas modalidades, se usa una población mixta de microorganismos en los métodos de la descripción.
- Modificación del genoma de los microbios
- En algunas modalidades, el microorganismo puede tener su genoma alterado de alguna manera para proporcionar un rasgo mejorado de interés, por ejemplo, mejora de la fijación de nitrógeno para cultivos no leguminosos.

Se conocen varios métodos en la técnica para la modificación de polinucleótidos en una célula (que incluye, entre otros, cualquier secuencia de polinucleótidos comprendida dentro de la célula, que incluye ADN genómico, cromosómico, y plasmídico). Brevemente, se introduce una rotura de cadena simple o doble en un polinucleótido diana (el sujeto de la modificación), cuyo resultado puede ser una inserción de al menos un nucleótido, la delección de al menos un nucleótido, el reemplazo de al menos un nucleótido, o cualquier combinación de lo anterior, de acuerdo con el deseo del profesional.

La rotura de cadena simple o doble (SSB o DSB) puede lograrse mediante cualquiera de una cantidad de métodos, que incluyen la utilización de sustancias químicas o radiación, un resultado del proceso de recombinación homóloga, mediante la introducción de una nucleasa específica o no específica, o mediante cualquier combinación de lo anterior.

Las enzimas que efectúan la escisión de polinucleótidos se conocen en la técnica, y pueden incluir (sin limitación): endonucleasas de restricción, meganucleasas, TALEN, dedos de zinc, o endonucleasas Cas.

En algunos aspectos, la presente descripción se refiere a microbios aislados genéticamente modificados que tienen actividad de fijación de nitrógeno mejorada, en comparación con variantes genéticamente no modificadas de la misma especie o cepa de microbio.

La glutamina (Gln) es la señal de nitrógeno universal en todos los diazótrofos de vida libre (véase, por ejemplo, Wang et al., PLOS Genetics, 2018). Las bacterias gramnegativas, como *Klebsiella* y *Pseudomonas*, tienen vías de nitrógeno bien dilucidadas y una administración y expresión génicas más fáciles y predecibles para las cepas modificadas del genoma. En el organismo gramnegativo *Klebsiella*, NifL es el regulador negativo del *nif* operón. Cuando la glutamina intracelular es alta (exceso de nitrógeno), NifL forma un complejo represor para inactivar la expresión del operón *nif*. En el organismo gramnegativo *Azospirillum*, NifA activa la transcripción del operón *nif*. La expresión de *nifA* está regulada por la glutamina a través de la fosforilación de *ntrB* de *ntrC*. La nitrogenasa se inactiva postranscripcionalmente.

Por el contrario, las bacterias Grampositivas, tales como *Paenibacillus* descritas en la presente descripción, son más difíciles de transformar y tienen vías de fijación de nitrógeno menos estudiadas.

Por lo tanto, la modificación exitosa de la célula que da como resultado una mayor capacidad de fijación de nitrógeno para una bacteria grampositiva como *Paenibacillus* no solo es sorprendente, sino que es muy necesaria en la biotecnología agrícola. Debido a las capacidades de formación de

esporas de *Paenibacillus*, hay un mayor potencial comercial para un producto que comprende una cepa de *Paenibacillus* editada génicamente que mejora la fijación de nitrógeno para las plantas de cultivo.

En las bacterias Grampositivas, el operón *nif* controla las vías de fijación de nitrógeno a través de GlnR. La unión de GlnR al sitio I activa la expresión de Nif, mientras que la unión de GlnR al sitio II reprime la expresión de Nif. Por lo tanto, un gen diana para mejorar la fijación de nitrógeno en *Paenibacillus* es el activador/represor Nif GlnR y sus sitios de unión.

Dentro del género *Paenibacillus*, hay dos subgrupos distintos, el subgrupo I y el subgrupo II, cada uno de los cuales comprende una composición de operón diferente. El subgrupo I de *Paenibacillus*, tal como *Paenibacillus polymyxa*, comprende en este orden: *nifB*, *nifH*, *nifD*, *nifK*, *nifE*, *nifN*, *nifZ*, *hesA*, *nifV*. El subgrupo II de *Paenibacillus*, tal como *Paenibacillus graminis*, comprende en este orden: *nifB*, *nifH*, *nifD*, *nifK*, *nifE*, *nifV*, *nifZ*, *orf1*, *hesA*, *nifV*.

En algunas modalidades, los microbios *Paenibacillus* tienen una modificación genética al gen *nif*, que codifica enzimas responsables de la actividad de fijación de nitrógeno por el microbio. En otras modalidades, los microbios aislados tienen una modificación genética a *glnR*, el gen que codifica la proteína GlnR, que participa en la detección de concentraciones de amoníaco locales y en la regulación de la expresión del gen *nif*. En determinadas modalidades, los microbios aislados tienen una modificación genética tanto a los genes *nif* como a los genes *glnR*.

En algunas modalidades, la presente descripción se refiere a un microbio aislado genéticamente modificado, que incluye una o más modificaciones genéticas seleccionadas de: una modificación genética a un gen *glnR* endógeno que codifica GlnR; y una modificación genética a una región reguladora aguas arriba (5') o región de unión a GlnR de un gen *nif* endógeno, donde: la modificación genética al gen *glnR* endógeno que codifica GlnR se caracteriza por proporcionar un gen *glnR* mutante que produce una variante de proteína GlnR; la modificación genética a la secuencia de región reguladora 5' se caracteriza por proporcionar una afinidad de unión mejorada a GlnR, en comparación con una secuencia de región reguladora 5' genéticamente no modificada; y la una o más modificaciones genéticas se caracterizan por proporcionar una actividad de fijación de nitrógeno mejorada al microbio, en comparación con una cepa del microbio genéticamente no modificada.

En algunas modalidades, la modificación genética al gen *glnR* endógeno se caracteriza por proporcionar un gen *glnR* mutante que produce una variante de proteína GlnR. En algunas modalidades, la modificación genética al gen *glnR* produce un gen mutante que es capaz de

transcribirse y traducirse para producir una versión modificada de la proteína GlnR. En otras palabras, en algunas modalidades, los microbios aislados descritos en la presente descripción no se modifican para inactivar o eliminar el gen *glnR*, o de cualquier otra manera evitar la producción de una proteína GlnR. En determinadas modalidades, la proteína variante de GlnR retiene una o más funciones de la proteína GlnR no modificada, endógena, de tipo silvestre. Por ejemplo, en algunas modalidades, la proteína variante sigue siendo capaz de reconocer y unirse a elementos de reconocimiento o secuencias de región reguladora 5' dentro del gen *nif*. En determinadas modalidades, la proteína variante de GlnR sigue siendo capaz de regular la expresión del gen *nif*, particularmente con respecto a activar o regular positivamente la expresión del gen *nif*.

Si bien la presente descripción excluye los microbios aislados que se han modificado genéticamente para evitar la producción de una proteína GlnR, tal como mediante la inactivación o eliminación del gen *glnR*, la presente descripción abarca microbios genéticamente modificados donde el gen *glnR* se elimina y se reemplaza con un gen *glnR* recombinante. En algunas modalidades, el gen *glnR* recombinante puede derivarse de una cepa o especie microbiana que es diferente del microbio en el que se incorpora el gen recombinante. En algunas modalidades, el gen *glnR* recombinante puede ser un gen no natural o sintético. En algunas modalidades, el gen *glnR* recombinante puede codificar una variante de la proteína GlnR que regula de manera más eficiente la expresión de *nif*, por ejemplo, al unirse a los elementos de reconocimiento de GlnR en la región reguladora 5' de *nif* con mayor afinidad, o al formar complejos con proteínas adicionales requeridas para la transcripción de *nif* con mayor afinidad.

En algunas modalidades, la modificación genética al gen *glnR* endógeno incluye un truncamiento, lo que significa que el gen codifica una variante de la proteína GlnR que carece de uno o más residuos de aminoácidos, en comparación con la proteína codificada por el gen natural o endógeno. Los expertos en la técnica apreciarán que la modificación genética para producir el gen mutante truncado que codifica GlnR puede lograrse mediante múltiples métodos de biología molecular conocidos comúnmente en la técnica. Por ejemplo, en algunas modalidades, el gen mutante truncado que codifica la proteína GlnR puede prepararse mediante la inserción de un codón de terminación dentro del gen aguas arriba del codón de terminación endógeno en el gen *glnR* nativo. Alternativamente, en algunas modalidades, el gen *glnR* mutante truncado puede prepararse mediante la edición genética del gen *glnR* endógeno para eliminar las secuencias de ADN que codifican los aminoácidos a excluir en la variante truncada de la proteína GlnR.

En algunas modalidades, la modificación de truncamiento al gen *glnR* incluye un truncamiento que incluye una eliminación de una porción del gen *glnR* endógeno que incluye un dominio C-terminal de la proteína GlnR. En determinadas modalidades, la eliminación de una porción del dominio C-terminal de la proteína GlnR es el resultado de una eliminación de la porción del gen endógeno que codifica GlnR que codifica específicamente el dominio C-terminal. En determinadas modalidades, la eliminación de una porción del dominio C-terminal de la proteína GlnR es el resultado de la inserción de un codón de terminación inmediatamente aguas arriba de la porción del gen endógeno que codifica GlnR que codifica específicamente el dominio C-terminal. En determinadas modalidades, la porción del gen *glnR* endógeno que codifica GlnR que se modifica en los microbios aislados incluye la porción que codifica aproximadamente los 25 aminoácidos C-terminales de la proteína GlnR.

Sin limitarse a la teoría, el dominio C-terminal de la proteína GlnR se asocia con la detección de concentraciones de amoníaco locales, por ejemplo, mediante la formación de un complejo con la proteína glutamina sintetasa. En condiciones de concentraciones de amoníaco locales elevadas, GlnR se une a y forma un complejo con la glutamina sintetasa que eventualmente reprime la transcripción del gen *nif*, de esta manera se reduce la actividad de fijación de nitrógeno del microbio. Por lo tanto, al truncar la proteína GlnR para eliminar el dominio C-terminal, la proteína variante es incapaz de formar un complejo con la glutamina sintetasa, lo que significa que la variante tiene una capacidad reducida para regular negativamente la expresión del gen *nif*. Como resultado, los microbios que tienen la variante de truncamiento C-terminal de la proteína GlnR son capaces de mantener la expresión del gen *nif* incluso en condiciones donde la concentración de amoníaco local es alta en el ambiente que rodea al microbio.

En la presente descripción también se contemplan modificaciones genéticas al gen *glnR* endógeno que produce un gen *glnR* mutante que codifica una proteína variante de GlnR caracterizada por tener afinidades de unión mejoradas a elementos de reconocimiento o secuencias de región reguladora 5' en un gen *nif* endógeno, en comparación con la proteína GlnR de tipo silvestre. En algunas modalidades, un gen *glnR* mutante que incluye un truncamiento de una porción del gen *glnR* que codifica el dominio C-terminal de la proteína GlnR produce una proteína variante de GlnR que tiene afinidades de unión mejoradas a los elementos de reconocimiento o secuencias de región reguladora 5' en un gen *nif* endógeno, en comparación con la proteína GlnR de tipo silvestre. En otras modalidades, el gen *glnR* mutante puede incluir mutaciones a una porción del gen *glnR* que codifica un dominio de unión a ADN de GlnR. En determinadas de estas

modalidades, las mutaciones a la porción del gen *glnR* que codifica un dominio de unión al ADN de GlnR produce un gen *glnR* mutante que codifica una variante de proteína GlnR que tiene afinidades de unión mejoradas a los elementos de reconocimiento o secuencias de región reguladora 5' en un gen *nif* endógeno, por ejemplo, mediante la alteración de residuos de aminoácidos particulares requeridos para la interacción del dominio de unión al ADN con los nucleótidos en los elementos de reconocimiento o secuencias de región reguladora 5' del gen *nif*.

El gen endógeno que codifica *nif* contiene al menos dos secuencias de región reguladora 5' a la que la proteína GlnR es capaz de reconocer y unirse. La secuencia de la primera región reguladora 5' se ubica aguas arriba del sitio de inicio de la transcripción en la región reguladora 5' del gen. Sin limitarse a la teoría, la unión de GlnR a la secuencia de la primera región reguladora 5' se asocia con la expresión activada o regulada positivamente del gen *nif*. Por lo tanto, una modificación genética a la secuencia de la primera región reguladora 5' que se caracteriza por proporcionar una afinidad de unión mejorada a GlnR proporciona una expresión mejorada o regulada positivamente del gen *nif*, en comparación con un microbio no modificado genéticamente de la misma especie o cepa, de esta manera se mejora la actividad de fijación de nitrógeno del microbio aislado. La secuencia de la segunda región reguladora 5' se ubica aguas abajo del sitio de inicio de la transcripción. Sin limitarse a la teoría, la unión de GlnR a la secuencia de la segunda región reguladora 5' se asocia con la represión o regulación negativa de la expresión del gen *nif*.

En algunas modalidades, el microbio aislado incluye una modificación genética a una secuencia de región reguladora 5' dentro de un gen *nif* endógeno, donde la secuencia de región reguladora 5' se ubica aguas arriba del sitio de inicio de la transcripción del gen *nif*.

En algunas modalidades, la secuencia de región reguladora 5' ubicada aguas arriba del sitio de inicio de la transcripción del gen *nif* incluye la secuencia:

5'–X1–N–X2–X3–X4–A–X5–X6–X3–X3–A–N–X7–T–N–A–X8–X1–X5–3' [SEQID NO:19]

donde: cada X1 se selecciona independientemente de A, G y T; X2 se selecciona de C y G; cada X3 se selecciona independientemente de A y T; X4 se selecciona de C y T; cada X5 se selecciona de G y T; X6 se selecciona de A, C y G; X7 se selecciona de A, C y T; X8 se selecciona de A y C; y cada N se selecciona de A, C, G y T.

En algunas modalidades, la secuencia de región reguladora 5' ubicada aguas arriba del sitio de inicio de la transcripción del gen *nif* incluye una secuencia seleccionada de al menos una de las siguientes:

5'-ACGATATATTACTTGACGT-3' [SEQID NO:20] 5'-GTGATATCTTACCTAACGT-3' [SEQID NO:21]; 5'-AAGTTATGTAAGTTAACAT-3' [SEQID NO:22]; 5'-AGGTTATATAAACTAACAT-3' [SEQID NO:23]; 5'-ATCATATATTAGTTGAATG-3' [SEQID NO:24]; 5'-AAGTTAGCTAAGCTAACAT-3' [SEQID NO:25]; 5'-ACGATATATTACTTGACGT-3' [SEQID NO:26]; 5'-ACGATATATTACTTGACGT-3' [SEQID NO:27]; 5'-AGGTTATATAAACTAACAT-3' [SEQID NO:28]; 5'-AGGTTATATAAACTCACAT-3' [SEQID NO:29]; 5'-AGGTTATATAAACTAACAT-3' [SEQID NO:30]; 5'-AGGTTATATAAACTAACAT-3' [SEQID NO:31]; 5'-ATGTTATCTAATATTACAT-3' [SEQID NO:32]; 5'-TGGTCAGGAAAGTTAACAT-3' [SEQID NO:33]; 5'-AAGTTATATAAGTTAACAT-3' [SEQID NO:34]. En algunas modalidades, la secuencia de región reguladora 5' ubicada aguas arriba del sitio de inicio de la transcripción del gen *nif* incluye la secuencia 5'-CGATATATTACTTGACG-3' [SEQID NO:35]. En algunas modalidades, los microbios aislados genéticamente modificados descritos en la presente descripción también incluyen una modificación genética a la secuencia de una segunda región reguladora 5' dentro del gen *nif* endógeno. En algunas modalidades, los microbios aislados genéticamente modificados descritos en la presente descripción también incluyen una modificación genética a la secuencia de una segunda región reguladora 5' dentro del gen *nif* endógeno, donde la secuencia de la segunda región reguladora 5' se ubica aguas abajo de un sitio de inicio de la transcripción en el gen *nif* endógeno.

En algunas modalidades, la proteína GlnR puede reconocer y unirse a la secuencia de la segunda región reguladora 5' natural en el gen *nif* endógeno. En algunas modalidades, la modificación genética a la secuencia de la segunda región reguladora 5' dentro del gen *nif* endógeno se caracteriza por reducir la regulación negativa o represión de la expresión del gen *nif* endógeno por GlnR. En algunas modalidades, la modificación genética a la secuencia de la segunda región reguladora 5' dentro del gen *nif* endógeno incluye una modificación genética que produce una secuencia de región reguladora 5' con una afinidad reducida por la proteína GlnR, con relación a la secuencia de la segunda región reguladora 5' natural. En algunas modalidades, la modificación genética a la secuencia de la segunda región reguladora 5' dentro del gen *nif* endógeno incluye una modificación genética que produce una secuencia de región reguladora 5' que no puede reconocer ni unirse a la proteína GlnR. Por ejemplo, en determinadas modalidades, la modificación genética a la secuencia de la segunda región reguladora 5' en el gen *nif* endógeno incluye eliminar o inactivar la secuencia de la segunda región reguladora 5' del gen *nif* endógeno. En determinadas

modalidades adicionales, la modificación genética a la secuencia de la segunda región reguladora 5' en el gen *nif* endógeno incluye reemplazar la secuencia de la segunda región reguladora 5' en el gen *nif* endógeno con una secuencia de ADN caracterizada por no ser reconocible por GlnR. La secuencia de ADN caracterizada por no ser reconocible por GlnR no se limita particularmente e incluye cualquier secuencia que se caracterice por no tener afinidad por la proteína GlnR o una afinidad sustancialmente reducida por la proteína GlnR, en comparación con la secuencia de la segunda región reguladora 5' natural.

En algunas modalidades, la secuencia de la segunda región reguladora 5' dentro del gen *nif* endógeno incluye la secuencia:

10 5'-Y1-Y1-G-T-N-A-Y-1-N-Y1-A-A-Y2-Y3-T-Y3-A-C-Y4-Y5-3' [SEQID NO:36],
donde: cada Y1 se selecciona independientemente de A, G y T; Y2 se selecciona de A, C y T; cada Y3 se selecciona independientemente de A y T; Y4 se selecciona de A y G; Y5 se selecciona de C y T; y cada N se selecciona independientemente de A, C, G y T.

En algunas modalidades, la secuencia de la segunda región reguladora 5' dentro del gen *nif* endógeno incluye una secuencia seleccionada de al menos una de las siguientes: 5'-ATGTAAGGGAATATAACGT-3' [SEQID NO:37]; 5'-ATGTAAGGTAATTTAACGT-3' [SEQID NO:38]; 5'-GTGTTATGAAATATAACAT-3' [SEQID NO:39]; 5'-GTGTAACTAAAATTACAT-3' [SEQID NO:40]; 5'-AAGTGAGGAAACATAACGT-3' [SEQID NO:41]; 5'-GGGTCAGGAAACATAACAT-3' [SEQID NO:42]; 5'-ATGTAAGGTAATATAACGT-3' [SEQID NO:43]; 5'-GTGTAAGGAAATATAACGT-3' [SEQID NO:44]; 5'-GTGTAACTAAAATTACAT-3' [SEQID NO:45]; 5'-GTGTAACTAAAATTACAT-3' [SEQID NO:46]; 5'-GTGTTAGATAAAAATTACAT-3' [SEQID NO:47]; 5'-GTGTAACTAAAATTACAT-3' [SEQID NO:48]; 5'-TTGTAGTAAATATAACAC-3' [SEQID NO:49]; 5'-TTGTAGGAAACATAACAC-3' [SEQID NO:50]; 5'-ATGTTATGAAATATAACAT-3' [SEQID NO:51]. En algunas modalidades, la secuencia de la segunda región reguladora 5' dentro del gen *nif* endógeno incluye la secuencia 5'-TGTAAGGGAATATAACG-3' [SEQID NO:37].

En algunas modalidades, los microbios aislados genéticamente modificados descritos en la presente descripción incluyen una modificación genética tanto a un gen *glnR* endógeno que codifica GlnR como una modificación genética a una secuencia de región reguladora 5' dentro de un gen *nif* endógeno.

En algunas modalidades, la modificación genética a la secuencia de región reguladora 5' dentro del gen *nif* endógeno incluye un reemplazo de la secuencia de región reguladora 5' con una secuencia de ADN caracterizada por proporcionar una afinidad de unión mejorada a GlnR, en comparación con la secuencia de región reguladora 5'. Los expertos en la técnica apreciarán que el reemplazo de la secuencia de región reguladora 5' en el gen *nif* endógeno puede lograrse mediante una variedad de métodos de biología molecular conocidos comúnmente en la técnica. Por ejemplo, en algunas modalidades, la secuencia de región reguladora 5' en el gen *nif* endógeno se reemplaza mediante mutagénesis dirigida al sitio, o procesos relacionados, para mutar nucleótidos específicos dentro de la secuencia de región reguladora 5' para producir la secuencia de ADN caracterizada por proporcionar una afinidad de unión mejorada a GlnR. En otras modalidades, la secuencia de región reguladora 5' en el gen *nif* endógeno se reemplaza mediante métodos de edición génica para escindir la secuencia de región reguladora 5' natural e insertar una secuencia de ADN recombinante caracterizada por proporcionar una afinidad de unión mejorada a GlnR.

En algunas modalidades, la secuencia de ADN caracterizada por proporcionar una afinidad de unión mejorada a GlnR se deriva de una secuencia de una segunda región reguladora 5' dentro del gen *nif* endógeno. En otras palabras, una secuencia de región reguladora 5' dentro del gen *nif* endógeno puede reemplazarse con una secuencia de la segunda región reguladora 5' del gen *nif* endógeno que se ubica en un sitio alternativo dentro del gen. Por ejemplo, en algunas modalidades, la secuencia de ADN caracterizada por proporcionar una afinidad de unión mejorada a GlnR se deriva de una secuencia de una segunda región reguladora 5' dentro del gen *nif* endógeno, donde la secuencia de la segunda región reguladora 5' se ubica aguas abajo del sitio de inicio de la transcripción dentro del gen *nif* endógeno. En determinadas modalidades, los microbios aislados genéticamente modificados de la presente descripción incluyen una modificación genética a una secuencia de región reguladora 5' dentro de un gen *nif* endógeno, donde la secuencia de región reguladora 5' se ubica aguas arriba del sitio de inicio de la transcripción del gen *nif* endógeno y la modificación genética a la secuencia de región reguladora 5' incluye un reemplazo de la secuencia de región reguladora 5' con una secuencia de ADN que se deriva de una secuencia de la segunda región reguladora 5' dentro del gen *nif* endógeno. En determinadas modalidades, los microbios aislados genéticamente modificados de la presente descripción incluyen una modificación genética a una secuencia de región reguladora 5' dentro de un gen *nif* endógeno, donde la secuencia de región reguladora 5' se ubica aguas arriba del sitio de inicio de la transcripción del gen *nif* endógeno y la modificación genética a la secuencia de región reguladora 5' incluye un reemplazo

de la secuencia de región reguladora 5' con una secuencia de ADN que se deriva de una secuencia de la segunda región reguladora 5' dentro del gen *nif* endógeno, donde la secuencia de la segunda región reguladora 5' dentro del gen *nif* endógeno se ubica aguas abajo del sitio de inicio de la transcripción dentro del gen *nif* endógeno.

- 5 En otras modalidades, la secuencia de ADN caracterizada por proporcionar una afinidad de unión mejorada a GlnR es una secuencia de ADN no natural, lo que significa que no se conoce que la secuencia de ADN aparezca naturalmente en un gen *nif* endógeno como un sitio de unión a GlnR. Una secuencia de ADN no natural puede diseñarse de novo mediante el uso de técnicas y métodos conocidos comúnmente en la técnica, tales como ensayos de unión diseñados para probar la
- 10 interacción de GlnR con secuencias de ADN particulares. Por ejemplo, los ensayos de unión basados en técnicas que incluyen, pero no se limitan a, polarización por fluorescencia y resonancia de plasmones superficiales pueden usarse para determinar la afinidad de GlnR por una secuencia de ADN particular. Por lo tanto, una gran cantidad de secuencias de ADN variables pueden analizarse con respecto a la afinidad de unión a GlnR, y aquellas secuencias que demuestran la
- 15 mayor afinidad pueden incorporarse en la región reguladora 5' del gen *nif* endógeno para proporcionar la regulación del gen *nif* modulada por GlnR.

En algunas modalidades, GlnR reconoce y se une a la secuencia de ADN caracterizada por proporcionar una afinidad de unión mejorada a GlnR con una constante de disociación, o K_d que es aproximadamente 2 veces a aproximadamente 25 veces menor que la constante de disociación

20 de un complejo de GlnR y la secuencia de región reguladora 5' natural. En otras modalidades, GlnR reconoce y se une a la secuencia de ADN caracterizada por proporcionar una afinidad de unión mejorada a GlnR con una constante de disociación, o K_d que es aproximadamente 1.1 veces a aproximadamente 25 veces menor que la constante de disociación de un complejo de GlnR y la secuencia de región reguladora 5' natural. En algunas modalidades, GlnR reconoce y se une a la

25 secuencia de ADN caracterizada por proporcionar una afinidad de unión mejorada a GlnR con una constante de disociación que es aproximadamente 2 veces, aproximadamente 3 veces, aproximadamente 4 veces, aproximadamente 5 veces, aproximadamente 6 veces, aproximadamente 7 veces, aproximadamente 8 veces, aproximadamente 9 veces, aproximadamente 10 veces, aproximadamente 11 veces, aproximadamente 12 veces,

30 aproximadamente 13 veces, aproximadamente 14 veces, aproximadamente 15 veces, aproximadamente 16 veces, aproximadamente 17 veces, aproximadamente 18 veces, aproximadamente 19 veces, aproximadamente 20 veces, aproximadamente 21 veces,

aproximadamente 22 veces, aproximadamente 23 veces, aproximadamente 24 veces, o aproximadamente 25 veces menor que la constante de disociación de un complejo de GlnR y la secuencia de región reguladora 5' natural. En determinadas modalidades, GlnR reconoce y se une a la secuencia de ADN caracterizada por proporcionar una afinidad de unión mejorada a GlnR con una constante de disociación que es aproximadamente 17 veces menor que la constante de disociación de un complejo de GlnR y la secuencia de región reguladora 5' natural.

En algunas modalidades, los microbios aislados genéticamente modificados descritos en la presente descripción incluyen una modificación genética a un gen *glnR* endógeno que codifica GlnR y una modificación genética a una secuencia de región reguladora 5' dentro de un gen *nif* endógeno, donde la modificación genética al gen *glnR* endógeno incluye un truncamiento de una porción del gen que codifica un dominio C-terminal de GlnR, y la modificación genética a una secuencia de región reguladora 5' dentro del gen *nif* incluye reemplazar una secuencia de región reguladora 5' que está aguas arriba del sitio de inicio de la transcripción con una secuencia de ADN a la que GlnR reconoce y se une con una afinidad de unión mayor, en comparación con la secuencia de región reguladora 5' natural.

En algunas modalidades, los microbios aislados genéticamente modificados descritos en la presente descripción incluyen una modificación genética a un gen *glnR* endógeno que codifica GlnR y una modificación genética a una secuencia de región reguladora 5' dentro de un gen *nif* endógeno, donde la modificación genética al gen *glnR* endógeno incluye un truncamiento de una porción del gen que codifica un dominio C-terminal de GlnR, y la modificación genética a una secuencia de región reguladora 5' dentro del gen *nif* incluye inactivar o eliminar una secuencia de región reguladora 5' que está aguas abajo del sitio de inicio de la transcripción.

En algunas modalidades, los microbios aislados genéticamente modificados descritos en la presente descripción incluyen una modificación genética a un gen *glnR* endógeno que codifica GlnR y una modificación genética a una secuencia de región reguladora 5' dentro de un gen *nif* endógeno, donde la modificación genética al gen *glnR* endógeno incluye un truncamiento de una porción del gen que codifica un dominio C-terminal de GlnR, la modificación genética a una secuencia de región reguladora 5' dentro del gen *nif* incluye reemplazar una secuencia de región reguladora 5' que está aguas arriba del sitio de inicio de la transcripción con una secuencia de ADN a la que GlnR reconoce y se une con una afinidad de unión mayor— en comparación con la secuencia de región reguladora 5' natural— y la modificación genética a una secuencia de región

reguladora 5' dentro del gen *nif* también incluye la inactivación o eliminación de una secuencia de región reguladora 5' que está aguas abajo del sitio de inicio de la transcripción.

En algunas modalidades, los microbios aislados genéticamente modificados descritos en la presente descripción incluyen una modificación genética a una secuencia de región reguladora 5' dentro de un gen *nif* endógeno, donde la modificación genética a una secuencia de región reguladora 5' dentro del gen *nif* incluye reemplazar una secuencia de región reguladora 5' que está aguas arriba del sitio de inicio de la transcripción con una secuencia de ADN a la que GlnR reconoce y se une con una afinidad de unión mayor– en comparación con la secuencia de región reguladora 5' natural– y la modificación genética a una secuencia de región reguladora 5' dentro del gen *nif* también incluye la inactivación o eliminación de una secuencia de región reguladora 5' que está aguas abajo del sitio de inicio de la transcripción.

En algunas modalidades, los microbios aislados genéticamente modificados de la presente descripción se caracterizan por tener una expresión constitutiva del gen *nif*. En algunas modalidades, los microbios aislados genéticamente modificados de la presente descripción se caracterizan por tener una expresión constitutiva del gen *nif*, independientemente de las concentraciones de nitrógeno o amoníaco locales. Por ejemplo, en determinadas modalidades, el microbio aislado genéticamente modificado se caracteriza por tener una expresión constitutiva del gen *nif* en condiciones limitantes del nitrógeno. En determinadas modalidades, el microbio aislado genéticamente modificado se caracteriza por tener una expresión constitutiva del gen *nif* en condiciones de abundancia de nitrógeno. En determinadas modalidades, el microbio aislado genéticamente modificado se caracteriza por tener una expresión constitutiva del gen *nif* en condiciones limitantes del nitrógeno o de abundancia de nitrógeno.

En esta descripción también se abarcan microbios aislados genéticamente modificados donde el microbio carece de un gen *nif* y/o *glnR* endógeno y el microbio se edita genéticamente para incorporar un gen *nif* y/o *glnR* exógeno. Los genes *nif* y/o *glnR* exógenos incorporados en el microbio aislado pueden incluir una o más de las modificaciones genéticas a los genes *nif* y/o *glnR*, como se describe en la presente descripción. Por ejemplo, el gen *glnR* exógeno incorporado en el microbio puede codificar una proteína variante de GlnR que incluye un truncamiento de un dominio C-terminal de la proteína, y/o se caracteriza por ser capaz de unirse a un elemento de reconocimiento o secuencia de región reguladora 5' dentro de un gen *nif* con afinidad mejorada. El gen *nif* exógeno incorporado en el microbio aislado puede incluir uno o más elementos de reconocimiento o secuencias de región reguladora 5' a las que GlnR puede reconocer y unirse con

afinidad mejorada o atenuada. Además de un gen *nif* y/o *glnR* exógeno, los genes auxiliares conocidos comúnmente en la técnica por mejorar la capacidad de fijación de nitrógeno también pueden incorporarse en el microbio que carece de un gen *nif* y/o *glnR* endógeno. La incorporación adicional de estos genes auxiliares puede mejorar la capacidad de fijación de nitrógeno del microbio en mayor medida que la incorporación de los genes *nif* y *glnR* exógenos solos.

En la presente descripción también se contemplan modificaciones genéticas al gen *cueR* endógeno. CueR pertenece a una familia de reguladores transcripcionales hélice-giro-hélice (reguladores HTH de la familia Mer), similares a GlnR. CueR y GlnR tienen los mismos dominios pfam.

En algunas modalidades, el microbio aislado genéticamente modificado se caracteriza como una cepa o especie bacteriana grampositiva. En algunas modalidades, el microbio aislado genéticamente modificado se caracteriza como una cepa o especie bacteriana grampositiva formadora de esporas.

