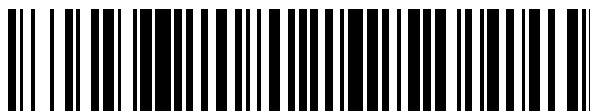


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 817 004**

51 Int. Cl.:

C12N 1/20 (2006.01)

A01N 63/20 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.07.2016** **PCT/GB2016/052289**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.02.2017** **WO17017440**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.07.2016** **E 16753687 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.07.2020** **EP 3328989**

54 Título: **Novedosa cepa de *Gluconacetobacter diazotrophicus* (Gd) y uso de la misma en agricultura**

30 Prioridad:

28.07.2015 GB 201513277

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

06.04.2021

73 Titular/es:

AZOTIC TECHNOLOGIES LTD. (100.0%)
R9 Building N2 Chorley Business & Technology
Centre Euxton Lane Euxton
Chorley, Lancashire PR7 6TE, GB

72 Inventor/es:

DENT, DAVID;
PATEL, DHAVAL y
DEVINE, GARY

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 817 004 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Novedosa cepa de *Gluconacetobacter diazotrophicus* (Gd) y uso de la misma en agricultura

La presente invención se refiere a una novedosa cepa de la bacteria fijadora de nitrógeno *Gluconacetobacter diazotrophicus* (Gd). La cepa tiene buena utilidad en la agricultura, en términos de capacidad para colonizar células vegetales intracelularmente, dando lugar a una fijación de nitrógeno particularmente eficaz.

La *Gluconacetobacter diazotrophicus* (Gd) ha sido bien estudiada por sus actividades promotoras de la fijación de nitrógeno y del crecimiento de las plantas como se revisa en Eskin et al. International Journal of Agronomy (2014):1-13. Sin embargo, se ha mostrado que ciertas cepas de Gd son particularmente ventajosas en el tratamiento de las plantas, puesto que son capaces de establecerse ellas mismas intracelularmente dentro de las células vegetales, a la vez que presentan independencia de especies y de tejido (Cocking et al., In vitro Cellular & Developmental Biology Plant (2006) 42 (1). Estas propiedades, combinadas con su capacidad para desplazarse a través de una variedad de tejidos de planta, hacen que dichas cepas sean más capaces de proporcionar los beneficios a las plantas de cultivo objetivo.

Sin embargo, existe una amplia variedad de cepas de Gd y todavía no ha sido posible proporcionar medios para identificar fácilmente las cepas que tienen estas propiedades beneficiosas.

Además, un aspecto importante de los biofertilizantes ha sido proporcionar una alternativa a los fertilizantes químicos de una forma respetuosa con la naturaleza a las plantas de cultivo agrícola. Sin embargo, sería útil validar la eficacia de cualquier tratamiento en curso en condiciones de campo, de manera que un agricultor fuera capaz de determinar qué niveles de fertilizante de nitrógeno, si los hay, se requieren suministrar para potenciar las condiciones de crecimiento.

Los inventores han encontrado que una cepa de Gd ventajosa específica contiene varias secuencias únicas que no se encuentran en otras especies de Gd, ni en otras especies, que incluyen especies de plantas. Esto significa que la cepa beneficiosa puede ser fácilmente identificada. Esto es útil tanto en la monitorización de los tratamientos en los campos como en la investigación para identificar cepas beneficiosas relacionadas.

Según la presente invención, se proporciona una cepa fijadora de nitrógeno de *Gluconacetobacter diazotrophicus* (Gd) depositada por CABI en el Reino Unido con el Tratado de Budapest con número de acceso de depósito IMI504958.

Esta cepa comprende SEQ ID NOs 1-10 y un plásmido individual de aproximadamente 17566 pb de tamaño.

Se ha encontrado que la cepa es particularmente eficaz en la colonización intracelular de células vegetales dando como resultado la beneficiosa fijación del nitrógeno. En particular, se ha encontrado que el uso de la cepa de la invención conduce a mejoras del rendimiento en cultivos tales como cultivos de cereales como maíz y trigo. Alternativamente, se pueden lograr rendimientos similares incluso con reducción en las aplicaciones de fertilizantes de nitrógeno tradicionales.

Las secuencias que tienen números de SEQ ID 1-10 (mostradas en la Tabla 1 adjunta) en lo sucesivo están presentes en la cepa de la invención, pero no aparecen en análisis genómicos de otras cepas disponibles.

La presencia de un plásmido, en particular de este tamaño, se diferencia de una cepa previamente conocida de Gd, UAP5541, que se ha informado que está ausente en los plásmidos (Luis E. Fuentes-Ramiérez et al., FEMS Microbiology Ecology 29 (1999) 117-128). Además, el tamaño del plásmido es más pequeño que el previamente informado con respecto a las cepas PAL5 que contienen un plásmido individual (Giongo et al. Standards in Genomic Sciences, Mayo de 2010, Volumen 2, Número 3, pp 309-317 doi: 10.4056/sigs.972221).

El plásmido de la cepa de la invención también se puede caracterizar porque se restringe a dos fragmentos por la enzima de restricción Eco RI, en donde los fragmentos tienen aproximadamente 12 Kb y aproximadamente 5,6 kb de tamaño, respectivamente. Además, el plásmido carece de varias secuencias clave que se ha identificado previamente que están presentes en el plásmido de PAL5. Estas secuencias se muestran como SEQ ID N° 65, 66, 67 y 68 en el listado de secuencias adjunto. Así, la ausencia de estas secuencias particulares puede proporcionar un rasgo caracterizador adicional de la cepa de la invención.

El análisis de gráficos de puntos del plásmido de esta cepa se realizó frente al plásmido pequeño (NC_010123; 16610 pb) del análisis de secuencias de ADN Pal5 (M. Bertalan et al. BMC Genomics (2009) 10:450 DOI: 10.1186/1471-2164-10-450) usando el software GEPARD V 1.30 (Krusiek et al. Bioinformatics 2007; 23(8): 1026-8). Es interesante señalar que no se produjo ningún gráfico cuando se compararon las secuencias de ADN de los dos plásmidos. Esto indica que la homología es tan baja que no se podría establecer similitud estructural por el software; confirmando así que el plásmido es un plásmido individual y único.

Para su uso en agricultura, la cepa de la invención se formula adecuadamente en una composición agrícola.

- Así, un aspecto adicional de la invención comprende una composición agrícola que comprende una cepa de la invención en combinación con un vehículo agrícolamente aceptable. En general, la concentración de bacterias fijadoras de nitrógeno que está presente en la composición variará dependiendo de factores tales como el modo de administración, el tipo de planta o semilla que está tratándose y la cepa particular de Gd usada y el nivel de fijación de nitrógeno potenciado requerido. Normalmente, sin embargo, las composiciones comprenderán una disolución que contiene desde 1 hasta 1×10^9 bacterias por mililitro de composición, por ejemplo desde 10^1 a 10^3 bacterias por mililitro de composición, por ejemplo, desde 50-200 bacterias por mililitro de composición tal como 100 bacterias por mililitro de composición. Dicha composición se puede obtener cultivando la cepa de bacteria hasta un nivel fácilmente detectable, por ejemplo, examinando la densidad óptica y luego diluyendo la disolución en consecuencia.
- La cepa de Gd puede ser el único componente activo de la composición, o se puede combinar con componentes agroquímicamente activos adicionales tales como insecticidas, fungicidas o reguladores del crecimiento de las plantas, siempre que estos sean compatibles con Gd.
- La composición de la invención comprende adecuadamente un disolvente, tal como agua, aunque si se requiere se pueden usar disolventes orgánicos, tales como aceites vegetales o hidrocarburos tales como aceites de parafina o de queroseno. Adecuadamente, cualquier disolvente orgánico es un aceite vegetal tal como aceite de soja, aceite de girasol, aceite de canola (aceite de semilla de colza), aceite de semilla de algodón, aceite de ricino, aceite de linaza o aceite de palma, o mezclas de estos.
- La composición puede comprender además aditivos o excipientes tales como espesantes, dispersantes, diluyentes, humectantes, vehículos sólidos, etc., como se conoce en la técnica.
- La composición puede comprender además un polisacárido o un tensioactivo agrícolamente aceptable o una combinación de estos. Los inventores han encontrado que dichos componentes pueden potenciar la actividad de la composición, como se describe en una solicitud de patente británica en tramitación junto con la presente. Los polisacáridos adecuados incluyen polisacáridos de hidrocoloide derivados de fuentes vegetales, animales o microbianas.
- En particular, estos incluyen exudados de polisacárido de goma tales como goma arábica, goma ghatti, goma karaya y goma tragacanto, derivados celulósicos tales como carboximetilcelulosa, metilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa o celulosa microcristalina, almidones y derivados que incluyen, por ejemplo, almidón de maíz, almidón de tapioca, almidón de patata, almidón de arroz, almidón de trigo y versiones modificadas de los mismos, tales como almidón pregelatinizado, almidón oxidado, almidón etilado, dextrinas de almidón o maltodextrina, pectina, polisacáridos derivados de alga marina tales como agar, alginatos, carragenina y furcellarano, gomas de semillas tales como goma guar y goma de semilla de algarrobo, polisacáridos derivados de la fermentación microbiana, tales como goma xantana y goma gellan, y polisacáridos que contienen nitrógeno tales como quitosano; o mezcla de estos.
- El polisacárido puede ser un exudado de polisacárido de goma, tal como goma arábica, goma ghatti, goma karaya o goma tragacanto. Un ejemplo particular del polisacárido es goma arábica.
- La cantidad de polisacárido presente en la composición puede variar dependiendo de factores tales como el modo de administración, el tipo de planta o semilla que está tratándose y el nivel de fijación de nitrógeno potenciado requerido. Esto variará dependiendo de diversos factores, tales como el polisacárido particular usado, el tipo de planta o semilla que está tratándose y el método de administración. Sin embargo, normalmente, se usa una composición que comprende desde 0,1 hasta 1 % p/p, por ejemplo desde 0,1 hasta 0,5 % p/p tal como aproximadamente 0,3 % p/p de polisacárido.
- La composición puede comprender además un tensioactivo o detergente que incluye en particular un detergente no iónico, tal como el comercializado con el nombre comercial 'Tween'®, por ejemplo Tween 80. Tween 80 es un detergente no iónico; compuesto por 70 % del ácido graso ácido oleico y el resto una combinación de ácido linoleico, palmítico y esteárico. El pH de una disolución al 1 % está en el intervalo de desde 5,5-7,2. Se usa ampliamente para sustancias emulsionantes y dispersantes en productos medicinales y alimenticios. Tiene poca o ninguna actividad como agente antibacteriano (Dawson et al. (1986) Data for Biochemical Research, 3ª ed., Oxford University Press (New York, NY: 1986), p. 289). La cantidad de tensioactivo incluida varía dependiendo de diversos factores, tales como el tensioactivo particular usado, el tipo de semilla que está tratándose, el modo de administración, el tipo de planta o semilla que está tratándose y el nivel de fijación de nitrógeno potenciado requerido. Sin embargo, normalmente, una composición comprende desde 0,0005 hasta 0,2 % v/v, por ejemplo desde 0,0005 hasta 0,15 % v/v, tal como aproximadamente 0,001 % v/v.
- Adecuadamente, en la composición también se incluye un nutriente para la cepa de Gd. Los ejemplos incluyen una disolución al 3 % p/v de sacarosa como se describe en el documento de patente EP-B-1422997.
- Como por lo general todos los componentes de las composiciones son productos naturales, el impacto medioambiental de los tratamientos de la invención es bajo y las composiciones pueden cumplir relativamente fácilmente los requisitos normativos.

La formulación se puede aplicar como un recubrimiento de semilla como se ha descrito anteriormente. En particular, la formulación se puede aplicar a semillas, ya sea pulverizando o por inmersión, y entonces las semillas se secan formando un recubrimiento residual que comprende encima la cepa de Gd.

Se puede potenciar la capacidad de fijación del nitrógeno de una planta administrando a la planta o a su entorno la cepa de Gd de la presente invención, o una composición agrícola que la comprende, de manera que la cepa de Gd colonice las plantas y en particular entre en las células vegetales (colonización intracelular).

Esto se puede lograr en una variedad de formas. Por ejemplo, la cepa de Gd se puede administrar a un medio de crecimiento de la planta, en particular durante o después de la germinación, usando un método como se describe, por ejemplo, en el documento de patente EPA-1714545. En este caso, la administración de niveles en particular bajos, por ejemplo desde 1-100 bacterias por mililitro de inóculo, a los medios de crecimiento, tales como agar, se aplica a céspedes, en, por ejemplo, durante la germinación o poco después de ella, por ejemplo hasta 7 días después.

Alternativamente, la cepa de Gd se puede aplicar a una semilla, en particular a la superficie de una semilla, por ejemplo en una impregnación previa a la germinación o, en una realización particular, como un recubrimiento de semillas. Alternativamente, la una o más composiciones se pueden aplicar a un medio de crecimiento sobre el que se deja que germinen las semillas. Dichos medios de crecimiento incluyen medios artificiales tales como geles de agar, así como tierras o compost en los que las semillas están a punto de sembrarse o se han sembrado.

La cepa de Gd se puede aplicar a plantas en crecimiento y en particular a una herida de la planta. Esta técnica se describe en la solicitud de patente internacional del solicitante en tramitación junto con la presente N° PCT/GB2015/052170. En este método, las bacterias fijadoras de nitrógeno se administran a la herida de una planta en crecimiento. La herida puede ser el resultado de daño accidental o natural, tras lo cual la disponibilidad de nitrógeno adicional puede facilitar el crecimiento de reparación. Sin embargo, la herida puede ser el resultado del daño provocado por acciones tales como segar (césped de disfrute), cortar (cultivos de silaje y de heno), consumo por ganado (césped de pasto) o por recogida. Por tanto, se puede llevar a cabo una etapa preliminar de causar 'daño' al césped, en particular por siega, corte o por recogida antes de la administración de las bacterias fijadoras de nitrógeno. Las bacterias fijadoras de nitrógeno se aplican adecuadamente en el plazo de un periodo de tiempo relativamente corto desde que se llevan a cabo dichas acciones, por ejemplo, en el plazo de 48 horas, por ejemplo en el plazo de 24 horas, tal como en el plazo de 10 horas y adecuadamente en el plazo de 1-2 horas desde el daño que se causa a la planta.

La administración de las bacterias se puede lograr por la aplicación de una formulación adecuada al área de heridas, en particular en forma de una composición. La composición puede estar en forma de un líquido, gel, pasta que se puede aplicar directamente o en forma diluida, o puede estar en forma de una composición sólida tal como una composición de polvo o gránulo que se disolverá en líquido tal como agua antes de uso. En composiciones sólidas, las bacterias se usarán, en general, en forma secada, por ejemplo en forma liofilizada, que son reconstituibles tras la adición de agua. Sin embargo, la resistencia a la desecación de la cepa de la presente invención puede significar que no se requiere la liofilización.

La composición puede estar en una forma adecuada para pulverizar sobre las plantas y así comprenderá un concentrado para dilución que puede estar en forma de un líquido o sólido, en particular en forma de un líquido, o puede comprender una composición acuosa diluida que se puede pulverizar directamente.

La cantidad de bacterias fijadoras de nitrógeno administradas en cualquier caso particular variará dependiendo de factores tales como el tipo de semilla o la planta que está tratándose, el nivel de mejora de la germinación requerida y el método de administración. Normalmente, sin embargo, las semillas o su entorno, tal como el medio de crecimiento, se inoculan con una disolución que contiene desde 1 hasta 1×10^9 bacterias por mililitro de inóculo, por ejemplo desde 1-100 bacterias por mililitro de inóculo, por ejemplo desde 10-80 bacterias por mililitro de inóculo tal como 50 bacterias por mililitro de inóculo. Dicha disolución se puede obtener cultivando las bacterias hasta un nivel fácilmente detectable, por ejemplo, examinando la densidad óptica y luego diluyendo la disolución en consecuencia.

La cepa de Gd se puede administrar junto con o en combinación con una cepa de *Terribacillus*, como se describe en la solicitud de patente internacional del solicitante en tramitación junto con la presente N° PCT/GB2015/052171. Los inventores han encontrado que dicha cepa puede potenciar la actividad de Gd. Las cepas de *Terribacillus* incluyen *Terribacillus saccharophilus*, *Terribacillus halophilus*, *Terribacillus goriensis* o *Terribacillus aidingensis*, pero en particular es una cepa de *Terribacillus saccharophilus*. El *Terribacillus* se administra o por separado o en mezcla con la cepa de Gd. El *Terribacillus* puede estar en mezcla íntima con la cepa de Gd, o se puede administrar en una forma de cocultivo, o de cultivo mixto.

Las plantas adecuadas incluyen cultivos leguminosos y no leguminosos y ornamentales. La planta no leguminosa seleccionada preferentemente de la familia de céspedes *Graminae* incluye arroz [*Oryza sativa*], trigo [*Triticum aestivum*] y maíz [*Zea mays*]. La planta no leguminosa también puede ser una seleccionada de familias tales como: *Solanaceae* (incluye tomate, patata y tabaco), *Brassicaceae* / *Cruciferae* (incluye coles, nabos, colza oleaginosa y la planta modelo *Arabidopsis thaliana*), *Malvaceae* (incluye algodón), *Compositae* / *Asteraceae* (incluye girasol y lechuga), *Euphorbiaceae* (incluye yuca), *Chenopodiaceae* (incluye remolacha azucarera). La planta leguminosa se selecciona

preferentemente de *Leguminosae* (incluye soja, trébol, alfalfa, guisantes y otras judías). Las semillas tratadas pueden ser de plantas monocotiledóneas o dicotiledóneas, pero en particular son plantas monocotiledóneas tales como céspedes, arroz, trigo, cebada, sorgo, mijo, avena, centeno y maíz. En particular, las semillas tratadas según el método de la invención son céspedes tales como *Lolium perenne*.

- 5 Otros cultivos enumerados anteriormente pueden usar la cepa de Gd para facilitar la supervivencia en condiciones de pH no óptimo como se ha descrito anteriormente.

Una vez inoculada como se describe en el presente documento, la cepa de Gd de la invención colonizará las células vegetales y actuará simbióticamente dentro de la planta para potenciar la fijación de nitrógeno.

- 10 Así, un aspecto adicional de la invención proporciona una planta o semilla que se ha colonizado por la cepa de Gd como se ha descrito anteriormente. En particular, la cepa de Gd se localiza intracelularmente en células vegetales vivas.

Los inventores han encontrado que la cepa Gd intracelular pasará de generación a generación y que así las semillas y otra descendencia obtenida de las semillas y plantas de la invención también comprenderán la cepa de Gd intracelular. Dicha semilla o descendencia forma aún un aspecto adicional de la invención.

- 15 Potenciando la fijación de nitrógeno, las plantas pueden mostrar propiedades potenciadas, tales como características de crecimiento más rápido o mejorado y/o rendimiento mejorado. En un aspecto adicional, la invención proporciona un método de producción de un producto de planta, comprendiendo dicho método cultivar una planta colonizada con la cepa de Gd como se ha descrito anteriormente, y obtener el producto de la misma.

- 20 Además, los inventores observaron que ciertas plantas colonizadas por bacterias fijadoras de nitrógeno, en particular plantas intracelularmente colonizadas, muestran no solo características de crecimiento o rendimiento potenciadas, sino que también muestran un aumento del nivel de clorofila en comparación con plantas sin dichas bacterias intracelulares. Las plantas que parece que demuestran particularmente esta propiedad son céspedes que incluyen céspedes de pasto, de disfrute y para carreras de caballos. Esto es particularmente ventajoso en el contexto de dichas plantas, ya que altos niveles de clorofila dan lugar a una mejor coloración verde, que es altamente deseable en un contexto ornamental.

Por tanto, la cepa de Gd de la invención se puede usar para aumentar la clorofila en los céspedes.

- 30 Los céspedes pueden incluir céspedes tales como céspedes de pasto, de disfrute, para carreras de caballos u ornamentales, por ejemplo, *Lolium spp.* tales como *Lolium perenne*, *Lolium multiflorum*, *Lolium persicum*, *Agrostis spp.* tales como *Agrostis castellana*, *Agrostis capillaris*, *Agrostis stolonifera*, *Festuca spp.* tales como *Festuca rubra*, *Festuca ovina*, *Festuca longifolia*, *Festuca arundinacea*, *Poa spp.* tales como *Poa annua*, *Poa Pratensis* y *Poa trivialis*, *Paspalum vaginatum*, *Cynodon spp.* tal como *Cynodon dactylon*, *Zoysia spp.* tales como *Zoysia japonica*, *Zoysia tenuifolia*, o *Emerald Zoysia*, *Stenotaphrum secundatum*, *Buchloe dactyloides* o *Pennisetum clandestinum*. Sin embargo, generalmente, *Lolium spp.* y/o *Festuca spp.* forman la base de muchos céspedes de disfrute o para carreras de caballos.

- 35 La cepa de Gd se puede administrar a céspedes usando cualquiera de las técnicas descritas en el presente documento, pero en particular, se puede aplicar a las semillas de céspedes como un recubrimiento, o a heridas de los céspedes causadas después del corte.

La cepa se puede identificar y/o monitorizar usando un kit de diagnóstico que comprende medios para determinar la presencia en una muestra de al menos una secuencia de ácidos nucleicos seleccionada de SEQ ID NOs 1-10.

- 40 Como se trata en el presente documento, las SEQ ID NO 1-10 representan secuencias únicas y novedosas, que aparecen en la cepa de Gd de la invención. Así, proporcionan un medio de identificación de esta cepa beneficiosa. Además, la cepa es sensible a la detección usando cebadores que no reaccionan de forma cruzada con una especie de planta.

- 45 Además, puesto que la cepa puede colonizar células vegetales hospedadoras intracelularmente, es capaz de desplazarse eficazmente por la planta. Se puede usar un kit para proporcionar una evaluación de la colonización por Gd después de la germinación en una etapa temprana y comprobar su eficiencia. Esto permitirá entonces a los agricultores tomar una "decisión informada" sobre la existencia y el grado de colonización y si se requiere cuánto fertilizante de nitrógeno basado en producto químico se requerirá aplicar. Este nivel adicional de seguridad proporciona 'garantía' a los agricultores de que sus cultivos están siendo bien cuidados, incluso cuando se usa un fertilizante respetuoso con la naturaleza y el cultivo en forma de Gd.

El kit puede comprender medios para determinar la presencia de más de una de las secuencias de ácidos nucleicos de SEQ ID NOs 1-10, por ejemplo hasta 10, tal como hasta 5, o hasta 3 de dichas secuencias de ácidos nucleicos de SEQ ID NOs 1-10. De esta forma, se proporcionaría un kit de diagnóstico fiable.

La detección de plásmidos, por ejemplo por aislamiento usando un kit de aislamiento de plásmidos comercialmente disponible, puede proporcionar confirmación adicional de la identificación de la cepa beneficiosa. En particular, cualquier plásmido identificado debe ser inferior a 27455 pb de tamaño, por ejemplo aproximadamente 17566 pb. La presencia de un plásmido, en particular de este tamaño, se diferencia de una cepa de Gd previamente conocida, UAP5541, que se ha informado que está ausente en plásmidos (Luis E. Fuentes-Ramírez et al., FEMS Microbiology Ecology 29 (1999) 117-128). Además, el tamaño del plásmido es más pequeño que el previamente informado con respecto a las cepas de PAL5 que contienen un único plásmido.

