

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 978 960**

51 Int. Cl.:

C07K 19/00 (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01)
C12N 1/21 (2006.01)
C12R 1/07 (2006.01)
C12R 1/125 (2006.01)
C12R 1/05 (2006.01)
C12R 1/085 (2006.01)
C12R 1/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.03.2014** **PCT/US2014/030824**
 87 Fecha y número de publicación internacional: **18.09.2014** **WO14145964**
 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.03.2014** **E 14763028 (9)**
 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.03.2024** **EP 2970507**

54 Título: **Proteínas de fusión y métodos para estimular el crecimiento vegetal, proteger plantas e inmovilizar esporas de bacilos en plantas**

30 Prioridad:

15.03.2013 US 201361799262 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
23.09.2024

73 Titular/es:

SPOGEN BIOTECH INC. (100.0%)
1601 South Providence Road, Suite 120
Columbia, Missouri 65211, US

72 Inventor/es:

THOMPSON, BRIAN y
THOMPSON, KATIE

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

Observaciones:

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

ES 2 978 960 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

Proteínas de fusión y métodos para estimular el crecimiento vegetal, proteger plantas e inmovilizar esporas de bacilos en plantas

Campo de la invención

La presente invención se refiere en general a métodos para estimular el crecimiento vegetal que comprenden el uso de proteínas de fusión que contienen una secuencia de direccionamiento, una proteína de exosporio o un fragmento de proteína de exosporio que dirige la proteína de fusión al exosporio de una bacteria *Bacillus*. También se divulgan bacterias *Bacillus* recombinantes que expresan dichas proteínas de fusión y formulaciones que contienen las bacterias *Bacillus* recombinantes que expresan las proteínas de fusión. También se divulgan métodos para proteger plantas frente a patógenos y para potenciar la resistencia al estrés en plantas mediante la aplicación de las bacterias *Bacillus* recombinantes o las formulaciones a plantas o un medio de crecimiento vegetal. También se divulgan métodos para inmovilizar esporas de una bacteria *Bacillus* recombinante que expresa una proteína de fusión en plantas o en materia vegetal.

Antecedentes de la invención

Dentro de la zona que rodea las raíces de una planta hay una región denominada rizosfera. En la rizosfera, bacterias, los hongos y otros organismos compiten por los nutrientes y por unirse a las estructuras de las raíces de la planta. Tanto bacterias como hongos perjudiciales y beneficiosos pueden ocupar la rizosfera. Las bacterias, los hongos y el sistema radicular de la planta pueden verse influenciados por las acciones de los péptidos, enzimas y otras proteínas de la rizosfera. El aumento del suelo o tratamiento de plantas con algunos de estos péptidos, enzimas u otras proteínas tendrían efectos beneficiosos sobre las poblaciones globales de bacterias y hongos del suelo beneficiosos, crearía un entorno de suelo global más saludable para el crecimiento vegetal, mejoraría el crecimiento vegetal y proporcionaría la protección de las plantas contra determinados patógenos bacterianos y fúngicos. Sin embargo, intentos previos de introducir péptidos, enzimas y otras proteínas en el suelo para inducir efectos beneficiosos sobre las plantas se han visto obstaculizados por la baja supervivencia de las enzimas, las proteínas y los péptidos en el suelo. Adicionalmente, la prevalencia de proteasas presentes naturalmente en el suelo conduce a la degradación de las proteínas en el suelo. El entorno alrededor de las raíces de una planta (la rizosfera) es una mezcla única de bacterias, hongos, nutrientes y raíces que tienen cualidades diferentes de las del suelo nativo. La relación simbiótica entre estos organismos es única y podría mejorarse con la inclusión de proteínas exógenas. La concentración elevada de hongos y bacterias en la rizosfera provoca una degradación aún mayor de las proteínas debido a niveles anormalmente altos de proteasas y otros elementos perjudiciales para las proteínas del suelo. Además, las enzimas y otras proteínas introducidas en el suelo pueden disiparse rápidamente de las raíces de las plantas.

El documento US 6.333.302 describe el uso de una proteína o un polipéptido inductores de respuesta hipersensible de *Clavibacter michiganensis* en plantas.

El documento WO 0200232 describe sistemas de presentación de esporas para aplicaciones de proteínas medicinales e industriales.

El documento US 2011281316 describe un sistema de suministro de moléculas de exosporio de *Bacillus* (BEMD) que proporciona un medio para suministrar moléculas de interés (MOI, por sus siglas en inglés) a un entorno.

El documento WO 2006/012366 describe el uso de proteínas exógenas unidas a la superficie de esporas de *Bacillus* recombinantes.

El documento US 2003/228679 describe el uso de especies de *Bacillus* para aumentar el crecimiento vegetal.

Por lo tanto, existe en la técnica la necesidad de un método para suministrar eficazmente péptidos, enzimas y otras proteínas a las plantas (por ejemplo, a los sistemas radiculares de las plantas) y para prolongar el período de tiempo durante el cual dichas moléculas permanecen activas. Además, existe en la técnica la necesidad de un método para el direccionamiento selectivo de dichos péptidos, enzimas y proteínas a la rizosfera y a las hojas y raíces de las plantas en particular.

Sumario de la invención

La invención es como se expone en las reivindicaciones.

La invención proporciona un método para estimular el crecimiento vegetal que comprende introducir una bacteria *Bacillus* recombinante que expresa una proteína de fusión en un medio de crecimiento vegetal o aplica una bacteria *Bacillus* recombinante que expresa una proteína de fusión a una planta, una semilla vegetal, o un área que rodea una planta o una semilla vegetal, en donde:

la bacteria *Bacillus* recombinante comprende *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus pseudomycoides*, *Bacillus samanii*, *Bacillus gaemokensis*, *Bacillus weihenstephensis*, o una combinación de los mismos, en donde cuando la bacteria *Bacillus* recombinante comprende *Bacillus anthracis*, el método comprende además inactivar la bacteria *Bacillus* recombinante antes de su introducción en el medio de crecimiento vegetal o de su aplicación a la planta, la semilla vegetal o el área que rodea la planta o la semilla

vegetal; y

la proteína de fusión comprende:

(A) al menos una proteína o péptido estimulante del crecimiento vegetal, en donde la proteína o péptido estimulante del crecimiento vegetal comprende:

una hormona peptídica que comprende una fitosulfocina, clavata 3 (CLV3) o sistemina;
un péptido no hormonal que comprende un péptido eNOD40, RHPP, POLARIS o inhibidor de la tripsina de Kunitz (KTI);
una enzima implicada en la producción o activación de un compuesto estimulante del crecimiento vegetal, en donde la enzima implicada en la producción o activación de un compuesto estimulante del crecimiento vegetal comprende una aminotransferasa, una amina oxidasa, una peptidasa, una proteasa, una adenosina fosfato isopenteniltransferasa, una fosfatasa, una quitosanasa, una quitinasa, una β -1,3-glucanasa, una β -1,4-glucanasa, una β -1,6-glucanasa o una desaminasa del ácido aminociclopropano-1-carboxílico; o
una enzima que degrada o modifica una fuente de nutrientes bacteriana, fúngica o vegetal, en donde la enzima que degrada o modifica una fuente de nutrientes bacteriana, fúngica o vegetal comprende una celulasa, una lipasa, una lignina oxidasa, una proteasa, una glucósido hidrolasa, una fosfatasa, una nucleasa, una amidasa, una nitrato reductasa, una nitrito reductasa, una amilasa, una ligninasa, una glucosidasa, una fosfolipasa, una fitasa, una pectinasa, una glucanasa, una sulfatasa, una ureasa o una xilanasas; y

(B) una secuencia de direccionamiento, proteína de exosporio o fragmento de proteína de exosporio que dirige la proteína de fusión al exosporio de la bacteria *Bacillus* recombinante, en donde la secuencia de direccionamiento, proteína de exosporio o fragmento de proteína de exosporio comprende la secuencia X_1 - X_2 - X_3 - X_4 - X_5 - X_6 - X_7 - X_8 - X_9 - X_{10} - X_{11} - X_{12} - X_{13} - X_{14} - X_{15} - X_{16} , en donde:

X_1 es alanina (A), lisina (K), isoleucina (I), serina (S), arginina (R), metionina (M), asparagina (N), leucina (L) o está ausente;
 X_2 es fenilalanina (F), leucina (L), isoleucina (I) o metionina (M);
 X_3 es ácido aspártico (D), ácido glutámico (E), leucina (L), glicina (G), asparagina (N), serina (S) o prolina (P);
 X_4 es prolina (P) o serina (S);
 X_5 es asparagina (N), ácido aspártico (D), ácido glutámico (E), glicina (G), cisteína (C) o lisina (K);
 X_6 es leucina (L), asparagina (N), serina (S) o isoleucina (I);
 X_7 es valina (V) o isoleucina (I);
 X_8 es glicina (G);
 X_9 es prolina (P);
 X_{10} es treonina (T) o prolina (P);
 X_{11} es leucina (L) o fenilalanina (F);
 X_{12} es prolina (P);
 X_{13} es prolina (P), valina (V), serina (S) o isoleucina (I);
 X_{14} es isoleucina (I), valina (V), leucina (L) o metionina (M);
 X_{15} es prolina (P), glutamina (Q) o treonina (T); y
 X_{16} es prolina (P), treonina (T) o serina (S);

en donde la proteína o péptido estimulante del crecimiento vegetal está unido operativamente a la secuencia de direccionamiento, proteína de exosporio o fragmento de proteína de exosporio; y
en donde las plantas cultivadas en presencia de la bacteria *Bacillus* recombinante presenta un crecimiento mayor en comparación con las plantas cultivadas en ausencia de la bacteria *Bacillus* recombinante, en las mismas condiciones.

La invención también proporciona:

Un método para estimular el crecimiento vegetal que comprende introducir una bacteria *Bacillus* recombinante que expresa una proteína de fusión en un medio de crecimiento vegetal o aplica una bacteria *Bacillus* recombinante que expresa una proteína de fusión a una planta, una semilla vegetal, o un área que rodea una planta o una semilla vegetal, en donde:

la bacteria *Bacillus* recombinante comprende *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus pseudomycoides*, *Bacillus samanii*, *Bacillus gaemokensis*, *Bacillus weihenstephensis* o una combinación de los mismos, en donde cuando la bacteria *Bacillus* recombinante comprende *Bacillus anthracis*, el método comprende además inactivar la bacteria *Bacillus* recombinante antes de su introducción en el medio de crecimiento vegetal o de su aplicación a la planta, la semilla vegetal o el área que rodea la planta o la semilla vegetal; y
la proteína de fusión comprende:

(A) al menos una proteína o péptido estimulante del crecimiento vegetal, en donde la proteína o péptido estimulante del crecimiento vegetal comprende:

una hormona peptídica que comprende una fitosulfocina, clavata 3 (CLV3) o sistemina;
 un péptido no hormonal que comprende un péptido eNOD40, RHPP, POLARIS o inhibidor de la tripsina de Kunitz (KTI);
 una enzima implicada en la producción o activación de un compuesto estimulante del crecimiento vegetal, en donde la enzima implicada en la producción o activación de un compuesto estimulante del crecimiento vegetal comprende una aminotransferasa, una amina oxidasa, una peptidasa, una proteasa, una adenosina fosfato isopenteniltransferasa, una fosfatasa, una quitosanasa, una quitinasa, una β -1,3-glucanasa, una β -1,4-glucanasa, una β -1,6-glucanasa o una desaminasa del ácido aminociclopropano-1-carboxílico; o
 una enzima que degrada o modifica una fuente de nutrientes bacteriana, fúngica o vegetal, en donde la enzima que degrada o modifica una fuente de nutrientes bacteriana, fúngica o vegetal comprende una celulasa, una lipasa, una lignina oxidasa, una proteasa, una glucósido hidrolasa, una fosfatasa, una nucleasa, una amidasa, una nitrato reductasa, una nitrito reductasa, una amilasa, una ligninasa, una glucosidasa, una fosfolipasa, una fitasa, una pectinasa, una glucanasa, una sulfatasa, una ureasa o una xilanasa; y

(B) una proteína de exosporio que dirige la proteína de fusión al exosporio de la bacteria *Bacillus* recombinante, comprendiendo la proteína de exosporio:

(a) una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 95 % de identidad con la SEQ ID NO: 72;
 (b) una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 95 % de identidad con la SEQ ID NO: 73;
 (c) una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 95 % de identidad con la SEQ ID NO: 74;
 (d) una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 95 % de identidad con la SEQ ID NO: 76;
 (e) una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 95 % de identidad con la SEQ ID NO: 80;
 (f) una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 95 % de identidad con la SEQ ID NO: 81; o
 (g) una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 95 % de identidad con la SEQ ID NO: 83;

en donde la proteína o péptido estimulante del crecimiento vegetal está unido operativamente a la proteína de exosporio; y

en donde las plantas cultivadas en presencia de la bacteria *Bacillus* recombinante presenta un crecimiento mayor en comparación con las plantas cultivadas en ausencia de la bacteria *Bacillus* recombinante, en las mismas condiciones.

En el presente documento se divulgan proteínas de fusión que comprenden al menos una proteína o péptido estimulante del crecimiento vegetal, al menos una proteína o péptido que potencia la resistencia al estrés en una planta, o al menos una proteína o péptido de unión a plantas. La proteína o péptido estimulante del crecimiento vegetal comprende una hormona peptídica, un péptido no hormonal o una enzima implicada en la producción o activación de un compuesto estimulante del crecimiento vegetal. La proteína de fusión también comprende una secuencia de direccionamiento, una proteína de exosporio o un fragmento de proteína de exosporio. En algunas divulgaciones, la secuencia de direccionamiento, proteína de exosporio o fragmento de proteína de exosporio expresado por la bacteria *Bacillus* puede ser: (a) una secuencia de direccionamiento que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 43 % de identidad con los aminoácidos 20-35 de la SEQ ID NO: 1, en donde la identidad con los aminoácidos 25-35 es de al menos el 54 %; (b) una secuencia de direccionamiento que comprende los aminoácidos 1-35 de la SEQ ID NO: 1; (c) una secuencia de direccionamiento que comprende los aminoácidos 20-35 de la SEQ ID NO: 1; (d) una secuencia de direccionamiento que comprende la SEQ ID NO: 1; (e) una proteína de exosporio que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 85 % de identidad con la SEQ ID NO: 2; (f) una secuencia de direccionamiento que comprende los aminoácidos 1-27 de la SEQ ID NO: 3; (g) una secuencia de direccionamiento que comprende los aminoácidos 12-27 de la SEQ ID NO: 3; (h) una secuencia de direccionamiento que comprende la SEQ ID NO: 3; (i) una proteína de exosporio que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 85 % de identidad con la SEQ ID NO: 4; (j) una secuencia de direccionamiento que comprende los aminoácidos 1-38 de la SEQ ID NO: 5; (k) una secuencia de direccionamiento que comprende los aminoácidos 23-38 de la SEQ ID NO: 5; (l) una secuencia de direccionamiento que comprende la SEQ ID NO: 5; (m) una proteína de exosporio que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 85 % de identidad con la SEQ ID NO: 6; (n) una secuencia de direccionamiento que comprende los aminoácidos 1-28 de la SEQ ID NO: 7; (o) una secuencia de direccionamiento que comprende los aminoácidos 13-28 de la SEQ ID NO: 7; (p) una secuencia de direccionamiento que comprende la SEQ ID NO: 7; (q) una proteína de exosporio que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 85 % de identidad con la SEQ ID NO: 8; (r) una secuencia de direccionamiento que comprende los aminoácidos 1-24 de la SEQ ID NO: 9; (s) una secuencia de direccionamiento que comprende los aminoácidos 9-24 de la SEQ ID NO: 9; (t) una secuencia de direccionamiento que comprende la SEQ ID NO: 9; (u) una proteína de exosporio que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 85 % de identidad con la SEQ ID NO: 10; (v) una secuencia de direccionamiento que comprende los aminoácidos 1-33 de la SEQ ID NO: 11; (w) una secuencia de direccionamiento que comprende los aminoácidos 18-33 de la SEQ ID NO: 11; (x) una secuencia de direccionamiento que comprende la SEQ ID NO: 11; (y) una proteína de exosporio que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 85 % de identidad con la SEQ ID NO: 12; (z) una secuencia de

[illegible]

que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 85 % de identidad con la SEQ ID NO: 56; (cv) una secuencia de direccionamiento que comprende los aminoácidos 1-130 de la SEQ ID NO: 57; (cw) una secuencia de direccionamiento que comprende los aminoácidos 115-130 de la SEQ ID NO: 57; (cx) una secuencia de direccionamiento que comprende la SEQ ID NO: 57; (cy) una proteína de exosporio que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 85 % de identidad con la SEQ ID NO: 58; (cz) un fragmento de proteína de exosporio que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 85 % de identidad con la SEQ ID NO: 59; (da) una secuencia de direccionamiento que comprende la SEQ ID NO: 60; (db) una secuencia de direccionamiento que comprende la SEQ ID NO: 61; (dc) una secuencia de direccionamiento que comprende la SEQ ID NO: 62; (dd) una secuencia de direccionamiento que comprende la SEQ ID NO: 63; (de) una secuencia de direccionamiento que comprende la SEQ ID NO: 64; (df) una secuencia de direccionamiento que comprende la SEQ ID NO: 65; (dg) una secuencia de direccionamiento que comprende la SEQ ID NO: 66; (dh) una secuencia de direccionamiento que comprende la SEQ ID NO: 67; (di) una secuencia de direccionamiento que comprende la SEQ ID NO: 68; (dj) una secuencia de direccionamiento que comprende la SEQ ID NO: 69; (dk) una secuencia de direccionamiento que comprende la SEQ ID NO: 70; (dl) una proteína de exosporio que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 85 % de identidad con la SEQ ID NO: 71; (dm) una proteína de exosporio que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 85 % de identidad con la SEQ ID NO: 72; (dn) una proteína de exosporio que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 85 % de identidad con la SEQ ID NO: 73; (do) una proteína de exosporio que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 85 % de identidad con la SEQ ID NO: 74; (dp) una proteína de exosporio que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 85 % de identidad con la SEQ ID NO: 75; (dq) una proteína de exosporio que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 85 % de identidad con la SEQ ID NO: 76; (dr) una proteína de exosporio que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 85 % de identidad con la SEQ ID NO: 77; (ds) una proteína de exosporio que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 85 % de identidad con la SEQ ID NO: 78; (dt) una proteína de exosporio que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 85 % de identidad con la SEQ ID NO: 79; (du) una proteína de exosporio que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 85 % de identidad con la SEQ ID NO: 80; (dv) una proteína de exosporio que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 85 % de identidad con la SEQ ID NO: 81; (dw) una proteína de exosporio que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 85 % de identidad con la SEQ ID NO: 82; (dx) una proteína de exosporio que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 85 % de identidad con la SEQ ID NO: 83; (dy) una proteína de exosporio que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 85 % de identidad con la SEQ ID NO: 84; (dz) una secuencia de direccionamiento que comprende los aminoácidos 22-31 de la SEQ ID NO: 1; (ea) una secuencia de direccionamiento que comprende los aminoácidos 22-33 de la SEQ ID NO: 1; (eb) una secuencia de direccionamiento que comprende los aminoácidos 20-31 de la SEQ ID NO: 1; (ec) una secuencia de direccionamiento que comprende los aminoácidos 14-23 de la SEQ ID NO: 3; (ed) una secuencia de direccionamiento que comprende los aminoácidos 14-25 de la SEQ ID NO: 3; o (ef) una secuencia de direccionamiento que comprende los aminoácidos 12-23 de la SEQ ID NO: 3.

En la invención, la secuencia de direccionamiento, proteína de exosporio o fragmento de proteína de exosporio expresado por la bacteria *Bacillus* comprende la secuencia X₁-X₂-X₃-X₄-X₅-X₆-X₇-X₈-X₉-X₁₀-X₁₁-X₁₂-X₁₃-X₁₄-X₁₅-X₁₆, en donde:

X₁ es alanina (A), lisina (K), isoleucina (I), serina (S), arginina (R), metionina (M), asparagina (N), leucina (L) o está ausente;
 X₂ es fenilalanina (F), leucina (L), isoleucina (I) o metionina (M);
 X₃ es ácido aspártico (D), ácido glutámico (E), leucina (L), glicina (G), asparagina (N), serina (S) o prolina (P);
 X₄ es prolina (P) o serina (S);
 X₅ es asparagina (N), ácido aspártico (D), ácido glutámico (E), glicina (G), cisteína (C) o lisina (K);
 X₆ es leucina (L), asparagina (N), serina (S) o isoleucina (I);
 X₇ es valina (V) o isoleucina (I);
 X₈ es glicina (G);
 X₉ es prolina (P);
 X₁₀ es treonina (T) o prolina (P);
 X₁₁ es leucina (L) o fenilalanina (F);
 X₁₂ es prolina (P);
 X₁₃ es prolina (P), valina (V), serina (S) o isoleucina (I);
 X₁₄ es isoleucina (I), valina (V), leucina (L) o metionina (M);
 X₁₅ es prolina (P), glutamina (Q) o treonina (T); y
 X₁₆ es prolina (P), treonina (T) o serina (S);

en donde la proteína o péptido estimulante del crecimiento vegetal está unido operativamente a la secuencia de direccionamiento, proteína de exosporio o fragmento de proteína de exosporio; y

en donde las plantas cultivadas en presencia de la bacteria *Bacillus* recombinante presenta un crecimiento mayor en comparación con las plantas cultivadas en ausencia de la bacteria *Bacillus* recombinante, en las mismas condiciones.

También se divulgan proteínas de fusión que comprenden una secuencia de direccionamiento, una proteína de

exosporio o un fragmento de proteína de exosporio y al menos una proteína o péptido que protege una planta frente a un patógeno. La secuencia de direccionamiento, una proteína de exosporio o un fragmento de proteína de exosporio pueden ser: (a) una secuencia de direccionamiento que consiste en una secuencia de aminoácidos que consiste en 16 aminoácidos y que tiene al menos aproximadamente un 43 % de identidad con los aminoácidos 20-35 de la SEQ ID NO: 1, en donde la identidad con los aminoácidos 25-35 es de al menos aproximadamente el 54 %; (b) una secuencia de direccionamiento que consiste en los aminoácidos 1-35 de la SEQ ID NO: 1; (c) una secuencia de direccionamiento que consiste en los aminoácidos 20-35 de la SEQ ID NO: 1; (d) una secuencia de direccionamiento que consiste en la SEQ ID NO: 1; (e) una secuencia de direccionamiento que comprende la SEQ ID NO: 60; (f) una secuencia de direccionamiento que comprende los aminoácidos 1-27 de la SEQ ID NO: 3; (g) una secuencia de direccionamiento que comprende los aminoácidos 12-27 de la SEQ ID NO: 3; (h) una secuencia de direccionamiento que comprende la SEQ ID NO: 3; (i) una proteína de exosporio que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 85 % de identidad con la SEQ ID NO: 4; (j) una secuencia de direccionamiento que comprende los aminoácidos 1-38 de la SEQ ID NO: 5; (k) una secuencia de direccionamiento que comprende los aminoácidos 23-38 de la SEQ ID NO: 5; (l) una secuencia de direccionamiento que comprende la SEQ ID NO: 5; (m) una proteína de exosporio que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 85 % de identidad con la SEQ ID NO: 6; (n) una secuencia de direccionamiento que comprende los aminoácidos 1-28 de la SEQ ID NO: 7; (o) una secuencia de direccionamiento que comprende los aminoácidos 13-28 de la SEQ ID NO: 7; (p) una secuencia de direccionamiento que comprende la SEQ ID NO: 7; (q) una proteína de exosporio que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 85 % de identidad con la SEQ ID NO: 8; (r) una secuencia de direccionamiento que comprende los aminoácidos 1-24 de la SEQ ID NO: 9; (s) una secuencia de direccionamiento que comprende los aminoácidos 9-24 de la SEQ ID NO: 9; (t) una secuencia de direccionamiento que comprende la SEQ ID NO: 9; (u) una proteína de exosporio que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 85 % de identidad con la SEQ ID NO: 10; (v) una secuencia de direccionamiento que comprende los aminoácidos 1-33 de la SEQ ID NO: 11; (w) una secuencia de direccionamiento que comprende los aminoácidos 18-33 de la SEQ ID NO: 11; (x) una secuencia de direccionamiento que comprende la SEQ ID NO: 11; (y) una proteína de exosporio que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 85 % de identidad con la SEQ ID NO: 12; (z) una secuencia de direccionamiento que comprende los aminoácidos 1-33 de la SEQ ID NO: 13; (aa) una secuencia de direccionamiento que comprende los aminoácidos 18-33 de la SEQ ID NO: 13; (ab) una secuencia de direccionamiento que comprende la SEQ ID NO: 13; (ac) una proteína de exosporio que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 85 % de identidad con la SEQ ID NO: 14; (ad) una secuencia de direccionamiento que comprende los aminoácidos 1-43 de la SEQ ID NO: 15; (ae) una secuencia de direccionamiento que comprende los aminoácidos 28-43 de la SEQ ID NO: 15; (af) una secuencia de direccionamiento que comprende la SEQ ID NO: 15; (ag) una proteína de exosporio que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 85 % de identidad con la SEQ ID NO: 16; (ah) una secuencia de direccionamiento que comprende los aminoácidos 1-27 de la SEQ ID NO: 17; (ai) una secuencia de direccionamiento que comprende los aminoácidos 12-27 de la SEQ ID NO: 17; (aj) una secuencia de direccionamiento que comprende la SEQ ID NO: 17; (ak) una proteína de exosporio que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 85 % de identidad con la SEQ ID NO: 18; (al) una secuencia de direccionamiento que comprende los aminoácidos 1-33 de la SEQ ID NO: 19; (am) una secuencia de direccionamiento que comprende los aminoácidos 18-33 de la SEQ ID NO: 19; (an) una secuencia de direccionamiento que comprende la SEQ ID NO: 19; (ao) una proteína de exosporio que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 85 % de identidad con la SEQ ID NO: 20; (ap) una secuencia de direccionamiento que comprende los aminoácidos 1-33 de la SEQ ID NO: 21; (aq) una secuencia de direccionamiento que comprende los aminoácidos 18-33 de la SEQ ID NO: 21; (ar) una secuencia de direccionamiento que comprende la SEQ ID NO: 21; (as) una proteína de exosporio que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 85 % de identidad con la SEQ ID NO: 22; (at) una secuencia de direccionamiento que comprende los aminoácidos 1-24 de la SEQ ID NO: 23; (au) una secuencia de direccionamiento que comprende los aminoácidos 9-24 de la SEQ ID NO: 23; (av) una secuencia de direccionamiento que comprende la SEQ ID NO: 23; (aw) una proteína de exosporio que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 85 % de identidad con la SEQ ID NO: 24; (ax) una secuencia de direccionamiento que comprende los aminoácidos 1-24 de la SEQ ID NO: 25; (ay) una secuencia de direccionamiento que comprende los aminoácidos 9-24 de la SEQ ID NO: 25; (az) una secuencia de direccionamiento que comprende la SEQ ID NO: 25; (ba) una proteína de exosporio que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 85 % de identidad con la SEQ ID NO: 26; (bb) una secuencia de direccionamiento que comprende los aminoácidos 1-30 de la SEQ ID NO: 27; (bc) una secuencia de direccionamiento que comprende los aminoácidos 15-30 de la SEQ ID NO: 27; (bd) una secuencia de direccionamiento que comprende la SEQ ID NO: 27; (be) una proteína de exosporio que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 85 % de identidad con la SEQ ID NO: 28; (bf) una secuencia de direccionamiento que comprende los aminoácidos 1-33 de la SEQ ID NO: 29; (bg) una secuencia de direccionamiento que comprende los aminoácidos 18-33 de la SEQ ID NO: 29; (bh) una secuencia de direccionamiento que comprende la SEQ ID NO: 29; (bi) una proteína de exosporio que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 85 % de identidad con la SEQ ID NO: 30; (bj) una secuencia de direccionamiento que comprende los aminoácidos 1-24 de la SEQ ID NO: 31; (bk) una secuencia de direccionamiento que comprende los aminoácidos 9-24 de la SEQ ID NO: 31; (bl) una secuencia de direccionamiento que comprende la SEQ ID NO: 31; (bm) una proteína de exosporio que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 85 % de identidad con la SEQ ID NO: 32; (bn) una secuencia de direccionamiento que comprende los aminoácidos 1-15 de la SEQ ID NO: 33; (bo) una secuencia de direccionamiento que comprende la SEQ ID NO: 33; (bp) una proteína de exosporio que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 85 % de identidad con la SEQ ID NO: 34; (bq) una secuencia de direccionamiento que comprende los aminoácidos 1-16 de la SEQ ID NO: 35; (br) una secuencia de direccionamiento

[illegible]

Se divulgan proteínas de fusión que comprenden una secuencia de direccionamiento, una proteína de exosporio o un fragmento de proteína de exosporio y al menos una proteína o péptido que protege una planta frente a un patógeno. La proteína o péptido que protege una planta frente a un patógeno puede comprender una harpina, una α -elastina,

una β -elastina, una sistemina, una fenilalanina amoníaco-liasas, una elicitorina, una defensina, una criptogéina, una proteína flagelina, un péptido de flagelina, una bacteriocina, una lisozima, un péptido de lisozima, un sideróforo, un péptido activo no ribosómico, una conalbúmina, una albúmina, una lactoferrina, un péptido de lactoferrina o TasA. Como alternativa, la proteína o péptido que protege una planta frente a un patógeno tiene actividad insecticida, actividad helminticida, suprime la depredación de insectos o gusanos, o una combinación de los mismos. Como alternativa, la proteína que protege una planta frente a un patógeno comprende una enzima. La secuencia de direccionamiento, proteína de exosporio o fragmento de proteína de exosporio puede ser cualquiera de las secuencias de direccionamiento, proteínas de exosporio o fragmentos de proteínas de exosporio enumerados anteriormente en el párrafo [0005].

También se divulgan proteínas de fusión que comprenden al menos una proteína o péptido de interés y una proteína de exosporio. La proteína de exosporio puede ser una proteína de exosporio que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 85 % de identidad con una cualquiera de las SEQ ID NO: 71, 75, 80, 81, 82, 83 y 84.

Se divulgan bacterias *Bacillus* recombinantes que expresan cualquiera de las proteínas de fusión.

Se divulgan formulaciones que comprenden cualquiera de las bacterias *Bacillus* recombinantes y un vehículo agrícolamente aceptable.

La presente invención se refiere a un método para estimular el crecimiento vegetal. El método comprende introducir en un medio de crecimiento vegetal cualquiera de las bacterias *Bacillus* recombinantes que expresan una proteína de fusión que comprende al menos una proteína o péptido estimulante del crecimiento vegetal y una secuencia de direccionamiento, proteína de exosporio o fragmento de proteína de exosporio que dirige la proteína de fusión al exosporio de las bacterias *Bacillus* recombinantes. Como alternativa, el método comprende aplicar a una planta, una semilla vegetal o un área que rodea una planta o una semilla vegetal de cualquiera de las bacterias *Bacillus* recombinantes que expresan una proteína de fusión que comprende al menos una proteína o péptido estimulante del crecimiento vegetal y una secuencia de direccionamiento, proteína de exosporio o fragmento de proteína de exosporio que dirige la proteína de fusión al exosporio de las bacterias *Bacillus* recombinantes. La proteína o péptido estimulante del crecimiento vegetal está unido físicamente al exosporio de la bacteria *Bacillus* recombinante.

En la presente invención el método comprende introducir una bacteria *Bacillus* recombinante que expresa una proteína de fusión en un medio de crecimiento vegetal o aplica una bacteria *Bacillus* recombinante que expresa una proteína de fusión a una planta, una semilla vegetal, o un área que rodea una planta o una semilla vegetal, en donde la bacteria *Bacillus* recombinante comprende *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus pseudomycoides*, *Bacillus samarii*, *Bacillus gaemokensis*, *Bacillus weihenstephensis* o una combinación de los mismos, en donde cuando la bacteria *Bacillus* recombinante comprende *Bacillus anthracis*, el método comprende además inactivar la bacteria *Bacillus* recombinante antes de su introducción en el medio de crecimiento vegetal o de su aplicación a la planta, la semilla vegetal o el área que rodea la planta o la semilla vegetal; y

la proteína de fusión comprende:

(A) al menos una proteína o péptido estimulante del crecimiento vegetal, en donde la proteína o péptido estimulante del crecimiento vegetal comprende:

una hormona peptídica que comprende una fitosulfocina, clavata 3 (CLV3) o sistemina;
un péptido no hormonal que comprende un péptido eNOD40, RHPP, POLARIS o inhibidor de la tripsina de Kunitz (KTI);
una enzima implicada en la producción o activación de un compuesto estimulante del crecimiento vegetal, en donde la enzima implicada en la producción o activación de un compuesto estimulante del crecimiento vegetal comprende una aminotransferasa, una amina oxidasa, una peptidasa, una proteasa, una adenosina fosfato isopenteniltransferasa, una fosfatasa, una quitosanasa, una quitinasa, una β -1,3-glucanasa, una β -1,4-glucanasa, una β -1,6-glucanasa o una desaminasa del ácido aminociclopropano-1-carboxílico; o
una enzima que degrada o modifica una fuente de nutrientes bacteriana, fúngica o vegetal, en donde la enzima que degrada o modifica una fuente de nutrientes bacteriana, fúngica o vegetal comprende una celulasa, una lipasa, una lignina oxidasa, una proteasa, una glucósido hidrolasa, una fosfatasa, una nucleasa, una amidasa, una nitrato reductasa, una nitrito reductasa, una amilasa, una ligninasa, una glucosidasa, una fosfolipasa, una fitasa, una pectinasa, una glucanasa, una sulfatasa, una ureasa o una xilanasas; y

(B) una proteína de exosporio que dirige la proteína de fusión al exosporio de la bacteria *Bacillus* recombinante, comprendiendo la proteína de exosporio:

(a) una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 95 % de identidad con la SEQ ID NO: 72;
(b) una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 95 % de identidad con la SEQ ID NO: 73;
(c) una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 95 % de identidad con la SEQ ID NO: 74;

- (d) una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 95 % de identidad con la SEQ ID NO: 76;
- (e) una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 95 % de identidad con la SEQ ID NO: 80;
- (f) una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 95 % de identidad con la SEQ ID NO: 81; o
- (g) una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 95 % de identidad con la SEQ ID NO: 83;

en donde la proteína o péptido estimulante del crecimiento vegetal está unido operativamente a la proteína de exosporio; y

en donde las plantas cultivadas en presencia de la bacteria *Bacillus* recombinante presenta un crecimiento mayor en comparación con las plantas cultivadas en ausencia de la bacteria *Bacillus* recombinante, en las mismas condiciones.

La proteína o péptido estimulante del crecimiento vegetal está unido físicamente al exosporio de la bacteria *Bacillus* recombinante.

También se divulga un método para proteger una planta frente a un patógeno o potenciar la resistencia al estrés en una planta. El método comprende introducir en un medio de crecimiento vegetal cualquiera de las bacterias *Bacillus* recombinantes que expresan una proteína de fusión que comprende al menos una proteína o péptido que protege una planta frente a un patógeno o al menos una proteína o péptido que potencia la resistencia al estrés en una planta, o cualquiera de las formulaciones que comprenden cualquiera de las bacterias *Bacillus* recombinantes que expresan una proteína de fusión que comprende al menos una proteína o péptido que protege una planta frente a un patógeno o al menos una proteína o péptido que potencia la resistencia al estrés en una planta. Como alternativa, el método comprende aplicar a una planta, una semilla vegetal o un área que rodea una planta cualquiera de las bacterias *Bacillus* recombinantes que expresan una proteína de fusión que comprende al menos una proteína o péptido que protege una planta frente a un patógeno o al menos una proteína o péptido que potencia la resistencia al estrés en una planta, o cualquiera de las formulaciones que comprenden cualquiera de las bacterias *Bacillus* recombinantes que expresan una proteína de fusión que comprende al menos una proteína o péptido que protege una planta frente a un patógeno o al menos una proteína o péptido que potencia la resistencia al estrés en una planta. La proteína o péptido que protege una planta frente a un patógeno o la proteína o péptido que potencia la resistencia al estrés en una planta está físicamente unida al exosporio de las bacterias *Bacillus* recombinantes.

Se divulga un método para inmovilizar una espora de bacteria *Bacillus* recombinante en una planta. El método comprende introducir en un medio de crecimiento vegetal cualquiera de las bacterias *Bacillus* recombinantes que expresan al menos una proteína o péptido de unión a plantas, o cualquiera de las formulaciones que comprenden cualquiera de las bacterias *Bacillus* recombinantes que expresan al menos una proteína o péptido de unión a plantas. Como alternativa, el método comprende aplicar a una planta, una semilla vegetal o un área que rodea una planta o una semilla vegetal cualquiera de las bacterias *Bacillus* recombinantes que expresan al menos una proteína o péptido de unión a plantas, o cualquiera de las formulaciones que comprenden cualquiera de las bacterias *Bacillus* recombinantes que expresan al menos una proteína o péptido de unión a plantas. La proteína o péptido de unión a plantas está unido físicamente al exosporio de las bacterias *Bacillus* recombinantes.

Otros objetos y características serán en parte evidentes y en parte señalados en lo sucesivo en el presente documento.

Breve descripción de los dibujos

La FIG. 1 muestra una alineación de la secuencia de aminoácidos de la porción amino-terminal de BclA de la cepa Sterne de *Bacillus anthracis* y con la región correspondiente de diversas proteínas de exosporio de bacterias *Bacillus*.

La FIG. 2 muestra resultados de microscopía fluorescente de ejemplo para la expresión de proteínas de fusión que contienen diversas proteínas de exosporio unidas a un indicador mCherry en el exosporio.

Definiciones

Cuando se usan los artículos "un", "una", "uno", "el", "la", y "dicho/a" en el presente documento, significan "al menos uno" o "uno o más" a menos que se indique lo contrario.

Las expresiones "que comprende", "que incluye(n)", y "que tiene" pretenden ser incluyentes y hacen referencia a que puede haber elementos adicionales además de los elementos enumerados.

La expresión "péptido bioactivo" se refiere a cualquier péptido que ejerza una actividad biológica. Pueden generarse "péptidos bioactivos", por ejemplo, a través de la escisión de una proteína, péptido, proproteína o preproproteína por una proteasa o peptidasa.

Una "enzima implicada en la producción o activación de un compuesto estimulante del crecimiento vegetal" incluye cualquier enzima que catalice cualquier etapa en una vía de síntesis biológica de un compuesto que estimule el crecimiento vegetal o altere la estructura vegetal, o cualquier enzima que catalice la conversión de un derivado inactivo o menos activo de un compuesto que estimula el crecimiento vegetal o altera la estructura vegetal a una forma activa

o más activa del compuesto. Dichos compuestos incluyen, por ejemplo, pero sin limitación, hormonas vegetales de molécula pequeña tales como auxinas y citocininas, péptidos bioactivos y moléculas pequeñas estimulantes del crecimiento vegetal sintetizadas por bacterias u hongos en la rizosfera (por ejemplo, 2,3-butanodiol).

- 5 La expresión "proteína de fusión", como se usa en el presente documento, se refiere a una proteína que tiene una secuencia polipeptídica que comprende secuencias derivadas de dos o más proteínas separadas. Puede generarse una proteína de fusión uniendo entre sí una molécula de ácido nucleico que codifica la totalidad o parte de un primer polipéptido con una molécula de ácido nucleico que codifica la totalidad o parte de un segundo polipéptido para crear una secuencia de ácido nucleico que, cuando se expresa, produce un único polipéptido que tiene propiedades
- 10 funcionales derivadas de cada una de las proteínas originales.

La expresión "inmovilizar una espora de bacteria *Bacillus* recombinante en una planta" se refiere a la unión de una espora de bacteria *Bacillus* a una planta, por ejemplo, a una raíz de una planta o a una porción aérea de una planta tal como una hoja, tallo, flor o fruto, de manera que la espora se mantenga en la estructura de la raíz o en la porción

15 aérea de la planta en lugar de dispersarse en el medio de crecimiento vegetal o en el entorno que rodea las porciones aéreas de la planta.

Un "medio de crecimiento vegetal" incluye cualquier material que sea capaz de soportar el crecimiento de una planta.

- 20 Una "proteína o péptido potenciador del sistema inmunitario vegetal", como se usa en el presente documento, incluye cualquier proteína o péptido que tiene un efecto beneficioso sobre el sistema inmunitario de una planta.

La expresión "proteína o péptido estimulante del crecimiento vegetal", como se usa en el presente documento, incluye cualquier proteína o péptido que aumenta el crecimiento vegetal en una planta expuesta a la proteína o péptido.

- 25 Una "proteína o péptido que protege una planta frente a un patógeno", como se usa en el presente documento, incluye cualquier proteína o péptido que hace que una planta expuesta a la proteína o péptido sea menos susceptible a la infección con un patógeno.

- 30 Una "proteína o péptido que potencia la resistencia al estrés en una planta", como se usa en el presente documento, incluye cualquier proteína o péptido que hace que una planta expuesta a la proteína o péptido sea más resistente al estrés.

- 35 La expresión "proteína o péptido de unión a plantas" se refiere a cualquier péptido o proteína capaz de unirse específica o no específicamente a cualquier parte de una planta (por ejemplo, raíces o porciones aéreas de una planta tales como hojas, follaje, tallos, flores o frutos) o a materia vegetal.

- 40 La expresión "secuencia de direccionamiento", como se usa en el presente documento, se refiere a una secuencia polipeptídica que, cuando está presente como parte de un polipéptido más largo o una proteína, da como resultado la localización del polipéptido más largo o la proteína en una ubicación subcelular específica. Las secuencias de direccionamiento descritas en el presente documento dan como resultado la localización de proteínas en el exosporio de una bacteria *Bacillus*.

Descripción de la invención

- 45 En el presente documento se divulgan proteínas de fusión que contienen una secuencia de direccionamiento, una proteína de exosporio o un fragmento de proteína de exosporio que dirige la proteína de fusión al exosporio de una bacteria *Bacillus* y: (a) al menos una proteína o péptido estimulante del crecimiento vegetal; (b) al menos una proteína o péptido que protege una planta frente a un patógeno; (c) al menos una proteína o péptido que potencia la resistencia
- 50 al estrés de una planta; o (d) al menos una proteína o péptido de unión a plantas. La presente invención se refiere únicamente a (a). Cuando se expresan en bacterias *Bacillus*, estas proteínas de fusión se dirigen a la capa de exosporio de la espota y se orientan físicamente de manera que la proteína o péptido se presenta en el exterior de la espota.

- 55 Este sistema de presentación de exosporio de *Bacillus* (BEMD, por sus siglas en inglés) puede usarse para suministrar péptidos, enzimas y otras proteínas a plantas (por ejemplo, al follaje, frutos, flores, tallos o raíces de plantas) o a un medio de crecimiento vegetal tal como el suelo. Los péptidos, las enzimas y las proteínas suministradas al suelo u otro medio de crecimiento vegetal de esta manera persisten y presentan actividad en el suelo durante períodos de tiempo prolongados. La introducción de bacterias *Bacillus* recombinantes que expresan las proteínas de fusión
- 60 descritas en el presente documento en el suelo o la rizosfera de una planta conducen a una potenciación beneficiosa del crecimiento vegetal en muchas condiciones diferentes del suelo. El uso de BEMD para crear estas enzimas les permite continuar ejerciendo sus resultados beneficiosos para la planta y la rizosfera durante los primeros meses de vida de una planta.

- 65 Secuencias de direccionamiento, proteínas de exosporio y fragmentos de proteínas de exosporio

Para facilitar la referencia, las SEQ ID NO para las secuencias de péptidos y proteínas a las que se hace referencia en el presente documento se enumeran en la Tabla 1 a continuación.

Tabla 1. Secuencias de péptidos y proteínas

Proteína, fragmento de proteína o secuencia de direccionamiento (SEQ ID NO)	Secuencia
AA 1-41 de BclA (<i>B. anthracis</i> Sterne) (SEQ ID NO: 1)*	MSNNNYSNGLNPDESLSASAFDPNLVGPTLPPIPPFTLPTG
BclA de longitud completa (SEQ ID NO: 2)*	MSNNNYSNGLNPDESLSASAFDPNLVGPTLPPIPPFTLPTGPTGPFTTGPTGPTGPTGPTGPTGPTGPTGDTGTTGPTGPTGPTGPTGPTGPTGPTGPTGFTPTGPTGPTGPTGPTGPTGPTGDTGTTGPTGPTGPTGPTGPTGPTGPTGDTGTTGPTGPTGPTGPTGPTGPTGPTGATGLTGPTGPTGPSGLGLPAGLYAFNSGGISLDLGINDPVPFNTVGSQFFTGT AISQLDADTFVISE TGFYKITVIANTATASVLGGLTIQVNGVPVPGTGSSSLISLGAPFTIVIQA ITQITTPPSLVEVIVTGLGLSLALGTSASIIIEKVA
AA 1-33 de BetA/BAS3290 (<i>B. anthracis</i> Sterne) (SEQ ID NO: 3)	MSEKYIILHGTALEPNLIGPTLPPIPPFTFPNG
BetA/BAS3290 de longitud completa (SEQ ID NO: 4)	MSEKYIILHGTALEPNLIGPTLPPIPPFTFPNGPTGITGPTGATGFTGIGITGPTGVTGPTGIGITGPTGATGLGILPVFGTITTDVGIGFSVIVNTNINFTLPGPVSGTTLNPVDNSIIINTTGVYSVSFSIVFVIQAISSSILNLTINDSIQFAIESRIGGGPGVRATSARTDLLSLNQGDVLRVRIREATGDIIYSNASLVVSKVD
Met + AA 2-43 de BAS4623 (<i>B. anthracis</i> Sterne) (SEQ ID NO: 5)	MVKVVEGNGGKSKIKSPLNSNFKILSDLVGPTFPPVPTGMTGIT
BAS4623 de longitud completa (SEQ ID NO: 6)	VVKVVEGNGGKSKIKSPLNSNFKILSDLVGPTFPPVPTGMTGITGSTGATGNTGPTGETGATGSAGITGSTGPTGNTGGTGSTGPTGNTGATGSTGVTGSTGVTGSTGVTGSTGPTGETGGTGSTGVTGSTGATGSTGVTGNTGPTGSTGATGNTGSIGETGGTGSMPGPTGETGVTGSTGGTGSTGVTGNTGPTGSTGVTGSTGVTGSTGPTGSTGVTGSTGPTGSTGVTGSTGVTGNTGPTGSTGVTGSTGVTGETGP TGSTGATGNTGPTGETGGTGSTGATGSTGVTGNTGPTGSTGVTGNTGATGETGPTGNTGATGNTGPTGETGVTGSTGPTGETGVTGSTGPTGNTGATGETGATGSTGVTGNTGSTGETGPTGSTGPTGSTGATGVTGNTGPTGSTGATGATGSTGPTGSTGTTGNTGVTGDTGPTGATGVSTTATYAFANNTSGSVISVLLGGTNIPLPNNQNIGPGITVSGGNTVFTVANAGNYIAYTINLTAGLLVSSRITVNGSPLAGTINSPTVATGSFSATIIASLPAGAAVSLQLFGVVALATLSTATPGATLTIIRLS

(continuación)

Proteína, fragmento de proteína o secuencia de direccionamiento (SEQ ID. NO)	Secuencia
AA 1-34 de BclB (<i>B. anthracis</i> Sterne) (SEQ ID NO: 7)	MKQNDKLWLDKGIIGPENIGPTFPVLPPIHIPTG
BclB de longitud completa (SEQ ID NO: 8)	MKQNDKLWLDKGIIGPENIGPTFPVLPPIHIPTGITGATGATGITGATGP TGTTGATGATGITGVGTGATGITGVGTGATGITGVGTGATGITGVGTGPTGIT GATGPTGITGATGPAGITGVGTGPTGITGATGPTGTTGVGTGPTGDTGLA GATGPTGATGLAGATGPTGDTGATGPTGATGLAGATGPTGATGLTG ATGATGATGGGAIIPFASGTPALLVNAVLANLTGTL LGFGFSQP GIAP GVGGT LTILPGVVGDYAFV APRDGIITSLAGFFSATAALAPLTPVQIQM QIFIAPAASNTFTP VAPPLLLTPALPAIAIGTTATGIQAYNVPVVAGDKI LVVVS LTGASPIAAVAGFVSAGLNIV
AA 1-30 de BAS1882 (<i>B. anthracis</i> Sterne) (SEQ ID NO: 9)	MDEFLSSAALNPGSVGPTLPPMQPFQFRTG
BAS 1882 de longitud completa (SEQ ID NO: 10)	MDEFLSSAALNPGSVGPTLPPMQPFQFRTGPTGSTGAKGAIGNTEPYW HTGPPGIVLLTYDFKSLSISFAFRILPIS
AA 1-39 del gen 2280 (<i>B. weihenstephanensis</i> KBAB4) (SEQ ID NO: 11)	MFDKNEIQKINGILQANALNP NLIGPTLPPIPPFTLPTG
Gen 2280 de KBAB4 de longitud completa (SEQ ID NO: 12)	MFDKNEIQKINGILQANALNP NLIGPTLPPIPPFTLPTGPTGVTGPTGVT GPTGVTGPTGVTGPTGVTGPTGVTGPTGVTGPTGVTGPTGVTGPTGVT TGPTGVTGPTGVTGPTGVTGPTGVTGPTGETGPTGGTEGCLDCCVL PMQS VLQQ LIGETVILGTIADTPNT PPLFFLFTITS VND FLVTVDGTTT FVVNISDV TG VGFLPPGPITLLPPTDV GCECECRERPIRQL LD AFIGST VS LLASNGSIAADFSVEQT GLGIVLGTL PINPTTTVRFAISTCKITAVNIT PITM
AA 1-39 del gen 3572 (<i>B. weihenstephanensis</i> KBAB4) (SEQ ID NO: 13)	MFDKNEMKKTNEVLQANALDPNIIGPTLPPIPPFTLPTG
Gen 3572 de KBAB4 de longitud completa (SEQ ID NO: 14)	MFDKNEMKKTNEVLQANALDPNIIGPTLPPIPPFTLPTGPTGPTGPTGP TGPTGPTGPTGPTGPTGPTGPTGPTGPTGLTGPTGPTGLTGPTGLTGPT GPTGLTGQTGSTGPTGATEGCLDCCV FPMQEVL RQLVGQTVILATIA DAPNV APRFFLFNITS VND FLVTVD PVSN TTFV VNISDVIGVGFS LTV PPLTLL PPADLGCECDCRERPIRELLDTLIGSTVNLLVSNGSIATGFNVE QTALGIVIGTLPIPINPPPPTLFRFAISTCKITA VDITPTPTAT
AA 1-49 del Péptido líder de exosporio (<i>B. cereus</i> VD200) (SEQ ID NO: 15)	MSRKDKFNRSRMSRKDRFN SPKIKSEISISPD LVGPTFPPIP SF TLPTG

(continuación)