Consortios microbianos

En aspectos, la descripción proporciona consorcios microbianos que comprenden una combinación de al menos dos microbios cualesquiera, en donde uno es una cepa de *Paenibacillus* descrita en la Tabla 1a, la Tabla 1b o la Tabla 1c. En algunas modalidades, la cepa de *Paenibacillus* comprende una secuencia de polinucleótidos que comparte al menos 90 % de identidad con una o más de las SEQ ID NO. 1-52. En algunas modalidades, la cepa de *Paenibacillus* es una especie seleccionada del grupo que consiste en: *polymyxa*, *tritici*, *albidus*, *anaericanus*, *azotifigens*, *borealis*, *donghaensis*, *ehimensis*, *graminis*, *jilunlii*, *odorifer*, *panacisoli*, *phoenicis*, *pocheonensis*, *rhizoplanae*, *silage*, *taohuashanense*, *thermophilus*, *typhae* y *wynnii*. En algunas modalidades, la cepa de *Paenibacillus* es del subgrupo I. En algunas modalidades, la cepa de *Paenibacillus* es del subgrupo II.

En determinadas modalidades, los consorcios de la presente descripción comprenden dos microbios, o tres microbios, o cuatro microbios, o cinco microbios, o seis microbios, o siete microbios, u ocho microbios, o nueve microbios o diez o más microbios. Dichos microbios de los consorcios son diferentes especies microbianas o diferentes cepas de unas especies microbianas.

Composiciones producidas por microbios

En algunos casos, los microbios de la presente descripción pueden producir uno o más compuestos y/o tener una o más actividades, por ejemplo, uno o más de los siguientes: producción de un metabolito, producción de una fitohormona tal como auxina, producción de acetoina, producción de un compuesto antimicrobiano, producción de un sideróforo, producción de un policétido,

producción de una fenazina, producción de una celulasa, producción de pectinasa, producción de quitinasa, producción de glucanasa, producción de xilanasas o proteasa, o ácido orgánico, o lipopéptido, o polinucleótido, o polipéptido, fijación de nitrógeno, solubilización de fosfato mineral o cualquier combinación y/o pluralidad de los anteriores.

- 5 Por ejemplo, un microbio de la descripción puede producir una fitohormona seleccionada del grupo que consiste en una auxina, una citoquinina, una giberelina, etileno, un brasinoesteroide y ácido abscísico.

Así, un “metabolito producido por” un microbio de la descripción, pretende capturar cualquier molécula (molécula pequeña, vitamina, mineral, proteína, ácido nucleico, lípido, grasa, 10 carbohidrato, etc.) producida por el microbio. A menudo, no se conoce el mecanismo de acción exacto, de manera que un microbio de la descripción imparte una característica beneficiosa a una especie de planta dada. Se plantea la hipótesis de que, en algunos casos, el microbio produce un metabolito que es beneficioso para la planta. Por lo tanto, en algunos aspectos, una preparación sin células o inactivada es beneficiosa para una planta, ya que el microbio no tiene que estar vivo para 15 impartir una característica beneficiosa a la especie de planta dada, siempre que la preparación incluya un metabolito que fue producido por dicho microbio y que es beneficioso para una planta.

En una modalidad, los microbios de la descripción pueden producir auxina (por ejemplo, ácido indol-3-acético (IAA)). Puede ensayarse la producción de auxina. Muchos de los microbios descritos en la presente descripción pueden ser capaces de producir la hormona vegetal auxina 20 ácido indol-3-acético (IAA) cuando crecen en cultivo. La auxina juega un papel clave en la alteración de la fisiología de la planta, que incluye el grado de crecimiento de las raíces.

Por lo tanto, en una modalidad, los microbios de la descripción están presentes como una población dispuesta sobre la superficie o dentro de un tejido de una especie de planta dada. Los microbios pueden producir una composición, tal como un metabolito, en una cantidad efectiva para 25 provocar un aumento detectable en la cantidad de composición que se encuentra sobre o dentro de la planta, en comparación con una planta de referencia no tratada con los microbios o libre de células o preparaciones inactivas de la descripción. La composición producida por dicha población microbiana puede ser beneficiosa para las especies de plantas.

Dichas composiciones producidas por microbios pueden estar presentes en el caldo o medio de 30 cultivo celular en el que crecen los microbios, o pueden incluir un exudado producido por los microbios. Como se usa en la presente descripción, “exudado” se refiere a una o más composiciones excretadas o extraídas de una o más células(s) microbiana(s). Como se usa en la

presente descripción, “caldo” se refiere a la composición colectiva de un medio de cultivo celular después de que las células microbianas se colocan en el medio. La composición del caldo puede cambiar con el tiempo, durante diferentes fases de crecimiento y/o desarrollo microbiano. El caldo y/o el exudado pueden mejorar las características de las plantas con las que se asocian.

5 Características inducidas por microbios en las plantas

La presente descripción utiliza microbios para impartir propiedades beneficiosas (o características beneficiosas) a especies de plantas convenientes, tales como especies agronómicas de interés. En la descripción actual, la terminología “propiedad beneficiosa”, “característica beneficiosa” o “rasgo de interés”, se usa indistintamente e indica que una propiedad fenotípica o genética de interés de la planta conveniente se modula mediante la aplicación de un microbio o consorcios microbianos como se describe en la presente descripción. Como se mencionó anteriormente, en algunos aspectos, es muy posible que un metabolito producido por un microbio determinado sea el responsable final de modular o impartir una característica beneficiosa a una planta determinada.

Hay un gran número de características beneficiosas que pueden modularse mediante la aplicación de los microbios de la descripción. Por ejemplo, los microbios pueden tener la capacidad para impartir una o más propiedades beneficiosas a una especie de planta, por ejemplo: mayor crecimiento, mayor rendimiento, mayor eficiencia en la utilización de nitrógeno, mayor tolerancia al estrés, mayor tolerancia a la sequía, mayor velocidad fotosintética, mayor eficiencia en el uso del agua, mayor resistencia a los patógenos, modificaciones en la arquitectura de la planta que no necesariamente afectan el rendimiento de la planta, sino que abordan la funcionalidad de la planta, lo que hace que la planta aumente la producción de un metabolito de interés, etc.

En aspectos, los microbios enseñados en la presente descripción proporcionan una amplia gama de aplicaciones agrícolas, que incluyen: mejoras en el rendimiento de grano, fruta y flores, mejoras en el crecimiento de las partes de la planta, capacidad mejorada para utilizar nutrientes (por ejemplo, nitrógeno, fosfato y similares), resistencia mejorada a las enfermedades, efectos bioplaguicidas que incluyen resistencia mejorada a hongos, insectos y/o nemátodos; supervivencia mejorada en climas extremos y mejoras en otras características fenotípicas deseadas de la planta.

En algunos aspectos, los microbios aislados, consorcios y/o composiciones agrícolas de la descripción pueden aplicarse a una planta para modular o alterar una característica de la planta tal como contenido alterado de aceite, contenido alterado de proteínas, composición alterada de carbohidratos de la semilla, composición alterada del aceite de la semilla, composición alterada de proteínas de la semilla, tolerancia a los productos químicos, tolerancia al frío, senescencia

retrasada, resistencia a enfermedades, tolerancia a la sequía, peso de la mazorca, mejora del crecimiento, mejora de la salud, tolerancia al calor, tolerancia a los herbicidas, resistencia a herbívoros, fijación mejorada del nitrógeno, utilización mejorada del nitrógeno, utilización mejorada de nutrientes (por ejemplo, fosfato, potasio y similares), arquitectura mejorada de la raíz, eficiencia mejorada en el uso del agua, aumento de la biomasa, aumento de la longitud de la raíz, aumento del peso de la semilla, aumento de la longitud de los brotes, mayor rendimiento, mayor rendimiento en condiciones de agua limitada, masa del grano, contenido de humedad del grano, tolerancia a los metales, número de mazorcas, número de granos por mazorca, número de vainas, mejora de la nutrición, resistencia a patógenos, niveles reducidos de patógenos (por ejemplo, a través de la excreción de metabolitos que perjudican la supervivencia del patógeno), resistencia a plagas, mejora de la capacidad fotosintética, tolerancia a la salinidad, permanencia verde, mejora del vigor, aumento del peso seco de semillas maduras, aumento del peso fresco de semillas maduras, aumento del número de semillas maduras por planta, aumento del contenido de clorofila, aumento del número de vainas por planta, aumento de la longitud de las vainas por planta, reducción del número de hojas marchitas por planta, reducción del número de hojas severamente marchitas por planta y aumento del número de hojas no marchitas por planta, una modulación detectable en el nivel de un metabolito, una modulación detectable en el nivel de un transcrito y una modulación detectable en el proteoma con relación a una planta de referencia.

En algunos aspectos, los microbios aislados, consorcios y/o composiciones agrícolas de la descripción pueden aplicarse a una planta para modular de manera negativa una característica particular de la planta. Por ejemplo, en algunos aspectos, los microbios de la descripción son capaces de disminuir una característica fenotípica de interés, ya que esta funcionalidad puede ser conveniente en algunas aplicaciones. Por ejemplo, los microbios de la descripción pueden poseer la capacidad de disminuir el crecimiento de raíces o disminuir la longitud de raíces. O los microbios pueden tener la capacidad de disminuir el crecimiento de los brotes o disminuir la velocidad a la que crece una planta, ya que estas modulaciones de una característica de la planta podrían ser convenientes en determinadas aplicaciones.

En algunas modalidades, los microbios aislados, los consorcios y/o las composiciones agrícolas de la descripción pueden aplicarse a una planta para impartir tolerancia al estrés por nemátodos a las plantas.

En algunas modalidades, los microbios aislados, los consorcios y/o las composiciones agrícolas de la descripción pueden aplicarse a una planta para proporcionar bioestimulación (efectos

bioestimulantes) a las plantas. En algunas modalidades, los microbios aislados, los consorcios y/o las composiciones agrícolas de la descripción pueden aplicarse a una planta para proporcionar tolerancia a las enfermedades a las plantas.

Composiciones agrícolas

- 5 En algunas modalidades, los microbios de la descripción se combinan con composiciones agrícolas. Las composiciones agrícolas generalmente se refieren a compuestos orgánicos e inorgánicos que pueden incluir composiciones que promueven el cultivo del microbio y/o el elemento vegetal; composiciones involucradas en la formulación de microbios para su aplicación a elementos vegetales (por ejemplo, pero no se limitan a: humectantes, agentes compatibilizantes
- 10 (también denominados “agentes de compatibilidad”), agentes antiespumantes, agentes de limpieza, agentes secuestrantes, agentes reductores de deriva, agentes neutralizantes y tampones, inhibidores de la corrosión, colorantes, odorantes, agentes esparcidores (también denominados “esparcidores”), auxiliares de penetración (también denominados “penetrantes”), agentes adhesivos (también denominados “pegatinas” o “aglutinantes”), agentes dispersantes, agentes espesantes (también
- 15 denominados “espesantes”), estabilizadores, emulsionantes, depresores del punto de congelación, agentes antimicrobianos y similares); composiciones involucradas en conferir protección al elemento vegetal o planta (por ejemplo, pero no se limitan a: pesticidas, nematicidas, fungicidas, bactericidas, herbicidas y similares); así como también otras composiciones que puedan ser de interés para la aplicación particular.
- 20 En algunas modalidades, las composiciones agrícolas de la presente descripción son sólidas. Cuando se usan composiciones sólidas, puede desearse incluir uno o más materiales portadores con el microbio aislado activo o consorcios. En algunas modalidades, la presente descripción enseña el uso de portadores que incluyen, pero no se limitan a: tierras minerales tales como sílices, geles de sílice, silicatos, talco, caolín, arcilla de ataque, piedra caliza, tiza, loess, arcilla, dolomita, tierra de
- 25 diatomeas, sulfato de calcio, sulfato de magnesio, óxido de magnesio, materiales sintéticos molidos, fertilizantes tales como sulfato de amonio, fosfato de amonio, nitrato de amonio, tiourea y urea, productos de origen vegetal tales como harinas de cereales, harina de corteza de árbol, harina de madera y harina de cáscara de nuez, polvos de celulosa, attapulguitas, montmorillonitas, mica, vermiculitas, sílices sintéticas y silicatos de calcio sintéticos o composiciones de estos.
- 30 Composiciones de crecimiento
- En algunas modalidades, se proporciona una composición al microbio y/o al elemento vegetal que promueve el crecimiento y desarrollo. Las composiciones ilustrativas incluyen líquidos (tales como

caldo, medios) y/o sólidos (tales como tierra, nutrientes). Pueden añadirse diversos compuestos orgánicos o inorgánicos a la composición de crecimiento para facilitar la salud del microbio, solo o en combinación con el elemento vegetal, por ejemplo, pero no se limitan a: aminoácidos, vitaminas, minerales, carbohidratos, azúcares simples, lípidos.

5 Composiciones de formulación

Pueden combinarse una o más composiciones, además del(de los) microbio(s) o la composición producida por microbios, por diversos motivos de aplicación, estabilidad, actividad y/o almacenamiento. Las composiciones adicionales pueden denominarse “componentes de formulación”.

- 10 En algunas modalidades, las composiciones agrícolas descritas en la presente descripción pueden formularse como un líquido, un sólido, un gas, o un gel.

Por lo tanto, en algunas modalidades, la presente descripción enseña que las composiciones agrícolas descritas en la presente descripción pueden incluir compuestos o sales tales como sal de monoetanolamina, sulfato de sodio, sulfato de potasio, cloruro de sodio, cloruro de potasio, acetato de sodio, hidrogenosulfato de amonio, cloruro de amonio, acetato de amonio, formato de amonio, oxalato de amonio, carbonato de amonio, hidrogenocarbonato de amonio, tiosulfato de amonio, hidrogenodifosfato de amonio, dihidrogenomonofosfato de amonio, hidrogenofosfato de sodio y amonio, tiocianato de amonio, sulfamato de amonio o carbamato de amonio.

- 15 En algunas modalidades, la presente descripción enseña que las composiciones agrícolas pueden incluir aglutinantes tales como: polivinilpirrolidona, alcohol polivinílico, acetato de polivinilo parcialmente hidrolizado, carboximetilcelulosa, almidón, copolímeros de vinilpirrolidona/acetato de vinilo y acetato de polivinilo o composiciones de estos; lubricantes tales como estearato de magnesio, estearato de sodio, talco o polietilenglicol, o composiciones de estos; antiespumantes tales como emulsiones de silicona, alcoholes de cadena larga, ésteres fosfóricos, dioles de acetileno, ácidos grasos o compuestos organofluorados y agentes complejantes tales como: sales de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), sales de ácido trinitrilotriacético o sales de ácidos polifosfóricos o composiciones de estos.

En algunas modalidades, las composiciones agrícolas comprenden agentes tensioactivos. En algunas modalidades, los agentes tensioactivos se añaden a las composiciones agrícolas líquidas.

- 20 En otras modalidades, los agentes tensioactivos se añaden a formulaciones sólidas, especialmente aquellas diseñadas para diluirse con un portador antes de la aplicación. Así, en algunas modalidades, las composiciones agrícolas comprenden surfactantes. Los surfactantes a veces se

usan, ya sea solos o con otros aditivos, tales como aceites minerales o vegetales, como adyuvantes para mezclas de tanques de pulverización para mejorar el rendimiento biológico de los microbios en la diana. Los tipos de surfactantes usados para la biomejora dependen generalmente de la naturaleza y el modo de acción de los microbios. Los agentes tensioactivos pueden ser de carácter aniónico, catiónico o no iónico, y pueden emplearse como agentes emulsionantes, agentes humectantes, agentes de suspensión o para otros fines. En algunas modalidades, los surfactantes son no iónicos tales como: etoxilatos de alquilo, etoxilatos de alcohol alifático lineal y etoxilatos de amina alifática. Los surfactantes usados convencionalmente en la técnica de la formulación y que también pueden usarse en las presentes formulaciones se describen en McCutcheon's Detergents and Emulsifiers Annual, MC Publishing Corp., Ridgewood, N.J., 1998, y en Encyclopedia of Surfactants, Vol. I-III, Chemical Publishing Co., Nueva York, 1980-81. En algunas modalidades, la presente descripción enseña el uso de surfactantes que incluyen metales alcalinos, metales alcalinotérreos o sales de amonio de ácidos sulfónicos aromáticos, por ejemplo, ácido ligno-, fenol-, naftaleno- y dibutilnaftalenosulfónico, y de ácidos grasos de arilsulfonatos, de éteres alquílicos, de éteres laurílicos, de sulfatos de alcoholes grasos y de sulfatos de éter glicólico de alcoholes grasos, condensados de naftaleno sulfonado y sus derivados con formaldehído, condensados de naftaleno o de los ácidos naftalenosulfónicos con fenol y formaldehído, condensados de fenol o ácido fenolsulfónico con formaldehído, condensados de fenol con formaldehído y sulfito de sodio, polioxietilenoctilfeniléter, isooctil, octil o nonilfenol etoxilado, tributilfenilpoliglicoléter, alcoholes de alquilarilpoliéter, alcohol isotridecílico, aceite de ricino etoxilado, triarilfenoles etoxilados, sales de triarilfenoletoxilatos fosfatados, acetato de laurilalcoholpoliglicoléter, ésteres de sorbitol, licores residuales de lignina-sulfito o metilcelulosa o composiciones de estos.

En algunas modalidades, la presente descripción enseña otros agentes tensioactivos adecuados, que incluyen sales de sulfatos de alquilo, tales como laurilsulfato de dietanolamonio; sales de alquilarilsulfonato, tales como dodecibencenosulfonato de calcio; productos de adición de alquilfenol-óxido de alquileo, tales como nonilfenol-etoxilato de C18; productos de adición de alcohol-óxido de alquileo, tales como alcohol tridecílico-etoxilato de C16; jabones, tales como estearato de sodio; sales de alquilnaftaleno-sulfonato, tales como dibutil-naftalenosulfonato de sodio; ésteres de dialquilo de sales de sulfosuccinato, tales como di(2-etilhexil)sulfosuccinato de sodio; ésteres de sorbitol, tales como oleato de sorbitol; aminas cuaternarias, tales como cloruro de lauril trimetilamonio; ésteres de polietilenglicol de ácidos grasos, tales como estearato de

polietilenglicol; copolímeros en bloque de óxido de etileno y óxido de propileno; sales de ésteres de mono y dialquilfosfato; aceites vegetales tales como aceite de soja, aceite de colza/canola, aceite de oliva, aceite de ricino, aceite de semilla de girasol, aceite de coco, aceite de elote, aceite de semilla de algodón, aceite de linaza, aceite de palma, aceite de cacahuete, aceite de cártamo, aceite de sésamo, aceite de tung y similares; y ésteres de los aceites vegetales anteriores, particularmente ésteres metílicos.

En algunas modalidades, las composiciones agrícolas comprenden agentes humectantes. Un agente humectante es una sustancia que, cuando se añade a un líquido, aumenta el poder de dispersión o penetración del líquido al reducir la tensión interfacial entre el líquido y la superficie sobre la que se esparce. Los agentes humectantes se usan para dos funciones principales en las formulaciones agroquímicas: durante el procesamiento y la fabricación para aumentar la tasa de humectación de los polvos en agua para hacer concentrados para líquidos solubles o concentrados en suspensión; y durante la mezcla de un producto con agua en un tanque de pulverización u otro recipiente para reducir el tiempo de humectación de los polvos humectables y para mejorar la penetración del agua en los gránulos dispersables en agua. En algunas modalidades, los ejemplos de agentes humectantes usados en las composiciones agrícolas de la presente descripción, que incluyen polvos humectables, concentrados en suspensión y formulaciones de gránulos dispersables en agua, son: laurilsulfato de sodio; dioctilsulfosuccinato de sodio; etoxilatos de alquilfenol; y etoxilatos de alcoholes alifáticos.

En algunas modalidades, las composiciones agrícolas de la presente descripción comprenden agentes dispersantes. Un agente dispersante es una sustancia que se adsorbe sobre la superficie de las partículas y ayuda a preservar el estado de dispersión de las partículas y evita que se vuelvan a agregar. En algunas modalidades, los agentes dispersantes se añaden a las composiciones agrícolas de la presente descripción para facilitar la dispersión y suspensión durante la fabricación y para asegurar que las partículas se vuelvan a dispersar en agua en un tanque de pulverización. En algunas modalidades, los agentes dispersantes se usan en polvos humectables, concentrados en suspensión y gránulos dispersables en agua. Los surfactantes que se usan como agentes dispersantes tienen la capacidad de adsorberse fuertemente sobre la superficie de una partícula y proporcionar una barrera estérica o cargada contra la reagregación de partículas. En algunas modalidades, los surfactantes usados más comúnmente son aniónicos, no iónicos o mezclas de los dos tipos.

En algunas modalidades, para formulaciones de polvo humectable, los agentes dispersantes más comunes son los lignosulfonatos de sodio. En algunas modalidades, los concentrados en suspensión proporcionan muy buena adsorción y estabilización mediante el uso de polielectrolitos, tales como condensados de formaldehído de sulfonato de naftaleno sódico. En algunas modalidades, también se usan ésteres de fosfato de etoxilato de triestirilfenol. En algunas modalidades, tales como los condensados de óxido de alquilariletileno y los copolímeros de bloque EO-PO, a veces se combinan con aniónicos como agentes dispersantes para concentrados en suspensión.

En algunas modalidades, las composiciones agrícolas de la presente descripción comprenden surfactantes poliméricos. En algunas modalidades, los surfactantes poliméricos tienen ‘cadenas principales’ hidrófobas muy largas y un gran número de cadenas de óxido de etileno que forman los ‘dientes’ de un surfactante de ‘peine’. En algunas modalidades, estos polímeros de alto peso molecular pueden dar muy buena estabilidad a largo plazo a los concentrados en suspensión, porque las cadenas principales hidrófobas tienen muchos puntos de anclaje en las superficies de las partículas. En algunas modalidades, los ejemplos de agentes dispersantes usados en las composiciones agrícolas de la presente descripción son: lignosulfonatos de sodio; condensados de formaldehído de sulfonato de naftaleno de sodio; ésteres de fosfato de etoxilato de triestirilfenol; etoxilatos de alcoholes alifáticos; etoxilatos de alquilo; copolímeros de bloque EO-PO; y copolímeros de injerto.

En algunas modalidades, las composiciones agrícolas de la presente descripción comprenden agentes emulsionantes. Un agente emulsionante es una sustancia que estabiliza una suspensión de gotitas de una fase líquida en otra fase líquida. Sin el agente emulsionante, los dos líquidos se separarían en dos fases líquidas inmiscibles. En algunas modalidades, las mezclas de emulsionantes usadas más comúnmente incluyen alquilfenol o alcohol alifático con 12 o más unidades de óxido de etileno y la sal de calcio soluble en aceite del ácido dodecibencenosulfónico. Un intervalo de valores de equilibrio hidrófilo-lipófilo (“HLB”) de 8 a 18 normalmente proporcionará buenas emulsiones estables. En algunas modalidades, la estabilidad de la emulsión a veces puede mejorarse mediante la adición de una pequeña cantidad de un surfactante de copolímero de bloque EO-PO.

En algunas modalidades, las composiciones agrícolas de la presente descripción comprenden agentes solubilizantes. Un agente solubilizante es un surfactante, que formará micelas en agua a concentraciones superiores a la concentración crítica de micelas. Luego, las micelas son capaces de

disolver o solubilizar materiales insolubles en agua dentro de la parte hidrófoba de la micela. Los tipos de surfactante habitualmente usados para la solubilización son los no iónicos: monooleatos de sorbitán; etoxilatos de monooleato de sorbitán; y ésteres de oleato de metilo.

En algunas modalidades, las composiciones agrícolas de la presente descripción comprenden solventes orgánicos. Los solventes orgánicos se usan principalmente en la formulación de concentrados emulsionables, formulaciones ULV y, en menor medida, formulaciones granulares. A veces se usan mezclas de solventes. En algunas modalidades, la presente descripción enseña el uso de solventes que incluyen aceites parafínicos alifáticos tales como queroseno o parafinas refinadas. En otras modalidades, la presente descripción enseña el uso de solventes aromáticos tales como xileno y fracciones de mayor peso molecular de solventes aromáticos C9 y C10. En algunas modalidades, los hidrocarburos clorados son útiles como cosolventes para evitar la cristalización de pesticidas cuando la formulación se emulsiona en agua. Los alcoholes se usan a veces como cosolventes para aumentar el poder del solvente.

En algunas modalidades, las composiciones agrícolas comprenden agentes gelificantes. Los espesantes o agentes gelificantes se usan principalmente en la formulación de concentrados en suspensión, emulsiones y suspoemulsiones para modificar la reología o las propiedades de flujo del líquido y para evitar la separación y sedimentación de las partículas o gotitas dispersas. Los agentes espesantes, gelificantes y antisedimentación generalmente se dividen en dos categorías, específicamente, partículas insolubles en agua y polímeros solubles en agua. Es posible producir formulaciones de concentrados en suspensión mediante el uso de arcillas y sílices. En algunas modalidades, las composiciones agrícolas comprenden uno o más espesantes que incluyen, pero no se limitan a: montmorillonita, por ejemplo, bentonita; silicato de magnesio y aluminio; y attapulguita. En algunas modalidades, la presente descripción enseña el uso de polisacáridos como agentes espesantes. Los tipos de polisacáridos más usados son los extractos naturales de semillas y algas o los derivados sintéticos de la celulosa. Algunas modalidades utilizan xantano y algunas modalidades utilizan celulosa. En algunas modalidades, la presente descripción enseña el uso de agentes espesantes que incluyen, pero no se limitan a: goma guar; goma de algarrobo; carragenina; alginatos; metilcelulosa; carboximetilcelulosa de sodio (SCMC); hidroxietilcelulosa (HEC). En algunas modalidades, la presente descripción enseña el uso de otros tipos de agentes antisedimentación tales como almidones modificados, poliacrilatos, alcohol polivinílico y óxido de polietileno. Otro buen agente antisedimentación es la goma de xantano.

En algunas modalidades, la presencia de surfactantes, que reducen la tensión interfacial, puede hacer que las formulaciones a base de agua formen espuma durante las operaciones de mezcla en la producción y en la aplicación a través de un tanque de pulverización. Por tanto, en algunas modalidades, para reducir la tendencia a la formación de espuma, a menudo se añaden agentes antiespumantes durante la etapa de producción o antes de llenar las botellas/tanques de pulverización. Generalmente, hay dos tipos de agentes antiespumantes, específicamente siliconas y no siliconas. Las siliconas suelen ser emulsiones acuosas de dimetil polisiloxano, mientras que los agentes antiespumantes sin silicona son aceites insolubles en agua, tales como octanol y nonanol, o sílice. En ambos casos, la función del agente antiespumante es desplazar el surfactante de la interfase aire-agua.

En algunas modalidades, las composiciones agrícolas comprenden un conservante.

En algunas modalidades, las composiciones agrícolas pueden formularse como: un empapado de suelo, una pulverización foliar, un tratamiento por inmersión, un tratamiento en surcos, una enmienda de suelo, gránulos, un tratamiento al voleo, un tratamiento de control de enfermedades poscosecha o un tratamiento de semilla. En algunas modalidades, las composiciones agrícolas pueden aplicarse solas en programas de pulverización o en rotación con otros productos agrícolas.

En algunas modalidades, las composiciones agrícolas pueden ser compatibles con la mezcla en tanque. En algunas modalidades, las composiciones agrícolas pueden ser compatibles con la mezcla en tanque con otros productos agrícolas. En algunas modalidades, las composiciones agrícolas pueden ser compatibles con equipos usados para aplicaciones terrestres, aéreas y de riego.

En algunas modalidades, las composiciones agrícolas pueden aplicarse a semillas o plantas genéticamente modificadas.

Composiciones protectoras

Además, los microbios individuales, o consorcios microbianos o comunidades microbianas, desarrollados de acuerdo con los métodos descritos, pueden combinarse con activos conocidos disponibles en el espacio agrícola, tales como: pesticida, herbicida, bactericida, fungicida, insecticida, virucida, miticida, nematocida, acaricida, regulador del crecimiento vegetal, rodenticida, agente antialgas, biocontrol o agente beneficioso. Además, los microbios, consorcios microbianos o comunidades microbianas desarrollados de acuerdo con los métodos descritos pueden combinarse con fertilizantes conocidos. Tales combinaciones pueden exhibir propiedades sinérgicas. Aún más, los microbios individuales o consorcios microbianos o comunidades

microbianas, desarrollados de acuerdo con los métodos descritos, pueden combinarse con ingredientes inertes. Además, en algunos aspectos, los microbios descritos se combinan con agentes biológicos activos.

5 En algunas modalidades, los microbios individuales, o consorcios microbianos, o comunidades microbianas, desarrollados de acuerdo con los métodos descritos pueden combinarse con bioplaguicidas que funcionan como un herbicida, bactericida, fungicida, insecticida, virucida, miticida, nematocida, acaricida, rodenticida y /o agente antialgas. Dichos biopesticidas pueden ser, pero no se limitan a, organismos macrobianos (por ejemplo, nemátodos benéficos y similares), organismos microbianos (por ejemplo, Serenade, Bt y similares), extractos de plantas (por ejemplo, Timorex Gold y similares), bioquímica (por ejemplo, feromonas de insectos y similares) y/o
10 minerales y aceites (por ejemplo, aceite de canola).

Pesticidas y biopesticidas

En algunas modalidades, las composiciones agrícolas de la presente descripción comprenden pesticidas, usados en combinación con los microbios enseñados. En algunas modalidades, las
15 composiciones agrícolas de la presente descripción comprenden biopesticidas, usados en combinación con los microbios enseñados.

En algunas modalidades, los microbios individuales, o consorcios microbianos o comunidades microbianas, desarrollados de acuerdo con los métodos descritos pueden combinarse con pesticidas conocidos en el espacio agrícola, tales como: pesticidas que funcionan como un herbicida, bactericida, fungicida, insecticida, virucida, miticida, nematocida, acaricida, rodenticida y/o agente
20 antialgas.

En algunas modalidades, los microbios individuales, o consorcios microbianos, o comunidades microbianas, desarrollados de acuerdo con los métodos descritos pueden combinarse con biopesticidas conocidos en el espacio agrícola, tales como: biopesticidas que funcionan como un
25 herbicida, bactericida, fungicida, insecticida, virucida, miticida, nematocida, acaricida, rodenticida y/o agente antialgas.

Por ejemplo, en algunas modalidades, la presente descripción enseña composiciones agrícolas que comprenden uno o más de los siguientes ingredientes activos que incluyen: organismos macrobianos (por ejemplo, nemátodos benéficos y similares), organismos microbianos (por ejemplo, Serenade, Bt y similares), extractos de plantas (por ejemplo, Timorex Gold y similares), bioquímicos (por ejemplo, feromonas de insectos y similares), y/o minerales y aceites (por
30 ejemplo, aceite de canola).