El plásmido se puede someter a corte, en particular por medio de una enzima de restricción Eco RI, dando dos fragmentos de aproximadamente 12 kb y aproximadamente 5,6 kb.

El kit de diagnóstico puede comprender además medios para determinar la presencia de al menos una secuencia de ácidos nucleicos que es característica de la cepa de Gd, por ejemplo 2, o 3 secuencias de ácidos nucleicos que son características de la cepa. Si se conoce que la muestra contiene la cepa de Gd, una determinación positiva de esta determinación serviría de 'control' confirmando que la prueba se ha llevado a cabo eficazmente.

Los ejemplos particulares de dichas secuencias se muestran como SEQ ID NOs 11-13 en la Tabla 2 en lo sucesivo. Estos son responsables de la detección de la cepa de Gd en una variedad de cultivos, sin reaccionar de forma cruzada con especies de plantas.

Además, un kit puede comprender medios para detectar secuencias que no se encuentran en la cepa de la invención, para proporcionar un control negativo. Los ejemplos de dichas secuencias se muestran como SEQ ID Nos 65-68.

Un kit puede comprender medios para detectar la presencia de una secuencia de ácidos nucleicos específica de planta, tal como un ácido nucleico específico de cloroplasto que se amplifica universalmente a partir de ADN de planta. La inclusión de dichos medios puede servir de control cuando el kit se usa en el contexto de la detección de Gd dentro de una especie de planta, ya que este medio producirá una señal detectable, incluso en ausencia de Gd. Si falla esta señal, esto indicaría un fallo de la prueba en vez de que necesariamente no está Gd presente. Un conjunto de cebadores de cloroplastos particular que está comercialmente disponible de Thermo Scientific. Product como Phire Plant Direct PCR Master Mix, se basa en la divulgación por Demesure B et al (1995) Molecular Ecology 4:129-131.

Los medios para detectar la presencia de las secuencias de ácidos nucleicos pueden adoptar diversas formas como sería entendido en la técnica.

Donde los ácidos nucleicos comprenden genes que se expresan, el kit puede comprender medios para detectar las proteínas expresadas. Dichos medios pueden incluir pruebas específicas de proteína tales como análisis inmunoquímicos que utilizan anticuerpos específicos para las proteínas para inmovilizar y/o detectar las proteínas, tales como técnicas de ELISA o de RIA, o métodos inmunolectroforéticos tales como transferencia Western.

Sin embargo, se prefiere que un kit comprenda medios para detectar ácidos nucleicos específicos por sí mismos.

En particular, se pueden detectar ácidos nucleicos usando cualquiera de las técnicas disponibles que incluyen ensayos de unión de ácidos nucleicos e inmunoensayos usando anticuerpos producidos contra formas haptenizadas de los ácidos nucleicos. La detección puede implicar reacciones de amplificación de ácidos nucleicos, y así en particular los kits pueden comprender uno o más cebadores de amplificación que se dirigen a la o cada secuencia de ácidos nucleicos que se detecta.

Como entendería un experto, cuando la detección de una secuencia se lleva a cabo usando una reacción de amplificación, no sería necesario amplificar la secuencia entera, sino solo un fragmento característico de la secuencia entera, por ejemplo un fragmento de al menos 10, y adecuadamente al menos 50 pares de bases. Así, el tamaño de la secuencia que se puede amplificar podría estar en el intervalo de desde 10-3070 pares de bases, y adecuadamente desde 20-2000 pares de bases, por ejemplo desde 50-500 pares de bases, tal como desde 100-300 pares de bases. El tamaño del fragmento dependerá de la naturaleza de la reacción de detección que se usa, pero debe ser suficiente para garantizar que el producto sea característico de SEQ ID NOs 1-10 o variantes como se han definido anteriormente, y así no está presente en otras secuencias, en particular secuencias de plantas. Donde se amplifica más de una secuencia, se pueden seleccionar para ser tamaños diferentes, de manera que puedan ser fácilmente diferenciadas durante la detección, usando técnicas tales como separación basándose en tamaño, o análisis de los puntos de fusión.

Si se requiere, un kit puede comprender además uno o más reactivos adicionales necesarios para llevar a cabo una reacción de amplificación de ácidos nucleicos. Así, puede incluir enzimas tales como polimerasas, sales tales como sales de magnesio o de manganeso, tampones y nucleótidos como sería entendido en la técnica.

Un kit puede incluir, si se requiere, medios para detectar los productos de amplificación. Dichos medios pueden incluir colorantes o sondas, en particular sondas marcadas que se unen al producto intermedio de la secuencia diana con los cebadores. Alternativamente, los cebadores se pueden marcar ellos mismos para facilitar la detección.

Las reacciones de amplificación de ácidos nucleicos adecuadas incluyen reacciones que utilizan ciclado térmico tal como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y la reacción en cadena de la ligasa (LCR), así como reacciones de amplificación isotérmica, tal como amplificación basada en secuencias de ácidos nucleicos (NASBA), amplificación por desplazamiento de cadenas (SDA), amplificación mediada por la transcripción (TMA), amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP) y amplificación por círculo rodante, 3SR, amplificación por ramificación (como se describe por Zhang et al., Molecular Diagnosis (2001) 6 No 2, p 141-150), amplificación por polimerasa recombinasa (disponible de TwistDx) y otros. La amplificación de ácidos nucleicos puede usar PCR, por ejemplo PCR cuantitativa (qPCR), para proporcionar información referente al grado de colonización.

Alternativamente, la amplificación es por una reacción de LAMP. Los ensayos de LAMP utilizan al menos cuatro y adecuadamente seis cebadores que se diseñan para actuar en seis regiones diferentes de la secuencia diana. Siempre habrá dos cebadores externos (F3 y B3) y dos cebadores internos (FIP y BIP). Opcionalmente, además, existen dos cebadores de bucle (FLoop y BLoop). El uso de cebadores de bucle reduce normalmente el tiempo de amplificación y aumenta la especificidad del ensayo. Los cebadores FIP y BIP consisten en F2, complementario a la región F2c de la secuencia molde, y F1c, idéntico a la región F1 del molde. Se necesita considerar cuatro características principales para garantizar un diseño de cebadores LAMP satisfactorio: la temperatura de fusión de los cebadores (T_m), dada a 55-65 °C para cebadores F3, FIP, BIP y B3 y ≥ 65 °C para FLoop y BLoop; un contenido de GC de 50-60 % en las secuencias de cebadores; la ausencia de formación de estructuras secundarias y estabilidad en los extremos de cada cebador; y finalmente la distancia entre regiones de cebadores. Se desvelan en lo sucesivo ejemplos de los conjuntos de cebadores de LAMP adecuados.

Se puede determinar la presencia de los productos de reacciones de amplificación usando cualquier tecnología disponible. Así, se pueden incluir técnicas donde se separan productos sobre un gel basándose en el tamaño y/o la carga y se detectan, tal como por electroforesis en gel de agarosa. Alternativamente, se pueden detectar *in situ*, usando, por ejemplo, usando colorantes intercalantes o sondas o cebadores marcados. Se conoce la detección de los productos de amplificación usando una amplia variedad de sistemas de señalización y de detección. Muchos de estos sistemas pueden funcionar en 'tiempo real', que permite que el progreso de la amplificación se monitorice a medida que avanza, permitiendo la cuantificación del producto. Muchos de dichos sistemas utilizan marcas y en particular marcas fluorescentes que están asociadas con elementos tales como cebadores y sondas usados en el sistema de amplificación y que se basan en transferencia de energía fluorescente (FET) como una base para la señalización. Una forma particular de dicha transferencia de energía fluorescente es la transferencia de energía por resonancia fluorescente o transferencia de energía de resonancia de Förster (FRET) para la generación de señales.

Un ejemplo importante de dicho proceso comercialmente usado es el proceso TaqMan®, en el que una sonda doblemente marcada, que lleva tanto una primera marca que comprende una molécula donante de energía fluorescente o indicador como una segunda marca que comprende una molécula aceptora de energía fluorescente o extintor, se incluye en un sistema de PCR. Cuando se unen a la sonda, estas moléculas interactúan de manera que la señal fluorescente de la molécula donante sea inactivada por el aceptor. Sin embargo, durante una reacción de amplificación, la sonda se une a la secuencia diana y se digiere a medida que la polimerasa extiende los cebadores usados en la PCR. La digestión de la sonda conduce a la separación de las moléculas de donante y de aceptor, de manera que ya no interactúan. De esta forma, se elimina el efecto extintor del aceptor, modificando así las emisiones de la molécula. Este cambio en la emisión se puede monitorizar y está relacionado con el progreso de la reacción de amplificación.

Donde se detecta más de una secuencia de ácidos nucleicos, el kit puede comprender componentes suficientes para llevar a cabo múltiples reacciones de amplificación separadas, tal como conjuntos individuales de cebadores. Preferentemente, sin embargo, el kit está configurado para llevar a cabo una reacción múltiple, donde se pueden detectar múltiples dianas en una única reacción. En este caso, donde la detección se hace usando electroforesis en gel, los cebadores se seleccionan adecuadamente de manera que cada producto amplificado tenga un tamaño o carga significativamente diferente de manera que puedan ser fácilmente separados e identificados sobre un gel de agarosa, o por análisis del punto de fusión usando un reactivo de señalización tal como un colorante intercalante de ADN.

Alternativamente, donde el sistema de detección incluye marcas, cualquier marca proporcionada, por ejemplo en cebadores o sondas, proporcionará una señal diferente y distinguible de otros conjuntos de cebadores, por ejemplo basándose en la longitud de onda de la señal emitida y/o el hecho de que el producto tenga un punto de fusión o temperatura de hibridación diferente, que se pueden distinguir llevando a cabo un análisis del punto de fusión de los productos.

Los cebadores de amplificación adecuados, en particular para la amplificación por PCR, junto con el tamaño aproximado de los productos que generan, se seleccionan de los considerados en la Tabla 3 a continuación:

Tabla 3

	SEQ ID	Directo	SEQ ID	Inverso	Tamaño de producto
A	14	TGAAATTGACGCCCGTTGGA	15	CACGCCGGGAAAGAGGATTC	472 pb
B	16	GGCAACGCGGTTTCTACGAA	17	CGTTAGCCGGGGTTGTCAGA	489 pb
C	18	TCGTTGCCACTTTCCGAGGG	19	GTCGATTGTGTGCAGCGTCAA	268 pb
D	20	CACCGATCTTGTGCGTTTCG	21	CGGCAATGCTCCATACCCAC	522 pb
E	22	CACCGGAAAGAGTGGCAGGA	23	AACCGGGTCACTTGCATCAT	783 pb
F	24	AGCCATCGGAGTCACATCGG	25	GGAAACCTCGAAACCTGCG	1129 pb
G	26	TCAGGGCAATCACTAGCCGG	27	TCGAGCAGCCGTTTCATCCA	1118 pb
H	28	TGATGCGCTTGTTGTCGACG	29	CGTTCGCCCTTGTCGTCATG	478 pb
I	30	GGGCCATCCGTTACCTGCTT	31	TGACACACCCGCTCCGAAAT	1102 pb
J	32	GCATTTGCGGTAAGTCATCCCA	33	GGATCCCGATTGCAAGCCA	814 pb
K	34	TGTCGGGTGCGGAACCAAG	35	CGGGTTCTCGCTGATGACCT	464 pb
L	36	TCCCGCCTGCATCTGAAGAC	37	CAGCGATGCCAGCCAATACC	1098 pb
M	38	GTTGTCGCGTCTGATGCAG	39	ACCTGGGCATTGTTGGTGGA	1045 pb

Se ha encontrado que los conjuntos de cebadores representados por SEQ ID NOs 14-33 sirven de cebadores específicos de cepa útiles para cepas de *Gd* beneficiosas, mientras que los conjuntos de cebadores representados por SEQ ID NOs 34-39 sirven de cebadores específicos de especie de *Gd* útiles.

Los kits se pueden usar en métodos de determinación de la presencia en una muestra de una cepa de *Gluconacetobacter diazotrophicus* (*Gd*) capaz de colonizar intracelularmente células vegetales, comprendiendo dicho método detectar en dicha muestra al menos una secuencia de ácidos nucleicos seleccionada de SEQ ID NOs 1-10.

Se pueden detectar adecuadamente hasta 10, por ejemplo hasta 5 tal como aproximadamente 3 de dichas secuencias de ácidos nucleicos de SEQ ID NOs 1-10.

Un método puede comprender además detectar al menos un ácido nucleico que es característico de especie de *Gd*, como se ha descrito anteriormente, tal como una secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NOs 11-13. Nuevamente, si se requiere, se puede detectar más de una de dichas secuencias de ácidos nucleicos específicas de especie.

Además, un método puede comprender además detectar una secuencia de ácidos nucleicos específica de planta, que puede ser característica de la planta colonizada por *Gd* particular que se examina o puede estar universalmente presente en las plantas, tal como una secuencia de ácidos nucleicos específica de cloroplasto, como control para la reacción.

Se pueden usar en el método diversos métodos de detección, como se describe en el presente documento, pero en particular, el método puede comprender una reacción de amplificación de ácidos nucleicos, tal como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Cebadores adecuados son como se han descrito anteriormente.

Una muestra que se puede usar en el método de la invención puede ser cualquier muestra que contenga o que se sospecha que contiene una cepa de *Gd*. Esto puede incluir cultivos o muestras de laboratorio, que pueden contener la cepa de *Gd* deseada. Alternativamente, puede comprender muestras de plantas, que incluyen muestras de hoja, tallo o raíz, de las que se ha liberado el ácido nucleico, por ejemplo provocando la lisis celular, por ejemplo usando medios mecánicos, químicos o sónicos. En particular, la muestra es de una planta a la que se ha aplicado previamente una cepa de *Gluconacetobacter diazotrophicus* (*Gd*). De esta forma, se puede confirmar la colonización satisfactoria de la planta por *Gd*.

Normalmente, dichas pruebas se llevarán a cabo en un laboratorio, aunque se pueden llevar a cabo pruebas móviles, por ejemplo, en condiciones de campo, si está disponible equipo adecuado, tal como máquinas de PCR móviles, o si

se emplea detección de dianas en dianas de proteína particulares, usando técnicas tales como ELISA, que se puede llevar a cabo en dispositivos de flujo lateral.

La invención se describirá ahora particularmente a modo del ejemplo con referencia a las figuras adjuntas que se describen del siguiente modo:

5 **Figura 1:** es un gel que muestra productos de PCR de un intervalo diseñado para ser específicos de cepa o de especie, que incluye los conjuntos de cebadores A-H en la Tabla 3 (mostrados en la Figura 1A en los carriles 4, 5, 6, 7, 8, 9, 12 y 13 respectivamente) e I-M en la Tabla 3 mostrados en la Figura 1B en los carriles 4, 5, 9, 12 y 13, respectivamente.

10 **Figura 2:** es un gel que ilustra productos de PCR usando el conjunto de cebadores E tras la inoculación de reacciones con 100 ng de (1) OSR var. Ability, (2) OSR var. Extrovert, (3) arroz var. Valencia, (4) trigo var. Willow, (5) césped var. Aberglyn, (6) césped var. Dickens, (7) maíz, (8) quinoa, (9) Arabidopsis var. Columbia, (10) cebada var. Chapeaux, (11) césped var. Twystar, (12) césped var. J Premier Wicket, (13) patata y (14) tomate. El carril (15) contiene amplicón producido a partir de 10 ng de ADN genómico de Gd, (16) contiene el control de PCR sin molde y el marcador de peso molecular en cada extremo del gel es HyperLadder 1 kb plus (Bioline).

15 **Figura 3:** es un gel que ilustra la PCR de sensibilidad usando el conjunto de cebadores B en reacciones que contienen 100 ng de ADN de OSR var. Ability, inoculado con (1) 1 ng, (2) 100 picogramos, (3) 10 picogramos, (4) 1 picogramo, (5) 100 femtogramos, (6) 10 femtogramos y (7) sin ADN genómico añadido de Gd. El carril (8) es la muestra de control sin molde y el marcador de peso molecular en cada extremo del gel es HyperLadder 1 kb plus (Bioline).

20 La **Figura 4** son gráficos que muestran (A) amplificación positiva de *Gluconacetobacter diazotrophicus* por LAMP fluorescente usando la máquina en tiempo real Genie II y un conjunto de cebadores que forma parte de la invención. La amplificación positiva de ADN se detecta por una señal de fluorescencia, y (B) una curva de hibridación para las muestras de *Gluconacetobacter diazotrophicus*, siguiendo la amplificación por LAMP; la reacción se sometió a análisis de hibridación y se detecta la temperatura a la que el ADNbc se vuelve a hibridar como un estallido de fluorescencia.

25 La **Figura 5** son gráficos que muestran resultados representativos de experimentos de QPCR llevados a cabo usando cebadores diseñados para amplificar secuencias según la invención, cuando se llevan a cabo usando diluciones sucesivas de muestras que contienen ADN de GD, donde (A) muestra los resultados para el conjunto de cebadores designado P5 para SEQ ID NOs 58 y 59, (B) muestra los resultados para un conjunto de cebadores designado P8 para SEQ ID NOs 60 y 61 y (C) muestra los resultados para un conjunto de cebadores designado P17 para SEQ ID NO 62 y 63 como se define en lo sucesivo.

35 La **Figura 6** son gráficos que muestran resultados representativos de experimentos de QPCR llevados a cabo usando cebadores diseñados para amplificar secuencias según la invención, cuando se llevan a cabo usando diluciones sucesivas de muestras que contienen ADN de GD y ADN genómico de planta, donde (A) muestra los resultados para el conjunto de cebadores designado P5 en presencia de ADN de trigo, (B) muestra los gráficos de picos de fusión de los productos de (A) para todas las muestras (es decir, diluciones de Gd en presencia de genoma de trigo y controles relevantes); (C) muestra el gráfico de picos de fusión de los controles de (A) donde un control positivo que comprende ADN de Gd solo produjo señal donante, y controles negativos que comprenden ADN de planta solo y muestras negativas de QPCR solo (NTC – sin control de transcrito), ambos no produjeron señal donante; (D) muestra resultados para un conjunto de cebadores designado P17 como se define en lo sucesivo en presencia de ADN de maíz; (E) muestra el gráfico de picos de fusión de los productos de (D) para todas las muestras probadas (es decir, diluciones de Gd en presencia de genoma de maíz y controles relevantes); y (F) muestra los gráficos de picos de fusión de los controles de (D) donde un control positivo que comprende ADN de Gd solo produjo señal donante, y controles negativos que comprenden ADN de planta solo y muestras negativas de QPCR solo (NTC - sin control de transcrito), pero no produjeron señal donante.

45 La **Figura 7** muestra un gel de agarosa al 1 % resuelto que muestra ADN de plásmido extraído de una cepa particular de GD (IMI504853).

50 La **Figura 8** muestra un producto de digestión con restricción en gel de agarosa al 1 % resuelto de ADN de plásmido con Eco RI de la cepa de Gd (IMI504853). Los fragmentos restringidos se mencionan como 1) ~12 Kb y 2) ~5,6 Kb cuando migran a lo largo de HyperLadder de 1 kb (Bioline) donde está marcado el fragmento más próximo a la escalera para la comparación de tamaño.

La **Figura 9** muestra un gel de agarosa obtenido de una amplificación por PCR para detectar Gd de plantas de semillero de trigo obtenidas durante un ensayo de campo.

55 La **Figura 10** es una tabla que muestra el índice de clorofila de trigo tratado con Gd según la invención en comparación con un control.

Sin embargo, será evidente para un experto en la técnica que no se requieren detalles específicos para poner en práctica la invención. Las siguientes descripciones se presentan para fines de ilustración y descripción. No pretenden ser exhaustivas o limitar la invención a las formas precisas desveladas. Son posibles muchas modificaciones y variaciones en vista de las enseñanzas anteriores. Las realizaciones se muestran y se describen para explicar mejor los principios de la invención y sus aplicaciones prácticas, para así permitir que otros expertos en la técnica utilicen mejor la invención y diversas realizaciones con diversas modificaciones, ya que son aptas para el uso particular contemplado.

Ejemplo 1: Identificación de secuencias únicas

Se aisló IMI504853, una cepa de Gd obtenida de someter a pases UAP5541, que se encontró que tenía propiedades de colonización de plantas particularmente beneficiosas, y se secuenció todo el genoma (esta cepa se ha depositado con CABI en el Reino Unido y se le ha asignado el número de acceso del Tratado de Budapest IMI504958.) Se hizo una comparación con el genoma públicamente disponible de la cepa tipo (PAL5; secuenciada por JGI, EE. UU. [acceso de secuencia de Genbank CP001189]) usando métodos convencionales.

Sorprendentemente, se observó un gran número de diferencias en el genoma, y en particular, se identificaron varios genes que estaban presentes en el genoma de IMI504853 pero no PAL5.

Se observaron muchos de estos genes con una función asociada. Los genes únicos con comentarios se comprobaron adicionalmente para naturaleza única en todos los genomas secuenciados hasta la fecha usando la herramienta BLAST basada en la web de NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

El análisis del resultado de BLAST redujo la lista a 20 genes únicos no presentes en ningún genoma. Pareció que estos genes eran "específicos de la cepa" para IMI504853.

Por tanto, se encontró que cinco conjuntos eran únicos para las especies de Gd y posteriormente se denominarán "específicos de especie" (es decir, presentes en IMI 504853, Pa15 y otras cepas de Gd pero no en otras especies)

Así, parece que estas diferencias de secuencia caracterizan la cepa y se pueden usar para diseñar un kit de diagnóstico para IMI504853 y cepas similares.

Ejemplo 2: Validación por PCR

Se diseñó un juego de 25 conjuntos de cebadores basados en las secuencias identificadas en el análisis del genoma. Primero se probó la especificidad de estos 25 conjuntos de cebadores (20 diseñados para ser específicos de cepa y 5 diseñados para ser específicos de especie) llevando a cabo una reacción de PCR convencional usando ADN genómico de IMI504853 y PAL5. Los resultados con IMI504853 se ilustran en la Figura 1. Los resultados mostraron que los 16 conjuntos de cebadores específicos de cepa delinearon IMI504853 a partir de PAL5 como se obtuvieron de tres colecciones diferentes (ATCC49037, DSM5601 y LMG7603). Sin embargo, 4 supuestos conjuntos de cebadores específicos de cepa reaccionaron de forma cruzada con al menos un PAL5 y, por tanto, se retiraron del estudio específico de cepa.

Reaccionaron los 5 cebadores específicos de especie, como era de esperar.

Además, se hizo la prueba de cebadores específicos de cepa y de especie contra otras dos cepas de Gd, una originalmente aislada en India (IMI 502398) y la otra de Mauricio (IMI 502399), así como un cultivo revivido en 2001 de la cepa UAP5541 (conservada en glicerol a -80 °C), usando el método descrito anteriormente. Los datos estuvieron de acuerdo con los 16 conjuntos de cebadores específicos de cepa y 4 de cebadores específicos de especie, ya que uno de los conjuntos de cebadores específicos de especie producidos produjo una banda de mayor peso molecular. Esto fue un resultado sorprendente.