Proteína, fragmento de proteína o secuencia de direccionamiento (SEQ ID NO)	Secuencia
Péptido líder de exosporio de longitud completa (SEQ ID NO: 16)	MSRKDKFNRSRMSRKDRFNSPKIKSEISISPDLVGPTFPPPIPSFTLPTGIT GPTFNINFRAEKNVAQSFTPPADIQVSYGNIIFNNGGGYSSVTNTFTAPI NGIYLFSASIGFNPTLGTSTLRLTIRKNLVSVASQTGTITTGGTPQLEIT TIIDLLASQTIDIQFSAAESGTLTVGSSNFFSGALLP
AA 1-33 del Péptido líder de exosporio (<i>B. cereus</i> VD166) (SEQ ID NO: 17)	MNEEYSILHGALEPNLIGPTLPSIPPFTFPTG
Péptido líder de exosporio de longitud completa (SEQ ID NO: 18)	MNEEYSILHGALEPNLIGPTLPSIPPFTFPTGPTGITGPTGATGFTGIGIT GPTGVTGPTGIGITGPTGATGPTGIGITGPTG
AA 1-39 de la proteína hipotética IKG_04663 (<i>B. cereus</i> VD200) (SEQ ID NO: 19)	MKNRDNNRKQNSLSSNFRIPPELIGPTFPPVPTGFTGIG
Proteína hipotética IKG_04663 de longitud completa, parcial (SEQ ID NO: 20)	MKNRDNNRKQNSLSSNFRIPPELIGPTFPPVPTGFTGIGITGPTGPQGPT GPQGPRGLQGPMGEMGPTGPQGVQGIQGSVGPIGATGPEGQQGPQGL RGPQGETGATGPGGVQGLQGPIGPTGATGAQGIQGIQGLQGPIGATGP EGSQGIQGVQGLPGATGPQGIQGAQGIQGTPGPSGNTGATGATGATG QGITGPTGITGPTGITGPSGGPPGPTGPTGATGPGGGPSGSTGATGATG NTGATGSTGVTGATGSTGPTGSTGAQGLQGIQGIQGPPIGPTGPEGSQGI QGIPGPTGVTGEQGIQGVQGIQGATGATGDQGPQGIQGVIGPQGVVG ATGDQGPQGIQGVPGPSGETGPQGVQGIQGPMDIGPTGPEGPEGLQ GPQGIQGVPGPVGATGPEGPQGIQGIQGPVGATGPQGPQGIQGIQGVQ GITGATGVQGATGIQGIQGEIGATGPEGPQGVQGAQGAIGPTGPMGPQ GVQGVQGIQGATGAQGVQGPQGIQGIQGPPTGATGDMGATGATGEGT TGPTGVTGPTGVTGPSGGPAGPTGPTGPSGPAGVTGPSGGPPGPTGAT GATGVTGDTGATGSTGVTGATGETGATGVTGLQGPQGIQGVQGEIGP TGPPQGVQGPQGIQGVVTGATGDQGPQGIQGPQGDIGPTGPQGIQGPQGS QGIQGATGGTGAQGPQGIQGPQGDIGLTGSQGPPTGIQGIQGEIGPTGPE GPEGLQGPQGIQGIQGPVGATGPEGPQGIQGIQGVQGATGPQGPQGIQ GIQGVQGITGATGAQGATGIQGIQGEIGATGPEGPQGVQGIQGAIGPT GPMGAQGVQGIQGIQGATGAQGVQGPQGIQGVQGPPTGATGETGATG ATGEGTTGPTGVTGPTGVTGPSGGPAGPTGPTGPSGPAGVTGPSGGPP GPTGATGATGVTGDTGATGSTGVTGATGATGATGVTGLQGPQGIQGV VQGEIGPTGPQGIQGPQGIQGVVTGATGAQGPQGIQGPQGDIGPTGSQGI QGPQGPQGIQGATGATGAQGPQGIQGPQGEIGPTGPQGPQGIQGPQGI QGPTG
AA 1-39 de la proteína propulsor β YVTN (<i>B. weihenstephanensis</i> KBAB4) (SEQ ID NO: 21)	MSDKHQMKKISEVLQAHALDPNLIGPPLPPITPFTFPTG

(continuación)

Proteína, fragmento de proteína o secuencia de direccionamiento (SEQ ID NO)	Secuencia
Proteína propulsor β YVTN de longitud completa de KBAB4 (SEQ ID NO: 22)	MSDKHQMKKISEVLQAHALDPNLIGPPLPPITPFTFPTGSTGPTGSTGS TGPTGSTGNTGPTGPTGPPVGTNLDTIYVTNDISNNVSAIDGNTNTVLT TIPVGTNPVGVGVNSSTNLIYVVNNGSDNISVINGSTNTVVATIPVGTQ PFGVGVNPSTNLIYVANRTSNNVSVIKGGTNTVLTITIPVGTNPVGVGV NSSTNLIYVTNEIPNSVSVIKGGTNTVVATIPVGLFPFGVGVNSLTNLIY VVNNSPHNVSVIDGNTNTVLTITISVGTSPVGVGVNLSTNLIYVANEVP
	NNISVINGNTNTVLTITIPVGTTPFEVGVNSSTNLIYVSNLNSNNVSVIN GSANTVIATVPVGSVPRGIGVKP
AA 1-30 de la proteína hipotética bcerkbab4_2363 (<i>B. weihenstephanensis</i> KBAB4) (SEQ ID NO: 23)	MDEFLSFAALNPGSIGPTLPPVPPFQFPTG
Proteína hipotética bcerkbab4_2363 de longitud completa de KBAB4 (SEQ ID NO: 24)	MDEFLSFAALNPGSIGPTLPPVPPFQFPTGPTGSTGSTGPTGSTGSTGPT GFNLPA GPASITLTSNETTACVSTQGNNTLFFSGQVLVNGSPTPGVVV SFSFSNP SLAFMVPLAVITNASGNFTAVFLAANGPGTVTVTASLLDSP GTMASVTITIVNCP
AA 1-30 de la proteína hipotética bcerkbab4_2131 (<i>B. weihenstephanensis</i> KBAB4) (SEQ ID NO: 25)	MDEFLSSTALNPGSIGPTLPPMQPFQFPTG
Proteína hipotética bcerkbab4_2131 de longitud completa (SEQ ID NO: 26)	MDEFLSSTALNPGSIGPTLPPMQPFQFPTGPTGSTGTTGPTGSIGPTGNT GLTGNTGPTGITGPTGDTG
AA 1-36 de la repetición de triple hélice que contiene colágeno (<i>B. weihenstephanensis</i> KBAB4) (SEQ ID NO: 27)	MKERDRQNSLNSNFRISPNLIGPTFPPVPTGFTGIG

(continuación)

Proteína, fragmento de proteína o secuencia de direccionamiento (SEQ ID NO)	Secuencia
Repetición de triple hélice que contiene colágeno de longitud completa de KBAB4 (SEQ ID NO: 28)	MKERDRQNSLNSNFRISPNLIGPTFPPVPTGFTGIGITGPTGPQGPTGPQ GPRGFQGPMPGEMGPTGPQGVQGIQGPAGQMGATGPEGQQGPQGLRG PQGETGATGPQGVQGLQGPPIGPTGATGAQGIQGIQGLQGPPIGATGPEG PQGIQGVQGVPGATGSQGIQGAQGIQGPQGPSGNTGATGVTGQGISGP TGITGPTGITGPSGGPPGPTGATGATGPGGGPSGSTGATGATGNTGVT GSAGVTGNTGSTGSTGETGAQGLQGIQGVQGPPIGPTGPEGPQGIQGIQ GPTGVTGEQGIQGVQGIQGITGATGDQGPQGIQGAIGPQGITGATGDQ GPQGIQGVPGPTGDTGSQGVQGIQGPMDIGPTGPEGPEGLQGPQGIQ GVPGPAGATGPEGPQGIQGIQGPPIGVTGPEGPQGIQGIQGIQGITGATG AQGATGVQGVQGNIGATGPEGPQGVQGTQGDIGPTGPMGPQGVQGI QGIQGPPTGAQGVQGPQGIQGIQGPPTGVTGDTGTTGATGEGTTGATGV TGPSGVTGPSGGPAGPTGPTGPSGPTGLTGPSGGPPGPTGATGVTGGV GDTGATGSTGVTGATGVTGATGATGLQGPQGIQGVQGDIGPTGPQG VQGPQGIQGITGATGDQGPQGIQGPQGIQGPPTGPQGIQGGQGPQGIQ ATGATGAQGPQGIQGIQGVQGPPTGPQGPPTGIQGVQGEIGPTGPQGVQ GLQGPQGPPTGDTGPTGPQGPQGIQGPPTGATGATGSQGIQGPPTGATGA TGSQGIQGPPTGATGATGATGATGATGATGATGVTGVSTTATYSFANN TSGSAISVLLGGTNIPLNNQNIQGPITVSGGNTVFTVTNAGNYIAYTI NITAALLVSSRITVNGSPLAGTINSPAVATGSFNATIISNLAAGSAISLQ LFGLLAVATLSTTTPGATLTIIRLS
AA 1-39 de la proteína hipotética bmyco0001_21660 (<i>B. mycoides</i> 2048) (SEQ ID NO: 29)	VFDKNEIQKINGILQANALNPNLIGPTLPPIPPFTLPTG
Proteína hipotética bmyco0001_21660 de longitud completa (SEQ ID NO: 30)	VFDKNEIQKINGILQANALNPNLIGPTLPPIPPFTLPTGPTGGTGPTGVT GPTGVTGPTGVTGPTGVTGPTGVTGPTGVTGPTGVTGPTGVTGPTGV TGPTGVTGPTGVTGPTGVTGPTGGTEGCLDCCVLPMQSVLQQLIGE TVILGTIADTPNTPPLFFLFTITSVNDFLVTVDGTTTFVNVISDVTGVG FLPPGPPITLLPPTDVGCECECRERPIRQLLDAFIGSTVSLLASNGSIAAD FSVEQTGLGIVLGTLPINPTTTVRFAISTCKITAVNITPITM
AA 1-30 de la proteína hipotética bmyc0001_22540 (<i>B. mycoides</i> 2048) (SEQ ID NO: 31)	MDEFLYFAALNPGSIGPTLPPVQPFQFPTG
Proteína hipotética bmyc0001_22540 de longitud completa (SEQ ID NO: 32)	MDEFLYFAALNPGSIGPTLPPVQPFQFPTGPTGSTGATGSTGSTGSTGP TGSTGSTGSTGSTGPTGPTGPTGSTGPTGPTGFNLPA GPASITLTSNETT ACVSTQGNNTLFFSGQVLVNGSPTPGVVVSFSFSNPSLAFMVPLAVIT NASGNFTAVFLAANGPGTIVTVTASLLDSPGTMASVTITIVNCP
AA 1-21 de la proteína hipotética bmyc0001_21510 (<i>B. mycoides</i> 2048) (SEQ ID NO: 33)	MDSKNIGPTFPPLPSINFPTG

(continuación)

Proteína, fragmento de proteína o secuencia de direccionamiento (SEQ ID: NO)	Secuencia
Proteína hipotética bmyc0001_21510 de longitud completa (SEQ ID NO: 34)	MDSKNIGPTFPPLPSINFPTGVTGETGATGETGATGATGETGATGETG ETGATGATGATGATGETGATGATGATGAAGATGETGATGETGATGE TGATGETGATGVTGETGATGETGAAGETGITGVTGPTGETGATGETG ATGATGITGATGITGVAGATGETGAAGETGPTGATGAIGAIGATGAT GITGVTGATGETGAAGATGITGVTGATGETGAAGATGITGATGITGV AGATGITGPTGIPGTIPTTNLLYFTFSDGEKLIYTNADGIAQYGTTQILS PSEVSYINLFFINGILQPQPFYEVTAGQLTLLDDEPPSQGSSIILQFIIN
AA 1-22 de la proteína de repetición de triple hélice de colágeno (<i>B. thuringiensis</i> 35646) (SEQ ID NO: 35)	MIGPENIGPTFPILPPIYIPTG
Proteína de repetición de triple hélice de colágeno de longitud completa (SEQ ID NO: 36)	MIGPENIGPTFPILPPIYIPTGETGPTGITGATGETGPTGITGPTGITGATG ETGSTGITGATGETGSTGITGPIGITGATGETGPIGITGATGETGPTGITG STGITGLTGVTGLTGETGPIGITGPTGITGPTGVTGATGPTGGIGPITTT NLLYYTFADGEKLIYTDTDGIPQYGTNNILSPSEVSYINLFFVNGILQPQP LYEVSTGKLTLLDTQPPSQGSSIILQFIIN
AA 1-35 de la proteína hipotética WP_69652 (<i>B. cereus</i>) (SEQ ID NO: 43)	MSNNNIPSPFFFNFNPELIGPTFPPIPLTLPTG
Proteína hipotética WP_69652 de longitud completa (SEQ ID NO: 44)	MSNNNIPSPFFFNFNPELIGPTFPPIPLTLPTGPTGSTGATGATGPTGA TGPTGATGPTGATGATGSTGATGPTGATGTFSSANASIVTPAPQTVNN LAPIQFTAPVLISKNVTFNGIDTFTIQIPGNYFFIGAVMTSNNQAGPVAV GVGFNGIPVPSLDGANYGTPTGQEVVCFGFSGQIPAGTTINLYNISDKT ISIGGATAAGSSIVAARLSFFRIS
AA 1-41 del líder de exosporio WP016117717 (<i>B. cereus</i>) (SEQ ID NO: 45)	MFSEKKRKDLIPDNFLSAPALDPNLIGPTFPPIPSFTLPTG
Líder de exosporio de longitud completa WP016117717 (SEQ ID NO: 46)	MFSEKKRKDLIPDNFLSAPALDPNLIGPTFPPIPSFTLPTGSTGPTGPTG DTGPTGPTATICIRTPDNGCSVAEGSGTVASGFASHAEACNTQAIGD CSHAEGQFATASGTASHAEGFQTTASGFASHTEGSGTTADANFSHTE GINTIVDVLHPGSHIMGKNGTTRSSFSWHLANGLAVGPSLNSAVIEGV TGNLYLDGVVISPNAAADYAEMFETIDGNLIDVGYFVTLYGEKIRKAN ANDDYILGVVSATPAMIADASDLRWHNLFVRDEWGRTQYHEVVVPE KKMAMEE
AA 1-49 del péptido de exosporio WP002105192 (<i>B. cereus</i>) (SEQ ID NO: 47)	MTRKDKFNRSRISRRDRFNSPKIKSEILISPDLVGPTFPPIPSFTLPTG

(continuación)

Proteína, fragmento de proteína o secuencia de direccionamiento (SEQ ID NO)	Secuencia
Péptido de exosporio de longitud completa WP002105192 (SEQ ID NO: 48)	MTRKDKFNRSRISRRDRFNSPKIKSEILISPDLVGPTFFPIPSFTLPTGVTGPTGNTGPTGITGPTGDTGPTGDTGPTGITGP
AA 1-38 de la proteína hipotética WP87353 (<i>B. cereus</i>) (SEQ ID NO: 49)	MSRKDRFNSPKIKSEISISPDLVGPTFFPIPSFTLPTG
Proteína hipotética WP87353 de longitud completa (SEQ ID NO: 50)	MSRKDRFNSPKIKSEISISPDLVGPTFFPIPSFTLPTGITGPTGNTGPTGDTGPTGPTFNINFRAEKNGAQSFTPPADIQVSYGNIIFNNGGGYSSVTNTFTAPINGIYLFSANIGFNPTLGTTSTLRITIRKNLVSVASQTIDIQFSAAESGTLTVGSSNFF
AA 1-39 del péptido de exosporio 02112369 (<i>B. cereus</i>) (SEQ ID NO: 51)	MKERDNKGKQHSLNSNFRIPPELIGPTFPPVPTGFTGIG
Péptido de exosporio de longitud completa 02112369 (SEQ ID NO: 52)	MKERDNKGKQHSLNSNFRIPPELIGPTFPPVPTGFTGIGITGPTGPQGPTGPQGPRGFQGPMMGEMGPTGPQGVQGIQGPAGQMAGATGPEGQQGPEGLRGPVGATGATGLQGVQGIQGPSTGATGAQGIQGIQGLQGPIGATGPEGPQGIQGVQGLPGATGPQGVQGVQGVIGPQGPSTGGTGATGQGVGTGPTGITGSTGVTGPSGGPPGPTGPTGATGPGGGPSGSTGVTGSTGNTGATGSPGVTGATGPTGSTGATGIQGSQGIQGIQGIQGPLGPTGPEGPQGIQGIPTGITGEQGIQGVQGIQGITGATGDQGT
AA 1-39 de la proteína de exosporio WP016099770 (<i>B. cereus</i>) (SEQ ID NO: 53)	MRERDNKRQQHSLNPNFRISPELIGPTFPPVPTGFTGIG
Proteína de exosporio de longitud completa WP016099770 (SEQ ID NO: 54)	MRERDNKRQQHSLNPNFRISPELIGPTFPPVPTGFTGIGITGPTGPQGPTGPQGPRGFQGPMMGEMGPTGPQGVQGIQGPVGPATGPEGQQGPPQGLRGPQGETGATGPGGVQGLQGPIGPTGATGAQGVQGIQGLQGPIGATGPEGPQGIQGVQGLPGATGSQGIQGVQGIQGPQGPSTGATGATGQGITGPTGITGPTGITGPSGGPPGPTGPTGATGPGGGPSGSTGATGATGNTGATGNTGITGATGSTGPTGSTGAQGLQGIQGIQGPPIGPTGPEGPQGIQGIPTGPTGVTGEQGIQGVQGIQGITGATGDQGPQGIQGVVIGAQGVGTGATGDQGPQGIQGVPGPSGATGPQGVQGIQGPMDIGPTGPEGPEGLQGPQGI
	QGVPGPVGATGPEGPQGIQGIQGVQGATGPQGPQGIQGIQGVQGITGATG
AA 1-36 de la proteína hipotética YP006612525 (<i>B. thuringiensis</i>) (SEQ ID NO: 55)	MKNRDNKGKQQSNFRIPPELIGPTFPPVPTGFTGIG

(continuación)

Proteína, fragmento de proteína o secuencia de direccionamiento (SEQ ID: NO)	Secuencia
Proteína hipotética YP006612525 de longitud completa (SEQ ID NO: 56)	MKNRDNKGKQQSNFRIPPELIGPTFPPVPTGFTGIGITGPTGPQGPTGP QGPRGFQGPMGEMGPTGPQGVQGIQGPVGPIGATGPEGQQGAQGLR GPQGETGATGPQGVQGLQGPIGPTGATGAQGIQGIQGLQGPIGATGPE GPQGIQGVQGLPGATGPQGIQGAQGIQGTQGPSGNTGATGATGQGLT GPTGITGPTGITGPSGGPPGPTGPTGATGPGGGPSGSTGATGATGDTG ATGSTGVTGATGAQGPQGVQGIQGPPTGATGATGATGPQGIQGPQGIQ GPTGATGATGSQGPTCNTGPTGSQGIQGPPTGPTGAGATGATGATGAT GVSTTATYAFANNTSGSIISVLLGGTNIPLPNNQNIGPGITVSGGNTVFT VANAGNYIAYTINLTAGLLVSSRITVNGSPLAGTINSPAVAAGSFSAT IIANLPAGAAVSLQLFGVIALATLSTATPGATLTIIRLS
AA 1-136 de la proteína hipotética TIGR03720 (<i>B. mycoides</i>) (SEQ ID NO: 57)**	MKFSKKSTVDSSIVGKRVSXVNVNLRFYDARSCQDKDVGFDVVGEL FTIFRKLNMEGSVQFKAHNSIGKTYITINEVYVFTVLLQYSTLIGGS YVFDKNEIQKINGILQANALNPNIIGPTLPPIPPFTLPTG
Proteína hipotética TIGR03720 de longitud completa (SEQ ID NO: 58)**	MKFSKKSTVDSSIVGKRVSXVNVNLRFYDARSCQDKDVGFDVVGEL FTIFRKLNMEGSVQFKAHNSIGKTYITINEVYVFTVLLQYSTLIGGS YVFDKNEIQKINGILQANALNPNIIGPTLPPIPPFTLPTGPTGGTGPTGV TGPTGVTGPTGVTGPTGVTGPTGVTGPTGVTGPTGVTGPTGVTGPTG VTGPTGVTGPTGVTGPTGVTGPTGGTEGCLCDDCVLPMQSVLQQLIG ETVILGTIADTPNTPPLFFLFTITSVNDFLVTVDGTTTFVVNISDVTGV GFLPPGPITLLPPTDVGCECECRERPIRQLLDAFIGSTVSLASNGSIAA DFSVEQTGLGIVLGTLPINPTTTVRFAISTCKITAVNITPITM
AA 1-196 de BclA (<i>B. anthracis</i> Sterne) (SEQ ID NO: 59)*	MSNNNYSNGLNPDESLSASAFDPNLVGPTLPPIPPFTLPTGPTGPFTTG PTGPTGPTGPTGPTGPTGPTGPTGPTGDTGTTGPTGPTGPTGPTGPTGP TGPTGPTGPTGPTGPTGPTGPTGPTGPTGPTGPTGPTGPTGPTGPTGPTG PTGPTGPTGPTGPTGPTGPTGPTGPTGPTGPTGPTGPTGPTGPTGPTGPTG
Met + AA 20-35 de BclA (<i>B. anthracis</i> Sterne) (SEQ ID NO: 60)	MAFDPNLVGPTLPPIPP
Met + AA 12-27 de BetA/BAS3290 (<i>B. anthracis</i> Sterne) (SEQ ID NO: 61)	MALEPNLIGPTLPPIPP
Met + AA 18-33 del gen 2280 (<i>B. weihenstephanensis</i> KBAB4) (SEQ ID NO: 62)	MALNPNIIGPTLPPIPP
Met + AA 18-33 del gen 3572 (<i>B. weihenstephanensis</i> KBAB4) (SEQ ID NO: 63)	MALDPNIIGPTLPPIPP

(continuación)

Proteína, fragmento de proteína o secuencia de direccionamiento (SEQ ID NO)	Secuencia
Met + AA 12-27 del Péptido líder de exosporio (<i>B. cereus</i> VD166) (SEQ ID NO: 64)	MALEPNLIGPTLPSIPP
Met + AA 18-33 de la proteína propulsor β YVTN (<i>B. weihenstephanensis</i> KBAB4) (SEQ ID NO: 65)	MALDPNLIGPPLPPITP
Met + AA 9-24 de la proteína hipotética bcerkbab4_2363 (<i>B. weihenstephanensis</i> KBAB4) (SEQ ID NO: 66)	MALNPGSIGPTLPPVPP
Met + AA 9-24 de la proteína hipotética bcerkbab4_2131 (<i>B. weihenstephanensis</i> KBAB4) (SEQ ID NO: 67)	MALNPCSIGPTLPPMQP
Met + AA 9-24 de la proteína hipotética bmyc0001_22540 (<i>B. mycoides</i> 2048) (SEQ ID NO: 68)	MALNPGSIGPTLPPVQP
Met + AA 9-24 de BAS1882 (<i>B. anthracis</i> Sterne) (SEQ ID NO: 69)	MALNPGSVGPTLPPMQP
Met + AA 20-35 del líder de exosporio WP016117717 (<i>B. cereus</i>) (SEQ ID NO: 70)	MALDPNLIGPTFPPIPS
InhA de longitud completa (<i>B. mycoides</i>) (SEQ ID NO: 71)	MKRKTPFKVFSSLAITTMLGCTFALGTSVAYAETTSQSKGSISTTPIDN NLIQEERLAEALKERGTTIDQSASKEETQKAVEQYIEKKKGDQPNKEIL PDDPAKEASDFVKKVKEKKMEEKEKVKKSVENASSEQTPSQNKQKL NGKVPTSPAKQAPYNGAVRTDKVLVLLVEFSDYKHNNIEQSPGYMY ANDFSREHYQKMLFGNEPFTLFDGSKVKTFKQYYEEQSGGSYTTDGY VTEWLTVPGKAADYGADGKTGHDNKGPKGARDLVKEALKAAAEKG LDLSQFDQFDRTYDNGDGNQNEPDGVIDHLMVIHAGVGGQEAGGGKL GDDAIWSHRSKLAQDPVAIEGTSKSKVSYWDGKVAAHDYTIEPEDGA VGVFHAHEFGHDLGLPDEYDTNYTGAGSPVEAWSLMSGGSWTGRIAG

(continuación)

Proteína, fragmento de proteína o secuencia de direccionamiento (SEQ ID. NO)	Secuencia
	TEPTSFSPQNKDFLQKNMDGNWAKIVEVDYDKIKRGVGFPTYIDQSV TKSNRPGLVRVNLPEKSVETIKTGFGKHAYYSTRGDDMHTTLETPLF DLTKAANAKFDYKANYELEAECDFIEVHAVTEDGKTTLIDKLGDQV KGDQDTTEGKWIDKSYDLSQFKGKKVQLQFDYITDPALTYKGFAMD NVNVTVDGKVVFSDDAEGQAKMKLNGFVVSDBGTEKKPHYYYLEWR NYAGSDEGLKVGRGPVYNTGLVWYADDSFKDNWVGRHPGEGFLG VVDSPHEAVVGNLNGKPVYGTGLQIADAAAFSLDQTPAWNVSFTR GQFNYPGLPGVATFDDSKVYSNTQIPDAGRKVPQLGLKFQVVGQAD DKSAGAIWIRR
BAS1141 de longitud completa (ExsY) (<i>B. anthracis</i> Sterne) (SEQ ID NO: 72)	MSCNENKHHGSSHCVVDVVKFINELQDCSTTTTCGSGCEIPFLGAHNT ASVANTRPFILYTKAGAPFEAFAPSANLTSCRSPIFRVESVDDDDSCAVL RVLSVVLGDSSPVPPTDDPICTFLAVPNARLVSTSTCITVDLSCFCAIQC LRDVTI
BAS1144 de longitud completa (BxpB/ExsFA) (<i>B. anthracis</i> Sterne) (SEQ ID NO: 73)	MFSSDCEFTKIDCEAKPASTLPAFGFAFNASAPQFASLFTPLLLPSVSPN PNITVPVINDTVSVGDGIRILRAGIYQISYTLTISLDNSPVAPEAGRFFLS LGTPANIIPGSGTAVRSNVIGTGEVDVSSGVILINLNPGDLIRIVPVELIG TVDIRAAALTVAQIS
BAS 11 45 de longitud completa (CotY) (<i>B. anthracis</i> Sterne) (SEQ ID NO: 74)	MSCNCNEDHHHHDCDFNCVSNVVRFIHELQECATTTTCGSGCEVPFLG AHNSASVANTRPFILYTKAGAPFEAFAPSANLTSCRSPIFRVESIDDDD CAVLRVLSVVLGDTSPVPPTDDPICTFLAVPNARLISTNTCLTVDLSCF CAIQCLRDVTI
BAS1140 de longitud completa (<i>B. anthracis</i> Sterne) (SEQ ID NO: 75)	MEVGGTSVKNNKNSSTVGKPLLYIAQVSLELAAPKTKRIILTNNFENED RKEESNRNENVVSSAVEEVIEQEEQQEQEQEQEQVEEKTEEEEQV QEQQEPVRTVPYNKSFKDMNNEEKIHFLNRPYIPKVRCRIKTATIS YVGSII SYRNGIVAIMPPNSMRDIRLSIEEIKSIDMAGF
ExsFB de longitud completa (<i>B. anthracis</i> H9401) (SEQ ID NO: 76)	MKERSENMRSSSRKLTNFCRAQAPSTLPALGFAFNATSPQFATLFTP LLLPSTGPNPNITVPVINDTISTGTGIRIQVAGIYQISYTLTISLDNVPVTP EAARFFLTLSSTNIIAGSGTAVRSNIIGTGEVDVSSGVILINLNPGDLIQ IVPVEVIGTVDIRSAALTVAQIR

(continuación)

Proteína, fragmento de proteína o secuencia de direccionamiento (SEQ ID NO)	Secuencia
InhA1 de longitud completa (<i>B. thuringiensis</i> HD74) (SEQ ID NO: 77)	MSKKPFKVLSSIALTAVLGLSFGAGTQSAYAETPVNKTATSPVDDHLI PEERLADALKKRGVIDSKASETETKKA VEKYVENKKGENPGKEAAN GDQLTKDASDFLKKVKDAKADTKEKLNQPATGTPAATGPVKGGNLG KVPTSPAKQKDYNGEVRKDKVLVLLVEYADFKHNNIDKEPGMYSN DFNKEHYEKMLFGNEPFTLDDGSKIETFKQYYEEQSGGSYTV DGTVT KWLTVPGKAADYGADAPGGGHDNKGPKGPRDLVKDALKAAVDSGI DLSEFDQFDQYDVNGDGNKNQPDGLIDHLMIIHAGVVGQEAGGGKLG DDAIWSHRWTVGPKPFPIEGTQAKVPYWGGKMAAFDYTIEPEDGAV GVFAHEYGHDLGLPDEYDTQYSGQGEPIEAWSIMSGGSWAGKIAGTT PTSFS PQNKEFFQKTIGGNWANIVEVDYEKLNKGIGLATYLDQSVTKS ARPGMIRVNLPDKDVKTIEPAFGKQYYYSTKGDDLHTKMETPLFDLT NATSAKFDFKSLYEIEAGYDFLEVHAVTEDGKQTLIERLGEKANSGN ADSTNGKWIDKSYDLSQFKGKKVKLTFDYITDGGGLALNGFALDNASL TVDGKVVFSDDAEGTPQLKLDGFFVVSNGTEKKKHNYVVEWRNYAG ADNALKFARGPVFNTGMVVWYADSA YTDNWVGVHPGHGFLGVVD SHPEAIVGTLNGKPTVKSSSTRFQIADAAFSFDKTPAWKVVSPTRGFTT YDGLAGVPKFDDSKTYINQQIPDAGRILPKLGLKFEVVGQADDNSAG AVRLYR
ExsJ de longitud completa	MKHNDCFDHNNCNPVFSADCCKNPQSVPTREQLSQLITLLNSLVSAI
(<i>B. cereus</i> ATCC 10876) (SEQ ID NO: 78)	SAFFANPSNANRLVLLDLFNQFLIFLNSLLPSPEVNFLKQLTQSIIVLLQ SPAPNLGQLSTLLQQFY SALAQFFFDLIPISCNSNVDSATLQLLFNL LIQLINATPGATGPTGPTGPTGPTGPAGTGAGPTGATGATGATGPTGA TGPAGTGGATGATGATGVTGATGATGATGPTGPTGATGPTGATGAT GATGPTGATGPTGATGLTGATGAAGGGAIIPFASGTTPSALVNALVA NTGTLLGFGFSQPGVALTGGTSITLALGVGDYAFVAPRAGTITSLAGF FSATAALAPISPVQVQIQILTAPAA SNTFTVQGAPLLLTPAFAAIAIGST ASGIIAEAI PVAAGDKILLYVSLTAASPIAAVAGFVSAGINIV
ExsH de longitud completa (<i>B. cereus</i>) (SEQ ID NO: 79)	MKHNDCFGHNNCNPVFTPDCCNNPQTVPTITSEQLGRLITLLNSLIAA IAAFFANPSDANRLALLNLFTQLLNLLNELAPSPEGNFLKQLIQSIINLL QSPNPNLGQLLSLLQQFY SALAPFFFSLILDPASLQLLNLLAQLIGVTP GGGATGPTGPTGPGGGATGPTGPTGPGGGATGPTGATGPTGDTGLAG ATGATGPTGDTGVAGPAGPTGPTGDTGLAGATGPTGPTGDTGLAGA TGPTGATGLAGATGPTGATGLTGATGATGAAGGGAIIPFASGTTPAAL VNALIA NTGTLLGFGFSQPGIGLAGGTSITLALGVGDYAFVAPRDGVI TSLAGFFSATAALSPLSPVQVQIQILTAPAA SNTFTVQGAPLLLTPAFA AIAIGSTASGIIPEAIPV VAGDKILLYVSLTAASPIAAVAGFVSAGINIV
YjcA de longitud completa (<i>B. anthracis</i> Ames) (SEQ ID NO: 80)	MLFTSWLLFFIFALAAFR LTRLIVYDKITGFLRRPFIDELEITEPDGSVST FTKVKGKGLRKWIGELLSCYWCTGVWVSAFLLVLYNWIPVAEPLLA LLAIAAGAAAIETITGYFMGE

(continuación)

Proteína, fragmento de proteína o secuencia de direccionamiento (SEQ ID NO)	Secuencia
YjCB de longitud completa (<i>B. anthracis</i>) (SEQ ID NO: 81)	MFAVSNNPRQNSYDLQQWYHMQQQHQAQQQAYQEQLQQQGFVKK KGCNCGKKKSTIKHYEE
BclC de longitud completa (<i>B. anthracis</i> Sterne) (SEQ ID NO: 82)	MSRYDDSQNKFSKPCFPSSAGRIPNTPSIPVTKAQLRTFRAIIIDLTKIIP KLFANPSPQNIEDLIDTLNLLSKFICSLDAASSLKAQGLAIKLNILITILKN PTFVASAVFIELQNLINYLLSITKLFRIIDPCTLQELLKLIAALQ TALVNS ASFIQGPPTGPTGPTGPTGPTGATGATGPQGVQGPAGATGATGPQGVQ GPAGATGATGPQGAQGPAGATGATGPQGAQGPAGATGATGPQGIQ PAGATGATGPQGVQGPPTGATGIGVTGPTGPSGGPAGATGPQGPQNT GATGPQGIQGPAGATGATGPQGAQGPAGATGATGPQGVQGPPTGATG IGVTGPTGPSGPSFPVATIVVTNNIQQTIVLQFNNFNTAINVNNIIFNG TDTVTVINAGIYVISVSISTTAPGCAPLGVGISINGAVATDNFSSNLIGD SLSFTTITLTAGANISVQSTLNEITIPATGNTNIRLTVFRIA
Fosfatasa ácida de longitud completa (<i>Bacillus thuringiensis</i> serovar konkukian cepa 97-27) (SEQ ID NO: 83)	MKMKRGITTLLSVAVLSTSLVACSGITEKTVAKEEKVKLTDQQLMAD LWYQTAGEMKALYYQGYNIGQLKLDAVLAKGTEKKPAIVLDLDETV LDNSPHQAMSVKTGKGYPYKWDDWINKAEAEALPGAIDFLKYTESK GVDIYYISNRKTNQLDATIKNLERVGAPQATKEHILLQDPKEKGKEKR RELVSQTHDIVLFFGDNLSDFTGFDGKSVKDRNQAVADSKAQFGEKFI IFPNPMYGDWEGALYDYDFKKSDAEKDKIRRDNLKSFDTK
InhA2 de longitud completa (<i>B. thuringiensis</i> HD74) (SEQ ID NO: 84)	MKKKKKKLPLAVLTTAAVLSSTFAFGGHAAYAETPTSSLPIDEHLIPE ERLAEALKQRGVIDQSASQAETSKAVEKYVEKKKGENPGKEILTGDS LTQEASDFMKKVKDAKMRENEQAQQPEVGPVAGQGAALNPGKLNG KVPTTSAKQEEYNGAVRKDKVLVLLVEFSDFKHNNIDQEPGYMYSK DFNREHYQKMLFGDEPFTLFDGSKINTFKQYYEEQSGGSYTVDGTVT EWLTVPGKASDYGADAGTGHDNKGPLGPKDLVKEALKA AVAKGIN LADFDQYDQYDQNGNGNKNPDGIIIDHLMVVHAGVVGQEAGGGKLG DDAIWSHRSKLGSKPYAIDGTKSSVSNWGGKMAAYDYTIEPEDGAV GVFAHEYGHDLGLPDEYDTKYSGQGEPVESWSIMSGGSWAGKIAGT EPTSFSPQNKEFFQKNMKGNWANILEVDYDKLSKGIGVATYVDQSTT KSKRPGIVRVNLPDKDIKNIESAFGKKFYYSTKGNDIHTTLETVPVFDLT

(continuación)

Proteína, fragmento de proteína o secuencia de direccionamiento (SEQ ID. NO)	Secuencia
	NAKDAKFDYKAFYELEAKYDFLDVYAIAEDGKTRIDRMGEKDIKG GADTTDGGKWVDKSYDLSQFKGKKVKLQFEYLTDAVAYKGFALDNA ALTVDGKVVFSDDAEGQPAMTLKGFTVSNQFEQKKHNYVVEWRNY AGSDTALQYARGPVFNTGMVVWYADQSFTDNWVGVPGEGLGVV DSHPEAIVGTLNGQPTVKSSSTRYQIADAASFSDQTPAWKVNSPTRGIF DYKGLPGVAKFDDSKQYINSVIPDAGRKLPLKLGKFEVVGQAEDKSA GAVWLHR
AA = aminoácidos * BclA de la cepa Sterne de <i>B. anthracis</i> tiene un 100 % de identidad de secuencia con BclA de <i>B. thuringiensis</i> . Por lo tanto, las SEQ ID NO: 1, 2 y 59 también representan los aminoácidos 1-41 de BclA de <i>B. thuringiensis</i> , BclA de <i>B. thuringiensis</i> de longitud total y los aminoácidos 1-196 de BclA de <i>B. thuringiensis</i> , respectivamente. De forma análoga, la SEQ ID NO: 60 también representa un resto metionina más los aminoácidos 20-35 de BclA de <i>B. thuringiensis</i> . ** La proteína hipotética TIGR03720 de <i>B. mycoides</i> tiene una identidad de secuencia del 100 % con la proteína hipotética WP003189234 de <i>B. mycoides</i> . Por lo tanto, las SEQ ID NO: 57 y 58 también representan los aminoácidos 1-136 de la proteína hipotética WP003189234 de <i>B. mycoides</i> y la proteína hipotética WP003189234 de <i>B. mycoides</i> de longitud completa, respectivamente.	

- Bacillus* es un género de bacterias con forma de bastón. Las bacterias *Bacillus* incluyen las especies *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus pseudomycoides*, *Bacillus samanii*, *Bacillus gaemokensis* y *Bacillus weihenstephanensis*. En condiciones ambientales estresantes, las bacterias *Bacillus* experimentan esporulación y forman endosporas ovaladas que pueden permanecer inactivas durante períodos de tiempo prolongados. La capa más externa de las endosporas se conoce como exosporio y comprende una capa basal rodeada por una pelusa externa de proyecciones similares a pelos. Los filamentos de la pelusa similar a pelo están formados predominantemente por la glicoproteína BclA similar al colágeno, mientras que la capa basal se compone de varias proteínas diferentes. Otra proteína relacionada con el colágeno, bclb, también está presente en el exosporio y está expuesta en endosporas de bacterias *Bacillus*. Se ha demostrado que BclA, el componente principal de la pelusa superficial, está adherida al exosporio con su extremo amino (extremo N) colocado en la capa basal y su extremo carboxi (extremo C) extendiéndose hacia afuera desde la espora.
- Anteriormente se descubrió que determinadas secuencias de las regiones N-terminales de BclA y BclB podrían usarse para dirigir un péptido o proteína al exosporio de una endospora de *Bacillus* (véanse las Solicitudes de Patente de los EE. UU. N.º 2010/0233124 y 2011/0281316, y Thompson *et al.*, *Targeting of the BclA and BclB proteins to the Bacillus anthracis spore surface*, *Molecular Microbiology* 70(2):421-34 (2008)). También se descubrió que la proteína BetA/BAS3290 de *Bacillus anthracis* está localizada en el exosporio.
- En particular, se ha descubierto que los aminoácidos 20-35 de BclA de la cepa Stern de *Bacillus anthracis* son suficientes para el direccionamiento al exosporio. En la Figura 1 se muestra una alineación de secuencia de los aminoácidos 1-41 de BclA (SEQ ID NO: 1) con las correspondientes regiones N-terminales de varias otras proteínas de exosporio de bacterias *Bacillus* y proteínas de bacterias *Bacillus* que tienen secuencias relacionadas. Como se puede observar en la Figura 1, existe una región de alta homología entre todas las proteínas en la región correspondiente a los aminoácidos 20-41 de BclA. Sin embargo, en estas secuencias, los aminoácidos correspondientes a los aminoácidos 36-41 de BclA contienen una estructura secundaria y no son necesarios para la localización de la proteína de fusión en el exosporio. La región de la secuencia de direccionamiento conservada de BclA (aminoácidos 20-35 de la SEQ ID NO: 1) se muestra en negrita en la Figura 1 y corresponde a la secuencia de direccionamiento mínima necesaria para la localización en el exosporio. Una región más conservada que abarca los aminoácidos 25-35 de BclA dentro de la secuencia de direccionamiento está subrayada en las secuencias de la Figura 1 y es la secuencia de reconocimiento para ExsFA/BxpB/ExsFB y sus homólogos, que dirigen y ensamblan las proteínas descritas en la superficie del exosporio. Las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 3, 5 y 7 en la Figura 1 son los aminoácidos 1-33 de BetA/BAS3290 de la cepa Sterne de *Bacillus anthracis*, una metionina seguida de los aminoácidos 2-43 de BAS4623 de la cepa Sterne de *Bacillus anthracis* y los aminoácidos 1-34 de BclB de la cepa Sterne de *Bacillus anthracis*, respectivamente. (Para BAS4623, se descubrió que reemplazar la valina presente en la posición 1 en la proteína nativa con una metionina daba como resultado una mejor expresión). Como se puede observar en la Figura 1, cada una de estas secuencias contiene una región conservada correspondiente a los aminoácidos 20-35 de BclA (SEQ ID NO: 1; mostrada en negrita) y una región más conservada correspondiente a los aminoácidos 20-35 de BclA (subrayada).

Proteínas adicionales de bacterias *Bacillus* también contienen la región de direccionamiento conservada. En particular, en la Figura 1, la SEQ ID NO: 9 son los aminoácidos 1-30 de BAS1882 de la cepa Sterne de *Bacillus anthracis*, la SEQ ID NO: 11 son los aminoácidos 1-39 del producto del gen 2280 de *Bacillus weihenstephanensis* KBAB4, la SEQ ID NO: 13 son los aminoácidos 1-39 del producto del gen 3572 de *Bacillus weihenstephanensis* KBAB4, la SEQ ID NO: 15 son los aminoácidos 1-49 del péptido líder de exosporio de *Bacillus cereus* VD200, la SEQ ID NO: 17 son los aminoácidos 1-33 del péptido líder de exosporio de *Bacillus cereus* VD166, la SEQ ID NO: 19 son los aminoácidos 1-39 de la proteína hipotética IKG_04663 de *Bacillus cereus* VD200, la SEQ ID NO: 21 son los aminoácidos 1-39 de la proteína propulsor β YVTN de *Bacillus weihenstephanensis* KBAB4, la SEQ ID NO: 23 son los aminoácidos 1-30 de la proteína hipotética bcerkbab4_2363 de *Bacillus weihenstephanensis* KBAB4, la SEQ ID NO: 25 son los aminoácidos 1-30 de la proteína hipotética bcerkbab4_2131 de *Bacillus weihenstephanensis* KBAB4, la SEQ ID NO: 27 son los aminoácidos 1-36 de la repetición de triple hélice que contiene colágeno de *Bacillus weihenstephanensis* KBAB4, la SEQ ID NO: 29 son los aminoácidos 1-39 de la proteína hipotética bmyc0001_21660 de *Bacillus mycoides* 2048, la SEQ ID NO: 31 son los aminoácidos 1-30 de la proteína hipotética bmyc0001_22540 de *Bacillus mycoides* 2048, la SEQ ID NO: 33 son los aminoácidos 1-21 de la proteína hipotética bmyc0001_21510 de *Bacillus mycoides* 2048, la SEQ ID NO: 35 son los aminoácidos 1-22 de la proteína de repetición de triple hélice de colágeno de *Bacillus thuringiensis* 35646, la SEQ ID NO: 43 son los aminoácidos 1-35 de la proteína hipotética WP_69652 de *Bacillus cereus*, la SEQ ID NO: 45 son los aminoácidos 1-41 del líder de exosporio WP016117717 de *Bacillus cereus*, la SEQ ID NO: 47 son los aminoácidos 1-49 del péptido de exosporio WP002105192 de *Bacillus cereus*, la SEQ ID NO: 49 son los aminoácidos 1-38 de la proteína hipotética WP87353 de *Bacillus cereus*, la SEQ ID NO: 51 son los aminoácidos 1-39 del péptido de exosporio 02112369 de *Bacillus cereus*, la SEQ ID NO: 53 son los aminoácidos 1-39 de la proteína de exosporio WP016099770 de *Bacillus cereus*, la SEQ ID NO: 55 son los aminoácidos 1-36 de la proteína hipotética YP006612525 de *Bacillus thuringiensis* y la SEQ ID NO: 57 son los aminoácidos 1-136 de la proteína hipotética TIGR03720 de *Bacillus mycoides*. Como se muestra en la Figura 1, cada una de las regiones N-terminales de estas proteínas contiene una región que está conservada con los aminoácidos 20-35 de BclA (SEQ ID NO: 1) y una región más altamente conservada correspondiente a los aminoácidos 25-35 de BclA.

En las proteínas de fusión divulgadas en el presente documento, cualquier porción de BclA que incluya los aminoácidos 20-35 puede usarse como la secuencia de direccionamiento en la presente invención. Además, pueden usarse proteínas de exosporio de longitud completa o fragmentos de proteínas de exosporio para dirigir las proteínas de fusión al exosporio. Por lo tanto, puede usarse BclA de longitud completa o un fragmento de BclA que incluye los aminoácidos 20-35 para el direccionamiento al exosporio. Por ejemplo, puede usarse BclA de longitud completa (SEQ ID NO: 2) o un fragmento de tamaño mediano de BclA que carece del extremo carboxi terminal tal como la SEQ ID NO: 59 (aminoácidos 1-196 de BclA) para dirigir las proteínas de fusión al exosporio. Los fragmentos de tamaño mediano, tal como el fragmento de la SEQ ID NO: 59, tienen menos estructura secundaria que BclA de longitud completa y se ha descubierto que son adecuados para su uso como secuencia de direccionamiento. La secuencia de direccionamiento también puede comprender porciones mucho más cortas de BclA que incluyen los aminoácidos 20-35, tales como la SEQ ID NO: 1 (aminoácidos 1-41 de BclA), los aminoácidos 1-35 de la SEQ ID NO: 1, los aminoácidos 20-35 de la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 60 (un resto metionina unido a los aminoácidos 20-35 de BclA). Incluso fragmentos más cortos de BclA que incluyen sólo algunos de los aminoácidos 20-35 también presentan la capacidad de dirigir proteínas de fusión al exosporio. Por ejemplo, la secuencia de direccionamiento puede comprender los aminoácidos 22-31 de la SEQ ID NO: 1, los aminoácidos 22-33 de la SEQ ID NO: 1 o los aminoácidos 20-31 de la SEQ ID NO: 1.

Como alternativa, cualquier porción de BetA/BAS3290, BAS4623, bclb, BAS1882, el producto del gen 2280 de KBAB4, el producto del gen 3572 de KBAB4, péptido líder de exosporio de *B. cereus* VD200, péptido líder de exosporio de *B. cereus* VD166, proteína hipotética IKG_04663 de *B. cereus* VD200, proteína propulsor β YVTN de *B. weihenstephanensis* KBAB4, proteína hipotética bcerkbab4_2363 de *B. weihenstephanensis* KBAB4, proteína hipotética bcerkbab4_2131 de *B. weihenstephanensis* KBAB4, repetición de triple hélice que contiene colágeno de *B. weihenstephanensis* KBAB4, proteína hipotética bmyc0001_21660 de *B. mycoides* 2048, proteína hipotética bmyc0001_22540 de *B. mycoides* 2048, proteína hipotética bmyc0001_21510 de *B. mycoides* 2048, proteína de repetición de triple hélice de colágeno de *B. thuringiensis* 35646, proteína hipotética WP_69652 de *B. cereus*, líder de exosporio WP016117717 de *B. cereus*, péptido de exosporio WP002105192 de *B. cereus*, proteína hipotética WP87353 de *B. cereus*, péptido de exosporio 02112369 de *B. cereus*, proteína de exosporio WP016099770 de *B. cereus*, proteína hipotética YP006612525 de *B. thuringiensis* o proteína hipotética TIGR03720 de *B. mycoides* que incluye los aminoácidos correspondientes a los aminoácidos 20-35 de BclA, puede servir como la secuencia de direccionamiento. Como se puede observar en la Figura 1, los aminoácidos 12-27 de BetA/BAS3290, los aminoácidos 23-38 de BAS4623, los aminoácidos 13-28 de Bclb, los aminoácidos 9-24 de BAS1882, los aminoácidos 18-33 del producto del gen 2280 de KBAB4, los aminoácidos 18-33 del producto del gen 3572 de KBAB4, los aminoácidos 28-43 del péptido líder de exosporio de *B. cereus* VD200, los aminoácidos 12-27 del péptido líder de exosporio de *B. cereus* VD166, los aminoácidos 18-33 de la proteína hipotética IKG_04663 de *B. cereus* VD200, los aminoácidos 18-33 de la proteína propulsor β YVTN de *B. weihenstephanensis* KBAB4, los aminoácidos 9-24 de la proteína hipotética bcerkbab4_2363 de *B. weihenstephanensis* KBAB4, los aminoácidos 9-24 de la proteína hipotética bcerkbab4_2131 de *B. weihenstephanensis* KBAB4, los aminoácidos 15-30 de la repetición de triple hélice que contiene colágeno de *B. weihenstephanensis* KBAB4, los aminoácidos 18-33 de la proteína hipotética bmyc0001_21660 de *B. mycoides* 2048, los aminoácidos 9-24 de la proteína hipotética bmyc0001_22540 de *B. mycoides* 2048, los aminoácidos 1-15 de la proteína hipotética bmyc0001_21510 de *B. mycoides* 2048, los

aminoácidos 1-16 de la proteína de repetición de triple hélice de colágeno de *B. thuringiensis* 35646, los aminoácidos 14-29 de la proteína hipotética WP_69652 de *B. cereus*, los aminoácidos 20-35 del líder de exosporio WP016117717 de *B. cereus*, los aminoácidos 28-43 del péptido de exosporio WP002105192 de *B. cereus*, los aminoácidos 17-32 de la proteína hipotética WP87353 de *B. cereus*, los aminoácidos 18-33 del péptido de exosporio 02112369 de *B. cereus*, los aminoácidos 18-33 de la proteína de exosporio WP016099770 de *B. cereus*, los aminoácidos 15-30 de la proteína hipotética YP006612525 de *B. thuringiensis* y los aminoácidos 115-130 de la proteína hipotética TIGR03720 de *B. mycoides* corresponden a los aminoácidos 20-35 de BclA. Por lo tanto, cualquier porción de estas proteínas que incluya los aminoácidos correspondientes enumerados anteriormente puede servir como la secuencia de direccionamiento.

Además, cualquier secuencia de aminoácidos que comprenda los aminoácidos 20-35 de BclA, o cualquiera de los aminoácidos correspondientes enumerados anteriormente, puede servir como la secuencia de direccionamiento.

Por lo tanto, la secuencia de direccionamiento puede comprender los aminoácidos 1-35 de la SEQ ID NO: 1, los aminoácidos 20-35 de la SEQ ID NO: 1, la SEQ ID NO: 1, la SEQ ID NO: 60, los aminoácidos 22-31 de la SEQ ID NO: 1, los aminoácidos 22-33 de la SEQ ID NO: 1 o los aminoácidos 20-31 de la SEQ ID NO: 1. Como alternativa, la secuencia de direccionamiento consiste en los aminoácidos 1-35 de la SEQ ID NO: 1, los aminoácidos 20-35 de la SEQ ID NO: 1, la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 60. Como alternativa, la secuencia de direccionamiento puede consistir en los aminoácidos 22-31 de la SEQ ID NO: 1, los aminoácidos 22-33 de la SEQ ID NO: 1 o los aminoácidos 20-31 de la SEQ ID NO: 1. Como alternativa, la proteína de exosporio puede comprender BclA de longitud completa (SEQ ID NO: 2) o el fragmento de proteína de exosporio puede comprender un fragmento de tamaño mediano de BclA que carece del extremo carboxi, tal como la SEQ ID NO: 59 (aminoácidos 1-196 de BclA). Como alternativa, el fragmento de proteína de exosporio puede consistir en la SEQ ID NO: 59.