En algunas modalidades, los microbios individuales, o consorcios microbianos o comunidades microbianas, desarrollados de acuerdo con los métodos descritos pueden combinarse con un herbicida seleccionado del grupo que consiste en: una acetamida seleccionada del grupo que consiste en acetoclor, alaclor, butaclor, dimetaclor, dimetenamida, flufenacet, mefenacet, metolaclor, metazaclor, napropamida, naproanilida, petoxamida, pretilaclor, propaclor y tenilclor; un derivado de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en bilanafos, glufosinato y sulfosato; un ariloxifenoxipropionato seleccionado del grupo que consiste en clodinafop, cihalofof-butilo, fenoxaprop, fluazifop, haloxifop, metamifop, propaquizafof, quizalofof y quizalo-fop-P-tefurilo; diquat y paraquat; un (tio)carbamato seleccionado del grupo que consiste en asulam, butilato, carbetamida, desmedifam, dimepiperato, eptam (EPTC), esprocarb, molinato, orbencarb, fenmedifam, prosulfocarb, piributicarb, tiobencarb y trialato; una ciclohexanodiona seleccionada del grupo que consiste en butroxidim, cletodim, cicloxidim, profoxidim, setoxidim, tepraloxidim y tralkoxidim; una dinitroanilina seleccionada del grupo que consiste en benfluralina, etalfluralina, orizalina, pendimetalina, prodiamina y trifluralina; un éter difenílico seleccionado del grupo que consiste en acifluorfen, aclonifeno, bifenox, diclofof, etoxifeno, fomesafeno, lactofeno y oxifluorfen; un hidroxibenzonitrilo seleccionado del grupo que consiste en bomoxinil, diclobenil e yoxinil; una imidazolinona seleccionada del grupo que consiste en imazametabenz, imazamox, imazapic, imazapir, imazaquin e imazetapir; un ácido fenoxiacético seleccionado del grupo que consiste en clomeprop, ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), 2,4-DB, diclorprop, MCPA, MCPA-tioetilo, MCPB y mecoprop; una pirazina seleccionada del grupo que consiste en cloridazón, flufenpiretilo, flutiacet, norflurazón y piridato; una piridina seleccionada del grupo que consiste en aminopiraldia, clopiraldia, diflufenicano, ditiopir, fluridona, fluroxipir, picloram, picolinafeno y tiazopir; una sulfonilurea seleccionada del grupo que consiste en amidosulfurón, azimsulfurón, bensulfurón, clorimuon-etil, clorsulfurón, cinosulfurón, ciclosulfamurón, etoxisulfurón, flazasulfurón, flucetosulfurón, flupirsulfurón, foramsulfurón, halosulfurón, imazosulfurón, yodosulfurón, mesosulfurón, metsulfurón-metil, nicosulfurón, oxasulfurón, primisulfurón, prosulfurón, pirazosulfurón, rimsulfurón, sulfometurón, sulfosulfurón, tifensulfurón, triasulfurón, tribenurón, trifloxisulfurón, triflusulfurón, tritosulfurón y 14(2-cloro-6-propilimidazol[1,2]-bipiridazin-3-il)sulfonil)-3-(4,6-dimetoxi-pirimidin-2-il)urea; una triazina seleccionada del grupo que consiste en ametrina, atrazina, cianazina, una dimetametrina, etiozina, hexazinona, metamitrón, metribuzina, prometrina, simazina, terbutilazina, terbutrina y triaziflam; un compuesto de urea seleccionado del grupo que consiste en clorotolurón, daimurón, diurón,

fluometurón, isoproturón, linurón, metabenzthiazurón y tebutiurón; un inhibidor de la acetolactato sintasa seleccionado del grupo que consiste en bispiribac-sodio, cloransulam-metil, diclosulam, florasulam, flucarbazona, flumetsulam, metosulam, orto-sulfamurón, penoxsulam, propoxycarbazona, piribambenz-propil, piribenzoxim, piriftalid, piriminobac-metil, pirimisulfán, piritiobac, piroxasulfona y piroxsulam; y un compuesto seleccionado del grupo que consiste en amicarbazona, aminotriazol, anilofos, beflubutamida, benazolina, bencarbazona, benfluresato, benzofenap, bentazona, benzobiciclón, bromacil, bromobutida, butafenacil, butamifos, cafenstrol, carfentrazona, cinidón-etilo, clortal, cinmetilino, clomazona, cumilurón, ciprosulfamida, dicamba, difenzoquat, diflufenzopir, Drechslera monoceras, endotal, etofumesato, etobenzanida, fentrazamida, flumiclorac-pentilo, flumioxazin, flupoxam, flurocloridona, flurtamona, indanofan, isoxaben, isoxaflutola, lenacilo, propanil, propizamida, quinclorac, meraquinc, mesotriona, ácido metilarsónico, naftalam, oxadiargil, oxadiazon, oxaziclomefona, pentoxazona, pinoxaden, piraclonil, piraflufen-etil, pirasulfotol, pirazoxifen, pirazolinato, quinoclamina, saflufenacil, sulcotriona, sulfentrazona, terbacil, tefuriltriona, tembotriona, tiencarbazona, topramezona, 4-hidroxi-3-[2-(2-metoxi-etoximetil)-6-trifluorometil-piridin-3-carbonil]-biciclol[3.2.1]oct-3-en-2-ona, éster etílico del ácido (3-[2-cloro-4-fluoro-5-(3-metil-2,6-dioxo-4-trifluorometil-3,6-dihidro-2H-pirimidin-1-il)-fenoxil]-piridin-2-iloxi)-acético, éster metílico del ácido 6-amino-5-cloro-2-ciclopropil-pirimidin-4-carboxílico, 6-cloro-3-(2-ciclopropil-6-metil-fenoxi)-piridazin-4-ol, ácido 4-amino-3-cloro-6-(4-cloro-fenil)-5-fluoro-piridin-2-carboxílico, éster metílico del ácido 4-amino-3-cloro-6-(4-cloro-2-fluoro-3-metoxi-fenil)-piridin-2-carboxílico y éster metílico del ácido 4-amino-3-cloro-6-(4-cloro-3-dimetilamino-2-fluoro-fenil)-piridin-2-carboxílico.

En algunas modalidades, los microbios individuales, o consorcios microbianos, o comunidades microbianas, desarrollados de acuerdo con los métodos descritos pueden combinarse con un insecticida seleccionado del grupo que consiste en: un organo(tio)fosfato seleccionado del grupo que consiste en acefato, azametifos, azinfos-metilo, clorpirifos, clorpirifos-metilo, clorfenvinfos, Díazinón, diclorvos, dicrotofos, dimetoato, disulfotón, etión, fenitrotión, fentión, isoxatión, malatión, metamidofos, metidatión, metil-paratión, mevinfos, monocrotofos, oxidemetón-metilo, paraoxón, paratión, fentoato, fosadona, fosmet, fosfamidón, forato, foxima, pirimifos-metilo, profenofos, protiofos, sulprofos, tetraclorvinfos, terbufos, triazofos y triclorfón; un carbamato seleccionado del grupo que consiste en alanicarb, aldicarb, bendiocarb, benfuracarb, carbaril, carbofurano, carbosulfano, fenoxicarb, furatiocarb, metiocarb, metomil, oxamil, pirimicarb, propoxur, tiodicarb y triazamato; un piretroide seleccionado del grupo que consiste en aletrina,

bifentrina, ciflutrina, cihalotrina, cifenotrina, cipermetrina, alfa-cipermetrina, beta-cipermetrina, zeta-cipermetrina, deltametrina, esfenvalerato, etofenprox, fenpropatrina, fenvalerato, imiprotrina, lambda-cihalotrina, permetrina, praletrina, piretrina I y II, resmetrina, silafluofeno, taufluvalinato, teflutrina, tetrametrina, tralometrina, transflutrina, proflutrina y dimeflutrina; un regulador del crecimiento de insectos seleccionado del grupo que consiste en a) un inhibidor de la síntesis de quitina en donde dicho inhibidor de la síntesis de quitina es una benzoilurea seleccionada del grupo que consiste en clorfluazurón, ciramazin, diflubenzurón, flucicloxurón, flufenoxurón, hexaflumurón, lufenurón, novalurón, teflubenzurón, triflumurón; buprofezina, diofenolan, hexitiazox, etoxazol y clofentazina; b) un antagonista de ecdisona seleccionado del grupo que consiste en halofenozida, metoxifenozida, tebufenozida y azadiractina; c) un juvenoide seleccionado del grupo que consiste en piriproxifeno, metopreno y fenoxicarb; o d) un inhibidor de la biosíntesis de lípidos seleccionado del grupo que consiste en espiroclufen, espiromesifen y espirotetramato; un compuesto agonista/antagonista del receptor nicotínico seleccionado del grupo que consiste en clotianidina, dinotefurano, imidacloprid, tiametoxam, nitenpiram, acetamiprid, tiacloprid y 1-(2-cloro-tiazol-5-ilmetil)-2-nitrimino-3,5-dimetil-[1,3,5]triazinano; un compuesto antagonista de GABA seleccionado del grupo que consiste en endosulfán, etiprol, fipronil, vaniliprol, pirafluprol, piriprol y amida del ácido 5-amino-1-(2,6-dicloro-4-metil-fenil)-4-sulfina-1H-pirazol-3-carboxílico; un insecticida de lactona macrocíclica seleccionado del grupo que consiste en abamectina, emamectina, milbemectina, lepimectina, spinosad y spinetoram; un acaricida inhibidor del transporte de electrones mitocondrial I (METI) seleccionado del grupo que consiste en fenazaquin, piridaben, tebufenpirad, tolfenpirad y flufenimer; un compuesto METI II y III seleccionado del grupo que consiste en acequinocilo, fluaciprim e hidrametilnon; clorfenapir; un inhibidor de la fosforilación oxidativa seleccionado del grupo que consiste en cihexatina, diafenthiurón, óxido de fenbutatina y propargita; criomazina; butóxido de piperonilo; un bloqueador de los canales de sodio seleccionado del grupo que consiste en indoxacarb y metaflumizona; y un compuesto seleccionado del grupo que consiste en benclotiaz, bifenazato, cartap, flonicamid, piridalil, pimetrozina, sulfuro, tiociclam, flubendiamida, clorantraniliprol, ciazipir (HGW86), cienopirafen, flupirazofos, ciflumetofen, amidoflumet, imiciafos, bistriflurón, y pirifluquinazón.

En algunas modalidades, la presente invención enseña un uso sinérgico de los microbios o consorcios microbianos actualmente descritos con pesticidas conocidos en el espacio agrícola, tales

como: pesticidas que funcionan como un herbicida, bactericida, fungicida, insecticida, virucida, miticida, nematocida, acaricida, rodenticida y/o agente antialgas.

En algunas modalidades, la presente invención enseña un uso sinérgico de los microbios o consorcios microbianos actualmente descritos con biopesticidas conocidos en el espacio agrícola, tales como: biopesticidas que funcionan como un herbicida, bactericida, fungicida, insecticida, virucida, miticida, nematocida, acaricida, rodenticida y/o agente antialgas.

En algunas modalidades, cuando el microbio o consorcios microbianos identificados de acuerdo con los métodos enseñados se combina con un pesticida, se observa un efecto aditivo en una característica fenotípica de interés de la planta. En otras modalidades, cuando el microbio o consorcios microbianos identificados de acuerdo con los métodos enseñados se combina con un pesticida, se observa un efecto sinérgico en una característica fenotípica de interés de la planta.

En algunas modalidades, cuando el microbio o consorcios microbianos identificados de acuerdo con los métodos enseñados se combina con un bioplaguicida, se observa un efecto aditivo en una característica fenotípica de interés de la planta. En otras modalidades, cuando el microbio o consorcios microbianos identificados de acuerdo con los métodos enseñados se combina con un bioplaguicida, se observa un efecto sinérgico en un rasgo fenotípico de interés de la planta.

El efecto sinérgico obtenido por los métodos enseñados puede cuantificarse de acuerdo con la fórmula de Colby (es decir, $(E) = X + Y - (X * Y / 100)$). Véase Colby, R. S., "Calculating Synergistic and Antagonistic Responses of Herbicide Combinations," 1967 Weeds, vol. 15, pp. 20-22, incorporado en la presente descripción como referencia en su totalidad. Por lo tanto, por "sinérgico" se entiende un componente que, en virtud de su presencia, aumenta el efecto deseado en más de una cantidad aditiva.

Los microbios y consorcios aislados de la presente descripción pueden aumentar sinérgicamente la eficacia de los compuestos pesticidas activos en la agricultura y también los compuestos pesticidas auxiliares agrícolas.

Los microbios y consorcios aislados de la presente descripción pueden aumentar sinérgicamente la eficacia de los compuestos biopesticidas activos en la agricultura y también los compuestos biopesticidas auxiliares agrícolas.

Reguladores de crecimiento vegetal y bioestimulantes

En algunas modalidades, las composiciones agrícolas de la presente descripción comprenden reguladores del crecimiento vegetal y/o bioestimulantes, usados en combinación con los microbios enseñados.

En algunas modalidades, los microbios individuales, o consorcios microbianos o comunidades microbianas, desarrollados de acuerdo con los métodos descritos pueden combinarse con reguladores del crecimiento vegetal conocidos en el espacio agrícola, tales como: auxinas, giberelinas, citoquininas, generadores de etileno, inhibidores del crecimiento y retardadores del crecimiento.

Por ejemplo, en algunas modalidades, la presente descripción enseña composiciones agrícolas que comprenden uno o más de los siguientes ingredientes activos que incluyen: ancimidol, butralina, alcoholes, cloruro de cloromequat, citoquinina, daminozida, etepohon, flurprimidol, ácido giberrélico, mezclas de giberelinas, ácido indol-3-butírico (IBA), hidrazida maleica, mefludida, cloruro de mepiquat, pentaborato de mepiquat, ácido naftaleno-acético (NAA), 1-naftalenoacetemida (NAD), n-decanol, placlobutrazol, prohexadiona cálcica, trinexapac-etilo, uniconazol, ácido salicílico, ácido abscísico, etileno, brasinoesteroides, jasmonatos, poliaminas, óxido nítrico, estrigolactonas o karriquinas entre otros.

En algunas modalidades, los microbios individuales, o consorcios microbianos, o comunidades microbianas, desarrollados de acuerdo con los métodos descritos, pueden combinarse con inoculantes de semillas conocidos en el espacio agrícola, tales como: QUICKROOTS®, VAULT®, RHIZO-STICK®, NODULATOR®, DORMAL®, SABREX®, entre otros. En algunas modalidades, un inoculante de *Bradyrhizobium* se utiliza en combinación con cualquier solo microbio o consorcios microbianos descrito aquí. En aspectos particulares, se observa un efecto sinérgico cuando se combina uno de los inoculantes antes mencionados, por ejemplo, QUICKROOTS® o *Bradyrhizobium*, con un microbio o consorcios microbianos como los enseñados en la presente descripción.

En algunas modalidades, las composiciones agrícolas de la presente descripción comprenden un regulador del crecimiento vegetal, que contiene: kinetina, ácido giberélico y ácido indolbutírico, junto con cobre, manganeso y zinc.

En algunas modalidades, la presente descripción enseña composiciones agrícolas que comprenden uno o más reguladores del crecimiento vegetal disponibles comercialmente, que incluyen, pero no se limitan a: Abide®, A-Rest®, Butralin®, Fair®, Royaltac M®, Sucker-Plucker®, Off-Shoot®, Contact-85®, Citadel®, Cycocel®, E-Pro®, Conklin®, Culbac®, Cytoplex®, Early Harvest®, Foli-Zyme®, Goldengro®, Happygro®, Incite®, Megagro®, Ascend®, Radiate®, Stimulate®, Suppress®, Validate®, X-Cyte®, B-Nine®, Compress®, Dazide®, Boll Buster®, BollD®, Cerone®, Cotton Quik®, Ethrel®, Finish®, Flash®, Florel®, Mature®, MFX®, Prep®, Proxy®,

- Quali-Pro®, SA-50®, Setup®, Super Boll®, Whiteout®, Cutless®, Legacy®, Mastiff®, Topflor®, Ascend®, Cytoplex®, Ascend®, Early Harvest®, Falgro®, Florgib®, Foli-Zyme®, GA3®, GibGro®, Green Sol®, Incite®, N-Large®, PGR IV®, Pro-Gibb®, Release®, Rouse®, Ryzup®, Stimulate®, BVB®, Chrysal®, Fascination®, Procone®, Fair®, Rite-Hite®, Royal®, Sucker Stuff®, Embark®, Sta-Lo®, Pix®, Pentia®, DipN Grow®, Goldengro®, Hi-Yield®, Rootone®, Antac®, FST-7®, Royaltac®, Bonzi®, Cambistat®, Cutdown®, Downsize®, Florazol®, Paclo®, Paczol®, Piccolo®, Profile®, Shortstop®, Trimmit®, Turf Enhancer®, Apogee®, Armor Tech®, Goldwing®, Governor®, Groom®, Legacy®, Primeraone®, Primo®, Provair®, Solace®, T-Nex®, T-Pac®, Concise® y Sumagic®.
- 10 En algunas modalidades, la presente invención enseña un uso sinérgico de los microbios o consorcios microbianos actualmente descritos con reguladores y/o estimulantes del crecimiento vegetal tales como fitohormonas o productos químicos que influyen en la producción o interrupción de los reguladores del crecimiento vegetal.
- En algunas modalidades, la presente invención enseña que las fitohormonas pueden incluir:
- 15 auxinas (por ejemplo, ácido indolacético IAA), giberelinas, citoquininas (por ejemplo, kinetina), ácido abscísico, etileno (y su producción regulada por ACC sintasa e interrumpida por ACC desaminasa).
- En algunas modalidades, los microbios individuales, o consorcios microbianos, o comunidades microbianas, desarrollados de acuerdo con los métodos descritos, pueden combinarse con
- 20 bioestimulantes. Dichos bioestimulantes pueden ser, pero no se limitan a, organismos microbianos, extractos de plantas, algas marinas, ácidos, biocarbón y similares.
- En algunas modalidades, los microbios individuales, o consorcios microbianos o comunidades microbianas, desarrollados de acuerdo con los métodos descritos pueden combinarse con fertilizantes, que pueden ser orgánicos (por ejemplo, estiércol, sangre, pescado y similares), a base
- 25 de nitrógeno (por ejemplo, nitrato, amonio, urea y similares), fosfato y potasio. Dichos fertilizantes también pueden contener micronutrientes que incluyen, pero no se limitan a, azufre, hierro, zinc y similares.
- En algunas modalidades, la presente invención enseña productos químicos adicionales que promueven el crecimiento vegetal que pueden actuar en sinergia con los microbios y consorcios
- 30 microbianos descritos en la presente descripción, tales como: ácidos húmicos, ácidos fúlvicos, aminoácidos, polifenoles e hidrolizados de proteínas.

Por lo tanto, en algunas modalidades, la descripción proporciona la aplicación de los microbios enseñados en combinación con Ascend® sobre cualquier cultivo. Además, la descripción proporciona la aplicación de los microbios enseñados en combinación con Ascend® sobre cualquier cultivo y utilizar cualquier método o tasa de aplicación.

- 5 En algunas modalidades, la presente descripción enseña composiciones agrícolas con bioestimulantes.

Como se usa en la presente descripción, el término “bioestimulante” se refiere a cualquier sustancia que actúa para estimular el crecimiento de microorganismos que pueden estar presentes en el suelo u otro medio de cultivo vegetal.

- 10 El nivel de microorganismos en el suelo o medio de cultivo está directamente relacionado con la salud de las plantas. Los microorganismos se alimentan de fuentes de carbono biodegradables y por lo tanto la salud de las plantas también se correlaciona con la cantidad de materia orgánica en el suelo. Mientras que los fertilizantes proporcionan nutrientes para alimentar y cultivar plantas, en algunas modalidades, los bioestimulantes proporcionan carbono biodegradable, por ejemplo,
- 15 melaza, carbohidratos, por ejemplo, azúcares, para alimentar y cultivar microorganismos. A menos que se indique claramente de cualquier otra manera, un bioestimulante puede comprender un único ingrediente, o una combinación de varios ingredientes diferentes, capaces de mejorar la actividad microbiana o el crecimiento y desarrollo vegetal, debido al efecto de uno o más de los ingredientes, ya sea al actuar independientemente o en combinación.
- 20 En algunas modalidades, los bioestimulantes son compuestos que producen respuestas de crecimiento vegetal no nutricionales. En algunas modalidades, muchos beneficios importantes de los bioestimulantes se basan en su capacidad para influir en la actividad hormonal. Las hormonas en las plantas (fitohormonas) son mensajeros químicos que regulan el desarrollo de la planta normal, así como también las respuestas al medio ambiente. El crecimiento de raíces y brotes, así
- 25 como también otras respuestas de crecimiento, están regulados por fitohormonas. En algunas modalidades, los compuestos de los bioestimulantes pueden alterar el estado hormonal de una planta y ejercer una gran influencia sobre su crecimiento y salud. Por lo tanto, en algunas modalidades, la presente descripción enseña algas marinas, ácidos húmicos, ácidos fúlvicos y vitaminas B como componentes comunes de bioestimulantes. En algunas modalidades, los
- 30 bioestimulantes de la presente descripción mejoran la actividad antioxidante, lo que aumenta el sistema defensivo de la planta. En algunas modalidades, la vitamina C, la vitamina E y los aminoácidos tales como la glicina son antioxidantes contenidos en los bioestimulantes.

En otras modalidades, los bioestimulantes pueden actuar para estimular el crecimiento de microorganismos que están presentes en el suelo u otro medio de cultivo vegetal. Estudios previos han demostrado que cuando determinados bioestimulantes que comprenden extractos de semillas orgánicas específicas (por ejemplo, soja) se usaron en combinación con un inoculante microbiano, los bioestimulantes fueron capaces de estimular el crecimiento de los microbios que incluyen en el inoculante microbiano. Por lo tanto, en algunas modalidades, la presente descripción enseña uno o más bioestimulantes que, cuando se usan con un inoculante microbiano, son capaces de mejorar la población de microbios naturales y microbios inoculantes. Para una revisión de algunos usos populares de los bioestimulantes, véase por favor Calvo y otros, 2014, Plant Soil 383:3-41.

Combinaciones de elementos vegetales, microbios y composiciones agrícolas

En algunas modalidades, la presente descripción enseña que los microbios individuales, o consorcios microbianos, o comunidades microbianas o cualquier combinación de los anteriores, por ejemplo, que comprende cualquiera o una pluralidad de microorganismos que incluye una cepa de *Paenibacillus* editada genómicamente descrita en la presente descripción, puede aplicarse a un elemento vegetal, opcionalmente en combinación con cualquier composición agrícola, para la mejora del fenotipo de la planta.

Los microbios aislados o comunidades o consorcios (generalmente “microbios” o “microbio”, indistintamente) pueden aplicarse a un elemento vegetal heterólogo, lo que crea una combinación sintética. Los microbios se consideran heterólogos a un elemento vegetal si normalmente no están asociados con la semilla en la naturaleza o, si se encuentran, se aplican en cantidades diferentes a las que se encuentran en la naturaleza. En algunas modalidades, los microbios pueden encontrarse de manera natural en una parte de una planta pero no en otra, y la introducción de los microbios en otra parte vegetal se considera una asociación heteróloga.

Se contempla además que el microbio, ya sea aislado o en combinación con una planta o elemento vegetal, puede asociarse además con una o más composiciones agrícolas, tales como las descritas anteriormente.

Se contemplan combinaciones sintéticas de microbios y elementos vegetales, microbios y composiciones agrícolas y microbios y elementos vegetales y composiciones agrícolas (generalmente “composiciones sintéticas”, composiciones que comprenden componentes que típicamente no se encuentran asociados en la naturaleza).

Tratamientos de elementos vegetales

En algunas modalidades, la presente descripción también concierne el descubrimiento de que el tratamiento de elementos vegetales antes de que se siembren o planten con una combinación de uno o más de los microbios o composiciones agrícolas de la presente descripción puede mejorar una característica deseada de la planta, por ejemplo, el crecimiento vegetal, la salud de las plantas y/o la resistencia de las plantas a las plagas.

Por lo tanto, en algunas modalidades, la presente descripción enseña el uso de uno o más de los microbios o consorcios microbianos como tratamientos de elementos vegetales. El tratamiento de semillas puede ser un recubrimiento de elementos vegetales aplicado directamente a un elemento vegetal sin tratar y “desnudo”. Sin embargo, el tratamiento de semillas puede ser un recubrimiento de elemento vegetal que se aplica a un elemento vegetal que ya se ha recubierto con uno o más recubrimientos de elementos vegetales o tratamientos de elementos vegetales anteriores. Los tratamientos de elementos vegetales anteriores pueden incluir uno o más compuestos activos, ya sean productos químicos o biológicos, y uno o más ingredientes inertes.

El término “tratamiento de elementos vegetales” generalmente se refiere a la aplicación de un material a un elemento vegetal antes o durante el tiempo en que se planta en el suelo. El tratamiento de elementos vegetales con microbios y otras composiciones agrícolas de la presente descripción tiene la ventaja de administrar los tratamientos en el lugar en el que se plantan los elementos vegetales poco antes de la germinación del elemento vegetal y la emergencia de un elemento vegetal.

En otras modalidades, la presente descripción también enseña que el uso de tratamientos de elementos vegetales minimiza la cantidad de microbios o composición agrícola que se requiere para tratar con éxito las plantas y limita aún más la cantidad de contacto de los trabajadores con los microbios y las composiciones en comparación con las técnicas de aplicación tales como la pulverización sobre el suelo o sobre elementos vegetales emergentes.

Además, en algunas modalidades, la presente descripción enseña que los microbios descritos en la presente descripción son importantes para mejorar las primeras etapas de la vida vegetal (por ejemplo, dentro de los primeros treinta días siguientes a la emergencia del elemento vegetal). Por lo tanto, en algunas modalidades, la administración de los microbios y/o las composiciones de la presente descripción como un tratamiento del elemento vegetal coloca al microbio en el lugar de acción en un momento crítico para su actividad.

En algunas modalidades, las composiciones microbianas de la presente descripción se formulan como un tratamiento de elementos vegetales. En algunas modalidades, se contempla que los

elementos vegetales pueden recubrirse de manera sustancialmente uniforme con una o más capas de los microbios y/o composiciones agrícolas descritas en la presente descripción, mediante el uso de métodos convencionales de mezcla, pulverizado o una combinación de los mismos a través del uso del equipo de la aplicación del tratamiento que está específicamente diseñado y fabricado para

5 aplicar con precisión, seguridad y eficiencia productos de tratamiento de elementos vegetales a elementos vegetales. Dicho equipo usa diversos tipos de tecnología de recubrimiento, tales como recubridores rotatorios, recubridores de tambor, técnicas de lecho fluidizado, lechos de vertido, nieblas rotatorias o una combinación de los mismos. Los tratamientos del elementos vegetales líquidos tales como los de la presente descripción pueden aplicarse a través de un disco

10 “atomizador” giratorio o una boquilla de pulverizado, que distribuye uniformemente el tratamiento de semillas sobre el elemento vegetal a medida que se mueve a través del patrón de pulverizado. En aspectos, el elemento vegetal se mezcla o se voltea luego durante un período de tiempo adicional para lograr una distribución y secado del tratamiento adicional.

Los elementos vegetales pueden imprimirse o no imprimirse antes del recubrimiento con las

15 composiciones microbianas para aumentar la uniformidad de la germinación y la emergencia. En una modalidad alternativa, puede dosificarse una formulación de polvo seco sobre el elemento vegetal móvil y permitir que se mezcle hasta que se distribuya por completo.

En algunas modalidades, los elementos vegetales tienen al menos parte del área superficial recubierta con una composición microbiológica, de acuerdo con la presente descripción. En

20 algunas modalidades, un recubrimiento de semillas que comprende la composición microbiana se aplica directamente a un elemento vegetal desnudo. En algunas modalidades, se aplica un recubrimiento de elemento vegetal que comprende la composición microbiana a un elemento vegetal que ya tiene aplicado un recubrimiento de elemento vegetal. En algunos aspectos, el elemento vegetal puede tener una capa de elemento vegetal que comprende, por ejemplo,

25 clotianidina y/o *Bacillus firmus*-I-1582, sobre los cuales se aplicará la presente composición encima, como una sobrecapa de elemento vegetal. En algunos aspectos, las composiciones microbianas enseñadas se aplican como un recubrimiento de elemento vegetal a elementos vegetales que ya se han tratado con PONCHO™ VOTiVO™. En algunos aspectos, el elemento vegetal puede tener una capa de elemento vegetal que comprende, por ejemplo, metalaxil, y/o

30 clotianidina, y/o *Bacillus firmus*-I-1582, sobre los cuales se aplicará la presente composición encima, como una sobrecapa de elemento vegetal. En algunos aspectos, las composiciones

microbianas enseñadas se aplican como un recubrimiento de elemento vegetal a elementos vegetales que ya se han tratado con ACCELERON™.

En algunas modalidades, los elementos vegetales tratados con microorganismos tienen una concentración de esporas microbianas, o concentración de células microbianas, de aproximadamente: 10^2 a 10^{12} , 10^2 a 10^{11} , 10^2 a 10^{10} , 10^2 a 10^9 , 10^2 a 10^8 , 10^2 a 10^7 , 10^2 a 10^6 , 10^2 a 10^5 , 10^2 a 10^4 o 10^2 a 10^3 por elemento vegetal.

En algunas modalidades, los elementos vegetales tratados con microorganismos tienen una concentración de esporas microbianas, o concentración de células microbianas, de aproximadamente: 10^3 a 10^{12} , 10^3 a 10^{11} , 10^3 a 10^{10} , 10^3 a 10^9 , 10^3 a 10^8 , 10^3 a 10^7 , 10^3 a 10^6 , 10^3 a 10^5 o 10^3 a 10^4 por elemento vegetal.

En algunas modalidades, los elementos vegetales tratados con microorganismos tienen una concentración de esporas microbianas, o concentración de células microbianas, de aproximadamente: 10^4 a 10^{12} , 10^4 a 10^{11} , 10^4 a 10^{10} , 10^4 a 10^9 , 10^4 a 10^8 , 10^4 a 10^7 , 10^4 a 10^6 o 10^4 a 10^5 por elemento vegetal.

En algunas modalidades, los elementos vegetales tratados con microorganismos tienen una concentración de esporas microbianas, o concentración de células microbianas, de aproximadamente: 10^5 a 10^{12} , 10^5 a 10^{11} , 10^5 a 10^{10} , 10^5 a 10^9 , 10^5 a 10^8 , 10^5 a 10^7 o 10^5 a 10^6 por elemento vegetal.

En algunas modalidades, los elementos vegetales tratados con microorganismos tienen una concentración de esporas microbianas, o concentración de células microbianas, de aproximadamente: 10^5 to 10^9 por elemento vegetal.

En algunas modalidades, los elementos vegetales tratados con microorganismos tienen una concentración de esporas microbianas o concentración de células microbianas de al menos aproximadamente: 1×10^3 , o 1×10^4 , o 1×10^5 , o 1×10^6 , o 1×10^7 , o 1×10^8 o 1×10^9 por elemento vegetal.

En algunas modalidades, la cantidad de uno o más de los microbios y/o composiciones agrícolas aplicadas al elemento vegetal depende de la formulación final, así como también del tamaño o tipo de planta o elemento vegetal utilizado. En algunas modalidades, uno o más de los microbios están presentes en aproximadamente un 2 % p/p a aproximadamente un 80 % p/p de la formulación completa. En algunas modalidades, el uno o más de los microbios empleados en las composiciones es del 5 % p/p a aproximadamente 65 % p/p, o del 10 % p/p a aproximadamente 60 % p/p en peso de la formulación completa.

En algunas modalidades, los elementos vegetales también pueden tener más esporas o células microbianas por elemento vegetal, tales como, por ejemplo, aproximadamente 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 , 10^{10} , 10^{11} , 10^{12} , 10^{13} , 10^{14} , 10^{15} , 10^{16} o 10^{17} esporas o células por elemento vegetal.