Se comprobó la sensibilidad de detección de los 25 conjuntos de cebadores (20 específicos de cepa y 5 específicos de especie) usando diluciones sucesivas de cultivos de caldo bacteriano. Se encontró que 24 de estos conjuntos produjeron niveles de detección muy altos (que requirieron 1-10 células bacterianas).

Además, estos 25 cebadores se comprobaron entonces para reactividad cruzada con varias especies de plantas diana y variedades usando ADN extraído internamente. Los cebadores se probaron en una reacción de PCR usando ADN extraído de plantas de las siguientes especies: maíz, trigo (var. Willow), quinoa, arroz (var. Valencia), cebada (var. Chapeaux), patata, Arabidopsis (var. Columbia), colza oleaginosa (vars. Ability y Extrovert) y una variedad de céspedes (vars. Aberglyn, Dickens, J Premier Wicket y Twystar). El método para aislar ácidos nucleicos de tejidos de planta implicó la maceración mecánica de material de hoja, seguido por una extracción de CTAB modificada (Doyle and Doyle, 1987 Phytochem. Bull., 19: 11-15). Brevemente, se rompieron membranas celulares usando SDS y CTAB para liberar sus contenidos, y se degradaron las proteínas celulares o se desnaturalizaron usando proteinasa K y β -mercaptoetanol. El tampón de extracción también contuvo PVPP para retirar los polifenoles de planta, EDTA para quelar iones metálicos, cloruro sódico para solubilizar estructuras de ácido nucleico, así como TRIS HCl para estabilizar el pH del tampón. Se degradaron las moléculas de ARN usando tratamiento con RNasa A. Tras la retirada

de los residuos celulares insolubles usando mezcla de cloroformo:isoamilo (24:1), precipitaron los ácidos desoxinucleicos en etanol usando acetato sódico, se lavaron usando etanol diluido y se resuspendieron en agua de calidad molecular.

Se muestran resultados ilustrativos en la Figura 2.

- 5 Al mismo tiempo, se probó la sensibilidad de cebadores inoculando reacciones de PCR que contenían 100 ng de los genomas de planta anteriormente mencionados con ADN genómico diluido sucesivamente seis veces a partir de Gd, a partir de 1 ng. Se encontró que la sensibilidad del sistema de PCR no estaba, en general, afectado por la presencia de genoma de la planta y se estableció detección rutinaria desde un mínimo de 1 picogramo de ADN de Gd.

- 10 Se muestran resultados ilustrativos en la Figura 3. Los resultados sugirieron que 17 de los 20 conjuntos de cebadores específicos de cepa y tres de los cinco conjuntos específicos de especie o no reaccionan de forma cruzada con ningún genoma de planta probado, o reaccionan de forma cruzada con un número pequeño, pero producen un producto de ADN de un tamaño diferente y tamaño distinguible.

- 15 De los conjuntos de cebadores específicos de cepa, solo 10 produjeron resultados que fueron de (1) alta especificidad, (2) alta sensibilidad, y (3) no produjeron reacciones cruzadas con ADN de planta y estos se representan en la Tabla 3 anteriormente como los conjuntos de cebadores A-J. Similarmente, se encontró que solo tres de los conjuntos de cebadores específicos de especie seleccionados eran específicos y suficientemente sensibles para su uso y estos se muestran como los conjuntos de cebadores K-M en la Tabla 3, respectivamente. Además, el tamaño de los productos obtenidos usando estos cebadores se muestra en la Tabla 3 y se ilustra en las Figuras 1A y 1B. Así, los métodos y los kits basados en estos cebadores son particularmente útiles en la identificación de Gd beneficiosa en situaciones de campo.

20 Ejemplo 3: Ensayo de LAMP

Se diseñó una serie de cebadores de LAMP para amplificar las regiones de SEQ ID NOs 6, 7 y 9 y se muestran en la Tabla 4 a continuación del siguiente modo:

Tabla 4

SEQ ID NO	Secuencia	Tipo
40	CTCAGGAAGACCGAATTGATTA	F3
41	GCGAAACGTCTGATTGAAC	B3
42	CGGATAACCACTGGTGCTCCGACTCGCCTCACTCTACT	FIP
43	TCCACGAATCTCACGAAGCACCCCGACCTTATCTCCCAT	BIP
44	GCCAGGCGTGACATATAACTA	FL
45	CGGAATACCTAGTTGGAACACT	BL
46	TCAAGATCGATGCACCTATTC	F3
47	AACAGACAGTTCTGGTAGGA	B3
48	CGCATCTCCAGATCGGCAGGTCGTCAGTCGATCATG	FIP
49	ACATCTGTCCACGGCATTGGTGGCTGGCTTATGAGTCT	BIP
50	GAGAAGTCCTCTGCTTCGG	FL
51	CGGCGGTTGAGAAGATGT	BL
52	GGAAGACATCAACGAAGCA	F3
53	TTGACAGTTGCATAGTCCG	B3
54	ATACGGCTCGTCATGTGCGGGTGATGGATAATCTCAGCC	FIP
55	CAGTGGCCGAACCTGGAAGCGCTGATATAAGCCTGAAGAT	BIP
56	ATTGCACCGCGTTGATG	FL
57	GCGTAACGGTCACAAGGA	BL

Se diseñaron SEQ ID NOs 40-45 para amplificar la SEQ ID NO 6 anterior, se diseñaron SEQ ID NOs 46-51 para amplificar la SEQ ID NO 7 anterior y se diseñaron SEQ ID NOs 52-57 para amplificar la SEQ ID NO 9 anterior.

5 Estos cebadores se obtuvieron y se probaron en un ensayo de LAMP en muestras que comprendían ADN de Gd puro que se había aislado usando una metodología de CTAB modificada a partir de bacterias que crecieron en cultivo líquido.

Además, se probaron los ADN de una variedad de bacterias patógenas de planta y hongos para la amplificación en LAMP por los conjuntos de cebadores. Estos incluyeron *Bacillus subtilis*, *Lactobacillus*, *Fructobacillus*, *Pseudomonas* spp., *Agrobacterium* spp., una variedad de fitoplasmas y diversos hongos que incluyen especies de los géneros *Fusarium*, *Penicillium* y *Aspergillus*.

Se llevó a cabo LAMP en tiempo real en un instrumento Genie II (OptiGene) y se añadió 1 µL de muestra a una mezcla de reacción de 24 µL que contenía 15 µL de Isothermal Master Mix ISO-001 (OptiGene), 200 nM de cada cebador externo (F3 y B3), 2 µM de cada cebador interno (FIP y BIP) y 1 µM de cebador de bucles (FLoop y BLoop). La reacción de RT-LAMP consistió en 30 minutos de amplificación isotérmica a 63 °C. Para evaluar la temperatura de hibridación de los productos, las reacciones se sometieron entonces a una etapa de hibridación lenta desde 95 hasta 68 °C (0,05 °C/s) con monitorización de la fluorescencia.

También se usaron controles de reacción negativos, que consisten en agua.

De los tres conjuntos de cebadores probados en LAMP, el tercer conjunto de cebadores específico para SEQ ID NO 9 dio amplificación en nueve minutos y medio con una hibridación a 89,2 °C (véase la Figura 4A). El conjunto de cebadores específico para SEQ ID NO 6 amplificó el control positivo en aproximadamente 11 minutos con una hibridación de aproximadamente 88 °C, y el conjunto de cebadores específico para SEQ ID NO 7 fue el más lento, amplificando el control positivo en aproximadamente 23 minutos con una temperatura de hibridación de aproximadamente 90 °C.

25 Todos los conjuntos de cebadores que dieron la amplificación de Gd positiva fueron específicos para las bacterias y no se amplificaron a partir de ADN de ninguno de los otros ADN bacterianos y fúngicos en los que se probaron. Por tanto, todos son adecuados como conjuntos de cebadores que se van a usar para la detección de la bacteria Gd.

Ejemplo 4: Detección de Gd en muestras de planta usando LAMP

Para validar los cebadores en ADN rápidamente extraído de semilla contaminada, se estableció una serie de experimentos en los que la semilla de dos especies de planta, tomate y trigo, se pulverizó sobre la superficie con ADN de Gd. Entonces se sometieron las muestras a la técnica de extracción de ADN de 2 minutos en la que las muestras se ponen en tubos de plástico que contienen perlas de acero y tampón TE y se agitaron vigorosamente durante 2 minutos. Entonces se colocaron dos microlitros de la disolución en la reacción de LAMP como se describe en el Ejemplo 4 usando el conjunto de cebadores que comprende SEQ ID NOs 52 a 57 para probar la amplificación del ADN de Gd de estas muestras.

35 Los resultados mostraron que el ADN de Gd es detectable cuando se somete a estos ensayos, contra una referencia de ADN de planta.

Con el fin de confirmar que cualquier muestra que dio negativo para Gd soportó la amplificación de LAMP (es decir, no contiene inhibidores de reacciones de LAMP), se usaron los cebadores del gen citocromo-oxidasa (COX) (Tomlinson et al., 2012 Journal of Virological Methods, 191: 148-154), que amplifican ADN de la planta hospedadora, como controles para negativos falsos en todas las muestras.

Ejemplo 5: Determinación de QPCR

Se llevaron a cabo una variedad de reacciones de QPCR en muestras que comprendían cantidades conocidas de ADN de Gd (IMI504853) y también a partir de una variedad de especies de cultivo que incluyen ADN genómico de maíz, cebada y trigo.

45 Se prepararon mezclas de reacción de QPCR hasta un volumen de 20 µL de volumen por reacción. En el caso de ADN de Gd solo, este consistió en 10 µL de iTaq™ Universal SYBR Green® Supermix (2X) (Bio-Rad), 1 µL de cada uno de cebadores directos e inversos (concentración final de 10 µmoles), 7 µL de SDW (agua destilada estéril) y 1 µL de molde de ADN a la concentración requerida.

Los cebadores usados en este caso fueron como se expone en la Tabla 5.

Tabla 5

SEQ ID NO	Secuencia	Tipo
58	AGGAGGCTCTTTCTTTGGAAGC	Directo
59	AAGTGCCCCTGTTATCGTACAC	Inverso
60	TGGGTCATCGGTTCTGATTTC	Directo
61	TAGTTTGATGTCGGGTGCTGAG	Inverso
62	GCGAATACCGGTCTTTTACGC	Directo
63	ATGCAAGCTCCGGATTGAGAG	Inverso

5 El conjunto de cebadores representado por SEQ ID NOs 58 y 59 (designado P5) tenía el objetivo de amplificar una región de 149 pares de bases de SEQ ID NO 3, el conjunto de cebadores representado por SEQ ID NOs 60 y 61 (designado P8) se diseñó para amplificar una región de 104 pares de bases de SEQ ID NO 6 anterior y el par de cebadores representado por SEQ ID NO 62 y 63 (designado P17) se diseñó para amplificar una región de 130 pares de bases de SEQ ID NO 10 anterior.

10 Se llevó a cabo ciclado térmico usando un sistema de detección de PCR en tiempo real CFX96 Touch™ de Bio-rad. Se realizó la desnaturalización inicial a 95 °C durante 3 minutos; la amplificación se realizó usando 40 ciclos de desnaturalización a 95 °C durante 5 segundos seguido por 60 °C durante 30 segundos (lectura de placa después de cada amplificación).

15 Todos los conjuntos de cebadores amplificaron el ADN de Gd con buena eficiencia como se expone en la Tabla 6, que muestra los valores de Cq promedio de tres duplicados de la amplificación, y cuantitativamente como se ilustra por la Figura 5. Se calculó el porcentaje de eficiencia usando la fórmula % de E = $[10^{(-1/\text{pendiente})}] - 1 \times 100$.

Tabla 6

Log Diluciones	P5 (SEQ ID NOs 58 +59)	P8 (SEQ ID NOs 60 +61)	P17 (SEQ ID NOs 62 + 63)	ng/μL
-1	19,23	19,68	19,96	12
-2	22,75	22,55	23,39	1,2
-3	26,19	26,10	26,78	0,12
-4	30,23	29,97	30,75	0,012
-5	33,64	32,85	33,96	0,0012
-6	36,15	36,26	37,04	0.00012
-7	NA	NA	NA	
Pendiente	-3,4659	-3,3613	-3,4594	
% de eficiencia	94,32	98,38	94,57	

20 Se llevó a cabo la amplificación cuantitativa en presencia de ADN genómico de planta para determinar si hubo reactividad cruzada. Se encontró que aunque hubo reactividad cruzada con algunas especies de plantas, los pares de cebadores P5 no mostraron reactividad cruzada con los genomas de trigo y de cebada, P8 no mostró reactividad cruzada con trigo, cebada y maíz y P17 no mostró reactividad cruzada con los genomas de trigo y maíz, haciendo que estos sean conjuntos de cebadores posiblemente adecuados para detectar Gd en especies de cultivo.

25 Para garantizar que la eficiencia y la robustez de los cebadores se mantendría en presencia de ADN genómico de planta, se repitieron los ejemplos de QPCR anteriores, pero en este caso se cambió la composición usándose 6 μL de SDW (agua destilada estéril) junto con 1 μL de molde de ADN de dilución de Gd relevante y 1 μL de molde de ADN genómico de planta. Por ejemplo, se diluyó sucesivamente ADN de Gd (92 ng/μL) desde 10^{-1} hasta 10^{-7} con o ADN de

trigo (70,6 ng/μL) o ADN de maíz (111 ng/μL) y se realizaron las reacciones de amplificación como se ha descrito anteriormente.

Se muestran resultados representativos en la Figura 6(A) y (C) y en la Tabla 7.

Tabla 7

Curva patrón de qPCR de ADN de Gd+Planta			
Log diluciones	Valor Cq de la serie de qPCR		ng/μL en la reacción
	P5(Seq ID 3)_ Trigo	P17(Seq ID 10)_ Maíz	
-1	21,47	21,76	9,2
-2	24,56	25,11	9,2
-3	27,69	28,13	0,92
-4	31,38	32,08	0,092
-5	34,89	35,32	0,0092
-6	37,55	37,80	0,00092
-7	N/A	N/A	0,000092
ADN de AzGd (0,01)	24,20	25,00	
ADN de planta	N/A	NA	
NTC	NA	NA	
Pendiente	-3,2887	-3,2794	
% de eficiencia	101,41	101,81	

5

Parece que los cebadores mantendrán la eficiencia en presencia de genomas de planta y así pueden formar la base de un kit de detección.

Los resultados se confirmaron llevando a cabo el análisis de fusión después de la amplificación, el análisis de la curva de desnaturalización (curva de fusión) se realizó desde 60 °C hasta 95 °C con incremento de 0,5 °C 5 segundos/etapa seguido por lectura de placas después de cada incremento.

10

Los ejemplos representativos de los resultados se muestran en la Figura 6(B) y 6(E). Son visibles curvas de fusión claras para ADN de Gd amplificado, sin ADN genómico de planta.

Ejemplo 6: Detección de plásmidos

Se realizó la extracción de ADN de plásmido de Gd (IMI504853) usando el kit Qiagen mini prep (Nº de Cat. 69104). Se siguió el protocolo de extracción de plásmido de bajo número de copias usando 5 mL y 10 mL de cultivo bacteriano de 48 horas. El plásmido extraído migró sobre gel de agarosa al 1 % flanqueado por un HyperLadder de 1 kb plus (Figura 7) y se obtuvieron imágenes usando Bio-rad ChemiDoc™.

15

Junto con el ADN de plásmido, también se incluyó ADN genómico de Gd (IMI504853) en el carril 1. Los resultados, mostrados en la Figura 7 indican la presencia de un plásmido individual de aproximadamente 17,5 Kb de tamaño, que es más pequeño que el previamente informado para plásmidos encontrados en PAL5.

20

Se secuenció el ADN de plásmido y se diseñó un cebador usando Primer3 (Untergasser et al. (2012) Primer3 - new capabilities and interfaces. Nucleic Acids Research 40(15):e115; Koressaar and Remm (2007) Enhancements and modifications of primer design program Primer3 Bioinformatics 23(10):1289-91) para cubrir los sitios de inicio y terminación de los datos de la secuencia lineal (P_End_Fw - CCAAATCTCTGGAACGGGTA (SEQ ID NO 64). Se realizó secuenciación de Sangar usando este cebador (SEQ ID NO 64) y se alinearon los datos secuenciados para confirmar que la secuencia de plásmido estaba completa.

25

Puesto que el ADN de plásmido en su forma natural es circular y puede formar estructuras secundarias y terciarias, esto podría afectar la exactitud de las mediciones de tamaño usando geles de agarosa. Para confirmar los resultados

y también validar la secuenciación del ADN de plásmido, se estudió un mapa de restricción de plásmido usando NEBcutter (<http://nc2.neb.com/NEBcutter2/>). La digestión con restricción linealizará el plásmido proporcionando solo una estructura conformacional simple. Por tanto, la selección de enzima de restricción se hace después de estudiar la secuencia, permitiendo así que también se valide la secuencia de plásmidos. En caso de ADN de plásmido IMI504853, el cortador de NEB mostró la enzima de restricción EcoRI para digerir el ADN de plásmido a 3864-9461 pb y 9462-3863 pb que produce un fragmento de ADN de 5598 pb y 11968 pb. Tanto se puede estudiar el tamaño usando un HyperLadder de 1 Kb plus (Nº de Cat. de Bioline - BIO-33069) disponible en el laboratorio, que elimina también la limitación de la detección de tamaño máximo de la escalera de referencia.

Por tanto, se realizó digestión con restricción en el plásmido IMI504853 usando el cortador doble EcoRI (Fisher, Nº de Cat. 10819360) según el protocolo del proveedor. Los productos de digestión después de la restricción migraron sobre gel de agarosa al 1 % hasta que se resolvieron las bandas y se obtuvieron imágenes usando Bio-rad ChemiDocTM. El ADN de plásmido IMI504853 cuando se restringió con EcoRI produjo dos fragmentos (1. ~12 Kb y 2. ~5,6 Kb) de ADN de tamaño predicho (Figura 8).

Esto validó los datos de secuenciación en términos de tanto el tamaño como la secuencia. Puede proporcionar además una prueba de identificación o una prueba de confirmación en relación con un kit usado en la identificación de cepas de la invención.

Ejemplo 7: Ilustración de actividad de IMI504853

Se diseñó un ensayo de campo para probar Gd (IMI504853) como biofertilizante usando trigo (cultivar Mulika). Se plantaron dos parcelas, tratada con Gd y de control (sin tratar) respectivamente. Después de la germinación, se muestrearon plantas de semillero de trigo joven a los 10-12 días de crecimiento y se probaron para la presencia de Gd usando el cebador G (seq ID 26 y 27) que representa la seq ID 7 de ADN. Se detectó la presencia de Gd cuando la PCR se resolvió sobre un gel de agarosa al 1 % con controles negativos y positivos respectivos (Fig 9) que confirmaron que en la condición del mundo real el kit diseñado funciona bien.

Se mostró que la medición del contenido de clorofila, es decir, el "verdor" usando un medidor de SPAD se correlacionaba con la salud de las plantas y el rendimiento del cultivo en general. Se comprobó el cultivo en las etapas de crecimiento 35 y 61 para su contenido de clorofila usando SPAD se encontró que era estadísticamente significativo ($P = 0,001$) en parcelas tratadas con Gd cuando se comparó con parcelas de control (Fig 10). Es interesante señalar que el SPAD mostró un aumento significativo en el contenido de clorofila del trigo obtenido de parcelas tratadas con Gd de la invención en comparación con controles no tratados (fig 10). Esto indica que las parcelas tratadas con Gd que se ha confirmado que tienen la bacteria presente usando el kit de diagnóstico dan como resultado plantas mucho más sanas y rendimiento posiblemente más alto. Los datos del ensayo de campos de trigo indica la eficacia de Gd como biofertilizante.

Ejemplo 8: Beneficios del rendimiento de uso de IMI504853

Se sembró semilla de maíz forrajero no tratada y tratada con una formulación que comprendía IMI504853 a una concentración de aproximadamente 10^5 - 10^7 ufc/mL en dos localizaciones diferentes, y se fertilizó en diferentes proporciones de la tasa recomendada de fertilizante de nitrógeno, que variaba desde 0 hasta 175 kg ha^{-1} para cada variedad particular, región y disponibilidad de nitrógeno de la tierra. Los resultados del rendimiento indicaron una reducción de potencial global en el fertilizante de nitrógeno de entre 40-95 % sin sufrir penalización del rendimiento. Los beneficios promedio del rendimiento en los niveles de N condujeron a un aumento en el rendimiento de entre 7 % y 21 %. Así, a las tasas de fertilizante de N completo recomendadas, los cultivos tratados con IMI504853 pudieron proporcionar un beneficio de rendimiento hasta 1 t/ha en maíz.

En otro ensayo, se sembró semilla de trigo de primavera, ya fuera sin tratar o tratado con una formulación que comprendía IMI504853, a una concentración de aproximadamente 10^5 - 10^7 ufc/mL en primavera. El cultivo se fertilizó a diferentes proporciones de la tasa recomendada de fertilizante de nitrógeno que variaban desde 0 hasta 125 kg ha^{-1} basándose en la variedad, la región y la disponibilidad del nitrógeno de la tierra. En todos los niveles de fertilizante, los cultivos tratados con IMI504853 mostraron un aumento del rendimiento promedio de 15 %, pero a fertilizante de nitrógeno cero y fertilizante de nitrógeno completo este aumento fue 20 % y 10 %, respectivamente. Los resultados indican que para el cultivo tratado con IMI504853, es posible reducir la aplicación de fertilización de N en hasta 85 % y todavía alcanzar el mismo rendimiento que un cultivo completamente fertilizado.