La secuencia de direccionamiento también puede comprender los aminoácidos 1-27 de la SEQ ID NO: 3, los aminoácidos 12-27 de la SEQ ID NO: 3 o la SEQ ID NO: 3, o la proteína de exosporio puede comprender BetA/BAS3290 de longitud completa (SEQ ID NO: 4). También se ha descubierto que puede usarse como secuencia de direccionamiento un resto metionina unido a los aminoácidos 12-27 de BetA/BAS3290. Por lo tanto, la secuencia de direccionamiento puede comprender la SEQ ID NO: 61. La secuencia de direccionamiento también puede comprender los aminoácidos 14-23 de la SEQ ID NO: 3, los aminoácidos 14-25 de la SEQ ID NO: 3 o los aminoácidos 12-23 de la SEQ ID NO: 3.

La secuencia de direccionamiento también puede comprender los aminoácidos 1-38 de la SEQ ID NO: 5, los aminoácidos 23-38 de la SEQ ID NO: 5 o la SEQ ID NO: 5, o la proteína de exosporio puede comprender BAS4623 de longitud completa (SEQ ID NO: 6).

Como alternativa, la secuencia de direccionamiento puede comprender los aminoácidos 1-28 de la SEQ ID NO: 7, los aminoácidos 13-28 de la SEQ ID NO: 7 o la SEQ ID NO: 7, o la proteína de exosporio puede comprender BclB de longitud completa (SEQ ID NO: 8).

La secuencia de direccionamiento también puede comprender los aminoácidos 1-24 de la SEQ ID NO: 9, los aminoácidos 9-24 de la SEQ ID NO: 9 o la SEQ ID NO: 9, o la proteína de exosporio puede comprender BAS1882 de longitud completa (SEQ ID NO: 10). También puede usarse como secuencia de direccionamiento un resto metionina unido a los aminoácidos 9-24 de BAS1882. Por lo tanto, la secuencia de direccionamiento puede comprender la SEQ ID NO: 69.

La secuencia de direccionamiento también puede comprender los aminoácidos 1-33 de la SEQ ID NO: 11, los aminoácidos 18-33 de la SEQ ID NO: 11 o la SEQ ID NO: 11, o la proteína de exosporio puede comprender el producto del gen 2280 de *B. weihenstephanensis* KBAB4 de longitud completa (SEQ ID NO: 12). También puede usarse como secuencia de direccionamiento un resto metionina unido a los aminoácidos 18-33 del producto del gen 2280 de *B. weihenstephanensis* KBAB4. Por lo tanto, la secuencia de direccionamiento puede comprender la SEQ ID NO: 62.

La secuencia de direccionamiento también puede comprender los aminoácidos 1-33 de la SEQ ID NO: 13, los aminoácidos 18-33 de la SEQ ID NO: 13 o la SEQ ID NO: 13, o la proteína de exosporio puede comprender el producto del gen 3572 de *B. weihenstephanensis* KBAB4 de longitud completa (SEQ ID NO: 14). También puede usarse como secuencia de direccionamiento un resto metionina unido a los aminoácidos 18-33 del producto del gen 3572 de *B. weihenstephanensis* KBAB4. Por lo tanto, la secuencia de direccionamiento puede comprender la SEQ ID NO: 63.

Como alternativa, la secuencia de direccionamiento puede comprender los aminoácidos 1-43 de la SEQ ID NO: 15, los aminoácidos 28-43 de la SEQ ID NO: 15 o la SEQ ID NO: 15, o la proteína de exosporio puede comprender el péptido líder de exosporio de *B. cereus* VD200 de longitud completa (SEQ ID NO: 16).

La secuencia de direccionamiento también puede comprender los aminoácidos 1-27 de la SEQ ID NO: 17, los aminoácidos 12-27 de la SEQ ID NO: 17 o la SEQ ID NO: 17, o la proteína de exosporio puede comprender el péptido líder de exosporio de *B. cereus* VD166 de longitud completa (SEQ ID NO: 18). También puede usarse como secuencia de direccionamiento un resto metionina unido a los aminoácidos 12-27 del péptido líder de exosporio de *B. cereus*

VD166. Por lo tanto, la secuencia de direccionamiento puede comprender la SEQ ID NO: 64.

La secuencia de direccionamiento también puede comprender los aminoácidos 1-33 de la SEQ ID NO: 19, los aminoácidos 18-33 de la SEQ ID NO: 19 o la SEQ ID NO: 19, o la proteína de exosporio puede comprender la proteína hipotética IKG_04663 de *B. cereus* VD200 de longitud completa (SEQ ID NO: 20).

Como alternativa, la secuencia de direccionamiento comprende los aminoácidos 1-33 de la SEQ ID NO: 21, los aminoácidos 18-33 de la SEQ ID NO: 21 o la SEQ ID NO: 21, o la proteína de exosporio puede comprender la proteína propulsor β YVTN de *B. weihenstephanensis* KBAB4 de longitud completa (SEQ ID NO: 22). También puede usarse como secuencia de direccionamiento un resto metionina unido a los aminoácidos 18-33 de la proteína propulsor β YVTN de *B. weihenstephanensis* KBAB4. Por lo tanto, la secuencia de direccionamiento puede comprender la SEQ ID NO: 65.

La secuencia de direccionamiento también puede comprender los aminoácidos 1-24 de la SEQ ID NO: 23, los aminoácidos 9-24 de la SEQ ID NO: 23 o la SEQ ID NO: 23, o la proteína de exosporio puede comprender la proteína hipotética bcerkbab4_2363 de *B. weihenstephanensis* KBAB4 de longitud completa (SEQ ID NO: 24). También puede usarse como secuencia de direccionamiento un resto metionina unido a los aminoácidos 9-24 de la proteína hipotética bcerkbab4_2363 de *B. weihenstephanensis* KBAB4. Por lo tanto, la secuencia de direccionamiento puede comprender la SEQ ID NO: 66.

La secuencia de direccionamiento comprende los aminoácidos 1-24 de la SEQ ID NO: 25, los aminoácidos 9-24 de la SEQ ID NO: 25 o la SEQ ID NO: 25, o la proteína de exosporio puede comprender la proteína hipotética bcerkbab4_2131 de *B. weihenstephanensis* KBAB4 de longitud completa (SEQ ID NO: 26). También puede usarse como secuencia de direccionamiento un resto metionina unido a los aminoácidos 9-24 de la proteína hipotética bcerkbab4_2131 de *B. weihenstephanensis* KBAB4. Por lo tanto, la secuencia de direccionamiento puede comprender la SEQ ID NO: 67.

Como alternativa, la secuencia de direccionamiento comprende los aminoácidos 1-30 de la SEQ ID NO: 27, los aminoácidos 15-30 de la SEQ ID NO: 27 o SEQ ID NO: 27, o la proteína de exosporio puede comprender la repetición de triple hélice que contiene colágeno de *B. weihenstephanensis* KBAB4 de longitud completa (SEQ ID NO: 28).

La secuencia de direccionamiento también puede comprender los aminoácidos 1-33 de la SEQ ID NO: 29, los aminoácidos 18-33 de la SEQ ID NO: 29 o la SEQ ID NO: 29, o la proteína de exosporio puede comprender la proteína hipotética bmyc0001_21660 de *B. mycoides* 2048 de longitud completa (SEQ ID NO: 30).

La secuencia de direccionamiento también puede comprender los aminoácidos 1-24 de la SEQ ID NO: 31, los aminoácidos 9-24 de la SEQ ID NO: 31 o la SEQ ID NO: 31, o la proteína de exosporio puede comprender la proteína hipotética bmyc0001_22540 de *B. mycoides* 2048 de longitud completa (SEQ ID NO: 32). También puede usarse como secuencia de direccionamiento un resto metionina unido a los aminoácidos 9-24 de la proteína hipotética bmyc0001_22540 de *B. mycoides* 2048. Por lo tanto, la secuencia de direccionamiento puede comprender la SEQ ID NO: 68.

Como alternativa, la secuencia de direccionamiento comprende los aminoácidos 1-15 de la SEQ ID NO: 33, la SEQ ID NO: 33, o la proteína de exosporio comprende la proteína hipotética bmyc0001_21510 de *B. mycoides* 2048 de longitud completa (SEQ ID NO: 34).

La secuencia de direccionamiento también puede comprender los aminoácidos 1-16 de la SEQ ID NO: 35, la SEQ ID NO: 35, o la proteína de exosporio puede comprender la proteína de repetición de triple hélice de colágeno de *B. thuringiensis* 35646 de longitud completa (SEQ ID NO: 36).

La secuencia de direccionamiento puede comprender los aminoácidos 1-29 de la SEQ ID NO: 43, los aminoácidos 14-29 de la SEQ ID NO: 43 o la SEQ ID NO: 43, o la proteína de exosporio puede comprender la proteína hipotética WP_69652 de *B. cereus* de longitud completa (SEQ ID NO: 44).

Como alternativa, la secuencia de direccionamiento puede comprender los aminoácidos 1-35 de la SEQ ID NO: 45, los aminoácidos 20-35 de la SEQ ID NO: 45 o la SEQ ID NO: 45, o la proteína de exosporio puede comprender el líder de exosporio WP016117717 de *B. cereus* de longitud completa (SEQ ID NO: 46). También puede usarse como secuencia de direccionamiento un resto metionina unido a los aminoácidos 20-35 del líder de exosporio WP016117717 de *B. cereus*. Por lo tanto, la secuencia de direccionamiento puede comprender la SEQ ID NO: 70.

La secuencia de direccionamiento puede comprender los aminoácidos 1-43 de la SEQ ID NO: 47, los aminoácidos 28-43 de la SEQ ID NO: 47 o la SEQ ID NO: 47, o la proteína de exosporio puede comprender el péptido de exosporio WP002105192 de *B. cereus* de longitud completa (SEQ ID NO: 48).

La secuencia de direccionamiento puede comprender los aminoácidos 1-32 de la SEQ ID NO: 49, los aminoácidos 17-32 de la SEQ ID NO: 49 o la SEQ ID NO: 49, o la proteína de exosporio puede comprender la proteína hipotética

WP87353 de *B. cereus* de longitud completa (SEQ ID NO: 50).

Como alternativa, la secuencia de direccionamiento puede comprender los aminoácidos 1-33 de la SEQ ID NO: 51, los aminoácidos 18-33 de la SEQ ID NO: 51 o la SEQ ID NO: 51, o la proteína de exosporio puede comprender el péptido de exosporio 02112369 de *B. cereus* de longitud completa (SEQ ID NO: 52).

La secuencia de direccionamiento puede comprender los aminoácidos 1-33 de la SEQ ID NO: 53, los aminoácidos 18-33 de la SEQ ID NO: 53 o la SEQ ID NO: 53, o la proteína de exosporio puede comprender la proteína de exosporio WP016099770 de *B. cereus* de longitud completa (SEQ ID NO: 54).

Como alternativa, la secuencia de direccionamiento puede comprender los aminoácidos 1-30 de la SEQ ID NO: 55, los aminoácidos 15-30 de la SEQ ID NO: 55 o la SEQ ID NO: 55, o la proteína de exosporio puede comprender la proteína hipotética YP006612525 de *B. thuringiensis* de longitud completa (SEQ ID NO: 56).

La secuencia de direccionamiento también puede comprender los aminoácidos 1-130 de la SEQ ID NO: 57, los aminoácidos 115-130 de la SEQ ID NO: 57 o la SEQ ID NO: 57, o la proteína de exosporio puede comprender la proteína hipotética TIGR03720 de *B. mycoides* de longitud completa (SEQ ID NO: 58).

Además, puede observarse fácilmente en la alineación de secuencias de la Figura 1 que, aunque los aminoácidos 20-35 de BclA están conservados y los aminoácidos 25-35 están más conservados, puede ocurrir cierto grado de variación en esta región sin afectar a la capacidad de la secuencia de direccionamiento para dirigir una proteína al exosporio. La Figura 1 enumera el porcentaje de identidad de cada uno de los aminoácidos correspondientes de cada secuencia con los aminoácidos 20-35 de BclA ("20-35 % de identidad") y con los aminoácidos 25-35 de BclA ("25-35 % de identidad"). Por lo tanto, por ejemplo, en comparación con los aminoácidos 20-35 de BclA, los aminoácidos correspondientes de BetA/BAS3290 son aproximadamente un 81,3 % idénticos, los aminoácidos correspondientes de BAS4623 son aproximadamente un 50,0 % idénticos, los aminoácidos correspondientes de BclB son aproximadamente un 43,8 % idénticos, los aminoácidos correspondientes de BAS1882 son aproximadamente un 62,5 % idénticos, los aminoácidos correspondientes del producto del gen 2280 de KBAB4 son aproximadamente un 81,3 % idénticos y los aminoácidos correspondientes del producto del gen 3572 de KBAB4 son aproximadamente un 81,3 % idénticos. Las identidades de secuencia en esta región para las secuencias restantes se enumeran en la Figura 1.

Con respecto a los aminoácidos 25-35 de BclA, los aminoácidos correspondientes de BetA/BAS3290 son aproximadamente un 90,9 % idénticos, los aminoácidos correspondientes de BAS4623 son aproximadamente un 72,7 % idénticos, los aminoácidos correspondientes de BclB son aproximadamente un 54,5 % idénticos, los aminoácidos correspondientes de BAS1882 son aproximadamente un 72,7 % idénticos, los aminoácidos correspondientes del producto del gen 2280 de KBAB4 son aproximadamente un 90,9 % idénticos y los aminoácidos correspondientes del producto del gen 3572 de KBAB4 son aproximadamente un 81,8 % idénticos. Las identidades de secuencia en esta región para las secuencias restantes se enumeran en la Figura 1.

Por lo tanto, la secuencia de direccionamiento puede comprender una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente un 43 % de identidad con los aminoácidos 20-35 de la SEQ ID NO: 1, en donde la identidad con los aminoácidos 25-35 es de al menos aproximadamente el 54 %. Como alternativa, la secuencia de direccionamiento consiste en una secuencia de aminoácidos que consiste en 16 aminoácidos y que tiene al menos aproximadamente un 43 % de identidad con los aminoácidos 20-35 de la SEQ ID NO: 1, en donde la identidad con los aminoácidos 25-35 es de al menos aproximadamente el 54 %.

La secuencia de direccionamiento también puede comprender una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente un 50 % de identidad con los aminoácidos 20-35 de la SEQ ID NO: 1, en donde la identidad con los aminoácidos 25-35 es de al menos aproximadamente el 63%. Como alternativa, la secuencia de direccionamiento consiste en una secuencia de aminoácidos que consiste en 16 aminoácidos y que tiene al menos aproximadamente un 50% de identidad con los aminoácidos 20-35 de la SEQ ID NO: 1, en donde la identidad con los aminoácidos 25-35 es de al menos aproximadamente el 63%.

La secuencia de direccionamiento también puede comprender una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente un 50 % de identidad con los aminoácidos 20-35 de la SEQ ID NO: 1, en donde la identidad con los aminoácidos 25-35 es de al menos aproximadamente el 72%. Como alternativa, la secuencia de direccionamiento consiste en una secuencia de aminoácidos que consiste en 16 aminoácidos y que tiene al menos aproximadamente un 50% de identidad con los aminoácidos 20-35 de la SEQ ID NO: 1, en donde la identidad con los aminoácidos 25-35 es de al menos aproximadamente el 72%.

La secuencia de direccionamiento también puede comprender una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente un 56% de identidad con los aminoácidos 20-35 de la SEQ ID NO: 1, en donde la identidad con los aminoácidos 25-35 es de al menos aproximadamente el 63%. Como alternativa, la secuencia de direccionamiento consiste en una secuencia de aminoácidos que consiste en 16 aminoácidos y que tiene al menos aproximadamente un 56% de identidad con los aminoácidos 20-35 de la SEQ ID NO: 1, en donde la identidad con los aminoácidos 25-

35 es de al menos aproximadamente el 63%.

Como alternativa, la secuencia de direccionamiento puede comprender una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente un 62 % de identidad con los aminoácidos 20-35 de la SEQ ID NO: 1, en donde la identidad con los aminoácidos 25-35 es de al menos aproximadamente el 72%. La secuencia de direccionamiento también puede consistir en una secuencia de aminoácidos que consiste en 16 aminoácidos y que tiene al menos aproximadamente un 62 % de identidad con los aminoácidos 20-35 de la SEQ ID NO: 1, en donde la identidad con los aminoácidos 25-35 de la SEQ ID NO: 1 es de al menos aproximadamente el 72 %.

La secuencia de direccionamiento puede comprender una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 68 % de identidad con los aminoácidos 20-35 de la SEQ ID NO: 1, en donde la identidad con los aminoácidos 25-35 es de al menos aproximadamente el 81%. Como alternativa, la secuencia de direccionamiento consiste en una secuencia de aminoácidos que consiste en 16 aminoácidos y que tiene al menos un 68 % de identidad con los aminoácidos 20-35 de la SEQ ID NO: 1, en donde la identidad con los aminoácidos 25-35 es de al menos aproximadamente el 81%.

La secuencia de direccionamiento también puede comprender una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente un 75 % de identidad con los aminoácidos 20-35 de la SEQ ID NO: 1, en donde la identidad con los aminoácidos 25-35 es de al menos aproximadamente el 72%. Como alternativa, la secuencia de direccionamiento consiste en una secuencia de aminoácidos que consiste en 16 aminoácidos y que tiene al menos aproximadamente un 75% de identidad con los aminoácidos 20-35 de la SEQ ID NO: 1, en donde la identidad con los aminoácidos 25-35 de la SEQ ID NO: 1 es de al menos aproximadamente el 72 %.

La secuencia de direccionamiento también puede comprender una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente un 75 % de identidad con los aminoácidos 20-35 de la SEQ ID NO: 1, en donde la identidad con los aminoácidos 25-35 es de al menos aproximadamente el 81%. Como alternativa, la secuencia de direccionamiento consiste en una secuencia de aminoácidos que consiste en 16 aminoácidos y que tiene al menos aproximadamente un 75% de identidad con los aminoácidos 20-35 de la SEQ ID NO: 1, en donde la identidad con los aminoácidos 25-35 de la SEQ ID NO: 1 es de al menos aproximadamente el 81%.

La secuencia de direccionamiento también puede comprender una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente un 81% de identidad con los aminoácidos 20-35 de la SEQ ID NO: 1, en donde la identidad con los aminoácidos 25-35 es de al menos aproximadamente el 81%. Como alternativa, la secuencia de direccionamiento consiste en una secuencia de aminoácidos que consiste en 16 aminoácidos y que tiene al menos aproximadamente un 81% de identidad con los aminoácidos 20-35 de la SEQ ID NO: 1, en donde la identidad con los aminoácidos 25-35 es de al menos aproximadamente el 81%.

La secuencia de direccionamiento puede comprender una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente un 81 % de identidad con los aminoácidos 20-35 de la SEQ ID NO: 1, en donde la identidad con los aminoácidos 25-35 es de al menos aproximadamente el 90%. Como alternativa, la secuencia de direccionamiento consiste en una secuencia de aminoácidos que consiste en 16 aminoácidos y que tiene al menos aproximadamente un 81% de identidad con los aminoácidos 20-35 de la SEQ ID NO: 1, en donde la identidad con los aminoácidos 25-35 es de al menos aproximadamente el 90%.

El experto reconocerá que también pueden usarse variantes de las secuencias anteriores como secuencias de direccionamiento, siempre que la secuencia de direccionamiento comprenda los aminoácidos 20-35 de BclA, los aminoácidos correspondientes de BetA/BAS3290, BAS4263, bclb, BAS1882, el producto del gen 2280 de KBAB4 o el producto del gen 3572 de KBAB, o haya presente una secuencia que comprenda cualquiera de las identidades de secuencia indicadas anteriormente para los aminoácidos 20-35 y 25-35 de BclA.

Se ha descubierto además que determinadas proteínas de exosporio de bacterias *Bacillus* que carecen de regiones que tienen homología con los aminoácidos 25-35 de BclA también pueden usarse para dirigir un péptido o proteína al exosporio de una bacteria *Bacillus*. En particular, las proteínas de fusión pueden comprender una proteína de exosporio que comprende la SEQ ID NO: 71 (InhA de *B. mycoides*), una proteína de exosporio que comprende la SEQ ID NO: 72 (BAS1141 de *B. anthracis* Sterne (ExsY)), una proteína de exosporio que comprende la SEQ ID NO: 73 (BAS1144 de *B. anthracis* Sterne (BxpB/ExsFA)), una proteína de exosporio que comprende la SEQ ID NO: 74 (BAS 1145 de *B. anthracis* Sterne (CotY)), una proteína de exosporio que comprende la SEQ ID NO: 75 (BAS1140 de *B. anthracis* Sterne), una proteína de exosporio que comprende la SEQ ID NO: 76 (ExsFB de *B. anthracis* H9401), una proteína de exosporio que comprende la SEQ ID NO: 77 (InhA1 de *B. thuringiensis* HD74), una proteína de exosporio que comprende la SEQ ID NO: 78 (ExsJ de *B. cereus* ATCC 10876), una proteína de exosporio que comprende la SEQ ID NO: 79 (ExsH de *B. cereus*), una proteína de exosporio que comprende la SEQ ID NO: 80 (YjcA de *B. anthracis* Ames), una proteína de exosporio que comprende la SEQ ID NO: 81 (YjcB de *B. anthracis*), una proteína de exosporio que comprende la SEQ ID NO: 82 (BclC de *B. anthracis* Sterne), una proteína de exosporio que comprende la SEQ ID NO: 83 (fosfatasa ácida de *Bacillus thuringiensis* serovar konkukian cepa 97-27) o una proteína de exosporio que comprende la SEQ ID NO: 84 (InhA2 de *B. thuringiensis* HD74). La inclusión de una proteína de exosporio que comprende la SEQ ID NO: 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83 u 84 en las proteínas de fusión descritas en el presente documento dará como resultado el direccionamiento al exosporio de una bacteria *Bacillus*.

Además, también pueden usarse proteínas de exosporio que tengan un alto grado de identidad de secuencia con cualquiera de las proteínas de exosporio de longitud completa o los fragmentos de proteínas de exosporio descritos anteriormente para dirigir un péptido o proteína al exosporio de una bacteria *Bacillus*. Por lo tanto, la proteína de fusión puede comprender una proteína de exosporio que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 85 % de identidad con una cualquiera de las SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 59, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83 y 84. Como alternativa, la proteína de fusión puede comprender una proteína de exosporio que tiene al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 % de identidad con una cualquiera de las SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 59, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83 y 84.

Como alternativa, la proteína de fusión puede comprender un fragmento de proteína de exosporio que consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 85 % de identidad con la SEQ ID NO: 59. Como alternativa, la proteína de fusión puede comprender un fragmento de proteína de exosporio que consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 % de identidad con la SEQ ID NO: 59.

En cualquiera de las secuencias de direccionamiento, las proteínas de exosporio o los fragmentos de proteínas de exosporio descritos en el presente documento, la secuencia de direccionamiento, proteína de exosporio o fragmento de proteína de exosporio puede comprender la secuencia de aminoácidos GXT en su extremo carboxi, en donde X es cualquier aminoácido.

En cualquiera de las secuencias de direccionamiento, proteínas de exosporio y fragmentos de proteínas de exosporio descritos en el presente documento, la secuencia de direccionamiento, proteína de exosporio o fragmento de proteína de exosporio, puede comprender un resto alanina en la posición de la secuencia de direccionamiento que corresponde al aminoácido 20 de la SEQ ID NO: 1.

Proteínas de fusión

Se divulgan proteínas de fusión que comprenden una secuencia de direccionamiento, una proteína de exosporio o un fragmento de proteína de exosporio, y al menos una proteína o péptido estimulante del crecimiento vegetal, en donde la proteína o péptido estimulante del crecimiento vegetal comprende una hormona peptídica, un péptido no hormonal o una enzima implicada en la producción o activación de un compuesto estimulante del crecimiento vegetal, y son expresadas por la bacteria *Bacillus* utilizada en el método de la invención.

También se divulgan proteínas de fusión que comprenden una secuencia de direccionamiento, una proteína de exosporio o un fragmento de proteína de exosporio, y al menos una proteína o péptido que potencia la resistencia al estrés en una planta. La secuencia de direccionamiento, proteína de exosporio o fragmento de proteína de exosporio puede ser cualquiera de las secuencias de direccionamiento, proteínas de exosporio o fragmentos de proteínas de exosporio descritos anteriormente en el párrafo [0005]0.

También se divulgan proteínas de fusión que comprenden una secuencia de direccionamiento, una proteína de exosporio, o un fragmento de proteína de exosporio, y al menos una proteína o péptido de unión a plantas. La secuencia de direccionamiento, proteína de exosporio o fragmento de proteína de exosporio puede ser cualquiera de las secuencias de direccionamiento, proteínas de exosporio o fragmentos de proteínas de exosporio descritos anteriormente en el párrafo [0006].

También se divulgan proteínas de fusión que comprenden una secuencia de direccionamiento, una proteína de exosporio, o un fragmento de proteína de exosporio, y al menos una proteína o péptido que protege una planta frente a un patógeno. La secuencia de direccionamiento, proteína de exosporio o fragmento de proteína de exosporio puede ser cualquiera de las secuencias de direccionamiento, proteínas de exosporio o fragmentos de proteínas de exosporio descritos anteriormente en el párrafo [0006].

Se divulgan proteínas de fusión que comprenden una secuencia de direccionamiento, una proteína de exosporio, o un fragmento de proteína de exosporio, y al menos una proteína o péptido que protege una planta frente a un patógeno. La proteína o péptido que protege una planta frente a un patógeno comprende una harpina, una α -elastina, una β -elastina, una sistemina, una fenilalanina amoniaco-liasas, una elicitina, una defensina, una criptogeína, una proteína flagelina, un péptido de flagelina, una bacteriocina, una lisozima, un péptido de lisozima, un sideróforo, un péptido activo no ribosómico, una conalbúmina, una albúmina, una lactoferrina, un péptido de lactoferrina, TasA. Como alternativa, la proteína o péptido que protege una planta frente a un patógeno tiene actividad insecticida, actividad helminticida, suprime la depredación de insectos o gusanos, o una combinación de los mismos. Como alternativa, la proteína que protege una planta frente a un patógeno comprende una enzima. La secuencia de direccionamiento, proteína de exosporio o fragmento de proteína de exosporio puede ser cualquiera de las secuencias de direccionamiento, proteínas de exosporio o fragmentos de proteínas de exosporio descritos anteriormente en el párrafo [0006].

La proteína de fusión puede prepararse usando métodos de clonación y biología molecular convencionales conocidos en la técnica. Por ejemplo, un gen que codifica una proteína o péptido (por ejemplo, un gen que codifica una proteína o péptido que estimula el crecimiento vegetal) puede amplificarse mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y ligarse al ADN que codifica cualquiera de las secuencias de direccionamiento descritas anteriormente para formar una molécula de ADN que codifica la proteína de fusión. La molécula de ADN que codifica la proteína de fusión puede clonarse en cualquier vector adecuado, por ejemplo, un vector plasmídico. El vector comprende adecuadamente un sitio de clonación múltiple en el que puede insertarse fácilmente la molécula de ADN que codifica la proteína de fusión. El vector también contiene adecuadamente un marcador seleccionable, tal como un gen de resistencia a antibióticos, de manera que las bacterias transformadas, transfectadas o apareadas con el vector puedan identificarse y aislarse fácilmente. Cuando el vector es un plásmido, el plásmido también comprende adecuadamente un origen de replicación. El ADN que codifica la proteína de fusión está adecuadamente bajo el control de un promotor de esporulación que provocará la expresión de la proteína de fusión en el exosporio de una endospora de bacteria *Bacillus* (por ejemplo, un promotor *bclA* nativo de una bacteria *Bacillus*). Como alternativa, el ADN que codifica la proteína de fusión puede integrarse en el ADN cromosómico del hospedador bacteria *Bacillus*.

La proteína de fusión también puede comprender secuencias polipeptídicas adicionales que no forman parte de la secuencia de direccionamiento, proteína de exosporio, fragmento de proteína de exosporio o la proteína o péptido que estimula el crecimiento vegetal, la proteína o péptido que protege una planta frente a un patógeno, la proteína o péptido que potencia la resistencia al estrés en una planta o la proteína o péptido de unión a plantas. Por ejemplo, la proteína de fusión puede incluir etiquetas o marcadores para facilitar la purificación o visualización de la proteína de fusión (por ejemplo, un marcador de polihistidina o una proteína fluorescente tal como GFP o YFP) o la visualización de proteínas esporas de bacteria *Bacillus* recombinante que expresan la proteína de fusión.

La expresión de proteínas de fusión en el exosporio usando las secuencias de direccionamiento, proteínas de exosporio y fragmentos de proteínas de exosporio descritos en el presente documento, se potencia debido a una falta de estructura secundaria en los extremos amino de estas secuencias, lo que permite el plegamiento nativo de las proteínas fusionadas y la retención de la actividad. El plegamiento adecuado puede potenciarse adicionalmente mediante la inclusión de un enlazador de aminoácidos corto entre la secuencia de direccionamiento, proteína de exosporio, fragmento de proteína de exosporio y la proteína compañera de fusión.

Por lo tanto, cualquiera de las proteínas de fusión descritas en el presente documento puede comprender un enlazador de aminoácidos entre la secuencia de direccionamiento, la proteína de exosporio o el fragmento de proteína de exosporio y la proteína o péptido estimulante del crecimiento vegetal, la proteína o péptido que protege una planta frente a un patógeno, la proteína o péptido que potencia la resistencia al estrés en una planta o la proteína o péptido de unión a plantas.

El enlazador puede comprender un enlazador de polialanina o un enlazador de poliglicina. También puede usarse un enlazador que comprende una mezcla de restos tanto alanina como glicina. Por ejemplo, cuando la secuencia de direccionamiento comprende la SEQ ID NO: 1, una proteína de fusión puede tener una de las siguientes estructuras:

Sin enlazador: SEQ ID NO: 1 - Proteína compañera de fusión

Enlazador de alanina: SEQ ID NO: 1-A_n-Proteína compañera de fusión

Enlazador de glicina: SEQ ID NO: 1-G_n-Proteína compañera de fusión

Enlazador mixto de alanina y glicina: SEQ ID NO: 1 - (A/G)_n - Proteína compañera de fusión

donde A_n, G_n y (A/G)_n son cualquier número de alaninas, cualquier número de glicinas o cualquier número de una mezcla de alaninas y glicinas, respectivamente. Por ejemplo, n puede ser de 1 a 25, y es preferentemente de 6 a 10. Cuando el enlazador comprende una mezcla de restos alanina y glicina, puede usarse cualquier combinación de restos glicina y alanina. En las estructuras anteriores, "Proteína compañera de fusión" representa la proteína o péptido que estimula el crecimiento vegetal, la proteína o péptido que protege una planta frente a un patógeno, la proteína o péptido que potencia la resistencia al estrés en una planta o la proteína o péptido de unión a plantas.

Como alternativa, o además, el enlazador puede comprender un sitio de reconocimiento de proteasa. La inclusión de un sitio de reconocimiento de proteasa permite una eliminación dirigida, tras la exposición a una proteasa que reconoce el sitio de reconocimiento de proteasa, de la proteína o péptido estimulante del crecimiento vegetal, la proteína o péptido que protege una planta frente a un patógeno, la proteína o péptido que potencia la resistencia al estrés en una planta o la proteína o péptido de unión a plantas.

Proteínas y péptidos estimulantes del crecimiento vegetal

Como se ha señalado anteriormente, la presente invención se refiere a métodos que utilizan una bacteria *Bacillus* que expresa una proteína de fusión que comprende una secuencia de direccionamiento, proteína de exosporio o fragmento de proteína de exosporio y al menos una proteína o péptido estimulante del crecimiento vegetal, en donde la proteína o péptido estimulante del crecimiento vegetal comprende una hormona peptídica, un péptido no hormonal o una enzima implicada en la producción o activación de un compuesto estimulante del crecimiento vegetal.

Por ejemplo, cuando la proteína o péptido estimulante del crecimiento vegetal comprende una hormona peptídica, la hormona peptídica comprende una fitosulfocina (por ejemplo, fitosulfocina- α), clavata 3 (CLV3) o sistemina.

- 5 Cuando la proteína o péptido estimulante del crecimiento vegetal comprende un péptido no hormonal, el péptido no hormonal comprende un péptido eNOD40, RHPP, POLARIS o inhibidor de tripsina de Kunitz (KTI).

La proteína o péptido estimulante del crecimiento vegetal puede comprender una enzima implicada en la producción o activación de un compuesto estimulante del crecimiento vegetal. En algunas divulgaciones la enzima implicada en la producción o activación de un compuesto estimulante del crecimiento vegetal puede ser cualquier enzima que catalice cualquier etapa en una vía de síntesis biológica para un compuesto que estimule el crecimiento vegetal o altere la estructura vegetal, o cualquier enzima que catalice la conversión de un derivado inactivo o menos activo de un compuesto que estimula el crecimiento vegetal o altera la estructura vegetal en una forma activa o más activa del compuesto. En la invención, la enzima implicada en la producción o activación de un compuesto estimulante del crecimiento vegetal comprende una aminotransferasa, una amina oxidasa, una peptidasa, una proteasa, una adenosina fosfato isopenteniltransferasa, una fosfatasa, una quitosanasa, una quitinasa, una β -1,3-glucanasa, una β -1,4-glucanasa, una β -1,6-glucanasa o una desaminasa del ácido aminociclopropano-1-carboxílico; o una enzima que degrada o modifica una fuente de nutrientes bacteriana, fúngica o vegetal, en donde la enzima que degrada o modifica una fuente de nutrientes bacteriana, fúngica o vegetal comprende una celulasa, una lipasa, una lignina oxidasa, una proteasa, una glucósido hidrolasa, una fosfatasa, una nucleasa, una amidasa, una nitrato reductasa, una nitrito reductasa, una amilasa, una ligninasa, una glucosidasa, una fosfolipasa, una fitasa, una pectinasa, una glucanasa, una sulfatasa, una ureasa o una xilanas.

- 25 El compuesto estimulante del crecimiento vegetal puede comprender un compuesto producido por bacterias u hongos en la rizosfera, por ejemplo, 2,3-butanodiol.

Como alternativa, el compuesto estimulante del crecimiento vegetal puede comprender una hormona del crecimiento vegetal, por ejemplo, una citocinina o un derivado de citocinina, etileno, una auxina o un derivado de auxina, un ácido giberélico o un derivado del ácido giberélico, ácido abscísico o un derivado del ácido abscísico, o un ácido jasmónico o un derivado del ácido jasmónico.

35 Cuando el compuesto estimulante del crecimiento vegetal comprende una citocinina o un derivado de citocinina, la citocinina o el derivado de citocinina pueden comprender cinetina, cis-zeatina, transzeatina, 6-bencilaminopurina, dihidrozeatina, N6-(D2-isopentenil) adenina, ribosilzeatina, N6-(D2-isopentenil)adenosina, 2-metil-tio-cis-ribosilzeatina, cis-ribosilzeatina, trans-ribosilzeatina, 2-metil-tio-trans-ribosilzeatina, ribosilzeatin-5-monofosfato, N6-metilaminopurina, N6-dimetilaminopurina, ribósido de 2'-desoxizetina, 4-hidroxi-3-metil-trans-2-butenilaminopurina, ortotopolina, metatopolina, benciladenina, orto-metiltopolina, meta-metiltopolina o una combinación de los mismos.

40 Cuando el compuesto estimulante del crecimiento vegetal comprende una auxina o un derivado de auxina, la auxina o el derivado de auxina puede comprender una auxina activa, una auxina inactiva, una auxina conjugada, una auxina de origen natural o una auxina sintética, o una combinación de las mismas. Por ejemplo, la auxina o el derivado de auxina puede comprender ácido indol-3-acético, ácido indol-3-pirúvico, indol-3-acetaldoxima, indol-3-acetamida, indol-3-acetonitrilo, indol-3-etanol, indol-3-piruvato, indol-3-acetaldoxima, ácido indol-3-butírico, un ácido fenilacético, ácido 4-cloroindol-3-acético, una auxina conjugada con glucosa o una combinación de los mismos.

45 La enzima implicada en la producción o activación de un compuesto estimulante del crecimiento vegetal puede comprender una acetoina reductasa, una indol-3-acetamida hidrolasa, una triptófano monooxigenasa, una acetolactato sintetasa, una α -acetolactato descarboxilasa, una piruvato descarboxilasa, una diacetil reductasa, una butanodiol deshidrogenasa, una aminotransferasa (por ejemplo, triptófano aminotransferasa), una triptófano descarboxilasa, una amina oxidasa, una indol-3-piruvato descarboxilasa, una indol-3-acetaldehído deshidrogenasa, una oxidasa de cadena lateral de triptófano, una nitrilo hidrolasa, una nitrilasa, una peptidasa, una proteasa, una adenosina fosfato isopenteniltransferasa, una fosfatasa, una adenosina cinasa, una adenina fosforribosiltransferasa, CYP735A, una 5'-ribonucleótido fosfohidrolasa, una adenosina nucleosidasa, una zeatina cis-trans isomerasa, una zeatina O-glucosiltransferasa, una β -glucosidasa, una cis-hidroxilasa, una CK cis-hidroxilasa, una CK N-glucosiltransferasa, una 2,5-ribonucleótido fosfohidrolasa, una adenosina nucleosidasa, una nucleósido de purina fosforilasa, una zeatina reductasa, una hidroxilamina reductasa, una 2-oxoglutarato dioxigenasa, una hidrolasa giberélica 2B/3B, una giberelina 3-oxidasa, una giberelina 20-oxidasa, una quitosinasa, una quitinasa, una β -1,3-glucanasa, una β -1,4-glucanasa, una β -1,6-glucanasa, un ácido aminociclopropano-1-carboxílico desaminasa o una enzima implicada en la producción de un factor nod (por ejemplo, nodA, nodB o nodI).

60 Cuando la enzima comprende una proteasa o peptidasa, la proteasa o peptidasa puede ser una proteasa o peptidasa que escinde proteínas, péptidos, proproteínas o preproproteínas para crear un péptido bioactivo. El péptido bioactivo puede ser cualquier péptido que ejerza una actividad biológica.

- 65 Los ejemplos de péptidos bioactivos incluyen RKN 16D 10 y RHPP.

La proteasa o peptidasa que escinde proteínas, péptidos, proproteínas o preproproteínas para crear un péptido bioactivo pueden comprender subtilisina, una proteasa ácida, una proteasa alcalina, una proteinasa, una endopeptidasa, una exopeptidasa, termolisina, papaína, pepsina, tripsina, pronasa, una carboxilasa, una serina proteasa, una ácido glutámico proteasa, una aspartato proteasa, una cisteína proteasa, una treonina proteasa o una metaloproteasa.

La proteasa o peptidasa puede escindir proteínas en una harina rica en proteínas (por ejemplo, harina de soja o extracto de levadura).

10 Proteínas y péptidos que protegen las plantas frente a patógenos

Se divulgan proteínas de fusión que comprenden una secuencia de direccionamiento, proteína de exosporio o fragmento de proteína de exosporio, y al menos una proteína o péptido que protege una planta frente a un patógeno.

La proteína o péptido que protege una planta frente a un patógeno puede comprender una proteína o péptido que estimula una respuesta inmunitaria vegetal. Por ejemplo, la proteína o péptido que estimula una respuesta inmunitaria vegetal puede comprender una proteína o péptido potenciador del sistema inmunitario vegetal. La proteína o péptido potenciador del sistema inmunitario vegetal puede ser cualquier proteína o péptido que tiene un efecto beneficioso sobre el sistema inmunitario de una planta. Las proteínas y péptidos potenciadores del sistema inmunitario vegetal adecuados incluyen harpinas, α -elastinas, β -elastinas, sisteminas, fenilalanina amoníaco-liasas, elicinas, defensinas, criptogeínas, proteínas flagelina y péptidos de flagelina (por ejemplo, flg22).

Como alternativa, la proteína o péptido que protege una planta frente a un patógeno puede ser una proteína o péptido que tiene actividad antibacteriana, actividad antifúngica o actividad tanto antibacteriana como antifúngica. Los ejemplos de dichas proteínas y péptidos incluyen bacteriocinas, lisozimas, péptidos de lisozima (por ejemplo, LysM), sideróforos, péptidos activos no ribosómicos, conalbúminas, albúminas, lactoferrinas, péptidos de lactoferrina (por ejemplo, LfcinB) y TasA.

La proteína o péptido que protege una planta frente a un patógeno también puede ser una proteína o péptido que tiene actividad insecticida, actividad helminticida, suprime la depredación de insectos o gusanos, o una combinación de los mismos. Por ejemplo, la proteína o péptido que protege una planta frente a un patógeno puede comprender una toxina bacteriana insecticida (por ejemplo, una proteína insecticida VIP), una endotoxina, una toxina Cry (por ejemplo, una toxina Cry de *Bacillus thuringiensis*), una proteína o péptido inhibidor de proteasa (por ejemplo, un inhibidor de tripsina o un inhibidor de proteasa de punta de flecha), una cisteína proteasa o una quitinasa. Cuando la toxina Cry es una toxina Cry de *Bacillus thuringiensis*, la toxina Cry puede ser una proteína Cry5B o una proteína Cry21A. Cry5B y Cry21A tienen actividad tanto insecticida como nematocida.

La proteína que protege una planta frente a un patógeno puede comprender una enzima. Las enzimas adecuadas incluyen proteasas y lactonasas. Las proteasas y lactonasas pueden ser específicas para una molécula de señalización bacteriana (por ejemplo, una molécula de señalización de lactona homoserina bacteriana).

Cuando la enzima es una lactonasa, la lactonasa puede comprender 1,4-lactonasa, 2-pirona-4,6-dicarboxilato lactonasa, 3-oxoadipato enol-lactonasa, actinomicina lactonasa, desoxilimonato anillo A-lactonasa, gluconolactonasa L-rhamnono-1,4-lactonasa, limonina-anillo-D-lactonasa, esteroide-lactonasa, triacetato-lactonasa o xilono-1,4-lactonasa.

La enzima también puede ser una enzima que sea específica de un componente celular de una bacteria u hongo. Por ejemplo, la enzima puede comprender una β -1,3-glucanasa, una β -1,4-glucanasa, una β -1,6-glucanasa, una quitosinasa, una quitinasa, una enzima similar a la quitosinasa, una liticasa, una peptidasa, una proteinasa, una proteasa (por ejemplo, una proteasa alcalina, una proteasa ácida o una proteasa neutra), una mutanolisina, una estafolisina o una lisozima.

Para cualquiera de las proteínas de fusión anteriores que comprenden una proteína o péptido que protege una planta frente a un patógeno, el patógeno puede ser un patógeno bacteriano o un patógeno fúngico. Por ejemplo, el patógeno puede comprender una proteobacteria de clase α , una proteobacteria de clase β , una proteobacteria de clase γ o una combinación de las mismas. Los patógenos bacterianos particulares incluyen *Agrobacterium tumefaciens*, *Pantoea stewartii*, *Erwinia carotovora*, *Ralstonia solanacearum*, *Pseudomonas syringae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Xanthomonas campestris* y combinaciones de los mismos.

Otros patógenos bacterianos y fúngicos incluyen *Acarosporina microspora*, *Aceria guerreronis*, *Achlya conspicua*, *Achlya klebsiana*, *Achlysiella williamsi*, *Acholeplasmataceae*, *Acidovorax avenae*, *Acremonium strictum*, *Acrocalymma medicaginis*, *Acrodontium simplex*, *Acrophialophora fusispora*, *Acrosporium tingitaninum*, *Aecidium*, *Aecidium aechmantherae*, *Aecidium amaryllidis*, *Aecidium breyniae*, *Aecidium campanulastrum*, *Aecidium cannabis*, *Aecidium cantensis*, *Aecidium caspicum*, *Aecidium foeniculi*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Albonectria rigidiuscula*, *Albugo bliti*, *Albugo candida*, *Albugo ipomoeae-panduratae*, *Albugo laibachii*, *Albugo occidentalis*, *Albugo tragopogonis*, *Alternaria*, *Alternaria alternata*, *Alternaria brassicae*, *Alternaria brassicicola*, *Alternaria carthami*, *Alternaria cinerariae*, *Alternaria*

- citri*, *Alternaria dauci*, *Alternaria dianthi*, *Alternaria dianthicola*, *Alternaria euphorbiicola*, *Alternaria helianthi*, *Alternaria helianthicola*, *Alternaria japonica*, *Alternaria leucanthemi*, *Alternaria limicola*, *Alternaria linicola*, *Alternaria mali*, *Alternaria padwickii*, *Alternaria panax*, *Alternaria radicina*, *Alternaria raphani*, *Alternaria saponariae*, *Alternaria senecionis*, *Alternaria solani*, *Alternaria tenuissima*, *Alternaria triticina*, *Alternaria zinniae*, *Amazonia*, *Amphobotrys*
 5 *ricini*, *Anguillosporella vermiformis*, *Anguina* (genus), *Anguina agrostis*, *Anguina amsinckiae*, *Anguina australis*, *Anguina balsamophila*, *Anguina funesta*, *Anguina graminis*, *Anguina spermophaga*, *Anguina tritici*, *Anisogramma*
anomala, *Anthostomella pullulans*, *Antrodia albida*, *Antrodia serialiformis*, *Antrodia serialis*, *Aphanomyces cladogamus*, *Aphanomyces cochlioides*, *Aphanomyces euteiches*, *Aphanomyces euteiches* f. sp. *pisi*, *Aphanomyces raphani*,
 10 *Aphelenchoides*, *Aphelenchoides arachidis*, *Aphelenchoides besseyi*, *Aphelenchoides fragariae*, *Aphelenchoides*
parietinus, *Aphelenchoides ritzemabosi*, *Aphelenchus avenae*, *Apiognomonia errabunda*, *Apiognomonia veneta*,
Apiospora montagnei, *Appendiculella*, *Armillaria*, *Armillaria affinis*, *Armillaria apalosclera*, *Armillaria camerunensis*,
Armillaria duplicate, *Armillaria fellea*, *Armillaria fumosa*, *Armillaria fuscipes*, *Armillaria griseomellea*, *Armillaria heimii*,
Armillaria mellea, *Armillaria melleorubens*, *Armillaria montagnei*, *Armillaria omnituens*, *Armillaria pallidula*, *Armillaria*
 15 *paulensis*, *Armillaria pelliculata*, *Armillaria procera*, *Armillaria puiggarii*, *Armillaria singular*, *Armillaria socialis*, *Armillaria*
solidipes, *Armillaria tabescens*, *Armillaria tigrensis*, *Armillaria umbrinobrunnea*, *Armillaria viridiflava*, *Armillaria*
yungensis, *Arthrocladiella*, *Arthuriomyces peckianus*, *Ascochyta asparagine*, *Ascochyta bohemica*, *Ascochyta caricae*,
Ascochyta doronici, *Ascochyta fabae* f. sp. *lentis*, *Ascochyta graminea*, *Ascochyta hordei*, *Ascochyta humuli*, *Ascochyta*
pisi, *Ascochyta prasadii*, *Ascochyta sorghi*, *Ascochyta spinaciae*, *Ascochyta tarda*, *Ascochyta tritici*, *Ascospora*
 20 *ruborum*, *Ashbya gossypii*, *Aspergillus aculeatus*, *Aspergillus fischerianus*, *Aspergillus niger*, *Asperisporium caricae*,
Asperisporium minutulum, *Asteridiella*, *Asteridiella perseae*, *Asteroma caryae*, *Asteroma coryli*, *Asteroma*
inconspicuum, *Athelia arachnoidea*, *Athelia rolfsii*, *Aurantiporus fissilis*, *Belonolaimus*, *Belonolaimus gracilis*,
 25 *Belonolaimus longicaudatus*, *Beniowskia sphaeroidea*, *Bionectria ochroleuca*, *Bipolaris*, *Bipolaris cactivora*, *Bipolaris*
cookie, *Bipolaris incurvata*, *Bipolaris sacchari*, *Biscogniauxia capnodes* var. *capnodes*, *Biscogniauxia marginata*,
Biscogniauxia nummularia, *Bjerkandera adusta*, *Blakeslea trispora*, *Blumeria graminis*, *Botryodiplodia oncidii*,
 30 *Botryodiplodia ulmicola*, *Botryosphaeria cocogena*, *Botryosphaeria corticola*, *Botryosphaeria disrupta*, *Botryosphaeria*
dothidea, *Botryosphaeria marconii*, *Botryosphaeria obtuse*, *Botryosphaeria quercuum*, *Botryosphaeria rhodina*,
Botryosphaeria ribis, *Botryosphaeria stevensii*, *Botryosporium pulchrum*, *Botryotinia*, *Botryotinia fuckeliana*, *Botrytis*
anthophila, *Botrytis cinerea*, *Botrytis fabae*, *Bremia lactucae*, *Brenneria salicis*, *Briosia ampelophaga*,
Bulbomicrosphaera, *Burkholderia andropogonis*, *Burkholderia caryophylli*, *Burkholderia glumae*, *Cadophora malorum*,
 35 *Caesporium pistaciae*, *Camarotella acrocomiae*, *Camarotella costaricensis*, *Candidatus Liberibacter*,
Capitorostrum cocoas, *Capnodium footii*, *Capnodium mangiferum*, *Capnodium ramosum*, *Capnodium theae*,
Caulimoviridae, *Cephaleuros virescens*, *Cephalosporium gramineum*, *Ceratobasidium cereal*, *Ceratobasidium*
cornigerum, *Ceratobasidium noxium*, *Ceratobasidium ramicola*, *Ceratobasidium setariae*, *Ceratobasidium stevensii*,
 40 *Ceratocystis adiposa*, *Ceratocystis coerulescens*, *Ceratocystis fimbriata*, *Ceratocystis moniliformis*, *Ceratocystis*
paradoxa, *Ceratocystis pilifera*, *Ceratocystis pluriannulata*, *Ceratorhiza hydrophila*, *Ceratosporeopsis*, *Cercoseptoria*
ocellata, *Cercospora*, *Cercospora angreci*, *Cercospora apii*, *Cercospora apii* f. sp. *clerodendri*, *Cercospora apiicola*,
Cercospora arachidicola, *Cercospora asparagi*, *Cercospora atrofiliformis*, *Cercospora beticola*, *Cercospora brachypus*,
 45 *Cercospora brassicicola*, *Cercospora brunckii*, *Cercospora cannabidis*, *Cercospora cantuariensis*, *Cercospora capsici*,
Cercospora carotae, *Cercospora corylina*, *Cercospora fragariae*, *Cercospora fuchsiae*, *Cercospora fusca*, *Cercospora*
fusimaculans, *Cercospora gerberae*, *Cercospora halstedii*, *Cercospora handelii*, *Cercospora hayi*, *Cercospora*
hydrangea, *Cercospora kikuchii*, *Cercospora lentis*, *Cercospora liquidambaris*, *Cercospora longipes*, *Cercospora*
 50 *longissima*, *Cercospora mamaonis*, *Cercospora mangiferae*, *Cercospora medicaginis*, *Cercospora melongena*,
Cercospora minima, *Cercospora minuta*, *Cercospora nicotianae*, *Cercospora odontoglossi*, *Cercospora papaya*,
 55 *Cercospora penniseti*, *Cercospora pisa-sativae*, *Cercospora platanicola*, *Cercospora puderii*, *Cercospora pulcherrima*,
Cercospora raphidicola, *Cercospora rosicola*, *Cercospora rubroincta*, *Cercospora sojae*, *Cercospora solani*,
Cercospora solani-tuberosi, *Cercospora sorghi*, *Cercospora theae*, *Cercospora tuberculans*, *Cercospora vexans*,
Cercospora vicosae, *Cercospora zeae-maydis*, *Cercospora zebrina*, *Cercospora zonata*, *Cercosporaella rubi*, *Cereal*
cyst nematode, *Ceriporia spissa*, *Ceriporia xylostromatoides*, *Cerrena unicolor*, *Ceuthospora lauri*, *Choanephora*,
 60 *Choanephora cucurbitarum*, *Choanephora infundibulifera*, *Chondrostereum purpureum*, *Chrysomyxa ledi* var.
rhododendri, *Chrysomyxa ledicola*, *Chrysomyxa piperiana*, *Chrysomyxa roanensis*, *Cladosporium*, *Cladosporium*
arthropodii, *Cladosporium caryigenum*, *Cladosporium cladosporioides*, *Cladosporium cladosporioides* f. sp. *pisicola*,
Cladosporium cucumerinum, *Cladosporium herbarum*, *Cladosporium musae*, *Cladosporium oncobae*, *Clavibacter*
 65 *michiganensis*, *Claviceps fusiformis*, *Claviceps purpurea*, *Claviceps sorghi*, *Claviceps zizaniae*, *Climacodon*
pulcherrimus, *Climacodon septentrionalis*, *Clitocybe parasitica*, *Clonostachys rosea* f. *rosea*, *Clypeoportia iliaui*,
Cochliobolus, *Cochliobolus carbonum*, *Cochliobolus cymbopogonis*, *Cochliobolus hawaiiensis*, *Cochliobolus*
heterostrophus, *Cochliobolus lunatus*, *Cochliobolus miyabeanus*, *Cochliobolus ravenelii*, *Cochliobolus sativus*,
Cochliobolus setariae, *Cochliobolus spicifer*, *Cochliobolus stenospilus*, *Cochliobolus tuberculatus*, *Cochliobolus*
victoriae, *Coleosporium helianthi*, *Coleosporium ipomoeae*, *Coleosporium madaiae*, *Coleosporium pacificum*,
 60 *Coleosporium tussilaginis*, *Colletotrichum acutatum*, *Colletotrichum arachidis*, *Colletotrichum capsici*, *Colletotrichum*
cereals, *Colletotrichum crassipes*, *Colletotrichum dematium*, *Colletotrichum dematium* f. *spinaciae*, *Colletotrichum*
derridis, *Colletotrichum destructivum*, *Colletotrichum fragariae*, *Colletotrichum gossypii*, *Colletotrichum higginsianum*,
Colletotrichum kahawae, *Colletotrichum lindemuthianum*, *Colletotrichum lini*, *Colletotrichum mangelotii*, *Colletotrichum*
 65 *musae*, *Colletotrichum nigrum*, *Colletotrichum orbiculare*, *Colletotrichum pisi*, *Colletotrichum sublineolum*,
Colletotrichum trichellum, *Colletotrichum trifolii*, *Colletotrichum truncatum*, *Coniella castaneicola*, *Coniella diploidiella*,
Coniella fragariae, *Coniothecium chomatosporum*, *Coniothyrium celtidis-australis*, *Coniothyrium henriquesii*,