- 5 En algunas modalidades, los recubrimientos de elementos vegetales de la presente descripción pueden ser de hasta 10 μm , 20 μm , 30 μm , 40 μm , 50 μm , 60 μm , 70 μm , 80 μm , 90 μm , 100 μm , 110 μm , 120 μm , 130 μm , 140 μm , 150 μm , 160 μm , 170 μm , 180 μm , 190 μm , 200 μm , 210 μm , 220 μm , 230 μm , 240 μm , 250 μm , 260 μm , 270 μm , 280 μm , 290 μm , 300 μm , 310 μm , 320 μm , 330 μm , 340 μm , 350 μm , 360 μm , 370 μm , 380 μm , 390 μm , 400 μm , 410 μm , 420 μm , 430 μm , 440 μm , 450 μm , 460 μm , 470 μm , 480 μm , 490 μm , 500 μm , 510 μm , 520 μm , 530 μm , 540 μm , 550 μm , 560 μm , 570 μm , 580 μm , 590 μm , 600 μm , 610 μm , 620 μm , 630 μm , 640 μm , 650 μm , 660 μm , 670 μm , 680 μm , 690 μm , 700 μm , 710 μm , 720 μm , 730 μm , 740 μm , 750 μm , 760 μm , 770 μm , 780 μm , 790 μm , 800 μm , 810 μm , 820 μm , 830 μm , 840 μm , 850 μm , 860 μm , 870 μm , 880 μm , 890 μm , 900 μm , 910 μm , 920 μm , 930 μm , 940 μm , 950 μm , 960 μm , 970 μm , 980 μm , 990 μm , 1,000 μm , 1,010 μm , 1,020 μm , 1,030 μm , 1,040 μm , 1,050 μm , 1,060 μm , 1,070 μm , 1,080 μm , 1,090 μm , 1,100 μm , 1,110 μm , 1,120 μm , 1,130 μm , 1,140 μm , 1,150 μm , 1,160 μm , 1,170 μm , 1,180 μm , 1,190 μm , 1,200 μm , 1,210 μm , 1,220 μm , 1,230 μm , 1,240 μm , 1,250 μm , 1,260 μm , 1,270 μm , 1,280 μm , 1,290 μm , 1,300 μm , 1,310 μm , 1,320 μm , 1,330 μm , 1,340 μm , 1,350 μm , 1,360 μm , 1,370 μm , 1,380 μm , 1,390 μm , 1,400 μm , 1,410 μm , 1,420 μm , 1,430 μm , 1,440 μm , 1,450 μm , 1,460 μm , 1,470 μm , 1,480 μm , 1,490 μm , 1,500 μm , 1,510 μm , 1,520 μm , 1,530 μm , 1,540 μm , 1,550 μm , 1,560 μm , 1,570 μm , 1,580 μm , 1,590 μm , 1,600 μm , 1,610 μm , 1,620 μm , 1,630 μm , 1,640 μm , 1,650 μm , 1,660 μm , 1,670 μm , 1,680 μm , 1,690 μm , 1,700 μm , 1,710 μm , 1,720 μm , 1,730 μm , 1,740 μm , 1,750 μm , 1,760 μm , 1,770 μm , 1,780 μm , 1,790 μm , 1,800 μm , 1,810 μm , 1,820 μm , 1,830 μm , 1,840 μm , 1,850 μm , 1,860 μm , 1,870 μm , 1,880 μm , 1,890 μm , 1,900 μm , 1,910 μm , 1,920 μm , 1,930 μm , 1,940 μm , 1,950 μm , 1,960 μm , 1,970 μm , 1,980 μm , 1,990 μm , 2,000 μm , 2,010 μm , 2,020 μm , 2,030 μm , 2,040 μm , 2,050 μm , 2,060 μm , 2,070 μm , 2,080 μm , 2,090 μm , 2,100 μm , 2,110 μm , 2,120 μm , 2,130 μm , 2,140 μm , 2,150 μm , 2,160 μm , 2,170 μm , 2,180 μm , 2,190 μm , 2,200 μm , 2,210 μm , 2,220 μm , 2,230 μm , 2,240 μm , 2,250 μm , 2,260 μm , 2,270 μm , 2,280 μm , 2,290 μm , 2,300 μm , 2,310 μm , 2,320 μm , 2,330 μm , 2,340 μm , 2,350 μm , 2,360 μm , 2,370 μm , 2,380 μm , 2,390 μm , 2,400 μm , 2,410 μm , 2,420 μm , 2,430 μm , 2,440 μm , 2,450 μm , 2,460 μm , 2,470 μm , 2,480 μm , 2,490 μm , 2,500 μm , 2,510 μm , 2,520 μm , 2,530 μm , 2,540 μm , 2,550 μm , 2,560 μm , 2,570 μm , 2,580 μm , 2,590 μm , 2,600 μm ,

2,610 μm , 2,620 μm , 2,630 μm , 2,640 μm , 2,650 μm , 2,660 μm , 2,670 μm , 2,680 μm , 2,690 μm , 2,700 μm , 2,710 μm , 2,720 μm , 2,730 μm , 2,740 μm , 2,750 μm , 2,760 μm , 2,770 μm , 2,780 μm , 2,790 μm , 2,800 μm , 2,810 μm , 2,820 μm , 2,830 μm , 2,840 μm , 2,850 μm , 2,860 μm , 2,870 μm , 2,880 μm , 2,890 μm , 2,900 μm , 2,910 μm , 2,920 μm , 2,930 μm , 2,940 μm , 2,950 μm , 2,960 μm , 2,970 μm , 2,980 μm , 2,990 μm , o 3,000 μm de grosor.

En algunas modalidades, los recubrimientos de elementos vegetales de la presente descripción pueden tener 0.5 mm, 1 mm, 1.5 mm, 2 mm, 2.5 mm, 3 mm, 3.5 mm, 4 mm, 4.5 mm o 5 mm de grosor.

En algunas modalidades, las capas de elemento vegetal de la presente descripción pueden ser al menos 0.5 %, 1 %, 1.5 %, 2 %, 2.5 %, 3 %, 3.5 %, 4 %, 4.5 %, 5 %, 5.5 %, 6 %, 6.5 %, 7 %, 7.5 %, 8 %, 8.5 %, 9 %, 9.5 %, 10 %, 10.5 %, 11 %, 11.5 %, 12 %, 12.5 %, 13 %, 13.5 %, 14 %, 14.5 %, 15 %, 15.5 %, 16 %, 16.5 %, 17 %, 17.5 %, 18 %, 18.5 %, 19 %, 19.5 %, 20 %, 20.5 %, 21 %, 21.5 %, 22 %, 22.5 %, 23 %, 23.5 %, 24 %, 24.5 %, 25 %, 25.5 %, 26 %, 26.5 %, 27 %, 27.5 %, 28 %, 28.5 %, 29 %, 29.5 %, 30 %, 30.5 %, 31 %, 31.5 %, 32 %, 32.5 %, 33 %, 33.5 %, 34 %, 34.5 %, 35 %, 35.5 %, 36 %, 36.5 %, 37 %, 37.5 %, 38 %, 38.5 %, 39 %, 39.5 %, 40 %, 40.5 %, 41 %, 41.5 %, 42 %, 42.5 %, 43 %, 43.5 %, 44 %, 44.5 %, 45 %, 45.5 %, 46 %, 46.5 %, 47 %, 47.5 %, 48 %, 48.5 %, 49 %, 49.5 % o 50 % del peso del elemento vegetal sin recubrir.

En algunas modalidades, las esporas y/o células microbianas pueden recubrirse libremente sobre los elementos vegetales o pueden formularse en una composición líquida o sólida antes de recubrir los elementos vegetales. Por ejemplo, puede prepararse una composición sólida que comprende los microorganismos al mezclar un portador sólido con una suspensión de esporas hasta que los portadores sólidos se impregnen con la suspensión de esporas o células. A continuación, esta mezcla puede secarse para obtener las partículas deseadas.

En algunas otras modalidades, se contempla que las composiciones microbianas sólidas o líquidas de la presente descripción contienen además agentes funcionales, por ejemplo, carbón activado, nutrientes (fertilizantes) y otros agentes capaces de mejorar la germinación y calidad de los productos o una combinación de los mismos.

Los métodos y composiciones de recubrimiento de elementos vegetales que se conocen en la técnica pueden ser particularmente útiles cuando se modifican mediante la adición de una de las modalidades de la presente descripción. Dichos métodos y aparatos de recubrimiento para su aplicación se describen, por ejemplo, en las patentes de EE.UU. núms. 5,916,029; 5,918,413;

5,554,445; 5,389,399; 4,759,945; 4,465,017 y la solicitud de patente de EE.UU. App. núm. 13/260,310, cada uno de los cuales se incorpora como referencia en la presente descripción.

Las composiciones de recubrimiento de elementos vegetales se describen, por ejemplo, en las patentes de EE.UU. núms. 5,939,356; 5,876,739, 5,849,320; 5,791,084, 5,661,103; 5,580,544,
5 5,328,942; 4,735,015; 4,634,587; 4,372,080, 4,339,456; y 4,245,432, cada uno de los cuales se incorpora como referencia en la presente descripción.

En algunas modalidades, puede añadirse una variedad de aditivos a las formulaciones de tratamiento del elemento vegetal que comprenden las composiciones inventivas. Pueden añadirse aglutinantes e incluir aquellos compuestos de un polímero adhesivo que puede ser natural o
10 sintético sin efecto fitotóxico sobre el elemento vegetal a recubrir. El aglutinante puede seleccionarse entre acetatos de polivinilo; copolímeros de acetato de polivinilo; copolímeros de acetato de etilenvinilo (EVA); alcoholes polivinílicos; copolímeros de alcohol polivinílico; celulosas, que incluyen etilcelulosas, metilcelulosas, hidroximetilcelulosas, hidroxipropilcelulosas y carboximetilcelulosa; polivinilpirrolidonas; polisacáridos, que incluyen almidón, almidón
15 modificado, dextrinas, maltodextrinas, alginato y quitosanos; grasas; aceites; proteínas, que incluyen gelatina y zeínas; gomas arábicas; gomas lacas; cloruro de vinilideno y copolímeros de cloruro de vinilideno; lignosulfonatos de calcio; copolímeros acrílicos; polivinilacrilatos; óxido de polietileno; polímeros y copolímeros de acrilamida; acrilato de polihidroxietilo, monómeros de metilacrilamida; y policloropreno.

20 Puede emplearse cualquiera de una variedad de colorantes, que incluyen los cromóforos orgánicos clasificados como nitroso; nitro; azo, que incluye monoazo, bisazo y poliazos; acridina, antraquinona, azina, difenilmetano, indamina, indofenol, metino, oxazina, ftalocianina, tiazina, tiazol, triarilmetano, xanteno. Otros aditivos que pueden añadirse incluyen nutrientes trazas tales como sales de hierro, manganeso, boro, cobre, cobalto, molibdeno y zinc.

25 Puede aplicarse un polímero u otro agente de control de polvo para retener el tratamiento en la superficie del elemento vegetal.

En algunas modalidades específicas, 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. Los ejemplos de dichos materiales incluyen, pero no se limitan a, acetatos de polivinilo;
30 copolímeros de acetato de polivinilo; alcoholes polivinílicos; copolímeros de alcohol polivinílico; celulosas, tales como metilcelulosas, hidroximetilcelulosas e hidroximetilpropilcelulosas; dextrinas; alginatos; azúcares; melazas; polivinilpirrolidonas; polisacáridos; proteínas; grasas;

aceites; gomas arábicas; gelatinas; jarabes; y almidones. Pueden encontrarse más ejemplos, por ejemplo, en la patente de EE.UU. núm. 7,213,367, incorporada en la presente descripción como referencia.

También pueden incluirse diversos aditivos, tales como adherentes, dispersantes, surfactantes e ingredientes de nutrientes y tampones, en la formulación del tratamiento del elemento vegetal. Otros aditivos convencionales para el tratamiento del elemento vegetal incluyen, pero no se limitan a: agentes de recubrimiento, agentes humectantes, agentes tampón y polisacáridos. Puede añadirse al menos un portador aceptable en la agricultura a la formulación del tratamiento del elemento vegetal, tal 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.

En algunas modalidades, la composición de recubrimiento de elementos vegetales puede comprender al menos un relleno, que es un componente orgánico o inorgánico, natural o sintético con el que se combinan los componentes activos para facilitar su aplicación sobre el elemento vegetal. En aspectos, el relleno es un sólido inerte tal como arcillas, silicatos naturales o sintéticos, sílice, resinas, ceras, fertilizantes sólidos (por ejemplo, sales de amonio), minerales naturales del suelo, tales como caolines, arcillas, talco, cal, cuarzo, atapulguita, montmorillonita, bentonita o tierras de diatomeas, o minerales sintéticos, tales como sílice, alúmina o silicatos, en particular silicatos de aluminio o magnesio.

En algunas modalidades, la formulación del tratamiento del elemento vegetal puede incluir además uno o más de los siguientes ingredientes: otros pesticidas, que incluyen compuestos que actúan solo más abajo del suelo; fungicidas, tales como captan, tiram, metalaxil, fludioxonil, oxadixil e isómeros de cada uno de estos materiales y similares; herbicidas, que incluyen 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 de origen natural o recombinantes de los géneros *Rhizobium*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Trichoderma*, *Glomus*, *Gliocladium* y hongos micorrízicos. Estos ingredientes pueden añadirse como una capa separada sobre el elemento vegetal o,

alternativamente, pueden añadirse como parte de la composición del recubrimiento de elementos vegetales de la descripción.

En algunas modalidades, la formulación que se usa para tratar el elemento vegetal en la presente descripción puede estar en forma de una suspensión; emulsión; lodo de partículas en un medio acuoso (por ejemplo, agua); polvo humectable; gránulos humectables (fluidos secos); y gránulos secos. Si se formula como suspensión o lodo, la concentración del ingrediente activo en la formulación puede ser de aproximadamente 0.5 % a aproximadamente 99 % en peso (p/p), o de 5-40 %, o de cualquier otra manera formulada por los expertos en la técnica.

Como se mencionó anteriormente, pueden incorporarse a la formulación otros ingredientes inactivos o inertes convencionales. Tales ingredientes inertes incluyen, pero no se limitan a: agentes adhesivos convencionales; agentes dispersantes tales como metilcelulosa, por ejemplo, sirven como agentes dispersantes/adhesivos combinados para su uso en tratamientos de elementos vegetales; alcohol polivinílico; 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; surfactantes; compuestos anticongelantes (por ejemplo, urea), tintes, colorantes y similares. Otros ingredientes inertes útiles en la presente descripción pueden encontrarse en McCutcheon, vol. 1, "Emulsifiers and Detergents," MC Publishing Company, Glen Rock, N.J., EE.UU., 1996, incorporado como referencia en la presente descripción.

Las formulaciones de recubrimiento de elementos vegetales de la presente descripción pueden aplicarse a elementos vegetales mediante una variedad de métodos, que incluyen, pero no se limitan a: mezclar en un contenedor (por ejemplo, una botella o bolsa), aplicación mecánica, volteo, pulverizado e inmersión. Puede usarse una variedad de materiales activos o inertes para poner en contacto elementos vegetales con composiciones microbianas de acuerdo con la presente descripción.

En algunas modalidades, la cantidad de los microbios o composición agrícola que se usa para el tratamiento de la semilla variará en dependencia del tipo de elemento vegetal y el tipo de ingredientes activos, pero el tratamiento comprenderá poner en contacto los elementos vegetales con una cantidad de la composición inventiva efectiva en la agricultura.

Como se discutió anteriormente, una cantidad efectiva significa la cantidad de la composición inventiva que es suficiente para afectar los resultados beneficiosos o deseados. Una cantidad efectiva puede administrarse en una o más administraciones.

En algunas modalidades, además de la capa de recubrimiento, el elemento vegetal puede tratarse con uno o más de los siguientes ingredientes: otros pesticidas que incluyen fungicidas y herbicidas; protectores herbicidas; fertilizantes y/o agentes de biocontrol. Estos ingredientes pueden añadirse como una capa separada o, alternativamente, pueden añadirse en la capa de recubrimiento.

- 5 En algunas modalidades, las formulaciones del recubrimiento de elementos vegetales de la presente descripción pueden aplicarse a los elementos vegetales mediante el uso de una variedad de técnicas y máquinas, tales como técnicas de lecho fluidizado, el método de molino de rodillos, tratadores de elementos vegetales rotostáticos y recubridores de tambor. También pueden ser útiles otros métodos, tales como los lechos con surtidores. Los elementos vegetales pueden
- 10 predimensionarse antes del recubrimiento. Después del recubrimiento, los elementos vegetales típicamente se secan y luego se transfieren a una máquina de dimensionamiento para su dimensionamiento. Dichos procedimientos son conocidos en la técnica.

- En algunas modalidades, los elementos vegetales tratados con microorganismos también pueden envolverse con una película de revestimiento para proteger el recubrimiento. Dichos
- 15 revestimientos son conocidos en la técnica y pueden aplicarse mediante el uso de técnicas de revestimiento de película en tambor y lecho fluidizado.

- En otras modalidades de la presente descripción, las composiciones de acuerdo con la presente descripción pueden introducirse en un elemento vegetal mediante el uso de imprimación de matriz sólida. Por ejemplo, puede mezclarse una cantidad de una composición inventiva con un material
- 20 de matriz sólida y luego el elemento vegetal puede ponerse en contacto con el material de matriz sólida durante un período para permitir que la composición se introduzca en el elemento vegetal. A continuación, el elemento vegetal puede separarse opcionalmente del material de matriz sólida y almacenarse o usarse, o la mezcla de material de matriz sólida más el elemento vegetal puede almacenarse o plantarse directamente. Los materiales de matriz sólida que son útiles en la presente
- 25 descripción incluyen poliacrilamida, almidón, arcilla, sílice, alúmina, suelo, arena, poliurea, poliacrilato o cualquier otro material capaz de absorber o adsorber la composición inventiva durante un tiempo y liberar esa composición en o sobre el elemento vegetal. Es útil asegurarse de que la composición inventiva y el material de matriz sólida sean compatibles entre sí. Por ejemplo, el material de matriz sólida debe elegirse de modo que pueda liberar la composición a una
- 30 velocidad razonable, por ejemplo, durante un período de minutos, horas o días.

En algunas modalidades, la presente descripción enseña que los microbios individuales, o consorcios microbianos, o comunidades microbianas, desarrollados de acuerdo con los métodos descritos, pueden combinarse con cualquier bioestimulante vegetal.

En algunas modalidades, la presente descripción enseña composiciones agrícolas que comprenden uno o más bioestimulantes comercialmente disponibles, que incluyen, pero no se limitan a: Vitazyme®, Diehard™ Biorush®, Diehard™ Biorush® Fe, Diehard™ Soluble Kelp, Diehard™ Humate SP, Phocon®, Foliar Plus™, Plant Plus™, Accomplish LM®, Titan®, Soil Builder™, Nutri Life, Soil Solution™, Seed Coat™, PercPlus™, Plant Power®, CropKarb®, Thrust™, Fast2Grow®, Baccarat® y Potente®, entre otros.

En algunas modalidades, cuando el microbio o consorcios microbianos identificados de acuerdo con los métodos enseñados se combina con un agente químico activo, se observa un efecto aditivo en una característica fenotípica de interés de la planta. En otras modalidades, cuando el microbio o consorcios microbianos identificados de acuerdo con los métodos enseñados se combina con un agente químico activo, se observa un efecto sinérgico en una característica fenotípica de interés de la planta.

En algunas modalidades, cuando el microbio o consorcios microbianos identificados de acuerdo con los métodos enseñados se combina con un fertilizante, se observa un efecto aditivo en una característica fenotípica de interés de la planta. En otras modalidades, cuando el microbio o consorcios microbianos identificados de acuerdo con los métodos enseñados se combina con un fertilizante, se observa un efecto sinérgico en una característica fenotípica de interés de la planta.

En algunas modalidades, cuando el microbio o consorcios microbianos identificados de acuerdo con los métodos enseñados se combina con un regulador del crecimiento vegetal, se observa un efecto aditivo en una característica fenotípica de interés de la planta. En algunas modalidades, cuando el microbio o consorcios microbianos identificados de acuerdo con los métodos enseñados se combina con un regulador del crecimiento vegetal, se observa un efecto sinérgico. En algunos aspectos, los microbios de la presente descripción se combinan con Ascend® y se observa un efecto sinérgico para una o más características fenotípicas de interés.

En algunas modalidades, cuando el microbio o consorcios microbianos identificados de acuerdo con los métodos enseñados se combina con un bioestimulante, se observa un efecto aditivo en una característica fenotípica de interés de la planta. En algunas modalidades, cuando el microbio o consorcios microbianos identificados de acuerdo con los métodos enseñados se combina con un bioestimulante, se observa un efecto sinérgico.

El efecto sinérgico obtenido por los métodos enseñados puede cuantificarse de acuerdo con la fórmula de Colby (es decir, $(E) = X + Y - (X * Y / 100)$). Véase Colby, R. S., "Calculating Synergistic and Antagonistic Responses of Herbicide Combinations," 1967 Weeds, vol. 15, pp. 20-22, incorporado en la presente descripción como referencia en su totalidad. Por lo tanto, por

5 "sinérgico" se entiende un componente que, en virtud de su presencia, aumenta el efecto deseado en más de una cantidad aditiva.

Los microbios y consorcios aislados de la presente descripción pueden aumentar sinérgicamente la eficacia de los compuestos activos agrícolas y también de los compuestos auxiliares agrícolas.

En otras modalidades, cuando el microbio o consorcios microbianos identificados de acuerdo con

10 los métodos enseñados se combina con un fertilizante, se observa un efecto sinérgico.

Además, en determinadas modalidades, la descripción utiliza interacciones sinérgicas para definir consorcios microbianos. Es decir, en determinados aspectos, la descripción combina determinadas especies microbianas aisladas, que actúan sinérgicamente, en consorcios que imparten una característica beneficiosa a una planta, o que se correlacionan con el aumento de una característica

15 beneficiosa de la planta.

Las composiciones agrícolas desarrolladas de acuerdo con la descripción pueden formularse con determinados auxiliares, con el fin de mejorar la actividad de un compuesto agrícola activo conocido. Esto tiene la ventaja de que las cantidades de ingrediente activo en la formulación pueden reducirse mientras se mantiene la eficacia del compuesto activo, lo que permite, por lo

20 tanto, mantener los costos lo más bajo posible y seguir regulaciones oficiales cualquiera. En casos individuales, también puede ser posible ampliar el espectro de acción del compuesto activo desde las plantas, donde el tratamiento con un ingrediente activo particular sin adición no fue lo suficientemente exitoso, pueden ser tratadas con éxito mediante la adición de determinados auxiliares junto con los aislados microbianos y consorcios descritos. Además, el rendimiento del

25 activo puede aumentarse en casos individuales mediante una formulación adecuada cuando las condiciones ambientales no son favorables.

Tales auxiliares que pueden usarse en una composición agrícola pueden ser un adyuvante. Con frecuencia, los adyuvantes adoptan la forma de compuestos tensioactivos o similares a sales. En dependencia de su modo de acción, pueden clasificarse aproximadamente como modificadores,

30 activadores, fertilizantes, tampones de pH y similares. Los modificadores afectan las propiedades de humectación, adherencia y dispersión de una formulación. Los activadores rompen la cutícula cerosa de la planta y mejoran la penetración del ingrediente activo en la cutícula, tanto a corto

plazo (en minutos) como a largo plazo (en horas). Los fertilizantes tales como el sulfato de amonio, el nitrato de amonio o la urea mejoran la absorción y la solubilidad del ingrediente activo y pueden reducir el comportamiento antagónico de los ingredientes activos. Los tampones de pH se usan convencionalmente para llevar la formulación a un pH óptimo.

- 5 En algunas modalidades, el elemento vegetal es un elemento reproductivo vegetal (p. ej., semilla, tubérculo, bulbo, y/o brote). En algunas modalidades, el elemento vegetal no es un elemento reproductivo vegetal (p. ej., hoja, tallo, y/o raíz). En algunas modalidades, una pluralidad de elementos vegetales se asocian con los microbios descritos en la presente descripción.

- 10 En algunas modalidades, la planta o el elemento vegetal se asocian con uno o más microbios descritos en la presente descripción a través de un método indirecto, tal como, pero sin limitarse al tratamiento del medio de cultivo en el que se coloca la planta o el elemento vegetal.

- Para modalidades adicionales de composiciones agrícolas de la presente descripción, véase “Chemistry and Technology of Agrochemical Formulations,” editado por D. A. Knowles, copyright 1998 por Kluwer Academic Publishers, incorporado en la presente descripción como
15 referencia.

Plantas y beneficios agronómicos

- Una amplia variedad de plantas, que incluyen las cultivadas en agricultura, son capaces de recibir beneficios de la aplicación de microbios, tales como los descritos en la presente descripción, que incluyen microbios solos, consorcios y/o composiciones producidas a partir de ellos, o que
20 comprenden cualquiera de los anteriores. Cualquier número de una variedad de plantas diferentes, que incluyen musgos y líquenes y algas, puede usarse en los métodos de la descripción. En modalidades, las plantas tienen valor económico, social o medioambiental. Por ejemplo, las plantas pueden incluir aquellas usadas como: cultivos alimenticios, cultivos de fibras, cultivos oleaginosos, en la industria forestal, en la industria de la pulpa y el papel, como materia prima para la
25 producción de biocombustibles y como plantas ornamentales.

- Los microorganismos genéticamente modificados descritos en la presente descripción tienen aplicación en la mejora de la fijación de nitrógeno en plantas. En algunas modalidades, tales plantas incluyen aquellas que carecen de simbiontes de fijación de nitrógeno natural (p. ej., cultivos no leguminosos), tales como, de modo no taxativo: trigo, maíz (elote), arroz, y verduras.
30 En algunas modalidades, tales plantas incluyen aquellas que se beneficiarían de la fijación de nitrógeno adicional.

Métodos de aplicación

Los microorganismos pueden aplicarse a una planta, plántula, esqueje, propágulo o similares y/o al medio de cultivo que contiene dicha planta, mediante el uso de cualquier técnica apropiada conocida en la técnica.

5 Sin embargo, a manera de ejemplo, un microbio, consorcio o composición que comprende estos, y/o una composición producida a partir de estos, puede aplicarse a una planta, plántula, esqueje, propágulo o similares, mediante pulverización, recubrimiento, espolvoreado o cualquier otro método conocido en la técnica.

En otra modalidad, el microbio aislado, consorcios o composición que comprende los mismos pueden aplicarse directamente a una semilla de planta antes de la siembra.

10 En otra modalidad, el microbio aislado, consorcios o composición que comprende los mismos pueden aplicarse directamente a una semilla de planta, como un recubrimiento de semillas.

En una modalidad de la presente descripción, el microbio aislado, consorcios o composición que comprende los mismos se suministran en la forma de gránulos, o tapón o empapado de suelo que se aplica al medio de cultivo vegetal.

15 En otras modalidades, el microbio aislado, consorcios o composición que comprende los mismos se suministran en la forma de una aplicación foliar, tal como una pulverización foliar o composición líquida. La pulverización foliar o la aplicación líquida pueden aplicarse a una planta en crecimiento o a un medio de cultivo, por ejemplo, suelo.

20 En algunas modalidades, el microbio aislado, consorcios o composición que comprende los mismos se suministran en una forma seleccionada de: un empapado de suelo, una pulverización foliar, un tratamiento por inmersión, un tratamiento en surcos, una enmienda de suelo, gránulos, un tratamiento al voleo, un tratamiento de control de enfermedades poscosecha, o un tratamiento de semilla. En algunas modalidades, las composiciones agrícolas pueden aplicarse solas en programas de pulverización o en rotación.

25 En algunas modalidades, el microbio aislado, consorcios o composición que comprende los mismos pueden ser compatible con la mezcla en tanque. En algunas modalidades, las composiciones agrícolas pueden ser compatibles con la mezcla en tanque con otros productos agrícolas. En algunas modalidades, las composiciones agrícolas pueden ser compatibles con equipos usados para aplicaciones terrestres, aéreas y de riego.

30 En otra modalidad, el microbio aislado, consorcios o composición que comprende los mismos pueden formularse en gránulos y aplicarse junto con las semillas durante la siembra. O los gránulos pueden aplicarse después de la siembra. O los gránulos pueden aplicarse antes de la siembra.

En algunas modalidades, el microbio aislado, consorcios o composición que comprende los mismos se administran a una planta o medio de cultivo como una aplicación tópica y/o una aplicación de riego para mejorar el crecimiento, el rendimiento y la calidad del cultivo. La aplicación tópica puede ser mediante la utilización de una mezcla seca o polvo o composición en polvo o puede ser una formulación basada en líquido.

En modalidades, el microbio aislado, consorcios o composición que comprende el mismo puede formularse como: (1) soluciones; (2) polvos humectables; (3) polvos para espolvorear; (4) polvos solubles; (5) emulsiones o concentrados en suspensión; (6) aderezos o recubrimientos de semillas, (7) tabletas; (8) gránulos dispersables en agua; (9) gránulos solubles en agua (liberación lenta o rápida); (10) gránulos o suspensiones microencapsulados; (11) como componentes de riego, y (12) como componente de fertilizantes, pesticidas y otras enmiendas compatibles, entre otros. En determinados aspectos, las composiciones pueden diluirse en un medio acuoso antes de la aplicación por pulverización convencional. Las composiciones de la presente descripción pueden aplicarse al suelo, planta, semilla, rizósfera, rizovaina u otra área en la que sería beneficioso aplicar las composiciones microbianas. Aún más, los métodos balísticos pueden utilizarse como un medio para introducir microbios endófitos.

En aspectos, las composiciones se aplican al follaje de las plantas. Las composiciones pueden aplicarse al follaje de las plantas en la forma de una emulsión o concentrado en suspensión, solución líquida o pulverización foliar. La aplicación de las composiciones puede ocurrir en un laboratorio, cámara de crecimiento, invernadero o en el campo.

En otra modalidad, los microorganismos pueden inocularse en una planta al cortar las raíces o los tallos y exponer la superficie de la planta a los microorganismos mediante pulverización, inmersión o aplicar de cualquier otra manera una suspensión microbiana líquida, o gel o polvo.

En otra modalidad, los microorganismos pueden inyectarse directamente en tejido foliar o de la raíz, o de cualquier otra manera inocularse directamente en o sobre un corte foliar o de la raíz, o bien en un embrión, o radícula o coleóptilo extirpado. Estas plantas inoculadas pueden luego exponerse más a un medio de cultivo que contiene más microorganismos; sin embargo, esto no es necesario.

En otras modalidades, particularmente cuando los microorganismos no son cultivables, los microorganismos pueden transferirse a una planta mediante cualquiera o una combinación de injertos, inserción de explantes, aspiración, electroporación, heridas, poda de raíces, inducción de abertura de estomas o cualquier tratamiento físico, químico o biológico que proporciona la

oportunidad a los microbios de ingresar a las células vegetales o al espacio intercelular. Los expertos en la técnica pueden apreciar fácilmente una serie de técnicas alternativas que pueden usarse.

En una modalidad, los microorganismos se infiltran en partes de la planta tales como raíces, tallos, hojas y/o partes reproductivas de la planta (se vuelven endófitos), y/o crecen sobre la superficie de raíces, tallos, hojas y/o partes reproductivas de la planta (se vuelven epífitas) y/o crecen en la rizosfera de la planta. En una modalidad, los microorganismos forman una relación simbiótica con la planta.

Sin limitación, determinados aspectos se proporcionan de la siguiente manera:

10 Aspecto 1: Un microbio aislado genéticamente modificado que comprende una o más modificaciones genéticas seleccionadas de: una modificación genética a un gen *glnR* endógeno que codifica GlnR; y una modificación genética a una secuencia de región reguladora 5' dentro de un gen *nif* endógeno; en donde: la modificación genética al gen *glnR* endógeno que codifica GlnR se caracteriza por proporcionar un gen *glnR* mutante que produce una variante de proteína GlnR; la
15 modificación genética a la secuencia de región reguladora 5' se caracteriza por proporcionar una afinidad de unión mejorada a GlnR, en comparación con una secuencia de región reguladora 5' genéticamente no modificada; y la una o más modificaciones genéticas se caracterizan por proporcionar una actividad de fijación de nitrógeno mejorada al microbio, en comparación con una cepa del microbio genéticamente no modificada.

20 Aspecto 2: El microbio aislado del Aspecto 1, en donde la modificación genética al gen *glnR* endógeno que codifica GlnR comprende un truncamiento.

Aspecto 3: El microbio aislado del Aspecto 2, en donde el truncamiento comprende una eliminación de una porción del gen *glnR* endógeno que comprende una secuencia que codifica un dominio C-terminal de una proteína GlnR.

25 Aspecto 4: El microbio aislado del Aspecto 3, en donde la porción del gen *glnR* endógeno comprende una secuencia que codifica los 25 aminoácidos C-terminales de la proteína GlnR.

Aspecto 5: El microbio aislado de uno cualquiera de los Aspectos 1 a 4, en donde la secuencia de región reguladora 5' se ubica aguas arriba de un sitio de inicio de la transcripción en el gen *nif* endógeno.