Tabla 1

SEQ ID 1	Glutathion S-transferasa (EC 2.5.1.18)	ATGACAAAATTATACTATTCTCCGGGGGTTGGCTCTTTGGCAGGGGCTATTTCTCGAAGAGTTGGGAAGAC ATATCAGTTGAAATTTGAOCOCGTTGGAGACGAAGCAGCGGAAAGTGAAGAGTTTCTAAAATPAACCCGCGAG GAAGGTTGCCGTGTTTAAATGATGGTGGGAATAAATTACGAAAGCCCGCAATCTATTATTATTATTCGAGI TCAATTTICAGACGGAAATTTCTGGCCAAATCAGTTTGGAGCAAGCCGCTGCTGGGAATGGTTTAPCTGCTI ATCGACCAATGTACACTCGGTTGCCATATGGCAGGTGTCCCGACAGCAAGGTTTCATTGTATGAGGCTCAGT GGAAATATGTTATTTCAAAAGGGAATAATAACCTTCATCAATTTAGTATGTATAGAAAATATATATCTCCGGG AAAACCTGCTGTGGTGAATCCATTCATGCGTTGATCCGTAATTTGTTTGTATTTTATTTCTTGGGGGAAGC CATCGGATGGATATGGAATCCTCTCTCCGGGGTGGTCGGGTGATCGAGCCGGATGCTGGAGGGTTGGCCG TTCAAACGGCTTTACGCCAAGAAGGTTTGTATCTCGTAA
SEQ ID 2	O-metiltransferasa (EC 2.1.1.-)	TTGGATGCCCTCTGTTTCTTGGGGAGTCATCATGACATTCTCTCTTCTGTCGCGCAATTCACACCGCAGAT TCAAACGTGGGTTGATCGGCTTTATCCACACACTCTCGCAGATCCAGCGATACGCCATTTGGCGCAAGCCA AAGGACTGACACATGACGGCAACGGGTTCTACGAAGCCATGAAGATCCAGACTACCGTTACGCCAGAG TTCCGGGCCCCGCTCTATATTCTGGCAOAGCACCAGAGCCCAACATATCATATCGAATTCGGCAGTCTTCGG TCCTTCAACATTTATTTCTCGAGGGCTTTACGGGACATGGCGGGCGGACTGTTGAOCTCGGAACCTTATCT CAGACAAAGCAGAAAGGGCTTCCGCCAATCTGGGGAGCGAGACTGGCAGACCTCGTAGACATTCGCATCGGA GATGCCCGCGCCACGGTTATCGCGTATCTTCCCTCAGTCGATCTCATCTGCTGATGGGACTAAAGGACT CTACCTCGATCTCTTACTCTCTCTGGAACCTGCATTACGAAAGGTGGCCCTCTCATCAGGATTCGGCGGATC TCGATGGTACGACGGGGTCCGGCAGCAGCCTACCTTACCTATCTGACAPCCCGGCTAACGGATATCGCATC GCCGGCATCACTACACAGGGGTTGGACAAACCTTCGCTCACGATCTGGCGGTGGCGACCTGA
SEQ ID 3	Regulador transcripcional. Familia TetR	GTGGGAATAGCCACGGCTTACCAATACTTTGAGAACAGGAGACGTTGTGGGGCAGCTTAGTCGTCGGGTACG GGAAACACTGCTCCATGATGTGGTCAATTACTCGAAACCGCTTGTCTGTGGCACCTTCCGAGGTTGTGCGCT GTCTGGTGTGCTGCTGCTGAAGCGGACAGAGCCCTCCATCTTACGGTCCGGTGTGATCGGTTGGAGGAG GCTCTTTCTTTGGAGCGGATCATCTGCTGTGTGGGGTGTGAGCTTTGCACGGTTGTTCGCTGTTCTCTCAGTG CCAGGGAAATTAATCAGGAGACACTGCAAAAATCTGGCAGATGATCTGTGACGATACAGGGGCACTTATIG ACGCTGCACACATCGACAGATACCTATOGATGACTTGCTATTTGAOCGTATTACGGGAAGGCTGCTCGGATTT ATTACAGCGCGGCTTTAA

SEQ ID 4	Factor sigma de tipo ECF de ARN polimerasa :: Factor sigma de tipo ECF de ARN polimerasa	GTGGACACCGCGACAAATATTGGAGCTTTTCGGATACATCGACCGATCTTGTGGCTTTGCCGACAGGTAT CATGAGAGATGATAGTCTGCGGAGAGATGTTGTACAGGATGCTTTCTGCGGCTGACTACTGTAAACAGTGGCAC AGGACCGGCTTCTTTGGATCCCTGATAGTTTACCGCATATTTCGGATCTGGCCCTTTGACCCCTTATCGA CGACGGCAATTGAGGCGCGATTTGTTGACCATGGGTAGATGTTTTCGAAACATCGAAGCCSATGCCCC TACACCGGAAGGTGAGGCTTCAGGGAATCGACATGCGGCGATGCGCGCGGTATGCGGGAACCTGCCAGAAC GGAGTGGCTCGCATTTGGAATGCATCTGTTGACGGACGAAGCTAGGGAAATAGCGGCTCATTTAGGTGT TCTATTGGGAATGGCCACTCCCTTGTGCGAGTGGGTATGGAGCATTGGCGAAACGTCTTTCCACACCTGAAAC CTGA
SEQ ID 5	Proteína de la familia FecR. Sensor de COG:dicitrato de Fe2+. Componente de membrana;	GTGAGCGAAGACTTCAATCCAAACACGGCGGTGAGTGGAAATAGCCCTTTCAGAGAGCCTGACGATTCTGT GCTCAGAGAAACGCTTTGAGCAATGGCTTCTGCGCAGAGGATCACCGGAAGATGGCAGGAACCTTACGCGAGG GACTTGAGAAATTCGCGCGATTTGGCCGCTTTATGCTGAGAAATGGGTGCTTCATCAAGTGGGGCACAAAT ACGCGTCAAAACAGGTAGGCTCAAGGAGAGACCTGCTAATTTGTAGTCTTTTCAAGTTGCTGCAATTTGCGGC TGCTGCTGCCCTTACATTGGTAAGTCCCTCTGACCTTCTGCTTCGATTACAGGCGGATTACGCCACAGGCTCGG CAGAAACGGGACAGTCAGTCTCCCGATGGTAGTGAATTGACCTCGCGCGCGGAGTCCGGTAAATGCT TACTCTGTAGAGAAACGGGATATCGTCTTTTAAAGGAGAGGCGCTTTCAGGTTCCACATGATATGGCGCG ACCTTTTGAGGTCCACACAGACAAATTCACCGTAACGACATCGGACTATTTTTCAGCTCAGAAATGCTCAGG GCGAGGAGAAAGTCTCTGTCGCGGAAGGAGAGGTTCGGGTGACGATGTTTCGGTGGATTTTCATATCTCGAT GCCGGAACGTGGGAGCGGATTAGAACTGTAGCATGGAGTGAAGCTGCTACTCATGGGAGCGCTTCGCGGAAGA TGTGGGCGCATGTCAGCGGGGCAATTTATTCACAGGAAACAGCGGTGTCAGCGTCTGTGGAAGGCTTAGGC CCTACTACCGGGGGTGTGTCCTTTTATGGTTCCTTTGCGGAGAGAGTACACACACGCTGCTTATGACGAA AGTACACCGCTTGGCGCAATTCGCGCAATCCGACCGCGCGCTCATGCTCAGATCCATGCTTCCGCAATGCGCT GACRATATTGGCGCGACCGTAG

SEQ ID 6	Receptor de ferricromo-hierro	ATGAAAGGTCGCGTTGCATTGCGAATTGTGGGGGCTCATACGAAAGGAAACGGATAAGGTGATGACGAT TGATGATAGAATGAAGCGGTGTGGCGCGGAGGTGGCGTGGCTTATCGCGCTGGGTAGTACGAACGTTTCTGAATG CCGCTGTGAGAAAGCTATGGTGCAGAACCTTCCCAAAGTCTCGGGCGGTGAGATCATTTTCATTCCGGGCC CAATCTCTTGAAGTGTCTGCAAGGTTCCGGACAGCAAAAGTGGGTTGGAGGTTTCTGTGACGGAAATCTTGC AAATCTCTGACAAAGGACGGTGTAGCGGTACGATGACATCTGTCTAGGCCCTCAATGCCATCCTGTCTCGGGA CTGGCTGACATACACGATCAGGGGTGGCGAACCGTCTGTGTGACGAAAGCAGTAGCCAAACATCACGGTTGGT CCGGTCCGTCTCGGAGGAACCTCGCGCGGTACAGATCCACAGGGCGCGGTGTCTGGGTACTTCGCGGAAAAACAC AATGGTSGTACAAAGCGGATACGCCCATCACGGATACCGGATACCGGATACCGTCTAGTCTAGCTGTGACCGACGTTGA TGACCGATCAGGACCGGAGATATCCTACAGGGTTTGGGTACAGTCCGGGCACTACTCTGAGCCCGGAGGA ACGCAATATCGCGGATCTGCCAGAAATGACAACTGGGCAATTTATCAGGTGGATTTCTCTCGAGCCAGTCTGT GGATGGGTTGATGACGAATTCGTATGCCGCGCGCGGAGCCATAGCTTTCTGGACCGTATCGAGCGGCTCMAGGTC CAGCATCGGTGATGATGGCCAGACGACACCCCGGAGGAATGGTGGTATGAGGCTGAAGAAACCCACCGGAAACG CCGCTGCATCAGGTTTCGCTAGGCTTGGGAGCTGGGACGGTACGAGGCAACGTTCCGATGTCAGCCATTAAGAT CACGAGTCCGGTAAATCTGCGCTATCGTATTCGAGCCATCGGAGTCCAGTCCGACATCAGGAGAGCGGAATTG ATTATCATCGGGTGGTGTACTTCTTCAATCAGCTGGGATTCGATCCGAGACTCGCCCTACTCTACTTGGT AGTTATATGTAACGCGCTGGTCCAGGAGCACCAGTGGTTATCCGGTCCCTCGGGAATCTTATTCACAAATCGGA AATTCACGAAATCTACGAAGCACATTTATTCGGAATACCTAGTTGGGAGATAGGTTCGGGATGT
----------	-------------------------------	---

		TCGAATATCAATTTAGTCATAAATTTATTAATTTATTTAGTTCAATCAAGAGTTTCGGGTAGAGNATTCACAC GTTCAATGAGTCAAAATATCACCGATGTATACACCTGTAGATGTTGAGGAAATGGACATATTTTATTCCTCGGA ACAAAATATGAAACACACACTGAGGTACTTGTACTCGCTTATGGGGGGGCTCTTAACCTGGTCTGTACAAAC ATACATGGCTATCGGTTCIGATTTCCGCAATTAAGACTTAATCATATATACATGAGCTATCGAGACGCTGGGACA ATCGTGTGCCCACTCAGCACCCGACATCAAACTATTCCCATGTATAAGTTTAACTCCGCGAAGTGTGACGC CTTCGGCGAATAAACCCAGACTATPACTCGTTTCAGGAGCGCTATTTTCAGGACCAAGATAAATGGCAGC GCTGTCCGTTCCTTGGGTGGACGCCAGATTTGGTTAATTCATCTAATAAATATACAGTGTAAAGACTTT TATGAAACGTCAGCAACCGGTTAATAACACTGCTCACACCCCTCAATCGGCTTACCTGGAGAGCTGGTAT AATCTATAATTTTGACTTTGGGCTTTCGCCGTACTTCAGTTACGCAACATCCCTTGTGCCACAGGAGGTACGG ATTGGCAGGGTAAGATTTTCGGGCTTTGAGCGGAAAGCACTCGAAGCGGGTTGAAGTATAAAGTTCCAAAC GAAGATAICCI CATACGSCATCAGCATTCGGAATTTGATGAGAGACACTATCTTATCAGTGATCTTGTTCACAC GGCTTTTACAGTACGCGGGAACGGTACGCTCGCAGGGTTTCGAGGTTTCGGCCAGTCCGAACAATTACCAAA ACCTCAAACTTGTCCCTCTTACACATATGAGGATGTCGGTTCAAGAGACAACTTTGGCCGTAAATTCGGTC GATCCCGTCACGCTAACATATGGAGCAAGGTAAAGCGAGATGGGAAATTCGTTCTCTCGAGTTCCCTGGAAAT STTCAATATGTTCTTCAATACACCTTCACAGACGCCGCCCATTCGAGGGTCTGGCTTTAATGGAGGAATTCGCT ACACCGGTTTACCTATCGGACTATGAGGAGTCTTACAAACCGCGCGCTAATTAATCTTTTACATTTGGCGCA CACATATGATTTTGAGGAAATTAATCCCTTCTCTCAAGGCTCGCTGCCCAATCTCAATTTGGCCAA TAATATATATTAATCTCTGTCGAATACCGCCATATGTAATCTCTGTTATGCTCGAAGTTTACGGTAACGTGA CGTACAGCTGGTGA
SEQ ID 7	Proteína de la familia de la retrotranscriptasa	GTGAGCCCGCAATTTCTCTCCAGGTCCGGCTGCTCGGTTCCGCCAATGAGACAGCGGGCTTCTTCGACCT AGTCGGCAGTGTCTTAAATGGTCTCGGAGGAAAGAGACGACGACGTAATTCGCCCGCTTCAAGCAGCGCGCG SCATCCCTGAGTTCCATGGCGTCCCTTCCACAGGGTTTGGTTGAGCTGGCTTCTTCTCGAACAATCGTGTG CTTGATTTCCATCGGRTGTCATCGGACAGATTGGGAGAGAGTTACAAAGGGAGTGTGGCTCCGGGACGCCGTG

	CCGGTACTCGACGACATTAGACTGHCCTAATAACAACACTGCACCAAGGTATTGACCAAGAGAGCTCAGGGCGGTG TAATGGCGTGGCTTGGGCAACTCTCAGCGGGAGCTGTCCGGGCTTGGAAATTCCTCCCGGAGAGACGTCACACT SGGTCGGTIGAGGGGAGCAGATGCGGCTGGTTCCCAATCCGGAAGATGAGAGCGCATCCAGACCGGATTTTC CGCGGCTTCGATGCCASTGGTGGGAGGAGGTGATCCAGCGGATCCAGGAGCTTGGTCCGATCCCACTAACGA TCACAGCGTCGAGAGTCCGCTACCCCTCCCGGCTTGAGAGCGGTACCCGATGTCAAPAGCGAGACAGTCGGT CGTTTGGCTGGTTCGGTTCAGAAAACCTTTGGTTTCATGAGGCGCACTACTCGATGATGACACTTACATGGA GATTCGTGAATTCGGGAGGAGACGTTCCGGCGCACCCGACTTTCGAAATCGAGGCTTGAAGGAGAGCAGCGG CATTCGGCTATTCCTAGTCGHAAGGTGGATCTCGATCCTTCGAATGTGGGCTGTGCGGTCTGCACTCGAC CTCGGCGCTCCCGCACTCCTCAGGAGTACTGAACCTTTGAGCCCTATCTTGTGGGAGAGATCAGGGC AATCACTAGCCCGCAAGTTGCATACTGCTCGCGGAGATTTTCAGACAGGGGCGACCCGAGACGGGCTTCA TTGACGATCCAGAGTGCCTTCGCCGTGCCGTGATCTCGCGGTTATAGATCTCTGCTTCTGGAGGCGCGAGTA CGAGTGGCGCGGGCGAGCGCAACGTTCCCGTGGTATCTCGCGCAACAGCACTGCTTACATTCGGTCCA CGATCCCCGGGCTATCCAGATCGAGGAATTTCAAGACCAATCGATCCTATTGGCGCTCTCTCATTTCTGA AAGGGAACGGGAGTCTCTTCAGATCGCGAATTCGCAGTAGCGCGGTGGTGGAGCCGCGAGGTGGTTCCTTGG AATGATCAGGCGGTGGATCTCTGTCGGTCGGATGCTCACGCGAGAGCGGTTCCGCGAGGTGGCGCGCGACAT AGAATTCGCGCGCGATCTCTTTTCGGCGGTGACCGGACACCTCACCCTTCGGCGAGGCTTCCCGAGGACTTGG GGTTCGCGCAATGGTCCATGTCAGAGGAATGAGCTCTCTGCAAGCTATATCCAGGCAAGGGGCTCTGAAI CCGCTACCCCAATGAGATCGCGGTACTCAGTTTTCAGAGAAATTCATCTCCCTCTCCAPAGAGGAATTTGCC GGAAGTCGTGACCGGTGACGACGCGAGATAGCGGTACAGCAGTGGGCAATATGTCGCGGTTCGACGGGTGA TCTTCAGATCGGCGCAGACACCGGACTTACCCTTCTATTTACTGCTCCAGATAGAGTTCCAGCTTCCAGTTAG CGCTGGCGCTTTCAGCTGGTTTATTTACTTGGCTTTCATCTTACTGCGAGAAATAGACTTCCAGTTAG CCCCCCAICCTTGGAGGAGCTTAAAGCAATCTATCCGCTACCAAGACTACATCTTTTACGCGGCAATACGCT TCTATATGGGCTAGAGGCTTCGGGAGCAGTTGGCTACCAATTTCCGAGTTTCACTCAGGATCTCTCTCTCGAT

SEQ ID 8	Proteína de modulación de la topología de ADN
	CTGCTCACCTGCAAGGCTTGCAGCAAGTATGACCGGATGTGCGATCAGTTGTGCTCCCTGGATGAACGGCTGCTGCG AATCCGGCAGCTCTCTGATAGAGCCACCGCTCGGATTTGGCCCGGCTACAGAGACCTGGHIGCTCAAGATCGATG CACCTATTCCAGGTHCCACATCGAAGGGGCGCGCTTCGGGCTGGSTCTCCAGTCGATCATGATCGCGAAGCA GAGGACTTCTCGGCTCCGATCTGGNHTGGCTTCGCGCGGCTTCGACGAMAGCACCGCAACATCTCTCCAC GGCAATGGCGCGGTTTGAGAGATGTTGGATCTTCGGAGACTCAATAGCCACCGAGAGGAGGTCTCGACTGGC TCACTCTACAGAACTGTCTGTTTCAACCGGATGACGTTTGCACCCACCTCTGTCGTTTCCGAGACGCTTCAAG ACCGGATCCTGGTCGSAATGGCTTACGACAAGTGTTCAGGGGAGAGCCGCTGATCAACTGGCCCTCTGGAT TATCCGAGGATGCTGCGGGCATGGGCTACAGAGGTTGATCAGAGGCGAGGAAACAGACGACCTCTCTCCGA TGGAAACAGAGTACGTCAAACCGTTCGAACTGATCAACGGATTCGGGCTTCGACGCTGGTGGTGGGATACGAA TGGTCGAACAATCCGGCCAAAGACGCACTTTGGCTCACCGGTCATCTCTACGATGCAACAGACCTGAAGCT SGGAGGCTCTTCGTGATCGCTCAGAGCTGTTTCGGATCCACGCTGATCGCAACACGAGCTTATGGGCGCAGC AGATGGCGCAGCGGTGCATTAATATGTTCCAACTGCTGATCGCAACACGAGCTTATGGGCGCAGC AATGCTCAGGTTCCCAAGGGGAGGCTTATCAACGCGAGTGTTCATCCCATGGCCAGCCCGACGCTACCAAT TTCCCTTTCGAGATCGAGTATCGAGGGCATGAAGCAGAGACACAGCTGGGCTGGGAGGAAAGCGGGT SGAAATATCCACTGGCCGCTGTCAAGTCTGA
	TTGATGGGCTTGTGTHGCGGGGCCAACTGGCACTGGAAATCAAGCTGGTGTCAAGATTGGCTCAAGGCG AGCTATACCACTGTTCGCGCTCGATGAATTCATGGGTTCCGATCTCTCGGGGATTCGGCGCGGATCTGT TTGAACGCTGTCTATGCTCGGAGAGATTTGTACAGCTCGATCGCTGGTGTATCAAGACCTGTGAGTTCAAAATGG ACTGATATACGGAATAGACGACAGACTGGATGCTGCTCGATCCACGCTTTGGCGGAGACATCGCTGCTAT CCTCGCGCTTTCGTCAATCGCGGATGCTTTCTGGGCGGGGCAACGTGGAACGTTAAAGGCTCATTTGGAGG AGATGGCTTGTTCAGCCGACTACTATGATCATGAACGCGTATGCTGTTTTCAGAAAGAATTCGACAAATCGCCAGAC AAGCTCATCGCTGATGACGACAGGGCGAAGCGGCTTTGACGAGGCTGTATTCGCACTGGCTGA

SEQ ID 9	Precursor cicloisomaltotransferasa de glucano transferasa (EC 2.4.1.-)	de
		ATGGCATATTGGATCAGGCTCTCGCTGGCGGTGTGGCCGCCCGATCAGCAAGTTTGTAGCGAAGCGCGGTAAAT GGCCTGGATATCTTTTCAACAACATCTCTCGCTCTTACCGTCCCTTGGGCGCGGCATCCCTCCAGGTCCTGA TTGTTTCGCGATGTGGGGATGATCGGGTTTCTACAGGAGGAATATCGGATATTTCCGTGGACCTGACC CCACCTAGCCGCTTGGACGGGAGGCATCTGGATCTAGCGATATGTTCCGTGGCAAGTGTGGGCAACGATCTCA GAGCAAGCGGTCCAGCATCTGGGTGTGGGGGACACAGACATCTCACTATCCCGTCAACCGTTCCCACTCTCC ATGCTCAIAGGTATCAGTTGGCTATGCGGCGCTGAACATGGGACAGCGGACAGCGTCCCTGTACCGGGACA GGCAGCACTTCCAGCTCGCGCGCGATGTGGGTGAGGGGCACTCAAGTGGCCCGGTGATGGATAATCTCAGCCAGT CAAGCAAGCATGGGTGAGCGCGCGACGCTCGGCAAGTCTCCGGGCGCGGTGATGGATAATCTCAGCCAGT ATCAGATCAAGCGGTGCAATTTTAAGAGTGTGTGGGACATGACAGCGCTATCTCATCGGCCCGGAGTGG CCGAACTTGAAGGCTAACGCTCACAGGACCAATCTTCAGGCTTATATCAGCGCGCGCATAGCCGGGCGAT SGTGGGCTCGCTATATCTCTGGAPCGGAGCGCTGGGCGGACTATGCAACTCTCAATCCGAAAGGTACGGGG CAATGGGCTCTATGCTTCGCGACAGAACACCAACTGACCAAGCGCGGGGTGGTGTCTCTGGGGTGG TCGACCGACCATATTCTGAAATGAACCGCTTCAATGGCGACTGGGCGCAGATGGCTAACCGCGCATCCAGAA GACCATGTGGAAATTTAGGATCGAGCGCGCGCATCTGGATACGTTGGGTGACCTGGTGGTCAGCAATATGACG GCGAGGCGCATCCGTTACTTCTTTAGGAACGATTTCTGGCGAGCTTTGCGAATAATGTACAGGCTCAGACCGG GCACCACTGACATCAACGCGCTTTCGGGTTTGGATACCAACCGACCTTTACCTAAGCGGTACGGGACCGAACCT GTATATCGAACCCTATCCGAAATTCGGAACACCGCGGCTACGATGATTCGGAAGCTTATGGGACATCAAAAC AGAATATACGTCGCGCGCGCTGATGACGCGCTTTTATCCGACAGAGGTCCAGAGCGGTTCCTGACACGCTCC TTTGCGGTCAAGGTGAGAGTGTGAGGTTTGGACCGCGACTTAAATCCGATGCATAGCCATTAACCTCGG CATGAGTGTGTGCTCGGCGCAGATTGGGCTCAATGGAGGCTCCATATTACTCTTGGTGTATTTGATCACTTGA TACGGGGCCCATATTTCCCGCTCCGACCTTTAAGATCGAGGTCGATTCAGCAATATCTGGCGGATTTACTAC AACCTGTCCTTCCGAAATCCGCAATCTGCTCGGCTTCTGCGGCTTCCGCGCTCACTCATCTCACTCAAACTGAGCGGAGTCCATCCGCA TGGAAACGGAGCGATATCGGCGCAACCTTATGCGCAACCGGGAACGCTCTACTATCATCTCCCTGTATACGGGCTG