- Coniothyrium rosarum*, *Coniothyrium wernsdorffiae*, *Coprinospora psychromorbida*, *Cordana johnstonii*, *Cordana musae*, *Corioloopsis floccose*, *Corioloopsis gallica*, *Corticium invisum*, *Corticium penicillatum*, *Corticium theae*, *Coryneopsis rubi*, *Corynespora cassicola*, *Coryneum rhododendri*, *Crinipellis sarmentosa*, *Cronartium ribicola*, *Cryphonectriaceae*, *Cryptocline cyclaminis*, *Cryptomeliola*, *Cryptoporus volvatus*, *Cryptosporella umbrina*,
 5 *Cryptosporiopsis tarraconensis*, *Cryptosporium minimum*, *Curvularia caricae-papayae*, *Curvularia penniseti*, *Curvularia senegalensis*, *Curvularia trifolii*, *Cylindrocarpon candidum*, *Cylindrocarpon ianthothele* var. *ianthothele*, *Cylindrocarpon magnusianum*, *Cylindrocarpon musae*, *Cylindrocladiella camelliae*, *Cylindrocladiella parva*, *Cylindrocladium clavatum*, *Cylindrocladium lanceolatum*, *Cylindrocladium peruvianum*, *Cylindrocladium pteridis*, *Cylindrosporium cannabinum*, *Cylindrosporium juglandis*, *Cylindrosporium rubi*, *Cymadothea trifolii*, *Cytospora*, *Cytospora palmarum*, *Cytospora personata*, *Cytospora platani*, *Cytospora sacchari*, *Cytospora sacculus*, *Cytospora terebinthi*, *Cytosporina ludibunda*,
 10 *Dactulophora elongata*, *Daedaleopsis confragosa*, *Dasineura urticae*, *Datronia scutellata*, *Davidiella carinthiaca*, *Davidiella dianthi*, *Davidiella tassiana*, *Deightonella papuana*, *Deightonella torulosa*, *Dendrophoma marconii*, *Dendrophoma erumpens*, *Denticularia mangiferae*, *Dermea pseudotsugae*, *Diaporthaceae*, *Diaportha*, *Diaportha arctii*, *Diaportha citri*, *Diaportha dulcamarae*, *Diaportha eres*, *Diaportha helianthi*, *Diaportha lagunensis*, *Diaportha lokoyae*,
 15 *Diaportha melonis*, *Diaportha orthoceras*, *Diaportha perniciosa*, *Diaportha phaseolorum*, *Diaportha phaseolorum* var. *caulivora*, *Diaportha phaseolorum* var. *phaseolorum*, *Diaportha phaseolorum* var. *sojae*, *Diaportha rudis*, *Diaportha tanakae*, *Diaportha toxica*, *Dibotryon morbosum*, *Dicarpella dryina*, *Didymella bryoniae*, *Didymella fabae*, *Didymella lycopersici*, *Didymosphaeria arachidicola*, *Didymosphaeria taiwanensis*, *Dilophospora alopecuri*, *Dimeriella sacchari*, *Diplocarpon earlianum*, *Diplocarpon mali*, *Diplocarpon mespili*, *Diplocarpon rosae*, *Diplodia laelio-cattleyae*, *Diplodia manihoti*, *Diplodia paraphysaria*, *Diplodia theae-sinensis*, *Discosia artocreas*, *Guignardia fulvida*, *Discostroma corticola*, *Distocercospora*, *Distocercospora livistonae*, *Ditylenchus*, *Ditylenchus africanus*, *Ditylenchus angustus*, *Ditylenchus destructor*, *Ditylenchus dipsaci*, *Dolichodorus heterocephalus*, *Dothideomycetes*, *Dothiorella aromatica*, *Dothiorella dominicana*, *Dothiorella gregaria*, *Dothiorella ulmi*, *Drechslera avenacea*, *Drechslera campanulata*, *Drechslera dematioidea*, *Drechslera gigantea*, *Drechslera glycines*, *Drechslera musae-sapientium*, *Drechslera teres* f. *maculate*, *Drechslera wirreganensis*, *Durandiella pseudotsugae*, *Eballistra lineata*, *Eballistra oryzae*, *Eballistraceae*, *Echinodontium tinctorium*, *Ectendomeliola*, *Elsinoë ampelina*, *Elsinoë australis*, *Elsinoë batatas*, *Elsinoë brasiliensis*, *Elsinoë fawcettii*, *Elsinoë leucospila*, *Elsinoë mangiferae*, *Elsinoë piri*, *Elsinoë randii*, *Elsinoë rosarum*, *Elsinoë sacchari*, *Elsinoë theae*, *Elsinoë veneta*, *Endomeliola*, *Endothia radicalis*, *Endothiella gyrosa*, *Entoleuca mammata*, *Entorrhizomycetes*, *Entyloma ageratinae*, *Entyloma dahlia*, *Entyloma ellisii*, *Epicoccum nigrum*, *Ergot*, *Erwinia*, *Erwinia chrysanthemi*, *Erwinia psidii*, *Erysiphaceae*, *Erysiphales*, *Erysiphe*, *Erysiphe alphitoides*, *Erysiphe betae*, *Erysiphe brunneopunctata*, *Erysiphe cichoracearum*, *Erysiphe cruciferarum*, *Erysiphe flexuosa*, *Erysiphe graminis* f. sp. *avenae*, *Erysiphe graminis* f. sp. *tritici*, *Erysiphe heraclei*, *Erysiphe pisi*, *Eutypella parasitica*, *Eutypella scoparia*, *Exobasidium burtii*, *Exobasidium reticulatum*, *Exobasidium vaccinii* var. *japonicum*, *Exobasidium vaccinii-uliginosi*, *Exobasidium vexans*, *Exophiala*, *Flavescence dorée*, *Fomes fasciatus*, *Fomes lamaënsis*, *Fomes meliae*, *Fomitopsis cajanderi*,
 35 *Fomitopsis palustris*, *Fomitopsis rosea*, *Fomitopsis spraguei*, *Fomitopsis supina*, *Forma specialis*, *Frommeella tormentillae*, *Fusarium*, *Fusarium affine*, *Fusarium arthrosporioides*, *Fusarium circinatum*, *Fusarium crookwellense*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium incarnatum*, *Fusarium solani*, *Fusarium merismoides*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *asparagi*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *batatas*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *betae*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *cannabis*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *citri*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *coffea*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *cyclaminis*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *lentis*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *lini*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *medicaginis*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*, *Fusarium pallidroseum*, *Fusarium proliferatum*, *Fusarium redolens*, *Fusarium sacchari*, *Fusarium solani* f. sp. *pisi*, *Fusarium sporotrichioides*, *Fusarium subglutinans*, *Fusarium sulphureum*, *Fusocoria torulosa*, *Fusicladium pisicola*, *Fusicoccum aesculi*, *Fusicoccum amygdali*, *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*, *Gaeumannomyces graminis* var. *avenae*, *Gaeumannomyces graminis* var. *graminis*, *Galactomyces candidum*, *Ganoderma brownii*, *Ganoderma lobatum*, *Ganoderma orbiforme*, *Ganoderma philippii*, *Ganoderma tornatum*, *Ganoderma zonatum*, *Geastrumia polystigmatis*, *Georgefischeriaceae*, *Georgefischeriales*, *Geosmithia morbida*, *Geotrichum*, *Geotrichum candidum*, *Geotrichum candidum* var. *citri-aurantii*, *Geotrichum klebahnii*, *Gibberella*, *Gibberella acuminata*, *Gibberella avenacea*, *Gibberella baccata*, *Gibberella cyanogena*, *Gibberella fujikuroi*, *Gibberella fujikuroi* var. *subglutinans*, *Gibberella intricans*, *Gibberella pulicaris*, *Gibberella stilboides*, *Gibberella xylarioides*, *Gibberella zeae*, *Gibellina cerealis*, *Gilbertella persicaria*, *Gjaerumiaceae*, *Gliocladium vermoeseni*, *Globodera pallida*, *Globodera rostochiensis*, *Globodera tabacum*, *Gloeocercospora sorghi*, *Gloeocystidiellum porosum*, *Gloeophyllum mexicanum*, *Gloeophyllum trabeum*, *Gloeoporus dichrous*, *Gloeosporium cattleyae*, *Gloeosporium theae-sinensis*, *Glomerella cingulate*,
 55 *Glomerella glycines*, *Glomerella graminicola*, *Glomerella tucumanensis*, *Gnomonia caryae*, *Gnomonia comari*, *Gnomonia dispersa*, *Gnomonia iliaui*, *Gnomonia leptostyla*, *Gnomonia nerviseda*, *Gnomonia rubi*, *Golovinomyces cichoracearum* var. *latisporus*, *Granulobasidium vellereum*, *Graphiola phoenicis*, *Graphium rigidum*, *Graphium rubrum*, *Graphyllum pentamerum*, *Grovesinia pyramidalis*, *Guignardia bidwellii* f. *muscadinii*, *Guignardia camelliae*, *Guignardia citricarpa*, *Guignardia mangiferae*, *Guignardia musae*, *Guignardia philoprina*, *Gummosis*, *Gymnoconia nitens*,
 60 *Gymnopus dryophilus*, *Gymnosporangium clavipes*, *Gymnosporangium sabinae*, *Gymnosporangium globosum*, *Gymnosporangium juniperi-virginianae*, *Gymnosporangium kernianum*, *Gymnosporangium nelsonii*, *Gymnosporangium yamadae*, *Haematonectria haematococca*, *Hansenula subpelliculosa*, *Hapalosphaeria deformans*, *Haplobasidium musae*, *Haustorium*, *Helicobasidium compactum*, *Helicobasidium longisporum*, *Helicobasidium purpureum*, *Helicoma muelleri*, *Helicotylenchus*, *Helicotylenchus dihystra*, *Helicotylenchus multicinctus*,
 65 *Helminthosporium cookei*, *Helminthosporium papulosum*, *Helminthosporium solani*, *Helotiales*, *Hemicriconemoides kanayaensis*, *Hemicriconemoides mangiferae*, *Hemicyclophora arenaria*, *Hemlock woolly adelgid*, *Hendersonia*

- creberrima, *Hendersonia theicola*, *Hericium coralloides*, *Heterobasidion annosum*, *Heterodera*, *Heterodera amygdali*, *Heterodera arenaria*, *Heterodera aucklandica*, *Heterodera avenae*, *Heterodera bergeniae*, *Heterodera bifenestra*, *Heterodera cacti*, *Heterodera cajani*, *Heterodera canadensis*, *Heterodera cardiolata*, *Heterodera carotae*, *Heterodera ciceri*, *Heterodera cruciferae*, *Heterodera delvii*, *Heterodera elachista*, *Heterodera filipjevi*, *Heterodera gambiensis*,
5 *Heterodera goettingiana*, *Heterodera hordecalis*, *Heterodera humuli*, *Heterodera latipons*, *Heterodera medicaginis*, *Heterodera oryzae*, *Heterodera oryzicola*, *Heterodera rosii*, *Heterodera sacchari*, *Heterodera schachtii*, *Heterodera tabacum*, *Heterodera trifolii*, *Heteroderidae*, *Hexagonia hydnoidea*, *Hirschmanniella oryzae*, *Hoplalaimus galeatus*, *Hoplalaimidae*, *Hoplalaimus columbus*, *Hoplalaimus indicus*, *Hoplalaimus magnistylus*, *Hoplalaimus pararobustus*,
10 *Hoplalaimus seinhorsti*, *Hoplalaimus uniformis*, *Huanglongbing*, *Hyaloperonospora*, *Hyaloperonospora arabidopsidis*, *Hyaloperonospora brassicae*, *Hyaloperonospora parasitica*, *Hymenula affinis*, *Hyphodermella corrugata*, *Hyphodontia aspera*, *Hyphodontia sambuci*, *Hypochnus*, *Hypoxylon tinctor*, *Idriella lunata*, *Inonotus arizonicus*, *Inonotus cuticularis*, *Inonotus dryophilus*, *Inonotus hispidus*, *Inonotus ludovicianus*, *Inonotus munzii*, *Inonotus tamaricis*, *Irenopsis*, *Irpex destruens*, *Irpex lacteus*, *Isariopsis clavispora*, *Johncouchia mangiferae*, *Kabatiella caulivora*, *Kabatiella lini*, *Karnal bunt*, *Khuskia oryzae*, *Kretzschmaria deusta*, *Kretzschmaria zonata*, *Kuehneola uredinis*, *Kuttlakesa pironii*, *Labrella coryli*, *Laeticorticium roseum*, *Laetiporus baudonii*, *Lagenocystis radicola*, *Lariciformes officinalis*, *Lasiodiplodia theobromae*, *Leandria momordicae*, *Leifsonia xyli xyli*, *Lentinus tigrinus*, *Lenzites betulina*, *Lenzites elegans*, *Lepteutypa cupressi*, *Leptodontidium elatius* var. *elatius*, *Leptographium microsporum*, *Leptosphaeria acuta*, *Leptosphaeria cannabina*, *Leptosphaeria coniothyrium*, *Leptosphaeria libanotis*, *Leptosphaeria lindquistii*, *Leptosphaeria maculans*, *Leptosphaeria musarum*, *Leptosphaeria pratensis*, *Leptosphaeria sacchari*, *Leptosphaeria woroninii*, *Leptosphaerulina crassiasca*, *Leptosphaerulina trifolii*, *Leptothyrium nervisedum*, *Leptotrochila medicaginis*,
20 *Leucocytospora leucostoma*, *Leucostoma auerswaldii*, *Leucostoma kunzei*, *Leucostoma persoonii*, *Leveillula compositarum* f. *helianthi*, *Leveillula leguminosarum* f. *lentis*, *Leveillula taurica*, *Ligniera pilorum*, *Limacina tenuis*, *Linochora graminis*, *Longidorus africanus*, *Longidorus maximus*, *Longidorus sylphus*, *Lopharia crassa*, *Lophodermium*, *Lophodermium aucupariae*, *Lophodermium schweinitzii*, *Lophodermium seditiosum*, *Macrophoma mangiferae*,
25 *Macrophoma theicola*, *Macrophomina phaseolina*, *Macrosporium cocos*, *Magnaporthe*, *Magnaporthe grisea*, *Magnaporthe salvinii*, *Mamianiella coryli*, *Marasmiellus cocophilus*, *Marasmiellus inoderma*, *Marasmiellus scandens*, *Marasmiellus stenophyllus*, *Marasmius crinis-equi*, *Marasmius sacchari*, *Marasmius semiustus*, *Marasmius stenophyllus*, *Marasmius tenuissimus*, *Massarina walkeri*, *Mauginiella scaettae*, *Melampsora*, *Melampsora lini* var. *lini*, *Melampsora medusae*, *Melampsora occidentalis*, *Melanconis carthusiana*, *Melanconium juglandinum*, *Meliola*, *Meliola mangiferae*, *Meliolaceae*, *Meloidogyne acrona*, *Meloidogyne arenaria*, *Meloidogyne artiellia*, *Meloidogyne brevicauda*, *Meloidogyne chitwoodii*, *Meloidogyne enterolobii*, *Meloidogyne fruglia*, *Meloidogyne gajuscus*, *Meloidogyne incognita*, *Meloidogyne javanica*, *Meloidogyne naasi*, *Meloidogyne partityla*, *Meloidogyne thamesi*, *Meripilus giganteus*, *Merlinius brevidens*, *Meruliopsis ambigua*, *Mesocriconea xenoplax*, *Microascus brevicaulis*, *Microbotryum violaceum*, *Microdochium bolleyi*, *Microdochium dimerum*, *Microdochium panattonianum*, *Microdochium phragmitis*,
35 *Microsphaera*, *Microsphaera coryli*, *Microsphaera diffusa*, *Microsphaera ellisii*, *Microsphaera euphorbiae*, *Microsphaera hommae*, *Microsphaera penicillata*, *Microsphaera penicillata* var. *vaccinii*, *Microsphaera vaccinii*, *Microsphaera verruculosa*, *Microstroma juglandis*, *Moesziomyces bullatus*, *Monilinia azaleae*, *Monilinia fructicola*, *Monilinia fructigena*, *Monilinia laxa*, *Monilinia mali*, *Moniliophthora perniciosa*, *Moniliophthora roreri*, *Monilochaetes infuscans*, *Monochaetia coryli*, *Monochaetia mali*, *Monographella albescens*, *Monographella cucumerina*,
40 *Monographella nivalis* var. *neglecta*, *Monographella nivalis* var. *nivalis*, *Mononegavirales*, *Monosporascus cannonballus*, *Monosporascus eutypoides*, *Monostichella coryli*, *Mucor circinelloides*, *Mucor hiemalis*, *Mucor hiemalis* f. *silvaticus*, *Mucor mucedo*, *Mucor paronychius*, *Mucor piriformis*, *Mucor racemosus*, *Mycena citricolor*, *Mycena maculate*, *Mycocentrospora acerina*, *Mycotryptodiscus terrestris*, *Mycosphaerella angulata*, *Mycosphaerella arachidis*, *Mycosphaerella areola*, *Mycosphaerella berkeleyi*, *Mycosphaerella bolleana*, *Mycosphaerella brassicicola*,
45 *Mycosphaerella caricae*, *Mycosphaerella caryigena*, *Mycosphaerella cerasella*, *Mycosphaerella citri*, *Mycosphaerella coffeicola*, *Mycosphaerella confusa*, *Mycosphaerella cruenta*, *Mycosphaerella dendroides*, *Mycosphaerella eumusae*, *Mycosphaerella fragariae*, *Mycosphaerella gossypina*, *Mycosphaerella graminicola*, *Mycosphaerella henningii*, *Mycosphaerella horii*, *Mycosphaerella juglandis*, *Mycosphaerella lageniformis*, *Mycosphaerella linicola*, *Mycosphaerella louisianae*, *Mycosphaerella musae*, *Mycosphaerella musicola*, *Mycosphaerella palmicola*,
50 *Mycosphaerella pinodes*, *Mycosphaerella pistaciarum*, *Mycosphaerella pistacina*, *Mycosphaerella platanifolia*, *Mycosphaerella polymorpha*, *Mycosphaerella pomi*, *Mycosphaerella punctiformis*, *Mycosphaerella pyri*, *Didymella rabiei*, *Mycosphaerella recutita*, *Mycosphaerella rosicola*, *Mycosphaerella rubi*, *Mycosphaerella stigminaplantani*, *Mycosphaerella striatiformans*, *Mycovellosiella concors*, *Mycovellosiella fulva*, *Mycovellosiella koepkei*, *Mycovellosiella vaginae*, *Myriogenospora aciculisporea*, *Myrothecium roridum*, *Myrothecium verrucaria*, *Nacobbis aberrans*, *Nacobbis dorsalis*, *Naevula perexigua*, *Naohidemyces vaccinii*, *Nectria*, *Nectria cinnabarina*, *Nectria coccinea*, *Nectria ditissima*, *Nectria foliicola*, *Nectria mammoidea* var. *rubi*, *Nectria mauritiicola*, *Nectria peziza*, *Nectria pseudotrichia*, *Nectria radicola*, *Nectria ramularia*, *Nectriella pironii*, *Nemania diffusa*, *Nemania serpens* var. *serpens*, *Nematosporea coryli*, *Neocosmospora vasinfecta*, *Neodeightonia phoenixum*, *Neoerysiphe*, *Neofabraea malicorticis*, *Neofabraea perennans*, *Neofusicoccum mangiferae*, *Neonectria galligena*, *Oidiopsis gossypii*, *Oidium* (genus), *Oidium arachidis*, *Oidium caricae-papayae*, *Oidium indicum*, *Oidium mangiferae*, *Oidium manihotis*, *Oidium tingitaninum*, *Olpidium brassicae*,
60 *Omphalia tralucida*, *Oncobasidium theobromae*, *Onnia tomentosa*, *Ophiobolus anguillides*, *Ophiobolus cannabinus*, *Ophioirenina*, *Ophiostoma ulmi*, *Ophiostoma wagneri*, *Ovulariopsis papayas*, *Ovulinia azaleae*, *Ovulitis azaleae*, *Oxyporus corticola*, *Oxyporus latemarginatus*, *Oxyporus populinus*, *Oxyporus similis*, *Ozonium texanum* var. *parasiticum*, *Paecilomyces fulvus*, *Paralongidorus maximus*, *Paratrachodorus christiei*, *Paratrachodorus minor*, *Paratylenchus curvatus*, *Paratylenchus elachistus*, *Paratylenchus hamatus*, *Paratylenchus macrophallus*,
65 *Paratylenchus microdorus*, *Paratylenchus projectus*, *Paratylenchus tenuicaudatus*, *Pathovar*, *Pauahia*, *Peach latent*

- mosaic viroid, *Pectobacterium carotovorum*, *Peltaster fructicola*, *Penicillium aurantiogriseum*, *Penicillium digitatum*,
Penicillium expansum, *Penicillium funiculosum*, *Penicillium glabrum*, *Penicillium italicum*, *Penicillium purpogenum*,
Penicillium ulaiense, *Peniophora*, *Peniophora albobadia*, *Peniophora cinerea*, *Peniophora quercina*, *Peniophora*
 5 *sacrata*, *Perenniporia fraxinea*, *Perenniporia fraxinophila*, *Perenniporia medulla-panis*, *Perenniporia subacida*,
Periconia circinata, *Periconiella cocoes*, *Peridermium californicum*, *Peronosclerospora miscanthi*, *Peronosclerospora*
sacchari, *Peronosclerospora sorghi*, *Peronospora*, *Peronospora anemones*, *Peronospora antirrhini*, *Peronospora*
arborescens, *Peronospora conglomerata*, *Peronospora destructor*, *Peronospora dianthi*, *Peronospora dianthicola*,
Peronosporafarinosa, *Peronospora farinosa* f. sp. *betae*, *Peronospora hyoscyami* f. sp. *tabacina*, *Peronospora*
 10 *manshurica*, *Peronospora potentillae*, *Peronospora sparsa*, *Peronospora trifoliorum*, *Peronospora valerianellae*,
Peronospora viciae, *Pestalotia concentrica*, *Pestalotia longisetula*, *Pestalotia longisetula*, *Pestalotia rhododendri*,
Pestalotiopsis, *Pestalotiopsis adusta*, *Pestalotiopsis arachidis*, *Pestalotiopsis disseminata*, *Pestalotiopsis guepini*,
Pestalotiopsis leprogena, *Pestalotiopsis longisetula*, *Pestalotiopsis mangiferae*, *Pestalotiopsis palmarum*, *Pestalotiopsis*
sydowiana, *Pestalotiopsis theae*, *Pestalotiopsis versicolor*, *Phacidiopteryx padwickii*, *Phacidium infestans*,
Phaeochoropsis mucosa, *Phaeocytostroma iliaii*, *Phaeocytostroma sacchari*, *Phaeoisariopsis bataticola*, *Phaeolus*
 15 *schweinitzii*, *Phaeoramularia angolensis*, *Phaeoramularia dissiliens*, *Phaeoramularia heterospora*, *Phaeoramularia*
manihotis, *Phaeoseptoria musae*, *Phaeosphaerella mangiferae*, *Phaeosphaerella theae*, *Phaeosphaeria avenaria* f.
sp. *avenaria*, *Phaeosphaeria avenaria* f. sp. *triticae*, *Phaeosphaeria herpotrichoides*, *Phaeosphaeria microscopica*,
Phaeosphaeria nodorum, *Phaeosphaeriopsis obtusispora*, *Phaeotrichoconis crotalariae*, *Phakopsora gossypii*,
Phakopsora pachyrhizi, *Phanerochaete allantosporea*, *Phanerochaete arizonica*, *Phanerochaete avellanea*,
 20 *Phanerochaete burtii*, *Phanerochaete carnosa*, *Phanerochaete chrysorhizon*, *Phanerochaete radicata*, *Phanerochaete*
salmonicolor, *Phanerochaete tuberculata*, *Phanerochaete velutina*, *Phellinus ferreus*, *Phellinus gilvus*, *Phellinus*
ignarius, *Phellinus pini*, *Phellinus pomaceus*, *Phellinus weirii*, *Phialophora asteris*, *Phialophora cinerescens*,
Phialophora gregata, *Phialophora tracheiphila*, *Phloeospora multimagulans*, *Pholiota variicystis*, *Phoma*, *Phoma*
caricae-papayae, *Phoma clematidina*, *Phoma costaricensis*, *Phoma cucurbitacearum*, *Phoma destructiva*, *Phoma*
 25 *draconis*, *Phoma eupyrena*, *Phoma exigua*, *Phoma exigua* var. *exigua*, *Phoma exigua* var. *foveata*, *Phoma exigua* var.
linicola, *Phoma glomerata*, *Phoma glycinicola*, *Phoma herbarum*, *Phoma insidiosa*, *Phoma medicaginis*, *Phoma*
microspora, *Phoma nebulosa*, *Phoma oncidii-sphacelati*, *Phoma pinodella*, *Phoma scabra*, *Phoma sclerotoides*,
Phoma strasserii, *Phoma tracheiphila*, *Phomopsis arnoldiae*, *Phomopsis asparagi*, *Phomopsis asparagicola*,
Phomopsis azadirachtae, *Phomopsis cannabina*, *Phomopsis caricae-papayae*, *Phomopsis coffeae*, *Phomopsis*
 30 *elaeagni*, *Phomopsis ganjae*, *Phomopsis javanica*, *Phomopsis lokoyae*, *Phomopsis mangiferae*, *Phomopsis*
obscurans, *Phomopsis perseae*, *Phomopsis prunorum*, *Phomopsis scabra*, *Phomopsis sclerotoides*, *Phomopsis*
tanakae, *Phomopsis theae*, *Phoma assimilata*, *Phragmidium*, *Phragmidium mucronatum*, *Phragmidium rosae-*
pimpinellifoliae, *Phragmidium rubi-idaei*, *Phragmidium violaceum*, *Phyllachora cannabidis*, *Phyllachora graminis* var.
graminis, *Phyllachora gratissima*, *Phyllachora musicola*, *Phyllachora pomigena*, *Phyllachora sacchari*, *Phyllactinia*,
 35 *Phyllactinia angulata*, *Phyllactinia guttata*, *Phyllody*, *Phyllosticta*, *Phyllosticta allariaefoliae*, *Phyllosticta*
anacardiacearum, *Phyllosticta arachidis-hypogaeae*, *Phyllosticta batatas*, *Phyllosticta capitalensis*, *Phyllosticta*
caricae-papayae, *Phyllosticta carpogena*, *Phyllosticta circumscissa*, *Phyllosticta coffeicola*, *Phyllosticta concentrica*,
Phyllosticta coryli, *Phyllosticta cucurbitacearum*, *Phyllosticta cyclaminella*, *Phyllosticta erratica*, *Phyllosticta*
hawaiiensis, *Phyllosticta lentisci*, *Phyllosticta manihotis*, *Phyllosticta micropuncta*, *Phyllosticta mortonii*, *Phyllosticta*
 40 *nicotianae*, *Phyllosticta palmetto*, *Phyllosticta penicillariae*, *Phyllosticta perseae*, *Phyllosticta platani*, *Phyllosticta*
pseudocapsici, *Phyllosticta sojaecola*, *Phyllosticta solitaria*, *Phyllosticta theae*, *Phyllosticta theicola*, *Phymatotrichopsis*
omnivora, *Physalospora abdita*, *Physalospora disrupta*, *Physalospora perseae*, *Physarum cinereum*, *Physoderma*
alfalfae, *Physoderma leproides*, *Physoderma trifolii*, *Physopella ampelopsidis*, *Phytophthora*, *Phytophthora alni*,
Phytophthora boehmeriae, *Phytophthora cactorum*, *Phytophthora cajani*, *Phytophthora cambivora*, *Phytophthora*
 45 *capsici*, *Phytophthora cinnamomi*, *Phytophthora citricola*, *Phytophthora citrophthora*, *Phytophthora cryptogea*,
Phytophthora drechsleri, *Phytophthora erythroseptica*, *Phytophthora fragariae*, *Phytophthora fragariae* var. *rubi*,
Phytophthora gallica, *Phytophthora hibernalis*, *Phytophthora infestans*, *Phytophthora inflata*, *Phytophthora iranica*,
Phytophthora katsurae, *Phytophthora kernoviae*, *Phytophthora lateralis*, *Phytophthora medicaginis*, *Phytophthora*
megakarya, *Phytophthora megasperma*, *Phytophthora nicotianae*, *Phytophthora palmivora*, *Phytophthora phaseoli*,
 50 *Phytophthora plurivora*, *Phytophthora ramorum*, *Phytophthora sojae*, *Phytophthora syringae*, *Phytophthora tentaculata*,
Phytoplasma, *Pichia membranifaciens*, *Pichia subpelliculosa*, *Pileolaria terebinthi*, *Pilidiella quercicola*,
Plasmodiophora brassicae, *Plasmopara*, *Plasmopara halstedii*, *Plasmopara helianthi* f. *helianthi*, *Plasmopara lactucae-*
radicis, *Plasmopara nivea*, *Plasmopara obducens*, *Plasmopara penniseti*, *Plasmopara pygmaea*, *Plasmopara viticola*,
Platyphora ulmi, *Plenodomus destruens*, *Plenodomus meliloti*, *Pleochaeta*, *Pleosphaerulina sojaecola*, *Pleospora*
 55 *alfalfae*, *Pleospora betae*, *Pleospora herbarum*, *Pleospora lycopersici*, *Pleospora tarda*, *Pleospora theae*, *Pleurotus*
dryinus, *Podosphaera*, *Podosphaera clandestina* var. *clandestina*, *Podosphaera fusca*, *Podosphaera leucotricha*,
Podosphaera macularis, *Podosphaera pannosa*, *Podosphaera tridactyla*, *Podosphaera tridactyla* var. *tridactyla*,
Podosphaera xanthii, *Polymyxa graminis*, *Polyscytalum pustulans*, *Polystigma fulvum*, *Poria hypobrunnea*, *Postia*
tephroleuca, *Potato cyst nematode*, *Pratylenchus allenii*, *Pratylenchus brachyurus*, *Pratylenchus coffeae*, *Pratylenchus*
 60 *crenatus*, *Pratylenchus dulscus*, *Pratylenchus fallax*, *Pratylenchus flakkensis*, *Pratylenchus goodeyi*, *Pratylenchus*
hexincisus, *Pratylenchus loosi*, *Pratylenchus minutus*, *Pratylenchus mulchandi*, *Pratylenchus musicola*, *Pratylenchus*
neglectus, *Pratylenchus penetrans*, *Pratylenchus pratensis*, *Pratylenchus reniformis*, *Pratylenchus scribneri*,
Pratylenchus thornei, *Pratylenchus vulnus*, *Pratylenchus zaeae*, *Pseudocercospora*, *Pseudocercospora arecaeum*,
Pseudocercospora cannabina, *Pseudocercospora fuligena*, *Pseudocercospora gunnerae*, *Pseudocercospora kaki*,
 65 *Pseudocercospora mali*, *Pseudocercospora pandoreae*, *Pseudocercospora puderi*, *Pseudocercospora purpurea*,
Pseudocercospora rhapsicola, *Pseudocercospora subsessilis*, *Pseudocercospora theae*, *Pseudocercospora vitis*,

- Pseudocercospora capsellae*, *Pseudocochliobolus eragrostidis*, *Pseudoepicoccum cocos*, *Pseudomonas amygdali*,
Pseudomonas asplenii, *Pseudomonas avellanae*, *Pseudomonas caricapapayae*, *Pseudomonas cichorii*,
Pseudomonas coronafaciens, *Pseudomonas corrugate*, *Pseudomonas ficuserectae*, *Pseudomonas flavescentis*,
5 *Pseudomonas fuscovaginae*, *Pseudomonas helianthi*, *Pseudomonas marginalis*, *Pseudomonas meliae*, *Pseudomonas*
oryzihabitans, *Pseudomonas palleroniana*, *Pseudomonas papaveris*, *Pseudomonas salomonii*, *Pseudomonas*
savastanoi, *Pseudomonas syringae*, *Pseudomonas tomato*, *Pseudomonas tremiae*, *Pseudomonas turbinellae*,
Pseudomonas viridiflava, *Pseudoperonospora cannabina*, *Pseudoperonospora cubensis*, *Pseudoperonospora humuli*,
Pseudopezizula tetraspora, *Pseudopezizula tracheiphila*, *Pseudopeziza jonesii*, *Pseudopeziza medicaginis*,
Pseudopeziza trifolii, *Pseudoseptoria donacis*, *Puccinia*, *Puccinia angustata*, *Puccinia arachidis*, *Puccinia aristidae*,
10 *Puccinia asparagi*, *Puccinia cacabata*, *Puccinia campanulae*, *Puccinia carthami*, *Puccinia coronata*, *Puccinia coronata*
var. hordei, *Puccinia dioicae*, *Puccinia erianthi*, *Puccinia extensicola var. hieraciata*, *Puccinia helianthi*, *Puccinia hordei*,
Puccinia jaceae var. solstitialis, *Puccinia kuehnii*, *Puccinia mariae-wilsoniae*, *Puccinia melanocephala*, *Puccinia*
menthae, *Puccinia pelargonii-zonalis*, *Puccinia pittieriana*, *Puccinia poarum*, *Puccinia psidii*, *Puccinia purpurea*,
Puccinia recondita, *Puccinia schedonnardii*, *Puccinia sessilis*, *Puccinia striiformis f. sp. hordei*, *Puccinia striiformis var.*
15 *striiformis*, *Puccinia subnitens*, *Puccinia substriata var. indica*, *Puccinia verruca*, *Puccinia xanthii*, *Pucciniastrum*,
Pucciniastrum americanum, *Pucciniastrum arcticum*, *Pucciniastrum coryli*, *Pucciniastrum epilobii*,
Pucciniastrum hydrangeae, *Punctodera calcoensis*, *Pycnopus cinnabarinus*, *Pycnopus sanguineus*,
Pycnostysanus azaleae, *Pyrenochaeta lycopersici*, *Pyrenochaeta terrestris*, *Pyrenopeziza brassicae*, *Pyrenophora*,
Pyrenophora avenae, *Pyrenophora chaetomioides*, *Pyrenophora graminea*, *Pyrenophora seminiperda*, *Pyrenophora*
20 *teres*, *Pyrenophora teres f. maculata*, *Pyrenophora teres f. teres*, *Pyrenophora tritici-repentis*, *Pythiaceae*, *Pythiales*,
Pythium, *Pythium acanthicum*, *Pythium aphanidermatum*, *Pythium aristosporum*, *Pythium arrhenomanes*, *Pythium*
buismaniae, *Pythium debaryanum*, *Pythium deliense*, *Pythium dissotocum*, *Pythium graminicola*, *Pythium*
heterothallicum, *Pythium hypogynum*, *Pythium irregulare*, *Pythium iwayamae*, *Pythium mastophorum*, *Pythium*
middletonii, *Pythium myriotylum*, *Pythium okanoganense*, *Pythium paddicum*, *Pythium paroecandrum*, *Pythium*
25 *perniciosum*, *Pythium rostratum*, *Pythium scleroteichum*, *Pythium spinosum*, *Pythium splendens*, *Pythium sulcatum*,
Pythium sylvaticum, *Pythium tardicrescens*, *Pythium tracheiphilum*, *Pythium ultimum*, *Pythium ultimum var. ultimum*,
Pythium vexans, *Pythium violae*, *Pythium volutum*, *Quinisulcius acutus*, *Quinisulcius capitatus*, *Radopholous similis*,
Radopholous similis, *Ralstonia solanacearum*, *Ramichloridium musae*, *Ramularia*, *Ramularia beticola*, *Ramularia*
brunnea, *Ramularia coryli*, *Ramularia cyclaminicola*, *Ramularia macrospora*, *Ramularia menthicola*, *Ramularia necator*,
30 *Ramularia primulae*, *Ramularia spinaciae*, *Ramularia subtilis*, *Ramularia tenella*, *Ramulispora sorghi*, *Ramulispora*
sorghicola, *Resinicium bicolor*, *Rhabdocline pseudotsugae*, *Rhabdocline weirii*, *Rhabdoviridae*, *Rhinocladium corticola*,
Rhizoctonia, *Rhizoctonia leguminicola*, *Rhizoctonia rubi*, *Rhizoctonia solani*, *Rhizomorpha subcorticalis*, *Rhizophydium*
graminis, *Rhizopus arrizus*, *Rhizopus circinans*, *Rhizopus microsporus var. microspores*, *Rhizopus oryzae*,
Rhodococcus fascians, *Rhynchosporium*, *Rhynchosporium secalis*, *Rhytidhysterium rufum*, *Rhytisma acerinum*,
35 *Rhytisma vitis*, *Rigidoporus lineatus*, *Rigidoporus microporus*, *Rigidoporus ulmarius*, *Rigidoporus vinctus*, *Rosellinia*
arcuata, *Rosellinia bunodes*, *Rosellinia necatrix*, *Rosellinia pepo*, *Rosellinia subiculata*, *Rotylenchulus*, *Rotylenchulus*
parvus, *Rotylenchulus reniformis*, *Rotylenchus brachyurus*, *Rotylenchus robustus*, *Saccharicola taiwanensis*,
Saccharomyces florentinus, *Saccharomyces kluyveri*, *Sarocladium oryzae*, *Sawadaea*, *Sawadaea tulasnei*,
Schiffnerula cannabis, *Schizoparme straminea*, *Schizophyllum commune*, *Schizopora flavipora*, *Schizothyrium pomi*,
40 *Scleroderma canker*, *Sclerophthora macrospora*, *Sclerophthora rayssiae*, *Sclerospore graminicola*, *Sclerospore*
mischanthi, *Sclerotinia borealis*, *Sclerotinia minor*, *Sclerotinia ricini*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Sclerotinia spermophila*,
Sclerotinia trifoliorum, *Sclerotium*, *Sclerotium cinnamomi*, *Sclerotium delphinii*, *Scutellonema brachyurum*,
Scutellonema cavenessi, *Scytinostroma galactinum*, *Seimatosporium mariae*, *Seimatosporium rhododendri*,
Selenophoma linicola, *Septobasidium*, *Septobasidium bogoriense*, *Septobasidium pilosum*, *Septobasidium*
45 *pseudopedicellatum*, *Septobasidium theae*, *Septocytia ruborum*, *Septogloeum potentillae*, *Septoria*, *Septoria aciculosa*,
Septoria ampelina, *Septoria azalea*, *Septoria bataticola*, *Septoria campanulae*, *Septoria cannabis*, *Septoria caryae*,
Septoria citri, *Septoria cucurbitacearum*, *Septoria darrowii*, *Septoria dianthi*, *Septoria eumusae*, *Septoria fragariae*,
Septoria fragariaecola, *Septoria glycines*, *Septoria helianthi*, *Septoria humuli*, *Septoria hydrangeae*, *Septoria lactucae*,
Septoria liquidambaris, *Septoria lycopersici*, *Septoria lycopersici var. malagutii*, *Septoria menthae*, *Septoria ostryae*,
50 *Septoria passerinii*, *Septoria pisi*, *Septoria pistaciae*, *Septoria platanifolia*, *Septoria rhododendri*, *Septoria secalis*,
Septoria selenophomoides, *Setosphaeria rostrata*, *Setosphaeria turcica*, *Sirosporium diffusum*, *Sparassis*,
Sphaceloma, *Sphaceloma arachidis*, *Sphaceloma coryli*, *Sphaceloma menthae*, *Sphaceloma perseae*, *Sphaceloma*
poinsettiae, *Sphaceloma pyrinum*, *Sphaceloma randii*, *Sphaceloma sacchari*, *Sphaceloma theae*, *Sphacelotheca*
reiliana, *Sphaerella platanifolia*, *Sphaeropsis tumefaciens*, *Sphaerotheca*, *Sphaerotheca castagnei*, *Sphaerotheca*
55 *fuliginea*, *Sphaerulina oryzina*, *Sphaerulina rehmanniana*, *Sphaerulina rubi*, *Sphenospora kevorkianii*, *Spiniger*
meineckellus, *Spiroplasma*, *Spongipellis unicolor*, *Sporisorium cruentum*, *Sporisorium ehrenbergii*, *Sporisorium*
scitamineum, *Sporisorium sorghi*, *Sporonema phacidioides*, *Stagonospora avenae f. sp. triticae*, *Stagonospora melloti*,
Stagonospora recedens, *Stagonospora sacchari*, *Stagonospora tainanensis*, *Steccherinum ochraceum*,
Stegocinctria junci, *Stegophora ulmea*, *Stemphylium alfalfa*, *Stemphylium bolickii*, *Stemphylium cannabinum*,
60 *Stemphylium globuliferum*, *Stemphylium lycopersici*, *Stemphylium sarciniforme*, *Stemphylium solani*, *Stemphylium*
vesicarium, *Stenella anthuricola*, *Stereum*, *Stereum hirsutum*, *Stereum rameale*, *Stereum sanguinolentum*,
Stigmatomycosis, *Stigmella platani-racemosae*, *Stigmella carpophila*, *Stigmella liquidambaris*, *Stigmella palmivora*,
Stigmella platani, *Stigmella platani-racemosae*, *Subanguina radicola*, *Subanguina wevelli*, *Sydowia polyspora*,
Sydowiella depressula, *Sydowiellaceae*, *Synchytrium endobioticum*, *Synchytrium fragariae*, *Synchytrium*
65 *liquidambaris*, *Taiwanofungus camphoratus*, *Tapesia aciformis*, *Tapesia yallundae*, *Taphrina aurea*, *Taphrina bullata*,
Taphrina caerulea, *Taphrina coryli*, *Taphrina deformans*, *Taphrina entomosporea*, *Taphrina johansonii*, *Taphrina*

5 *potentillae*, *Taphrina ulmi*, *Taphrina wiesneri*, *Thanatephorus cucumeris*, *Thielaviopsis*, *Thielaviopsis basicola*,
Thyrostroma compactum, *Tilletia barclayana*, *Tilletia caries*, *Tilletia controversa*, *Tilletia laevis*, *Tilletia tritici*, *Tilletia*
walkerii, *Tilletiariaceae*, *Tobacco necrosis virus*, *Togniniaceae*, *Trachysphaera fructigena*, *Trametes gibbosa*, *Trametes*
hirsute, *Trametes nivosa*, *Trametes pubescens*, *Tranzschelia discolor* f. sp. *persica*, *Tranzschelia pruni-spinosae* var.
 10 *discolor*, *Trichaptum biforme*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma koningii*, *Trichoderma viride*, *Trichothecium*
roseum, *Tripospermum acerinum*, *Truncatella*, *Truncatella laurocerasi*, *Tubercularia lateritia*, *Tubercularia ulmea*,
Tubeufia peizula, *Tunstallia aculeata*, *Tylenchorhynchus*, *Tylenchorhynchus brevilineatus*, *Tylenchorhynchus*
claytoni, *Tylenchorhynchus dubius*, *Tylenchorhynchus maximus*, *Tylenchorhynchus nudus*, *Tylenchorhynchus*
phaseoli, *Tylenchorhynchus vulgaris*, *Tylenchorhynchus zeae*, *Tylenchulus semipenetrans*, *Typhula idahoensis*,
 15 *Typhula incarnate*, *Typhula ishkariensis*, *Typhula ishkariensis* var. *canadensis*, *Typhula variabilis*, *Typhulochaeta*,
Tyromyces calkinsii, *Tyromyces chioneus*, *Tyromyces galactinus*, *Ulocladium atrum*, *Ulocladium consortiale*, *Uncinula*,
Uncinula macrospora, *Uncinula necator*, *Uredo behnickiana*, *Uredo kriegiana*, *Uredo musae*, *Uredo nigropuncta*,
Uredo rangellii, *Urocystis*, *Urocystis agropyri*, *Urocystis brassicae*, *Urocystis occulta*, *Uromyces*, *Uromyces apiosporus*,
Uromyces beticola, *Uromyces ciceris-arietini*, *Uromyces dianthi*, *Uromyces euphorbiae*, *Uromyces graminis*, *Uromyces*
 20 *inconspicuus*, *Uromyces lineolatus* subsp. *nearcticus*, *Uromyces medicaginis*, *Uromyces musae*, *Uromyces oblongus*,
Uromyces pisi-sativi, *Uromyces proëminens* var. *poinsettiae*, *Uromyces trifolii-repentis* var. *fallens*, *Uromyces viciae-*
fabae var. *viciae-fabae*, *Urophlyctis leproides*, *Urophlyctis trifolii*, *Urophora cardui*, *Ustilaginales*, *Ustilaginoidea virens*,
Ustilaginomyces, *Ustilago*, *Ustilago avenae*, *Ustilago hordei*, *Ustilago maydis*, *Ustilago nigra*, *Ustilago nuda*, *Ustilago*
scitaminea, *Ustilago tritici*, *Valsa abietis*, *Valsa ambiens*, *Valsa auerswaldii*, *Valsa ceratosperma*, *Valsa kunzei*, *Valsa*
 25 *nivea*, *Valsa sordida*, *Valsaria insitiva*, *Venturia carpophila*, *Venturia inaequalis*, *Venturia pirina*, *Venturia pyrina*,
Veronaea musae, *Verticillium*, *Verticillium albo-atrum*, *Verticillium albo-atrum* var. *menthae*, *Verticillium dahliae*,
Verticillium longisporum, *Verticillium theobromae*, *Villosiclava virens*, *Virescence*, *Waitea circinata*, *Wuestneiopsis*
Georgiana, *Xanthomonas ampelina*, *Xanthomonas axonopodis*, *Xanthomonas campestris*, *Xanthomonas campestris*
pv. campestris, *Xanthomonas oryzae*, *Xeromphalina fraxinophila*, *Xiphinema americanum*, *Xiphinema bakeri*,
 30 *Xiphinema brevicolle*, *Xiphinema diversicaudatum*, *Xiphinema insigne*, *Xiphinema rivesi*, *Xiphinema vuittenezi*, *Xylaria*
mali, *Xylaria polymorpha*, *Xylella fastidiosa*, *Xylophilus*, *Xylophilus ampelinus*, *Zopfia rhizophila*, *Zygosaccharomyces*
bailii y *Zygosaccharomyces florentinus*.