30 Aspecto 6: El microbio aislado de uno cualquiera de los Aspectos 1 a 5, en donde la secuencia de región reguladora 5' dentro de un gen *nif* endógeno comprende la secuencia: 5'-X1-N-X2-X3-X4-A-X5-X6-X3-X3-A-N-X7-T-N-A-X8-X1-X5-3' (SEQID NO: 34), en donde cada X1 se

selecciona independientemente de A, G y T; X2 se selecciona de C y G; cada X3 se selecciona independientemente de A y T; X4 se selecciona de C y T; cada X5 se selecciona de G y T; X6 se selecciona de A, C y G; X7 se selecciona de A, C y T; X8 se selecciona de A y C; y cada N se selecciona de A, C, G y T.

- 5 Aspecto 7: El microbio aislado de uno cualquiera de los Aspectos 1 a 6, en donde la secuencia de región reguladora 5' dentro de un gen *nif* endógeno comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en: SEQID NO: 35-49.

Aspecto 8: El microbio aislado de uno cualquiera de los Aspectos 1 a 5, en donde la secuencia de región reguladora 5' dentro de un gen *nif* endógeno comprende la SEQID NO: 34.

- 10 Aspecto 9: El microbio aislado de uno cualquiera de los Aspectos 1 a 8, en donde la modificación genética a la secuencia de región reguladora 5' comprende un reemplazo de la secuencia de región reguladora 5' con una secuencia de ADN caracterizada por proporcionar una afinidad de unión mejorada a GlnR, en comparación con la secuencia de región reguladora 5' natural.

Aspecto 10: El microbio aislado del Aspecto 9, en donde la secuencia de ADN comprende la
15 secuencia: 5'-Y1-Y1-G-T-N-A-Y1-N-Y1-A-A-Y2-Y3-T-Y3-A-C-Y4-Y5-3' (SEQID NO:50), en donde: cada Y1 se selecciona independientemente de A, G y T; Y2 se selecciona de A, C y T; cada Y3 se selecciona independientemente de A y T; Y4 se selecciona de A y G; Y5 se selecciona de C y T; y cada N se selecciona independientemente de A, C, G y T.

Aspecto 11: El microbio aislado del Aspecto 9 o 10, en donde la secuencia de ADN comprende una
20 secuencia seleccionada del grupo que consiste en: SEQID NO: 51-66.

Aspecto 12: El microbio aislado del Aspecto 9, en donde la secuencia de ADN comprende la SEQID NO:50.

Aspecto 13: El microbio aislado de uno cualquiera de los Aspectos 1 a 12, en donde el microbio comprende una modificación genética a un gen *glnR* endógeno y una modificación genética a una
25 secuencia de región reguladora 5' dentro de un gen *nif* endógeno.

Aspecto 14: El microbio aislado de uno cualquiera de los Aspectos 1 a 13, que comprende además una modificación genética a la secuencia de una segunda región reguladora 5' dentro del gen *nif* endógeno, en donde la secuencia de la segunda región reguladora 5' se ubica aguas abajo de un sitio de inicio de la transcripción en el gen *nif* endógeno.

30 Aspecto 15: El microbio aislado del Aspecto 14, en donde la secuencia de la segunda región reguladora 5' comprende la secuencia: 5'-Y1-Y1-G-T-N-A-Y1-N-Y1-A-A-Y2-Y3-T-Y3-A-C-Y4-

Y5–3', en donde: cada Y1 se selecciona independientemente de A, G y T; Y2 se selecciona de A, C y T; cada Y3 se selecciona independientemente de A y T; Y4 se selecciona de A y G; Y5 se selecciona de C y T; y cada N se selecciona independientemente de A, C, G y T.

5 Aspecto 16: El microbio aislado del Aspecto 14 o 15, en donde la secuencia de la segunda región reguladora 5' se selecciona del grupo que consiste en: SEQID NO: 51-66.

Aspecto 17: El microbio aislado del Aspecto 14, en donde la secuencia de la segunda región reguladora 5' comprende la secuencia SEQID NO:50.

10 Aspecto 18: El microbio aislado de uno cualquiera de los Aspectos 14 a 17, en donde la modificación genética a la secuencia de la segunda región reguladora 5' comprende una eliminación de la secuencia de la segunda región reguladora 5' del gen nif endógeno.

Aspecto 19: El microbio aislado de uno cualquiera de los Aspectos 14 a 17, en donde la modificación genética a la secuencia de la segunda región reguladora 5' comprende un reemplazo de la secuencia de la segunda región reguladora 5' con una secuencia de ADN caracterizada por no ser reconocible por GlnR.

15 Aspecto 20: El microbio aislado de uno cualquiera de los Aspectos 1 a 19, en donde el microbio se caracteriza por tener una expresión constitutiva de nif en condiciones limitantes del nitrógeno o de abundancia de nitrógeno.

Aspecto 21: El microbio aislado de uno cualquiera de los Aspectos 1 a 20, en donde el microbio es una cepa bacteriana grampositiva.

20 Aspecto 22: El microbio aislado de uno cualquiera de los Aspectos 1 a 21, en donde el microbio es una cepa bacteriana grampositiva formadora de esporas.

Aspecto 23: El microbio aislado de uno cualquiera de los Aspectos 1 a 22, en donde el microbio es una cepa bacteriana grampositiva formadora de esporas de *Paenibacillus*, *Bacillus*, *Brevibacillus*, *Lysinibacillus*, *Cohnella*, *Fontibacillus*, *Clostridium*, *Arthrobacter* y/o *Microbacterium*.

25 Aspecto 24: El microbio aislado de uno cualquiera de los Aspectos 1 a 23, en donde el microbio es una cepa bacteriana grampositiva formadora de esporas de una especie seleccionada del grupo que consiste en: *Paenibacillus borealis*, *Paenibacillus albidus*, *Paenibacillus ehimensis*, *Paenibacillus graminis*, *Paenibacillus jilunlii*, *Paenibacillus odorifer*, *Paenibacillus phoenicis*, *Paenibacillus pocheonensis*, *Paenibacillus polymyxa*, *Paenibacillus sp.*, *Paenibacillus taohuashanense*,
30 *Paenibacillus thermophilus*, *Paenibacillus tritici*, *Paenibacillus typhae*, *Paenibacillus wynnii*, *Paenibacillus azotofigens* y *Paenibacillus silagei*.

Aspecto 25: El microbio aislado de uno cualquiera de los Aspectos 1 a 24, en donde el microbio es, o se prepara a partir de, una cepa bacteriana grampositiva formadora de esporas seleccionada del grupo que consiste en: cepa 8619 de *Paenibacillus polymyxa*, cepa 8619-G20 de *Paenibacillus polymyxa*, cepa 8619-G21 de *Paenibacillus polymyxa*, cepa 8619-G29 de *Paenibacillus polymyxa*,
5 cepa 8619-G25 de *Paenibacillus polymyxa*, cepa 8619-G50 de *Paenibacillus polymyxa*, cepa 17899 de *Paenibacillus odorifer*, cepa 17899-G13 de *Paenibacillus odorifer*, y cepa WLY78 de *Paenibacillus polymyxa*.

Aspecto 26: El microbio aislado de uno cualquiera de los Aspectos 1 a 20, en donde el microbio es una cepa bacteriana gramnegativa.

10 Aspecto 27: El microbio aislado de uno cualquiera de los Aspectos 1 a 20 o 26, en donde el microbio es una cepa bacteriana gramnegativa de un género seleccionado del grupo que consiste en *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Rahnella*, *Kosakonia*, *Herbaspirillum*, *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Rhizobium* y *Klebsiella*.

Aspecto 28: La cepa bacteriana aislada de uno cualquiera de los Aspectos 1 a 20, 26, o 27, en
15 donde el microbio es una cepa bacteriana gramnegativa de una especie seleccionada del grupo que consiste en: *Klebsiella variicola*, *Azospirillum brasilense*, *Enterobacter soli*, *Kosakonia oryzae*, *Kosakonia oryzendophytica*, *Kosakonia pseudosacchari*, *Kosakonia radicincitans*, *Kosakonia radicinitans*, *Pseudomonas lini*, *Pseudomonas marincola*, *Pseudomonas plecoglossicida*, *Pseudomonas resinovorans*, *Pseudomonas umsongensis*, *Rahnella aquatilis*, *Azotobacter chroococcum*,
20 *Azotobacter nigricans*, *Herbaspirillum chlorophenolicum*, *Herbaspirillum frisingense*, *Herbaspirillum huttiense*, *Herbaspirillum seropedicae*, *Herbaspirillum hiltneri*, *Herbaspirillum seropedicae*, *Rhizobium azooxidifex*, *Rhizobium cauense*, *Rhizobium nepotum* y *Rhizobium oryziradicis*.

Aspecto 29: Una composición agrícola que comprende el microbio aislado genéticamente
25 modificado de uno cualquiera de los Aspectos 1-28 y un portador aceptable en la agricultura.

Aspecto 32: La composición agrícola del Aspecto 29, en donde la composición se caracteriza por ser una composición agrícola que promueve el crecimiento vegetal.

Aspecto 31: La composición agrícola del Aspecto 29 o 30, que comprende además uno o más
30 agentes adicionales seleccionados del grupo que consiste en: un pesticida, un herbicida, un bactericida, un fungicida, un insecticida, un virucida, un miticida, un nematocida, un acaricida, un regulador del crecimiento vegetal, un rodenticida, un agente antialgas, un agente de biocontrol, un fertilizante, un biopesticida y un bioestimulante.

Aspecto 32: La composición agrícola del Aspecto 29 o 30, que comprende además uno o más fertilizantes.

Aspecto 33: La composición agrícola del Aspecto 32, en donde el uno o más fertilizantes se seleccionan de un fertilizante basado en fósforo, un fertilizante basado en potasio, un fertilizante basado en fósforo y potasio, un fertilizante basado en nitrógeno, un fertilizante basado en nitrógeno, fósforo y potasio, y sus combinaciones.

Aspecto 34: La composición agrícola del Aspecto 32 o 33, en donde el uno o más fertilizantes comprenden un fertilizante basado en fósforo.

Aspecto 35: La composición agrícola del Aspecto 32 o 33, en donde el uno o más fertilizantes comprenden un fertilizante basado en potasio.

Aspecto 36: La composición agrícola del Aspecto 32 o 33, en donde el uno o más fertilizantes comprenden un fertilizante basado en fósforo y potasio.

Aspecto 37: La composición agrícola del Aspecto 32 o 33, en donde el uno o más fertilizantes comprenden un fertilizante basado en nitrógeno.

Aspecto 38: La composición agrícola del Aspecto 32 o 33, en donde el uno o más fertilizantes comprenden un fertilizante basado en nitrógeno, fósforo y potasio.

Aspecto 39: La composición agrícola de uno cualquiera de los Aspectos 32 a 38, en donde el uno o más fertilizantes comprenden un fertilizante granular.

Aspecto 40: La composición agrícola de uno cualquiera de los Aspectos 32 a 38, en donde el uno o más fertilizantes comprenden un fertilizante líquido.

Aspecto 41: La composición agrícola del Aspecto 29 o 30, que comprende además un agente agrícola biológico.

Aspecto 42: La composición agrícola del Aspecto 41, en donde el agente agrícola biológico se selecciona de un biofertilizante microbiano, un biofertilizante no microbiano, un bioestimulante, un biopesticida y sus combinaciones.

Aspecto 43: La composición agrícola del Aspecto 41 o 42, en donde el agente agrícola biológico comprende un biofertilizante microbiano.

Aspecto 44: La composición agrícola del Aspecto 43, en donde el biofertilizante microbiano comprende un microbio que solubiliza nutrientes, en donde el microbio que solubiliza nutrientes solubiliza nutrientes seleccionados de fósforo, potasio, silicio, azufre y sus combinaciones.

- Aspecto 45: La composición agrícola del Aspecto 43, en donde el biofertilizante microbiano comprende un microbio depurador de micronutrientes, en donde el microbio depurador de micronutrientes depura micronutrientes seleccionados de hierro y molibdeno.
- 5 Aspecto 46: La composición agrícola del Aspecto 43, en donde el biofertilizante microbiano comprende un microbio secuestrador de carbono.
- Aspecto 47: La composición agrícola del Aspecto 43, en donde el biofertilizante microbiano comprende un microbio convertidor de nitrógeno.
- Aspecto 48: La composición agrícola del Aspecto 41 o 42, en donde el agente agrícola biológico comprende un bioestimulante.
- 10 Aspecto 49: La composición agrícola del Aspecto 48, en donde el bioestimulante comprende un agente promotor del crecimiento vegetal.
- Aspecto 50: La composición agrícola del Aspecto 48, en donde el bioestimulante comprende un agente de tolerancia al estrés abiótico.
- Aspecto 51: La composición agrícola del Aspecto 48, en donde el bioestimulante comprende un
15 agente que mejora el rendimiento.
- Aspecto 52: La composición agrícola del Aspecto 29 o 30, que comprende además un agente agrícola químico.
- Aspecto 53: La composición agrícola del Aspecto 52, en donde el agente agrícola químico comprende un pesticida sintético.
- 20 Aspecto 54: La composición agrícola del Aspecto 52, en donde el agente agrícola químico comprende un herbicida sintético.
- Aspecto 55: La composición agrícola de uno cualquiera de los Aspectos 29 a 54, en donde la composición agrícola se formula como un recubrimiento de semillas, una pulverización foliar, un empapado de suelo, un tratamiento por inmersión, un tratamiento en surcos, una enmienda de
25 suelo, gránulos o un tratamiento al voleo.
- Aspecto 56: Un método para impartir una o más características beneficiosas a una planta, el método comprende aplicar una cantidad efectiva en la agricultura del microbio aislado de uno cualquiera de los Aspectos 1 a 28, o la composición agrícola de uno cualquiera de los Aspectos 29 a 55, a una semilla, a la planta, o a los medios en los que se cultiva la planta.
- 30 Aspecto 57: El método del Aspecto 56, en donde la una o más características beneficiosas se seleccionan de mayor crecimiento, mayor biomasa, mayor rendimiento, mayor capacidad de fijación de nitrógeno, mayor eficiencia de utilización de nitrógeno, mayor tolerancia al estrés,

mayor tolerancia a la sequía, mayor contenido de clorofila, mayor velocidad fotosintética, solubilización de fosfato mejorada, salud vegetal mejorada y eficiencia de uso del agua mejorada.

Aspecto 58: El método del Aspecto 56 o 57, en donde la una o más características beneficiosas comprenden un mayor crecimiento.

- 5 Aspecto 59: El método del Aspecto 56 o 57, en donde la una o más características beneficiosas comprenden una mayor biomasa.

Aspecto 60: El método del Aspecto 56 o 57, en donde la una o más características beneficiosas comprenden mayor rendimiento.

- 10 Aspecto 61: El método del Aspecto 56 o 57, en donde la una o más características beneficiosas comprenden una mayor capacidad de fijación de nitrógeno.

Aspecto 62: El método del Aspecto 56 o 57, en donde la una o más características beneficiosas comprenden un mayor contenido de clorofila.

Aspecto 63: El método del Aspecto 56 o 57, en donde la una o más características beneficiosas comprenden una solubilización de fosfato mejorada.

- 15 Aspecto 64: El método del Aspecto 56 o 57, en donde la una o más características beneficiosas comprenden una salud vegetal mejorada.

- Aspecto 65: El método de uno cualquiera de los Aspectos 56 a 64, que comprende además aplicar uno o más agentes adicionales a una semilla, a la planta o a los medios en los que se cultiva la planta, en donde el uno o más agentes adicionales se seleccionan del grupo que consiste en: un
20 pesticida, un herbicida, un bactericida, un fungicida, un insecticida, un virucida, un mitocida, un nematocida, un acaricida, un regulador del crecimiento vegetal, un rodenticida, un agente antialgas, un agente de biocontrol, un fertilizante, un biopesticida y un bioestimulante.

Aspecto 66: El método del Aspecto 65, en donde el uno o más agentes adicionales comprenden uno o más fertilizantes.

- 25 Aspecto 67: El método del Aspecto 66, en donde el uno o más fertilizantes se seleccionan de un fertilizante basado en fósforo, un fertilizante basado en potasio, un fertilizante basado en fósforo y potasio, un fertilizante basado en nitrógeno, un fertilizante basado en nitrógeno, fósforo y potasio, y sus combinaciones.

- 30 Aspecto 68: El método del Aspecto 66 o 67, en donde el uno o más fertilizantes comprenden un fertilizante basado en fósforo.

Aspecto 69: El método del Aspecto 66 o 67, en donde el uno o más fertilizantes comprenden un fertilizante basado en potasio.

- Aspecto 70: El método del Aspecto 66 o 67, en donde el uno o más fertilizantes comprenden un fertilizante basado en fósforo y potasio.
- Aspecto 71: El método del Aspecto 66 o 67, en donde el uno o más fertilizantes comprenden un fertilizante basado en nitrógeno.
- 5 Aspecto 72: El método del Aspecto 66 o 67, en donde el uno o más fertilizantes comprenden un fertilizante basado en nitrógeno, fósforo y potasio.
- Aspecto 73: El método del Aspecto 66 o 67, en donde el uno o más fertilizantes comprenden un fertilizante granular.
- Aspecto 74: El método del Aspecto 66 o 67, en donde el uno o más fertilizantes comprenden un
10 fertilizante líquido.
- Aspecto 75: El método del Aspecto 65, en donde el uno o más agentes adicionales comprenden un agente agrícola biológico.
- Aspecto 76: El método del Aspecto 75, en donde el agente agrícola biológico comprende un biofertilizante microbiano.
- 15 Aspecto 77: El método del Aspecto 76, en donde el biofertilizante microbiano comprende un microbio que solubiliza nutrientes, en donde el microbio que solubiliza nutrientes solubiliza nutrientes seleccionados de fósforo, potasio, silicio, azufre y sus combinaciones.
- Aspecto 78: El método del Aspecto 76, en donde el biofertilizante microbiano comprende un microbio depurador de micronutrientes, en donde el microbio depurador de micronutrientes depura
20 micronutrientes seleccionados de hierro y molibdeno.
- Aspecto 79: El método del Aspecto 76, en donde el biofertilizante microbiano comprende un microbio secuestrador de carbono.
- Aspecto 80: El método del Aspecto 76, en donde el biofertilizante microbiano comprende un microbio convertidor de nitrógeno.
- 25 Aspecto 81: El método del Aspecto 75, en donde el agente agrícola biológico comprende un bioestimulante.
- Aspecto 82: El método del Aspecto 81, en donde el bioestimulante comprende un agente promotor del crecimiento vegetal.
- Aspecto 83: El método del Aspecto 81, en donde el bioestimulante comprende un agente de
30 tolerancia al estrés abiótico.
- Aspecto 84: El método del Aspecto 81, en donde el bioestimulante comprende un agente que mejora el rendimiento.

Aspecto 85: El método del Aspecto 65, en donde el uno o más agentes adicionales comprenden un agente agrícola químico.

Aspecto 86: El método del Aspecto 85, en donde el agente agrícola químico comprende un pesticida sintético.

- 5 Aspecto 87: El método del Aspecto 85, en donde el agente agrícola químico comprende un herbicida sintético.

Aspecto 88: El método de uno cualquiera de los Aspectos 65 a 79, en donde el uno o más agentes adicionales se aplican antes, simultáneamente con, o después de una aplicación del microbio aislado o la composición agrícola.

- 10 Aspecto 89: Un proceso para preparar un microbio aislado genéticamente modificado, el proceso comprende: modificar genéticamente un gen *glnR* endógeno que codifica GlnR, modificar genéticamente una secuencia de región reguladora 5' dentro de un gen *nif* endógeno, o una de sus combinaciones; y aislar el microbio, en donde: modificar genéticamente el gen *glnR* endógeno que codifica GlnR comprende editar el gen *glnR* endógeno para producir un gen mutante que codifica
15 una variante de proteína GlnR; modificar genéticamente la secuencia de región reguladora 5' dentro de un gen *nif* endógeno comprende reemplazar la secuencia de región reguladora 5' por una secuencia de ADN caracterizada por proporcionar una afinidad de unión mejorada a GlnR, en comparación con la secuencia de región reguladora 5'; el microbio se caracteriza por tener actividad de fijación de nitrógeno; y
20 modificar genéticamente el gen endógeno que codifica GlnR de la secuencia de región reguladora 5' proporciona una actividad de fijación de nitrógeno mejorada, en comparación con una cepa del microbio genéticamente no modificada.

- Si bien la invención se ha mostrado y descrito particularmente con referencia a una modalidad preferida y diversas modalidades alternantes, los expertos en la técnica entenderán que pueden
25 realizarse diversos cambios en la forma y los detalles sin apartarse del espíritu y el alcance de la invención. Diversas alteraciones, modificaciones y mejoras de la presente descripción, que fácilmente se les ocurrirán a los expertos en la técnica, que incluyen determinadas alteraciones, modificaciones, sustituciones y mejoras, también forman parte de esta descripción. Por ejemplo, mientras que los ejemplos particulares más abajo pueden ilustrar los métodos y modalidades
30 descritos en la presente descripción mediante el uso de una planta específica, los principios de estos ejemplos pueden aplicarse a cualquier planta. Por lo tanto, se apreciará que el alcance de esta

invención está abarcado por las modalidades enumeradas en la presente descripción en lugar de únicamente por los ejemplos específicos que se ejemplifican más abajo.

Todas las patentes y publicaciones citadas a las que se hace referencia en esta solicitud se incorporan en la presente descripción por referencia en su totalidad, para todos los fines, en la misma medida que si cada una se incorporara individual y específicamente por referencia.

EJEMPLOS

Los métodos y composiciones presentados en la presente descripción – basados en la utilización de los microbios, comunidades, consorcios y/o composiciones aislados descritos que comprenden y/o son producidos por microbios o consorcios o comunidades – mejoran una o más características de las plantas, por ejemplo, fijación de nitrógeno en cultivos agrícolas.

La abreviatura “ul” significa “microlitros”, “ug” significa “microgramos”.

Ejemplo 1: Cultivo de microbios, secuenciación y selección de dianas

Las cepas de *Paenibacillus* 8619, 17899, 17911, 53953, 54805, 55083, 55136, 55146, 55470, 68890, 70995, 77155, 77357 y 77359, y las cepas genéticamente modificadas de las anteriores, se cultivaron en medios de cultivo para obtener un crecimiento celular suficiente.

Después, una submuestra de cada una de las cepas se transfirió asépticamente a medios de cultivo sin nitrógeno y se incubó en condiciones microaerófilas durante 72 horas.

Los aislados de interés se cultivaron hasta la fase de logaritmo medio en medios R2A. El ADN se extrajo con el estuche de extracción de ADN Qiagen Powersoil y las bibliotecas de secuenciación se construyeron con el estuche iGenomix RipTide según las instrucciones del fabricante. La secuenciación se realizó en un Illumina HiSeq con PE150. Las lecturas de Illumina sin procesar se recortaron a Q15 con Trimmomatic v38 (Bolger AM, Lohse M, y Usadel B. (2014). Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina Sequence Data. Bioinformatics, btu170) y ensamblado con SPAdes (Prjibelski A, Antipov D, Meleshko D, Lapidus A, y Korobeynikov A. (2020) Using SPAdes de novo assembler. Curr. Protoc. Bioinform. 70, e102) mediante el uso de los parámetros predeterminados. Los cóntigos ensamblados se analizaron con BinSanity 0.5.4. (Graham ED, Heidelberg JF, y Tully BJ. (2017) BinSanity: unsupervised clustering of environmental microbial assemblies using coverage and affinity propagation. PeerJ 5:e3035) para la pureza con un valor de corte de contaminación < 5 %. El compartimiento más grande se extrajo y anotó con Prokka 1.8 (Seemann T. (2014) Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. Bioinformatics 30(14):2068-9). Las secuencias del ADNr 16S se identificaron mediante Prokka 1.8 y las secuencias se extrajeron

directamente del archivo .ffn. La taxonomía fue asignada por GTDB-tk utilizando parámetros predeterminados con la base de datos de abril de 2021 (Pierre-Alain Chaumeil, Aaron J Mussig, Philip Hugenholtz, Donovan H Parks, GTDB-Tk: un kit de herramientas para clasificar genomas con Genome Taxonomy Database, Bioinformatics, Volumen 36, Edición 6, 15 de marzo de 2020, 5 Páginas 1925-1927).

Una selección de las cepas de *Paenibacillus* se caracterizó como subgrupo I o subgrupo II, de acuerdo con el método de Xie y otros, (2014) (Comparative Genomic Analysis of N₂-Fixing and Non-N₂-Fixing *Paenibacillus* spp.: Organization, Evolution and Expression of the Nitrogen Fixation Genes. 10(3)). Aunque el conglomerado de genes nif compuesto por nifB, nifH, nifD, 10 nifK, nifE, nifN, nifX, hesA y nifV está muy conservado entre las 15 cepas de *Paenibacillus* fijadoras de N₂, hay algunas variaciones en las secuencias de ADN de los conglomerados de nif, que pueden dividirse en dos subgrupos: el subgrupo I y el subgrupo II. Los 9 genes nifBHDKENXhesAnifV del grupo de genes nif dentro del subgrupo I son contiguos, mientras que hay un ORF de 261–561 pb, cuyo producto previsto es desconocido, entre nifX y hesA dentro del 15 subgrupo II. Las especies de *Paenibacillus* *P. polymyxa* y *P. tritici* son ejemplos del subgrupo I. *Paenibacillus* species *P. albidus*, *P. anaericanus*, *P. azotifigens*, *P. borealis*, *P. donghaensis*, *P. ehimensis*, *P. graminis*, *P. jilunlii*, *P. odorifer*, *P. panacisoli*, *P. phoenicis*, *P. pocheonensis*, *P. rhizoplanae*, *P. silage*, *P. taohuashanense*, *P. thermophilus*, *P. typhae*, y *P. wynnii* son ejemplo del subgrupo II.

20 Las dianas de edición de varios polinucleótidos en el genoma de *Paenibacillus* se seleccionaron para aumentar la fijación de nitrógeno en ausencia de nitrógeno aplicado exógenamente, en presencia de adición mínima de nitrógeno (por ejemplo, amonio) y en presencia de nitrógeno añadido. Se desarrollaron varios enfoques, que incluyeron desactivar la regulación negativa del operón *nif* en presencia de nitrógeno ambiental, así como también fomentar la transcripción 25 durante todas las condiciones.

NifH

El complejo enzimático de nitrogenasa consta de las siguientes dos proteínas conservadas: la proteína MoFe, compuesta por subunidades codificadas por los genes *nifD* y *nifK*; y la proteína Fe, codificada por el gen *nifH*. El gen de la proteína del hierro nitrogenasa, *nifH*, es uno de los genes 30 funcionales más antiguos existentes en la historia de la evolución génica. Las secuencias de nucleótidos para las regiones codificantes de los genes nifHDK entre todos los organismos de fijación de nitrógeno están altamente conservadas. Sin embargo, la cantidad de copias y la

disposición de *nifH*, *nifD* y *nifK* son diferentes entre las diferentes bacterias diazotróficas. Debido a la naturaleza esencial de NifH, se crearon inactivaciones para probar la funcionalidad, mediante la eliminación de toda la región codificante (ATG hasta el codón de terminación) mediante recombinación homóloga. La edición resultante unió el cromosoma menos la secuencia eliminada y sin nucleótidos insertados.

GlnR

En las bacterias *Paenibacillus*, el operón *nif* controla las vías de fijación de nitrógeno a través de GlnR; La transcripción génica de operón *nif* está regulada por amonio y oxígeno. Se crearon inactivaciones (eliminación de ATG de toda la región codificante a M156, lo que deja el codón de terminación en la secuencia resultante, por recombinación homóloga) y truncamientos de C25 (ADN de extracción que codifica los últimos 25 aminoácidos de *glnR*) de GlnR para evaluar el impacto en la fijación de nitrógeno.

Sitios I y II de unión a GlnR

La unión de GlnR al sitio I activa la expresión de Nif, mientras que la unión de GlnR al sitio II reprime la expresión de Nif. Además, GlnR tiene una mayor afinidad para unirse al Sitio II. Se exploraron varios enfoques para aumentar la expresión del operón *nif* para aumentar la fijación de nitrógeno: inactivación del sitio I (reemplazo de los últimos seis ácidos nucleicos de la secuencia del sitio I de unión a GlnR natural), eliminación del sitio II, inactivación del sitio II (reemplazo de los últimos seis ácidos nucleicos de la secuencia del sitio II de unión a GlnR natural), duplicación de la secuencia del sitio II e inserción en el sitio I (por ejemplo, que reemplaza el sitio I), y combinaciones de ediciones que comprendían cualquiera de uno o más de los anteriores.

CueR

Este gen se identificó erróneamente como GlnR en 8619 y sorprendentemente produjo un aumento prometedor de la actividad. La identificación errónea se debió a la ausencia del ORF de GlnR en la secuencia original del genoma según Illumina para 8619 usada para diseñar el casete de edición. De manera estructuralmente similar a GlnR, CueR se eligió como la coincidencia más cercana a la secuencia proteica de GlnR. Al igual que GlnR, es un regulador transcripcional de tipo HTH. También se ubica inmediatamente aguas arriba del gen de *nrgA* (transportador de amonio), que comparte el mismo transportador bidireccional. Es posible que sea un regulador transcripcional nuevo.

En muchas especies bacterianas, CueR generalmente se reconoce como el regulador del sistema de eflujo de cobre Cue, activando la expresión génica en respuesta a altos niveles de cobre

intracelular. En nuestra *Paenibacillus polymyxa*, el CueR ORF comparte un promotor bidireccional con el transportador de amonio NrgA. CueR es un regulador transcripcional de tipo HTH como GlnR, y su proximidad a NrgA en *Paenibacillus polymyxa* también indica que puede desempeñar un papel en la transcripción del transportador de amonio. Si este es el caso, la eliminación de CueR desregula la expresión de NrgA en relación con los niveles de nitrógeno, lo que reduce el transporte de amonio a la célula. La disminución de los niveles de amonio en la célula induce a la célula a utilizar nitrógeno atmosférico a través de la expresión de la nitrogenasa.

El locus CM8619_híbrido_04839 se extrajo del ensamblaje CM8619_híbrido_CE y se analizó para determinar la identidad del gen regulador HTH de la familia MerR. Todos los genes reguladores HTH de la familia MerR ortólogos de la cepa Y412MC10 de *Paenibacillus* sp. se extrajeron de la base de datos de ortología KEGG (KO). Se construyó una base de datos BLAST con los genes MerR ortólogos y se realizó una búsqueda bidireccional en BLAST con blastp para el gen de MerR putativo, glnRnt. El mayor acierto fue un acierto de 62 % de identidad con CueR. El ensamblaje Y412MC10 de *Paenibacillus* sp. se extrajo del NCBI y el panorama génico de la región de CueR coincidió con el del CM8619 con *nrgA* inmediatamente aguas arriba y una metaloproteasa de zinc aguas abajo.

Ejemplo 2: Edición de cepas de *Paenibacillus*

Las ediciones de los microbios *Paenibacillus* para producir cepas genéticamente modificadas que imparten características mejoradas a las plantas con las que se asocian pueden lograrse mediante inserción de nucleótidos, delección de nucleótidos, reemplazo de nucleótidos, y/o cualquier combinación o pluralidad de lo anterior. El efecto neto puede ser uno de regulación ascendente, regulación descendente, inactivación (del polinucleótido diana y/o la función de su ARN o proteína codificada), y/o cualquier combinación o pluralidad de lo anterior. En la presente descripción se contemplan específicamente dianas genómicas en *Paenibacillus* que incluyen *cueR*, sitio I de unión a GlnR aguas arriba del operón *nif*, sitio II de unión a GlnR aguas arriba del operón *nif*, Orf1 y *glnR*.

Debido a los desafíos conocidos de trabajar con bacterias grampositivas tales como *Paenibacillus*, en comparación con bacterias gramnegativas más manejables tales como *Klebsiella*, las ediciones exitosas y las asociaciones exitosas con plantas que imparten beneficios mejorados a las plantas son sorprendentes e inesperadas.

El vector de edición génica de grampositivas pMiniMad2 se obtuvo del Centro de reserva genética de bacilos, y se modificó mediante la inserción del origen de transferencia TraJ, originalmente del

vector pKVM4, entre los sitios de restricción de Sall y BamHI, lo que produce el vector de edición génica de grampositivas movilizable pMMmob.