	GGATCGGTGGTGAATTGGGCTCACAACATGATCGGGTTCCATTATATTCGSAATTGACGACCCCTGACGGCAAA AACAAATCCGACCCCGGTGAACAACCTGCTGATCGAGATGGAAATTCCTGGAAAGAGACACACCGGGGGCATTTGTA CTATAGCGCGCCGACATCAACCCAGGCTTCCACACGCCCTCACTATAGGCTGAACGGAAACGGTAGCGTGA TGTTTACGCTACCGACTCTCAAGACGGTGGCGCTTGTTTGGCTGAAGGACCAATTCACCACTACGACCGAI TACACGATCGGTACCGCGCAGGATGTGAGGGTGGCAGACAAATCTTCGGAACGACGGAGAGGATGC TACCGGATAACGCTGGCTGTGTCGCTCCGACAGGTGGACACATCGATTCGGAGCGGTGTCTCAACGC TAACGATGGIAACCCGAAGCAACTCGCGGACTGGTCGAATTCGCCCTGGATGCACCTGATGGACCAATCATC GCGGTATATATGTTCTGCTAGCGCCACGACACAPACCACTCAATACGACGGCCAGTATTCGGGACACA TACCGTCTTCGGTAAATTCCTGGTCCGAGATACCGTGATATCCTGGAAGCCATAA
SEQ ID 10	Melitransferasa (EC 2.1.1.-) ATGATGGCTAACGACAAATACCACTGAGGTGGTTGGTGATTTGGGTAGTCACTCCCACTTTGGCGCAAGGTTT TACTTTTAAAGTAAACAGCAGTCACATAGATACGATTCCTTCTACTATTCATAAAACGGTTCCTGGAGACTTAAAGAG CTCGACAACTAATATAATATCGAACTGATCAGGAGTTCGCTGGTCTTATTTAGATGTGGAGCGGATACC GGTCTTTTACGCTAGTCCGCGCAGCAGCCCAACCCCTGATCCGGCTCTGCTTTTGGAGCCGCTTCGGAGTAAI TCGTGAATCTCTCAGAGCAATATTGCTCTCAATCCGGAGCTTGCTACGATCGGTATCGCTCGAGCCCTGTGGGT TATCGAATGAACGGGCACTTTCACTTTTACGAPAGATCAACAATCGTGGCTTTGTACACGACGATTCATCG CTTGAAAAAGCACAATGACAGCGAATCGGCGATTTGTACGTGAGGCGCACTACGAGACCCGACACTTGAIGA ATTGGAAGAAACGCTCGGGAATCGAGCGTTCCGTTGCTCAAAATTAAGTTGAGGACATGAGCATGCGCGTTA TCTCGGTGGCGCCCHCTTTATCGCCACGACCGCCCTTTCTTACTCTGAACTCTGAGAGAGGCTAACACT TTGAGTCTGGACCACTGTTGGTACCGAGTCCACTACCTTGGCTGGCAATGGCAACCCGACGAATTGGGGCAGTG CGAGGTTTACGTTTCAATGACGACGCTGGATCATCTTTTGGTCCCGCCGAAAGACGGGACGCGCTATTTT CGCTCTGCGCGCACTTGGCTTGCAAAATCGGGAATCCGCTGA

SEQ ID 11	Represor transcripcional; via_afirmada PF01381 tipo Peptidasa S24.:PF00717	ATGTCGATTTCCGAGCGCCCATGCGGATTTGTCGGAACCTGGCAAAATGACAAATAGCCGATGGTTAT CAGGCTACGAGAACTAGTGGATCGGACCGGAGCGCGAAGCTGTGCGCGCACGCGAGGACATCCCTCTCAGCA CACTTTACAGTTACCTGTGCGGTGCGGAACCTCAAGCTTTTCGTGCGCGCAAGATCACGGAAGCCTGGGGTGC AGTCTTGACTGGCTTGGCGAGGAGGAGGAGCGGACCTGCGGCGCGGGAATTCGGCAATGCCGGAGGGGTCC CGAGTCGGTCCAGTTTCTGAATTAGACGCTCAATCTCTCCGCCACACGCGGCTGACGCGGGAATGTTCTTATA TCGAAGCGGAATATCGATACCGGGATTTTCTCCCTTTGTCCATTAGTCCATACGGAACACATTTCCGCC GTACCGCGGAATCCGACAGCATGATCCGATCATAGACGATGGAGACATCTTTTAAATGAACGGATGTGA TAGCTCACAGTGGCAGCATCTATGCCCTGGGGTAGAARAACACCTTCTGTGAGGCGTCTGATCCTCAAGA CCAACGGCAGGTCCTCGGTCTATCAGCGAGAACCCGGTTACCGGACCGAGGAACTGAACGCCGAGGAGGTTCCG AGGATGGTCCAGGACGAGGGCTTTCCGGCCAGGATCATCGCGCGGCTCATCTCGCGCGCGGTTAGCCTGATCC ATAG
SEQ ID 12	Receptor hemo de la membrana externa	ATGGGATCGTCTCTTGCCCTGGCTCGTGGGACCTCAATAGTATGTTGGCGGTTCCGCAATCCTATGCTTG GCGGGACAATAGCCCGTGGCCCGCCAGGACGAAACAAAGGCGAATCGCGCGGTTACATGCGCAGGGGACGC GCAAGCGGGCAGCGCCATCCACCGCAGGATCAAGCGGTGGCTGTCTGTGGGAACAGTGAAGATCCCATGGG ATGAGACAGAGCGTTACCCGTGGGACGATGGACAAAGTTCGTGGCGGGGACCACTCCCTGCAAGATTCTGGC CAGGACACCGGGTGTCAATTTTGCTGGGACGACCCGTTCCGGCTGGATACATGGGCGAATGGGCGAATCATCAATCC GCGGCTATTCACAAAGCCAGTTGGGCAATCACCTGGACGATATCCCGCTGGGCGATGCCAGTTTCATCAATCC AACGGCTCGATATCATACAGCGGATCATCCAGAACATATCGGTCCGCTCGACATGTCCAGGGTGGCGGTGC GCTCGATGTATGTCCCGTACCCACCTGGGTGGCGGCTGCAATATTTACTCGATCCCGCGGACAAAGGCTG GTGGAGCATTTTCACAGACGTTCCGCGACCAACAGACCTATCGACGTAAGTCCAGCGCCAGAGCGGCAAGCTC AATCCGAGGGGAGGAGTTCTATGGTGTAGCGCGCACCGATGCCGGAATGGAAAGGCGCGGGGACCA GTTCGATACAGCAGGCGATTTTCAGATCGTACAGCGCTCGGGCGTTACGGAAATGTCCGGATTCCTCATTT

		ATTCCGATTGACACAGTATTAATTACAGCGATTGAGCCTGGAAATCATCCAGAGCTCGGCGGGAACTGGGAT TATTTCATTCCGAACTCAAGACCGCGTATCAGCCTCGCGAGGGGATCTATCCCGAAGCTATGCCAGGTGG ACATCCCATGCAACGCTCTCTATACGATCTCTCCAGGCCACCGGATTAATTCTTCCCGCATCACCTCCACGA TGGACCTGACGTCGCGCTGATCTGAAGAGGCTGCTGACGACGATCAGCGGGGAGCTACGATGAGACC AACCCCTATGTGCTGCTGCGCTCGGCGCGCCATGATCCAGCAGGTCGAGGACACATCATGATGACGCGGTGG CGGGATTGCGCGGCTGAGTACCAAGATCGGCATCAATTCGCTTGAACCGGCTCTGTGTAAGAAACAACAGGAT ATGCTGCGCGCAACGGTACTACACAGACGCTCTGCGGGAGGTACGCCGGAAGCGCCACCGGACCGTAC AACGATCGGTTCCGACCGCATACCGCATGACCTTCATACCAACGTTTTCATATATACCTGGAAGATTCTTA CGGTATCTTGAAGACGCTGCGGCTGACGCGGCTTCATATCCATGATGTCAGCAGACGCTCGGCGGCGCATCT ATACAAATCCGCTCATACGCGGAGGACACCCAGCGGAGTGGAGCTGACCAAGCAGCGCTTCTGCGG CATGTACGATCACTGGATTTCCTGCGCGGAGGAGTGTGTTTTCGACTTCGCGGAGAACATGCGCGCAT CACCTATAATACATGGCAGAGCGGAATGCAI GGGGAGTCATGAGATGCCGAGAACCTGAAGCCCGAGACA CTTCAATTACGAGTCTGGTTATCGATATAATCCGCTTCGTCGCGGCTCGTCAATCTGTATCATATCGAI TACGGAACCGCTGGCCACCAATCACACCGGAGCTGTGACGCCCAACATACCIATATCAAGCTGGGAA CATGGGATCTGGGTGCGGATGCGCGTGACGCTGCGCCGCTGCGGGCTCGAGATCTTCAACAGCGCA GCTACACAAATCCACCTATGGGAGGATGTATCCAGCGGGGGTAATTAATCCATCAGCGGGAAGGAG GCGGCTATCCCAATGATGTACAGGCCAACCTCTCTACAGGATGAGCAACGCAAGTCAATCTCAAGI CAATATATGGGAAAGGATACATCTGTCATACAGACGCGCGCTGACGCGGTATGGCTGGCATCGCTGT CGGCGACCTATATCTCAAAACCAATCCCAATCTCTCTGAGCTGATTAATTAATTTCGGGCTCTACAACTGTC AACAGGAATATTCGGGCGCATCGGCGGTCTCACTGTCCGCTGACAGGAGAACTCTTTGCGGCGCGGCGC AGCGAGTTCTTCGGTACGCTGCAAGCGGTCTTAG
SEQ ID 13	Levansucrase	GTGACGGGCGGTCTGTGCTGTGCAATCTGAAGATTTCCTTCAGGAGGATGGATTCGGCGATGTACGCG AAACTAGCCACGCTGAATATGGGTTGGCGGCTTCCTGCTCATGCTGTGGCGCGCAACTGGCTGGCGC

	AAGGGAATTCAGCGGCGAGGAAGCGGGCGGATGGCGACCGTCCGGGTGATGCTCGTGGCGGCGGCTC TTCCCGCGGGTTCGCTGGCGGGGTGCGGGGCTTCGGGCTGCCGCAATTCATACGCGACAGGCGTAAGAACC GCGATCGGACTTTACGCGCGGTGGACAGGTGCGAGCGATTGAGATCAAGGCGATTGGATGCGAGCGTGG CGGCGGGCAGAAATTCCTGCGGGCGGCTGACCATCCGGAACATCCGCGGCAATTCCTGGTGAACAAATCG GATGCTGGGTCTGGGATACCTGGACCTGATCGCAAGCACGCGGATCAGTTGAGCTATAAGGGCTGGGAAGT CATTTTCIGCTGAAGGCGGACCCCAATGCGGATAAGGTTTCGACGACCGCACGCTGCGCATGCCCATCGGCT TCTCTATCGTGGCGGGGTAATTCGCGGAGCGCGCGGTGAATGGCGCTGGACCTATGGCGGCGCATCTC TTCCCGGCGGAGCGGAGCGGAGCTCTACGCGGCGGAGACTACGGAACGAGCGGATGGTCCGGTTCGTC GCGTCTGATGCAGATACATGGCAATACGTTATCGGTCTTATACCGACGTGCGTTCAACCGGTAGCGCAACG CCAACAACATCACCGCGCGGCGGCAATCACCCAGACGCTGGGGGGAATCCAGCGGCACTTCAACCAATGTC TGGTTCAAGGGCTTCACCGCGGCGGCGGCTGCTGAGCGCGGAGCGGTGCTGTATCAGAACGTTGGGAGAA CGAATTCITCAATTCGCGGATCCGTTCACTTCGAGGACCGGAGCATCCGGCGTGAATGATGATGCTCG AGGCGAATACCGCGGGCGGAGCGTGGCTGCGCACTGACCGGCGGCGATCTGGGCTTCGCGCGGAGCGATGCC AATCGGAACCGCTGCAGGAAGTCTGGATACGCGGGCTATTACAGAGGCGCAATATCGGGCTGGCGGCTGGC CACGGATTCGACCTGTCGAAATGGAAGTTCTGTCGCGGTGATTCGAGCAACTGCGTCAATGACCGAGCG AACGGCGCGAGGTGTACCTCCATTAAGGGAATATATATCTTACCATCAGCCAGCGAGAGCTTCGGGCGC GTGTGATGGACCGGACGGGCTTACGGCTTCGTGGGTGAGGCGATCCGAGTGAATTCGAGCGGATGACTA TGGCAGCGGCTGACATGGGCAATCCGACCGACCTCAACAGCGGGGAGGCGAGGATTCGATCCAGCGCGG ACGAGAACCGCGGGGCTTCAGTCTTATTCGACTACGTATGCGGGGGGAGTGGTGGATGGTTCATCGAC ACGTGGAAACCGTCCGGGGGTACCTGGGCGGCGGCTGGGATTCGCGGCGGAGAGCGGCTGGCGGT CGACCTGGCGTACGGCAATGGGCGGCTGGGCGGCTATGGGATATTCGCGGCGGAGCGGCGGAGTGAATCG CCGGCTTCATCCAGGAATCTCTCCGCGGCGGAGGTCGCTCCGCGGCGGAGGCGGCGGAGGCGGAGGCGG GTGCTGGCGGAGGTTCGCGGATTCCTGATACCACTA
--	--

Listado de secuencias

<110> Azotic Technologies Ltd

<120> MICROORGANISMOS NOVEDOSOS Y SU USO EN AGRICULTURA

5

<130> P3088/WO

<150> GB1513277.2

<151> 28-07-2015

10

<160> 68

<170> BiSSAP 1.3.6

15

<210> 1

<211> 630

<212> ADN

<213> Acetobacter

20

<220>

<223> Glutación S-transferasa (EC 2.5.1.18)

<400> 1

atgacaaaat tatactattc tcccggcgct tgctctttgg cagggcatat tttgctcgaa	60
gagttgggaa gaccatatga gttgaaattg acgcccgttg gagaogaagg cacgggaagt	120
gaagagtttc taaaaataaa cccgcgagga aggggtgcctg ttttaattga tgggtgcggaa	180
ataattaccg aaagccccgc aatcttattt tatttatoga gttcattttc agacggaaat	240
ttctggccaa aatcagtttt ggagcaagcc cgctgctggg aatggtttaa ctggttatcg	300
agcaatgtac actcggttgc ctatgggcag gtgtggcgac caggacgggt cattgatgat	360
gagcgtcagt ggaataatgt tatttcaaaa gggaaaaata accttcatga atttagtgat	420
gtaatagaaa ataatatctc cgggaaaacg tgggtgtgtgg gtgaatcgta ttcatgcggt	480
gatccgtatt tgtttgtttt ttattcttgg gggaaagcca tcggattgga tatggaatcc	540
tctttcccg cgtggtcgcg tcatgcagcg cggatgctgg agcggttggc cgttcaaaac	600
gctttacggc aagaaggttt gatctcgtaa	630

25

<210> 2

<211> 729

<212> ADN

<213> Acetobacter

5

<220>

<223> O-metiltransferasa (EC 2.1.1.-)

<400> 2

10

ttggatgcct ctcgttttcc ttgcggagtc atcatgacca ttcctctctt tcgtccgcaa	60
ttcacaccgc agattcaacg tgcgcttgat cgcctttatt ccgagacact ctcgcaagat	120
ccagcgatac gccaatggc gcaagccaaa ggactgacac atgacgggca acgcggttcc	180
tacgaagcca tgaaagatgc cagactaccc gttacgccag agttcggcgc cctgctctat	240
attctggcac gcagcaccag agcccaacat atcatcgaat tcggcacgtc cttcggtggt	300
tcaacattat ttctcgcagc ggctttacgc gacaatggcg ggggccgact ggtgacctcg	360
gaacttatct cagacaaagc agaaagggtc tccgccaatc tcggggaggc aggactggca	420
gacctcgtag acattcgcat cggagatgcc cgcgccacgt tatcgctga tcttcctgag	480
tcgatcgatc tgatcctgct ggatgcgact aaaggactct acctcgatct cttactcctg	540
ctggaacctg cattacgaaa aggtggcctg gtgatcagcg atcgcgccga tctcgatggt	600
gacgacggcg gtcgcgcagc agcctacctt acctatctga caaccccgcc taacggatat	660
cgcacgccc gcatcactac acaggcgttg ggacaaacct tcgctcacga tgtggcggtg	720
cgcacctga	729

<210> 3

15

<211> 462

<212> ADN

<213> Acetobacter

<220>

20

<223> Regulador transcripcional, familia TetR

<400> 3

ES 2 817 004 T3

```

gtgggaatag ccacgctcta ccaatacttt gagaacaagg agagcgttgt cgcggcactt      60
agtcgtcggg tacgggaaac actgctccat gatgttgctt cattactcga aaccgcttgt      120
tcgttgccac tttccgaggg tgtgcgctgt ctggtcgtcg ctgccgtgaa ggcggacaag      180
agccgtccat cgcttaacgt cgggcttgat cggttggagg aggcctcttc tttggaagcg      240
gatcatctgc tggtagcggc tgagctttgc acggttggtt cgtcgttcct caagtgccag      300
ggaattattc aggagaacac tgcaaaaatt ctggcagatg atctgtgtac gataacaggg      360
gcacttattg acgctgcaca caatcgacag atacctatcg atgacttgct aattgaccgt      420
attacgcgaa ggctggtcgc gattattcag agcgcgcttt aa                          462

```

<210> 4

<211> 522

5 <212> ADN

<213> Acetobacter

<220>

<223> Factor sigma de tipo ECF de ARN polimerasa::Factor sigma de tipo ECF de ARN polimerasa

10

<400> 4

```

gtgggacagc cggacaaata tttcgagctt ttcgcgatac atcgcaccga tcttgtgcgt      60
ttcgccagag gtatcatgag agatgatagt ctggcggaag atgttgtaca ggatgctttt      120
ctcgggctga ctactgtaac agtggcacag gaccgcgttc tttcggatcc tctgaattac      180
gtttaccgca ttattcgga tctggccttt gaccgttata gacgacggca attcgaggcc      240
ggattgtttg accatggggg agatagttct tccgaaacaa tcgaagcgga tgcccctaca      300
ccggaaggtg aggccttcagg gaaatccgac atgcgggcaa tgcgcgccgc tatggcgga      360
ctgccagaac ggacgtgcgt cgcattggaa atgcatctgt tcgacggacg aaagctacgg      420
gaaatagcgg ctcathtagg tgtttctatt gggatggccc actcccttgt cgcagtgggt      480
atggagcatt gccgcaaacg tctttccaca cctgaaacct ga                          522

```

15

<210> 5

<211> 984

<212> ADN

<213> Acetobacter

20

<220>

<223> Proteína de la familia FecR, sensor de COG:dicitrato de Fe2+, componente de membrana;

ES 2 817 004 T3

<400> 5

gtgagcgaag acttcaatcc aacaacggcg gttgagtgga aaatagccct ttcagaagag	60
cctgacgatt ctgtgctcag agaacgcttt gaagcatggc ttgctgccgc agaggatcac	120
cggaaagagt ggcaggaact tacgcaggga cttgagaatt tccgccagat tggcccgctt	180
tatcgtgaga aatgggtgcc ttcataaagt ggggcacaaa atactgcgtc aaaacaaggt	240
aggctcaaag gaagacctgc taattttgtt aggttttcag ttgctgcatt tgcggctgct	300
gctgccgta cattggtatg gtccctctgac cttctgcttc gattacaggc cgattacgcc	360
acaggctcgg cagaaacgcg aacagtcagt ctccccgatg gtagtgaatt gaccctcggc	420
ccgcgaagtg cggtaaaaat gtcttactct gtagagaaac gggatattcg tcttttaaag	480
ggagaggcgc tcttcacggt tcgacatgat atggcgcgac cttttgaggt ccacacagac	540
aaattcaccg taacggacat cggaactatt tttgacgtca gaatgtctca gggcgaggaa	600
gaagtctctg tccgggaagg agaggctcgg gtgcaggatg tttccggtgg atttcataat	660
ctcgatgccg gaacgtggga gcggattaga actgtaggca atggagttag cgtcactcat	720
gggagcggct ctccggaaga tgtgggcgca tggtcagcgg ggcaaattat tgccaaggaa	780
aacagcgtgt ccagcgtcgt ggaaaggctt aggccctact accggggggt tgttgtcctt	840
tatggttctt cttttgggga gaagtcactc actggtgttt atgacgcaag tgacccggtt	900
ggcgcatttc gggcgatcgc agccgcgcat catgctcaga tgcacaggt ttcgccatgg	960
ctgacaatat tggccgcacc gtag	984

<210> 6

5

<211> 2604

<212> ADN

<213> Acetobacter

<220>

10

<223> Receptor de ferricromo-hierro

<400> 6

ES 2 817 004 T3

atgaaggggtg cggttgcatt gcattcgcaa ttgtggcggc tcatacgaat gggaacggat	60
aaggatgatga cgattgatga tagaatgaag cgggtgtggc gccaggtggc gtggcttatc	120
gcgctgggta gtacgacgtt tctgaatgcc gctgtgacga aaagctatgg tgcagaacct	180
tcccaaagtg ctcgggccgt cagatcattt tccattccgg cccaatctct tgaagatggt	240
ctcgcaaggt tcggacagca aagtgggtgg caggtttctg ttgacggaaa tcttgcaaaa	300
tctctgacaa cgcacgggtg tagcggtagc atgacatctg ctcaggccct caatgcgac	360
ctgtccggga ctggcctgac atacacgac aggggtggcc gaaccgtcgt gctgacgaaa	420
gcagtagcca acatcacgct tgggtccggtc cgtgtcggag gaaccctcgc gcgtcaggat	480
ccaacagggc cgggtgtcgg ctacttcgcc gaaaacacaa tggttggtac aaagacggat	540
acgcccatac cggaataacc gaactcagtc tacgtcgtga ccaagcagtt gatgaccgat	600
cagcagccgc agaataacct acaggctttg cgttacactc ccggcatcta ctctgaagcc	660
ggaggaacga caaatcgcg atctgccag aatgacaaca tgggcattta tcagcgtgga	720
tttctctcga gccagttcgt ggatgggttg atgacgaatt cgtatgccgc cgccgagcca	780
agctttctgg accgtatcga ggcgtcaac ggtccagcat cggatgatga tggccagacg	840
acaccgggag gaatggtcgg tatgagcctg aagaaaccca ccgaaacgcc gctgcatcag	900
gtttcgcctag gcttcggaag ctggggacgg tacgaggcaa cgttcgatgt cagcgataag	960
atcacgcagt ccggtaatct gcgctatcgt attgcagcca tcggagtcac atcgggcact	1020
caggaagacc gaattgatta tcacgggtg ggtgtacttc cttcaatcac gtgggatatc	1080
gatcccaaga ctgcctcac tctacttggg agttatatgt acacgcctgg ctcagggagc	1140
accagtgggt atccggctct cgggactctt attcacaatt cggaaattcc acgaatctca	1200
cgaagcacat ttatcggaat acctagttgg aacactatgg gagataaggt cgggatgttc	1260
gaatatcaat ttagtcataa atttaataaa ttatttgagt tcaatcagac gtttcgcgta	1320
gagaattcca acgttcatga gtcaaatatc accgatgtaa cacctgtaga tgttgaagga	1380
aaatggacat atttttatcc ttggaaacaa aattatgaaa acacaactga ggtacttgat	1440
actcgcttag gggggcggtt tctaactggg cctgtacaac atacatgggt catcggttct	1500
gatttcgcga attatgacta tcattatact gagctcatcg acgacgggtc gacaatcggt	1560
gtgcccactc agcaccogac atcaaaactat tccccatgta taagtttaac ctccgcgaag	1620