Los patógenos insectos y gusanos incluyen *Acalymma*, *Acyrtosiphon pisum*, gusano cogollero africano, abeja
 30 africanizada, *Agromyzidae*, *Agrotis munda*, *Agrotis porphyricollis*, *Aleurocanthus woglumi*, *Aleyrodes proletella*,
Alphitobius diaperinus, *Altica chalybea*, *Anasa tristis*, *Anguina tritici*, *Anisoplia austriaca*, *Anthonomus pomorum*,
Anthonomus signatus, *Aonidiella aurantii*, *Apamea apamiformis*, *Apamea niveivenosa*, *Aphelenchoides* spp., pulgón,
Aphis gossypii, gusano de la manzana, hormiga argentina, gusano cogollero cortador, *Arotrophora arcuatalis*,
 35 *Asterolecanium coffeae*, *Athous haemorrhoidalis*, *Aulacophora*, langosta de la plaga australiana, *Bactericera cockerelli*,
Bactrocera, *Bactrocera correcta*, *Bagrada hilaris*, barrenador bandeado del nogal americano, gusano cogollero de la
 remolacha, *Belonolaimus* spp., pulgón de la judía negra, *Blepharidopterus chlorionis*, polilla Bogong, gorgojo del
 algodón, *Bradysia similigibbosa*, mosquito de la vaina de *Brassica*, *Brevicoryne brassicae*, langosta parda, chinche
 apestosa marmolada parda, saltamontes pardo, *Bursephelenchus* spp., polilla de la col, gusano de la col,
 40 *Callosobruchus maculatus*, escarabajo de la caña, mosca de la zanahoria, nematodos del quiste de los cereales,
Cecidomyiidae, *Ceratitis capitata*, *Ceratitis rosa*, escarabajo de la hoja de los cereales, *Chlorops pumilionis*, escarabajo
 de cuerno largo de los cítricos, *Coccus viridis*, polilla de la manzana, escarabajo barrenador del café, escarabajo de
 la patata de Colorado, escarabajo americano de la harina, palomilla, escarabajo del pepino, *Curculio nucum*, *Curculio*
occidentis, gusano cortador, *Cyclocephala borealis*, hierba espada oscura, escarabajo del hueso del dátil, *Delia* spp.,
 45 *Delia antiqua*, *Delia floralis*, *Delia radicum*, langosta del desierto, *Diabrotica*, *Diabrotica balteata*, *Diabrotica speciosa*,
 polilla dorso de diamante, *Diaphania indica*, *Diaphania nitidalis*, *Diaphorina citri*, *Diaprepes abbreviatus*, *Diatraea*
saccharalis, saltamontes diferencial, *Ditylenchus* spp., *Dociostaurus maroccanus*, *Drosophila suzukii*, *Dryocosmus*
kuriphilus, *Earias perhuegeli*, *Epicauta vittata*, *Epilachna varivestis*, *Erionota thrax*, *Eriosomatinae*, *Euleia heraclei*,
Eumetopina flavipes, *Eupoecilia ambiguella*, barrenador europeo del maíz, *Eurydema oleracea*, *Eurygaster*
integriceps, chinche del bosque, *Frankliniella tritici*, *Galleria mellonella*, dardo de jardín, cícada de alas vítreas, mosca
 50 blanca del invernadero, *Gryllotalpa orientalis*, *Gryllus pennsylvanicus*, polillas gitanas, *Helicoverpa armigera*,
Helicoverpa gelatopoeon, *Helicoverpa punctigera*, *Helicoverpa zea*, *Heliothis virescens*, *Henosepilachna*
vigintioctopunctata, mosca de Hesse, *Heterodera* spp., *Jacobiasca formosana*, escarabajo japonés, escarabajo
 Khapra, *Lampides boeticus*, minador de las hojas, *Lepidiotia consobrina*, *Lepidosaphes beekii*, *Lepidosaphes ulmi*,
Leptoglossus zonatus, *Leptopterna dolabrata*, polilla de cera menor, *Leucoptera* (polilla), *Leucoptera coffeina*, polilla
 55 parda clara de la manzana, *Lissorhoptrus oryzophilus*, saltamontes de cola larga, *Lygus*, *Lygus hesperus*,
Macronellicoccus hirsutus, *Macroductylus subspinosus*, *Macrosiphum euphorbiae*, gorgojo del maíz, *Manduca sexta*,
Mayetiola hordei, chinche harinosa, *Meloidogyne* spp., *Megacopta cribraria*, *Metcalfa pruinosa*, polillas, polilla del
 puerro, *Myzus persicae*, *Nacobus* spp., *Nezara viridula*, procesionaria del roble, mosca del fruto del olivo, *Ophiomyia*
simplex, *Opisina arenosella*, *Opomyza*, *Opomyza florum*, *Opomyzidae*, *Oscinella frit*, *Ostrinia furnacalis*, *Oxycarenus*
 60 *hyalinipennis*, chinche harinosa de la papaya, *Papilio demodocus*, *Paratachardina pseudolobata*, *Pentatomoidea*,
Phthorimaea operculella, *Phyllophaga*, *Phylloxera*, *Phylloxeridae*, *Phylloxeroidea*, *Pieris brassicae*, gusano rosado del
 algodón, *Planococcus citri*, *Platynota idaeusalis*, curculio de la ciruela, *Pratylenchus* spp., *Prionus californicus*,
Pseudococcus viburni, *Pyralisfarinalis*, hormiga de fuego roja importada, langosta roja, nematodo de la lesión de la
 raíz, nematodos del nudo de la raíz, *Radopholus* spp., *Rotylenchulus* spp., *Rhagoletis cerasi*, *Rhagoletis indifferens*,
 65 *Rhagoletis mendax*, *Rhopalosiphum maidis*, *Rhyacionia frustrana*, *Rhynchophorus ferrugineus*, *Rhynchophorus*
palmarum, *Rhyzopertha*, polilla del arroz, chinche apestosa del arroz, pulgón ruso del trigo, cochinilla de San José,

cochinillas, *Schistocerca americana*, *Sciaridae*, *Scirtothrips dorsalis*, *Scutelleridae*, *Scutiphora pedicellata*, nematodos de la agalla de semilla, minador de hojas serpentina, mosca blanca de hoja plateada, *Sipha flava*, pequeño escarabajo de la colmena, barrenador del maíz del suroeste, pulgón de la soja, *Spodoptera cilium*, *Spodoptera litura*, escarabajo del pepino manchado, barrenador de la vid de la calabaza, nematodos del tallo, *Stenotus binotatus*, *Strauzia longipennis*, escarabajo pulga rayado, plaga sonn, insecto del boniato, chinche manchadora, arañuelas, *Thrips angusticeps*, *Thrips palmi*, *Toxoptera citricida*, *Trichodorus spp.*, *Trioza erytreae*, polilla del nabo, *Tuta absoluta*, *Tylenchulus spp.*, escarabajo de alfombra variegado, *Virachola isocrates*, gusano de cera, gusano de la raíz del maíz occidental, arañuelas de las flores occidentales, mosca del trigo, gorgojo del trigo, mosca blanca, polilla de invierno y *Xiphenema spp.*

Por ejemplo, el insecto o gusano patógeno puede ser un gusano cogollero, gusano cortador negro, barrenador europeo del maíz, gusano cogollero del maíz, gusano cortador, escarabajo japonés, barrenador menor del tallo del maíz, picudo del maíz, gusano de la semilla del maíz, oruga tejedora, barrenador del tallo del maíz meridional, gusano de la raíz del maíz, gusano de alambre de la patata meridional, barrenador del tallo, escarabajo de la caña de azúcar, gusanos blancos, cucaracha de la col, gorgojo del algodón, gusano cogollero rayado amarillo, escarabajo de la hoja de los cereales, chinche, áfidos, gusano cogollero de la remolacha, escarabajo mexicano de la judía, gusano falso medidor de la soja, barrenador del tallo de la soja o una combinación de los mismos.

Proteínas y péptidos que potencian la resistencia al estrés en plantas

Se divulgan proteínas de fusión que comprenden una secuencia de direccionamiento, proteína de exosporio o fragmento de proteína de exosporio y al menos una proteína o péptido que potencia la resistencia al estrés en una planta.

Por ejemplo, la proteína o péptido que potencia la resistencia al estrés en una planta comprende una enzima que degrada un compuesto relacionado con el estrés. Los compuestos relacionados con el estrés incluyen, pero sin limitación, ácido aminociclopropano-1-carboxílico (ACC), especies de oxígeno reactivo, óxido nítrico, oxilipinas y fenólicos. Las especies reactivas específicas de oxígeno incluyen hidroxilo, peróxido de hidrógeno, oxígeno y superóxido. La enzima que degrada un compuesto relacionado con el estrés puede comprender una superóxido dismutasa, una oxidasa, a catalasa, una ácido aminociclopropano-1-carboxílico desaminasa, una peroxidasa, una enzima antioxidante o un péptido antioxidante.

La proteína o péptido que potencia la resistencia al estrés en una planta también puede comprender una proteína o péptido que protege una planta frente a un estrés ambiental. El estrés ambiental puede comprender, por ejemplo, sequía, inundación, calor, heladas, sal, metales pesados, pH bajo, pH alto o una combinación de los mismos. Por ejemplo, la proteína o péptido que protege una planta frente a un estrés ambiental puede comprender una proteína de nucleación de hielo, una prolinasa, una fenilalanina amoníaco liasa, una isocorismato sintasa, una isocorismato piruvato liasa o una colina deshidrogenasa.

Proteínas y péptidos de unión a plantas

Se divulgan proteínas de fusión que comprenden una secuencia de direccionamiento, proteína de exosporio o fragmento de proteína de exosporio y al menos proteína o péptido de unión a plantas. La proteína o péptido de unión a plantas puede ser cualquier proteína o péptido que sea capaz de unirse específica o no específicamente a cualquier parte de una planta (por ejemplo, una raíz de una planta o una porción aérea de una planta tal como una hoja, tallo, flor o fruto) o a materia vegetal. Por lo tanto, por ejemplo, la proteína o péptido de unión a plantas puede ser una proteína o péptido de unión a raíces o una proteína o péptido de unión a hojas.

Las proteínas y péptidos de unión a plantas adecuados incluyen adhesinas (por ejemplo, ricadhesina), flagelinas, omptinas, lectinas, expansinas, proteínas estructurales de biopelículas (por ejemplo, TasA o YuaB), proteínas de pilus, proteínas curlus, intiminas, invasinas, aglutininas y proteínas afimbriales.

Otras proteínas de fusión

También se divulgan proteínas de fusión que comprenden al menos una proteína o péptido de interés y una proteína de exosporio que comprende una proteína de exosporio que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 85 % de identidad con una cualquiera de las SEQ ID NO: 71, 75, 80, 81, 82, 83 y 84. Como alternativa, la proteína del exosporio puede comprender una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o al menos un 100 % de identidad con una cualquiera de las SEQ ID NO: 71, 75, 80, 81, 82, 83 y 84.

La proteína o péptido de interés puede comprender cualquier proteína o péptido. Por ejemplo, la proteína o péptido de interés puede comprender cualquiera de las proteínas o péptidos descritos en el presente documento. Por ejemplo, la proteína o péptido de interés puede comprender cualquiera de las proteínas o péptidos estimulantes del crecimiento vegetal descritos en el presente documento, cualquiera de las proteínas o péptidos que protegen una planta frente a un patógeno descrito en el presente documento, cualquiera de las proteínas o péptidos que potencian la resistencia

al estrés en una planta descrita en el presente documento o cualquiera de las proteínas o péptidos de unión a plantas descritos en el presente documento.

Por lo tanto, cuando la proteína o péptido de interés comprende una proteína o péptido que estimula el crecimiento vegetal, la proteína o péptido estimulante del crecimiento vegetal puede comprender una hormona peptídica, un péptido no hormonal o una enzima implicada en la producción o activación de un compuesto estimulante del crecimiento vegetal. Como alternativa, la proteína o péptido estimulante del crecimiento vegetal puede comprender cualquiera de las enzimas que degradan o modifican una fuente de nutrientes bacteriana, fúngica o vegetal que se describe a continuación en el presente documento.

Bacterias *Bacillus* recombinantes que expresan las proteínas de fusión

La presente invención también se refiere a métodos que usan una bacteria *Bacillus* recombinante que expresa una proteína de fusión. La proteína de fusión expresada por la bacteria *Bacillus* utilizada en el método de la invención comprende al menos una proteína o péptido que estimula el crecimiento vegetal y una secuencia de direccionamiento, proteína de exosporio o fragmento de proteína de exosporio que dirige la proteína de fusión al exosporio de la bacteria *Bacillus* recombinante.

En algunas realizaciones, la secuencia de direccionamiento, una proteína de exosporio o un fragmento de proteína de exosporio comprende la secuencia X₁-X₂-X₃-X₄-X₅-X₆-X₇-X₈-X₉-X₁₀-X₁₁-X₁₂-X₁₃-X₁₄-X₁₅-X₁₆, en donde:

- X₁ es cualquier aminoácido o está ausente;
- X₂ es fenilalanina (F), leucina (L), isoleucina (I) o metionina (M);
- X₃ es cualquier aminoácido;
- X₄ es prolina (P) o serina (S);
- X₅ es cualquier aminoácido;
- X₆ es leucina (L), asparagina (N), serina (S) o isoleucina (I);
- X₇ es valina (V) o isoleucina (I);
- X₈ es glicina (G);
- X₉ es prolina (P);
- X₁₀ es treonina (T) o prolina (P);
- X₁₁ es leucina (L) o fenilalanina (F);
- X₁₂ es prolina (P);
- X₁₃ es cualquier aminoácido;
- X₁₄ es cualquier aminoácido;
- X₁₅ es prolina (P), glutamina (Q) o treonina (T); y
- X₁₆ es prolina (P), treonina (T) o serina (S);

y la proteína o péptido estimulante del crecimiento vegetal comprende una hormona peptídica que comprende una fitosulfocina, clavata 3 (CLV3), sistemina, ZmIGF o un SCR/SP11; un péptido no hormonal que comprende un RKN 16D10, Hg-Syv46, un péptido eNOD40, melitina, mastoparín, Mas7, RHPP, POLARIS o inhibidor de la tripsina de Kunitz (KTI); una enzima implicada en la producción o activación de un compuesto estimulante del crecimiento vegetal; o una enzima que degrada o modifica una fuente de nutrientes bacteriana, fúngica o vegetal.

En algunas realizaciones, la proteína de exosporio dirige la proteína de fusión al exosporio de la bacteria *Bacillus* recombinante, comprendiendo la proteína de exosporio:

- (a) una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 95 % de identidad con la SEQ ID NO: 72;
- (b) una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 95 % de identidad con la SEQ ID NO: 73;
- (c) una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 95 % de identidad con la SEQ ID NO: 74;
- (d) una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 95 % de identidad con la SEQ ID NO: 76;
- (e) una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 95 % de identidad con la SEQ ID NO: 80;
- (f) una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 95 % de identidad con la SEQ ID NO: 81; o
- (g) una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 95 % de identidad con la SEQ ID NO: 83.

En otras divulgaciones, la proteína de fusión puede ser cualquiera de las proteínas de fusión analizadas anteriormente.

En algunas divulgaciones, la bacteria *Bacillus* recombinante puede coexpresar dos o más de cualquiera de las proteínas de fusión analizadas anteriormente. Por ejemplo, la bacteria *Bacillus* recombinante utilizada en el método de la invención puede coexpresar al menos una proteína de fusión que comprende una proteína o péptido de unión a plantas, junto con al menos una proteína de fusión que comprende una proteína o péptido estimulante del crecimiento vegetal, al menos una proteína de fusión que comprende una proteína o péptido que protege una planta frente a un patógeno, o al menos una proteína o péptido que potencia la resistencia al estrés en una planta.

La bacteria *Bacillus* recombinante se selecciona de *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus pseudomycoides*, *Bacillus samanii*, *Bacillus gaemokensis*, *Bacillus weihenstephanensis* o una

combinación de los mismos. Por ejemplo, la bacteria *Bacillus* recombinante puede comprender *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus pseudomycoides* o *Bacillus mycoides*. En particular, la bacteria *Bacillus* recombinante puede comprender *Bacillus thuringiensis* o *Bacillus mycoides*.

Para generar una bacteria *Bacillus* recombinante que expresa una proteína de fusión, cualquier bacteria *Bacillus* puede conjugarse, transducirse o transformarse con un vector que codifica la proteína de fusión usando métodos convencionales conocidos en la técnica (por ejemplo, mediante electroporación). Después, las bacterias pueden cribarse para identificar transformantes mediante cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, cuando el vector incluye un gen de resistencia a antibióticos, las bacterias pueden cribarse para detectar resistencia a antibióticos. Como alternativa, el ADN que codifica la proteína de fusión puede integrarse en el ADN cromosómico de un hospedador bacteriano *Bacillus*. Después, la bacteria *Bacillus* recombinante puede exponerse a condiciones que inducirán la esporulación. Se conocen en la técnica condiciones adecuadas para inducir la esporulación. Por ejemplo, la bacteria recombinante *Bacillus* puede sembrarse en placas de agar e incubarse a una temperatura de aproximadamente 30 °C durante varios días (por ejemplo, 3 días).

También pueden usarse cepas inactivadas, cepas no tóxicas o cepas manipuladas genéticamente de cualquiera de las especies anteriores. Por ejemplo, puede usarse un *Bacillus thuringiensis* que carece de la toxina Cry. Como alternativa, o además, una vez generadas las esporas de la bacteria *Bacillus* recombinante que expresan la proteína de fusión, pueden inactivarse para evitar la germinación adicional una vez que estén en uso. Puede usarse cualquier método para inactivar esporas bacterianas conocido en la técnica. Los métodos adecuados incluyen, sin limitación, tratamiento térmico, irradiación gamma, irradiación con rayos X, irradiación UV-A, irradiación UV-B, tratamiento químico (por ejemplo, tratamiento con glutaraldehído, formaldehído, peróxido de hidrógeno, ácido acético, lejía o cualquier combinación de los mismos) o una combinación de los mismos. Como alternativa, pueden usarse esporas derivadas de cepas no toxigénicas o cepas inactivadas genéticamente o físicamente.

Bacterias *Bacillus* recombinantes que tienen efectos que promueven el crecimiento vegetal y/u otros atributos beneficiosos

Muchas cepas bacterianas de *Bacillus* tienen atributos beneficiosos inherentes. Por ejemplo, algunas cepas tienen efectos que promueven el crecimiento vegetal. Cualquiera de las proteínas de fusión descritas en el presente documento puede expresarse en dichas cepas.

Por ejemplo, la bacteria *Bacillus* recombinante puede comprender una cepa de bacterias que promueve el crecimiento vegetal.

La cepa de bacterias que promueve el crecimiento vegetal puede comprender una cepa de bacterias que produce una toxina insecticida (por ejemplo, una toxina Cry), produce un compuesto fungicida (por ejemplo, una β -1,3-glucanasa, una quitosinasa, una liasa o una combinación de las mismas), produce un compuesto nematocida (por ejemplo, una toxina Cry), produce un compuesto bactericida, es resistente a uno o más antibióticos, comprende uno o más plásmidos que se replican libremente, se une a raíces de plantas, coloniza raíces de plantas, forma biopelículas, solubiliza nutrientes, secreta ácidos orgánicos o cualquier combinación de los mismos.

Por ejemplo, cuando la bacteria *Bacillus* recombinante comprende una cepa de bacterias que promueve el crecimiento vegetal, la cepa de bacterias que promueve el crecimiento vegetal puede comprender *Bacillus mycoides* BT155 (NRRL N.º B-50921), *Bacillus mycoides* EE118 (NRRL N.º B-50918), *Bacillus mycoides* EE141 (NRRL N.º B-50916), *Bacillus mycoides* BT46-3 (NRRL N.º B-50922), bacteria *Bacillus* EE128 (NRRL N.º B-50917), *Bacillus thuringiensis* BT013A (NRRL N.º B-50924) o bacteria *Bacillus* EE349 (NRRL N.º B-50928). Cada una de estas cepas se depositó en el Servicio de Investigación Agrícola (ARS, por sus siglas en inglés) del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA, por sus siglas en inglés), que tiene la dirección 1815 North University Street, Peoria, Illinois 61604 EE.UU., el 10 de marzo de 2014, y se identifica mediante el número de depósito NRRL que se proporciona entre paréntesis.

Estas cepas que promueve el crecimiento vegetal se aislaron de las rizosferas de diversas plantas vigorosas y se identificaron por sus secuencias de ARNr 16S (proporcionadas en el presente documento como las SEQ ID NO. 104-110) y a través de ensayos bioquímicos. Las cepas se identificaron al menos hasta su designación de género por medio de indicadores bioquímicos y morfológicos convencionales. Los ensayos bioquímicos para cepas grampositivas confirmadas tales como *Bacillus* incluyeron crecimiento en medio PEA y agar nutritivo, examen microscópico, crecimiento en medio de NaCl al 5 % y al 7,5 %, crecimiento a pH 5 y pH 9, crecimiento a 42 °C y 50 °C, la capacidad de producir ácido tras la fermentación con celobiosa, lactosa, glicerol, glucosa, sacarosa, d-manitol y almidón; producción de pigmentos fluorescentes; hidrólisis de gelatina; reducción de nitrato; producción de catalasa, hidrólisis de almidón; reacción de oxidasa, producción de ureasa y motilidad. La identificación de estas cepas y la demostración de sus efectos que promueven el crecimiento vegetal se describen adicionalmente en los Ejemplos a continuación en el presente documento.

Por ejemplo, la bacteria *Bacillus* recombinante que comprende una cepa de bacterias que promueve el crecimiento vegetal puede comprender *Bacillus mycoides* BT155, *Bacillus mycoides* EE141 o *Bacillus thuringiensis* BT013A. La

bacteria *Bacillus* recombinante puede expresar cualquiera de las proteínas de fusión descritas en el presente documento, por ejemplo, una proteína de fusión que comprende la secuencia de direccionamiento de la SEQ ID NO: 60 y un péptido no hormonal (por ejemplo, inhibidor de tripsina de Kunitz (KTI)), una enzima implicada en la producción o activación de un compuesto estimulante del crecimiento vegetal (por ejemplo, una quitosinasa), una proteína o péptido de unión a plantas (por ejemplo, TasA); una proteína o péptido que protege una planta frente a un patógeno (por ejemplo, TasA), o una enzima que degrada o modifica una fuente de nutrientes bacteriana, fúngica o vegetal (por ejemplo, una fosfatasa tal como PhoA o fitasa, o una endoglucanasa).

Promotores

En cualquiera de las bacterias *Bacillus* recombinantes descritas en el presente documento, la proteína de fusión puede expresarse bajo el control de un promotor que es nativo de la secuencia de direccionamiento, la proteína de exosporio o el fragmento de proteína de exosporio de la proteína de fusión. Por ejemplo, cuando la proteína de fusión comprende una secuencia de direccionamiento derivada de BclA de *B. anthracis* Sterne (por ejemplo, los aminoácidos 20-35 de la SEQ ID NO: 1, los aminoácidos 1-35 de la SEQ ID NO: 1, la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 60) o cuando la proteína de fusión comprende BclA de longitud completa (SEQ ID NO: 2) o un fragmento de BclA de longitud completa (por ejemplo, SEQ ID NO: 59), la proteína de fusión puede expresarse bajo el control de un promotor que normalmente se asocia al gen *BclA* en el genoma de *B. anthracis* Sterne (por ejemplo, el promotor de la SEQ ID NO: 85).

Como alternativa, la proteína de fusión puede expresarse bajo el control de un promotor de esporulación de alta expresión. En algunos casos, el promotor que es nativo de la secuencia de direccionamiento, proteína de exosporio o fragmento de proteína de exosporio será un promotor de esporulación de alta expresión. En otros casos, el promotor que es nativo de la secuencia de direccionamiento, proteína de exosporio o fragmento de proteína de exosporio no será un promotor de esporulación de alta expresión. En los últimos casos, puede resultar ventajoso reemplazar el promotor nativo por un promotor de esporulación de alta expresión. La expresión de la proteína de fusión bajo el control de un promotor de esporulación de alta expresión proporciona una mayor expresión de la proteína de fusión en el exosporio de la bacteria *Bacillus*.

El promotor de esporulación de alta expresión puede comprender una o más secuencias promotoras de polimerasa específicas de esporulación sigma-K.

Los promotores de esporulación de alta expresión adecuados para su uso en la expresión de las proteínas de fusión en una bacteria *Bacillus* incluyen aquellos enumerados en la Tabla 2 a continuación:

Tabla 2. Secuencias promotoras

Promotor (SEQ ID NO.)	Secuencia
Promotor de BclA (<i>B. anthracis</i> Sterne) (SEQ ID NO: 85)	TAATCACCCCTCTTCCAAATCAATCATATGTTTATACATATACTAAACT TTCCATTTTTTTTAAATTGTTCAAGTAGTTTAAGATTTCTTTTCAATAAT TCAAATGTCCGTGTCATTTTCTTTCGGTTTTGCATCTACTATATAATG AACGCTTTATGGAGGTGAATTTATG
Promotor de BetA (<i>B. anthracis</i> Sterne) (SEQ ID NO: 86)	ATTTATTTTCATTCAATTTTTCTATTTAGTACCTACCGCACTCACAAAA AGCACCTCTCATTAATTTATATTATAGTCATTGAAATCTAATTTAATGA AATCATCATACTATATGTTTTATAAGAAGTAAAGGTACCATACTTAA TTAATACATATCTATACACTTCAATATCACAGCATGCAGTTGAATTAT ATCCAACCTTTCATTTCAAATTAATAAGTGCCTCCGCTATTGTGAATG TCATTTACTCTCCCTACTACATTTAATAATTATGACAAGCAATCATAG GAGGTTACTACATG
Promotor de BAS1882	AATTACATAACAAGAACTACATTAGGGAGCAAGCAGTCTAGCGAAAG CTAACTGCTTTTTTATTAAATAACTATTTTATTAAATTTTCATATATACA

(continuación)

Promotor (SEQ ID NO.)	Secuencia
(<i>B. anthracis</i> Sterne) (SEQ ID NO: 87)	ATCGCTTGTCCATTTCAATTTGGCTCTACCCACG <u>CATTACTA</u> TTAGTA ATATGAATTTTTTCAGAGGTGGATTTTATT
Promotor del gen 3572 (<i>B. weihenstephensis</i> KBAB 4) (SEQ ID NO: 88)	CTATGATTTAAGATACACAATAGCAAAAGAGAAACATATTATATAAC GATAAATGAACTTATGTATATGTATGGTAACTGTATATATTACTACA ATACAGTATACTCATAGGAGGTAGGTATG
Promotor de la proteína propulsor β YVTN (<i>B. weihenstephensis</i> KBAB 4) (SEQ ID NO: 89)	GGTAGGTAGATTTGAAATATGATGAAGAAAAGGAATAACTAAAAGGA GTCGATATCCGACTCCTTTTAGTTATAAATAATGTGGAATTAGAGTAT AATTTTATATAGGTATATTGTATTAGATGAACGCTTTATCCTTTAATTG TGATTAATGATGGATTGTAAGAGAAGGGGCTTACAGTCCTTTTTTTAT GGTGTTCTATAAGCCTTTTTTAAAAGGGGTACACCCACACCCAAAAA CAGGGGGGGTTATAACTACATATTGGATGTTTTGTAACTACAAGAAT CGGTATTAATTACCCTGTAAATAAGTTATGTGTATATAAGGTAACCTT <u>ATATATTC</u> CTCTACAATAAAATAAAGGAGGTAATAAAGTG
Promotor de Cry 1A (<i>B. thuringiensis</i> HD-73) (SEQ ID NO: 90)	AACCCTTAATGCATTGGTTAAACATTGTAAAGTCTAAAGCATGGATAA TGGGCGAGAAGTAAGTAGATTGTTAACACCTTGGGTCAAAAATTGAT ATTTAGTAAAATTAGTTGCACTTTGTGCATTTTTT <u>CATAAGATGAGTC</u> <u>ATATGTTTT</u> AAATTGTAGTAATGAAAAACAGTATTATATCATAATGA <u>ATTGGTATCTTAATAAAAGAGATGGAGGTA</u> ACTTA
Promotor de ExsY (<i>B. thuringiensis</i> serovar konkukian cepa 97-27) (SEQ ID NO: 91)	TAATTCCACCTTCCCTTATCCTCTTTCGCCTATTTAAAAAAGGTCTTG AGATTGTGACCAAATCTCCTCAACTCCAATATCTTATTAATGTAAATA CAAACAAGAAGATAAGGAGTGACATTAA
Promotor de CotY (<i>B. thuringiensis</i> Al Hakam) (SEQ ID NO: 92)	AGGATGTCTTTTTTTATATTGTATTATGTACATCCCTACTATATAAATT CCCTGCTTTTATCGTAAGAATTAACGTAATATCAACCATATCCCGTTC <u>ATATTGTA</u> GTAGTGTATGTCAGAACTCACGAGAAGGAGTGAACATAA
Promotor de YjcA (<i>B. thuringiensis</i> serovar kurstaki cepa HD73) (SEQ ID NO: 93)	TTAATGTCACCTCTTATCTTCTTGTGTTTGTATTTACATT <u>AATAAGATATT</u> GGAGTTGAGGAGATTTGGTCACAATCTCAAGACCTTTTTTTTAAATAG GCGAAAGAGGATAAGGGAAGGTGGAATTA
Promotor de YjcB (<i>B. thuringiensis</i> serovar kurstaki cepa HD73) (SEQ ID NO: 94)	ATATATTTTTCATAATACGAGAAAAAGCGGAGTTTAAAAGAATGAGGG AACGGAAATAAAGAGTTGTT <u>CATATAGTAA</u> AATAGACAGAATTGACAG TAGAGGAGA

(continuación)

Promotor (SEQ ID NO.)	Secuencia
Promotor de BxpB (<i>B. thuringiensis</i> Al Hakam) (SEQ ID NO: 95)	AAACTAAATAATGAGCTAAGCATGGATTGGGTGGCAGAATTATCTGC CACCCAATCCATGCTTAAAGAGTATTATTATGTAAATTTCTTAAAATT GGGAACTTGTCTAGAACATAGAACCTGTCCTTTTCATTAAGTAAAG TAGAAACAGATAAAGGAGTGAAAAACA
Promotor de ramnosa (<i>B. thuringiensis</i> Al Hakam) (SEQ ID NO: 96)	ATTCACTACAACGGGGATGAGTTTGATGCGGATACATATGAGAAGTA CCGGAAAGTGTTTGTAGAACATTACAAAGATATATTATCTCCATCATA AAGGAGAGATGCAAAG
Promotor de CotY/CotZ (<i>B. anthracis</i> Sterne) (SEQ ID NO: 97)	CGCGCACCCTTCGTCGTACAACAACGCAAGAAGAAGTTGGGGATAC AGCAGTATTCTTATTCAGTGATTTAGCACGCGGCGTAACAGGAGAAA ACATTCACGTTGATTCAGGGTATCATATCTTAGGATAAATATAATATT AATTTTAAAGGACAATCTCTACATGTTGAGATTGTCCTTTTTTATTTGTT CTTAGAAAGAACGATTTTTTAACGAAAGTTCTTACCACGTTATGAATAT AAGTATAATAGTACACGATTTATTCAGCTACGTA
Promotor de BclC (<i>B. anthracis</i> Sterne) (SEQ ID NO: 98)	TGAAGTATCTAGAGCTAATTTACGCAAAGGAATCTCAGGACAACACT TTCGCAACACCTATATTTTAAATTTAATAAAAAAGAGACTCCGGAGT CAGAAATTATAAAGCTAGCTGGGTTCAAATCAAAAATTTCACTAAAA CGATATTATCAATACGCAGAAAATGGAAAAAACGCCTTATCATAAGG CGTTTTTTCCATTTTTTCTTCAAACAAACGATTTTACTATGACCATTTA ACTAATTTTTGCATCTACTATGATGAGTTTCATTACATTCTCATTAG AAAGGAGAGATTTAATG
Promotor de Sigma K (<i>B. anthracis</i> Sterne) (SEQ ID NO: 99)	TATATCATATGTAAAATTAGTTCTTATTCCCACATATCATATAGAATC GCCATATTATACATGCAGAAAATAAGTATGGTATTATTCTTAAATTC TTTAGCACCTTCTAATATTACAGATAGAATCCGTCAATTTCAACAGTG AACATGGATTTCTTCTGAACACAACCTTTTTTCTTTCCTTATTTCCAAA AAGAAAAGCAGCCCATTTTAAAATACGGCTGCTTGTAATGTACATTA
Promotor de InhA (<i>B. thuringiensis</i> Al Hakam) (SEQ ID NO: 100)	TATCACATAACTCTTTATTTTTAATATTTTCGACATAAAGTGAAACTTT AATCAGTGGGGGCTTTGTTTCATCCCCCACTGATTATTAATTGAACCA AGGGATAAAAAGATAGAGGGTCTGACCAGAAAACCTGGAGGGGCATGA TTCTATAACAAAAAGCTTAATGTTTATAGAATTATGTCTTTTTTATATAG GGAGGGTAGTAAACAGAGATTTGGACAAAAATGCACCGATTTATCTG AATTTTAAGTTTATAAAGGGGAGAAATG
Operón 1 de la glicosiltransfer asa del grupo BclA (<i>B. thuringiensis</i> cepa 97-27) (SEQ ID NO: 101)	ATTTTTTACTTAGCAGTAAACTGATATCAGTTTTACTGCTTTTTTCATT TTTAAATTCAATCATTAATCTTCCTTTTCTACATAGTCATAATGTTGT ATGACATTCCGTAGGAGGCACTTATA

(continuación)

Promotor (SEQ ID NO.)	Secuencia
Operón 2 de la glicosiltransferasa del grupo BclA (<i>B. thuringiensis</i> rovar kurstaki cepa HD73) (SEQ ID NO: 102)	ACATAAATTCACCTCCATAAAGCGTTCATTATATAGTAGATGCAAAAC CGAAAGAAAATGACACGGACATTTGAATTATTGAAAAGAAATCTTAA ACTACTTGAACAATTTAAAAAAATGGAAAGTTTAGTATATGTATAAC <u>ATATGATTG</u> ATTTGGAAGAGGGTGATTA
Promotor de la glicosiltransferasa (<i>B. thuringiensis</i> Al Hakam) (SEQ ID NO: 103)	TTCTATTTTCCAAC <u>CATAACATG</u> CTACGATTAAATGGTTTTTTTGCAAAT GCCTTCTTGGGAAGAAGGATTAGAGCGTTTTTTTTATAGAAACCAAAAC TCATTAACAATTTTAAGTTAATGACTTTTTTGTGCTTTAAGAGGTT TTATGTTACTATAATTATAGTATCAGGTACTAATAACAAGTATAAGTA TTTCTGGGAGGATATATCA

En las secuencias promotoras enumeradas en la Tabla 2 anterior, las ubicaciones de las secuencias promotoras de la polimerasa específicas de la esporulación sigma-K se indican en negrita y subrayado. El promotor de CryIA (*B. thuringiensis* HD-73; SEQ ID NO: 90) tiene un total de cuatro secuencias sigma-K, dos de los cuales se superponen entre sí, como se indica mediante el doble subrayado en la Tabla 2.

Los promotores de esporulación de alta expresión preferidos para su uso en la expresión de las proteínas de fusión en una bacteria *Bacillus* incluyen el promotor de BetA (*B. anthracis* Sterne; SEQ ID NO: 86), el promotor de BclA (*B. anthracis* Sterne; SEQ ID NO: 85), los promotores de los operones 1 y 2 de la glicosiltransferasa del grupo BclA (*B. anthracis* Sterne; las SEQ ID NO: 101 y 102) y el promotor de la proteína propulsor β YVTN (*B. weihenstephanensis* KBAB 4; SEQ ID NO: 89).

En cualquiera de las bacterias *Bacillus* recombinantes descritas en el presente documento, la proteína de fusión puede expresarse bajo el control de un promotor de esporulación que comprende una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos un 80 %, al menos un 90%, al menos un 95 %, al menos un 98%, al menos un 99 % o un 100 % de identidad con una secuencia de ácido nucleico de una cualquiera de las SEQ ID NO: 85-103.

Cuando el promotor de esporulación comprende una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos un 80 %, al menos un 90%, al menos un 95 %, al menos un 98 % o al menos un 99 % de identidad con una secuencia de ácido nucleico de una cualquiera de las SEQ ID NO: 85-103, la secuencia o secuencias promotoras de la polimerasa específica de la esporulación sigma-K tienen preferentemente un 100 % de identidad con los nucleótidos correspondientes de la SEQ ID NO: 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102 o 103. Por ejemplo, como se ilustra en la Tabla 2 anterior, el promotor de BclA de *B. anthracis* Sterne (SEQ ID NO: 85) tiene secuencias promotoras de polimerasa específicas de la esporulación de sigma-K en los nucleótidos 24-32, 35-43 y 129-137. Por lo tanto, si el promotor de esporulación comprende una secuencia que tiene al menos un 90 % de identidad con la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 85, se prefiere que los nucleótidos del promotor de esporulación correspondientes a los nucleótidos 24-32, 35-43 y 129-137 de la SEQ ID NO: 85 tengan un 100 % de identidad con los nucleótidos 24-32, 35-43 y 129-137 de la SEQ ID NO: 85.

30 Formulaciones

También se divulgan formulaciones que comprenden cualquiera de los miembros de bacterias *Bacillus* recombinantes analizados en la sección anterior y un vehículo agrícolamente aceptable.

El vehículo agrícolamente aceptable puede ser cualquier vehículo adecuado para su uso agrícola. Por ejemplo, los vehículos agrícolamente aceptables adecuados incluyen, pero sin limitación, dispersantes, tensioactivos, aditivos, agua, espesantes, agentes antiaglomerantes, descomposición de residuos, formulaciones de compostaje, aplicaciones granulares, tierra de diatomeas, aceites, agentes colorantes, estabilizantes, conservantes, polímeros, recubrimientos y combinaciones de los mismos.

El aditivo puede comprender un aceite, un caucho, una resina, una arcilla, a polioxietilenglicol, un terpeno, un viscoso orgánico, un éster de ácido graso, un alcohol sulfatado, un sulfonato de alquilo, un sulfonato de petróleo, un sulfato de alcohol, un alquilbutanodiamato de sodio, un poliéster de tiobutanodioato de sodio, un derivado de benceno acetónitrilo, un material proteínico (por ejemplo, un producto lácteo, harina de trigo, sémola de soja, sangre, albúmina, gelatina o una combinación de los mismos) o una combinación de los mismos.

El espesante puede comprender un alquilsulfonato de polietilenglicol de cadena larga, un oleato de polioxietileno o una combinación de los mismos.

5 El tensioactivo puede comprender un aceite de petróleo pesado, un destilado de petróleo pesado, un éster de ácido graso de poliol, un éster de ácido graso polietoxilado, un aril alquil polioxietilenglicol, un acetato de alquil amina, un aril sulfonato de alquilo, un alcohol polihídrico, un fosfato de alquilo, o una combinación de los mismos.

10 El antiaglomerante comprende una sal de sodio, un carbonato de calcio, tierra de diatomeas o una combinación de los mismos. Por ejemplo, la sal de sodio puede comprender una sal de sodio de naftalenosulfonato de monometilo, una sal de sodio de naftalenosulfonato de dimetilo, un sulfito de sodio, un sulfato de sodio o una combinación de los mismos.

15 Los vehículos agrícolamente aceptables adecuados incluyen vermiculita, carbón vegetal, barro prensa de carbonatación de fábrica de azúcar, cascarilla de arroz, carboximetilcelulosa, turba, perlita, arena fina, carbonato de calcio, harina, alumbre, un almidón, talco, polivinilpirrolidona o una combinación de los mismos.

20 La formulación puede comprender una formulación de recubrimiento de semillas, una formulación líquida para la aplicación a plantas o a un medio de crecimiento vegetal, o una formulación sólida para la aplicación a plantas o a un medio de crecimiento vegetal.

Por ejemplo, la formulación de recubrimiento de semillas puede comprender una solución acuosa o a base de aceite para la aplicación a semillas. Como alternativa, la formulación de recubrimiento de semillas puede comprender una formulación en polvo o granular para la aplicación a semillas.

25 La formulación líquida para la aplicación a plantas o a un medio de crecimiento vegetal puede comprender una formulación concentrada o una formulación lista para usar.

30 La formulación sólida para la aplicación a plantas o a un medio de crecimiento vegetal puede comprender una formulación granular o un agente en polvo.

Cualquiera de las formulaciones anteriores también puede comprender un producto agroquímico, por ejemplo, un fertilizante, un material fertilizante de micronutrientes, un insecticida, un herbicida, una enmienda para el crecimiento vegetal, un fungicida, un insecticida, un molusquicida, un algicida, un inoculante bacteriano, un inoculante fúngico o una combinación de los mismos.

35 El fertilizante puede comprender un fertilizante líquido.

40 El abono puede comprender sulfato de amonio, nitrato de amonio, nitrato de sulfato de amonio, cloruro de amonio, bisulfato de amonio, polisulfuro de amonio, tiosulfato de amonio, amoníaco acuoso, amoníaco anhidrido, polifosfato de amonio, sulfato de aluminio, nitrato de calcio, nitrato de amonio y calcio, sulfato de calcio, magnesita calcinada, caliza calcítica, óxido de calcio, nitrato de calcio, caliza dolomítica, cal hidratada, carbonato de calcio, fosfato de diamonio, fosfato de monoamonio, nitrato de magnesio, sulfato de magnesio, nitrato de potasio, cloruro de potasio, sulfato de potasio y magnesio, sulfato de potasio, nitratos de sodio, caliza magnesiana, magnesita, urea, urea-formaldehídos, nitrato amónico de urea, urea recubierta con azufre, urea recubierta con polímero, isobutiliden diurea, $K_2SO_4 \cdot 2MgSO_4$, kainita, silvinita, kieserita, sales de Epsom, azufre elemental, arcilla calcárea, conchas de ostra molidas, harina de pescado, tortas de aceite, estiércol de pescado, harina de sangre, fosfato de roca, superfosfatos, escoria, harina de huesos, ceniza de madera, estiércol, guano de murciélago, musgo de turbera, abono, arena verde, harina de semilla de algodón, harina de plumas, harina de cangrejo, emulsión de pescado, ácido húmico o una combinación de los mismos.

50 El material fertilizante de micronutrientes puede comprender ácido bórico, un borato, una frita de boro, sulfato de cobre, una frita de cobre, un quelato de cobre, un decahidrato de tetraborato de sodio, un sulfato de hierro, un óxido de hierro, sulfato de hierro y amonio, una frita de hierro, un quelato de hierro, un sulfato de manganeso, un óxido de manganeso, un quelato de manganeso, un cloruro de manganeso, una frita de manganeso, a molibdato de sodio, ácido molibdico, un sulfato de cinc, un óxido de cinc, un carbonato de cinc, una frita de cinc, fosfato de cinc, un quelato de cinc o una combinación de los mismos.

60 El insecticida puede comprender un organofosfato, un carbamato, un piretroide, un acaricida, un ftalato de alquilo, ácido bórico, un borato, un fluoruro, azufre, una urea haloaromática sustituida, un éster de hidrocarburo, un insecticida de base biológica o una combinación de los mismos.

65 El herbicida puede comprender un compuesto de clorofenoxi, un compuesto nitrofenólico, un compuesto nitrocresólico, un compuesto de dipiridilo, una acetamida, un ácido alifático, una anilida, una benzamida, un ácido benzoico, un derivado del ácido benzoico, ácido anísico, un derivado del ácido anísico, un benzonitrilo, dióxido de benzotiadiazinona, un tiocarbamato, un carbamato, un carbanilato, cloropiridinilo, un derivado de ciclohexenona, un derivado de dinitroaminobenceno, un compuesto de fluorodinitrotoluidina, isoxazolidinona, ácido nicotínico,

isopropilamina, un derivado de isopropilamina, oxadiazolinona, un fosfato, un ftalato, un compuesto de ácido picolínico, una triazina, un triazol, un uracilo, un derivado de urea, endotal, clorato de sodio o una combinación de los mismos.

El fungicida puede comprender un benceno sustituido, un tiocarbamato, un bis ditiocarbamato de etileno, una tioftalidamida, un compuesto de cobre, un compuesto de organomercurio, un compuesto de organoestaño, un compuesto de cadmio, anilacina, benomilo, ciclohexamida, dodina, etridiazol, iprodiona, metlaxilo, tiamimefón, triforina o una combinación de los mismos.

El inoculante fúngico puede comprender un inoculante fúngico de la familia *Glomeraceae*, un inoculante fúngico de la familia *Claroidoglomeraceae*, un inoculante fúngico de la familia *Gigasporaceae*, un inoculante fúngico de la familia *Acaulosporaceae*, un inoculante fúngico de la familia *Sacculosporaceae*, un inoculante fúngico de la familia *Entrophosporaceae*, un inoculante fúngico de la familia *Pacidsporaceae*, un inoculante fúngico de la familia *Diversisporaceae*, un inoculante fúngico de la familia *Paraglomeraceae*, un inoculante fúngico de la familia *Archaeosporaceae*, un inoculante fúngico de la familia *Geosiphonaceae*, un inoculante fúngico de la familia *Ambisporaceae*, un inoculante fúngico de la familia *Scutellosporaceae*, un inoculante fúngico de la familia *Dentiscultataceae*, un inoculante fúngico de la familia *Racocetraceae*, un inoculante fúngico del filo *Basidiomycota*, un inoculante fúngico del filo *Ascomycota*, un inoculante fúngico del filo *Zygomycota* o una combinación de los mismos.

El inoculante bacteriano puede comprender un inoculante bacteriano del género *Rhizobium*, un inoculante bacteriano del género *Bradyrhizobium*, un inoculante bacteriano del género *Mesorhizobium*, un inoculante bacteriano del género *Azorhizobium*, un inoculante bacteriano del género *Allorhizobium*, un inoculante bacteriano del género *Sinorhizobium*, un inoculante bacteriano del género *Kluyvera*, un inoculante bacteriano del género *Azotobacter*, un inoculante bacteriano del género *Pseudomonas*, un inoculante bacteriano del género *Azospirillum*, un inoculante bacteriano del género *Bacillus*, un inoculante bacteriano del género *Streptomyces*, un inoculante bacteriano del género *Paenibacillus*, un inoculante bacteriano del género *Paracoccus*, un inoculante bacteriano del género *Enterobacter*, un inoculante bacteriano del género *Alcaligenes*, un inoculante bacteriano del género *Mycobacterium*, un inoculante bacteriano del género *Trichoderma*, un inoculante bacteriano del género *Gliocladium*, un inoculante bacteriano del género *Glomus*, un inoculante bacteriano del género *Klebsiella* o una combinación de los mismos.

El inoculante bacteriano puede comprender una cepa de bacterias que promueve el crecimiento vegetal. La cepa de bacterias que promueve el crecimiento vegetal puede comprender una cepa de bacterias que produce una toxina insecticida (por ejemplo, una toxina Cry), produce un compuesto fungicida (por ejemplo, una β -1,3-glucanasa, una quitosinasa, una liasa o una combinación de las mismas), produce un compuesto nematocida (por ejemplo, una toxina Cry), produce un compuesto bactericida, es resistente a uno o más antibióticos, comprende uno o más plásmidos que se replican libremente, se une a raíces de plantas, coloniza raíces de plantas, forma biopelículas, solubiliza nutrientes, secreta ácidos orgánicos o cualquier combinación de los mismos.

Por ejemplo, el inoculante bacteriano puede comprender *Bacillus aryabhattai* CAP53 (NRRL N.º B-50819), *Bacillus aryabhattai* CAP56 (NRRL N.º B-50817), *Bacillus flexus* BT054 (NRRL N.º B-50816), *Paracoccus kondratievae* NC35 (NRRL N.º B-50820), *Bacillus mycoides* BT155 (NRRL N.º B-50921), *Enterobacter cloacae* CAP12 (NRRL N.º B-50822), *Bacillus nealsonii* BOBA57 (NRRL N.º NRRL B-50821), *Bacillus mycoides* EE118 (NRRL N.º B-50918), *Bacillus subtilis* EE148 (NRRL N.º B-50927), *Alcaligenes faecalis* EE107 (NRRL N.º B-50920), *Bacillus mycoides* EE141 (NRRL N.º B-50916), *Bacillus mycoides* BT46-3 (NRRL N.º B-50922), bacteria *Bacillus* EE128 (NRRL N.º B-50917), *Bacillus thuringiensis* BT013A (NRRL N.º B-50924), *Paenibacillus massiliensis* BT23 (NRRL N.º B-50923), bacteria *Bacillus* EE349 (NRRL N.º B-50928), *Bacillus subtilis* EE218 (NRRL N.º B-50926), *Bacillus megaterium* EE281 (NRRL N.º B-50925) o una combinación de los mismos. Cada una de estas cepas se depositó en el Servicio de Investigación Agrícola (ARS) del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA), que tiene la dirección 1815 North University Street, Peoria, Illinois 61604 EE.UU., el 11 de marzo de 2013 (*Bacillus aryabhattai* CAP53, *Bacillus aryabhattai* CAP56, *Bacillus flexus* BT054, *Paracoccus kondratievae* NC35, *Enterobacter cloacae* CAP12 y *Bacillus nealsonii* BOBA57) o el 10 de marzo de 2014 (*Bacillus mycoides* BT155, *Bacillus mycoides* EE118, *Bacillus subtilis* EE148, *Alcaligenes faecalis* EE107, *Bacillus mycoides* EE141, *Bacillus mycoides* BT46-3, bacteria *Bacillus* EE128, *Bacillus thuringiensis* BT013A, *Paenibacillus massiliensis* BT23, *Bacillus* bacteria EE349, *Bacillus subtilis* EE218 y *Bacillus megaterium* EE281) y se identifica mediante los números NRRL proporcionados entre paréntesis.

Estas cepas que promueve el crecimiento vegetal se aislaron de las rizosferas de diversas plantas vigorosas y se identificaron por sus secuencias de ARNr 16S (proporcionadas en el presente documento como las SEQ ID NO. 104-121) y a través de ensayos bioquímicos. Las cepas se identificaron al menos hasta su designación de género por medio de indicadores bioquímicos y morfológicos convencionales. Los ensayos bioquímicos para cepas gramnegativas confirmadas tales como *Paracoccus kondratievae*, *Alcaligenes faecalis* y *Enterobacter cloacae* incluyeron el crecimiento en medio MacConkey y agar nutritivo, examen microscópico, crecimiento en medio de NaCl al 5 % y al 7,5 %, crecimiento a pH 5 y pH 9, crecimiento a 42 °C y 50 °C, la capacidad de producir ácido tras la fermentación con celobiosa, lactosa, glicerol, glucosa, sacarosa, d-manitol y almidón; producción de pigmentos fluorescentes; hidrólisis de gelatina; reducción de nitrato; hidrólisis de almidón; reacción de oxidasa; producción de catalasa; producción de ureasa y motilidad. De forma similar, los ensayos bioquímicos para cepas grampositivas confirmadas tales como *Bacillus* y *Paenibacillus* incluyeron crecimiento en medio PEA y agar nutritivo, examen microscópico, crecimiento en medio de NaCl al 5 % y al 7,5 %, crecimiento a pH 5 y pH 9, crecimiento a 42 °C y 50 °C,

la capacidad de producir ácido tras la fermentación con celobiosa, lactosa, glicerol, glucosa, sacarosa, d-manitol y almidón; producción de pigmentos fluorescentes; hidrólisis de gelatina; reducción de nitrato; producción de catalasa, hidrólisis de almidón; reacción de oxidasa, producción de ureasa y motilidad. La identificación de estas cepas y la demostración de sus efectos que promueven el crecimiento vegetal se describen adicionalmente en los Ejemplos a continuación en el presente documento.

Por ejemplo, la formulación puede comprender una cepa de bacterias que promueve el crecimiento vegetal que comprende *Paracoccus kondratievae* NC35, *Bacillus aryabhatai* CAP53 o *Bacillus megaterium* EE281, en donde la formulación comprende además cualquiera de las bacterias *Bacillus* recombinantes descritas en el presente documento, incluyendo cualquiera de las cepas de bacteria *Bacillus* que promueven el crecimiento vegetal recombinante del presente documento (por ejemplo, *Bacillus mycoides* recombinante BT155, *Bacillus mycoides* EE141 o *Bacillus thuringiensis* BT013A). La cepa de bacteria *Bacillus* que promueve el crecimiento vegetal recombinante puede expresar cualquiera de las proteínas de fusión descritas en el presente documento, por ejemplo, una proteína de fusión que comprende la secuencia de direccionamiento de la SEQ ID NO: 60 y un péptido no hormonal (por ejemplo, inhibidor de tripsina de Kunitz (KTI)), una enzima implicada en la producción o activación de un compuesto estimulante del crecimiento vegetal (por ejemplo, una quitosinasa), una proteína o péptido de unión a plantas (por ejemplo, TasA); una proteína o péptido que protege una planta frente a un patógeno (por ejemplo, TasA), o una enzima que degrada o modifica una fuente de nutrientes bacteriana, fúngica o vegetal (por ejemplo, una fosfatasa tal como PhoA o fitasa, o una endoglucanasa).