Ensamblaje de vectores de edición

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se ejecutó mediante el uso de los cebadores apropiados con polimerasa Q5 de alta fidelidad para amplificar los brazos de homología aguas arriba y aguas abajo con los salientes de ensamblaje de Gibson apropiados a partir del ADN genómico purificado de la cepa diana. Los productos de PCR se analizaron en un gel de agarosa para confirmar el tamaño apropiado. Las bandas se escindieron y se purificaron a partir del gel.

El vector de cadena principal pMMmob se digirió con las enzimas de restricción EcoRI y BamHI durante al menos 30 minutos a 37 C en tampón Cutsmart. La digestión se analizó en un gel de agarosa para confirmar el tamaño apropiado. La cadena principal digerida se purificó a partir del gel.

El ensamblaje de Gibson se realizó mediante la combinación de aproximadamente 100 ng de pMMmob digerido con los fragmentos de inserto en una relación molar 1:3:3 de cadena principal: inserto: inserto en un volumen de 10 ul, después se añadieron 10 ul de reactivo de Gibson 2x. La reacción se incubó a 50 C durante 60 minutos después se usó para la transformación en E. coli DH5 α .

Se añadieron 1-5 ul de la mezcla de ensamblaje de Gibson a 50 ul de células E. coli DH5 α químicamente competentes recién descongeladas y se agitó por vórtice con el dedo. La mezcla de células y plásmidos se incubó en hielo durante 30 minutos, se sometió a choque térmico a 42 C durante 30 segundos, después se volvió a colocar en hielo durante unos 5 minutos adicionales. Se añadió 1 ml de medio de SOC (catabolismo superóptimo), y las células se incubaron a 37 C con agitación a 200 RPM durante 60-90 minutos para la recuperación. Las diluciones del cultivo de recuperación se sembraron en placas de agar LB complementadas con 100 ng/ul de ampicilina y se incubaron durante toda la noche a 37 C.

La región del plásmido que comprende los insertos ensamblados se amplificó mediante PCR de colonias mediante el uso de polimerasa GoTaq a partir de varias colonias recuperadas, y los productos de PCR se analizaron en un gel de agarosa para confirmar el producto de tamaño esperado. Los productos de PCR del tamaño apropiado se enviaron a secuenciación de Sanger para confirmar el ensamblaje correcto y la ausencia de mutaciones inespecíficas en el casete de edición. Las colonias que albergan el plásmido correcto confirmadas se inocularon en caldo LB complementado con 100 ng/ul de ampicilina y se cultivaron durante toda la noche a 37 C y

agitación a 200 RPM. El plásmido se purificó a partir del cultivo de toda la noche y se transformó en la cepa donante de conjugación *E. coli* BW29472 mediante electroporación.

Se combinó 1 μ l del plásmido purificado con 50 μ l de células electrocompetentes *E. coli* BW29472 recién descongeladas y se incubaron durante 5 minutos en hielo. La mezcla de células y plásmido se transfirió a una cubeta de electroporación de 1 mm preenfriada en hielo. Mediante el uso de un electroporador, se aplicó una carga de 1,800 V, 25 μ F, 200 Ω a la cubeta, y la muestra se resuspendió inmediatamente en 1 ml de medio de SOC complementado con ácido 2,6-diaminopimélico (DAP) 0.3 mM. Las células resuspendidas se incubaron a 37 C con agitación a 200 RPM durante 60-90 minutos para la recuperación. Las diluciones del cultivo de recuperación se sembraron en placas de agar LB complementadas con 100 ng/ μ l de ampicilina y ácido 2,6-diaminopimélico 0.3 mM y se incubaron durante toda la noche a 37 C. Los transformantes recuperados se usaron como cepas donantes para la conjugación.

Conjugación

Las cepas receptoras se inocularon en 5 ml de medio de caldo de soya tríptico (TSB) en tubos cónicos de 50 ml y se cultivaron durante toda la noche a 30 C y agitación a 200 RPM. El donante *E. coli* BW29427 que albergaba el plásmido a movilizar se inoculó en 5 ml de medio LB complementado con 100 μ g/ μ l de ampicilina y ácido 2,6-diaminopimélico (DAP) 0.3 mM y se cultivó durante toda la noche a 37 C y agitación a 200 RPM.

Se centrifugaron alícuotas de 1 ml de los cultivos de donante y receptor de toda la noche, se lavaron en agua estéril, se combinaron y se aplicaron por puntos sobre la superficie de placas de agar LB complementadas con DAP 0.3 mM para el apareamiento conjugativo. Las placas de apareamiento se incubaron durante toda la noche a 25 C, la temperatura permisiva para la replicación de pM⁺mob en cepas receptoras grampositivas.

Las mezclas de apareamiento se resuspendieron mediante la adición de 1 ml de agua estéril encima del punto y agitación con un esparcidor en L estéril. Las resuspensiones se recolectaron en tubos de microcentrífuga, se lavaron y se resuspendieron en 100 μ l de agua estéril. Las células concentradas se esparcieron sobre placas de TSA complementadas con MLS (25 μ g/ml de lincomicina, 1 μ g/ml de eritromicina) sin adición de DAP y se incubaron durante 48-72 horas a 25 C hasta la aparición de colonias transconjugantes.

Integración del plásmido

Los transconjugantes recuperados se inocularon en 5 ml de medio TSB complementado con MLS y se cultivaron durante 48 horas a 25 C con agitación a 200 RMP, o hasta la turbidez. Las

diluciones del cultivo se sembraron en placas de TSA + MLS y se incubaron durante la noche a 37 C, la temperatura restrictiva para la replicación del plásmido, hasta la aparición de colonias integradas.

Escisión del plásmido

- 5 Las colonias integradas se inocularon en 5 ml de medio TSB complementado con MLS y se incubaron durante la noche a 37 C con agitación a 200 RPM. Se diluyeron 5 ul del cultivo de toda la noche en 5 ml de medio TSB fresco sin antibióticos y se cultivó durante toda la noche a 25 C, agitación a 200 RPM. Se repitió dos veces el subcultivo del cultivo de 5 ul durante toda la noche en 5 ml de TSB nuevo qt25C, agitación a 200 RPM, para un total de tres rondas de subcultivo. Las
- 10 diluciones del cultivo de la ronda tres de toda la noche se sembraron en placas de R2A sin antibióticos y se incubaron a 30 C durante toda la noche.

- La escisión del plásmido se confirmó mediante la selección de colonias individuales de la placa de R2A y su resiembra en un formato de rejilla en placas de agar con y sin MLS. Ambas placas se incubaron a 30 C durante 24-48 horas, hasta la aparición de las colonias. Se confirmó que el
- 15 plásmido se ha escindido y perdido en las colonias que crecieron cuando se sembraron en la placa sin MLS, pero no en la placa que contiene MLS.

Confirmación de la edición

- La región de edición se amplificó a partir de cepas editadas putativas mediante PCR de colonias, y la presencia de la edición correcta se confirmó por el tamaño de la banda cuando se analizó en un
- 20 gel de agarosa (cuando fue posible) y/o por secuenciación de Sanger. La ausencia de la cadena principal del plásmido se confirmó mediante ensayo de PCR del casete de resistencia de MLS. Se confirmó que las colonias que producían una banda del casete de MLS no eran las ediciones correctas.

- Los resultados de secuencia se analizaron para diferenciar las colonias en las que se había
- 25 escindido a tipo silvestre de las colonias correctamente editadas, y las secuencias se comprobaron para detectar mutaciones inespecíficas.

- Las colonias que se secuenciaron como ediciones correctas sin mutaciones inespecíficas recibieron una designación de cepa modificada, se añadieron a la biblioteca de cepas modificadas y se pusieron a disposición del equipo del proyecto para el análisis del bioensayo.

- 30 Las siguientes ediciones se suministraron a una o más cepas originales y se pusieron a disposición para evaluaciones in vitro y en planta.

Inactivación del sitio II de unión a GlnR

Este reemplazo de los nucleótidos donde GlnR se une durante la represión de la expresión de Nif con nucleótidos que no se unen a GlnR conduce a un aumento en la actividad de la nitrogenasa. Esta edición evita la represión de la vía de *nif* en respuesta a los niveles excesivos de nitrógeno y es análoga a la eliminación de un interruptor de apagado.

- 5 La secuencia “ATCGAT” se insertó entre la secuencia genómica natural aproximadamente 1,000 pares de bases aguas arriba de y que incluye del séptimo al nucleótido final del sitio II de unión a GlnR, y la secuencia genómica natural aproximadamente 1,000 pares de bases aguas abajo de y sin incluir el par de bases final del sitio II de unión a GlnR.

Duplicación del sitio II de unión a GlnR

- 10 Este reemplazo de la secuencia del sitio I natural con la secuencia del sitio II natural pretende aumentar la expresión de *nif* al aumentar la afinidad de unión de la GlnR a la secuencia de activación. En todas las condiciones, GlnR tiene una mayor afinidad de unión a la secuencia del sitio II. Dado que la actividad de activación frente a la de represión de GlnR parece depender de la ubicación de la unión, tener una mayor afinidad de unión por la ubicación responsable de la
- 15 activación dio como resultado una mayor expresión de *nif*.

- El casete de edición se construyó mediante la inserción de la secuencia del sitio II de unión a GlnR natural que se insertó entre la secuencia genómica natural aproximadamente 1,000 pares de bases aguas arriba de y sin incluir el primer nucleótido del sitio I de unión a GlnR, y la secuencia genómica natural aproximadamente 1,000 pares de bases aguas abajo de y sin incluir el par de
- 20 bases final del sitio I de unión a GlnR.

Inactivación de GlnR

- Se esperaba que esta edición diera como resultado un nivel basal de expresión de *nif* en condiciones de limitación o exceso. Comenzamos a observar actividad inesperada en una cepa con esta edición, pero más tarde se determinó que esta cepa se modificó incorrectamente y, de hecho,
- 25 era una CueR KO. Si se observa actividad en una cepa con inactivación de GlnR correcta, puede ser por el siguiente motivo.

- GlnR es el principal regulador conocido de la expresión de *nif* en *Paenibacillus*, y su interacción con la glutamina sintasa es la forma en que la célula regula la expresión de Nif en base al nivel de nitrógeno en el ambiente. Al eliminar este regulador, la expresión de Nif deja de regularse con
- 30 relación al nivel de nitrógeno ambiental y, en su lugar, puede verse impulsada por factores de transcripción desconocidos no regulados por el nivel de nitrógeno. Esto puede dar como resultado un aumento en la expresión de *nif*, particularmente en condiciones de exceso de nitrógeno.

El casete de edición se construyó mediante la inserción de la secuencia genómica natural aproximadamente 700 pares de bases aguas arriba de y sin incluir el codón de inicio del marco de lectura abierto de *glnR* que se ensambló con la secuencia genómica natural 700 pares de bases aguas abajo de y que incluye el codón de terminación del marco de lectura abierto de *glnR*

5 Truncamiento de C25 en GlnR

La región C25 en hélice alfa si GlnR se repliega en el sitio de dimerización, lo que hace que GlnR exista principalmente como monómeros en la célula. No es hasta que la glutamina sintasa inhibida por retroalimentación (FBI-GS) interactúa con los monómeros de GlnR en condiciones de exceso de nitrógeno, que la región C-terminal se despliega para fomentar la dimerización. Los dímeros de GlnR son capaces entonces de unirse fuertemente al sitio II de unión para la represión fuerte de la expresión de *nif*. Al eliminar los 25 aminoácidos C-terminales, se interrumpe esta interacción reguladora, lo que evita que la dimerización y unión de GlnR se controlen por los niveles de nitrógeno. Esto permitiría una mayor expresión de *nif* en condiciones de exceso de nitrógeno.

El casete de edición se construyó mediante la inserción de la secuencia genómica natural aproximadamente 500-1,300 (en dependencia de la cepa) pares de bases aguas arriba de y sin incluir el codón a veinticinco posiciones desde el extremo C-terminal del marco de lectura abierto de *glnR* que se ensambló con la secuencia genómica natural 500-900 (en dependencia de la cepa) pares de bases aguas abajo de y que incluye el codón de terminación del marco de lectura abierto de *glnR*.

20 Inactivación de CueR

El casete de edición se construyó mediante la inserción de la secuencia genómica natural aproximadamente 1,000 pares de bases aguas arriba de y sin incluir el codón de inicio del marco de lectura abierto de *cueR* que se ensambló con la secuencia genómica natural 1,000 pares de bases aguas abajo de y que incluye el codón de terminación del marco de lectura abierto de *cueR*.

25 Truncamiento de C25 en CueR

El casete de edición se construyó mediante la inserción de la secuencia genómica natural aproximadamente 1,000 pares de bases aguas arriba de y sin incluir el codón a veinticinco posiciones desde el extremo C-terminal del marco de lectura abierto de *cueR* que se ensambló con la secuencia genómica natural 1,000 pares de bases aguas abajo de y que incluye el codón de terminación del marco de lectura abierto de *cueR*.

30 Inactivación de Orf1

Se espera que esto demuestre una disminución de la actividad de *nif* debido a una disminución de la tolerancia al oxígeno. Sospechamos que esta edición nos demostrará el posible valor de insertar este gen en cepas que carecen de él. Sin embargo, en el caso que esta edición muestre aumentos en la expresión de *nif*, puede ser por el siguiente motivo.

- 5 Orf1 es un marco de lectura abierto que se encuentra en el conglomerado de *nif* de algunas cepas de *Paenibacillus* (denominadas subcategoría II), pero no en otras (denominadas subcategoría I). Se prevé que funcionará en presencia de altos niveles de oxígeno. Su ausencia en muchas cepas de alto rendimiento puede indicar que es superfluo y, en la mayoría de los casos, la asimilación de nitrógeno es más eficiente con su ausencia. Esto puede ser a través de la eliminación de la carga metabólica de la expresión de este ORF, o a través de actividades redundantes del producto de expresión en sí.

El casete de edición se construyó mediante la inserción de la secuencia genómica natural aproximadamente 1,000 pares de bases aguas arriba de y que incluye el codón de terminación del marco de lectura abierto de *nifX* que se ensambló con la secuencia genómica natural 1,000 pares de bases aguas abajo de y sin incluir el codón de terminación del marco de lectura abierto de Orf1.

Inactivación y duplicación del sitio II de unión a GlnR

Se espera que estas ediciones funcionen en conjunto sinérgicamente al evitar que los dímeros de GlnR se unan al “interruptor de apagado” del sitio II y al mejorar el “interruptor de encendido” mediante el aumento de su eficiencia de unión. Estas ediciones en conjunto garantizan que GlnR solo pueda actuar como una influencia positiva fuerte de la transcripción génica del operón *nif*.

El casete de edición se construyó mediante la inserción de la secuencia del sitio II de unión a GlnR natural entre la secuencia genómica de una cepa previamente editada con una inactivación del sitio II de unión a GlnR aproximadamente 1,000 pares de bases aguas arriba de y sin incluir el primer nucleótido del sitio I de unión a GlnR, y la secuencia genómica de una cepa previamente editada con una inactivación del sitio II de unión a GlnR aproximadamente 1,000 pares de base aguas abajo de y sin incluir el par de bases final del sitio I de unión a GlnR.

Inactivación del sitio II de unión a GlnR, truncamiento de C25 en CueR

Estas ediciones adoptan diferentes enfoques para prevenir la regulación negativa de la expresión de *nif*, a través de la prevención de la represión transcripcional mediante la unión de *glnR* al sitio II, y potencialmente mediante la regulación negativa de la expresión de NrgA, y por lo tanto, la prevención de la acumulación de amonio para desencadenar la regulación negativa.

Inactivación del sitio II de unión a GlnR, truncamiento de C25 en GlnR

Estas dos ediciones funcionan sinérgicamente para aumentar la formación de dímeros de GlnR mediante la eliminación de la región autoinhibidora de los monómeros de GlnR, y para evitar que estos dímeros se unan fuertemente al sitio II. Los dímeros más abundantes solo se podrán unir al sitio I, lo que provocaría una mayor expresión de *nif* en todas las condiciones.

5 Duplicación del sitio II de unión a GlnR, truncamiento de C25 en GlnR

Estas dos ediciones funcionan sinérgicamente para aumentar la formación de dímeros de GlnR mediante la eliminación de la región autoinhibidora de los monómeros de GlnR y el aumento de la afinidad de unión de estos dímeros al sitio de activación. Los dímeros más abundantes tendrán una mayor afinidad de unión al sitio de activación, lo que provocaría una mayor expresión de *nif* en condiciones de nitrógeno al menos limitadas.

10 Inactivación de Orf1, truncamiento de C25 en GlnR

Estas ediciones adoptan diferentes enfoques para mejorar la fijación de nitrógeno. La inactivación de orf1 puede eliminar una enzima redundante del proceso, lo que aumenta la eficiencia, mientras que el truncamiento de C25 aumenta la capacidad de los dímeros de GlnR disponibles mientras se desvinculan sus niveles de dimerización de los niveles de nitrógeno intracelular.

15 Inactivación del sitio II de unión a GlnR, inactivación de CueR

Estas ediciones adoptan diferentes enfoques para prevenir la regulación negativa de la expresión de *nif*, a través de la prevención de la represión transcripcional mediante la unión de *glnR* al sitio II, y potencialmente mediante la regulación negativa de la expresión de NrgA, y por lo tanto, la prevención de la acumulación de amonio para desencadenar la regulación negativa.

20 Duplicación del sitio II de unión a GlnR, inactivación de CueR

Estas ediciones adoptan diferentes enfoques para prevenir la regulación negativa de la expresión de *nif*, mediante el aumento de la afinidad de unión de los dímeros de GlnR al sitio de activación, y potencialmente mediante la regulación negativa de la expresión de NrgA, y por lo tanto, la prevención de la acumulación de amonio para desencadenar la regulación negativa.

25 Ejemplo 3: Clonación

Los vectores de clonación se ensamblaron mediante la introducción de un casete de edición (descrito anteriormente) en la estructura principal de pMMmob. pMMmob [oriBsTs traJ *ecol1* mls amp] es un derivado del plásmido pMiniMAD2 obtenido del centro de reserva genética de *Bacillus*. pMMmob se digiere con las enzimas de restricción BamH1 y EcoR1, se ejecuta en un gel de agarosa al 10 % y se purifica.

Las regiones de homología aguas arriba y aguas abajo se amplificaron a partir de extractos de ADN genómico mediante PCR mediante el uso de polimerasa de corrección de lectura, y cebadores diseñados para anexar secuencias flanqueantes para el ensamblaje de Gibson subsecuente. Para los constructos en los que se añadió una secuencia entre los brazos de homología
5 flanqueantes, la introducción de la secuencia se logró mediante la inclusión en las secuencias flanqueantes de los cebadores. Los productos de PCR se analizaron en un gel de agarosa al 10 % y se purificaron.

Las cadenas principales y los insertos se combinaron a una relación molar 1:3 de cadena principal a inserto, se combinaron con el reactivo de ensamblaje de Gibson, y se incubaron a 50 C durante
10 60 minutos para el ensamblaje del plásmido. Las mezclas de ensamblaje Gibson se transformaron posteriormente en DH5α *E. coli* químicamente competente. Los transformadores se recuperaron en placas de ampicilina LB+ 100 ug/ul.

El ensamblaje correcto de los plásmidos se confirmó mediante análisis de digestión de restricción y PCR de la región de inserto. El casete de edición se secuenció mediante secuenciación de Sanger
15 para confirmar la ausencia de mutaciones inespecíficas.

Los plásmidos confirmados se extrajeron de cultivos de DH5α durante toda la noche y se transformaron en BW29472 *E. coli* electrocompetente mediante electroporación y se recuperaron en placas de ampicilina LB+ 100 ug/uL + 300 uM de ácido diaminopimélico para conjugarlos en las cepas huésped.

20 Ejemplo 4: Edición génica en *Paenibacillus spp.*

Recombinación homóloga sin cicatrices

Este es un protocolo general para la edición génica en *Paenibacillus* mediante el uso de un plásmido de recombinación homóloga sin cicatrices sensible a la temperatura y se usó para las ediciones descritas en la presente descripción. Este protocolo se desarrolló para editar CM8619 y
25 puede aplicarse de manera generalizada a otros aislados de *Paenibacillus* con modificación. Este protocolo requiere el ensamblaje previo de uno o más vectores de edición diseñados para las ediciones deseadas usando la estructura principal de pMMob alojada en una cepa de donante de *E. coli* y una o más cepas receptoras de *Paenibacillus* con susceptibilidad confirmada al marcador de resistencia a antibióticos relevante.

30 Conjugación

Las cepas receptoras deseadas se cultivaron durante toda la noche en un medio de cultivo apropiado. Las cepas donantes se cultivaron durante toda la noche en un medio de cultivo

apropiado complementado con el marcador antibiótico relevante para el mantenimiento del plásmido movilizable. Las alícuotas del cultivo de toda la noche se lavaron, se combinaron y se sembraron en placas en un medio de agar apropiado para el cultivo de ambas cepas. Estas placas se incubaron durante toda la noche a la temperatura permisiva para la replicación del plásmido en la
5 cepa receptora.

Las mezclas de apareamiento se recuperaron, se lavaron y se volvieron a sembrar en placas de agar complementadas con el marcador antibiótico apropiado para la selección de cepas receptoras transconjugantes. Las placas se incubaron durante toda la noche a la temperatura permisiva para la replicación del plásmido hasta la aparición de colonias transconjugantes.

10 Integración

Las colonias transconjugantes se cultivaron en cultivo líquido en presencia del marcador selectivo a la temperatura permisiva para la replicación del plásmido durante toda la noche. Las diluciones del cultivo líquido se sembraron en placas de agar complementadas con el antibiótico selectivo y se incubaron durante toda la noche a la temperatura restrictiva para la replicación del plásmido. Se
15 asumió que las colonias recuperadas en estas condiciones han integrado el plásmido de edición mediante recombinación homóloga.

Escisión

Las colonias integradas se inocularon en un cultivo líquido, se cultivaron hasta alcanzar la turbidez a la temperatura permisiva para la replicación del plásmido, luego se subcultivaron en medio nuevo
20 sin el antibiótico y se cultivaron nuevamente durante toda la noche a temperatura permisiva. Este subcultivo en serie se repitió 2-3 veces más, y las diluciones del subcultivo final se sembraron en placas de agar sin el antibiótico.

Las colonias recuperadas se ensayaron para determinar la pérdida del plásmido mediante la resiembra en un medio que contiene el antibiótico y sin este. Se confirmó que las colonias que
25 crecieron en ausencia del antibiótico, pero no en presencia del antibiótico, han escindido y perdido el plásmido, y se identificaron como cepas editadas putativas.

Confirmación

Las cepas editadas putativas se analizaron para determinar si la edición se suministró con éxito o si la cepa se revirtió a tipo silvestre, al amplificar la región de edición mediante la reacción en cadena
30 de la polimerasa (PCR). Los productos de PCR se analizaron mediante electroforesis en gel y secuenciación de Sanger para confirmar el tamaño y la secuencia del producto apropiados para la edición. Las colonias que tienen la edición suministrada con éxito confirmadas se comprobaron

mediante secuenciación de Sanger para confirmar que no se añadieron mutaciones inespecíficas a la región de edición, y por ausencia de crecimiento en medio que contiene el antibiótico para confirmar que no hay presencia de la cadena principal del plásmido.

A las cepas que pasaron todas las etapas de confirmación se les asignó una designación de cepa modificada, se añadieron a la biblioteca de aislamientos modificados y se proporcionaron al equipo de bioensayo para las pruebas.

Otros métodos

Alternativamente, puede emplearse cualquier otro método conocido en la técnica para efectuar una o más de las ediciones de polinucleótidos descritas en la presente descripción, por ejemplo, de modo no taxativo: direccionamiento y/o asentamiento de nucleasas, endonucleasas de restricción, nucleasas de dedos de zinc, meganucleasas, endonucleasas de Cas, nucleasas efectoras de TAL, nucleasas guiadas, mutaciones en sitios aleatorios, edición a ciegas, mutagénesis química, o mutagénesis de radiación. Generalmente, se crea una rotura bicatenaria en el sitio diana o cerca de este que se editará, que se repara mediante procesos intracelulares tales como unión de extremo no homólogo, recombinación homóloga, o reparación dirigida por homología. El efecto neto puede ser uno o más de los siguientes: inserción de al menos un nucleótido, delección de al menos un nucleótido, reemplazo de al menos un nucleótido, alteración química de al menos un nucleótido. A los fines de las ediciones de las cepas de *Paenibacillus* descritas en la presente descripción, cualquier técnica que desee el médico puede usarse para lograr el resultado final.

Ejemplo 5: Identificación y almacenamiento de microbios

La preparación de la secuenciación para la identificación de microbios y el almacenamiento a largo plazo, se realizó mediante el siguiente método:

Día 1:

Use una punta estéril de 10 ul para transferir una colonia de una placa a un matraz que contenga un medio de cultivo líquido apropiado. Coloque los aislamientos en un agitador a temperatura ambiente e incube durante 2 días.

Día 3:

Los tubos pueden estar turbios después de estar en el agitador durante 2 días. Todas las muestras son analizadas por PCR. Aplique vórtex a cada tubo, recoja una muestra de 50 ul de cada tubo agitado y dispense en una placa de 96 pocillos. Mediante el uso de una pipeta multicanal, dispense 15 ul de las muestras de 50 ul en una nueva placa de 96 pocillos. La placa de 96 pocillos que contiene 35 ul de cada muestra se usará para el fenotipado y la placa de 96 pocillos que contiene

15 ul de cada muestra se usará para el análisis de PCR. Los cebadores 27F/1492R se usan generalmente para el análisis de PCR 16S, ya que rinden mejores resultados que PB36/38. Los controles negativos apropiados deben incluirse con la placa y analizarse por PCR. La placa se analizará por PCR mediante el uso de un termociclador Eppendorf. Una vez finalizada la PCR, se analiza en gel mediante el uso de técnicas estándar de electroforesis en gel. Esto es importante porque la mayoría de los aislamientos se cultivan lo suficiente como para que idealmente se almacenen a largo plazo en el día 3. El análisis de electroforesis en gel y PCR se usan para confirmar que los aislamientos contienen bacterias, en lugar de otros microbios. Para los aislamientos que no pasan la PCR o tienen un caldo claro, aplique vórtex a los tubos y use un asa para esparcirlos sobre una placa de Petri. Verifique después de varios días para ver si crece algo o si el tubo está contaminado. Para aislamientos que pasen PCR, dosifique 600 ul de glicerol al 50 % en tubos de 2 ml con tapón de rosca y añada 1,200 µl del cultivo bacteriano, de manera que el caldo se almacene en glicerol al 20 %. Almacene la reserva de glicerol a -80 °C y registre una imagen del gel de las muestras de PCR.

Día 4:

Compruebe las placas de Petri de los aislamientos rayados que fallaron en la PCR para determinar el crecimiento. (Durante este tiempo, los tubos de caldo de 2 ml permanecerán en el agitador.) Una vez que haya crecimiento en la placa y las colonias parezcan haberse aislado con éxito, dispense 600 ul de la mezcla de caldo y glicerol en el tubo pequeño y coloque ambos tubos en sus respectivas cajas de -80. Es posible que los aislamientos no superen la prueba de PCR por cualquiera de las siguientes razones: los cebadores pueden no funcionar con todas las bacterias, el aislamiento es en realidad un hongo, el aislamiento es muy adherente y, por lo tanto, no se homogeneiza en el caldo, el aislamiento produce demasiado EPS, por lo tanto, necesita una dilución antes de la configuración de la PCR, o el aislamiento crece lentamente. Durante los próximos días, continúe el revisado de la placa para confirmar que solo se aisló una única especie bacteriana. Si se observa contaminación, prepare un nuevo aislamiento. Debe verificarse la viabilidad de las reservas de glicerol preparadas.

Ejemplo 6: Formulación de microbios

Los microbios identificados de acuerdo con los ejemplos anteriores pueden formularse con componentes adicionales para su aplicación a través de métodos tales como, pero no se limita a: tratamiento de semilla, lavado de raíces, desparasitación de raíces, remojo de plántulas, aplicación foliar, inóculos de suelo, aplicación en surcos, aplicación de revestimiento, pretratamiento de

suelos, inoculación de heridas, riego con cinta de goteo, mediación de vectores a través de un polinizador, inyección, osmocebado, hidroponía, acuaponía, aeroponía. La formulación que comprende los microbios se prepara para aplicación agrícola como una formulación líquida, una sólida o una gaseosa. La aplicación a la planta se logra, por ejemplo, como un polvo para la deposición superficial sobre las hojas de la planta, como un pulverizado para la planta completa o elemento vegetal seleccionado, como parte de un goteo en el suelo o las raíces, o como un recubrimiento sobre el elemento vegetal antes de la siembra. Dichos ejemplos pretenden ser ilustrativos y no limitantes del alcance de la invención.

Los componentes de los medios para una preparación de microbios ilustrativos se muestran más abajo en la tabla 2. Añada todo el contenido con el 50 % del volumen final de agua necesario y agite la solución a una temperatura elevada hasta que se disuelva. Después de que se haya disuelto todo el contenido, use agua estéril de RO para llevar la solución al volumen final deseado. Las preparaciones de prueba de campo se realizan típicamente mediante el uso de la formulación 4x.

Tabla 2a: Componentes y concentraciones de medios ilustrativos para la formulación de microbios

	0.9X	vol. lleno más abajo	1.1x	vol. lleno más abajo	2x	vol. lleno más abajo	4x	vol. lleno más abajo
	1 ml		30 ml	30	1 ml		1 ml	10
Goma de xantano (mg)	1.8	0	2.2	66	4	0	8	80
Trehalosa (mg)	45.3	0	55	1,650	100	0	200	2,000
Isomalt (mg)	22.65	0	27.5	825	50	0	100	1,000

Tabla 2b: Componentes de medios ilustrativos para la formulación de microbios

Componente	Núm. CAS
Sacarosa	57-50-1
Proflo	68308-87-2
Extracto de levadura	8013-01-2
Tryptona	91079-40-2
MgSO ₄ ·7H ₂ O	10034-99-8
KH ₂ PO ₄	7778-77-0
K ₂ HPO ₄	7758-11-04
NaNH ₄ HPO ₄ ·4H ₂ O	7783-13-3
CaCl ₂	10043-52-4
MnSO ₄ ·1H ₂ O	10034-96-5
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	7446-20-0
CuSO ₄ ·5H ₂ O	7758-99-8
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	10102-40-6

FeSO ₄ *7H ₂ O	7782-63-0
--------------------------------------	-----------

Tabla 2c: Componentes de medios ilustrativos para la formulación de microbios

Componente	Núm. CAS
Tryptona	91079-40-2
Peptona de soja	91079-46-8
NaCl	7647-14-5
K ₂ HPO ₄	7758-11-4
Glucosa	50-99-7

Tabla 2d: Componentes de medios ilustrativos para la formulación de microbios

Componente	Núm. CAS
Trehalosa	6138-23-4
Isomalto	64519-82-0
goma Xantana	11138-66-2

El procedimiento para mezclar la formulación de TIX es el siguiente: Mida todos los ingredientes secos en un tubo de 50 ml. Aplique vórtex bien a los ingredientes para asegurarse de que la goma de xantano se “separe” de las otras fuentes de carbono. Añada aproximadamente la mitad del agua estéril de RO total a la mezcla, aplique vórtex. Use el extremo largo de un esparcidor en L para romper los trozos tanto como pueda. Caliente un poco de agua estéril de RO en el microondas a la temperatura del baño de agua tibia (45-50 °C). Agregue el agua estéril de RO restante a la mezcla, agite en vórtex. Repita la etapa 4 y aplique vórtex como sea necesario hasta que tenga una solución transparente sin grumos. Haga girar las burbujas creadas en el proceso de mezcla mediante el uso de una centrífuga durante 5-10 segundos en “centrifugado rápido”. Recuerde tener un balance para contrarrestar el tubo de formulación (TIX). Permita que la formulación se enfríe a temperatura ambiente. 1. Mezcle en los consorcios microbianos. Aplique vórtex para asegurar la homogeneidad. Es ideal añadir microbios a una concentración de 10⁹ UFC/ml a la formulación. Aplique la formulación a la planta o elemento vegetal para realizar pruebas de campo.