ES 2 817 004 T3

tgtgacgcct tcgcgggaat aaaccacagac tataactcgt ttcaggaggg cgtgtathtt	1680
caggaccaga taaaatggca gcgcctgtcc gttctcttgg gtggacgcca agattgggtt	1740
aattcatcta ataaaaatta cagtgtaacg aacttttatg gaaacgtcag caccgcggtt	1800
aataaactg ctccacaccc tcaatcggcc ttcacctgga gagctggtat aatctataat	1860
tttgactttg ggcttgcccc gtacttcagt tacgcaacat cctttgtgcc acaaggaggt	1920
acggattggc agggtaagat tttcgcgcct ttgagcggaa agcaactcga agccgggttg	1980
aagtataaag ttccaaacga agatatcctc ataacggcat cagcattccg aattgatgaa	2040
gaccactatc ttatcagtga tcttggtcac acgggcttta gcagtgcgc gggaacggta	2100
cgcctgcagg gtttcgaggt ttccgccagt gcgaacatta ccaaaacct caaactgtc	2160
gcctcttaca catatgagga tgtgcggttc agaaagaaca atttgccgt aaattcgtc	2220
gatcccgta cgctaacata tggagcaaag gtaagcgaga atggaaaatt cgttcctcga	2280
gttcctcga atatgtttaa tatgtttctt gattacacct tccacgacgc ccattgaag	2340
gggtctcggt ttaatggagg aattcgctac accggttta cctatgcga ctatgtggag	2400
tcttacaaaa cgccggcgta ttatctgttt gacattggcg cacactatga ttttgaggaa	2460
ataatccctt ctctcaaagg tctgcgtgcc cagttggcaa tctcaaattt ggccaataaa	2520
tattatatta ctctgtgcaa tacgccata tgtactctcg gttatgctcg aaagttttac	2580
ggtaacgtga cgtatagctg gtga	2604

<210> 7

<211> 3066

5 <212> ADN

<213> Acetobacter

<220>

<223> Proteína de la familia de la retrotranscriptasa

10

<400> 7

ES 2 817 004 T3

gtgacgcccg aattgctcct ctccaaggtg cggctgctgc ggtcgcccaa tgacgacggc	60
gcgttcttcg acctagtcgg cagtgttctt aattggtcct gggaggaaag agacgaacgt	120
caattcgccc gcttcaagca gcgcgcgggc atccctgagt tcgatggcgt cgccttcca	180
cagggtttgg ttgcagctgg cttcttctcg aacatcgtgc tgcttgattt cgatcggatc	240
gtcatcggac agattgggag agaagttaca aacggagtgt ggctccggga cgcctgccgg	300
tacgtcgacg acattagact gaccataaca actgcaccag gtattgacct aagagaagct	360
caggcgctg taatggcgtg gcttgggcaa ctcctcacgg ggagctgtcc gggcttgaa	420
ttctccccgg agaagacgtc aactgcgtcg gttggaggcg agcagatgcc gctggttcgc	480
caatcccgaa agatggagcg catccagacc gcgatttcg gcggcttcga tgccagtgg	540

ggcgaggagg	tgatccacgc	gatcgaagcc	ctcgtccgat	cccagctaac	gatcaacagc	600
gtcgaagagt	cgcctacccc	tcccggcttg	agagcggtag	ccgatgtcaa	agacgagaca	660
gtcggtcgtt	tcgctgctgg	tcggttcaga	aaaacctttc	gttcattgag	gccactactc	720
gatgatcgac	cttacatgga	gattgctgaa	ttcggggagg	agacgttccg	gcgcacccga	780
ctttcgcaat	cggagcttga	cgaggaagca	cgcgcatttg	cgctaatact	agtcgaacgg	840
tggatactcg	atccttcgaa	tgtgcggctg	ctgcgcgtcg	cactcgacct	ctggccgtcc	900
cgccaaactcc	tcaaggaagt	actgaaactc	tttgagccct	atcttgcctg	gaagatcagg	960
gcaatcacta	gccggcaagt	tgcatactac	tgccctcgccg	agatatttcg	agcagggggcg	1020
accgagacgg	gcttcattga	cgatccagag	tgccctcccc	ctgcgcgtcg	tctcgccggt	1080
tatagatctc	tgcttctgga	ggccgcagta	cgagtggccc	ggggcgaagc	cgaacgtgtc	1140
ccgtggtatc	tcgcgcaaca	agcactgctt	tacattgcgg	tcacgatcc	ccgggctatc	1200
caagatcgag	gaatttcaaa	gaccaatcga	tcctattggc	gcctcgtctc	atttctgaaa	1260
ggcgaacgcg	acgtctcttc	agatcgcgaa	ttcgcagtag	ccgcggtggt	gagccgcagg	1320
tcgttccttt	cgaatgatca	ggccgtggat	ctcgtcggtc	ggatgctcac	gccagagcgg	1380
ttcgccgagg	tgcccgcgcg	cgacatagaa	ttcgcccgcg	atctctttcg	cgccgtcgac	1440
cgacacctca	ccgttcgggc	aggcattgcc	gaggacttgg	gggtcgccga	atggtccatg	1500
tcagaggaaa	tgagctctct	gcaaagctat	atccaaggca	aagggcctct	gaatccgcta	1560
cgcaatgaga	tcggcgtagt	cagttttgca	gagaaattca	tctcccatct	ccaagaagga	1620
aatttgccgg	aagtcgtgac	gccgtcgacg	acgcagatag	cggtacagca	agtgggcaaa	1680
tatgtccggc	tcgaacgggt	gatcttcaga	tcggcccaga	caacgcgcac	ttaccggtct	1740
atttatactg	ctcccagatg	ggcgccggaa	tctcaacgct	ggcgctttca	gctcggttat	1800
ttacttcgct	tcattcttac	tgccagaata	gacttcagcc	ttccagttag	gccgccatcg	1860
tggaagggaag	gtaaacacat	ctatcggcct	accagaagtc	actggtttca	gcggcaatac	1920
ggcttctata	atgggcatga	ggccttcggg	gacgattggc	taccatttc	gcagttcact	1980
caggatcttc	tcttcgatct	gctcacctgg	cccggctgcc	gcacaagtag	cccggatgtc	2040
gatcagttgt	ccctggatga	aacggctgct	cgaatccgcg	cagctctcgt	agaagccacc	2100
gctgcgattg	gcccggttac	aggaacctg	atgctcaaga	tcgatgcacc	tattccaggt	2160
accacatcga	aggggcgcgc	gcttcggggc	tgcgctgtcc	agtcgatcat	gcccggaagca	2220
gaggacttct	cggctgccga	tctggagatg	cgctcgccgg	cccttcgacg	aaagcacccg	2280
aaacatctgt	ccacggcatt	ggcggcgggt	gagaagatgt	tggtatcttcg	cgagactcat	2340
aagccagcca	gcaagcgtct	cgactggctc	atcctaccag	aactgtctgt	tcaccgggat	2400
gacgttgcca	cccacctcgt	gccgttcgcg	cgagcgttca	agaccgcgat	cctggtcggc	2460

ES 2 817 004 T3

atggcctacg aacaagtcgt cacgggagag ccgctgatca actcggccct ctggattatc	2520
ccgaggatgg tgcggggcat gggcctacag acggtgatca gacggcaggg aaaacagcac	2580
ctctctccga tggaacagaa gtacgtcaaa ccggtcgaac tgatcaccgg attccgcccg	2640
tgcagtggtg tgggtgggta cgaatggtcg aacaatccgg ccaaagacgc actttggctc	2700
accgcgtcca tctgctacga tgcaacagac ctgaagctgg cgagcgatct tcgtgatcgc	2760
tcagacgtgt ttgcgatccc agccctgaat ctcgacgtcg gcaccttcga tcagatggcg	2820
caggcgctgc attatcatat gttccaactc gtgctgatcg cgaacaacgg agcttatggg	2880
ggcagcaatg ctcacgttcc caagggggag gcctatcaac gccaaagtgt ccatacccat	2940
ggccagcccc aggtacaat ttcccttttc gagatcgacg atatcgaggg catgaagcag	3000
agacacaagc tcggcgctgg gaaggaaggc ggggtggaaat atccacctgc cggctgtcaa	3060
gtctga	3066

<210> 8

<211> 513

5 <212> ADN

<213> Acetobacter

<220>

<223> Proteína de modulación de topología de ADN

10

<400> 8

ttgatgcgct tgttcgtgac ggggccaaact ggcagtggaa aatcaacgct ggctgcaaag	60
ttggctcaaa gggcagctat accactgttc ccgctcgatg aaattcattg ggttcgccat	120
ctctccgggg attggcggcg cgatcctgtt gaacgcctgt ctatgctcgg agagattgta	180
cagctcgatg cctgggtcat cgaaggcgtg cagttcaaat ggactgatat agcgatagaa	240
cgagcagact ggatcgtcgt cctcgatcca ccacgttggc ggaacatcgc tcgtatcctg	300
cgccgtttcg tcaatcgccg atgcttttct ggggcggggc accgtggaac ggtaaaggct	360
ctattggagg agatcggtt gtcagccgac tactatggtc atgaacgcgg tatgctgttc	420
gagaagattg gacaatcgcc agacaagctc atcgctgtac atgacgacaa gggcgaacgc	480
gctttgaccg aggctgtatt cgcgactgcg tga	513

15 <210> 9

<211> 2352

<212> ADN

<213> Acetobacter

<220>

<223> Precursor de glucanotransferasa de cicloisomaltooligosacárido (EC 2.4.1.-)

<400> 9

5

```

atggcatatt ggatcaggct ctgctggcc gtgtggccgc ccgatcagca acgttgtagc      60
gaaggccgcg taatgcgcgc ctatcttttc acaaccattc tctcgctctt accgtccctt    120
gcggcgccgc catccctcca aggtccgatt gtttcgcgat tgcgggatga tcgggctttc    180
taccaggcag gcaatgtcgc gatgatttcc gtggaactga cccactagc cgcttggaagc    240
ggaggccatg tggatctagc gatatgttcg cgtgggcaag tcgtgggcac gattcagagc    300
caagcgggtca ccagcatggt ggctggggcg gaccagacac ttcaactatcc cgtcaccggt    360
cccagtctcc atgctcatgg gtatcagttg gctatcgccg ccctgaacaa tggggacagc    420
gggacagcgt cctgtaccgg gacaggcagc acttccacgt cgcgggcoga tgtggcgta    480
ggcggcatca acgtggccgc gaatgcctgg gaagacatca acgaagcatg ggtcgacgcg    540
ccgacgcctc gcaacgtctc cgcggcccgc gtgatggata atctcagcca gtatcacatc    600
aacgcggtgc aattttacga cgtgctgtgg cgacatgacg agccgtattc atccgccccg    660
cagtggccga acctggaagg cgtaacggtc acaaggacca atcttcaggc ttatatcagc    720
gcggcgcata gccgcggcat ggtggcgctc gcctataatc tctggaacgg agcctgggcg    780
gactatgcaa ctgtcaatcc gaaggtcacg gcggcaatgg ggctctatgc ttcgtccgga    840
cagaaacacc aactgaccaa cggcgggggc tggctgtcct gggggtggtc gaccgaccat    900
attgctgaaa tgaaccggtt caatggcgac tggggccagat ggctaaccag ccagatccag    960
aagaccatgt ggaatttagg attcgacgcc gcgcactctg atacgttggg tgaccctggt   1020
ggtcagcaat atgacggcga ggccatccg ttacctgctt taggaacgat tctggcagac   1080
tttgccaata atgtacaggc tcagaccggg gcaccaactg acatcaacgc cgtttcgggt   1140
tggaatacca ccgaccttta cctacgcggt acgggacca acctgtatat cgaaccccat   1200
cccgaattcg gaaacacgcc gggtacgat gattcccga gcttatggga catcaaacag   1260
aaatatacgt cgcgcccgct gatgacggcg ttttatccgc agcaggcca gagcggttcg   1320
ctgagcacgt cctttgccgt caagggtag agtgtgaagg tttgcgacc gacgttaaaa   1380
tccggatgca tagccaataa cctcggcatt gagttgttgc tcggccagat tgcgctcaat   1440
ggaggctcca atattactct tggtagtttt gatcatctga taccggggcc atatttcccc   1500
cgtccgaccc ttaagatcga cggccattg cagcaatatc tggcggatta ctacaactgg   1560
tgggtcggaa tgcgcgatct gctgcgtgtc ggcgtcatct catccaatga gagggagtcc   1620
atccggaatg gaaacggagc cagtatcggc caaccttatg cccaaccggg aaccgtctac   1680
tatcatcccc tgatacgcgc tggcatcgct ggtgaattgg cgctcacaaa catgatcggg   1740
ttgcattata atcggattga cgaccctgac ggcaaaaaca atccgacccc ggtgaacaac   1800
ctgtcgatcg agatggaatt ctgggaaaga agcacaccgg gggcattgta ctatagcgcg   1860

```

ES 2 817 004 T3

```

cccgacatca accacggctt cccacagccc ctcacctata ggctgaacgg aaacggtagc 1920
gtgatgttta cgctaccgac tctcaagacg gtggcgcttg tttggctgga aggcaccaat 1980
ttcaccacta cgaccgatta cacgatcggg acggcgaggg atgtgagggg tggcacagca 2040
aacttctgga cgaacggcag cggagaggat gctaccggat atcgtggctg ctgtggtcgc 2100
tccgcacgct gggacagcat cgatttcgga gcgggtgtgt caacgctaac gatggttaacc 2160
cgaagccaac tcggcggaact ggtcgaattt cgcctggatg cacctgatgg accagtcac 2220
gcccgtaatt atgttcctgc gtctagcgcc acgacaacaa ccaactcaatt acgcaggcca 2280
gtatttcgga cacataccgt ctctcgctaaa attcctgggc gcgagattac gctgatatcc 2340
tggaagccat aa 2352

```

<210> 10

<211> 855

5 <212> ADN

<213> Acetobacter

<220>

<223> Metiltransferasa (EC 2.1.1.-)

10

<400> 10

```

atgatggcta acgacaatac cactgagggtg gttggtgcat ttgcggtaag tcatcccaac 60
ttggcgcaag gttttacttt tagtaacagc agtcaactag atacgattgc ttctactatt 120
cataaaagcg gtttgagagc ttatgaagct cgcacaacta atataattat cgaactgatc 180
aggagtctgt ctggtcttat tttagatgtg ggagcgaata ccgggtctttt tacgctagtc 240
gccgcagcag ccaacccccct gatccgcgtc tgctcttttg agccgcttgc gagtattcgt 300
gaacttctca agagcaatat tgctctcaat ccggagcttg catcacgtat cgctgtcgag 360
cctgtcgggt tatcgaatga acggggcact ttcacttttt acgaaacgat caacaatcgt 420
ggctttgtca cgacgagttc atcgtttgaa aaagcacatg cagagcgaat cggcgatttg 480
tacgtcgagc gcactatcga gacccggaca cttgatgaat tcggagaaac gctcgggaat 540
gcgagcggtc cgttcgtcaa aattgacgtt gagggacatg agcatgccgt tatctccggt 600
ggccgccact ttatcgccaa gcaccgccct tttcttactc tcgaagtcct gagagaggct 660
aacactttga gtctggacca gttggtgacc gagtccaact accttgccct ggcaatggca 720
cccgacgaat tgcggcagtg cgagcgttta cggtttcatg acgacgcctg gaatcatctt 780
ttggtccccc ccgaaaaagc ggaacggcta ttttcgtctt gccgccgact tggcttgcaa 840
atcgggatcc gctga 855

```

<210> 11

<211> 744

<212> ADN

<213> Acetobacter

5

<400> 11

```

atgtcgaatt ccgagcgccc aatgcgcgat ttgtcggacc tggcaaaaaa cggacaaata    60
gagccgatgg ttatcaggct acgagaagta gtggatcgga ccggaggcgc gaaagctgtg    120
gccgcacgca cggacatccc tctcagcaca ctttcagggtt acctgtcggg tcgggaactc    180
aagctttccg tcgcgcgcaa gatcacgga gcctgcggtg tcagtcttga ctggcttgcg    240
gcaggagagg acggacctgc ggcccgggaa ttcggcaatg cccggcaggc gggccccgag    300
tcgggtcgagt ttctgaatta cgacgtcatt ctctccgccc accagggcgt cgacggggat    360
agttcttata tcgaaacgag aatatcgata ccgcgggatt ttctcccttt gtccattcag    420
tccaatacgg acaacatttc ggccgtcacg gcgaaatgcg acagcatgaa tccgatcata    480
gacgatggag acattctttt aataagaacg gatgtgcata cgctcacaag tggcagcatc    540
tatgccctgc gggtagaaaa cacccttctg gtcaggcgtc tgatcctcaa gaccaacggc    600
aacgtccagg tcatcagcga gaacccgcgt tacccgaccg aggaactgaa cgccgaggac    660
gttcgcagga tgggccagga cgacggcttt ccggccagga tcatcggccg ggtcatctgg    720
cgcgccggta gcctgattcc atag                                         744

```

10

<210> 12

<211> 2331

<212> ADN

<213> Acetobacter

15

<220>

<223> Receptor hemo de la membrana externa

<400> 12

ES 2 817 004 T3

atgogcatcg tcctcttgcc ctgcctcgtc gcgacctcaa taagtatgtt ggcggtttcc	60
gcacccctatg cttgggogga caatagcccg tcgccccca ggacgaacaa acaggccaaa	120
tcgogggccgt tacatgogca ggggacgogc aaagcgggca gogccatcac cagccaggat	180
gaagcgggtg ctgtcgtggg aacacgtgag acatcgcatg ggatggagca gagcgttacc	240
cgtgogacga tggacaagtt cgtggcgggg accagtcccc tgcagattct gtcggccacg	300
acaccgggtg tcaattttgc ctoggacgac ccgttcggcc tggatacatg ggogaacaca	360
ttttatattc goggtattc ccaaagccag ttgggcatca ccctggacgg tatcccgtg	420
ggogatgccc agttcatcaa ttccaacggc ctcgatatca atcaggcgat catccagaac	480
aatatcggtc gogtcgacat gtcgcagggt ggcggtgogc tcgatgtcat gtccgtcacc	540
aacctgggtg gogcogtgca atattattca ctcgatccgc gogacaaggc tggtgagac	600
atttcacaga cgttcggcag caaccagacc tatcgcacgt acgtcagcgc ccagagcggc	660

ES 2 817 004 T3

```

aagctcaatc ccagcgggac gaagttctat gcgtcgtaac cgcgcaccga tgccgggaaa 720
tggaaggcgc ccggggacca gttegaacag caggcgaatt tcaagatcgt acagccgctc 780
gggcgttacg gaaaactgtc cggattcttc aattattccg aattcgacca gtataattac 840
agcgatttga gcctggaaat catccagaag ctcggcgcga acgtggatta tttctatccg 900
aactacaaag ccgcgtatca ggctgccgag gggatctatc ccgcaggcta tgccaaggtc 960
ggagatgcca tggacgtctc ctattacgat ggtggccagg accagcggaa ttatctttcc 1020
ggcatcacgt ccacgatoga cctgacgtcc cgcctgcata tgaagacggt gctgtacgac 1080
cagcaatcgc cgggggacta cgaatggacc aaccctatg tgcgtcgcc ctcgggcgcg 1140
cccatgatcc agcaggtcgc gcacacatcg atgacgcgcg tgggcgggat tggcgcggtg 1200
cagtaccaga tcgccaatca ttcgcttgaa accggcgtct ggtacgaaaa caacggatat 1260
agctggggcg aacggtacta caaccagccg cttctggggg agggtagcc ccgaagcgcc 1320
accggaccgt acaacgatcc gttcgccacc gcatacgcca tgaccttcaa taccaacagt 1380
tttcaatatt acctggaaga ttctaccgt atcttgaaag cgtcggggt gcacgcgggc 1440
ttcaaatcca tgctgacgac gacgtcgggc ggcgcatcct ataacaatcc cgtctatacg 1500
ggccaggaca ccctgccag tggcagcctg accaccgcca gcgccttct gccgcagtgc 1560
agcatcaact ggaatttct cccccgaac gaactgtttt tcgacttcgc ggagaacatg 1620
cgcgatttca cctataatac atggcagagc gggaatgcat ggggagtcaa tgagatgcc 1680
cagaacctga agcccgagac caccttcaat tacgaggtcg gttatcgata taattcccgc 1740
ttcgtcacgc gcctcgtaa tctgtatcat atcgattaca ggaaccggct ggccaccatc 1800
accaccggca gcctggtgaa cgcacacaat acctatatca acgtggggaa catggcgatc 1860
tggggtgccg atgcggcgt gacgggtgac ccgctgcgg gcctcgagat cttcaacagc 1920
gccagctaca acaaatccac ctatgggcag gatgtatcca gcggcgggt aaattatccc 1980
atcagcggca agcaggaggc cggctatccg caatggatgt acaaggcaa cgtctcgta 2040
aggtatggca acgcgaaggc caacttcaac gtcaactata tgggaaagcg atacatctcg 2100
tacatgaacg acgccgcgt gaacgggtat tggctggcat cgtgtcggc gacgtatata 2160
ttcaaaacca ttccccatct ctctcagctt gaattcaatt tcggcgtcta caacctgttc 2220
aaccaggaat atatcggcgc catcggcggg ttctcactgt ccggtgacac gcagcaactc 2280
tttgccggcg cgccacgcca gttcttcggt acgctgcacg cacggttcta g 2331