Métodos para promover el crecimiento vegetal

La presente invención también se refiere a métodos para estimular el crecimiento vegetal. El método para estimular el crecimiento vegetal comprende introducir en un medio de crecimiento vegetal cualquiera de las bacterias *Bacillus* recombinantes analizadas anteriormente en la medida en que las bacterias *Bacillus* recombinantes comprenden *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus pseudomycoides*, *Bacillus samanii*, *Bacillus gaemokensis*, *Bacillus weihenstephensis*, o una combinación de los mismos, en donde cuando la bacteria *Bacillus* recombinante comprende *Bacillus anthracis*, el método comprende además inactivar la bacteria *Bacillus* recombinante antes de su introducción en el medio de crecimiento vegetal o de su aplicación a la planta, la semilla vegetal o el área que rodea la planta o la semilla vegetal; y

la proteína de fusión comprende:

(A) al menos una proteína o péptido estimulante del crecimiento vegetal, en donde la proteína o péptido estimulante del crecimiento vegetal comprende:

una hormona peptídica que comprende una fitosulfocina, clavata 3 (CLV3) o sistemina;
un péptido no hormonal que comprende un péptido eNOD40, RHPP, POLARIS o inhibidor de la tripsina de Kunitz (KTI);
una enzima implicada en la producción o activación de un compuesto estimulante del crecimiento vegetal, en donde la enzima implicada en la producción o activación de un compuesto estimulante del crecimiento vegetal comprende una aminotransferasa, una amina oxidasa, una peptidasa, una proteasa, una adenosina fosfato isopenteniltransferasa, una fosfatasa, una quitosinasa, una quitinasa, una β -1,3-glucanasa, una β -1,4-glucanasa, una β -1,6-glucanasa o una desaminasa del ácido aminociclopropano-1-carboxílico; o
una enzima que degrada o modifica una fuente de nutrientes bacteriana, fúngica o vegetal, en donde la enzima que degrada o modifica una fuente de nutrientes bacteriana, fúngica o vegetal comprende una celulasa, una lipasa, una lignina oxidasa, una proteasa, una glucósido hidrolasa, una fosfatasa, una nucleasa, una amidasa, una nitrato reductasa, una nitrito reductasa, una amilasa, una ligninasa, una glucosidasa, una fosfolipasa, una fitasa, una pectinasa, una glucanasa, una sulfatasa, una ureasa o una xilanasas; y cualquiera de

(B) una secuencia de direccionamiento, proteína de exosporio o fragmento de proteína de exosporio que dirige la proteína de fusión al exosporio de la bacteria *Bacillus* recombinante, en donde la secuencia de direccionamiento, proteína de exosporio o fragmento de proteína de exosporio comprende la secuencia X_1 - X_2 - X_3 - X_4 - X_5 - X_6 - X_7 - X_8 - X_9 - X_{10} - X_{11} - X_{12} - X_{13} - X_{14} - X_{15} - X_{16} , en donde:

X_1 es alanina (A), lisina (K), isoleucina (I), serina (S), arginina (R), metionina (M), asparagina (N), leucina (L) o está ausente;
 X_2 es fenilalanina (F), leucina (L), isoleucina (I) o metionina (M);
 X_3 es ácido aspártico (D), ácido glutámico (E), leucina (L), glicina (G), asparagina (N), serina (S) o prolina (P);
 X_4 es prolina (P) o serina (S);
 X_5 es asparagina (N), ácido aspártico (D), ácido glutámico (E), glicina (G), cisteína (C) o lisina (K);
 X_6 es leucina (L), asparagina (N), serina (S) o isoleucina (I);
 X_7 es valina (V) o isoleucina (I);
 X_8 es glicina (G);
 X_9 es prolina (P);
 X_{10} es treonina (T) o prolina (P);

X₁₁ es leucina (L) o fenilalanina (F);
 X₁₂ es prolina (P);
 X₁₃ es prolina (P), valina (V), serina (S) o isoleucina (I);
 X₁₄ es isoleucina (I), valina (V), leucina (L) o metionina (M);
 X₁₅ es prolina (P), glutamina (Q) o treonina (T); y
 X₁₆ es prolina (P), treonina (T) o serina (S);

o

(C) una proteína de exosporio que dirige la proteína de fusión al exosporio de la bacteria *Bacillus* recombinante, comprendiendo la proteína de exosporio:

- (a) una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 95 % de identidad con la SEQ ID NO: 72;
- (b) una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 95 % de identidad con la SEQ ID NO: 73;
- (c) una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 95 % de identidad con la SEQ ID NO: 74;
- (d) una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 95 % de identidad con la SEQ ID NO: 76;
- (e) una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 95 % de identidad con la SEQ ID NO: 80;
- (f) una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 95 % de identidad con la SEQ ID NO: 81; o
- (g) una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 95 % de identidad con la SEQ ID NO: 83;

en donde la proteína o péptido estimulante del crecimiento vegetal está unido operativamente a la proteína de exosporio;

en donde la proteína o péptido estimulante del crecimiento vegetal está unido operativamente a la secuencia de direccionamiento, proteína de exosporio o fragmento de proteína de exosporio; y

en donde las plantas cultivadas en presencia de la bacteria *Bacillus* recombinante presenta un crecimiento mayor en comparación con las plantas cultivadas en ausencia de la bacteria *Bacillus* recombinante, en las mismas condiciones.

Como alternativa, cualquiera de las bacterias *Bacillus* recombinantes analizadas anteriormente pueden aplicarse a una planta, a una semilla vegetal o a un área que rodea una planta o una semilla vegetal que proporciona las bacterias *Bacillus* bacteria recombinantes expresa una proteína de fusión que comprende al menos una proteína o péptido que estimula el crecimiento vegetal y una secuencia de direccionamiento, proteína de exosporio o fragmento de proteína de exosporio. En dichos métodos, la proteína o péptido que estimula el crecimiento vegetal está unido físicamente al exosporio de la bacteria *Bacillus* recombinante.

Como alternativa, el método para estimular el crecimiento vegetal comprende introducir una bacteria *Bacillus* recombinante que expresa una proteína de fusión en un medio de crecimiento vegetal o aplica una bacteria *Bacillus* recombinante que expresa una proteína de fusión a una planta, una semilla vegetal o un área que rodea una planta o una semilla vegetal. La proteína de fusión comprende al menos una proteína o péptido estimulante del crecimiento vegetal y una secuencia de direccionamiento, proteína de exosporio o fragmento de proteína de exosporio. La proteína o péptido que estimula el crecimiento vegetal está unido físicamente al exosporio de la bacteria *Bacillus* recombinante.

Además, la secuencia de direccionamiento puede consistir en 16 aminoácidos y tener al menos un 43 % de identidad con los aminoácidos 20-35 de la SEQ ID NO: 1, en donde la identidad con los aminoácidos 25-35 es de al menos el 54 %. Como alternativa, la secuencia de direccionamiento puede consistir en los aminoácidos 1-35 de la SEQ ID NO: 1, los aminoácidos 20-35 de la SEQ ID NO: 1; la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 60.

La secuencia de direccionamiento puede comprender una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente un 50% de identidad con los aminoácidos 20-35 de la SEQ ID NO: 1, en donde la identidad con los aminoácidos 25-35 es de al menos aproximadamente el 63%. Como alternativa, la secuencia de direccionamiento consiste en una secuencia de aminoácidos que consiste en 16 aminoácidos y que tiene al menos aproximadamente un 50% de identidad con los aminoácidos 20-35 de la SEQ ID NO: 1, en donde la identidad con los aminoácidos 25-35 es de al menos aproximadamente el 63%.

La secuencia de direccionamiento puede comprender una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente un 50% de identidad con los aminoácidos 20-35 de la SEQ ID NO: 1, en donde la identidad con los aminoácidos 25-35 es de al menos aproximadamente el 72%. Como alternativa, la secuencia de direccionamiento consiste en una secuencia de aminoácidos que consiste en 16 aminoácidos y que tiene al menos aproximadamente un 50% de identidad con los aminoácidos 20-35 de la SEQ ID NO: 1, en donde la identidad con los aminoácidos 25-35 es de al menos aproximadamente el 72%.

La secuencia de direccionamiento puede comprender una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente un 56 % de identidad con los aminoácidos 20-35 de la SEQ ID NO: 1, en donde la identidad con los aminoácidos 25-35 es de al menos aproximadamente el 63%. Como alternativa, la secuencia de direccionamiento consiste en una secuencia de aminoácidos que consiste en 16 aminoácidos y que tiene al menos aproximadamente

un 56% de identidad con los aminoácidos 20-35 de la SEQ ID NO: 1, en donde la identidad con los aminoácidos 25-35 es de al menos aproximadamente el 63%.

La secuencia de direccionamiento puede comprender una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente un 62 % de identidad con los aminoácidos 20-35 de la SEQ ID NO: 1, en donde la identidad con los aminoácidos 25-35 es de al menos aproximadamente el 72%. Como alternativa, la secuencia de direccionamiento consiste en una secuencia de aminoácidos que consiste en 16 aminoácidos y que tiene al menos aproximadamente un 62% de identidad con los aminoácidos 20-35 de la SEQ ID NO: 1, en donde la identidad con los aminoácidos 25-35 de la SEQ ID NO: 1 es de al menos aproximadamente el 72 %.

La secuencia de direccionamiento puede comprender una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente un 68% de identidad con los aminoácidos 20-35 de la SEQ ID NO: 1, en donde la identidad con los aminoácidos 25-35 es de al menos aproximadamente el 81%. Como alternativa, la secuencia de direccionamiento consiste en una secuencia de aminoácidos que consiste en 16 aminoácidos y que tiene al menos aproximadamente un 68% de identidad con los aminoácidos 20-35 de la SEQ ID NO: 1, en donde la identidad con los aminoácidos 25-35 es de al menos aproximadamente el 81%.

La secuencia de direccionamiento puede comprender una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente un 75% de identidad con los aminoácidos 20-35 de la SEQ ID NO: 1, en donde la identidad con los aminoácidos 25-35 es de al menos aproximadamente el 72%. Como alternativa, la secuencia de direccionamiento consiste en una secuencia de aminoácidos que consiste en 16 aminoácidos y que tiene al menos aproximadamente un 75% de identidad con los aminoácidos 20-35 de la SEQ ID NO: 1, en donde la identidad con los aminoácidos 25-35 de la SEQ ID NO: 1 es de al menos aproximadamente el 72 %.

La secuencia de direccionamiento puede comprender una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente un 75% de identidad con los aminoácidos 20-35 de la SEQ ID NO: 1, en donde la identidad con los aminoácidos 25-35 es de al menos aproximadamente el 81%. Como alternativa, la secuencia de direccionamiento consiste en una secuencia de aminoácidos que consiste en 16 aminoácidos y que tiene al menos aproximadamente un 75% de identidad con los aminoácidos 20-35 de la SEQ ID NO: 1, en donde la identidad con los aminoácidos 25-35 de la SEQ ID NO: 1 es de al menos aproximadamente el 81%.

La secuencia de direccionamiento puede comprender una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente un 81 % de identidad con los aminoácidos 20-35 de la SEQ ID NO: 1, en donde la identidad con los aminoácidos 25-35 es de al menos aproximadamente el 81%. Como alternativa, la secuencia de direccionamiento consiste en una secuencia de aminoácidos que consiste en 16 aminoácidos y que tiene al menos aproximadamente un 81% de identidad con los aminoácidos 20-35 de la SEQ ID NO: 1, en donde la identidad con los aminoácidos 25-35 es de al menos aproximadamente el 81%.

La secuencia de direccionamiento puede comprender una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente un 81 % de identidad con los aminoácidos 20-35 de la SEQ ID NO: 1, en donde la identidad con los aminoácidos 25-35 es de al menos aproximadamente el 90%. Como alternativa, la secuencia de direccionamiento consiste en una secuencia de aminoácidos que consiste en 16 aminoácidos y que tiene al menos aproximadamente un 81% de identidad con los aminoácidos 20-35 de la SEQ ID NO: 1, en donde la identidad con los aminoácidos 25-35 es de al menos aproximadamente el 90%.

Como alternativa, la proteína de exosporio o fragmento de proteína de exosporio puede comprender una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98%, al menos un 99 % o un 100 % de identidad con una cualquiera de las SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 59, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83 y 84.

La proteína estimulante del crecimiento vegetal puede comprender una enzima. Por ejemplo, la enzima puede comprender una enzima que degrada o modifica una fuente de nutrientes bacteriana, fúngica o vegetal. Dichas enzimas incluyen celulasas, lipasas, lignina oxidasas, proteasas, glucósido hidrolasas, fosfatasas, nitrogenasas, nucleasas, amidasas, nitrato reductasas, nitrito reductasas, amilasas, amoníaco oxidasas, ligninasas, glucosidasas, fosfolipasas, fitasas, pectinasas, glucanasas, sulfatasas, ureasas, xilanasas y sideróforos. Cuando se introducen en un medio de crecimiento vegetal o se aplican a una planta, semilla o un área que rodea una planta o una semilla vegetal, las proteínas de fusión que comprenden enzimas que degradan o modifican una fuente de nutrientes bacteriana, fúngica o vegetal pueden ayudar en el procesamiento de nutrientes en las proximidades de la planta y dar como resultado una captación potenciada de nutrientes por la planta o por bacterias u hongos beneficiosos en las proximidades de la planta.

Las celulasas adecuadas incluyen endocelulasas (por ejemplo, una endogluconasa tal como una endoglucanasa de *Bacillus subtilis*, una endoglucanasa de *Bacillus thuringiensis*, una endoglucanasa de *Bacillus cereus* o una endoglucanasa de *Bacillus clausii*), exocelulasas (por ejemplo, una exocelulasa de *Trichoderma reesei*) y β -glucosidasas (por ejemplo, una β -glucosidasa de *Bacillus subtilis*, una β -glucosidasa de *Bacillus thuringiensis*, una β -glucosidasa de *Bacillus cereus* o una B-glucosidasa de *Bacillus clausii*).

La lipasa puede comprender una lipasa de *Bacillus subtilis*, una lipasa de *Bacillus thuringiensis*, una lipasa de *Bacillus cereus* o una lipasa de *Bacillus clausii*.

- 5 Las lignina oxidasas adecuadas comprenden lignina peroxidadas, laccasas, glioxal oxidasas, ligninasas y manganeso peroxidadas.

- 10 La proteasa puede comprender una subtilisina, una proteasa ácida, una proteasa alcalina, una proteinasa, una peptidasa, una endopeptidasa, una exopeptidasa, una termolisina, una papaína, una pepsina, una tripsina, una pronasa, una carboxilasa, una serina proteasa, una ácido glutámico proteasa, una aspartato proteasa, una cisteína proteasa, una treonina proteasa o una metaloproteasa.

- 15 La fosfatasa puede comprender una monoéster fosfórico hidrolasa, una fosfomonoesterasa (por ejemplo, PhoA4), una diéster fosfórico hidrolasa, una fosfodiesterasa, una monoéster trifosfórico hidrolasa, una anhídrido de fosforilo hidrolasa, una pirofosfatasa, una fitasa (por ejemplo, fitasa de *Bacillus subtilis* EE148 o fitasa de *Bacillus thuringiensis* BT013A), una trimetafosfatasa o una trifosfatasa.

- 20 La nitrogenasa puede comprender una nitrogenasa de la familia Nif (por ejemplo, *Paenibacillus massiliensis* NifBDEHKNXV).

- 25 En cualquiera de los métodos anteriores para estimular el crecimiento vegetal, las plantas cultivadas en el medio de crecimiento vegetal que comprende la bacteria *Bacillus* recombinante presenta un crecimiento mayor en comparación con el crecimiento vegetal en el medio de crecimiento vegetal idéntico que no contiene la bacteria *Bacillus recombinante*.

- En cualquiera de los métodos anteriores para estimular el crecimiento vegetal, la bacteria *Bacillus* recombinante puede comprender cualquiera de las cepas de bacterias que promueven el crecimiento vegetal recombinantes descritas anteriormente.

- 30 En cualquiera de los métodos anteriores para estimular el crecimiento vegetal, la proteína de fusión puede expresarse bajo el control de cualquiera de los promotores descritos anteriormente.

Métodos para proteger una planta frente a un patógeno

- 35 Se divulgan métodos para proteger una planta frente a un patógeno. Dichos métodos comprenden introducir cualquiera de las bacterias *Bacillus* recombinantes analizadas anteriormente o cualquiera de las formulaciones analizadas anteriormente en un medio de crecimiento vegetal. Como alternativa, dichos métodos comprenden aplicar cualquiera de las bacterias *Bacillus* recombinantes analizadas anteriormente o cualquiera de las formulaciones analizadas anteriormente a una planta, a una semilla vegetal o a un área que rodea una planta o una semilla vegetal. En estos métodos, la proteína o péptido que protege una planta frente a un patógeno está unido físicamente al exosporio de la bacteria *Bacillus* recombinante.

- 45 Las plantas cultivadas en el medio de crecimiento vegetal que comprende la bacteria *Bacillus* recombinante son menos susceptibles a la infección con el patógeno en comparación con las plantas cultivadas en el medio de crecimiento vegetal idéntico que no contiene la bacteria *Bacillus* recombinante. La susceptibilidad reducida del patógeno puede ser un resultado de la estimulación del sistema inmunitario de la planta por la proteína o péptido que protege una planta frente a un patógeno, o puede ser el resultado de un efecto directo o indirecto de la proteína o péptido que protege una planta frente a un patógeno sobre el patógeno.

Métodos para potenciar la resistencia al estrés en una planta

- 50 Se divulgan métodos para potenciar la resistencia al estrés en una planta. Dichos métodos comprenden introducir cualquiera de las bacterias *Bacillus* recombinantes analizadas anteriormente o cualquiera de las formulaciones analizadas anteriormente en un medio de crecimiento vegetal. Como alternativa, dichos métodos comprenden aplicar cualquiera de las bacterias *Bacillus* recombinantes analizadas anteriormente o cualquiera de las formulaciones analizadas anteriormente a una planta, a una semilla vegetal o a un área que rodea una planta o una semilla vegetal. En estos métodos, la proteína o péptido que potencia la resistencia al estrés en una planta está unido físicamente al exosporio de la bacteria *Bacillus* recombinante.

- 60 Las plantas cultivadas en el medio de crecimiento vegetal que comprende la bacteria *Bacillus* recombinante son menos susceptibles al estrés en comparación con las plantas cultivadas en el medio de crecimiento vegetal idéntico que no contiene la bacteria *Bacillus* recombinante.

Métodos para inmovilizar esporas de bacteria *Bacillus* en una planta

- 65 Se divulgan métodos para inmovilizar una spora de bacteria *Bacillus* recombinante en una planta. Estos métodos

comprenden introducir cualquiera de las bacterias *Bacillus* recombinantes analizadas anteriormente o cualquiera de las formulaciones analizadas anteriormente en un medio de crecimiento vegetal. Como alternativa, dichos métodos comprenden aplicar cualquiera de las bacterias *Bacillus* recombinantes analizadas anteriormente o cualquiera de las formulaciones analizadas anteriormente a una planta, a una semilla vegetal o a un área que rodea una planta o una semilla vegetal. La proteína o péptido de unión a plantas está unido físicamente al exosporio de la bacteria *Bacillus* recombinante.

Estos métodos permiten a la espora de bacteria *Bacillus* unirse a una planta, de manera que la espora se mantenga en la planta. Por ejemplo, estos métodos permiten a la espora de bacteria *Bacillus* unirse a la raíz de una planta o a una porción aérea de una planta (por ejemplo, follaje, tallos, frutos o flores), de manera que la espora se mantenga en la estructura de la raíz de la planta o en la porción aérea de una planta en lugar de disiparse en el medio de crecimiento vegetal o en el entorno que rodea la porción aérea de la planta.

En cualquiera de los métodos para inmovilizar una espora de bacteria *Bacillus* recombinante en una planta, la proteína o péptido de unión a plantas puede dirigir selectivamente y mantener la bacteria *Bacillus* en la planta o en una estructura o subestructura vegetal (por ejemplo, en raíces de plantas y subestructuras de raíces de plantas o en una porción aérea de una planta o una subestructura de una porción aérea de una planta).

Medio de crecimiento vegetal

En cualquiera de los métodos anteriores, el medio de crecimiento vegetal es un material que es capaz de soportar el crecimiento de una planta. El medio de crecimiento vegetal puede comprender tierra, agua, una solución acuosa, arena, grava, un polisacárido, mantillo, abono, musgo de turbera, paja, troncos, arcilla, sémola de soja, extracto de levadura o una combinación de los mismos. Por ejemplo, el medio de crecimiento vegetal comprende tierra, abono, musgo de turba o una combinación de los mismos.

El medio de crecimiento vegetal puede suplementarse opcionalmente con un sustrato para una enzima. Por ejemplo, el sustrato puede comprender triptófano, un monofosfato de adenosina, un difosfato de adenosina, un trifosfato de adenosina (por ejemplo, adenosina-3-trifosfato), indol, un trimetafosfato, ferredoxina, acetoina, diacetilo, piruvato, acetolactato, pectina, celulosa, metilcelulosa, almidón, quitina, pectina, una harina proteica, un derivado de celulosa, un fosfato, acetoina, quitosano, un derivado inactivo del ácido indol-3-acético, un derivado inactivo del ácido giberélico, un xilano, colina, un derivado de colina, prolina, una poliprolina, una harina rica en prolina, una proteína rica en prolina, fenilalanina, corismato, un arabinosilano, una grasa, una cera, un aceite, un ácido fítico, una lignina, un ácido húmico, colina, un derivado de colina o una combinación de los mismos.

Métodos de aplicación

En cualquiera de los métodos anteriores, la bacteria *Bacillus* recombinante o formulación puede introducirse en el medio de crecimiento vegetal o aplicarse a una planta, a una semilla vegetal o a un área que rodea una planta o una semilla vegetal.

Por ejemplo, el método puede comprender recubrir semillas con la bacteria *Bacillus* recombinante o una formulación que contiene la bacteria *Bacillus* recombinante antes de la siembra.

Como alternativa, el método puede comprender aplicar la bacteria *Bacillus* recombinante o formulación a una porción aérea de una planta, por ejemplo, al follaje, tallos, frutos o flores. Por ejemplo, la bacteria *Bacillus* recombinante o formulación puede pulverizarse, cepillarse, sumergirse o aplicarse de otro modo a las hojas u otras porciones aéreas de una planta.

El método puede comprender introducir la bacteria *Bacillus* recombinante en el medio de crecimiento vegetal aplicando una formulación líquida o sólida que contiene la bacteria *Bacillus* recombinante al medio (por ejemplo, suelo, abono, musgo de turba o una combinación de los mismos).

La formulación puede aplicarse al medio de crecimiento vegetal antes, simultáneamente o después de la siembra de semillas, plántulas, esquejes, bulbos o plantas en el medio de crecimiento vegetal.

Coaplicación de productos agroquímicos

Cualquiera de los métodos anteriores puede comprender además introducir al menos un producto agroquímico en el medio de crecimiento vegetal o aplicar al menos un producto agroquímico a plantas o semillas. El producto agroquímico puede ser cualquiera de los enumerados anteriormente para su inclusión en las formulaciones o cualquier combinación de los mismos.

Plantas

Los métodos anteriores pueden ponerse en práctica con una diversidad de plantas. Por ejemplo, la planta puede ser

una dicotiledónea, una monocotiledónea o una gimnosperma.

Por ejemplo, cuando la planta es una dicotiledónea, la dicotiledónea puede seleccionarse del grupo que consiste en

5 judía, guisante, tomate, pimienta, calabacita, alfalfa, almendra, semilla de anís, manzana, albaricoque, arracha, alcachofa, aguacate, cacahuete bambara, remolacha, bergamota, pimienta negra, zarzo negro, mora, arándano americano, naranja amarga, bok-choi, nuez de Brasil, fruto del pan, brócoli, haba, coles de Bruselas, trigo sarraceno, col, camelina, repollo chino, cacao, melón cantalupo, semillas de alcaravea, cardo, algarroba, zanahoria, anacardos, mandioca, semilla de ricino, coliflor, apionabo, apio, cereza, castaño, garbanzo, achicoria, cacahuete, pera, nuez de cidra, clementina, clavo, trébol, café, nuez de cola, colza, maíz, algodón, de semillas de algodón, caupí, crambe,

10 arándano rojo, berro, pepino, pasa, chirimoya, fruto de moringa oleífera, guisante de tierra, berenjena, endivia, hinojo, fenogreco, higo, avellana, lino, geranio, grosella espinosa, calabaza, uva, pomelo, guayaba, cáñamo, semilla de canamo, henna, lúpulo, judía de caballo, rábano picante, índigo, jazmín, pataca, yute, col rizada, kapok, kenaf, colinabo, naranja china, lavanda, limón, lenteja, lespedeza, lechuga, cal, regaliz, litchi, níspero, altramuz, nuez de macadamia, macis, mandarina, mangel, mango, níspero, melon, menta, morera, mostaza, nectarina, semilla de níger, nuez moscada, quingombó, oliva, opio, naranja, papaya, chirimía, guisante, melocotón, cacahuete, pera, nuez de pecán, caquis, guandú, pistacho, plátano, ciruela, granada, pomelo, semillas de amapola, patata, batata, ciruela pasa, calabaza, extractos de quebracho, membrillo, árboles del género *Cinchona*, quinoa, rábano, ramio, colza, frambuesa, *Salvia farinacea*, ruibarbo, rosa, caucho, nabo sueco, cártamo, esparceta, salsifí, sapodilla, Satsuma, escorzonera, sésamo, árbol de karité, soja, espinaca, calabacita, fresa, remolacha azucarera, caña de azúcar, girasol, colinabo,

20 pimienta dulce, mandarina, té, tef, tabaco, tomate, trébol, árbol de tung, nabo, urena, veza, nogal, sandía, yerba mate, berro de invierno, bolsa del pastor, berro de jardín, lentejilla, berro, carraspique, anís estrellado, laurel, laurel, casia, jamún, eneldo, tamarindo, menta, orégano, romero, salvia, guanábana, centella, palo María, pera bálsamo, nuez de kukui, castaño de Tahití, albahaca, arándano, hibisco, maracuyá, manzana estrella, sasafrás, cactus, hierba de San Juan, salicaria, espino, cilantro, planta de curry, kiwi, tomillo, calabacín, ulluco, jícama, hoja de agua, naranja mono espinoso, mombín amarillo, fruta estrella, amaranto, wasabi, pimienta japonesa, ciruela amarilla, mashúa, caoba china, espinaca de Nueva Zelanda, espinaca enramada, ugu, tanacetos, pamplina, jocote, manzana malaya, paracress, cardo mariano, patata china, perejil de caballo, mostaza de seto, *Melandrium mongolicus*, ágata, árbol de cassod, cardo, pimpinela, grosella estrellada, salicaria, artemisa, alazán, helecho encaje de plata, berza, primula, primavera, verdolaga, hierba nudosa, terebinto, lechuga arbórea, betel silvestre, pimienta de África occidental, yerba santa,

30 estragón, perejil, perfollo, berro de tierra, saxífraga de Burnet, hierba de miel, petasita, shiso, pimienta de agua, perilla, judía amarga, oca, kampong, apio chino, albahaca limón, albahaca tailandesa, mimosa de agua, mirra, árbol de col, moringa, mauka, helecho de avestruz, hierba de arroz, lechuga sawah amarilla, levística, hierba de la pimienta, maca, calabaza de botella, judía jacinto, espinaca de agua, morrillos, planta camaleón, espinaca de Okinawa, zumo dulce de loto, guasca, cilantro, rúcula, cardo, caigua, mitsuba, chipilín, hinojo marino, mampat, ébolo, calabaza de hiedra, cardo de col, col rizada de mar, chaya, huauzontle, mostaza etíope, cenizo gigante, espárrago de los pobres, epazote, cenizo blanco, celosía, alcaparra, grelo, col china, mizuna, saboya china, kai-lan, hojas de mostaza, espinaca malabar, acelga, malvavisco, carúncula trepadora, yute chino, pimentón, semilla de achiote, hierbabuena, ajedrea, mejorana, comino, camomila, bálsamo de limón, pimienta de Jamaica, arándano, chirimoya, mora de los pantanos, ciruela damascena, pitahaya, durián, saúco, guayabo, yaca, ciruelo de Java, azufaifo, fisalis, mangostán morado, rambután,

40 grosella roja, grosella negra, baya salal, satsuma, fruta ugli, judía azuki, judía negra, guisante de ojos negros, judía borlotti, judía común, judías verdes, alubias rojas, alubia de lima, frijoles mungo, alubia blanca, alubia pinta, ayocote, tirabeque, guisante dulce, flor de brócoli, brócoli calabrese, ortiga, pimienta, achicoria roja, daikon, rábano blanco, escaravía, tat soi, brocolini, rábano negro, raíz de bardana, haba, brócoli raab, lablab, altramuz, esterculia, frijol de terciopelo, judía alada, judías ñame, mulga, hierba de hierro, arbusto paraguas, tjunjula, wakalpulka, acacia de Kempe,

45 roble del desierto, chía, ayucos, nuez de la India, colocinto, mamoncillo, nuez maya, mongogo, nuez ogbono, nuez del paraíso y cempedak.

Como alternativa, la dicotiledónea puede ser de una familia seleccionada del grupo que consiste en *Acanthaceae* (acanto), *Aceraceae* (arce), *Achariaceae*, *Achatocarpaceae* (acatocarpus), *Actinidiaceae* (kiwi), *Adoxaceae* (moscatel), *Aextoxicaceae*, *Aizoaceae* (caléndula), *Akaniaceae*, *Alangiaceae*, *Alseuosmiaceae*, *Alzateaceae*, *Amaranthaceae* (amaranto), *Amborellaceae*, *Anacardiaceae* (zumaque), *Ancistrocladaceae*, *Anisophylleaceae*, *Annonaceae* (chirimoya), *Apiaceae* (zanahoria), *Apocynaceae* (apocináceas), *Aquifoliaceae* (acebo), *Araliaceae* (ginseng), *Aristolochiaceae* (hierba de parto), *Asclepiadaceae* (algodondilla), *Asteraceae* (margarita), *Austrobaileyaceae*, *Balanopaceae*, *Balanophoraceae* (*Balanophora*), *Balsaminaceae* (minosa sensitiva),

55 *Barbeyaceae*, *Barclayaceae*, *Basellaceae* (*Basella*), *Bataceae* (salicaria), *Begoniaceae* (begonia), *Berberidaceae* (berberis), *Betulaceae* (abedul), *Bignoniaceae* (trompeta trepadora), *Bixaceae* (planta pintalabios), *Bombacaceae* (ceiba), *Boraginaceae* (borraja), *Brassicaceae* (mostaza, también *Cruciferae*), *Bretschneideraceae*, *Brunelliaceae* (brunelia), *Bruniaceae*, *Brunoniaceae*, *Buddlejaceae* (arbusto de las mariposas), *Burseraceae* (incienso), *Buxaceae* (boj), *Byblidaceae*, *Cabombaceae* (hierba de Washington), *Cactaceae* (cactus), *Caesalpinjiaceae*, *Callitrichaceae*

60 (estrella de agua), *Calycanthaceae* (arbusto de fresa), *Calyceraceae* (calicera), *Campanulaceae* (campanilla), *Canellaceae* (canela), *Cannabaceae* (cáñamo), *Capparaceae* (alcaparra), *Caprifoliaceae* (madreselva), *Cardiopteridaceae*, *Caricaceae* (papaya), *Caryocaraceae* (souari), *Caryophyllaceae* (clavel), *Casuarinaceae* (roble), *Cecropiaceae* (cecropia), *Celastraceae* (uvas del diablo), *Cephalotaceae*, *Ceratophyllaceae* (cola de zorro), *Cercidiphyllaceae* (árbol de Katsura), *Chenopodiaceae* (bledo), *Chloranthaceae* (agüillo), *Chrysobalanaceae* (híaco), *Circaeasteraceae*, *Cistaceae* (jara), *Clethraceae* (aliso), *Clusiaceae* (mangostán, también *Guttiferae*), *Cneoraceae*, *Columelliaceae*, *Combretaceae* (almendra india), *Compositae* (margarita), *Connaraceae* (cáñamo), *Convolvulaceae*

65

- (gloria de la mañana), *Coriariaceae*, *Cornaceae* (cornáceas), *Corynocarpaceae* (karaka), *Crassulaceae* (siempreviva menor), *Crossosomataceae* (flor de roca), *Crypteroniaceae*, *Cucurbitaceae* (pepino), *Cunoniaceae* (cunonia), *Cuscutaceae* (cuscuto), *Cyrillaceae* (palo colorado), *Daphniphyllaceae*, *Datiscaceae* (cáñamo bastardo), *Davidsoniaceae*, *Degeneriaceae*, *Dialypetalanthaceae*, *Diapensiaceae* (diapensiáceas), *Dichapetalaceae*,
5 *Didiereaceae*, *Didymelaceae*, *Dilleniaceae* (manzana de elefante), *Dioncophyllaceae*, *Dipentodontaceae*, *Dipsacaceae* (cardancha), *Dipterocarpaceae* (meranti), *Donatiaceae*, *Droseraceae* (drosera), *Duckeodendraceae*, *Ebenaceae* (ébano), *Elaeagnaceae* (acebuche), *Elaeocarpaceae* (elaecarpo), *Elatinaceae* (elatináceas), *Empetraceae* (kareebos), *Epacridaceae* (epacris), *Eremolepidaceae* (amento-muérdago), *Ericaceae* (brezo), *Erythroxylaceae* (coca), *Eucommiaceae*, *Eucryphiaceae*, *Euphorbiaceae* (euforbia), *Eupomatiaceae*, *Eupteleaceae*,
10 *Fabaceae* (guisante o leguminosa), *Fagaceae* (haya), *Flacourtiaceae* (ciruela de la India), *Fouquieriaceae* (ocotillo), *Frankeniaceae* (frankeniáceas), *Fumariaceae* (fumaria), *Garryaceae* (garriáceas), *Geissolomataceae*, *Gentianaceae* (genciana), *Geraniaceae* (geranio), *Gesneriaceae* (gesneriáceas), *Globulariaceae*, *Gomortegaceae*, *Goodeniaceae* (goodeniáceas), *Greyiaceae*, *Grossulariaceae* (grosella), *Grubbiaceae*, *Gunneraceae* (gunneráceas), *Gyrostemonaceae*, *Haloragaceae* (pluma de ara), *Hamamelidaceae* (hamamelis), *Hemandiaceae* (hemandia),
15 *Himantandraceae*, *Hippocastanaceae* (caballuno), *Hippocrateaceae* (hipocrateáceas), *Hippuridaceae* (cirro de cola de caballo), *Hoplestigmataceae*, *Huaceae*, *Hugoniaceae*, *Humiriaceae*, *Hydnoraceae*, *Hydrangeaceae* (hortensia), *Hydrophyllaceae* (hidrofiláceas), *Hydrostachyaceae*, *Icacinaceae* (icacináceas), *Idiospermaceae*, *Illiciaceae* (anís estrellado), *Ixonanthaceae*, *Juglandaceae* (nogal inglés), *Julianiaceae*, *Krameriaceae* (krameriáceas), *Lacistemataceae*, *Lamiaceae* (menta, también *Labiatae*), *Lardizabalaceae* (lardizabaláceas), *Lauraceae* (laurel),
20 *Lecythidaceae* (nuez de Brasil), *Leeaceae*, *Leitneriaceae* (leitneriáceas), *Lennoaceae* (lennoáceas), *Lentibulariaceae* (utricularia), *Limnanthaceae* (limnantáceas), *Linaceae* (lino), *Lissocarpaceae*, *Loasaceae* (loasáceas), *Loganiaceae* (loganiáceas), *Loranthaceae* (lorantáceas), *Lythraceae* (lisimachia), *Magnoliaceae* (magnolia), *Malesherbiaceae*, *Malpighiaceae* (cereza de Barbados), *Malvaceae* (malva), *Marcgraviaceae* (marcgraviáceas), *Medusagynaceae*, *Medusandraceae*, *Melastomataceae* (melastomáceas), *Meliaceae* (caoba), *Melanthaceae*, *Mendonciaceae*,
25 *Menispermaceae* (menispermáceas), *Menyanthaceae* (menianto), *Mimosaceae*, *Misodendraceae*, *Mitrastemonaceae*, *Molluginaceae* (molugináceas), *Monimiaceae* (monimiáceas), *Monotropaceae* (monotropáceas), *Moraceae* (morera), *Moringaceae* (árbol del rábano picante), *Myoporaceae* (mioporáceas), *Myricaceae* (mirica), *Myristicaceae* (nuez moscada), *Myrothamnaceae*, *Myrsinaceae* (mirsináceas), *Myrtaceae* (mirto), *Nelumbonaceae* (nelumbonáceas), *Nepenthaceae* (nefentáceas), *Neuradaceae*, *Nolanaceae*, *Nothofagaceae*, *Nyctaginaceae* (maravilla), *Nymphaeaceae*
30 (lirio de agua), *Nyssaceae* (tupelo negro), *Ochnaceae* (ocnáceas), *Olcaceae* (olcáceas), *Oleaceae* (olivo), *Oliniaceae*, *Onagraceae* (onagra), *Oncothecaceae*, *Opiliaceae*, *Orobanchaceae* (orobanche), *Oxalidaceae* (oxalidáceas), *Paeoniaceae* (peonía), *Pandaceae*, *Papaveraceae* (amapola), *Papilionaceae*, *Paracryphiaceae*, *Passifloraceae* (flor de la pasión), *Pedaliaceae* (sésamo), *Pellicieraceae*, *Penaeaceae*, *Pentaphragmataceae*, *Pentaphylacaceae*, *Peridiscaceae*, *Physenaceae*, *Phytolaccaceae* (fitolaca), *Piperaceae* (pimiento), *Pittosporaceae* (pitósporo), *Plantaginaceae* (plátano), *Platanaceae* (plátano de sombra), *Plumbaginaceae* (plumbago),
35 *Podostemaceae* (podostemáceas), *Polemoniaceae* (polemoniáceas), *Polygalaceae* (poligaláceas), *Polygonaceae* (alforfón), *Portulacaceae* (verdolaga), *Primulaceae* (prímula), *Proteaceae* (proteáceas), *Punicaceae* (granado), *Pyrolaceae* (piroláceas), *Quiinaceae*, *Rafflesiaceae* (rafflesia), *Ranunculaceae* (ranúnculo), *Resedaceae* (resedáceas), *Retziaceae*, *Rhabdodendraceae*, *Rhamnaceae* (espiño amarillo), *Rhizophoraceae* (mangle rojo), *Rhoipteleaceae*,
40 *Rhynchocalycaceae*, *Rosaceae* (rosa), *Rubiaceae* (garanza), *Rutaceae* (ruda), *Sabiaceae* (sabiáceas), *Saccifoliaceae*, *Salicaceae* (sauce), *Salvadoraceae*, *Santalaceae* (sándalo), *Sapindaceae* (sapindáceas), *Sapotaceae* (sapotillo), *Sarcolaenaceae*, *Sargentodoxaceae*, *Sarraceniacaceae* (cántaro de la India), *Saururaceae* (saururáceas), *Saxifragaceae* (saxífraga), *Schisandraceae* (esquisandra), *Scrophulariaceae* (celidonia menor), *Scyphostegiaceae*, *Scyttopetalaceae*, *Simaroubaceae* (cuasia), *Simmondsiaceae* (jojoba), *Solanaceae* (patata), *Sonneratiaceae*
45 (soneratiáceas), *Sphaerosepalaceae*, *Sphenocleaceae* (spenoclea), *Stackhousiaceae* (estackhousiáceas), *Stachyuraceae*, *Staphyleaceae* (estafileáceas), *Sterculiaceae* (cacao), *Stylidiaceae*, *Styracaceae* (estoraque), *Surianaceae* (surianáceas), *Symplocaceae* (simplocáceas), *Tamaricaceae* (*Tamarix*), *Tepuianthaceae*, *Tetracentraceae*, *Tetrameristaceae*, *Theaceae* (té), *Theligonaceae*, *Theophrastaceae* (teofrastáceas), *Thymelaeaceae* (mezereo), *Ticodendraceae*, *Tiliaceae* (tilo), *Tovariaceae*, *Trapaceae* (castaña de agua),
50 *Tremandraceae*, *Trigoniaceae*, *Trimeniaceae*, *Trochodendraceae*, *Tropaeolaceae* (berro de agua), *Turneraceae* (turneráceas), *Ulmaceae* (olmo), *Urticaceae* (ortiga), *Valerianaceae* (valeriana), *Verbenaceae* (verbena), *Violaceae* (violeta), *Viscaceae* (muérdago de Navidad), *Vitaceae* (uva), *Vochysiaceae*, *Winteraceae* (winteráceas), *Xanthophyllaceae* y *Zygophyllaceae* (arbusto de creosota).
- 55 Cuando la planta es una monocotiledónea, la monocotiledónea puede seleccionarse del grupo que consiste en maíz, trigo, avena, arroz, cebada, mijo, banana, cebolla, ajo, espárrago, raigrás, mijo, fonio, raishán, hierba nipa, cúrcuma, azafrán, galanga, cebollino, cardamomo, dátil, piña, escalonia, puerro, cebolleta, castaña de agua, rampa, trigo tropical, bambú, ragi, harina de agua sin manchas, hoja de flecha, oreja de elefante, espinaca tahitiana, abacá, areca, mijo perla, nuez de betel, mijo de escoba, sorgo de escoba, citronela, coco, ñame de coco, maíz, quequisque, durra,
60 trigo duro, edo, fique, palometa negra, jengibre, dátil, hierba de esparto, pasto del Sudán, maíz de Guinea, cáñamo de Manila, henequén, maíz híbrido, jowar, citronela, zapupe, mijo espadaña, mijo de dedo, mijo cola de zorra, mijo japonés, mijo común, lino de Nueva Zelanda, avenas, palma aceitera, palma de palmira, palma de sagú, agróstide blanca, sisal, sorgo, trigo espelta, maíz dulce, sorgo dulce, taro, tef, hierba timotea, triticale, vainilla, trigo y ñame.
- 65 Como alternativa, la monocotiledónea puede ser de una familia seleccionada del grupo que consiste en *Acoraceae* (cálamo), *Agavaceae* (ágave), *Alismataceae* (plátano de agua), *Aloeaceae* (aloe), *Aponogetonaceae* (espárrago del

Cabo), *Araceae* (alocasia), *Arecaceae* (palmera), *Bromeliaceae* (bromelia), *Burmanniaceae* (burmaniáceas), *Butomaceae* (junco florido), *Cannaceae* (caña), *Centrolepidaceae*, *Commelinaceae* (comelináceas), *Corsiaceae*, *Costaceae* (costo), *Cyanastraceae*, *Cyclanthaceae* (carludovica), *Cymodoceaceae* (hierba manatí), *Cyperaceae* (ciperáceas), *Dioscoreaceae* (flame), *Eriocaulaceae* (ericauláceas), *Flagellariaceae*, *Geosiridaceae*, *Haemodoraceae* (sanguinaria del Canadá), *Hanguanaceae* (hanguana), *Heliconiaceae* (heliconiáceas), *Hydatellaceae*, *Hydrocharitaceae* (hierba cinta), *Iridaceae* (iris), *Joinvilleaceae* (joinvilleáceas), *Juncaceae* (junco), *Juncaginaceae* (hierba flecha), *Lemnaceae* (lenteja acuática), *Liliaceae* (lirio), *Limnocharitaceae* (amapola de agua), *Lowiaceae*, *Marantaceae* (marantáceas), *Mayacaceae* (mayacáceas), *Musaceae* (banana), *Najadaceae* (ninfa de agua), *Orchidaceae* (orquídea), *Pandanaceae* (pandan), *Petrosaviaceae*, *Philydraceae* (filidráceas), *Poaceae* (césped), *Pontederiaceae* (jacinto de agua), *Posidoniaceae* (posidoniáceas), *Potamogetonaceae* (espino de agua), *Rapateaceae*, *Restionaceae*, *Ruppiaceae* (rupiáceas), *Scheuchzeriaceae* (scheuchzeriáceas), *Smilacaceae* (esmilacáceas), *Sparganiaceae* (espaganiáceas), *Stemonaceae* (estemonáceas), *Strelitziaceae*, *Taccaceae* (tacáceas), *Thumiaceae*, *Triuridaceae*, *Typhaceae* (cola de gato), *Velloziaceae*, *Xanthorrhoeaceae*, *Xyridaceae* (xiridáceas), *Zannichelliaceae* (zaniqueliáceas), *Zingiberaceae* (jengibre) y *Zosteraceae* (hierba marina).

Cuando la planta es una gimnosperma, la gimnosperma puede ser de una familia seleccionada del grupo que consiste en *Araucariaceae*, *Boweniaceae*, *Cephalotaxaceae*, *Cupressaceae*, *Cycadaceae*, *Ephedraceae*, *Ginkgoaceae*, *Gnetaceae*, *Pinaceae*, *Podocarpaceae*, *Taxaceae*, *Taxodiaceae*, *Welwitschiaceae* y *Zamiaceae*.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos no limitantes se proporcionan para ilustrar adicionalmente la presente invención.

Ejemplo 1. Uso de una bacteria *Bacillus* recombinante que presenta una lipasa o una endoglucanasa para estimular el crecimiento vegetal en soja.

Los genes de lipasa y endoglucanasa de *Bacillus subtilis* se amplificaron a través de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando los siguientes cebadores que se muestran a continuación en la Tabla 3:

TABLA 3

	lipasa	endoglucanasa
directo	ggatccatggctgaacacaatcc (SEQ ID NO: 37)	ggatccatgaacgggtcaatc (SEQ ID NO: 39)
inverso	ggatccttaattcgtattctgccc (SEQ ID NO: 38)	ggatccttactaatttggtctgt (SEQ ID NO: 40)

Para crear construcciones de fusión, se fusionaron genes con el promotor de *bclA* nativo de ADN de *Bacillus thuringiensis* que codifica los primeros 35 aminoácidos de BclA (aminoácidos 1-35 de la SEQ ID NO:1) usando la técnica de corte y empalme mediante la técnica de extensión superpuesta (SOE, por sus siglas en inglés). Se clonaron amplicones correctos en el vector transportador pHP13 de *E. coli*/Bacillus y se cribaron clones correctos mediante secuenciación de ADN. Se electroporaron clones correctos en *Bacillus thuringiensis* (Cry-, plásmido-) y se cribaron para detectar resistencia al cloranfenicol. Los transformantes correctos se cultivaron en caldo de infusión de cerebro y corazón durante la noche a 30 °C, se sembraron en placas de agar nutritivo y se incubaron a 30 °C durante 3 días. Las esporas que expresaban la construcción de fusión (esporas de BEMD) se recogieron de las placas mediante lavado en solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se purificaron mediante centrifugación y lavados adicionales en PBS. Se crearon esporas de *Bacillus thuringiensis* (BT) de control no transformadas de manera idéntica.

Se plantaron semillas de soja (cepa Jake 011-28-04) a 2,54 cm de profundidad en macetas de 10 cm de profundidad llenas con tierra vegetal franca convencional. Las esporas se diluyeron a una concentración de 1×10^4 /ml en 50 ml de agua y se aplicaron a cada semilla en el momento de la siembra. Las plantas se cultivaron bajo una luz ideal usando lámparas T5, 54 vatios y se expusieron a 11 horas de luz al día en condiciones de temperatura controlada entre 15,5-25,5 °C. Las plantas se regaron hasta la saturación cada tres días durante un ensayo de dos semanas. Al cabo de dos semanas, se midió la altura de cada planta y se normalizaron las mediciones para controlar las esporas de *Bacillus thuringiensis*. Se realizaron dos ensayos independientes.

Los resultados se muestran en la Tabla 4, junto con el error típico de la media. En ambos ensayos, las semillas de soja cultivadas en presencia de esporas de BEMD que presentaban lipasa o endoglucanasa crecieron significativamente más que las semillas de soja tratadas con esporas de *B.t.* de control (análisis estadístico sometido a ensayo mediante un ensayo t).

TABLE 4

		Semillas de soja		
	Tratamiento	Altura Prom., cm	Comparación con el control	ETM
Ensayo n.º 1	<i>Bt</i> de control	14,034	100,0 %	0,521
	Lipasa, BEMD	17,93	127,8 %	0,395
	Endocelulasa, BEMD	16,31	116,2 %	0,411
Ensayo n.º 2	<i>Bt</i> de control	15,39	100,0 %	0,749
	Lipasa, BEMD	19,15	124,4 %	0,428
	Endocelulasa, BEMD	17,65	114,7 %	0,313

Ejemplo 2. Uso de una bacteria *Bacillus* recombinante que presenta una endoglucanasa para estimular el crecimiento vegetal en maíz.

Se crearon esporas de BEMD que expresaban endoglucanasa de una manera idéntica a la descrita anteriormente en el Ejemplo 1. Se plantó maíz de campo a 3,8 cm de profundidad en macetas de 10 cm de profundidad llenas con tierra vegetal franca convencional. Las esporas, las de control y las que expresaban endoglucanasa de BEMD, se diluyeron a una concentración de 1×10^4 /ml en 50 ml de agua y se aplicaron a cada planta en el momento de la siembra. También se incluyó un control con sólo agua. Las plantas se cultivaron bajo una luz ideal usando lámparas T5, 54 vatios y se expusieron a 11 horas de luz al día en condiciones de temperatura controlada entre 15,5 y 25,5 °C. Las plantas se regaron hasta la saturación cada tres días durante el ensayo de una semana. Al cabo de una semana, se midió la altura de cada planta, y se normalizaron las mediciones para controlar las esporas de *Bacillus thuringiensis*.

Los resultados se muestran en la Tabla 5, junto con el error típico de la media. El maíz cultivado en presencia de esporas de BEMD que presentaban endoglucanasa creció significativamente más que las semillas de soja tratadas con esporas de *B.t.* de control y las plantas de control con sólo agua (análisis estadístico sometido a ensayo mediante un ensayo t).

TABLA 5.

	Altura, cm	Comparación	ETM
H ₂ O	15,44	100 %	0,318
<i>Bt</i>	18,92	122,50 %	0,645
Endo de BEMD	22,71	143,40 %	0,616

Ejemplo 3. Uso de una bacteria *Bacillus* recombinante que presenta una endoglucanasa o una proteasa para estimular el crecimiento vegetal en trigo.

Se crearon esporas de BEMD que expresaban endoglucanasa de una manera idéntica a la descrita anteriormente en el Ejemplo 1. Se crearon esporas de BEMD que expresaban proteasa PtrB de *E. coli* usando métodos similares a los descritos anteriormente en el Ejemplo 1 y los siguientes cebadores: ggatccatgctacaaaagcc (directo, SEQ ID NO: 41) y ggatccttagtcgcagcgtagc (inverso, SEQ ID NO: 42).

Se plantó trigo duro de invierno a 2,54 cm de profundidad en macetas de 10 cm de profundidad llenas con tierra vegetal franca convencional. Las esporas, las de control y las que expresaban endoglucanasa o proteasa de BEMD, se diluyeron a una concentración de 1×10^4 /ml en 50 ml de agua y se aplicaron a cada planta en el momento de la siembra. También se incluyó un control con sólo agua. Las plantas se cultivaron bajo una luz ideal usando lámparas T5, 54 vatios y se expusieron a 11 horas de luz al día en condiciones de temperatura controlada entre 15,5 y 25,5 °C. Las plantas se regaron hasta la saturación cada tres días durante el ensayo de una semana. Al cabo de una semana, se midió la altura de cada planta y las mediciones se normalizaron a las plantas con sólo agua de control.

Los resultados se muestran en la Tabla 6, junto con el error típico de la media. El trigo cultivado en presencia de esporas de BEMD que presentaban endoglucanasa o proteasa creció significativamente más que las semillas de soja tratadas con esporas de *B.t.* de control o de control con agua (análisis estadístico sometido a ensayo mediante un ensayo t).

TABLA 6.