Ejemplo 7: Aplicación de microbios a elementos vegetales y cultivos de los mismos

Se prepara una composición microbiana (que comprende uno o más microbios aislados de una sola cepa, un consorcio, una comunidad, una combinación o cualquier combinación de los anteriores) de acuerdo con los ejemplos anteriores. La composición microbiana comprende uno o más microbios, opcionalmente en combinación con uno o más microbios adicionales descritos en la presente descripción.

Composiciones microbianas para aplicación

En algunos métodos, la composición microbiana se seca y se aplica directamente a un elemento vegetal.

5 En algunos métodos, la composición microbiana se suspende en una formulación líquida para su aplicación a un elemento vegetal.

En algunos métodos, la composición microbiana se combina con otra composición, tal como, pero sin limitarse a: un portador, un agente humectante, un estabilizador, una sal. En algunos métodos, la otra composición comprende una molécula que introduce resultados agrícolas beneficiosos adicionales para la planta a la que se aplica la composición microbiana. La otra composición
10 incluye, por ejemplo, pero no se limita a: un herbicida, un fungicida, un bactericida, un pesticida, un insecticida, un nematocida, un bioestimulante.

Tipos de aplicaciones

La composición microbiana se aplica a un elemento vegetal, en un momento durante el desarrollo apropiado para el resultado deseado, por ejemplo: en una formulación de una aplicación de
15 empapado de suelo/en surcos antes de la siembra; como una semilla u otro tratamiento de elemento reproductivo; como una aplicación de elemento reproductivo después de la siembra; como una aplicación en surcos, goteo o empape después de la siembra; como una aplicación directa a un elemento vegetal (por ejemplo, raíz, hoja, tallo); como una aplicación a un elemento vegetal cosechado (por ejemplo, una fruta o un grano). También se prueban combinaciones de tipos de
20 aplicaciones.

Métodos de aplicación

La composición microbiana se aplica a (inoculación) una planta o un elemento vegetal o un producto vegetal (antes de la siembra, después de la siembra, antes de la cosecha o después de la cosecha). Esto puede lograrse, por ejemplo, al aplicar la composición agrícola a una tolva o
25 esparcidor o tanque, que contiene la composición microbiana y que se configura para difundir la misma.

Se aplica un recubrimiento de semillas de la composición microbiana a una o más semillas de una planta de cultivo. Al aplicar el microbio aislado como un recubrimiento de semillas, la semilla se planta y se cultiva de acuerdo con las prácticas establecidas para ese cultivo.

30 Alternativamente, la composición microbiana se aplica al suelo en beneficio de una planta existente en ese suelo. Los métodos de aplicación al suelo incluyen tratamiento en surcos, aplicaciones de empape y goteo.

Alternativamente, la composición microbiana se aplica a la superficie de una planta o parte de la planta después de la germinación.

Alternativamente, la composición microbiana se aplica al material obtenido de la planta después de la cosecha.

- 5 También se planta una parcela de control de plantas, a las que no se les aplicó el microbio aislado. Las plantas asociadas con la composición microbiana exhiben características mejoradas de interés. Los métodos de aplicación pueden realizarse de acuerdo con cualquier protocolo conocido en la técnica.

10 Los elementos vegetales, plantas o medio de cultivo (por ejemplo, suelo) pueden además ser inoculado con una enfermedad o plaga, de acuerdo con el propósito de la prueba.

Más abajo se proporciona un protocolo ilustrativo y no limitante para empapar las plantas de tomate:

1. Diez días después de la siembra, separe cuidadosamente las plantas en 6 repeticiones para cada tratamiento. Las plantas son delicadas y las hojas pueden desgarrarse fácilmente. Asegúrese
15 de que el tamaño y la apariencia general de las plantas sea lo más uniforme posible (El propósito del raleo es continuar con una población de plantas homogénea). Trasplante si no hay suficientes plantas por repetición. Véase la etapa 3 para las guías sobre el trasplante.

2. Comience a reducir las macetas a una planta por maceta. Retire la planta más pequeña, que no esté saludable o que esté deformada de alguna manera. Si hay 2 o más plantas sanas por maceta,
20 las extras pueden trasplantarse a otra maceta. Use suelo sobrante preparado de la siembra inicial o de macetas donde las semillas no germinaron.

3. Para trasplantar: Si algunas macetas no germinaron, pueden llenarse con una planta de otro contenedor. Para hacer esto, simplemente extraiga la planta sobrante (tratar de extraer la mayor cantidad posible de masa de raíces sin molestar a la otra planta) con una pala y colóquela en un
25 agujero hecho en la maceta vacía. Firme el suelo alrededor de la planta con una ligera presión con los dedos.

4. Espacie las macetas en 6 líneas de macetas (1 línea de macetas por tratamiento), tomará 4 bandejas RL98. Una vez hecho esto, eche un vistazo a todos los tratamientos y considere hacer algunos cambios de maceta para asegurarse de que algunos tratamientos no tengan todas las
30 plantas grandes y otros tengan todas las plantas grandes.

5. Cambie los guantes si es necesario. Etiquete cada maceta con sus etiquetas Avery preparadas previamente. Los tratamientos deben etiquetarse en hileras de 6 repeticiones es decir, 1-1, 1-2, 1-3 a 1-6, etc. Hacer que sea más fácil encontrar todas las réplicas para cada tratamiento

6. Dos semanas después de la siembra (aproximadamente 4 días después del raleo y el etiquetado), obtenga tratamientos del equipo de microbiología; ponga en la mesa con bandejas de plantas preparadas. Reúna combitips, repetidor y agua de RO. (nota: las plantas deben regarse ligeramente el día del tratamiento)

7. Mezcle la solución microbiana al invertir el tubo/contenedor (tratamiento microbiano) 2-3 veces o sacúdalo ligeramente. Configure la combitip para dispensar 2 ml. Recolecte el fluido de tratamiento en la combitip, dispense la primera etapa de vuelta al tubo. Asegúrese de que el tratamiento que tiene corresponda a la hilera de plantas a tratar. Una vez confirmado, dosifique suavemente 2 ml de tratamiento en la superficie del suelo de cada maceta, cerca del tallo pero evite el contacto directo con el tallo y las hojas.

8. Deseche la combitip y repita la etapa 6 para todos los tratamientos. Para el control inoculado (IC o InoCon) y el control sin tratar (UTC), aplique agua de RO en lugar de un tratamiento.

Una vez que se hayan aplicado todos los tratamientos, vuelva a colocar las plantas en la cámara de crecimiento para (inoculación opcional) el crecimiento y la evaluación.

Visualización de microbios asociados con elementos vegetales

Los microbios individuales pueden marcarse con una proteína fluorescente de acuerdo con métodos conocidos en la técnica. El análisis de imágenes microscópicas demostró que los microbios descritos en la presente descripción se encontraron asociados con varios tejidos vegetales.

Ejemplo 8: Pruebas in vitro

Se evaluaron cepas de tipo silvestre y editadas genómicamente para la colonización de raíces, la actividad de reducción de acetileno, la formación de biopelículas, la turbidez (OD a 600 nm), la tolerancia al oxígeno y la expresión génica. Las ID de las cepas se proporcionan como <# de cepa original-# de edición>. A menos que se especifique de cualquier otra manera, los protocolos se realizaron mediante el uso de métodos conocidos en la técnica. Los resultados se muestran en las tablas 3a-3k.

ARA con GC-FID para cepas grampositivas

Asegurarse de que todos los equipos y materiales estén esterilizados. Envolver los contenedores del equipo de sellado en papel de aluminio antes de esterilizarlos en autoclave para que puedan

desenvolverse en la caja de paso de la cámara anaeróbica e ingresar en la cámara anaeróbica estéril. Selle las aberturas de los viales con papel de aluminio antes de la esterilización. Se requieren “sellos” sueltos para permitir el intercambio de gases en la caja de paso.

1. Sembrar los aislados a -80 C e incube a 30 C o 25 C hasta observar las colonias.
- 5 2. Esparcir una placa/aislar e incubar a 25 C o 30 C hasta que se observe un césped.
3. Recolectar placas y equilibrar con OD600 cada aislado a aproximadamente 0.3 para normalizar el inoculante.
4. Preparar la cámara anaeróbica limpiando las superficies y pasando el equipo de sellado; asegurarse de que los contenedores permitan el intercambio de gases.
- 10 5. Agregar 30 ml de NF11/vial; 3 repeticiones/aislado.
6. Agregar 150 ul de inoculante/vial que se equilibró a un OD600 de 0.3 con agua estéril.
7. Pasar los viales a través de la cámara anaeróbica y sellarlos en condiciones anaeróbicas; incluir un vial vacío (con la “tapa” de aluminio) para agregar un indicador anaeróbico para fines de control de calidad.
- 15 8. Colocar los viales a 30 C, 200 rpm durante 5 horas.
9. Después de 5 horas, trabajando en la campana extractora, retirar el 10 % (4 ml) del espacio libre de cada vial y reemplazar por el mismo volumen de gas acetileno. NOTA: El gas acetileno es altamente reactivo y explosivo, por lo que la bolsa debe mantenerse en la campana extractora mientras se trabaja.
- 20 10. Incubar a 30 C, 200 rpm durante 48 h.
11. A las 48 horas (u otro punto cronológico conocido), tomar una muestra de 1 ml de espacio libre y colocarlo en un tubo de recolección de GC.
12. Ejecute muestras en GC usando el método de instrumentos para el análisis de etileno “división 4”, que mide el pico de acetileno y las personas de etileno
- 25 13. La cantidad de gas se cuantifica por área del pico.
14. Tome lecturas de OD600 de 200 ul del cultivo y TVC de cultivo.
15. Analizar el gas etileno como un porcentaje de conversión de acetileno a etileno. Esto genera una estimación de la conversión total.

El volumen de gas producido (etileno) puede cuantificarse utilizando puntos de calibración en
30 Chromeleon o calculando el % del área del pico. El % del área del pico de acetileno + etileno debe ser = 100 % para esto. A partir de la cantidad conocida de acetileno agregado, el etileno producido puede determinarse en ml. 1 M de gas = 24 dm³ o 24,000 ml. Por lo tanto, 1 mM de gas = 24 ml.

Para calcular la cantidad de mM de etileno producido, divida la cantidad por 24: $\text{mM ET} = \text{ml}/24$

Para calcular RATE: mM por hora por CFU, se debe calcular mM como se describe anteriormente, y se debe saber qué cantidad del espacio libre muestreado (si se utiliza el cálculo de calibración, p. ej., 1 ml de espacio libre muestreado tiene x mM de gas, pero hay 6 ml de espacio libre total para que el etileno total producido sea = $6 \times \text{mM}$). Si el cálculo usando el % del área del pico sola, el paso anterior no es necesario, sino que se necesita saber qué cantidad de acetileno se agregó. Se necesita saber la cantidad de horas de incubación con acetileno. Es necesario hacer TVC para calcular las UFC/ml y luego multiplicar su valor de UFC por la cantidad de ml cultivados, p. ej., 4 ml (gneg) o 30 ml (gpos).

10 Índice = $\text{etileno total mM} / (\text{tiempo (h)} \times \text{UFC total})$

Protocolo de pruebas de ARA con tolerancia al oxígeno

Asegurarse de que todos los equipos y materiales estén esterilizados. Envolver los contenedores del equipo de sellado en papel de aluminio antes de esterilizarlos en autoclave para que puedan desenvolverse en la caja de paso de la cámara anaeróbica e ingresar en la cámara anaeróbica
15 estéril. Selle las aberturas de los viales con papel de aluminio antes de la esterilización. Se requieren “sellos” sueltos para permitir el intercambio de gases en la caja de paso.

1. Sembrar los aislados a -80 C e incube a 30 C o 25 C hasta observar las colonias.
2. Esparcir una placa/aislar e incubar a 25 C o 30 C hasta que se observe un césped.
3. Recolectar placas y equilibrar con OD600 cada aislado a aproximadamente 0.3 para
20 normalizar el inoculante.

4. Preparar la cámara anaeróbica limpiando las superficies y pasando el equipo de sellado; asegurarse de que los contenedores permitan el intercambio de gases.

5. Llevar el medio NF11 a la cámara anaeróbica después de limpiarlo. Agregar agar a 20 g/l a NF11 y colocar en la placa caliente. Llevar a hervor brevemente para derretir el agar. Después de
25 derretir el agar, verter 30mL del agar calentado en 70 ml en sus lados para maximizar la superficie y producir inclinaciones.

6. Agregar 150 ul de inoculante/vial que se equilibró a un OD600 de 0.3 con agua estéril. Realizarlo intentando maximizar la superficie expuesta al inoculado.

7. Pasar los viales a través de la cámara anaeróbica y sellarlos en condiciones anaeróbicas;
30 incluir un vial vacío (con la “tapa” de aluminio) para agregar un indicador anaeróbico para fines de control de calidad.

8. Para ajustar los niveles de oxígeno, después de sellar el vial, tomar una jeringa con aguja fina y retirar la parte del aire anaeróbico de la vía que se reemplazará por oxígeno 100 % puro de calidad médica.
 9. El ensayo se ha realizado en diversas condiciones de oxígeno, desde 0 % a 22 % de oxígeno, y se puede aumentar a condiciones de oxígeno mucho más alto debido a la adición manual de oxígeno. Por ejemplo, para lograr un 5 % de oxígeno, eliminar 2.2 ml de gas anaeróbico a mano y agregar 2 ml de oxígeno puro al 100 % en esta condición.
 10. Colocar los viales en incubador a 30 C durante 5 horas.
 11. Después de 5 horas, trabajando en la campana extractora, retirar el 10 % (4 ml) del espacio libre de cada vial y reemplazar por el mismo volumen de gas acetileno. NOTA: El gas acetileno es altamente reactivo y explosivo, por lo que la bolsa debe mantenerse en la campana extractora mientras se trabaja.
 12. Incubar a 30 C, 200 rpm durante 48 h.
 13. A las 48 horas (u otro punto cronológico conocido), tomar una muestra de 1 ml de espacio libre y colocarlo en un tubo de recolección de GC.
 14. Ejecute muestras en GC usando el método de instrumentos para el análisis de etileno “división 4”, que mide el pico de acetileno y las personas de etileno
 15. La cantidad de gas se cuantifica por área del pico.
 16. Analizar el gas etileno como un porcentaje de conversión de acetileno a etileno. Esto genera una estimación de la conversión total.
- El volumen de gas producido (etileno) puede cuantificarse usando puntos de calibración en Chromeleon o calculando el % del área del pico. El % del área del pico de acetileno + etileno debe ser = 100 % para esto. A partir de la cantidad conocida de acetileno agregado, el etileno producido puede determinarse en ml. 1 M de gas = 24 dm³ o 24,000 ml. Por lo tanto, 1 mM de gas = 24 ml.
- Para calcular cuántos mM de etileno se produjeron, dividir la cantidad por 24: mM ET= ml/24.
- Para calcular RATE: mM por hora por CFU, es necesario calcular mM como se describe anteriormente. Es necesario saber qué cantidad del espacio libre se muestrea (si se utiliza el cálculo de calibración, p. ej., 1 ml de espacio libre muestreado tiene x mM de gas, pero hay 6 ml de espacio libre, por lo que el etileno total producido = 6x mM). Si calcula utilizando el % del área del pico, solo el paso anterior no es necesario; solo necesita saber cuánto acetileno ha agregado. Es necesario conocer la cantidad de horas de incubación con acetileno. Es necesario hacer TVC para

calcular las UFC/ml y luego multiplicar su valor de UFC por la cantidad de ml cultivados, p. ej., 4 ml (gneg) o 30 ml (gpos).

Índice = etileno total mM/ (tiempo (h) x UFC total)

Colonización de las raíces

- 5 Las cepas bacterianas se prepararon con el gen GFP integrado en su genoma, mediante el uso de técnicas conocidas en la técnica. Las semillas se trataron con la(s) cepa(s), y mediante el uso de una técnica estéril, las semillas inoculadas se colocaron en tubos de fitagel. Los tubos se colocaron en cuartos de cultivo apropiados y se cubrieron durante 5 días para permitir la germinación. El tejido de la raíz se separó de la semilla y el brote, mediante el uso de pinzas y escalpelos esterilizados con EtOH y llama. El tejido de la raíz se cortó para que todos estuvieran en el mismo plano focal y se presionó al mismo nivel en agar al 0.8 %-agua en una placa cuadrada para obtener una imagen. Lo mismo se realizó para el tejido del brote. Se obtuvieron imágenes del tejido vegetal para detectar colonización bacteriana mediante el uso de microscopia de fluorescencia.

Protocolo de ensayo de biopelícula

- 15 Este protocolo se basó en la bibliografía: “Effects of an EPS Biosynthesis Gene Cluster of *Paenibacillus polymyxa* WLY78 on Biofilm Formation and Nitrogen Fixation under Aerobic Conditions” (Chen 2021). Materiales: Tubos de vidrio estériles de 3 ml, medio de “Biofilm Broth (BFB)”, solución de Crystal Violet (acuosa) al 0.1 %, ácido acético al 40 %. 7 días dieron los mejores resultados generales de biopelícula; algunos aislados pueden dar mejores resultados durante 5 días y comenzar a descomponerse después de este punto cronológico. Preparar usando la técnica estéril.

- La receta de BFB incluye: 5 g/l de KH_2PO_4 , 5 g/l de K_2HPO_4 , 0.86 g/l de glutamato monosódico, 0.1 g/l de extracto de levadura, 1 g/l de NH_4Cl pH 7. Esterilización con filtro después de esterilizarlo en autoclave: 36 g/l de glucosa, 0.03 g/l de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.02 g/l de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1 ml/l de solución de oligoelementos.

Los pasos del método son los siguientes:

1. Sembrar aislados a -80 C.
2. Preparar placas de proliferación de cada aislado.
3. Esterilizar en autoclave los tubos de vidrio de 3 ml en el bastidor de tubos (x3/aislado); usar una lámina como cubierta
4. Recolectar placas de proliferación y equilibrar con OD600 hasta ~0.3
5. Llenar cada tubo con 1 ml de BFB.

6. Inocular con 10 ul/tubo de extracción de placa de proliferación.
7. Volver a colocar la cubierta de aluminio sobre los tubos e incubar a 30 C, de forma fija durante 7 días.
8. Después de 7 días, comenzar por retirar el cultivo de los tubos usando puntas de pipeta largas (1,250 ul); recolectar el cultivo en tubos de 2 ml con tapa a presión.
9. Añadir agua al cultivo hasta alcanzar el volumen final de 1 ml. Tomar la lectura de OD600.
10. Lavar los tubos de vidrio con agua de RO; llenar aproximadamente hasta la mitad, sostener el tubo, sellar la parte superior y sacudir para desprender el exceso de material celular. Enjuagar varias veces.
11. Eliminar el exceso de agua usando puntas de pipeta largas.
12. Agregar 1 ml/tubo de solución Crystal Violet al 0.1 % e incubar durante 10 minutos a temperatura ambiente.
13. Retirar la solución Crystal Violet con una pipeta en un contenedor para desechos (p. ej., un tubo Falcon de 50 ml) y desecharlo en el contenedor de desechos de incineración.
14. Enjuagar los tubos de vidrio hasta que el agua sea transparente.
15. Tubos de vidrio seco (generalmente durante la noche).
16. Agregar 1 ml de solución de ácido acético al 40 % para disolver el anillo de biopelícula teñido.
17. Tomar la lectura OD570.
18. Normalizar OD570 por OD600 (si corresponde).

Resultados

Nota: los espacios en blanco en las tablas indican que no se probó.

Tabla 3a: Cepas de *Paenibacillus* de tipo silvestre (sin editar)

ID de la cepa	Coloni- zación de las raíces	ARA	NH4 ARA 2.5 mM	NH4 ARA 5 mM	Bio- película	OD600 nM	Tole- rancia al oxíge- no	Expre- sión génica
77155-WT		47.12	14.89	0.81	0.14	0.318	0.59	1.00
8619-WT	++	18.80	11.38	0.21	0.18	0.274	0.59	1.00
68890-WT		15.21	0.00	0.00	0.18	0.215		
77357-WT		41.71	18.46	2.76	0.19	0.287	0.28	
77359-WT		27.09	18.45	0.58		0.310		
70995-WT		29.53	5.89	0.02		0.343	0.05	
55470-WT		15.14	8.99	0.00		0.241		
55146-WT		13.79	9.48	0.00	0.19	0.268		

55136-WT		14.56	0.00	0.00		0.205	0.36	
55083-WT		23.16	11.18	0.74	0.16	0.256		
54805-WT		21.19	20.09	0.54		0.169	0.11	
53953-WT		36.20	20.32	3.52	0.32	0.209	0.23	
17911-WT	+	0.00						
17899-WT	+++	1.12					0.66	

Tabla 3b: truncamiento de C25 en CueR

ID de la cepa	Colonización de las raíces	ARA
8619-G29	++	13.85

Tabla 3c: truncamiento de C25 en CueR, inactivación del sitio II de unión a GlnR

ID de la cepa (# de original-# de edición)	ARA	NH4 ARA 2.5 mM	NH4 ARA 5 mM	Biopelícula	OD600 nM	Expresión génica
8619-G58	0.07	0.00	0.00	0.062	0.113	58
8619-G59	1.12	0.00	0.11		0.142	
8619-G60	12.73	1.07	0.57		0.173	

Tabla 3d: Inactivación de CueR

ID de la cepa (# de original-# de edición)	Colonización de las raíces	ARA	NH4 ARA 2.5 mM	NH4 ARA 5 mM	Biopelícula	OD600 nM	Tolerancia al oxígeno	Expresión génica
8619-G25	++	17.10	11.08	1.14	0.28	0.221	0.46	2.20
8619-G26		12.06	16.70	0.59		0.174		

Tabla 3e: CueR KO, inactivación del sitio II de unión a GlnR

ID de la cepa (# de original-# de edición)	ARA	NH4 ARA 2.5 mM	NH4 ARA 5 mM	OD600 nM
8619-G88	32.78	13.77	1.82	0.114

Tabla 3f: CueR KO, duplicación & inactivación del sitio II de unión a GlnR

ID de la cepa (# de original-# de edición)	ARA	NH4 ARA 2.5 mM	NH4 ARA 5 mM	OD600 nM
8619-G91	32.81	12.81	1.22	0.121

Tabla 3g: truncamiento de C25 en GlnR

	ID de la cepa (# de original-# de edición)	Coloni- zación de las raíces	ARA	NH4 ARA 2.5 mM	NH4 ARA 5 mM	Bio- película	OD600 nM	Tolerancia al oxígeno
5	77155-G46	-	27.77	17.46	18.44	0.08	0.188	
	68890-G12		9.10	1.58	1.51	0.09	0.284	
	68890-G24		3.05			0.09		
	68890-G25	+	3.72	1.50	1.13	0.10	0.258	
	68890-G26	+	4.79			0.09		
	55083-G14	+	17.42	12.32	13.93	0.15	0.177	
10	55083-G15		15.87	0.83	1.19	0.12	0.372	
	55083-G16		23.10	9.53	7.75	0.13	0.231	
	17911-G12		0.00					
	17899-G13	-	0.13					0.00

Tabla 3h: inactivación de GlnR

	ID de la cepa (# de original-# de edición)	ARA	NH4 ARA 2.5 mM	NH4 ARA 5 mM	OD600 nM
15	77155-G49	0.42	0.00	0.91	0.099
	68890-G32	0.00	0.00	0.00	0.059
	68890-G33	0.00	0.00	0.61	0.056

Tabla 3i: duplicación del sitio II de unión a GlnR

	ID de la cepa (# de original- # de edición)	Coloni- zación de las raíces	ARA	NH4 ARA 2.5 mM	NH4 ARA 5 mM	Bio- película	OD600 nM	Expresión génica
20	77155-G27		29.83	14.63	0.55	0.01	0.318	2.30
	77155-G28		22.16	13.42	0.76		0.269	
	8619-G52	++						
25	8619-G53		42.83	30.36	1.42	0.22	0.162	6.90
	68890-G19		8.07	0.00	0.00	0.09	0.210	
	68890-G20	+	16.03	0.03	0.00	0.04	0.118	
	68890-G21	+	17.09	0.03	0.00	0.10	0.118	
	77357-G4	-	37.04	15.73	0.71	0.26	0.311	
	77357-G5		33.38	14.31	0.13	0.24	0.334	
30	77359-G17	-	45.46	32.83	1.34	0.23	0.210	
	77359-G18	-	49.67	28.44	2.02	0.27	0.233	
	55470-G4	-	17.25	11.37	0.00		0.208	
	55470-G5	++	17.51	13.71	0.34		0.221	

55136-G9	-	23.88	24.85	3.90		0.152	
55136-G10	++	16.86	21.69	2.26		0.163	
55083-G11		0.00	0.00	0.00		0.286	

Tabla 3j: duplicación e inactivación del sitio II de unión a GlnR

ID de la cepa (# de original-# de edición)	Coloni- zación de las raíces	ARA	NH4 ARA 2.5 mM	NH4 ARA 5 mM	Bio- película	OD600 nM	Tole- rancia al oxígeno	Expre- sión génica
77155-G8	+	39.19	11.21	0.67	0.14	0.295	0.32	0.20
77155-G9	++	45.62	11.80	0.66	0.22	0.238		0.40
77155-G31		32.04	14.99	4.39		0.337		
77155-G32		28.69	7.78	0.91		0.281		
8619-G36	++							
8619-G38	++							
8619-G39	++							
8619-G50	-	29.56	22.22	2.83	0.27	0.164	0.26	1.30
77357-G8	-	45.42	18.91	6.61		0.289		
77357-G9	-	43.19	20.99	7.62		0.291		
77359-G21	-	36.72	23.61	5.78		0.154		
55146-G6	+	14.75	0.00	0.00	0.11	0.197		
55083-G3		15.18	4.81	2.49		0.497		
54805-G3	+	0.00	0.00	0.00		0.107		
54805-G4		0.00	0.00	0.00		0.119		
68890-G8		0.01	0.00	0.00	0.12	0.225		

Tabla 3k: inactivación del sitio II de unión a GlnR

ID de la cepa (# de original-# de edición)	Coloni- zación de las raíces	ARA	NH4 ARA 2.5 mM	NH4 ARA 5 mM	Bio- película	OD600 nM	Tole- rancia al oxígeno	Expre- sión génica
77155-G3	+	59.41	23.33	11.92	0.20	0.197		2.10
77155-G4	-	62.73	24.21	7.67	0.23	0.195		6.60
77155-G5	-	62.88	19.24	5.77	0.18	0.219		0.10
77155-G11		28.38	11.01	1.25	0.17	0.287		
77155-G21		41.31	6.56	0.53	0.18	0.303		6.10
77155-G22		37.20	13.83	2.32	0.17	0.336		2.40
8619-G19	++							
8619-G20	-							
8619-G21	+++	20.73			0.09	0.279		10.80
8619-G22	++	11.99			0.40	0.140		51.70
8619-G30	+++							
8619-G31		12.40			0.07	0.180		0.90

	8619-G32		31.35	29.56	1.77	0.43	0.201	0.31	6.20
	68890-G3	++	9.15	0.08	0.04		0.218		
	68890-G4		16.07	0.01	0.00		0.196		
	68890-G5		14.57	0.00	0.00	0.22	0.245		
	77359-G3	+	25.52	17.20	0.37		0.308		
5	77359-G4	+	34.46	17.68	0.98		0.312		
	77359-G5	+	27.77	14.99	0.26		0.274		
	70995-G4		36.25	5.25	2.39		0.297		
	70995-G5		23.19	13.38	2.07		0.362		
	55136-G6		26.61	16.30	3.69		0.219		
	55083-G6		14.69	6.47	7.24		0.469		
	54805-G8	++	19.95	13.58	0.30		0.179		
	54805-G9		14.69	15.55	0.43		0.164		
10	54805-G10	+	12.07	10.47	0.15		0.180		
	53953-G3	-	24.39	16.03	1.22	0.10	0.252		

Tabla 31: inactivación de NifH

	ID de la cepa (# de original-# de edición)	ARA	Biopelícula	OD600 nM	Expresión génica
15	77155-G16	0.02	0.17	0.275	0.00
	8619-G79	0.05	0.13	0.201	0.00

Estos datos demuestran que, aunque es difícil de lograr, las capacidades de fijación de nitrógeno mejoradas pueden impartirse a las cepas de *Paenibacillus* mediante la modificación de varios sitios dentro del genoma microbiano, que incluyen los loci del sitio I de unión a GlnR, sitio II de unión a GlnR, Orf1 y/o CueR.

Ejemplo 9: Pruebas en plantas

Los microbios editados descritos anteriormente se probaron en dos tipos diferentes de plantas de cultivo monocotiledóneas, una monocotiledónea C3 (trigo) y una monocotiledónea C4 (maíz).

Las plantas de maíz y trigo se asociaron con los microbios de tipo silvestre y/o editados descritos anteriormente, y se probaron en el invernadero, así como también en ensayos de campo a mayor escala. La asociación puede lograrse mediante uno o más de los siguientes procedimientos: tratamiento de semillas, tratamiento foliar, aplicación en surcos, desparasitación, fertilización lateral.

Las múltiples réplicas de plantas de elote (maíz; *Zea mays*) se trataron con los microbios descritos en la presente descripción y se cultivaron durante al menos 19 días (intervalo de 19-34 días). Los datos recolectados incluyeron biomasa, área de la hoja, altura de la planta, área de la raíz,

nitrógeno de brotes, verdor, NDVI (capturando cuánto más se refleja la luz infrarroja cercana en comparación con el rojo visible; una medida del estado de salud de la planta en función de cómo la planta refleja la luz a determinadas frecuencias), NPCI (índice de proporción de pigmento de clorofila normalizado), PSRI (índice de reflectancia de la senescencia de la planta) y CCI (índice del contenido de clorofila), y comparado con un control sin tratar. Los datos se presentan en la Tabla 4.