```

<210> 13

<211> 1812

5

<212> ADN

<213> Acetobacter

<220>

<223> Levansucrasa

<400> 13

gtgacggcgc ggtcgtggtt gctctgcaat ctgaagagtt tccttcagga ggatggaatg	60
gcgcattgtac gccgaaaagt agccacgctg aatatggcgt tggccgggtc cctgctcatg	120
gtgctgggcg cgcaaagtgc gctggcgcaa gggaatttca gccggcagga agccgcgcgc	180
atggcgccacc gtccgggtgt gatgcctcgt ggcggcccg ctttccccgg gcggtcgctg	240
gccgggggtgc cgggcttccc gctgcccagc attcatacgc agcaggcgta tgaccgcag	300
tcggacttta ccgcccgctg gacacgtgcc gacgcattgc agatcaaggc gcattcggat	360
gcgacggctcg cggccgggca gaattccctg ccggcgcaac tgaccatgcc gaacatcccg	420
gcggacttcc cgggtgatcaa tccggatgtc tgggtctggg atacctggac cctgatcgac	480
aagcacgccg atcagttcag ctataacggc tgggaagtca ttttctgcct gacggccgac	540
cccaatgccg gatacggttt cgacgaccgc cacgtgcattg cccgcattcg cttcttctat	600
cgctcgcgcg gtattcccg cagccggcgg ccgggtgaatg gcggctggac ctatggcggc	660
catctcttcc ccgacggagc cagcgcgagc gtctacgccg gccagacctc cacgaaccag	720
gcggaatggt ccggttcgtc gcgtctgatg cagatacatg gcaataccgt atcggctctc	780
tataccgacg tggcggtcaa ccgtgacgcc aacgccaaaca acatcacccc gccgcaggcc	840
atcatcaccc agaccctggg gcggatccac gccgacttca accatgtctg gttcacgggc	900
ttcacgcgcc acacgcgcgt gctgcagccc gacggcgctg tgtatcagaa cgggtgcgag	960
aacgaattct tcaatttccg cgatccgttc accttcgagg acccgaagca tcccggcgtg	1020
aactacatgg tgttcgaggg caataccgcg ggccagcgtg gcgtcgccaa ctgcaccgag	1080
gccgatctgg gcttccgccc gaacgatccc aatgcggaaa ccctgcagga agtcctggat	1140
agcggggcct attaccagaa ggccaatctc ggccctggcca tcgccacgga ttgcaccctg	1200
tcgaaatgga agttcctgtc gccgctgatt tcggccaact gcgtcaatga ccagaccgaa	1260
cggccgcagg tgtacctcca taacggaaaa tactatatct tcaccatcag ccaccgcag	1320
accttcgcgg ccggtgtcga tggaccggac ggcgtctacg gcttcgtggg tgacggcatc	1380
cgcagtgact tccagccgat gaactatggc agcggcctga cgatgggcaa tccgaccgac	1440
ctcaacacgg cggcaggcac ggatttcgat ccagcccg accagaacct gcgggccttc	1500
cagtcctatt cgcactacgt catgccgggg ggactgggtg aatcgttcat cgacacgggtg	1560
gaaaaccgtc gcgggggtac cctggcgccc acggctccggg tgcgcacgc ccagaacgcg	1620
tccgcggtcg acctgcggta cggcaatggc ggcctggggc gctatggcga tattccggcc	1680
aaccgcgcgg acgtgaacat cgcgggcttc atccaggatc tgttcggcca gccacgctg	1740
ggtctggcgg cgcaggcgtc caccaacaat gcccagggtg tggcgcaggt tcgccaattc	1800
ctgaaccagt aa	1812

5

<210> 14

<211> 20

	<212> ADN	
	<213> Acetobacter	
	<220>	
5	<223> Cebador	
	<400> 14	
	tgaaattgac gcccggtgga	20
10	<210> 15	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Acetobacter	
15	<220>	
	<223> Cebador	
	<400> 15	
	cacgccggga aagaggattc	20
20	<210> 16	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Acetobacter	
25	<220>	
	<223> Cebador	
	<400> 16	
30	ggcaacgcgg ttctacgaa	20
	<210> 17	
	<211> 20	
	<212> ADN	
35	<213> Acetobacter	

	<220>	
	<223> Cebador	
	<400> 17	
5	cgttagccgg ggtgtcaga	20
	<210> 18	
	<211> 20	
	<212> ADN	
10	<213> Acetobacter	
	<220>	
	<223> Cebador	
	<400> 18	
15	tcgttgccac ttccgaggg	20
	<210> 19	
	<211> 21	
20	<212> ADN	
	<213> Acetobacter	
	<220>	
	<223> Cebador	
25	<400> 19	
	gtcgattgtg tgcagcgtca a	21
	<210> 20	
30	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Acetobacter	
	<220>	
35	<223> Cebador	

	<400> 20	
	caccgatctt gtgcgtttcg	20
	<210> 21	
	<211> 20	
5	<212> ADN	
	<213> Acetobacter	
	<220>	
	<223> Cebador	
10		
	<400> 21	
	cggcaatgct ccataccac	20
	<210> 22	
15	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Acetobacter	
	<220>	
20	<223> Cebador	
	<400> 22	
	caccggaaag agtggcagga	20
25	<210> 23	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Acetobacter	
30	<220>	
	<223> Cebador	
	<400> 23	
	aaccgggtca cttgcgtcat	20
35		
	<210> 24	

	<211> 20		
	<212> ADN		
	<213> Acetobacter		
	<220>		
5	<223> Cebador		
	<400> 24		
	agccatcgga gtcacatcgg	20	
10	<210> 25		
	<211> 20		
	<212> ADN		
	<213> Acetobacter		
15	<220>		
	<223> Cebador		
	<400> 25		
	ggaaacctcg aaaccctgcg	20	
20	<210> 26		
	<211> 20		
	<212> ADN		
	<213> Acetobacter		
25	<220>		
	<223> Cebador		
	<400> 26		
30	tcagggcaat cactagccgg	20	
	<210> 27		
	<211> 20		
	<212> ADN		
35	<213> Acetobacter		

	<220>	
	<223> Cebador	
	<400> 27	
5	tcgagcagcc gttcatcca	20
	<210> 28	
	<211> 20	
	<212> ADN	
10	<213> Acetobacter	
	<220>	
	<223> Cebador	
15	<400> 28	
	tgatgcgctt gttcgtgacg	20
	<210> 29	
	<211> 20	
20	<212> ADN	
	<213> Acetobacter	
	<220>	
	<223> Cebador	
25	<400> 29	
	cgttcgcctt tgcgtcatg	20
	<210> 30	
30	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Acetobacter	
	<220>	
35	<223> Cebador	

ES 2 817 004 T3

	<400> 30	
	gggcatccg ttacctgctt	20
	<210> 31	
5	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Acetobacter	
	<220>	
10	<223> Cebador	
	<400> 31	
	tgacacaccc gctccgaaat	20
15	<210> 32	
	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Acetobacter	
20	<220>	
	<223> Cebador	
	<400> 32	
25	gcatttgcgg taagtcaccc ca	22
	<210> 33	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Acetobacter	
30	<220>	
	<223> Cebador	
	<400> 33	
35	ggatcccgat ttgcaagcca	20

	<210> 34	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Acetobacter	
5		
	<220>	
	<223> Cebador	
	<400> 34	
10	tgtcgggtcg ggaactcaag	20
	<210> 35	
	<211> 20	
	<212> ADN	
15	<213> Acetobacter	
	<220>	
	<223> Cebador	
20	<400> 35	
	cgggttctcg ctgatgacct	20
	<210> 36	
	<211> 20	
25	<212> ADN	
	<213> Acetobacter	
	<220>	
	<223> Cebador	
30	<400> 36	
	tccgcctgc atctgaagac	20
	<210> 37	
35	<211> 20	
	<212> ADN	

	<213> Acetobacter	
	<220>	
	<223> Cebador	
5	<400> 37	
	cagcggatgcc agccaatacc	20
	<210> 38	
	<211> 20	
10	<212> ADN	
	<213> Acetobacter	
	<220>	
	<223> Cebador	
15	<400> 38	
	gttcgtcgcg tctgatgcag	20
	<210> 39	
20	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Acetobacter	
	<220>	
25	<223> Cebador	
	<400> 39	
	acctgggcat tgttggtgga	20
30	<210> 40	
	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Acetobacter	
35	<220>	
	<223> Cebador	

	<400> 40		
	ctcaggaaga ccgaattgat ta	22	
5	<210> 41		
	<211> 19		
	<212> ADN		
	<213> Acetobacter		
	<220>		
10	<223> Cebador		
	<400> 41		
	gcgaaacgtc tgattgaac	19	
15	<210> 42		
	<211> 38		
	<212> ADN		
	<213> Acetobacter		
20	<220>		
	<223> Cebador		
	<400> 42		
	cggataacca ctggtgctcc gactcgctc actctact	38	
25	<210> 43		
	<211> 39		
	<212> ADN		
	<213> Acetobacter		
30	<220>		
	<223> Cebador		
	<400> 43		
35	tccacgaatc tcacgaagca ccccgacctt atctcccat	39	

	<210> 44	
	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Acetobacter	
5	<220>	
	<223> Cebador	
	<400> 44	
10	gccaggcgtg tacatataac ta	22
	<210> 45	
	<211> 22	
	<212> ADN	
15	<213> Acetobacter	
	<220>	
	<223> Cebador	
20	<400> 45	
	cggaatacct agttggaaca ct	22
	<210> 46	
	<211> 21	
25	<212> ADN	
	<213> Acetobacter	
	<220>	
	<223> Cebador	
30	<400> 46	
	tcaagatcga tgcacctatt c	21
	<210> 47	
35	<211> 20	
	<212> ADN	

<213> Acetobacter

 <220>
 <223> Cebador
 5

 <400> 47
 aacagacagt tctgtagga 20

 <210> 48
 10 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Acetobacter

 <220>
 15 <223> Cebador

 <400> 48
 cgcatctcca gatcggcagg tcgtccagtc gatcatg 37

 20 <210> 49
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> Acetobacter

 25 <220>
 <223> Cebador

 <400> 49
 acatctgtcc acggcattgg tggctggctt atgagtct 38
 30

 <210> 50
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Acetobacter
 35

 <220>

	<223> Cebador	
	<400> 50	
5	gagaagtcct ctgcttcgg	19
	<210> 51	
	<211> 18	
	<212> ADN	
10	<213> Acetobacter	
	<220>	
	<223> Cebador	
	<400> 51	
15	cggcggttga gaagatgt	18
	<210> 52	
	<211> 19	
	<212> ADN	
20	<213> Acetobacter	
	<220>	
	<223> Cebador	
25	<400> 52	
	ggaagacatc aacgaagca	19
	<210> 53	
	<211> 19	
30	<212> ADN	
	<213> Acetobacter	
	<220>	
	<223> Cebador	
35	<400> 53	

	ttgacagttg catagtccg	19
	<210> 54	
	<211> 39	
5	<212> ADN	
	<213> Acetobacter	
	<220>	
	<223> Cebador	
10	<400> 54	
	atacggctcg tcatgtcgcg gtgatggata atctcagcc	39
	<210> 55	
	<211> 40	
15	<212> ADN	
	<213> Acetobacter	
	<220>	
	<223> Cebador	
20	<400> 55	
	cagtggccga acctggaagc gctgatataa gcctgaagat	40
	<210> 56	
25	<211> 17	
	<212> ADN	
	<213> Acetobacter	
	<220>	
30	<223> Cebador	
	<400> 56	
	attgcaccgc gttgatg	17
35	<210> 57	
	<211> 18	

	<212> ADN	
	<213> Acetobacter	
	<220>	
5	<223> Cebador	
	<400> 57	
	gcgtaacggt cacaagga	18
10	<210> 58	
	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Acetobacter	
	<220>	
15	<223> Cebador	
	<400> 58	
	aggaggctct ttcttggaa gc	22
20	<210> 59	
	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Acetobacter	
25	<220>	
	<223> Cebador	
	<400> 59	
	aagtgccct gttatcgta ac	22
30	<210> 60	
	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Acetobacter	
35	<220>	

	<223> Cebador	
	<400> 60	
5	tgggtcatcg gttctgatt cc	22
	<210> 61	
	<211> 22	
	<212> ADN	
10	<213> Acetobacter	
	<220>	
	<223> Cebador	
	<400> 61	
15	tagtttgatg tcgggtgctg ag	22
	<210> 62	
	<211> 22	
	<212> ADN	
20	<213> Acetobacter	
	<220>	
	<223> Cebador	
25	<400> 62	
	gcgaataaccg gtcttttac gc	22
	<210> 63	
	<211> 21	
30	<212> ADN	
	<213> Acetobacter	
	<220>	
	<223> Cebador	
35	<400> 63	

	atgcaagctc cggattgaga g	21
	<210> 64	
	<211> 20	
5	<212> ADN	
	<213> Acetobacter	
	<220>	
	<223> Cebador	
10	<400> 64	
	ccaaatctct ggaacgggta	20
	<210> 65	
15	<211> 420	
	<212> ADN	
	<213> Acetobacter	
	<220>	
20	<223> secuencia codificante de proteína hipotética	
	<400> 65	
	atgcggatca gcggcatatc ttcgattctc gataatgcaa cggcccagtc ctcacgcggg	60
	gccacgacac agaagagcgg gatcttgcaa tcatcgtctc tcgatttcag caatatttcc	120
	gcgtcgaatc tgcaagacgt gaatgcggaa ctctataatc aggggaagat atcgctccgt	180
	cagagcgggtg acttgctcctt gttggatggg tgggcactca agggcgtcaa taatgggtcaa	240
	cttcggcagt catcgaccgg aacctcaac gcctattcct tgcttgatac catgattaat	300
	tatcaggaaa cgaacggtat cggcgatgta aaagatacgg tcgcatccct caaggcattg	360
	cgcagtacac ttgaggaata tgataccaac aatcagaata aaacggcgat cacggcctaa	420
25	<210> 66	
	<211> 864	
	<212> ADN	
	<213> Acetobacter	
30		

<220>

<223> GDIA_RS17945 (7136..7999)- proteína hipotética

<400> 66

	atgtacgttt cagtggcaaa ggctgggtacc atcgttgata gcctgtcgac gagggagaag	60
	agcaaagagg gaggcggcac gtcctgacg tccgatcagc cagattccgc tgaaacaggc	120
	cacgccgaga ccgaatctgt ttcgattacg ctgtctcagg cggccgtcga cgctttgaac	180
	gggactgcct cgcagaacac tccggcttcc atgcaactcg ccatgtcccg catggaccag	240
	attatccggt ccggcaacag cgcggcaaaa gccgatgccg gggcgcgtgt cgccaatttg	300
	caggcgcaga tgcggcagct catggagacc aaggatctca tgcgccaaa agcgcctggcg	360
	gccgccctgg cgctgatggc ccgcgaactg gccgccgccg tcagcgagta tgtgcaatgc	420
	ggcggatcgg ctgccaacgc ggccatttgt accgtcgtac tatccgcgtc ggccgacaca	480
	tcggctgac cgtccactgc cgccccggca acatctgtaa cggcggatca acccgttgcg	540
	tcggttcccc aggacgcgac acaggaacag agtgcccaag gccagaccgc tcccgggcag	600
	agcggtcagc agaccagga aggaaacgcc gtcgatcatt cgagcgatga gacggaacag	660
	accgcaggtg cggcaaatac ccagcctaaa gaaagcgggg acgacctgtt tgccaaggcc	720
	gtgaagagcc tggcggagga aatgaagagc atcctcaacg aactgaagaa caagaagaaa	780
	aaggacgatg cgtccgaaga ccatgatctt caatcgacac agggttctct cgacagaatc	840
5	gatcagatga ttggaggcat ataa	864

<210> 67

<211> 1392

<212> ADN

10 <213> Acetobacter

<220>

<223> GDIA_RS17965 (13228..14619)- subunidad de adaptador periplásmico de la secreción de tipo I de la familia HlyD

15

<400> 67

ES 2 817 004 T3

```

tcattggctcc ctcataccgt cagtcattgag cgggaatgaga ttgttaagaa gaaattgcat      60
aatgggttcgt gtaccactct gaatatctgc tgtaattgggc attcctggcc gggggtgaaa      120
cgatgaaggt acgccgtgca accgataatc ttcgatatgc agccgtgcgc gataatagga      180
ctgtgccgca gcggcaggat cgttgctcgc tcgctgcccg atcccgccgt ttgatacggc      240
gtcctgtgac gtattacat cgaacgtgtc tgcgctgatt tctcgtacca gcgcctcagc      300
accgccatac tgagagtatg gaaatgccgc gaacttgata attgccttgt tgccgggttg      360
cacaaaaccc gcatctttgc tgcttaaatg cacctcgact tcaagaccgc tatcgactgg      420
aacaagccgc atcagctctg ccccggttgt cagaacggac ccaggtgaca atctggcgat      480
cgtcaggacg actgcatcct cttgcgccgt caagatggtc atgcttttgc ggagcttcgc      540
cttttgatag tcggcatccg tggttgagag cttgtgttgt gcctcgctta aatcgcgata      600
gatgtccgct ctccatgttt caatatattc ttggcgcttcg gcgacgagcg cctgcaactt      660
ggcttttgcc gatgctgctg catgctgggc aaggacctcg gagcgctgaa cttccatcat      720
atcgttctga gcgccaagag tagaaaggcg gctgcccacc tgctcctcct gcaagcgagt      780
tcgcatcctg tgtacgttgg tcgcgacttc gagccgttta gcgtagatgg tagcgttggc      840
cagcgcgctt tggagatcgg ccgcctggga agccagttgt tcttgatagt tctcgatttt      900
ggccgcaaac tcagccttac gacgcaggaa tgcgcgcgct tgctgtattg acgctgggtc      960
gtcgggggtcc gacaggtagt ccctaccctg cgcttcgcga gaaaggcgtg cgacttcgcg      1020
agtataactt tgggtttgtg acttcaaatt tgcgatatca gcgtcggtta ccgtaggggc      1080
aaggcgggat aatacttggc cttatgaac aaggtcacct tcccgcacgt ccacactacg      1140
aataatcgac gtttcgaacg gctgtacaac gagaggtctc tgaatagata ctattttccc      1200
ttcgggtggac accaccgag tcagcggaaa gaccatcatg aatacgatac tactcgcggt      1260
cagcgcacca attatccaag atatatagcg ggctgaaggc gtggccggca tgttgacaag      1320
cgcggcagtc ggcgaatgaa actcaagcaa cgccggaggc aaatcggcgt agtcaaagga      1380
gtcagtcctcc ac                                                    1392

```

<210> 68

5

<211> 849

<212> ADN

<213> Acetobacter

<220>

10

<223> GDIA_RS18030 (25282..26130) - proteína hipotética

<400> 68

ES 2 817 004 T3

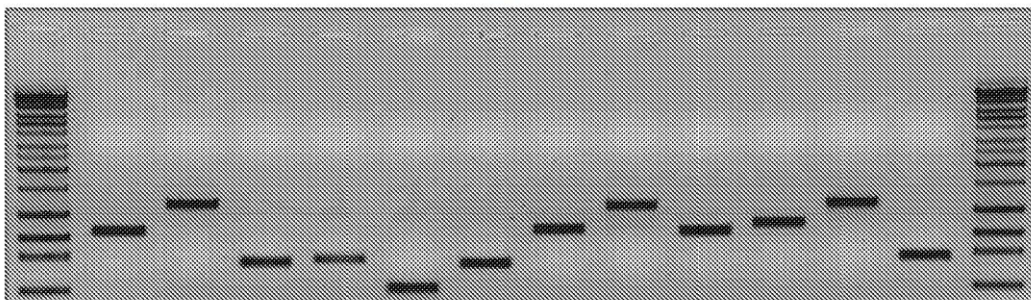
tcaagatttt ttaccttccc gctcgattgt gacggaagcg gcgagttcct tgatcgcggc	60
gacgctggca tcggctcggt cctcagcccc gatggcgcgg gcttccgctg cctgcacgcg	120
ggattccgca cgggcttcgg ccggtcacg ggacttttca gcgttctcca gtgccgtggc	180
agcgggtgctg gcccgacgct ccgcatgtc ctgggctttc tccgccccct gggcacgggc	240
ctgggcctcg gacacggcct gccgcagggc gtcgatctcc ccggtctgcc gctcgccat	300
ggcacgcgcc gcctgatggg cctgacgttc agcggtcagt tcgaccgtca gccggtccac	360
ctcccgtgc aaggcctcca gccggcgtgt cagcccttca gcctcggccg tagcgccagc	420
cagggcttcc gccaatcca tcgcctcccc cctggcatcg gccagctccg caccgcctg	480
agcctggata tcggcgatct gctggtcgc cgcttccgc gccagcgcca cttctggtc	540
ggccgcccc tggtggcct gctggacgga ttgcccttc tggcgctccg catcgacaaa	600
gccggtcagc atcgccagga agccctgctt catccgttcg gccgcgttgt ccatctcggc	660
cgagacgaga tccccggtt cgctccgggg ctctccttc ggtgcttcga ccggccgccc	720
gcgctgactg tctttccagg cgttgagcag cggcaggatg gcgttcggac tgccgcccc	780
cagctcgtcc cgcactttgc gcacactggg cttctcgccc cgcccgacca gcgcttcggc	840
ggcctgcat	849

REIVINDICACIONES

1. Una cepa fijadora de nitrógeno de *Gluconacetobacter diazotrophicus* (Gd) depositada por CABI en el Reino Unido con el número de acceso del depósito IMI 504958.
- 5 2. Una composición agrícolamente aceptable que comprende una cepa fijadora de nitrógeno según la reivindicación 1 en combinación con un vehículo.
3. Una composición según la reivindicación 2 que se puede aplicar como recubrimiento a una semilla.
4. Un método para potenciar la capacidad de fijación de nitrógeno de una planta, comprendiendo dicho método aplicar a la planta o al entorno de la misma una cepa fijadora de nitrógeno según la reivindicación 1, o una composición según la reivindicación 2 o 3.
- 10 5. Un método según la reivindicación 4, en donde la cepa fijadora de nitrógeno se aplica a un medio de crecimiento de la planta, a la superficie de una semilla, o a una herida de la planta.
6. Una semilla que tiene un recubrimiento encima, en donde el recubrimiento comprende la cepa fijadora de nitrógeno de la reivindicación 1.
7. Una planta o semilla que comprende una cepa fijadora de nitrógeno según la reivindicación 1.
- 15 8. Una planta o semilla que comprende una cepa fijadora de nitrógeno según la reivindicación 1 situada intracelularmente en su interior.
9. Un método de producción de un producto de planta, comprendiendo dicho método sembrar una planta o semilla según la reivindicación 7 u 8 y obtener el producto de la misma.