	Altura, cm	Comparación	ETM
H ₂ O	18,11	100 %	0,721
Control de <i>Bt</i>	19,96	110,33 %	0,752
Endo de BEMD	24,76	136,80 %	0,21
Proteasa de BEMD	22,35	123,40 %	0,354

Ejemplo 4. Uso de bacterias *Bacillus* recombinante que presentan una endoglucanasa para estimular el crecimiento vegetal en raigrás.

Se crearon esporas de BEMD que expresaban endoglucanasa de una manera idéntica a la descrita anteriormente en

el Ejemplo 1. Se plantó raigrás perenne a 6,4 mm de profundidad en macetas de 10 cm de profundidad llenas con tierra vegetal franca convencional. Las esporas, tanto las de control como las que expresaban endoglucanasa de BEMD, se diluyeron a una concentración de 1×10^4 /ml en 50 ml de agua y se aplicaron a cada planta en el momento de la siembra. También se incluyó un control con sólo agua. Las plantas se cultivaron bajo una luz ideal usando lámparas T5, 54 vatios y se expusieron a 11 horas de luz al día en condiciones de temperatura controlada entre 15,5 y 25,5 °C. Las plantas se regaron hasta la saturación cada tres días durante el ensayo de dos semanas. Al cabo de dos semanas, se midió la altura de cada planta y las mediciones se normalizaron a las plantas con sólo agua de control.

Los resultados se muestran en la Tabla 7, junto con el error típico de la media. El raigrás cultivado en presencia de esporas de BEMD que presentaban endocelulasa creció significativamente más que el raigrás tratado con esporas de *B.t.* de control o de control con agua (análisis estadístico sometido a ensayo mediante un ensayo t).

TABLA 7.

	Altura, cm	Comparación	ETM
H ₂ O	11,43	100,0 %	0,137
Control de <i>Bt</i>	12,29	107,7 %	0,128
Endo de BEMD	12,78	111,9 %	0,137

Ejemplo 5. Uso de bacterias *Bacillus* recombinantes que presentan enzimas implicadas en la síntesis o activación de hormonas vegetales para estimular el crecimiento vegetal.

El sistema de BEMD también puede usarse para presentar enzimas implicadas en la síntesis de hormonas vegetales. Por ejemplo, la hormona vegetal ácido indol-3-acético es un estimulador potente del crecimiento vegetal. El ácido indol-3-acético se sintetiza *in vivo* a partir de triptófano por las enzimas triptófano monooxigenasa e indol-3-acetamida hidrolasa. También pueden sintetizarse ácido indol-3-acético y otras hormonas auxinas *in vivo* a partir de triptófano y/o indol por las enzimas nitrilasa, triptófano aminotransferasa, indol-3-acetaldehído deshidrogenasa, indol-3-piruvato descarboxilasa, amina oxidasa, triptófano descarboxilasa y oxidasas de cadena lateral de triptófano.

El sistema de BEMD también puede usarse para presentar enzimas implicadas en la modificación de hormonas de crecimiento vegetal en formas bioactivas o inactivas. Por ejemplo, puede expresarse nitrilasa en el sistema de BEMD para catalizar la conversión de indol-3-acetonitrilo en el ácido indol-3-acético bioactivo. Adicionalmente, pueden añadirse formas inactivas de hormonas vegetales, tales como indol-3-acetonitrilo, al medio de crecimiento vegetal con la nitrilasa expresada por BEMD para proporcionar una liberación gradual de la hormona activa en el medio de crecimiento vegetal. Pueden modificarse muchas otras formas inactivas o menos activas de hormonas vegetales usando sus enzimas correspondientes.

Las hormonas de crecimiento vegetal relacionadas (auxinas) incluyen ácido indol-3-pirúvico, indol-3-acetaldoxima, indol-3-acetamida, indol-3-acetonitrilo, indol-3-etanol, indol-3-piruvato, ácido indol-3-butírico, ácidos fenilacéticos, ácido 4-cloroindol-3-acético e indol-3-acetaldoxima. Estas hormonas se sintetizan a partir de triptófano y/o indol *in vivo* a través de las enzimas triptófano monooxigenasa, indol-3-acetamida hidrolasa, nitrilasa, nitrilo hidrolasa, acetolactato sintetasa, alfa acetolactato descarboxilasa, triptófano aminotransferasa, indol-3-acetaldehído deshidrogenasa, indol-3-piruvato descarboxilasa, amina oxidasa, triptófano descarboxilasa y oxidasas de cadena lateral de triptófano.

También pueden sintetizarse hormonas del crecimiento de la familia de las citocininas mediante enzimas expresadas en el sistema de BEMD. Los ejemplos de citocininas incluyen cinetina, zeatina (cis y trans), 6-bencilaminopurina, dihidrozeatina, N6-(D2-isopentenil) adenina, ribosilzeatina, N6-(D2-isopentenil)adenosina, 2 metiltio-cis-ribosilzeatina, cis ribosilzeatina, ribosilzeatin-5-monofosfato, N6-metilaminopurina, N6-dimetilaminopurina, ribósido de 2'-desoxizetina, 4-hidroxi-3-metil-trans-2-butenilaminopurina, ortotopolina, metatopolina, benciladenina, ortometiltopolina y metametiltopolina. Estos compuestos estimulantes del crecimiento vegetal se sintetizan *in vivo* a partir de mevalonato o mono/di/trifosfato de adenosina mediante enzimas que incluyen fosfato de adenosina isopenteniltransferasas, fosfatasa, adenosina cinasa, adenina fosforribosiltransferasa, CYP735A, 5'ribonucleótido fosfohidrolasa, adenosina nucleosidasas, zeatina cis-trans isomerasa, zeatina O-glucosiltransferasas, β -glucosidasas, cis-hidroxilasas, CK cis-hidroxilasas, CK N-glucosiltransferasas, 2,5-ribonucleótidos fosfohidrolasas, adenosina nucleosidasas, purina nucleósido fosforilasas y zeatina reductasas.

Usando métodos similares a los descritos anteriormente en el Ejemplo 1, cualquiera de estas enzimas puede incorporarse al sistema de BEMD para su presentación en esporas de BEMD mediante la creación de una construcción de fusión que comprende la enzima y una secuencia de direccionamiento que dirige la enzima expresada al exosporio cuando la construcción de fusión se expresa en una bacteria *Bacillus*. Después puede añadirse una bacteria *Bacillus* recombinante que exprese una construcción de este tipo al suelo u otro medio de crecimiento vegetal o aplicarla directamente al follaje de las plantas usando métodos similares a los descritos anteriormente en el Ejemplo 1 para la estimulación del crecimiento vegetal.

El medio de crecimiento vegetal puede suplementarse con precursores o sustratos para las enzimas. Por ejemplo, el medio de crecimiento vegetal puede suplementarse con triptófano, monofosfatos de adenosina, difosfatos de

adenosina, trifosfatos de adenosina o indol. Las concentraciones adecuadas de estos sustratos están entre 100 nM y 100 µM.

Ejemplo 6. Uso de bacterias *Bacillus* recombinantes que presentan proteasas o peptidasas que escinden proteínas, péptidos, proproteínas o preproproteínas en péptidos bioactivos para la estimulación del crecimiento vegetal.

Pueden expresarse proteasas y peptidasas en el sistema de BEMD que pueden escindir enzimáticamente las proteínas disponibles en los medios de crecimiento vegetal en péptidos bioactivos que pueden actuar sobre la planta directa o indirectamente. Los ejemplos incluyen la escisión enzimática de harina de soja, extracto de levadura u otras harinas ricas en proteínas añadidas al medio de crecimiento vegetal en péptidos activos que pueden estimular directamente el crecimiento vegetal. Los péptidos bioactivos generados por la escisión enzimática de harinas proteicas incluyen RHPP y RKN 16D10, estimuladores potentes del desarrollo radicular vegetal. Adicionalmente, pueden escindirse proproteínas o preproproteínas en formas activas mediante proteasas y peptidasas expresadas en BEMD a sus formas bioactivas. Pueden añadirse proproteínas o preproproteínas inactivas en el medio de crecimiento vegetal para facilitar su escisión gradual por las proteasas de BEMD y la liberación lenta de proteínas bioactivas.

Usando métodos similares a los descritos anteriormente en el Ejemplo 1, cualquiera de estas proteasas y peptidasas puede incorporarse al sistema de BEMD para su presentación en esporas de BEMD mediante la creación de una construcción de fusión que comprende la proteasa o peptidasa y una secuencia de direccionamiento que dirige la enzima expresada al exosporio cuando la construcción de fusión se expresa en una bacteria *Bacillus*. Después puede añadirse una bacteria *Bacillus* recombinante que exprese una construcción de este tipo al suelo u otro medio de crecimiento vegetal suplementado con harina de soja, extracto de levadura u otra harina rica en proteínas para la estimulación del crecimiento vegetal. La harina de soja, extracto de levadura u otra harina rica en proteínas se añade adecuadamente al medio de crecimiento vegetal en forma de una composición líquida que comprende de aproximadamente 10 µg/l a aproximadamente 100 mg/l de la harina proteica, extracto de levadura u otra harina rica en proteínas.

Ejemplo 7. Uso de esporas de BEMD que expresan la proteasa PtrB para la estimulación del crecimiento vegetal.

Se crearon esporas de BEMD que expresaban proteasa PtrB de *E. coli* como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 3. Se plantaron semillas de soja a 2,54 cm de profundidad en macetas de 10 cm de profundidad llenas con tierra vegetal franca convencional. Las esporas, tanto las de control como las que expresaban proteasa de BEMD, se diluyeron a una concentración de 1×10^4 /ml en 50 ml de agua y se aplicaron a cada planta en el momento de la siembra. También se incluyó un control con sólo agua. Se añadió harina de soja a 25 mg/maceta al agua en el momento de la siembra. Las plantas se cultivaron bajo una luz ideal usando lámparas T5, 54 vatios y se expusieron a 13 horas de luz al día en condiciones de temperatura controlada entre 15,5 y 25,5 °C. Las plantas se regaron hasta la saturación cada tres días durante el ensayo de una semana. Al cabo de dos semanas, se midió la altura de cada planta y las mediciones se normalizaron a las plantas con sólo agua de control.

Los resultados se muestran en la Tabla 8, junto con el error típico de la media como porcentaje del control de agua. La soja cultivada en presencia de esporas de BEMD que presentaban proteasa creció significativamente más que las semillas de soja tratadas con esporas de *B.t.* de control o de control con agua (análisis estadístico sometido a ensayo mediante un ensayo t). La adición de harina de soja al control de agua o las plantas de control de *B. thuringiensis* tuvo poco efecto. Por el contrario, en presencia de harina de soja y del sistema de proteasa de BEMD, las plantas de soja respondieron significativamente por encima de todos los demás tratamientos.

TABLA 8.

Tratamiento	Harina de soja	Altura (cm)	Normalizada al agua	ETM, como porcentaje de agua
Sólo agua	No	12,10	100 %	3,1 %
Sólo agua	25 mg/maceta	12,43	102,7 %	7,4 %
<i>B. thuringiensis</i>	No	12,52	103,5 %	5,2 %
<i>B. thuringiensis</i>	25 mg/maceta	11,99	99,1 %	5,0 %
Proteasa de BEMD	No	12,97	107,2 %	6,1 %
Proteasa de BEMD	25 mg/maceta	14,44	119,3 %	4,8 %

Ejemplo 8. Uso de bacterias *Bacillus* recombinantes que presentan proteínas o péptidos implicados en la estimulación del crecimiento vegetal.

El sistema de BEMD también puede usarse para presentar proteínas o péptidos que están implicados directamente en la promoción del crecimiento vegetal. Por ejemplo, en el sistema de BEMD pueden expresarse hormonas peptídicas vegetales o péptidos no hormonales que estimulan el crecimiento vegetal. Por ejemplo, los péptidos no hormonales que se unen directamente a los receptores de las plantas y los activan pueden expresarse en el sistema de BEMD para actuar directamente sobre los receptores de la planta y las raíces de las plantas diana. Dichas hormonas peptídicas y péptidos no hormonales incluyen fitosulfocina, calcalva 3 (CLV3), sistemina, RKN 16D10, Hg-Syv46, eNOD40, proteínas de la familia NOD, ZmIGF, proteínas y péptidos de la familia SCR/SP11, RHPP, POLARIS y KTI.

Estos péptidos y péptidos relacionados pueden expresarse en el sistema de BEMD y suministrarse al medio de crecimiento vegetal o aplicarse directamente al follaje para estimular el crecimiento vegetal.

Usando métodos similares a los descritos anteriormente en el Ejemplo 1, cualquiera de estas proteínas o péptidos puede incorporarse al sistema de BEMD para su presentación en esporas de BEMD mediante la creación de una construcción de fusión que comprende la enzima y una secuencia de direccionamiento que dirige la enzima expresada al exosporio cuando la construcción de fusión se expresa en una bacteria *Bacillus*. Después puede añadirse una bacteria *Bacillus* recombinante que exprese una construcción de este tipo al suelo u otro medio de crecimiento vegetal o aplicarla directamente al follaje de las plantas usando métodos similares a los descritos anteriormente en el Ejemplo 1 para la estimulación del crecimiento vegetal.

Ejemplo 9. Uso de esporas de BEMD que expresan POLARIS o KTI para la estimulación del crecimiento vegetal.

Se crearon esporas de BEMD que expresaban el péptido vegetal POLARIS y el péptido de soja KTI sintetizando genes que codificaban los péptidos POLARIS o KIT unidos a la secuencia de direccionamiento de la SEQ ID NO: 60. Después, los genes se introdujeron en *Bacillus thuringiensis* y se prepararon esporas como se describe en el Ejemplo 1. Se plantaron semillas de soja a 2,54 cm de profundidad en macetas de 10 cm de profundidad llenas con tierra vegetal franca convencional. Se diluyeron esporas de BEMD que expresaban POLARIS o KTI a una concentración de 1×10^4 /ml en 50 ml de agua y se aplicaron a cada planta en el momento de la siembra. También se incluyó un control con sólo agua. También se sometieron a ensayo los efectos de los péptidos POLARIS y KTI puros sobre semillas de soja a 0,05 mg/maceta. Las plantas se cultivaron bajo una luz ideal usando lámparas T5, 54 vatios y se expusieron a 13 horas de luz al día en condiciones de temperatura controlada entre 15,5 y 25,5 °C. Las plantas se regaron hasta la saturación cada tres días durante el ensayo de dos semanas. Al cabo de dos semanas, se midió la altura de cada planta, se midieron las raíces y las mediciones se normalizaron a las plantas con sólo agua de control.

Los resultados se muestran en la Tabla 9, junto con el error típico de la media como porcentaje del control de agua. La soja cultivada en presencia de esporas de BEMD que presentaban POLARIS creció más y tuvo un ligero aumento en el desarrollo de las raíces que las semillas de soja de control con agua. La presencia del péptido KTI libre provocó un importante retraso en el crecimiento vegetal, perdiendo entre el 6-8 % de su altura, pero añadiendo un 15 % a la longitud de las raíces. La expresión de KTI en el sistema de BEMD condujo a un beneficio de crecimiento de las raíces, pero sin el efecto de retraso en el crecimiento de la altura de la planta. De manera importante, la presencia de las esporas de control de *Bacillus thuringiensis* con el péptido KTI libre no impidieron el efecto de retraso del crecimiento de KTI, mientras que el BEMD con KTI no mostró dicho retraso en el crecimiento.

TABLA 9.

Tratamiento	Péptido	Raíces normalizadas al agua	ETM	Altura, Normalizada al agua	ETM
Agua	No	100 %	6,8 %	100 %	4,3 %
Agua	KTI, 0,05 mg/maceta	115 %	8,4 %	91,8 %	3,1 %
POLARIS de BEMD	No	106,3 %	7,9 %	107,3 %	1,7 %
KTI de BEMD	No	113,3 %	5,8 %	99,4 %	3,4 %
<i>B. thuringiensis</i>	KTI, 0,05 mg/maceta	115 %	7,7 %	93,4 %	4,2 %

Ejemplo 10. Uso de bacterias *Bacillus* recombinantes que presentan enzimas que degradan o modifican una fuente de nutrientes bacteriana, fúngica o vegetal para estimular el crecimiento vegetal y/o procesar nutrientes.

El sistema de BEMD también puede usarse para presentar enzimas que degradan o modifican beneficiosamente una fuente de nutrientes bacteriana, fúngica o vegetal presente en el suelo u otro medio de crecimiento vegetal. Dichas enzimas degradan los productos presentes en el suelo u otro medio de crecimiento vegetal en formas que pueden ser captadas fácilmente por las plantas y/o las bacterias y/u hongos beneficiosos de la rizosfera. Dichas enzimas incluyen, por ejemplo, glucósido hidrolasas para degradar hidratos de carbono complejos, celulasas para degradar celulosa; lipasas para degradar lípidos, que incluyen aceite, grasas y ceras; lignina oxidasas para degradar lignina y ácidos húmicos; proteasas para degradar polipéptidos; fosfolipasas para degradar membranas; amidasas y nitrogenasas para recuperar nitrógeno; amilasas para procesar almidones; nucleasas para recuperar nucleótidos, pectinasas para descomponer pectina, sulfatasas para recuperar azufre y xilanasas para descomponer xilanos y arabinoxilanos. Los productos resultantes, que incluyen azúcares simples, aminoácidos, ácidos grasos y otros nutrientes estarán fácilmente disponibles para su captación directa por las plantas y/o para estimular el crecimiento y desarrollo de bacterias y/u hongos beneficiosos en las rizosferas de las plantas.

Además, pueden utilizarse enzimas y otras moléculas biológicas para liberar o secuestrar fosfato, nitrógeno y otros nutrientes elementales clave para la captación por las plantas de sus diversas formas orgánicas e inorgánicas en el suelo. Por ejemplo, pueden usarse fosfatasas para degradar fosfatos en el entorno en fosfatos inorgánicos utilizables

para el uso por las plantas. Los fosfatos pueden ser fosfatos de origen natural presentes en un medio de crecimiento vegetal. Como alternativa, o además, el medio de crecimiento vegetal puede suplementarse con fosfatos tales como trimetafosfato, una enmienda agrícola común. Los ejemplos de fosfatasa útiles incluyen monoéster fosfórico hidrolasas, fosfomonoesterasas, diéster fosfórico hidrolasas, fosfodiesterasas, monoéster trifosfórico hidrolasas, anhídrido de fosforilo hidrolasas, pirofosfatasa, fitasa, trimetafosfatasa y trifosfatasa. Por ejemplo, las enzimas trimetafosfatasa, trifosfatasa y pirofosfatasa descomponen secuencialmente el trimetafosfato en fosfato inorgánico utilizable.

La familia de enzimas nitrogenasas convierte el nitrógeno atmosférico (N₂) en amoníaco, convirtiendo de este modo el nitrógeno que de otro modo sería inaccesible para las plantas en una forma utilizable. Las enzimas adecuadas pertenecen a la familia Nif de nitrogenasas.

La energía química también puede añadirse directamente al medio de crecimiento vegetal en forma de adenosina -3-trifosfato, ferredoxina o enzimas adicionales que crean dicha energía en el sistema de BEMD. Éstas son cofactores para las nitrogenasas y están limitadas en el suelo. Por lo tanto, dichos cofactores pueden añadirse al suelo para potenciar las reacciones descritas anteriormente.

Otros suplementos que pueden añadirse al medio de crecimiento vegetal incluyen almidones, celulosa y derivados de celulosa, pectinas, xilanos y arabinoxilanos, grasas, ceras, aceites, ácidos fítics, ligninas, ácidos húmicos y otras fuentes de nutrientes sobre las que ejercen actividad las clases de enzimas anteriores.

Usando métodos similares a los descritos anteriormente en el Ejemplo 1, cualquiera de estas enzimas puede incorporarse al sistema de BEMD para su presentación en esporas de BEMD mediante la creación de una construcción de fusión que comprende la enzima y una secuencia de direccionamiento para dirigir la construcción de fusión al exosporio de una bacteria *Bacillus*. Después, la construcción de fusión puede expresarse en una bacteria *Bacillus* y esta bacteria *Bacillus* recombinante puede añadirse al suelo u otro medio de crecimiento vegetal usando métodos similares a los descritos anteriormente en el Ejemplo 1 para la estimulación del crecimiento vegetal.

Ejemplo 11. Uso de esporas de BEMD que expresan una fosfatasa para la estimulación del crecimiento vegetal.

Se crearon esporas de BEMD que expresaban Fosfatasa A4 (PhoA4) de *Bacillus subtilis* sintetizando un gen que codificaba PhoA4 unido a la secuencia de direccionamiento de la SEQ ID NO: 60. Después, este gen se introdujo en *Bacillus thuringiensis* y se prepararon esporas como en el Ejemplo 1. El maíz se plantó a 2,54 cm de profundidad en macetas de 10 cm de profundidad llenas con tierra vegetal franca convencional. Las esporas de BEMD que expresaban PhoA4, se diluyeron a una concentración de 1×10⁴/ml en 50 ml de agua y se aplicaron a cada planta en el momento de la siembra. También se incluyó un control con sólo agua. Se añadió polifosfato a las macetas en líquido a velocidad de 0,5 mg/maceta. Las plantas se cultivaron bajo una luz ideal usando lámparas T5, 54 vatios y se expusieron a 13 horas de luz al día en condiciones de temperatura controlada entre 15,5 y 25,5 °C. Las plantas se regaron hasta la saturación cada tres días durante el ensayo de dos semanas. Al cabo de dos semanas, se midió la altura de cada planta y las mediciones se normalizaron a las plantas con sólo agua de control.

Los resultados se muestran en la Tabla 10. El maíz cultivado en presencia de esporas de BEMD que presentaba PhoA4 presentó un crecimiento potenciado, especialmente en presencia de polifosfato añadido. Este efecto fue mayor que el efecto del polifosfato solo.

TABLA 10.

Tratamiento	Aditivo	Crecimiento, Comparación con agua
Agua	Ninguno	100 %
Agua	Polifosfato	110,8 %
BEMD PhoA4	Ninguno	108,3 %
BEMD PhoA4	Polifosfato	114,8 %

Ejemplo 12. Uso de bacterias *Bacillus* recombinante que presentan enzimas implicadas en la síntesis de 2,3-butanodiol o la síntesis o activación de ácido giberélico para la estimulación del crecimiento vegetal.

El sistema de BEMD también puede usarse para presentar enzimas implicadas en la síntesis del compuesto que promueve el crecimiento vegetal 2,3-butanodiol. *In vivo*, el 2,3-butanodiol es sintetizado por bacterias y hongos beneficiosos en la rizosfera a partir de acetoina, diacetilo, acetolactato o piruvato por las enzimas acetolactato sintetasa, α-acetolactato descarboxilasa, piruvato descarboxilasa, diacetil reductasa, butanodiol deshidrogenasas y acetoina reductasa.

El sistema de BEMD también puede usarse para presentar enzimas implicadas en la síntesis o activación del ácido giberélico, compuesto que promueve el crecimiento vegetal. El ácido giberélico puede producirse a partir de formas inactivas o menos activas a través de la acción de enzimas, incluyendo, pero sin limitación, hidroxilamino reductasas, 2-oxoglutarato dioxigenasas, giberelina 2B/3B hidrolasas, giberelina 3-oxidasas y giberelina 20-oxidasas.

Cualquiera de estas enzimas puede incorporarse al sistema de BEMD para su presentación en esporas de BEMD usando métodos similares a los descritos anteriormente en el Ejemplo 1. Puede prepararse una construcción de fusión que comprende la enzima y una secuencia de direccionamiento que dirige la enzima al exosporio cuando la construcción de fusión se expresa en una bacteria *Bacillus*. Después, la construcción de fusión se expresa en una bacteria *Bacillus* y la bacteria *Bacillus* se añade al suelo u otro medio de crecimiento vegetal para la estimulación del crecimiento vegetal.

Para aumentar el efecto de las enzimas presentadas en BEMD, el suelo puede suplementarse con sustratos para las enzimas. Por ejemplo, el suelo u otro medio de crecimiento vegetal puede suplementarse con acetoina, que es un sustrato para la acetoina reductasa; piruvato, que es un sustrato para la piruvato descarboxilasa; diacetilo, que es un sustrato para la diacetil reductasa; y/o acetolactato, que es un sustrato para la acetolactato descarboxilasa. Como alternativa, o además, el suelo u otro medio de crecimiento vegetal puede suplementarse con formas menos potentes o inactivas de ácido giberélico, que se convertirán en formas más activas mediante las enzimas descritas anteriormente en el suelo u otro medio de crecimiento vegetal.

Ejemplo comparativo 1. Uso de bacterias *Bacillus* recombinantes que presentan proteasas para proteger plantas frente a patógenos

El sistema de BEMD también puede usarse para presentar proteasas que protegen plantas frente a uno o más patógenos. Por ejemplo, determinados patógenos bacterianos pueden comunicarse entre miembros individuales a través de la secreción de homoserinas de lactona bacteriana o moléculas de señalización relacionadas. Por lo tanto, las proteasas específicas para las moléculas de señalización de homoserina de lactona bacteriana pueden proteger las plantas frente a dichos patógenos bacterianos al interrumpir la comunicación entre las bacterias, una etapa esencial para que las bacterias secreten toxinas y regulen positivamente los factores de virulencia. Las proteasas adecuadas específicas para moléculas de señalización de homoserina de lactona bacteriana incluyen endopeptidasas y exopeptidasas.

Pueden incorporarse proteasas específicas para moléculas de señalización de homoserina de lactona bacteriana en el sistema de BEMD usando métodos similares a los descritos anteriormente en el Ejemplo 1. Puede prepararse una construcción de fusión que comprende la proteasa y una secuencia de direccionamiento que dirige la proteasa al exosporio cuando la construcción de fusión se expresa en una bacteria *Bacillus*. Después, la construcción de fusión se expresa en una bacteria *Bacillus* y la bacteria *Bacillus* se añade al suelo u otro medio de crecimiento vegetal. Después, la proteasa puede degradar las moléculas de señalización de homoserina de lactona bacteriana, bloqueando una etapa clave en la virulencia de estos organismos y ayudando de este modo a proteger la planta de estos patógenos. Otras proteasas y peptidasas funcionan eficazmente en esta capacidad en el sistema de BEMD como se demostró anteriormente en los Ejemplos 6 y 7.

Ejemplo comparativo 2. Uso de bacterias *Bacillus* recombinantes que presentan proteínas y péptidos antimicrobianos para proteger plantas frente a patógenos.

El sistema de BEMD también puede usarse para presentar enzimas que presentan actividades antibacterianas y/o antifúngicas que pueden ayudar a proteger plantas frente a uno o más patógenos. Por ejemplo, pueden expresarse proteínas y péptidos antimicrobianos tales como bacteriocinas, lisozimas (por ejemplo, LysM), sideróforos, conalbúmina, albúmina, lactoferrinas (por ejemplo, LfcinB) o TasA en el sistema de BEMD para ejercer su efecto sobre patógenos bacterianos y fúngicos de las plantas. Las bacteriocinas, albúmina, conalbúmina, lisozimas y lactoferrina ejercen una acción antimicrobiana directa sobre sus dianas, mientras que los sideróforos se unen a los nutrientes esenciales que los patógenos necesitan para su virulencia. Por ejemplo, el péptido LfcinB de la lactoferrina, cuando se expresa en la superficie del sistema de BEMD lisaría las células bacterianas que son susceptibles a los péptidos de lactoferrina en el medio de crecimiento vegetal. Estas proteínas y péptidos tienen una acción específica sobre microbios seleccionados y pueden atacar selectivamente a un grupo de patógenos sin obstruir todos los microbios en el medio de crecimiento vegetal.

Cualquiera de estas proteínas o péptidos puede incorporarse al sistema de BEMD para su presentación en esporas de BEMD usando métodos similares a los descritos anteriormente en el Ejemplo 1. Puede prepararse una construcción de fusión que comprende la enzima y una secuencia de direccionamiento que dirige la enzima al exosporio cuando la construcción de fusión se expresa en una bacteria *Bacillus*. Después, la construcción de fusión se expresa en una bacteria *Bacillus* y el miembro de la bacteria *Bacillus* se añade al suelo u otro medio de crecimiento vegetal para la protección de las plantas frente a uno o más patógenos.

Ejemplo comparativo 3. Uso de esporas de BEMD que expresan péptidos antimicrobianos para proteger las plantas frente a bacterias.

Se sintetizaron genes que codificaban cualquiera de los dos péptidos antimicrobianos, LfcinB (derivado de lactoferrina bovina) y LysM (derivado de lisozima de pollo), unidos a una secuencia de direccionamiento de BclA (SEQ ID NO: 60), bajo el control del promotor de BclA (SEQ ID NO: 85). Los genes se introdujeron en *Bacillus thuringiensis* BT013A y se prepararon esporas mediante el cultivo durante la noche del *Bacillus* transformado en caldo de infusión de cerebro

y corazón, sembrando en placas de agar nutritivo a 30 °C y dejando crecer durante 3 días. Las esporas se separaron por lavado de las placas y se aclararon 3 veces en PBS. Se cultivaron cultivos de *Staphylococcus epidermidis* durante la noche en caldo TSB a 37 °C. Después, el cultivo durante la noche se sedimentó, se lavó en PBS y se resuspendió en PBS a una Abs₅₉₅ = 0,2. Se incubaron en PBS 1×10⁴ BEMD que expresaban los péptidos LysM o LfcinB con el *S. epidermidis* durante 3 horas a 37 °C, con agitación. Una muestra de control de *S. epidermidis* se dejó sin tratar (sin esporas de BEMD). Después de incubar durante 3 hora, se prepararon placas de dilución del *S. epidermidis* y se incubaron a 37 °C durante la noche. Los cultivos de *S. epidermidis* se contaron al día siguiente y se cuantificó el porcentaje de muerte. En la Tabla 11 a continuación, se registró un registro de la actividad letal. Los péptidos expresados en BEMD mataron un número significativo de células de *S. epidermidis*. Esto se traduciría directamente en la muerte de las bacterias en la rizosfera, semilla u otro material vegetal. La selección de péptidos específicos para determinadas clases de bacterias también puede sesgar la población de microorganismos cerca de la planta de manera beneficiosa, o puede dirigirse selectivamente a patógenos claves.

Tabla 11.

Tratamiento	Supervivencia	% de Muerte
Ninguno	100 %	0 %
LysM de BEMD	71 %	29 %
LfcinB de BEMD	23 %	77 %

Ejemplo comparativo 4. Uso de bacterias *Bacillus* recombinantes que presentan enzimas para proteger plantas frente a patógenos.

El sistema de BEMD también puede usarse para presentar enzimas que protegen plantas frente a uno o más patógenos. Por ejemplo, se degradan paredes celulares de levaduras y mohos mediante enzimas tales como β -1,3-glucanasas, β -1,4-glucanasas, β -1,6-glucanasas, quitosinasas, quitinasas, proteínas similares a quitosinasas y lisisasas. Se degradan paredes celulares bacterianas mediante enzimas seleccionadas de proteinasas, proteasas, mutanolisina, estafolisina y lisozimas. Cada una de estas enzimas que degradan la pared celular puede expresarse en el sistema de BEMD y añadirse al medio de crecimiento vegetal para la inhibición selectiva de microbios patógenos en la rizosfera.

El sistema de BEMD también puede usarse para presentar enzimas o proteínas que protegen plantas frente a insectos o gusanos patógenos, por ejemplo, suprimiendo la depredación por insectos y/o gusanos de las plantas deseadas. Los ejemplos de dichas proteínas y enzimas de interés incluyen endotoxinas, toxinas Cry, otras toxinas proteicas insecticidas, inhibidores de proteasas, cisteína proteasas, la proteína Cry 5B, la proteína Cry 21A, quitinasa, proteínas inhibidoras de proteasas, péptidos inhibidores de proteasas, inhibidores de tripsina e inhibidores de proteasa de punta de flecha.

Cualquiera de estas proteínas o péptidos puede incorporarse al sistema de BEMD para su presentación en esporas de BEMD usando métodos similares a los descritos anteriormente en el Ejemplo 1. Puede prepararse una construcción de fusión que comprende la enzima y una secuencia de direccionamiento que dirige la enzima al exosporio cuando la construcción de fusión se expresa en una bacteria *Bacillus*. Después, la construcción de fusión se expresa en una bacteria *Bacillus* y la bacteria *Bacillus* se añade al suelo u otro medio de crecimiento vegetal para la protección de las plantas frente a patógenos.

Ejemplo comparativo 5. Uso de esporas de BEMD que expresan una enzima antifúngica para proteger plantas y demostración de su eficacia contra *Saccharomyces*.

Se sintetizó un gen que codificaba una enzima antifúngica, β -1,3-glucanasa de *Bacillus subtilis*, unido a una secuencia de direccionamiento de BclA (SEQ ID NO: 60) bajo el control del promotor de BclA (SEQ ID NO: 85). El gen se introdujo en *Bacillus thuringiensis* BT013A y se prepararon esporas mediante el cultivo durante la noche del *Bacillus* transformado en caldo de infusión de cerebro y corazón, sembrando en placas de agar nutritivo a 30 °C, y dejando crecer durante 3 días. Las esporas se separaron por lavado de las placas y se aclararon 3 veces en PBS. Se cultivaron cultivos de *Saccharomyces cerevisiae* durante la noche en caldo YZ a 37 °C. Después, el cultivo durante la noche se sedimentó, se lavó en PBS y se resuspendió en PBS a una Abs₅₉₅ = 0,2. Se incubaron en PBS 1×10⁴ BEMD que expresaban β -1,3-glucanasa con el *Saccharomyces* durante 1 hora a 37 °C, con agitación. Una muestra de control de *Saccharomyces* se dejó sin tratar (sin esporas de BEMD). Después de incubar durante 3 hora, se prepararon placas de dilución del *Saccharomyces* y se incubaron a 37 °C durante la noche. Los cultivos de *Saccharomyces* se contaron al día siguiente y se cuantificó el porcentaje de muerte. En la Tabla 12 a continuación se muestra la actividad letal de las esporas de BEMD que expresaban β -1,3-glucanasa. La enzima expresada en BEMD mató a un número significativo de células de *Saccharomyces*. Esto se traduciría directamente en la muerte de microorganismos fúngicos en la rizosfera, semilla u otro material vegetal. La selección de proteínas específicas para determinadas clases de hongos también puede sesgar la población de microorganismos cerca de la planta de manera beneficiosa, o puede dirigirse selectivamente a patógenos fúngicos claves.

Tabla 12.

Tratamiento	Supervivencia	% de Muerte
Ninguno	100 %	0 %
β -1,3-Glucanasa de BEMD	83 %	17 %

Ejemplo comparativo 6. Uso de bacterias *Bacillus* recombinantes que presentan péptidos o proteínas estimuladoras del sistema inmunitario vegetal para proteger las plantas frente a patógenos.

El sistema de BEMD también puede usarse para presentar péptidos y proteínas potenciadores del sistema inmunitario vegetal. Estas proteínas pueden expresarse en el exterior de la espora de BEMD y suministrarse al medio de crecimiento vegetal para estimular el sistema inmunitario vegetal y permitir que la planta se proteja frente a los patógenos. Los ejemplos de proteínas y péptidos incluyen proteínas y péptidos de harpina, α -elastinas, β -elastinas, sisteminas, fenilalanina amoníaco-licasa, elicinas, defensinas, criptogeína y flagelina. La exposición de las plantas a estas proteínas y péptidos estimulará la resistencia a muchos patógenos vegetales en las plantas.

Cualquiera de estas proteínas o péptidos puede incorporarse al sistema de BEMD para su presentación en esporas de BEMD usando métodos similares a los descritos anteriormente en el Ejemplo 1. Puede prepararse una construcción de fusión que comprende la enzima y una secuencia de direccionamiento que dirige la enzima al exosporio cuando la construcción de fusión se expresa en una bacteria *Bacillus*. Después, la construcción de fusión se expresa en una bacteria *Bacillus* y la bacteria *Bacillus* se añade al suelo u otro medio de crecimiento vegetal para la protección de las plantas frente a patógenos.

Ejemplo comparativo 7. Uso de bacterias *Bacillus* recombinantes que presentan una proteína o péptido de unión a la raíz u hoja para inmovilizar la bacteria *Bacillus* recombinante en un sistema radicular de una planta o en las hojas de una planta.

También pueden incorporarse proteínas y péptidos de unión a raíces y hojas en el sistema de BEMD para permitir que las esporas de BEMD se inmovilicen en un sistema radicular o en las hojas de una planta. La presentación de dichos ligandos de unión a raíces u hojas en las esporas de BEMD permite el direccionamiento de las esporas al sistema radicular de una planta o a subestructuras del sistema radicular o a las hojas o a subestructuras de hojas para mantener las esporas de BEMD en una ubicación óptima para que otras moléculas biológicas y enzimas presentadas sean eficaces.

Por ejemplo, la ricadhesina es un ligando de unión a las raíces que se une a los pelos de las raíces. Por lo tanto, la presentación de ricadhesina en las esporas de BEMD dirige las esporas a los pelos de la raíz. Otras proteínas que podrían utilizarse para la unión selectiva a las raíces u hojas de las plantas incluyen adhesinas, flagelina, omptinas, lectinas, proteínas de pili, proteínas curlus, intiminas, invasinas, aglutinina, proteínas afimbriales, Tasa o YuaB.

Dichas proteínas y péptidos de unión a las raíces u hojas pueden incorporarse al sistema de BEMD usando métodos similares a los descritos anteriormente en el Ejemplo 1. Puede prepararse una construcción de fusión que comprende la proteína o péptido de unión a la raíz u hoja y una secuencia de direccionamiento que dirige la proteína o péptido al exosporio cuando la construcción se expresa en una bacteria *Bacillus*. Después, la construcción de fusión que contiene el ligando de unión a la raíz u hoja se expresa en una bacteria *Bacillus*. Dichas construcciones de fusión pueden coexpresarse con una o más construcciones de fusión adicionales que comprenden cualquiera de las enzimas beneficiosas analizadas en el presente documento (por ejemplo, una enzima implicada en la síntesis de una hormona vegetal, una enzima que degrada una fuente de nutrientes o una proteasa que protege una planta frente a un patógeno). La bacteria *Bacillus* recombinante se añade al suelo u otro medio de crecimiento vegetal, o se aplica a las hojas de una planta. El ligando de unión a la raíz u hoja dirige la bacteria *Bacillus* al sistema radicular de la planta o a las hojas de la planta y la inmoviliza allí, permitiendo de este modo que la construcción de fusión coexpresada ejerza sus efectos en estrecha proximidad al sistema radicular o de hojas.

Ejemplo comparativo 8. Uso de bacterias *Bacillus* recombinantes que presentan proteínas o enzimas para potenciar la resistencia al estrés de las plantas.

Pueden incorporarse al sistema de BEMD proteínas, péptidos y enzimas que potencian la resistencia al estrés en una planta y pueden suministrarse a las plantas diana a través de la adición a raíces, hojas o el medio de crecimiento vegetal. Durante los períodos de estrés, las plantas liberan compuestos relacionados con el estrés, incluyendo el ácido aminociclopropano-1-carboxílico (ACC), especies reactivas del oxígeno y otros, dando como resultado un impacto negativo en el crecimiento vegetal. El sistema de BEMD puede usarse para presentar enzimas que degradan dichos compuestos relacionados con el estrés, tales como ácido aminociclopropano-1-carboxílico desaminasa, superóxido dismutasas, oxidasas, catalasas y otras enzimas que actúan sobre especies reactivas de oxígeno. Estas enzimas reducen la cantidad de estos compuestos relacionados con el estrés y permiten que las plantas sigan creciendo e incluso prosperando en condiciones de estrés.

Cualquiera de estas proteínas o péptidos puede incorporarse al sistema de BEMD para su presentación en esporas de BEMD usando métodos similares a los descritos anteriormente en el Ejemplo 1. Puede prepararse una construcción

de fusión que comprende la enzima y una secuencia de direccionamiento que dirige la enzima al exosporio cuando la construcción de fusión se expresa en una bacteria *Bacillus*. Después, la construcción de fusión se expresa en una bacteria *Bacillus* y la bacteria *Bacillus* se añade al suelo o a otro medio de crecimiento vegetal o se aplica a las hojas de una planta para potenciar la resistencia al estrés de una planta diana.

5

Ejemplo comparativo 9. Preparación de esporas de BEMD que expresan la enzima protectora catalasa.

Se sintetizó un gen que codificaba la enzima protectora catalasa de *Bacillus* unido a una secuencia de direccionamiento de BetA (SEQ ID NO: 61) bajo el control del promotor de BetA (SEQ ID NO: 86). Este gen se introdujo en *Bacillus thuringiensis* BT013A. Se produjeron esporas cultivando durante la noche un cultivo de la cepa de *Bacillus* transformada y de tipo silvestre en caldo de infusión de cerebro y corazón, sembrando en placas de agar nutritivo a 30 °C, y dejando crecer durante 3 días. Las esporas se separaron por lavado de las placas y se aclararon 3 veces en PBS. Se añadieron 3 gotas de peróxido de hidrógeno a cada sedimento de esporas. La enzima catalasa convierte el peróxido de hidrógeno en agua y O₂ gaseoso. Las esporas de control no burbujearon, mientras que las esporas de BEMD-catalasa lo hicieron fácilmente, demostrando actividad enzimática en la superficie de las esporas. Pueden presentarse otras enzimas protectoras de manera similar y suministrarse a la planta para actuar sobre los radicales libres producidos durante el estrés por las plantas.

Ejemplo comparativo 10. Uso de bacterias *Bacillus* recombinantes que presentaban proteínas o enzimas que protegen semillas o plantas del estrés ambiental.

Pueden incorporarse al sistema de BEMD proteínas, péptidos y enzimas que protegen una planta frente al estrés ambiental y pueden suministrarse a las plantas diana a través de la adición a las raíces, hojas, fruto o el medio de crecimiento vegetal. Durante los períodos de heladas, las plantas pueden resultar dañadas por el efecto del hielo. El sistema de BEMD puede usarse para presentar péptidos, proteínas o enzimas que protegen las plantas frente a dichos efectos. Por ejemplo, el sistema de BEMD puede usarse para presentar colina deshidrogenasas, que actúan produciendo productos protectores que protegen la planta o semilla frente a las heladas. También pueden añadirse sustratos para estas enzimas (por ejemplo, colina y/o derivados de colina) al medio de crecimiento vegetal. La adición de dichos sustratos puede potenciar la cantidad de protector (betaína y productos químicos relacionados) producido en el entorno de la planta por las enzimas expresadas en BEMD. Se sabe que los derivados de betaína protegen las semillas frente al estrés por frío.

Cualquiera de estas proteínas o péptidos puede incorporarse al sistema de BEMD para su presentación en esporas de BEMD usando métodos similares a los descritos anteriormente en el Ejemplo 1. Puede prepararse una construcción de fusión que comprende la enzima y una secuencia de direccionamiento que dirige la enzima al exosporio cuando la construcción de fusión se expresa en una bacteria *Bacillus*. Después, la construcción de fusión se expresa en una bacteria *Bacillus* y la bacteria *Bacillus* se añade al suelo o a otro medio de crecimiento vegetal o se aplica a las hojas de una planta para proteger la planta de estrés y factores ambientales.

Ejemplo 13. Expresión potenciada de construcciones de fusión en el sistema de BEMD mediante el uso de elementos promotores potenciados o alternativos.

El sistema de BEMD puede presentar una amplia gama de proteínas, péptidos y enzimas que usan una o más de las secuencias de direccionamiento descritas en el presente documento. Algunas de estas secuencias de direccionamiento tienen una alta afinidad por el exosporio, lo que sería beneficioso para la expresión de proteínas de fusión, pero su bajo nivel de expresión de proteínas de fusión limita su uso en el sistema de BEMD. Para dichas proteínas y secuencias de fusión, pueden usarse promotores de esporulación de alta expresión alternativos en lugar de los promotores nativos.

Por ejemplo, la SEQ ID NO: 13 (aminoácidos 1-39 del gen 3572 de *B. weihenstephanensis* KBAB4) proporciona una secuencia N-terminal muy eficaz para el suministro de proteínas al exosporio de bacterias *Bacillus*, como se muestra en la Tabla 13 a continuación. Todos los genes se sintetizaron en su forma completa (incluyendo las regiones promotoras y las regiones que codifican proteínas de fusión) como se describe en el presente documento. Cuando los elementos promotores nativos para el gen 3572 de *B. weihenstephanensis* KBAB4 (SEQ ID NO: 88) se usaron para expresar una proteína de fusión que comprendía la secuencia de direccionamiento de la SEQ ID NO: 13 fusionada a una enzima β -galactosidasa (de *E. coli*), se expresó un nivel bajo de proteína de fusión, lo que conduce a una reducción de la actividad enzimática en la superficie de la espóra. La actividad enzimática se midió mediante la conversión de o-nitrofenilgalactósido 0,5 M en solución durante 10 minutos. La conversión enzimática se midió con un espectrofotómetro en ABS₅₄₀. El reemplazo de los elementos promotores nativos del gen 3570 de *B. weihenstephanensis* KBAB4 con los promotores de alta expresión de la SEQ ID NO: 86 (BetA/BAS3290 de *B. anthracis*) o SEQ ID NO: 89 (proteína propulsor β YVTN de *B. weihenstephanensis* KBAB4) condujo a un aumento drástico en la actividad enzimática de las esporas. Por otro lado, el reemplazo de los elementos promotores nativos para el gen 3572 de *B. weihenstephanensis* KBAB4 con el promotor nativo de BAS1882 de *B. anthracis* Sterne (SEQ ID NO: 87) condujo a una disminución de la actividad enzimática de las esporas. El nivel de expresión de la secuencia de direccionamiento de la SEQ ID NO: 13 fusionada a β -galactosidasa fue mucho menor (0,38X) cuando fue impulsada por el promotor de BAS1882 (SEQ ID NO: 87), y mejoró enormemente cuando fue impulsada desde el promotor de

BetA (SEQ ID NO: 86) o promotor de la proteína YVTN (SEQ ID NO: 89).

TABLA 13.

Promotor	Proteína de fusión	Actividad de β -galactosidasa en el sistema de BEMD, normalizada	Factor de cambio
SEQ ID NO: 88	SEQ ID NO: 13 - β -galactosidasa	100 %	
SEQ ID NO: 86	SEQ ID NO: 13 - β -galactosidasa	213,4 %	2.13X
SEQ ID NO: 89	SEQ ID NO: 13 - β -galactosidasa	220,7 %	2.21X
SEQ NO: ID 87	SEQ ID NO: 13 - β -galactosidasa	38,1 %	0.38X

5 Ejemplo 14. Aislamiento e identificación de cepas bacterianas que promueven el crecimiento vegetal.

Se recogieron muestras de suelo de rizosferas de las plantas más sanas y resistentes de patata (*Solanum tuberosum*), calabaza de verano amarilla (*Cucurbita pepo*), tomate (*Solanum lycopersicum*) y judía (*Phaseolus coccineus*), se diluyeron en agua esterilizada y se esparcieron en placas de agar nutritivo. Se seleccionaron para estudios posteriores aislados bacterianos que demostraron altas tasas de crecimiento y de los que pudieron hacerse pases y se propagaron. Las cepas seleccionadas se cultivaron en medio mínimo (3 g de KH_2PO_4 , 6 g de Na_2HPO_4 , 1 g de NH_4Cl , 0,50 g de NaCl , 0,15 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,013 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y 1 g de glucosa, por L en peso seco). Se centrifugaron cultivos durante la noche (30 °C) de cepas seleccionadas, el medio se retiró por decantación y se resuspendieron en una cantidad igual de agua destilada. Se plantaron diez semillas de lechuga por tratamiento a una profundidad de 1 cm en tierra vegetal franca (Columbia, MO) que se tamizó para eliminar residuos grandes. Las semillas se inocularon en el momento de la siembra en macetas de 4 cm con 0,5 μl de bacterias resuspendidas en agua mezcladas con 10 ml de H_2O . Diez ml de H_2O fueron suficientes para suministrar las bacterias dentro de los 7,62 centímetros³ (3 pulgadas³) del suelo y saturar el suelo para una adecuada germinación de las semillas. Las plantas se cultivaron a temperaturas entre 18-24 °C (65-75 °F) con 11 horas de luz/día y 5 ml de riego cada 3 días. Tras una semana, se recogieron las alturas de las plantas y diámetros de las hojas, así como la salud general de las plantas. El análisis inicial de los aislados de rizosfera dio como resultado la obtención de más de 200 especies distintas de bacterias y hongos de la rizosfera de las cuatro plantas. Algunas de las especies bacterianas se describen en la Tabla 14. Las cepas identificadas se indican mediante sus identificaciones bacterianas adecuadas. Otras cepas se indican por su número de identificación desconocido. Los inoculantes que dieron resultados cercanos al control (+/- 2 %) no se incluyeron en la tabla.

TABLA 14

Inoculante bacteriano	Lechuga mantecosa	Comparación	ETM
Sin inocular	Altura prom. (cm)	Control	0,07
<i>Paracoccus kondratiaevae</i> NC35	1,8	111,1 %	0,05
<i>B. aryabhattai</i> CAP53	2	202,8 %	0,45
<i>B. flexus</i> BT054	3,65	136,1 %	0,11
Cepa BT155 de <i>Bacillus mycoides</i>	2,45	120,4 %	0,21
<i>B. aryabhattai</i> CAP56	2,17	116,7 %	0,20
<i>B. nealsonii</i> BOBA57	2,1	155,6 %	0,03
<i>E. cloacae</i> CAP12	2,8	133,3 %	0,41
Desconocido 8	2,4	77,8 %	0,65
Desconocido 122	1,77	105,6 %	0,11
Desconocido 15	1,9	77,8 %	0,41
Desconocido 39	1,4	100,0 %	0,20
Desconocido 401	1,8	111,1 %	0,21
Desconocido 402	2	85,2 %	0,27
Desconocido 41	1,53	80,6 %	0,31
Desconocido 42	1,45	77,8 %	0,15
Desconocido 44	1,4	133,3 %	0,08
Desconocido 51	2,2	102,9 %	0,21

Las cepas bacterianas que produjeron el mayor efecto sobre la salud global y la altura de las plantas en el ensayo inicial con lechuga se sometieron a identificación adicional. Las cepas bacterianas se cultivaron durante la noche en caldo Luria Bertani a 37 °C y durante la noche los cultivos se centrifugaron en una centrífuga. El medio se decantó y el sedimento bacteriano restante se sometió a aislamiento de ADN cromosómico usando el kit de aislamiento de ADN cromosómico bacteriano de Qiagen. El ADN cromosómico se sometió a amplificación por PCR de las regiones codificantes del ARNr 16S usando los cebadores E338F 5'-ACT CCT ACG GGA GGC AGC AGT-3' (SEQ ID NO: 122),

E1099R A 5'-GGG TTG CGC TCG TTG C-3' (SEQ ID NO: 123) y E1099R B 5'-GGG TTG CGC TCG TTA C-3' (SEQ ID NO: 124). Se purificaron amplicones de PCR usando un kit de purificación de PCR Promega, y los amplicones resultantes se diluyeron y enviaron al DNA Core de la Universidad de Missouri para la secuenciación del ADN. Las secuencias de ADN se compararon con la base de datos NCBI BLAST de aislados bacterianos, y se identificaron géneros y especies mediante comparación directa con cepas conocidas. Las principales especies identificadas se indican en la Tabla 14. En muchos casos, las secuencias de ADN del ARNr 16S sólo pudieron delimitar el género de la cepa bacteriana seleccionada. En los casos en los que no pudo realizarse una identificación directa, se realizaron análisis bioquímicos adicionales, usando métodos convencionales en el campo, para diferenciar cepas a nivel de especie y cepa, y se enumeran en la Tabla 15.