Tabla 4: Datos de invernadero del maíz

IOC = Mejora respecto al control (sin tratar); Delta = cambio frente al control (sin tratar)

# de cepa-# de edición	Edición	IOC_-Biomasa_digital	delta_área de_hoja	IOC_-Altura	IOC_%_área de_raíz	IOC_% de N_brote	delta_verdor_pro-medio	delta_ND VI_pro-medio	delta_NPCI_pro-medio	delta_PSRI_pro-medio	delta_CCI
8619-G29	Truncamiento de C25 en CueR	9.14	627.44	-1.06			-0.0056	-0.0024	-0.0099	-0.0067	1.91
8619-G29	Truncamiento de C25 en CueR	4.59	629.23	3.63			-0.0009	0.0016	0.0024	-0.0001	0.63
8619-G29	Truncamiento de C25 en CueR	4.44	158.51	3.90	8.68	4.44	0.0009	-0.0011	0.0038	0.0043	
8619-G29	Truncamiento de C25 en CueR	4.28	143.15	4.37	10.80	0.11	0.0062	0.0031	-0.0004	-0.0002	-3.3
8619-G29	Truncamiento de C25 en CueR	10.90	1,517.88	3.44			-0.0038	0.011	-0.007	-0.0028	5.7
8619-G29	Truncamiento de C25 en CueR	6.31	111.25	5.78			-0.0051	-0.0032	0.0005	0.0011	2.59
8619-G29	Truncamiento de C25 en CueR	5.24	908.92	4.56			-0.0084	-0.0058	0.0007	0.0003	-3.46
8619-G29	Truncamiento de C25 en CueR	33.75	4,581.43	10.66			0.0043	0.0007	0.0022	0.002	3.42
8619-G29	Truncamiento de C25 en CueR	14.17	1,325.77	8.02		18.38	-0.0035	-0.012	0.0092	0.0068	
8619-G29	Truncamiento de C25 en CueR	-0.75	-194.57	-0.17			0.002	0.0035	0.0129	0.0059	0.51
8619-G29	Truncamiento de C25 en CueR	-10.48	-2,596.26	-0.76			-0.0061	-0.0062	-0.0016	0.0004	-2.02
8619-G59	Truncamiento de C25 en CueR, inactivación del sitio II de unión a GlnR	0.44	909.39	-4.29	2.97	22.15	0.0037	0.0232	-0.0303	-0.0278	2.75
8619-G59	Truncamiento de C25 en CueR, inactivación del sitio II de unión a GlnR	-1.43	-288.05	-1.11		11.43	-0.008	-0.0009	0.0011	0.0073	-0.07
8619-G59	Truncamiento de C25 en CueR, inactivación del sitio II de unión a GlnR	-14.24	-3,495.35	-4.56		-2.54	-0.0023	-0.0006	0.0037	0.0045	-0.53
8619-G59	Truncamiento de C25 en CueR, inactivación del sitio II de unión a GlnR	18.39	4,730.03	2.95	-4.93	14.05	0.0104	-0.003	0.0326	0.0193	-1.02
8619-G60	Truncamiento de C25 en CueR, inactivación del sitio II de unión a GlnR	20.58	4,594.64	1.67	-11.76	60.50	0.0056	0.0387	-0.0461	-0.0369	1.96

5	8619-G60	Truncamiento de C25 en CueR, inactivación del sitio II de unión a GlnR	6.45	1,927.49	-2.27		18.49	-0.0017	0.0033	0.0031	-0.0008	-0.37
	8619-G25	Inactivación de CueR	22.64	3,771.81	-0.24			0.0009	0.0048	0.0042	0.0024	0.02
	8619-G25	Inactivación de CueR	14.71	2,040.73	3.37	16.11	24.65	-0.005	0.0129	-0.0253	-0.0192	-1.87
	8619-G25	Inactivación de CueR	4.44	1,079.96	0.34	8.93		-0.0041	0.001	0.0108	0.0041	0.36
	8619-G25	Inactivación de CueR	3.49	703.79	2.12			-0.0043	-0.0019	-0.011	-0.0053	0.64
	8619-G25	Inactivación de CueR	2.78	407.03	3.34	-11.54		0.0011	-0.0008	0.0057	0.0016	0.66
	8619-G25	Inactivación de CueR	1.38	195.93	-3.53			-0.0047	0.0002	-0.0077	-0.0055	-1.01
	8619-G25	Inactivación de CueR	-13.47	-2,864.95	0.12	-2.71	-13.47	0.0105	0.0029	0.0077	0.0056	
	8619-G25	Inactivación de CueR	15.45	1,531.00	6.48	0.61		0.0049	0.0014	0.0008	0.0007	4.91
	8619-G25	Inactivación de CueR	14.60	2,266.19	3.38	19.60		-0.0011	0.0178	-0.0278	-0.0218	1.83
10	8619-G25	Inactivación de CueR	13.17	1,375.75	6.48			-0.0001	0.0016	-0.001	-0.002	0.84
	8619-G25	Inactivación de CueR	10.76	1,568.11	3.43			0.0012	0.0119	-0.0016	-0.0003	7.07
	8619-G25	Inactivación de CueR	4.43	1,054.49	0.42			0.0011	0.0023	0.0046	0.0031	0.6
	8619-G25	Inactivación de CueR	-12.30	-3,175.59	1.70			-0.0042	-0.003	-0.0088	-0.0073	-5.88
	8619-G25	Inactivación de CueR	19.00	3,478.41	1.89			-0.0009	-0.0053	-0.0044	0.0001	1.81
15	8619-G25	Inactivación de CueR	11.50	739.31	8.29		15.61	0.0005	0.0029	-0.0027	-0.0003	
	8619-G25	Inactivación de CueR	4.31	862.75	-0.01			-0.0008	-0.0098	0.0014	0.002	-3.19
	8619-G25	Inactivación de CueR	1.24	461.49	-0.34			0.0054	-0.001	0.0066	0.0035	0.54
	8619-G25	Inactivación de CueR	18.04	12,527.64	0.10	-4.96	88.26	0.0093	0.0296	-0.025	-0.0254	0.67
	8619-G25	Inactivación de CueR	16.40	10,542.20	1.09	-29.29	45.86	0.0077	0.0383	-0.033	-0.0321	2.33
20	17899-G29	Inactivación de C25 en GlnR, duplicación del sitio II de unión a GlnR	9.79	1,138.22	-2.47			0.0019	0.0009	-0.0017	0.0009	
	17899-G30	Inactivación de C25 en GlnR, duplicación del sitio II de unión a GlnR	8.60	477.10	4.18			0.0004	0.0012	-0.0042	0.0028	
	17899-G21	Inactivación de C25 en GlnR, Inactivación del sitio II de unión a GlnR	-11.83	-693.51	-1.73			-0.0061	-0.0094	0.0146	0.0095	
25	17899-G22	Inactivación de C25 en GlnR, Inactivación del sitio II de unión a GlnR	-3.40	-225.23	-1.88			-0.0010	-0.0044	0.0122	0.0070	
	17899-G23	Inactivación de C25 en GlnR, Inactivación del sitio II de unión a GlnR	-1.22	-42.52	-2.73			-0.0012	-0.0020	0.0027	0.0000	
	17899-G36	Inactivación de C25 en GlnR, Inactivación de NifH	15.32	732.14	2.03			0.0023	-0.0010	0.0058	0.0042	
30	17899-G42	Inactivación de C25 en GlnR, Inactivación de OrfI	18.86	375.15	9.80			0.0000	-0.0002	0.0085	0.0085	

5	17899-G43	Inactivación de C25 en GlnR, Inactivación de OrfI	-1.24	349.14	-5.57			-0.0025	-0.0049	-0.0025	-0.0044	
	17899-G44	Inactivación de C25 en GlnR, Inactivación de OrfI	2.72	131.06	-3.60			0.0079	0.0016	-0.0031	-0.0037	
	17899-G13	Truncamiento de C25 en GlnR	16.57	802.78	5.17			0.0023	0.0051	-0.0010	-0.0019	
	17899-G13	Truncamiento de C25 en GlnR	-8.89	-468.72	-3.90			0.0015	-0.0036	0.0053	0.0088	
	17899-G13	Truncamiento de C25 en GlnR	17.21	1,049.53	2.33			0.0038	0.0034	-0.0081	-0.0070	
10	68890-G12	Truncamiento de C25 en GlnR	15.35	7,408.28	2.92	21.02		0.0023	0.0008	0.0057	0.0006	
	68890-G12	Truncamiento de C25 en GlnR	3.79	-31.13	4.44		-1.45	0.0199	0.0198	-0.0157	-0.0217	1.51
	68890-G12	Truncamiento de C25 en GlnR	-2.86	-2,191.25	5.47			-0.0152	-0.0183	-0.0022	0.0079	-1.01
	68890-G12	Truncamiento de C25 en GlnR	-3.84	-839.54	-2.31			-0.0009	-0.0055	-0.0016	0.0019	-0.14
	68890-G12	Truncamiento de C25 en GlnR	-11.46	-2,010.06	-7.43	29.24		-0.0077	-0.0157	0.008	0.0148	-0.74
15	68890-G24	Truncamiento de C25 en GlnR	-9.43	-3,807.08	0.26			-0.0012	0.0078	-0.0063	-0.0046	
	68890-G25	Truncamiento de C25 en GlnR	-8.78	-2,866.19	-4.35			0.0040	0.0063	0.0166	0.0058	
	68890-G26	Truncamiento de C25 en GlnR	-4.95	-3,075.59	3.22			-0.0039	0.0022	-0.0053	-0.0032	
	17899-G25	Duplicación del sitio II de unión a GlnR	3.66	866.37	-5.30			0.0031	-0.0013	0.0008	0.0015	
	17899-G26	Duplicación del sitio II de unión a GlnR	-3.97	45.41	-3.93			0.0069	0.0049	0.0051	0.0046	
20	17899-G27	Duplicación del sitio II de unión a GlnR	5.11	748.59	-3.74			0.0025	0.0071	-0.0008	0.0032	
	68890-G19	Duplicación del sitio II de unión a GlnR	-1.92	-422.71	0.26			0.0084	0.0072	0.0210	0.0070	
	68890-G20	Duplicación del sitio II de unión a GlnR	-6.95	-2,117.69	-0.84			0.0114	0.0144	0.0244	0.0082	
	68890-G21	Duplicación del sitio II de unión a GlnR	-10.24	-4,147.11	-0.18			-0.0036	0.0077	0.0051	0.0005	
	8619-G53	Duplicación del sitio II de unión a GlnR	5.28	-26.60	6.04			0.004	0.0005	-0.0029	-0.0022	0.73
25	8619-G53	Duplicación del sitio II de unión a GlnR	16.08	1,317.14	2.12			0.0059	0.0032	-0.0008	-0.0018	-4.56
	8619-G53	Duplicación del sitio II de unión a GlnR	21.69	3,671.66	1.20	-0.92		0.0011	0.0112	-0.0153	-0.0096	1.27
	8619-G53	Duplicación del sitio II de unión a GlnR	17.03	2,835.36	3.13			0.0008	0.0091	-0.0014	-0.0017	1.01
	8619-G53	Duplicación del sitio II de unión a GlnR	25.52	5,893.37	-0.55		38.51	-0.0045	-0.0001	-0.006	-0.0041	-0.13
	8619-G53	Duplicación del sitio II de unión a GlnR	0.14	94.42	-0.38	-5.29		0.0029	0.0076	0.0003	0.0014	0.5
30	8619-G53	Duplicación del sitio II de unión a GlnR	16.19	2,601.51	4.20		24.41	0.002	0.01	-0.0099	-0.0085	2.18
	55083-G3	Duplicación e Inactivación del sitio II de unión a GlnR	4.80	-264.44	4.78	5.11		-0.0006	-0.0009	0.0236	0.0109	0.75
	55083-G3	Duplicación e Inactivación del sitio II de unión a GlnR	-12.88	-2,636.71	-4.47	0.45		-0.0073	0.0043	0.0007	-0.0008	0.11

5

10

15

20

25

30

55083-G3	Duplicación e Inactivación del sitio II de unión a GlnR	-2.94	-195.02	0.38	20.95		-0.0021	-0.0064	0.0112	0.0099	
55083-G3	Duplicación e Inactivación del sitio II de unión a GlnR	-4.77	-1,037.15	-3.36	32.78		-0.0077	-0.011	0.0126	0.0106	
8619-G50	Duplicación e Inactivación del sitio II de unión a GlnR	-7.91	-1,350.82	0.89			-0.0002	-0.0073	0.001	0.0003	-1.14
8619-G50	Duplicación e Inactivación del sitio II de unión a GlnR	14.75	1,629.36	-3.15			0.0069	0.0054	0.0009	0.001	-2.03
8619-G50	Duplicación e Inactivación del sitio II de unión a GlnR	22.59	4,153.68	3.61			0.0011	0.0054	0.0066	0.0047	0.51
8619-G50	Duplicación e Inactivación del sitio II de unión a GlnR	0.34	-15.05	2.15	4.38	14.30	-0.011	0.0081	-0.0148	-0.0086	
8619-G50	Duplicación e Inactivación del sitio II de unión a GlnR	6.64	986.22	3.10		12.29	0.0057	0.0096	-0.0032	-0.004	3.52
8619-G50	Duplicación e Inactivación del sitio II de unión a GlnR	2.46	1,220.73	-2.75	-11.67	6.93	-0.0017	0.0082	-0.0032	0.003	-1.63
8619-G50	Duplicación e Inactivación del sitio II de unión a GlnR	31.73	5,879.59	6.73	0.77		0.0187	0.0369	-0.0316	-0.0305	2.72
8619-G63	Duplicación e Inactivación del sitio II de unión a GlnR, Inactivación de NifH	11.40	2,878.10	3.93	16.47		0.0069	0.0147	-0.0183	-0.02	0.74
8619-G63	Duplicación e Inactivación del sitio II de unión a GlnR, Inactivación de NifH	5.76	1,097.91	1.74	-7.83	15.05	0.0006	0.0151	-0.0245	-0.02	2.77
8619-G63	Duplicación e Inactivación del sitio II de unión a GlnR, Inactivación de NifH	-1.51	375.17	-2.47	-7.19		-0.0079	-0.0127	0.0115	0.01	-1.51
8619-G63	Duplicación e Inactivación del sitio II de unión a GlnR, Inactivación de NifH	-4.37	-245.43	-3.34		8.94	-0.0023	0.006	-0.0049	-0.01	0.33
8619-G64	Duplicación e Inactivación del sitio II de unión a GlnR, Inactivación de NifH	10.09	1,473.78	3.07		21.58	0.0065	0.0017	0.0058	0	-0.4
8619-G64	Duplicación e Inactivación del sitio II de unión a GlnR, Inactivación de NifH	-1.88	515.20	-2.89	-2.17	-1.22	0.0019	0.0031	0.0029	0	0.46
17899-G17	Inactivación del sitio II de unión a GlnR	3.23	167.32	0.65			-0.0091	-0.0144	0.0008	0.0029	
17899-G18	Inactivación del sitio II de unión a GlnR	5.51	-58.73	4.69			0.0030	-0.0055	0.0046	0.0035	

5

10

15

20

25

30

17899-G19	Inactivación del sitio II de unión a GlnR	14.68	842.86	1.94			0.0002	-0.0013	0.0025	0.0012	
53953-G3	Inactivación del sitio II de unión a GlnR	14.84	1,115.23	2.22	-9.50		-0.0076	0.0038	0.0003	0.0004	-1.18
53953-G3	Inactivación del sitio II de unión a GlnR	21.78	3,567.01	7.52	-0.82	22.99	0.002	0.0035	0.0157	0.0071	
53953-G3	Inactivación del sitio II de unión a GlnR	20.42	4,315.39	2.30			0.0019	0.0123	-0.0151	-0.0111	4.17
53953-G3	Inactivación del sitio II de unión a GlnR	4.35	1,374.86	-0.34	-0.56	-9.31	0.0024	-0.012	0.0151	0.0187	-2.38
77155-G3	Inactivación del sitio II de unión a GlnR	19.54	2,874.79	6.79	-3.41	122.01	0.0103	0.0069	-0.0009	0.0026	1.63
77155-G3	Inactivación del sitio II de unión a GlnR	15.11	2,842.66	3.08			0.0022	0.0026	-0.0036	-0.003	3.21
77155-G3	Inactivación del sitio II de unión a GlnR	6.52	1,032.04	0.64	3.06	111.86	-0.002	-0.0048	-0.0035	-0.0052	
77155-G3	Inactivación del sitio II de unión a GlnR	46.74	5,913.38	21.69			0.0204	0.0468	-0.0272	-0.0385	2.8
77155-G3	Inactivación del sitio II de unión a GlnR	-18.41	-2,780.64	-9.77	45.90		-0.0196	-0.0008	-0.0514	-0.0311	0.46
77155-G4	Inactivación del sitio II de unión a GlnR	3.39	120.96	3.56			-0.0001	0.0133	-0.0119	-0.0098	2.59
77155-G4	Inactivación del sitio II de unión a GlnR	-6.06	-1,565.79	0.57	-4.13	73.34	-0.0081	-0.003	-0.0012	0.0061	-0.1
77155-G4	Inactivación del sitio II de unión a GlnR	-8.82	-2,627.00	1.03	4.89	75.27	-0.0053	-0.0039	-0.0105	-0.0076	
77155-G4	Inactivación del sitio II de unión a GlnR	-4.62	-1,430.45	2.35	-11.56	-3.79	-0.0147	0.0053	-0.0164	-0.0153	1.5
77155-G4	Inactivación del sitio II de unión a GlnR	-9.27	-2,161.83	-1.95			-0.0084	-0.0072	0.0076	0.008	-1.13
77155-G5	Inactivación del sitio II de unión a GlnR	11.89	2,655.93	1.78	0.43	103.80	-0.0161	-0.0181	-0.0126	0.0004	0.94
77155-G5	Inactivación del sitio II de unión a GlnR	4.98	909.81	-0.47	5.42	109.97	0.0064	0.0147	-0.0155	-0.0205	
77155-G5	Inactivación del sitio II de unión a GlnR	71.72	10,929.27	21.95			0.032	0.0519	0.0089	-0.0194	1.95
77155-G5	Inactivación del sitio II de unión a GlnR	-8.23	-1,039.91	-5.62	24.29		-0.0101	0.0285	-0.0558	-0.0443	2.3
17899-G34	Inactivación de NifH	28.54	1,414.73	5.92			-0.0067	-0.0101	0.0044	0.0049	
77155-G14	Inactivación de NifH	6.68	2,040.77	-0.50	15.79		0	0.0226	-0.0291	-0.03	2.46
77155-G14	Inactivación de NifH	-22.41	-4,082.80	-1.65			-0.0225	-0.0195	-0.0274	-0.01	-0.68
77155-G15	Inactivación de NifH	0.01	-1,360.39	6.12	-9.61	-12.27	-0.01	0.0037	-0.0138	-0.01	1.26
77155-G15	Inactivación de NifH	-5.12	-618.17	-1.78			-0.0047	0.0085	-0.0171	-0.02	-0.12
77155-G16	Inactivación de NifH	2.84	-25.98	3.96	13.37		-0.004	-0.0018	0.0105	0.01	
77155-G16	Inactivación de NifH	-6.85	-2,359.28	5.76	-0.65		-0.0123	-0.0059	-0.0249	-0.02	1.95
77155-G16	Inactivación de NifH	-12.60	-2,940.99	-3.71	-8.48		0.0289	0.0279	-0.0375	-0.04	
77155-G16	Inactivación de NifH	-12.65	-1,548.44	-5.23			-0.0053	-0.0036	0.0003	0	-0.09
8619-G46	Inactivación de NifH	20.32	983.37	10.89			0.0012	0.0006	0.0006	0	2.18
8619-G46	Inactivación de NifH	8.17	1,524.13	-0.35			0.0003	0.0094	-0.0037	0	1.73

8619-G46	Inactivación de NifH	-3.57	-1,046.69	1.18		-3.91	-0.001	0.0027	0.0071	0	1.01
8619-G46	Inactivación de NifH	-5.21	-391.51	-2.61			0.002	-0.0002	0.0002	0	-3.44
8619-G46	Inactivación de NifH	-13.27	-1,755.52	0.01	-9.50		-0.0049	-0.0057	0.0011	0	0.88
8619-G47	Inactivación de NifH	9.63	3,312.07	-2.83	-1.12	17.62	0.0051	0.0131	-0.0007	-0.01	0.99
8619-G47	Inactivación de NifH	-2.00	-541.73	2.44	6.79	-2.79	0.0079	0.0073	0.0085	0	0.4
8619-G79	Inactivación de NifH	6.15	680.65	4.21	-7.13	11.02	0.0023	-0.0017	0.0058	0	-0.05
8619-G79	Inactivación de NifH	-8.02	-2,498.52	-1.01		-5.93	0.0063	0.0162	-0.0236	-0.02	0.44
8619-G80	Inactivación de NifH	14.56	2,003.80	7.75		8.05	0.0076	0.0177	-0.0096	-0.01	1.1
8619-G80	Inactivación de NifH	5.36	1,763.23	-0.31	-5.70	-4.31	0.0078	-0.0022	0.0193	0.01	-0.5
17899-G40	Inactivación de Orf1	13.69	587.84	5.12			0.0098	0.0013	0.0072	0.0065	

Se trataron múltiples réplicas de trigo de invierno (*Triticum aestivum*) con los microbios descritos en la presente descripción y se cultivaron durante al menos 31 días (intervalo de 31-47 días). Los datos recolectados incluyeron biomasa, área de la hoja, altura de la planta, área de la raíz, nitrógeno de brotes, verdor, NDVI (capturando cuánto más se refleja la luz infrarroja cercana en comparación con el rojo visible; una medida del estado de salud de la planta en función de cómo la planta refleja la luz a determinadas frecuencias), NPCI (índice de proporción de pigmento de clorofila normalizado), PSRI (índice de reflectancia de la senescencia de la planta) y CCI (índice del contenido de clorofila), y comparado con un control sin tratar. Los datos se presentan en la Tabla 5.

Tabla 5: Datos de invernadero del trigo

IOC = Mejora respecto al control (sin tratar); Delta = cambio frente al control (sin tratar)

# de cepa-# de edición	Edición	IOC - Biomasa_digital	delta_área de hoja	IOC_% de altura	IOC_% de N_brotes	delta_verdor_promedio	delta_ND VI_promedio	delta_NPCI_promedio	delta_PSRI_promedio	delta_CCI
68890-G12	Truncamiento de C25 en GlnR	47.23	2,076.22	6.87	75.19	-0.0073	-0.0033	-0.0036	0.006	
68890-G12	Truncamiento de C25 en GlnR	24.98	1,367.48	7.22	56.9	-0.0009	0.0232	-0.0239	-0.029	
68890-G12	Truncamiento de C25 en GlnR	-6.35	-664.73	-3.6		-0.0023	0.0154	0.0002	-0.0061	
77155-G11	Inactivación del sitio II de unión a GlnR	46.81	2,110.07	12.26	55.78	-0.0048	0.0246	-0.0326	-0.0453	
77155-G11	Inactivación del sitio II de unión a GlnR	40.45	2,043.93	2.6	20.9	-0.0072	0.0024	0.0032	0.007	
77155-G15	Inactivación de NifH	31.18	1,873.75	0.92	50.27	0.0066	0.034	-0.02	-0.0352	
77155-G15	Inactivación de NifH	9.11	1,061.11	-3.07		0.0016	0.036	-0.03	-0.0425	
77155-G16	Inactivación de NifH	11.22	1,935.71	6.05		-0.0049	0.0022	-0.01	-0.0031	
77155-G16	Inactivación de NifH	-6.35	-664.73	-3.6		-0.0023	0.0154	0	-0.0061	
77155-G4	Inactivación del sitio II de unión a GlnR	15.89	1,059.51	8.74		-0.0017	-0.0048	0.0003	0.0062	
77155-G4	Inactivación del sitio II de unión a GlnR	2.69	38.62	1.63		0.0012	0.0012	-0.0024	-0.0055	
77155-G4	Inactivación del sitio II de unión a GlnR	-4.51	-190.83	-2.99		-0.0011	0.0003	0.0033	0.0065	

5	8619-G19	Inactivación del sitio II de unión a GlnR	15.21	1,570.31	2.76		0.0011	0.0148	-0.0071	-0.0095	
	8619-G19	Inactivación del sitio II de unión a GlnR	18.5	235.81	6.52		-0.0001	0.0084	-0.0026	0.0008	
	8619-G19	Inactivación del sitio II de unión a GlnR	7.83	1,502.38	-1.55		-0.0035	0.0117	-0.0079	-0.0078	-0.44
	8619-G19	Inactivación del sitio II de unión a GlnR	4.5	1,078.39	-1.65		0.0012	0.0169	-0.0129	-0.0141	5.99
	8619-G19	Inactivación del sitio II de unión a GlnR	-0.55	-109.76	1.39		-0.0009	0.0146	-0.0095	-0.0114	5.92
	8619-G19	Inactivación del sitio II de unión a GlnR	-3.93	-565.59	0.31		0.0033	0.0294	-0.0108	-0.0158	4.1
	8619-G25	Inactivación de CueR	16.71	2,439.87	0.22		0.0017	-0.0063	0.0061	0.0077	2.5
	8619-G25	Inactivación de CueR	14.09	1,550.6	2.7		0.008	0.016	-0.0039	-0.0053	3
	8619-G25	Inactivación de CueR	-7.95	-1,145.5	-0.29		-0.0024	0.0121	-0.0094	-0.0115	0.11
	8619-G25	Inactivación de CueR	-8.09	-1,148.42	-1.54		0.0065	0.0184	-0.0078	-0.0154	-0.38
10	8619-G25	Inactivación de CueR	-15.57	-2,076.79	-4.05		-0.005	0.0135	-0.0043	-0.0081	3.36
	8619-G63	Duplicación e inactivación del sitio II de unión a GlnR, inactivación de NifH	1.45	-23	1.12		-0.0045	-0.006	0	0.0044	3.7
	8619-G63	Duplicación e inactivación del sitio II de unión a GlnR, inactivación de NifH	-2.3	296.42	-3.13		0.0063	0.0203	-0.01	-0.012	-0.2
	68890-G19	Duplicación del sitio II de unión a GlnR	7.04	891.06	-2.97		0.0086	0.0092	-0.0093	-0.0125	3.87
15	68890-G20	Duplicación del sitio II de unión a GlnR	15.97	807.56	5.78		0.0086	0.0133	-0.0046	-0.0079	4.04
	68890-G21	Duplicación del sitio II de unión a GlnR	23.97	1,498.66	7.01		0.0074	0.0082	-0.0064	-0.0105	-2.94
	68890-G24	Truncamiento de C25 en GlnR	10.89	444.37	4.27		0.0050	0.0088	-0.0136	-0.0158	5.73
	68890-G25	Truncamiento de C25 en GlnR	22.70	1,534.34	5.89		0.0092	0.0090	-0.0029	-0.0039	3.63
	68890-G26	Truncamiento de C25 en GlnR	9.93	730.33	1.97		0.0042	0.0035	-0.0039	0.0006	3.3
20	77357-G4	Duplicación del sitio II de unión a GlnR	-16.65	-1,335.77	-2.03		0.0021	0.0101	-0.0096	-0.0017	-0.73
	77357-G5	Duplicación del sitio II de unión a GlnR	-5.98	-536.50	-2.42		0.0005	-0.0013	-0.0085	-0.0020	-1.11
	77357-G8	Duplicación e inactivación del sitio II de unión a GlnR	0.08	805.88	-7.94		-0.0011	-0.0033	-0.0072	-0.0006	4.51
	77357-G9	Duplicación e inactivación del sitio II de unión a GlnR	9.23	888.84	-0.16		0.0030	0.0020	-0.0043	-0.0058	
	77359-G17	Duplicación del sitio II de unión a GlnR	-8.01	-126.67	-8.16		-0.0039	-0.0108	0.0089	0.0086	3.32
	77359-G18	Duplicación del sitio II de unión a GlnR	14.67	1,347.70	-4.61		-0.0040	-0.0073	-0.0045	-0.0010	1.84
	77359-G21	Duplicación e inactivación del sitio II de unión a GlnR	11.56	1,160.93	-1.85		-0.0073	-0.0122	-0.0102	0.0007	0.08
	77359-G22	Duplicación e inactivación del sitio II de unión a GlnR	0.79	101.63	-0.63		-0.0087	-0.0108	-0.0059	0.0019	-2.94

Se plantaron cuatro ensayos de campo separados de semillas de elote tratadas, y cada ensayo tenía un régimen de fertilizante de nitrógeno diferente. El ensayo 1 tuvo una entrada de nitrógeno normal y los ensayos 2, 3 y 4 tuvieron una entrada de nitrógeno reducida (-0.0056 kg/m² (50 lb/acre). Parámetros del ensayo: Tratamientos: 18 (4 ensayos – 6x6 en cuadrado latino); Réplicas: 6; Diseño: cuadrado latino (4); Tamaño de la parcela: 4 hileras (3,048 m (10 pies)) de ancho por 12,192-15,24 m (40-50 pies) de largo.

Se plantaron cuatro ensayos de campo separados de elote tratado en surcos, y cada ensayo tenía un régimen de fertilizante diferente. El ensayo 1 tuvo una entrada de nitrógeno normal y los ensayos 2, 3 y 4 tuvieron una entrada de nitrógeno reducida (-0.0056 kg/m² (50 lb/acre). Tratamientos: 12 (2 ensayos – 6x6 en cuadrado latino); Réplicas: 6; Diseño: cuadrado latino; Tamaño de la parcela: 4 hileras (3,048 m (10 pies)) de ancho por 12,192-15,24 m (40-50 pies) de largo. Los datos se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6: Datos del ensayo de campo de maíz

Protocolo	Cepa-Edición	Descripción de la edición	Rendimiento frente a control kilogramos (bushels)/metros cuadrados (acre)
N bajo	8619-G29	Inactivación de C25 en CueR	-1.31
N bajo	8619-G25	Inactivación de CueR	-0.02
N bajo	8619-G39	Duplicación e inactivación del sitio II de unión a GlnR	1.24
N bajo	77155-G8	Duplicación e inactivación del sitio II de unión a GlnR	0.55
N bajo	53953-G3	Inactivación del sitio II de unión a GlnR	2.67
N bajo	8619-G32	Inactivación del sitio II de unión a GlnR	0.17
N bajo	8619-G32	Inactivación del sitio II de unión a GlnR	1.16
N bajo	8619-G21	Inactivación del sitio II de unión a GlnR	3.08
N bajo	68890-G5	Inactivación del sitio II de unión a GlnR	1.09
N bajo	53953-G3	Inactivación del sitio II de unión a GlnR	0.11
N bajo	8619-G50	Inactivación y duplicación del sitio II de unión a GlnR	4.40
N bajo	68890-G5	Inactivación del sitio II de unión a GlnR	2.58
N bajo	77155	tipo silvestre	2.02
N bajo	77155	tipo silvestre	4.08
N bajo	68890	tipo silvestre	-0.59
N bajo	53953	tipo silvestre	3.37
N bajo	8619	tipo silvestre	0.64
N bajo	6219	tipo silvestre	0.52
N normal	8619-G25	Inactivación de CueR	2.42
N normal	8619-G32	Inactivación del sitio II de unión a GlnR	3.05
N normal	8619-G32	Inactivación del sitio II de unión a GlnR	-0.98
N normal	8619-G21	Inactivación del sitio II de unión a GlnR	0.46
N normal	68890-G5	Inactivación del sitio II de unión a GlnR	-2.86
N normal	53953-G3	Inactivación del sitio II de unión a GlnR	0.30
N normal	8619-G50	Inactivación y duplicación del sitio II de unión a GlnR	3.87
N normal	77155	tipo silvestre	0.69
N normal	8619	tipo silvestre	2.23

Se plantaron ensayos de campo de semillas de trigo de invierno tratadas (10 ubicaciones de ensayo) y semillas de trigo de primavera tratadas (22 ubicaciones de ensayo), y cada ensayo tuvo un régimen de fertilizante diferente. El ensayo 1 (ID de tratamiento N normal) se fertilizó mediante el uso de prácticas agronómicas estándar, los ensayos 2 y 3 (ID de tratamiento N bajo) recibieron el 50 % del nitrógeno que se aplicó al ensayo 1. Los datos se muestran en la Tabla 7 (trigo de invierno) y la Tabla 8 (trigo de primavera).

Tabla 7: Datos del ensayo de campo de trigo de invierno

Protocolo	Cepa-Edición	Descripción de la edición	Rendimiento frente a control
N bajo	17911	tipo silvestre	1.93
N bajo	17911-G12	Truncamiento de C25 en GlnR	2.13
N bajo	17899	tipo silvestre	1.06
N bajo	17899-G13	Truncamiento de C25 en GlnR	3.06

Tabla 8: Datos del ensayo de campo de trigo de primavera

Protocolo	Cepa-Edición	Diana	Rendimiento frente a control
N normal	8619	Tipo silvestre	0.79
N normal	53953-G3	Inactivación del sitio II de unión a GlnR	1.46
N normal	8619-G32	Inactivación del sitio II de unión a GlnR	0.51
N normal	8619-G25	Inactivación de CueR	0.77
N normal	8619-G58	Truncamiento de C25 en CueR, inactivación del sitio II de unión a GlnR	1.52
N bajo	8619	Tipo silvestre	1.18
N bajo	53953-G3	Inactivación del sitio II de unión a GlnR	0.87
N bajo	8619-G32	Inactivación del sitio II de unión a GlnR	1.28
N bajo	8619-G25	Inactivación de CueR	2.58
N bajo	8619-G58	Truncamiento de C25 en CueR, inactivación del sitio II de unión a GlnR	0.12

Estos datos demuestran que, aunque es difícil de lograr, pueden impartirse capacidades de fijación de nitrógeno mejoradas a las cepas de *Paenibacillus* mediante la modificación de varios sitios dentro del genoma microbiano, que incluyen los loci del sitio I de unión a GlnR, el sitio II de unión a GlnR, Orf1 y/o CueR, para la mejora de las plantas.