A

Figura 1



B

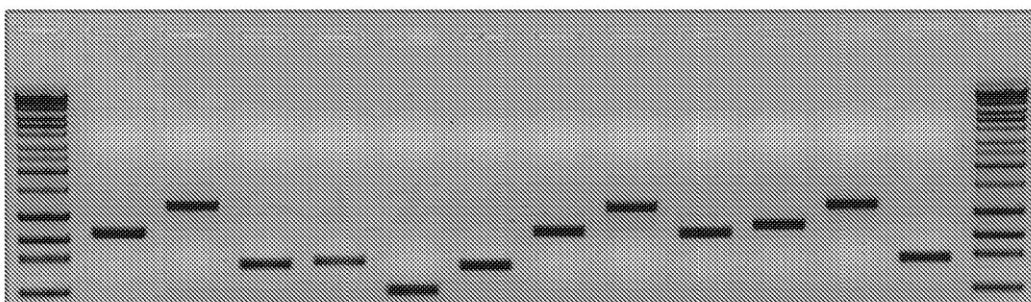


Figura 2

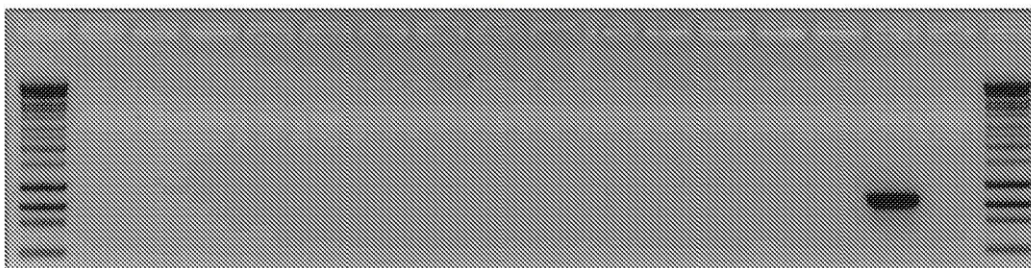


Figura 3

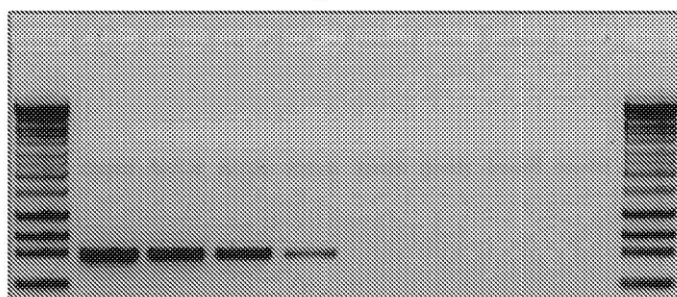


Figura 4

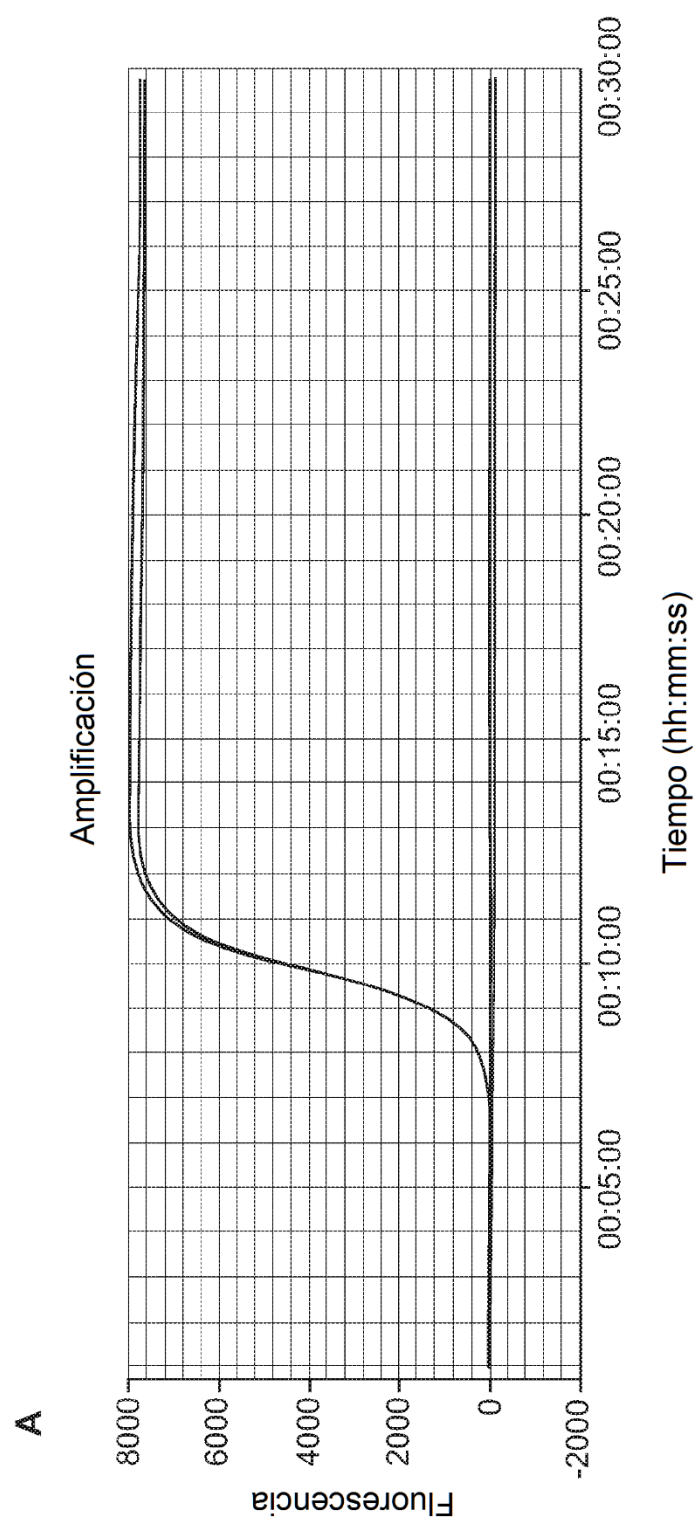


Figura 4 continuación

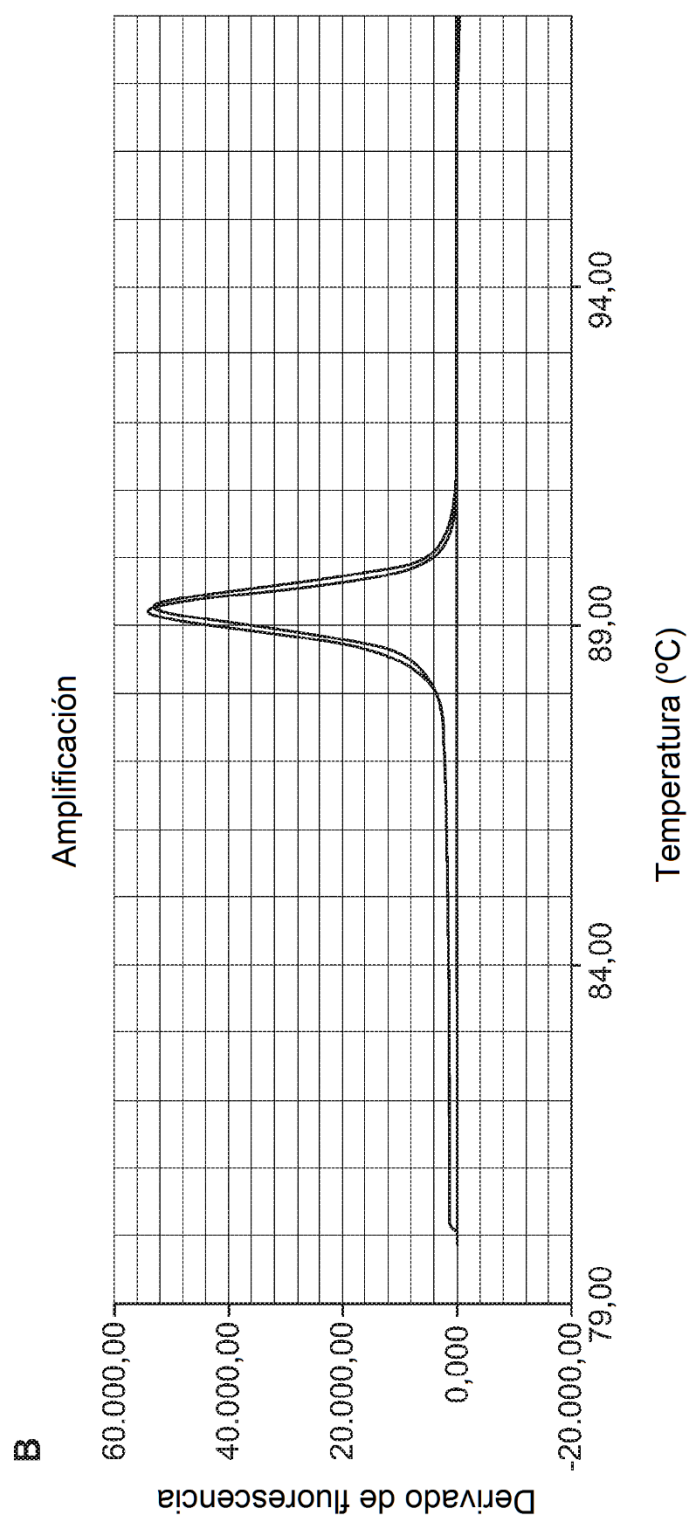


Figura 5

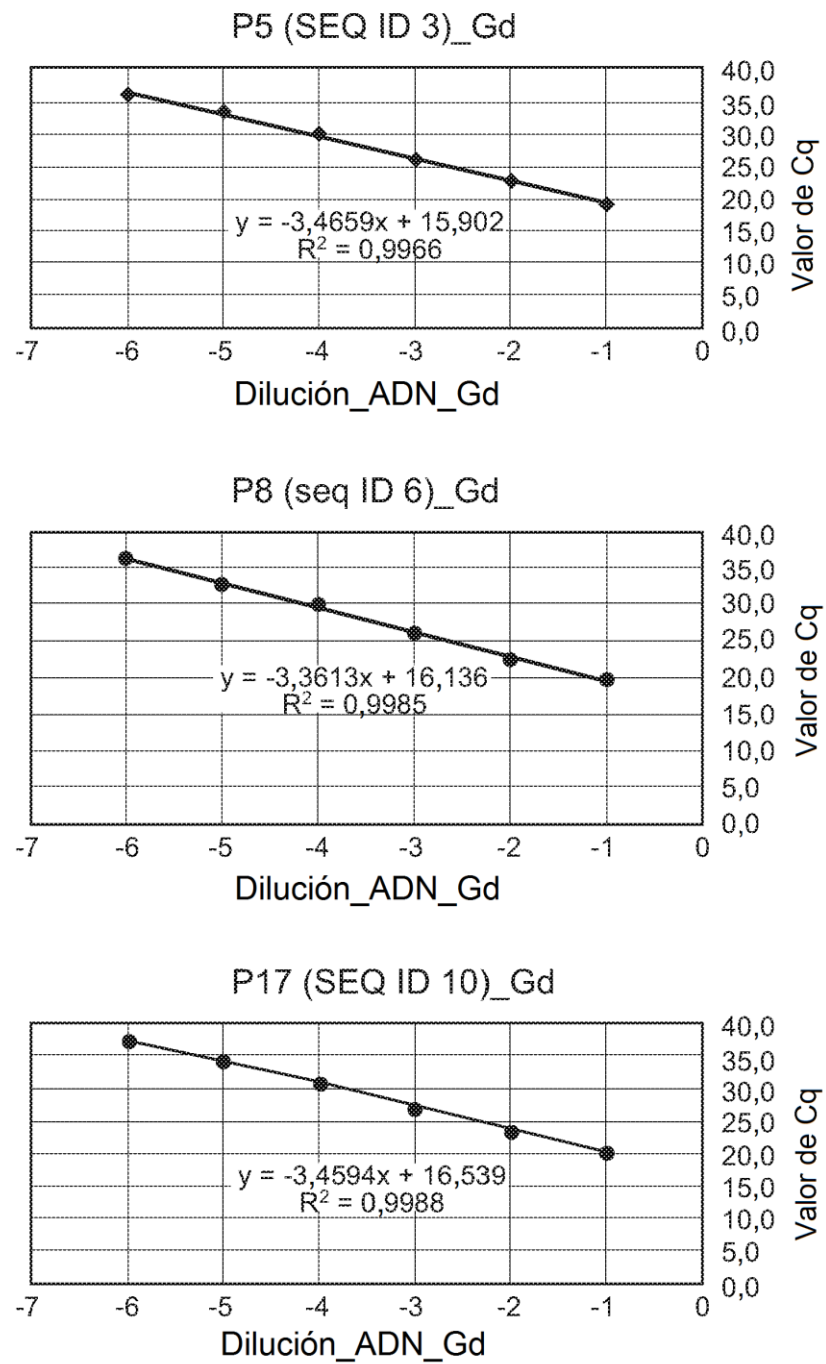


Figura 6

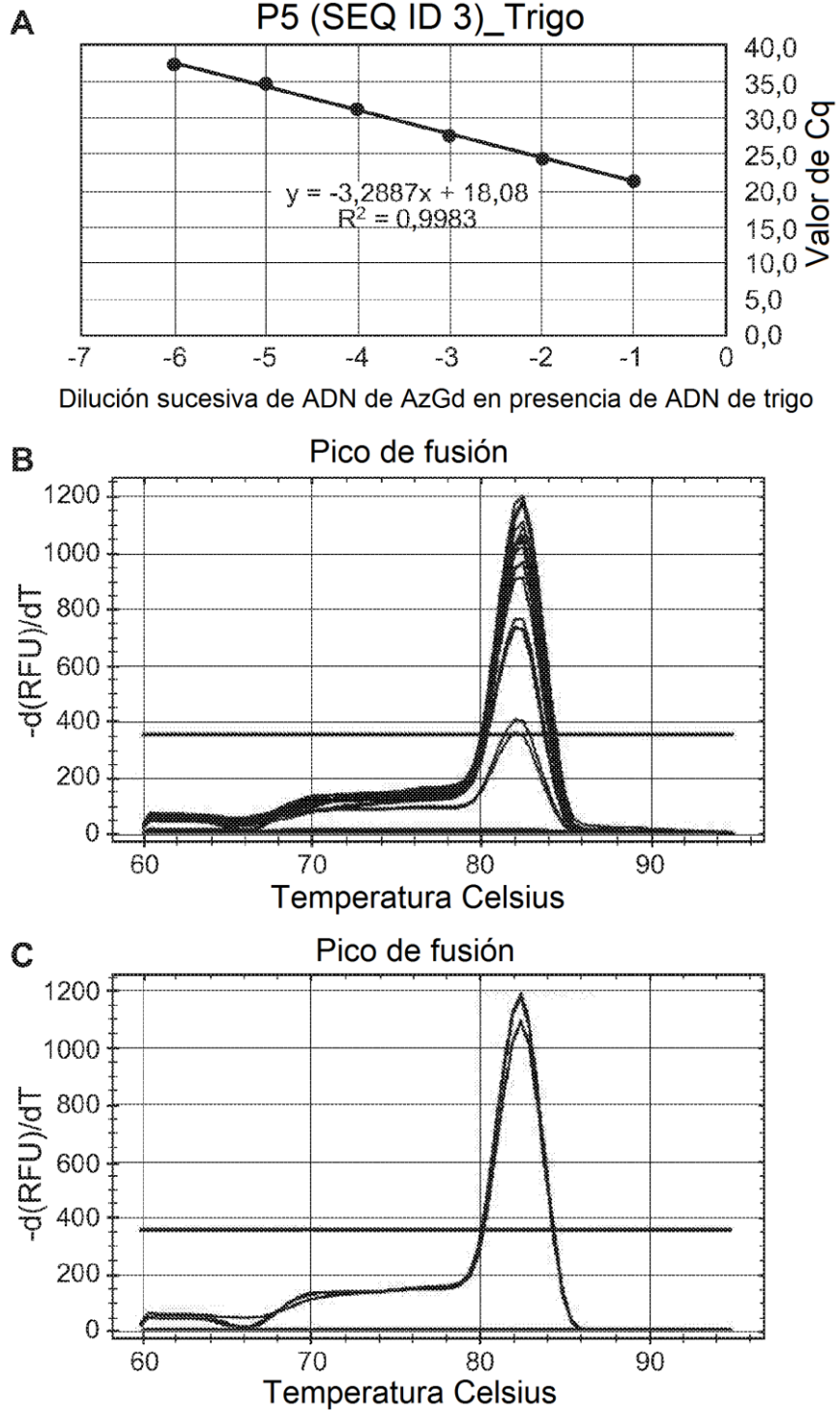
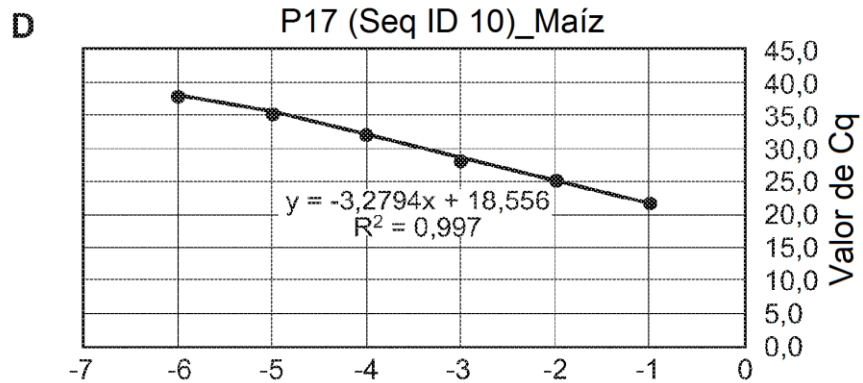


Figura 6 continuación



Dilución sucesiva de ADN de AzGd en presencia de ADN de maíz

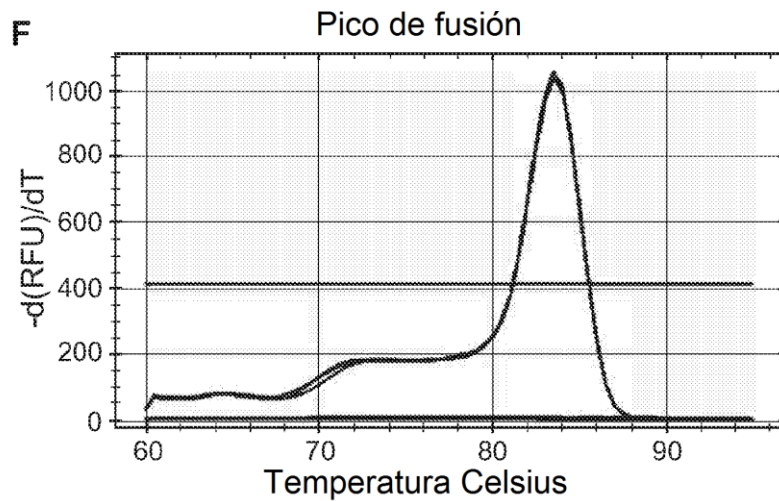
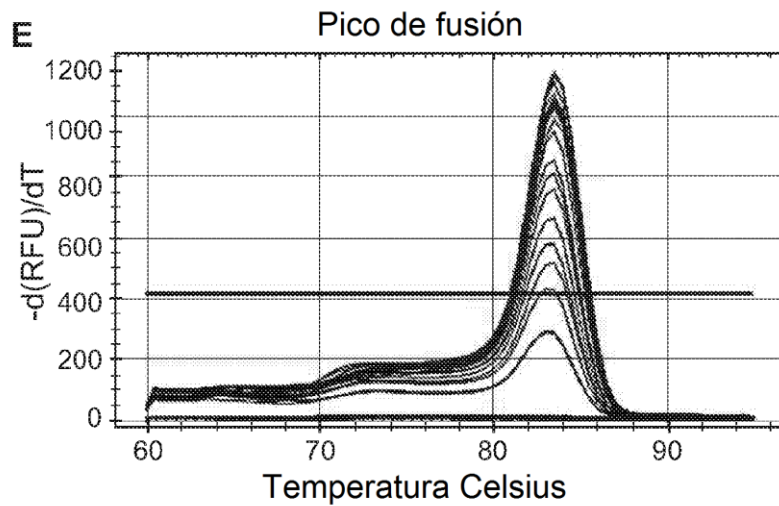


Figura 7

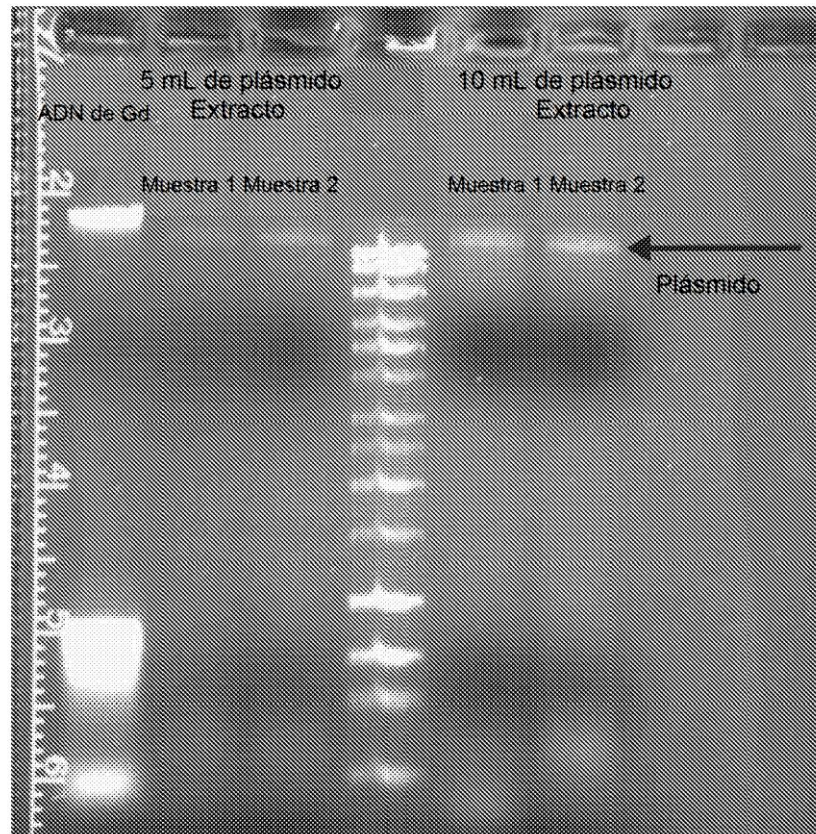


Figura 8

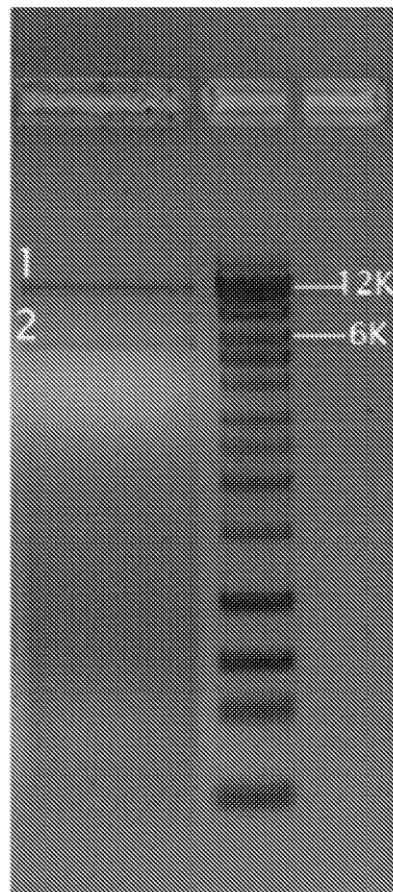


Figura 9

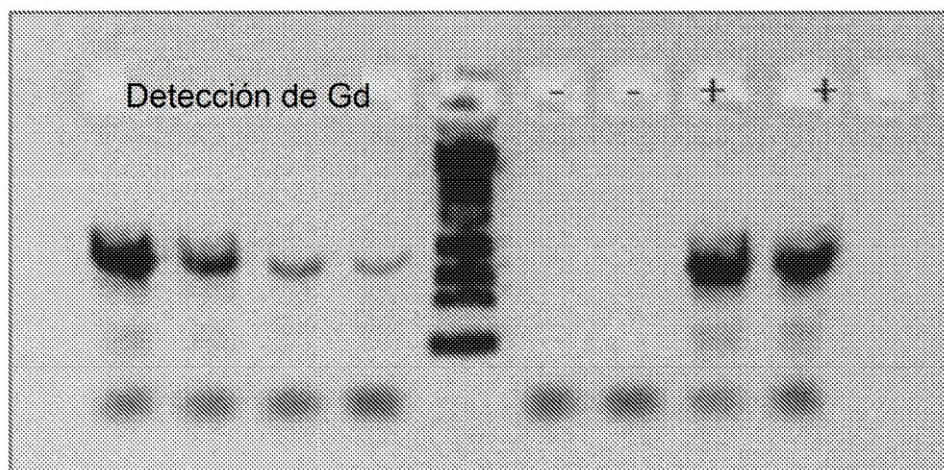


Figura 10