TABLA 15

Ensayo	CAP12 de <i>E. cloacae</i>	NC35 de <i>P. kondratiaevae</i>	CAP53 de <i>P. anyabhattai</i>	BT054 de <i>B. flexus</i>	BT155 de <i>B. mycoides</i>	CAP56 de <i>B. anyabhattai</i>	BOBA57 de <i>B. nealsoni</i>
Ureasa	-	-	-	-	-	-	+
Catalasa	+	+	+	+	+	+	+
Oxidasa	-	+	+	+	-	-	-
Nitrato	+	+	-	+	+	-	+
Crecimiento, NaCl al 5 %	+	-	+	+	-	+	+
Crecimiento, NaCl al 7,5 %	-	-	+	+	-	+	-
Crecimiento, 42 °C	+	+	+	+	+	+	+
Crecimiento, 50 °C	-	-	+	+	-	+	-
Crecimiento, pH 5	+	-	+	+	-	+	-
Crecimiento, pH 9	+	+	+	+	+	+	+
Ácido, Celobiosa	+	-	+	+	+	+	-
Ácido, Lactosa	+	-	+	+	+	-	+
Ácido, Almidón	-	-	-	+	-	+	-

Ejemplo 15. Aislamiento e identificación de cepas bacterianas que promueven el crecimiento vegetal adicionales.

Se recogieron muestras de suelo de campos agrícolas cerca de Gas, Kansas, se diluyeron en agua esterilizada y se extendieron sobre placas de agar nutritivo. Se seleccionaron para estudios posteriores aislados bacterianos que demostraron altas tasas de crecimiento y de los que pudieron hacerse pases y se propagaron. Las cepas seleccionadas se cultivaron en medio mínimo (3 g de KH_2PO_4 , 6 g de Na_2HPO_4 , 1 g de NH_4Cl , 0,50 g de NaCl , 0,15 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,013 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y 1 g de glucosa, por L en peso seco). Se centrifugaron cultivos durante la noche (30 °C) de cepas seleccionadas, el medio se retiró por decantación y se resuspendieron en una cantidad igual de agua destilada. Las semillas de maíz se recubrieron con un polímero de semillas comercial mezclado con agua sola (1,6 µl por semilla en total) o un polímero de semillas comercial que contenía cepas bacterianas seleccionadas (1,6 µl por semilla en total). Las semillas recubiertas se plantaron en macetas de 7,62 cm (3 pulgadas) de diámetro a una profundidad de 2,54 cm (1 pulgada) en tierra vegetal franca (Columbia, MO) que se tamizó para eliminar residuos grandes. Las plantas se cultivaron a temperaturas entre 18-24 °C (65-75 °F) con 11 horas de luz/día y 50 ml de riego en el momento de la siembra y cada 3 días. Después de dos semanas, se recogieron las alturas de las plantas y diámetros de las hojas, así como la salud general de las plantas. Para ensayos de germinación y determinación de la longitud de la raíz a los 3 días, las semillas se recubrieron como se indicó anteriormente y se dispersaron uniformemente a razón de 10 semillas por toalla de papel. Las toallas de papel se humedecieron con 10 ml de agua, se enrollaron, se colocaron en una bolsa de plástico pequeña y se incubaron a 30 °C o se colocaron sobre una estera térmica de germinación a 27-30 °C (80-85 °F). Las mediciones de raíces se registraron después de 3 días. El cribado inicial de aislados de rizosfera dio como resultado la obtención de más de 100 especies distintas de bacterias y hongos de la rizosfera. Algunas de las especies bacterianas se describen en la Tabla 16. Las cepas identificadas se indican mediante sus identificaciones bacterianas adecuadas.

TABLA 16

	Tratamientos de semillas de maíz	
	Altura prom. (2 semanas)	Longitud prom. de la raíz (3 días)
Inoculante bacteriano	normalizada al control de polímero (%)	normalizada al control de polímero (%)
Control de polímero	100	100
<i>B. mycoides</i> EE118	111,1	189,1
<i>B. subtilis</i> EE148	99,4	172,8
<i>Alcaligenes faecalis</i> EE107	111,5	129,2
<i>B. mycoides</i> EE141	109,2	143,5
<i>B. mycoides</i> BT46-3	105,6	141,3
Bacteria <i>B. cereus</i> EE128	105,6	-
<i>B. thuringiensis</i> BT013A	101,8	103,8
<i>Paenibacillus massiliensis</i> BT23	104,2	139,4
Bacteria <i>B. cereus</i> EE349	105,2	-
<i>B. subtilis</i> EE218	106,6	-
<i>B. megaterium</i> EE281	107,8	-

Las cepas bacterianas que produjeron el mayor efecto sobre la salud vegetal se describen en la Tabla 16. Las cepas bacterianas se cultivaron durante la noche en caldo Luria Bertani a 37 °C y durante la noche los cultivos se centrifugaron en una centrífuga. El medio se decantó y el sedimento bacteriano restante se sometió a aislamiento de ADN cromosómico usando el kit de aislamiento de ADN cromosómico bacteriano de Qiagen. El ADN cromosómico se sometió a amplificación por PCR de las regiones codificantes del ARNr 16S usando los cebadores E338F 5'-ACT CCT ACG GGA GGC AGC AGT-3' (SEQ ID NO: 122), E1099R A 5'-GGG TTG CGC TCG TTG C-3' (SEQ ID NO: 123) y E1099R B 5'-GGG TTG CGC TCG TTA C-3' (SEQ ID NO: 124). Se purificaron amplicones de PCR usando un kit de purificación de PCR Promega, y los amplicones resultantes se diluyeron y enviaron al DNA Core de la Universidad de Missouri para la secuenciación del ADN. Las secuencias de ADN se compararon con la base de datos NCBI BLAST de aislados bacterianos, y se identificaron géneros y especies mediante comparación directa con cepas conocidas. Las principales especies identificadas se indican en la Tabla 16. En muchos casos, las secuencias de ADN del ARNr 16S sólo pudieron delimitar el género de la cepa bacteriana seleccionada. En los casos en los que no pudo realizarse una identificación directa, se realizaron análisis bioquímicos adicionales, usando métodos convencionales en el campo, para diferenciar cepas a nivel de especie y cepa, y las cepas diferenciadas se enumeran en la Tabla 17.

TABLA 17

Ensayo	BT013A de <i>B. thuringiensis</i>	Miembro EE349 de la familia de <i>B. cereus</i>	EE148 de <i>B. subtilis</i>	EE218 de <i>B. subtilis</i>	EE218 de <i>B. megaterium</i>	BT23 de <i>Paenibacillus massiliensis</i>	BT46-3 de <i>B. mycoides</i>	EE107 de <i>Alcaligenes faecalis</i>	EE118 de <i>B. mycoides</i>	Miembro EE128 de la familia de <i>B. cereus</i>	EE141 de <i>B. mycoides</i>
Motilidad	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-
Colonia de rizoides	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+
Catalasa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Oxidasa	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Nitrato	+	+	wk	-	-	-	+	+	+	+	+
Crecimiento, NaCl al 5 %	+	wk	-	+	+	-	+	+	-	+	-
Crecimiento, NaCl al 7,5 %	wk	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
Crecimiento, 42 °C	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Crecimiento, 50 °C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Crecimiento, pH 5	wk	-	+	+	+	-	wk	+	-	+	-
Crecimiento, pH 9	+	+	-	+	+	-	wk	+	+	+	-
Ácido, Celobiosa	-	-	wk	+	-	+	+	wk	+	-	wk
Ácido, Lactosa	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	wk
Ácido, Almidón	-	+	-	+	+	-	+	wk	+	+	-

Wk = crecimiento débil o crecimiento bajo

Ejemplo 16. Ensayos de cepas bacterianas que promueven el crecimiento vegetal en alfalfa.

Las cepas seleccionadas se cultivaron en medio mínimo (3 g de KH_2PO_4 , 6 g de Na_2HPO_4 , 1 g de NH_4Cl , 0,50 g de NaCl , 0,15 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,013 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y 1 g de glucosa, por L en peso seco). Se centrifugaron cultivos durante la noche (30 °C) de cepas seleccionadas, el medio se retiró por decantación y las bacterias se resuspendieron en una cantidad igual de agua destilada. Se plantaron diez semillas de alfalfa recubiertas con Zeba para cada tratamiento a una profundidad de 0,6 cm en tierra vegetal franca (Columbia, MO) que se tamizó para eliminar residuos grandes. Las semillas se inocularon en el momento de la siembra con 0,5 µl de bacterias resuspendidas en agua mezcladas con 10 ml de H_2O . Diez ml de H_2O fueron suficientes para suministrar las bacterias dentro de los 7,62 centímetros³ (3 pulgadas³) del suelo y saturar el suelo para una adecuada germinación de las semillas. Las plantas se cultivaron a temperaturas entre 18-24 °C (65-75 °F) con 11 horas de luz/día y 5 ml de riego cada 3 días. Se permitió que la alfalfa creciera durante 1 semana para analizar la emergencia y el crecimiento inicial de las plantas en las condiciones descritas. En la Tabla 18 se enumeran las cepas identificadas indicadas por sus identificaciones bacterianas adecuadas y los datos de altura final.

TABLA 18

	Alfalfa		
Inoculante bacteriano	Med. Altura (cm)	Comparación	ETM
Sin inocular	4,82	-	0,008
<i>B. aryabhattai</i> CAP56	4,85	101,20 %	0,016
<i>B. nealsonii</i> BOBA57	4,86	101,70 %	0,021
<i>E. cloacae</i> CAP12	5,6	116,23 %	0,020

Ejemplo 17. Ensayos de cepas bacterianas que promueven el crecimiento vegetal en pepinos.

Las cepas seleccionadas se cultivaron en medio mínimo (3 g de KH_2PO_4 , 6 g de Na_2HPO_4 , 1 g de NH_4Cl , 0,50 g de NaCl , 0,15 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,013 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y 1 g de glucosa, por L en peso seco). Se centrifugaron cultivos durante la noche (30 °C) de cepas seleccionadas, el medio se retiró por decantación y se resuspendieron en la misma cantidad de agua destilada. Se plantaron diez semillas de pepino para cada tratamiento a una profundidad de 1 cm en tierra vegetal franca (Columbia, MO) que se tamizó para eliminar residuos grandes. Las semillas se inocularon en el momento de la siembra con 0,5 µl de bacterias resuspendidas en agua mezcladas con 10 ml de H_2O . Diez ml de H_2O fueron suficientes para suministrar las bacterias dentro de los 7,62 centímetros³ (3 pulgadas³) del suelo y saturar el suelo para una adecuada germinación de las semillas. Las plantas se cultivaron a temperaturas entre 18-24 °C (65-75 °F) con 11 horas de luz/día y 5 ml de riego cada 3 días. Se permitió que los pepinos crecieran durante 2 semanas para analizar la emergencia y el crecimiento inicial de las plantas en las condiciones descritas. En la Tabla 19 se enumeran las cepas identificadas indicadas por sus identificaciones bacterianas adecuadas y los datos de altura final.

TABLA 19

	Pepinos		
Inoculante bacteriano	Altura prom. (cm)	Comparación	ETM
Sin inocular	11,23	-	0,067
<i>B. aryabhattai</i> CAP53	11,5	102,00 %	0,023
<i>B. aryabhattai</i> CAP56	11,35	101,20 %	0,035
<i>B. nealsonii</i> BOBA57	11,33	101,10 %	0,014

Ejemplo 18. Ensayos de cepas bacterianas que promueven el crecimiento vegetal en calabaza amarilla.

Las cepas seleccionadas se cultivaron en medio mínimo (3 g de KH_2PO_4 , 6 g de Na_2HPO_4 , 1 g de NH_4Cl , 0,50 g de NaCl , 0,15 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,013 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y 1 g de glucosa, por L en peso seco). Se centrifugaron cultivos durante la noche (30 °C) de cepas seleccionadas, el medio se retiró por decantación y se resuspendieron en una cantidad igual de agua destilada. Se plantaron diez semillas de calabaza amarilla para cada tratamiento a una profundidad de 1 cm en tierra vegetal franca (Columbia, MO) que se tamizó para eliminar residuos grandes. Las semillas se inocularon en el momento de la siembra con 0,5 µl de bacterias resuspendidas en agua mezcladas con 10 ml de H_2O . Diez ml de H_2O fueron suficientes para suministrar las bacterias dentro de los 7,62 centímetros³ (3 pulgadas³) del suelo y saturar el suelo para una adecuada germinación de las semillas. Las plantas se cultivaron a temperaturas entre 18-24 °C (65-75 °F) con 11 horas de luz/día y 5 ml de riego cada 3 días. Se permitió que la calabaza creciera durante 2 semanas para analizar la emergencia y el crecimiento inicial de las plantas en las condiciones descritas. En la Tabla 20 se enumeran las cepas identificadas indicadas por sus identificaciones bacterianas adecuadas, los datos de altura final y los datos de diámetro final de la hoja (por el espacio de las dos hojas).

TABLA 20

Inoculante bacteriano	Altura prom. (cm)	Calabaza amarilla Comparación	ETM	Diámetro de la hoja (cm)	Comparación
Sin inocular	10,16	-	0,028	5,08	-
<i>B. aryabhattai</i> CAP53	11,75	115,60 %	0,055	7,25	142,60 %
<i>B. flexus</i> BT054	11,88	116,90 %	0,017	6,36	125,20 %
<i>Bacillus mycoides</i> BT155	11,92	117,20 %	0,051	6,33	124,60 %
<i>B. aryabhattai</i> CAP56	11,95	117,60 %	0,027	6,33	124,60 %
<i>B. nealsonii</i> BOBA57	11,89	117,00 %	0,118	6,42	126,40 %
<i>E. cloacae</i> CAP12	11,42	112,30 %	0,039	6,83	134,40 %

Ejemplo 19. Ensayos de cepas bacterianas que promueven el crecimiento vegetal en raigrás.

- 5 Las cepas seleccionadas se cultivaron en medio mínimo (3 g de KH_2PO_4 , 6 g de Na_2HPO_4 , 1 g de NH_4Cl , 0,50 g de NaCl , 0,15 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,013 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y 1 g de glucosa, por L en peso seco). Se centrifugaron cultivos durante la noche (30 °C) de cepas seleccionadas, el medio se retiró por decantación y se resuspendieron en una cantidad igual de agua destilada. Se plantaron treinta semillas de raigrás para cada tratamiento a una profundidad de 0,3 cm en tierra vegetal franca (Columbia, MO) que se tamizó para eliminar residuos grandes. Las semillas se
- 10 inocularon en el momento de la siembra con 0,5 µl de bacterias resuspendidas en agua mezcladas con 10 ml de H_2O . Diez ml de H_2O fueron suficientes para suministrar las bacterias dentro de los 7,62 centímetros³ (3 pulgadas³) del suelo y saturar el suelo para una adecuada germinación de las semillas. Las plantas se cultivaron a temperaturas entre 18-24 °C (65-75 °F) con 11 horas de luz/día y 5 ml de riego cada 3 días. Se permitió que el raigrás creciera durante 1,5 semanas para analizar la emergencia y el crecimiento inicial de las plantas en las condiciones descritas.
- 15 En la Tabla 21 se enumeran las cepas identificadas indicadas por sus identificaciones bacterianas adecuadas y los datos de altura.

TABLA 21

Inoculante bacteriano	Raigrás Altura prom. (cm)	Comparación	ETM
Sin inocular	1,61	-	0,023
<i>B. aryabhattai</i> CAP53	2,01	124,70 %	0,012
<i>B. flexus</i> BT054	2,21	137,30 %	0,034
<i>Bacillus mycoides</i> BT155	2,29	142,20 %	0,049
<i>B. aryabhattai</i> CAP56	2,19	136,00 %	0,009
<i>B. nealsonii</i> BOBA57	2,29	142,40 %	0,045
<i>E. cloacae</i> CAP12	1,98	122,50 %	0,015

- 20 Ejemplo 20. Ensayos de cepas bacterianas que promueven el crecimiento vegetal en maíz.

- Las cepas seleccionadas se cultivaron en medio mínimo (3 g de KH_2PO_4 , 6 g de Na_2HPO_4 , 1 g de NH_4Cl , 0,50 g de NaCl , 0,15 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,013 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y 1 g de glucosa, por L en peso seco). Se centrifugaron cultivos durante la noche (30 °C) de cepas seleccionadas, el medio se retiró por decantación y se resuspendieron en una cantidad igual de agua destilada. Se plantaron diez semillas de maíz para cada tratamiento a una profundidad de 2,5 cm en tierra vegetal franca (Columbia, MO) que se tamizó para eliminar residuos grandes. Las semillas se inocularon en el momento de la siembra con 0,5 µl de bacterias resuspendidas en agua mezcladas con 10 ml de H_2O . Diez ml de H_2O fueron suficientes para suministrar las bacterias dentro de los 7,62 centímetros³ (3 pulgadas³) del suelo y saturar el suelo para una adecuada germinación de las semillas. Las plantas se cultivaron a temperaturas entre 18-24 °C (65-75 °F) con 11 horas de luz/día y 5 ml de riego cada 3 días. Se permitió que el maíz creciera durante 2 semanas para analizar la emergencia y el crecimiento inicial de las plantas en las condiciones descritas. En la Tabla 22 se enumeran las cepas identificadas indicadas por sus identificaciones bacterianas adecuadas y los datos de altura final.

TABLA 22

Inoculante bacteriano	Maíz Altura prom. (cm)	Comparación	ETM
Sin inocular	8,9	-	0,039
<i>B. aryabhattai</i> CAP53	11,01	123,60 %	0,081
<i>B. flexus</i> BT054	9,96	112,00 %	0,095
Cepa BT155 de <i>Bacillus mycoides</i>	9,6	107,90 %	0,041
<i>B. aryabhattai</i> CAP56	9,54	107,10 %	0,088
<i>B. nealsonii</i> BOBA57	9,23	103,70 %	0,077

Ejemplo 21. Ensayos de cepas bacterianas que promueven el crecimiento vegetal en soja.

Las cepas seleccionadas se cultivaron en medio mínimo (3 g de KH_2PO_4 , 6 g de Na_2HPO_4 , 1 g de NH_4Cl , 0,50 g de NaCl , 0,15 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,013 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y 1 g de glucosa, por L en peso seco, o para *Bradyrhizobium* o *Rhizobium* en medio con manitol de levadura). Se centrifugaron cultivos durante la noche (30 °C) de cepas seleccionadas, el medio se retiró por decantación y se resuspendieron en la misma cantidad de agua destilada. Se plantaron diez semillas de soja para cada tratamiento a una profundidad de 2,5 cm en tierra vegetal franca (Columbia, MO) que se tamizó para eliminar residuos grandes. Las semillas se inocularon en el momento de la siembra con 0,5 µl de bacterias resuspendidas en agua mezcladas con 10 ml de H_2O . Cuando se sometieron a ensayo dos cepas bacterianas, se mezclaron 0,5 µl de cada bacteria resuspendida en 10 ml de H_2O . Diez ml de H_2O fueron suficientes para suministrar las bacterias dentro de los 7,62 centímetros³ (3 pulgadas³) del suelo y saturar el suelo para una adecuada germinación de las semillas. Las plantas se cultivaron a temperaturas entre 18-24 °C (65-75 °F) con 11 horas de luz/día y 5 ml de riego cada 3 días. Se permitió que la soja creciera durante 2 semanas para analizar la emergencia y el crecimiento inicial de las plantas en las condiciones descritas. En la Tabla 23 se enumeran las cepas identificadas indicadas por sus identificaciones bacterianas adecuadas y los datos de altura final. La coinoculación de cepas de bacterias divulgadas en el presente documento con miembros de *Bradyrhizobium* sp. o *Rhizobium* sp. conduce a un aumento en el crecimiento vegetal en comparación con cualquiera de los inoculantes solos.

TABLA 23

Inoculante bacteriano	Semillas de soja		
	Altura prom. (cm)	Comparación	ETM
Sin inocular	13,94	-	0,089
<i>B. aryabhattai</i> CAP53	16,32	117,1 %	0,146
<i>B. flexus</i> BT054	17,85	128,0 %	0,177
Cepa BT155 de <i>Bacillus mycoides</i>	18,93	135,8 %	0,117
<i>B. aryabhattai</i> CAP56	17,23	123,6 %	0,133
<i>B. aryabhattai</i> CAP53	16,32	117,1 %	0,077
<i>B. aryabhattai</i> CAP53 y <i>Bradyrhizobium</i> sp.	16,72	119,9 %	0,182
<i>B. aryabhattai</i> CAP53 y <i>Rhizobium</i> sp.	17,32	124,2 %	0,086
<i>Bradyrhizobium</i> sp.	14,25	102,2 %	
<i>Rhizobium</i> sp.	14,75	105,8 %	

Ejemplo 22. Bacterias *Bacillus* con atributos que promueven el crecimiento vegetal.

Se cultivó cepa BT155 de *Bacillus mycoides*, cepa EE118 de *Bacillus mycoides*, cepa EE141 de *Bacillus mycoides*, cepa BT46-3 de *Bacillus mycoides*, cepa EE349 de la bacteria *Bacillus*, cepa BT013A de *Bacillus thuringiensis* y cepa EE281 de *Bacillus megaterium* en caldo Luria Bertani a 37 °C y los cultivos durante la noche se centrifugaron, el medio se retiró por decantación y se resuspendieron en la misma cantidad de agua destilada. Se plantaron 20 semillas de maíz para cada tratamiento a una profundidad de 2,5 cm en tierra vegetal franca (Columbia, MO) que se tamizó para eliminar residuos grandes. Las semillas se inocularon en el momento de la siembra con 0,5 µl de bacterias resuspendidas en agua mezcladas con 50 ml de H_2O . Cincuenta ml de H_2O fueron suficientes para suministrar las bacterias dentro de los 442,5 cm³ (29 pulgadas³) del suelo y saturar el suelo para una adecuada germinación de las semillas. Las plantas se cultivaron a temperaturas entre 18,33-22,22 °C (65-72 °F) con 13 horas de luz/día y 5 ml de riego cada 3 días. Se permitió que las plántulas crecieran durante 2 semanas para analizar la emergencia y el crecimiento inicial de las plantas en las condiciones descritas. En la Tabla 24 se enumeran las cepas identificadas indicadas por sus identificaciones bacterianas adecuadas y los datos de altura final.

TABLA 24

Inoculante bacteriano	Altura prom., cm, Maíz	Porcentaje	ETM,
Control de H ₂ O	11,41	100 %	0,123
<i>B. mycoides</i> EE118	12,43	108,9 %	0,207
<i>B. mycoides</i> EE141	12,84	112,5 %	0,231
<i>B. mycoides</i> BT46-3	11,81	103,5 %	0,089
<i>Bacillus thuringiensis</i> BT013A	12,05	105,6 %	0,148
Miembro de la familia de <i>Bacillus cereus</i> EE128	13,12	114,9 %	0,159
<i>Bacillus mycoides</i> BT155	12,85	112,6 %	0,163
<i>Bacillus megaterium</i> EE281	11,99	105,1 %	0,098

Todas las bacterias que promueven el crecimiento vegetal sometidas a ensayo tuvieron un efecto beneficioso sobre la altura del maíz a las dos semanas en las condiciones descritas. La cepa EE128 de la bacteria *Bacillus* tuvo el mayor efecto en este ensayo, proporcionando un aumento de más del 14 % en la altura del maíz.

Ejemplo 23. Selección potenciada de bacteria *Bacillus* para cribar actividades que promueven el crecimiento vegetal y otras actividades beneficiosas como hospedador de expresión de BEMD.

El sistema de BEMD puede usarse para presentar una amplia gama de proteínas, péptidos y enzimas usando cualquiera de las secuencias de direccionamiento descritas en el presente documento para proporcionar efectos agrícolas beneficiosos. Pueden obtenerse efectos beneficiosos adicionales seleccionando un hospedador de expresión (una bacteria *Bacillus*) que tenga atributos beneficiosos inherentes. Muchas cepas de miembros de las bacterias *Bacillus* tienen beneficios que promueven el crecimiento vegetal. Adicionalmente, muchas cepas de bacterias *Bacillus* tienen efectos protectores, a través de actividad fungicida directa, nematocida u otras actividades protectoras. Al utilizar estas cepas como hospedadores de expresión para el sistema de BEMD, el producto de esporas final tendría una combinación de beneficios positivos en la agricultura.

La Tabla 25 proporciona resultados para experimentos en los que se expresó una proteína de fusión en diversas cepas de bacterias *Bacillus*. Todas las cepas expresan una proteína de fusión que comprende los aminoácidos 1-35 de la SEQ ID NO: 1 y la fosfatasa PhoA4 de *Bacillus subtilis*, una enzima beneficiosa para potenciar la captación de fosfato en el maíz. El gen se sintetizó, se clonó en el vector pMK4 y se introdujo en cada uno de los *Bacillus* spp. indicado en la Tabla 25 a continuación. Las cepas se llevaron a esporulación mediante incubación a 30 °C en placas de agar nutritivo que contenían cloranfenicol 10 µg/ml durante tres días. Las esporas se recogieron, se lavaron y aplicaron al maíz en el momento de la siembra en una proporción de 1×10^5 UFC/ml en 50 ml de agua por maceta de 7,62 cm de diámetro con 5 mg de polifosfato por maceta. El maíz se cultivó en tierra vegetal franca limosa durante dos semanas. Las plantas se cultivaron bajo una luz ideal usando lámparas T5, 54 vatios y se expusieron a 13 horas de luz al día en condiciones de temperatura controlada entre 15,5-25,5 °C. Las plantas se regaron hasta la saturación cada tres días durante un ensayo de dos semanas. Al cabo de dos semanas, se midió la altura de cada planta, y se normalizaron las mediciones para controlar las esporas de *Bacillus thuringiensis*. La expresión de la proteína de fusión SEQ ID NO: 1 - Fosfatasa condujo a un aumento en la altura del maíz a las 2 semanas independientemente de la cepa hospedadora de expresión seleccionada. Como se muestra en la tabla 25, uso de una bacteria *Bacillus* que promueve el crecimiento vegetal aumentó adicionalmente la altura del maíz

TABLA 25.

Especies de <i>Bacillus</i>	Cepa	Proteína de fusión	Altura a las 2 semanas, Normalizada
<i>B. thuringiensis</i>	Cepa BT013A	Ninguno	100 %
<i>B. thuringiensis</i>	Cepa BT013A	SEQ ID NO: 1-Fosfatasa	117,4 %
<i>B. mycoides</i>	Cepa EE141	Ninguno	107,3 %
<i>B. mycoides</i>	Cepa EE141	SEQ ID NO: 1-Fosfatasa	123,3 %
Bacteria <i>B. cereus</i>	Cepa EE128	Ninguno	124,1 %
Bacteria <i>B. cereus</i>	Cepa EE128	SEQ ID NO: 1-Fosfatasa	131,7 %
<i>B. mycoides</i>	Cepa BT155	Ninguno	104,8 %
<i>B. mycoides</i>	Cepa BT155	SEQ ID NO: 1-Fosfatasa	121,9 %

Ejemplo 24. Uso de diversas secuencias de direccionamiento para expresar β-galactosidasa en la superficie de *Bacillus thuringiensis*.

Puede usarse una amplia diversidad de secuencias de direccionamiento que tienen un alto grado de homología con los aminoácidos 20-35 de BclA (aminoácidos 20-35 de la SEQ ID NO: 1) para presentar enzimas, proteínas y péptidos en la superficie de bacterias *Bacillus*. Se compararon varias secuencias de direccionamiento mediante la preparación de proteínas de fusión que contenían las secuencias de direccionamiento unidas a lipasa de *Bacillus subtilis*. Las construcciones de fusión se sintetizaron usando los promotores nativos de la secuencia de direccionamiento, se clonaron en el plásmido replicante pMK4 y se introdujeron en *Bacillus thuringiensis* BT013A. Las cepas se llevaron a esporulación mediante incubación a 30 °C en placas de agar nutritivo que contenían cloranfenicol 10 µg/ml durante 3 días. Las esporas se recogieron, se lavaron y se resuspendieron en PBS a una velocidad de 1×10^8 /ml. Se suspendieron 1×10^5 esporas para cada construcción de fusión en 400 µl de dH₂O. Las reacciones se calentaron con los componentes de la reacción hasta la temperatura de reacción deseada (40 °C). Se añadieron 200 µl de tampón de trabajo (Solución A: Solución B 9:1). La Solución A era Tris 50 mM, pH 10 y ácido desoxicólico 13,6 mM y la Solución B era palmitato de p-nitrofenilo 3 mg/ml en isopropanol. La reacción se incubó a 40 °C durante 10 minutos y se colocó en hielo, se centrifugó para retirar las esporas y se registró la absorbancia a 420 nm. Los resultados se muestran en la Tabla 26 a continuación. La actividad se normalizó a una proteína de fusión de control que comprendía los aminoácidos 1-35 de la SEQ ID NO: 1 fusionados a lipasa de *Bacillus subtilis*.

TABLA 26.

Cepa	Secuencia de direccionamiento	Enzima	Actividad relativa
<i>B. thuringiensis</i> BT013A	Aminoácidos 1-35 de la SEQ ID NO: 1	Lipasa	100 %
<i>B. thuringiensis</i> BT013A	Aminoácidos 1-27 de la SEQ ID NO: 3	Lipasa	92,5 %
<i>B. thuringiensis</i> BT013A	Aminoácidos 1-28 de la SEQ ID NO: 7	Lipasa	13,5 %
<i>B. thuringiensis</i> BT013A	Aminoácidos 1-24 de la SEQ ID NO: 9	Lipasa	24,8 %
<i>B. thuringiensis</i> BT013A	Aminoácidos 1-33 de la SEQ ID NO: 13	Lipasa	98,5 %
<i>B. thuringiensis</i> BT013A	Aminoácidos 1-33 de la SEQ ID NO: 21	Lipasa	107,8 %
<i>B. thuringiensis</i> BT013A	SEQ ID NO: 60	Lipasa	137,1 %
<i>B. thuringiensis</i> BT013A	SEQ ID NO: 62	Lipasa	146,3 %
<i>B. thuringiensis</i> BT013A	SEQ ID NO: 64	Lipasa	115,7 %
<i>B. thuringiensis</i> BT013A	SEQ ID NO: 68	Lipasa	81,5 %

Varias secuencias de direccionamiento unidas a la lipasa dan como resultado niveles de expresión y actividad enzimática más altos en la superficie de las esporas. En particular, las SEQ ID NO. 60, 62 y 64, conteniendo, cada una, una secuencia de direccionamiento más corta, dieron como resultado una expresión de fusión potenciada en la superficie de las esporas de BEMD. Todas las proteínas de fusión que contenían secuencias de direccionamiento sometidas a ensayo dieron como resultado la presentación en superficie de lipasa.

Ejemplo 25. Uso de diversas secuencias de exosporio para expresar lipasa en la superficie de *Bacillus thuringiensis* y demostración de la localización de la proteína de fusión en la superficie del exosporio.

Puede usarse una amplia diversidad de proteínas de exosporio para presentar enzimas, proteínas y péptidos en la superficie de bacterias *Bacillus*. Se compararon varias proteínas de exosporio diferentes mediante la preparación de proteínas de fusión que contenían las proteínas de exosporio unidas a lipasa de *Bacillus subtilis* como se describe en el Ejemplo 34. Se sintetizaron construcciones de fusión usando el promotor nativo de la proteína de exosporio indicado en la Tabla 27 a continuación, se clonaron en el plásmido replicante pMK4 y se introdujeron en *Bacillus thuringiensis* BT013A. Se prepararon esporas que presentaban las diversas fusiones de proteína de exosporio-lipasa de *Bacillus subtilis* 168 cultivando las bacterias transformadas en caldo de infusión de cerebro y corazón con presión selectiva de cloranfenicol 10 µg/ml, sembrando en placas de agar nutritivo e incubando a 30 °C durante 3 días. Después de 3 días, las esporas se retiraron por lavado de las placas, se purificaron por centrifugación y se resuspendieron en PBS a 1×10^8 UFC/ml.

Se suspendieron 1×10^5 esporas para cada construcción de fusión en 400 µl de dH₂O. Las reacciones se calentaron con los componentes de la reacción hasta la temperatura de reacción deseada (40 °C). Se añadieron 200 µl de tampón de trabajo (Solución A: Solución B 9:1). La Solución A era Tris 50 mM, pH 10 y ácido desoxicólico 13,6 mM y la Solución B era palmitato de p-nitrofenilo 3 mg/ml en isopropanol. La reacción se incubó a 40 °C durante 10 minutos y se colocó en hielo, se centrifugó para retirar las esporas, y se registró la absorbancia a 420 nm. Los resultados se muestran en la Tabla 27, a continuación. La actividad se normalizó a la SEQ ID NO: 72 unida a lipasa.

TABLA 27.

Cepa	Proteína de exosporio	Enzima	Actividad relativa
<i>B. thuringiensis</i> BT013A	SEQ ID NO: 72	Lipasa	100 %
<i>B. thuringiensis</i> BT013A	SEQ ID NO: 73	Lipasa	134,5 %
<i>B. thuringiensis</i> BT013A	SEQ ID NO: 76	Lipasa	17,8 %
<i>B. thuringiensis</i> BT013A	SEQ ID NO: 80	Lipasa	19,8 %
<i>B. thuringiensis</i> BT013A	SEQ ID NO: 81	Lipasa	8,2 %

El uso de las proteínas de exosporio de las SEQ ID NO. 72 y 73 dio como resultado la mayor actividad enzimática en la espota. Todas las proteínas de fusión que contenían proteínas de exosporio dieron como resultado la presentación en superficie de lipasa de *Bacillus subtilis* 168 activa, aunque a distintos niveles.

Se demostró que proteínas adicionales de exosporio dan como resultado el direccionamiento de proteínas de fusión al exosporio usando el indicador fluorescente mCherry. Se crearon construcciones de fusión que contenían las proteínas de exosporio de las SEQ ID NO. 74, 83 y 73 unidas al indicador mCherry. Se cultivaron esporas durante 1,5 días, se recogieron y se resuspendieron como se ha descrito anteriormente. Se colocaron 7 µl de esporas fluorescentes bajo un microscopio Nikon E1000 y se tomaron imágenes durante la esporulación tardía. La localización circular en un anillo es indicativa de la localización de la capa externa de esporas y el aspecto coincide con la de una proteína de exosporio. Los resultados de la microscopía de fluorescencia se muestran en la Figura 2. Las Fig. 2A, 2B y 2C son imágenes de microscopía fluorescente de esporas que expresan proteínas de fusión que comprenden las proteínas de exosporio de las SEQ ID NO. 74, 83 y 73, respectivamente, y el indicador mCherry. Las tres fusiones demostraron niveles altos de fluorescencia y localización de exosporio, demostrando su utilidad potencial para la expresión de proteínas extrañas en la superficie del exosporio.

Ejemplo 26. Uso de diversas secuencias de direccionamiento y proteínas de exosporio para expresar fosfatasa en

esporas de *Bacillus subtilis* y efectos de las esporas que expresan fosfatasa en semillas de soja.

Se crearon esporas de BEMD que expresaban Fosfatasa A4 (PhoA4) de *Bacillus subtilis* EE148 mediante la síntesis de genes que codifican diversas secuencias de direccionamiento y proteínas de exosporio bajo el control de sus promotores nativos unidos a PhoA4. Los genes sintetizados se clonaron en pMK4 y se introdujeron en *Bacillus thuringiensis* BT013A. Se prepararon esporas que presentaban las diversas fusiones de proteína de exosporio-PhoA4 de *Bacillus subtilis* EE148 cultivando las bacterias transformadas en caldo de infusión de cerebro y corazón con presión selectiva de cloranfenicol 10 µg/ml, sembrando en placas de agar nutritivo e incubando a 30 °C durante tres días. Después de tres días, las esporas se retiraron por lavado de las placas, se purificaron por centrifugación y se resuspendieron en PBS a 1×10^8 UFC/ml.

Se plantaron semillas de soja a 2,54 cm de profundidad en macetas de 10 cm de profundidad llenas con tierra vegetal franca convencional. Las esporas de BEMD que expresaban PhoA4 se diluyeron a una concentración de 1×10^4 /ml en 50 ml de agua y se aplicaron a cada planta en el momento de la siembra. También se incluyó un control con sólo agua. Se añadió polifosfato a las macetas en líquido a velocidad de 0,5 mg/maceta. Las plantas se cultivaron bajo una luz ideal usando lámparas T5, 54 vatios y se expusieron a 13 horas de luz al día en condiciones de temperatura controlada entre 15,5 y 25,5 °C. Las plantas se regaron hasta la saturación cada tres días durante el ensayo de dos semanas. Al cabo de dos semanas, se midió la altura de cada planta y las mediciones se normalizaron a las plantas con sólo agua de control.

Los resultados se muestran en la Tabla 28. La soja cultivada en presencia de esporas de BEMD que expresaban proteínas de fusión que contenían PhoA4 unida a diversas secuencias de direccionamiento y proteínas de exosporio con diferentes compañeros de fusión con PhoA4 presentó crecimiento potenciado, pero el alcance del efecto varió dependiendo de la secuencia de direccionamiento o la proteína de exosporio utilizada.

TABLA 28.

Especies de <i>Bacillus</i>	Secuencia de direccionamiento o proteína de exosporio unida a PhoA4	Altura a las 2 semanas, Normalizada
H2O (Sin bacterias)	N/A	100 %
Cepa BT013A de <i>Bacillus thuringiensis</i>	Aminoácidos 1-35 de la SEQ ID NO: 1	100 %
Cepa BT013A de <i>Bacillus thuringiensis</i>	Aminoácidos 1-28 de la SEQ ID NO: 3	117,4 %
Cepa BT013A de <i>Bacillus thuringiensis</i>	Aminoácidos 1-33 de la SEQ ID NO: 21	107,3 %
Cepa BT013A de <i>Bacillus thuringiensis</i>	SEQ ID NO: 60	123,3 %
Cepa BT013A de <i>Bacillus thuringiensis</i>	SEQ ID NO: 62	124,1 %
Cepa BT013A de <i>Bacillus thuringiensis</i>	SEQ ID NO: 72	131,7 %
Cepa BT013A de <i>Bacillus thuringiensis</i>	SEQ ID NO: 73	104,8 %

Ejemplo 27. Coaplicación de tratamientos de semillas y esporas de BEMD, fertilizantes líquidos y otros aditivos.

Se sometió a ensayo la compatibilidad de las esporas de BEMD que expresaban proteínas de fusión con diversos tratamientos de semillas. Las esporas de BEMD expresaban proteínas de fusión que comprendían la secuencia de direccionamiento de los aminoácidos 1-35 de la SEQ ID NO: 1 unida a una fosfatasa (PhoA4) de *Bacillus subtilis* EE148 o el péptido POLARIS. Los genes sintetizados se clonaron en pMK4 y se introdujeron en *Bacillus thuringiensis* BT013A. Se prepararon esporas que presentaban las diversas fusiones de proteína de exosporio-PhoA4 o POLARIS de *Bacillus subtilis* EE148 cultivando las bacterias transformadas en caldo de infusión de cerebro y corazón con presión selectiva de cloranfenicol 10 µg/ml, sembrando en placas de agar nutritivo e incubando a 30 °C durante tres días. Después de tres días, las esporas se retiraron por lavado de las placas, se purificaron por centrifugación y se resuspendieron en PBS a 1×10^8 UFC/ml.

Las plantas se cultivaron bajo una luz ideal usando lámparas T5, 54 vatios y se expusieron a 13 horas de luz al día en condiciones de temperatura controlada entre 15,5 y 25,5 °C. Las plantas se regaron hasta la saturación cada tres días durante el ensayo de dos semanas. Al cabo de dos semanas, se midió la altura de cada planta y las mediciones se normalizaron a las plantas con sólo agua de control. Los resultados se muestran en la Tabla 29, a continuación. Empapado = aplicado al suelo a razón de 50 ml por maceta. Polímero = polímero de recubrimiento de semillas ACCELERON únicamente. Se añadieron esporas de BEMD a razón de 1×10^4 células/50 ml para aplicaciones de empapado. Se añadieron esporas de BEMD a razón de $1,3 \times 10^4$ células/semilla para aplicaciones de recubrimiento de semillas. 10-34-0 y 6-24-6 son composiciones fertilizantes iniciales comerciales convencionales. 10-34-0 es fosfato de amonio líquido. 6-24-6 es un fertilizante de fosfato líquido bajo en sal con una formulación orto/poli. Colorante = Agente colorante de recubrimiento de semillas de color rojo Becker Underwood. MACHO, APRON y CRUISER son fungicidas comerciales que se usan en semillas. MACHO contiene el principio activo imidacloprid, APRON contiene el principio activo mefenoxam y CRUISER contiene una mezcla de los ingredientes activos tiametoxam, mefenoxam y fludioxonil. Se descubrió que las esporas eran compatibles con muchas aplicaciones de semillas y conservaban su capacidad para estimular el crecimiento vegetal en el maíz.

TABLA 29.

Tratamiento con BEMD	Producto químico	Altura del maíz a las 2 semanas, normalizada
Ninguno	Ninguno (Empapado con agua)	100 %
Ninguno	Sólo polímero	101,3 %
BEMD PhoA4	N/A (Empapado)	111,3 %
POLARIS de BEMD	N/A (Empapado)	106,7 %
BEMD PhoA4	Polímero	109,3 %
POLARIS de BEMD	Polímero	107,3 %
BEMD PhoA4	Polímero + Colorante	102,3 %
BEMD PhoA4	Polímero + MACHO	107,9 %
BEMD PhoA4	Polímero + APRON	112,3 %
BEMD PhoA4	Polímero + CRUISER	116,8 %
BEMD PhoA4	Polímero + Colorante + MACHO + APRON + CRUISER	113,7 %
Ninguno	10-34-0 Iniciador (Empapado)	108,5 %
BEMD PhoA4	10-34-0 Fertilizante inicial (Empapado)	114,7 %
Ninguno	6-24-6 Fertilizante inicial (Empapado)	102,6 %
BEMD PhoA4	6-24-6 Fertilizante inicial (Empapado)	112,9 %

Se descubrió que las esporas de BEMD eran compatibles con todas las enmiendas de recubrimiento de semillas sometidas a ensayo. Hubo una ligera disminución en la actividad cuando las esporas de PhoA4 de BEMD se combinaron con colorante y polímero solo, pero las esporas recuperaron plena actividad con colorante en combinación con otros fungicidas. Las esporas de BEMD también funcionaron bien con fertilizantes líquidos. Los fertilizantes iniciales contribuyeron al crecimiento vegetal probablemente a través de la suplementación directa de nutrientes. Las esporas de BEMD funcionaron con ambos fertilizantes iniciales, lo que sugiere que la actividad de la fosfatasa aún puede conducir a un mayor crecimiento vegetal en presencia de un exceso de nutrientes. Las combinaciones de esporas de BEMD con fungicidas presentaron mayores aumentos en el crecimiento vegetal que las esporas de BEMD solas, probablemente debido a la protección brindada a las plantas jóvenes de maíz durante el crecimiento inicial.

Ejemplo comparativo 12. El uso de esporas de BEMD como adición foliar para reducir la inhibición del crecimiento del maíz por estrés.

El sistema de presentación de esporas de BEMD puede usarse para suministrar enzimas que pueden aliviar parte del estrés del cultivo de plantas en el campo o en el invernadero. Para lograr esto, se seleccionaron enzimas que actuaban selectivamente sobre las especies reactivas de oxígeno en el suelo. Las especies reactivas de oxígeno son un marcador clave de estrés en las plantas.

Se generaron esporas de BEMD que expresaban proteínas de fusión que comprendían la secuencia de direccionamiento de los aminoácidos 1-35 de la SEQ ID NO: 1 unida a quitosinasa, superóxido dismutasa, catalasa o β 1,3 glucanasa de *Bacillus thuringiensis* BT013A. Los genes sintetizados se clonaron en pMK4 y se introdujeron en *Bacillus thuringiensis* BT013A. Se prepararon esporas que presentaban las diversas fusiones de proteínas cultivando las bacterias transformadas en caldo de infusión de cerebro y corazón con presión selectiva de cloranfenicol 10 μ g/ml, sembrando en placas de agar nutritivo e incubando a 30 °C durante tres días. Después de tres días, las esporas se retiraron por lavado de las placas, se purificaron por centrifugación y se resuspendieron en PBS a 1×10^8 UFC/ml.

Se cultivaron plantas de maíz de tres semanas de edad en la etapa V5 bajo luz ideal usando lámparas T5, 54 vatios y se expusieron a 13 horas de luz al día en condiciones de temperatura controlada entre 15,5 y 25,5 °C. Las plantas se regaron hasta la saturación cada tres días durante el curso del ensayo. A medida que las plantas alcanzan V5, se pulverizaron esporas de BEMD o productos químicos de control positivo sobre las hojas a 1×10^5 Esporas de BEMD/ml o en las dosis recomendadas para los productos químicos. Se aplicó un total de 1 ml de pulverización a cada planta individualmente. La altura de las plantas se tomó justo antes de la aplicación de las pulverizaciones foliares. Después, las plantas de maíz se estresaron calentándolas a 32,2 °C y disminuyendo el riego a una vez por semana. Las plantas se mantuvieron en condiciones de estrés durante dos semanas. Al cabo de las dos semanas, se midieron nuevamente las alturas de las plantas y se registró el aspecto visual. En estas condiciones de estrés, el crecimiento vegetal fue mínimo en los tratamientos de control. La capacidad de continuar creciendo en condiciones de estrés se midió mediante un aumento en la altura de la planta durante el lapso de dos semanas en comparación con el control con sólo agua. Los resultados se muestran en la Tabla 30, a continuación.

TABLA 30.

Tratamiento	Tasa	Cambio en la altura de la planta durante 2 semanas de estrés
Ninguno	Ninguno	0 %
Esporas de <i>Bacillus thuringiensis</i> BT013A	1 ml/planta	-1,6 %
Quitinasasa de BEMD	1 ml/planta	0,3 %
Quitinasasa y Quitosán de BEMD	1 ml/planta y 5 mM	4,7 %
Superóxido dismutasa de BEMD	1 ml/planta	8,3 %
B1,3 Glucanasa de BEMD	1 ml/planta	4,9 %
Ácido salicílico	1 ml/planta	5,8 %
Benzotiadiazol (BTH)	1 ml/planta	7,3 %
Catalasa BEMD	1 ml/planta	-0,5 %

Se aplicaron varias enzimas desestresantes al maíz usando el sistema de BEMD, como se muestra en la Tabla 30 anterior. Las esporas de control no tuvieron ningún efecto significativo (disminución de la altura de la planta del -1,6 %). La enzima quitinasasa de BEMD tuvo un efecto positivo cuando se combinó con su sustrato, quitosano. Las dos enzimas con mejor rendimiento fueron β -1,3-glucanasa de BEMD y superóxido dismutasa de BEMD. La β -1,3-glucanasa de BEMD tiene una actividad principalmente antifúngica, pero también puede tener efectos directos sobre las plantas. El ácido salicílico y el BTH fueron controles positivos para el ensayo foliar y se observaron respuestas positivas para ambos. Este método de administración foliar puede usarse para suministrar enzimas desestresantes a las plantas en distintos momentos de la temporada.

Ejemplo 28. Niveles de expresión de proteínas de fusión usando diversos promotores que contienen Sigma-K.

Como se muestra en el Ejemplo 23 anterior, reemplazar el promotor nativo de una secuencia de direccionamiento, proteína de exosporio o fragmento de proteína de exosporio puede afectar en gran medida al nivel de proteína de fusión expresada en el exosporio de una espora de bacteria *Bacillus*. Por ejemplo, reemplazar el promotor de BclA nativo por el promotor de BclB reduce en gran medida el nivel de proteína de fusión en la superficie de esporas de bacterias *Bacillus*. Como alternativa, el reemplazo del promotor de BclB nativo por el promotor de BclA aumenta drásticamente los niveles de proteína de fusión en el exosporio.

Se obtuvieron niveles relativos de expresión del promotor para diversas proteínas de exosporio bajo el control de sus promotores de esporulación nativos a partir de datos de micromatrices de Bergman *et al.*, 2008. Los niveles de expresión relativos se determinaron durante el tiempo de esporulación tardía (300 minutos después del inicio del experimento), cuando los promotores de sigma K son más activos. Los promotores de sigma K son promotores clave para la expresión de genes localizados en exosporio y proteínas asociadas. La expresión relativa es el aumento en el nivel de expresión de un gen en comparación con el promedio de todos los demás genes del cromosoma en todos los momentos dados. La Tabla 31 a continuación muestra los niveles de expresión relativos de una diversidad de genes impulsados por sigma K en bacterias *Bacillus*.

TABLA 31.

Proteína (SEQ ID NO. del Promotor)	Expresión relativa (factor de aumento en ARNm)
CotY (SEQ ID NO: 97)	79,21
Promotores de ramnosa (SEQ ID NO: 96)	75,69
BclC (SEQ ID NO: 98)	14,44
Sigma K (SEQ ID NO: 99)	64
Promotor 1 de glicosiltransferasa US adyacente a BclA (SEQ ID NO: 101)	72,25
Promotor 2 de glicosiltransferasa DS adyacente a BclA (SEQ ID NO: 102)	73,96
BclA (SEQ ID NO: 85)	77,44
ExsY (SEQ ID NO: 91)	32,49
YicA (SEQ ID NO: 93)	64
YicB (SEQ ID NO: 94)	70,56
BxpB/ExsFA (SEQ ID NO: 95)	30,25
InhA (SEQ ID NO: 100)	34,25

En vista de lo anterior, se observará que se consiguen los diversos objetos de la invención y se obtienen otros resultados ventajosos.

REIVINDICACIONES

1. Un método para estimular el crecimiento vegetal que comprende introducir una bacteria *Bacillus* recombinante, que expresa una proteína de fusión, en un medio de crecimiento vegetal o aplicar una bacteria *Bacillus* recombinante que expresa una proteína de fusión a una planta, una semilla vegetal, o un área que rodea una planta o una semilla vegetal, en donde:

la bacteria *Bacillus* recombinante comprende *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus pseudomycoides*, *Bacillus samanii*, *Bacillus gaemokensis*, *Bacillus weihenstephensis*, o una combinación de los mismos, en donde cuando la bacteria *Bacillus* recombinante comprende *Bacillus anthracis*, el método comprende además inactivar la bacteria *Bacillus* recombinante antes de su introducción en el medio de crecimiento vegetal o de su aplicación a la planta, la semilla vegetal o el área que rodea la planta o la semilla vegetal; y

la proteína de fusión comprende:

(A) al menos una proteína o un péptido estimulante del crecimiento vegetal, en donde la proteína o el péptido estimulantes del crecimiento vegetal comprenden:

una hormona peptídica que comprende una fitosulfocina, una clavata 3 (CLV3) o una sistemina;
un péptido no hormonal que comprende un péptido eNOD40, RHPP, POLARIS o un inhibidor de la tripsina de Kunitz (KTI);

una enzima implicada en la producción o activación de un compuesto estimulante del crecimiento vegetal, en donde la enzima implicada en la producción o activación de un compuesto estimulante del crecimiento vegetal comprende una aminotransferasa, una amina oxidasa, una peptidasa, una proteasa, una adenosina fosfato isopenteniltransferasa, una fosfatasa, una quitosanasa, una quitinasa, una β -1,3-glucanasa, una β -1,4-glucanasa, una β -1,6-glucanasa o una desaminasa del ácido aminociclopropano-1-carboxílico; o

una enzima que degrada o modifica una fuente de nutrientes bacteriana, fúngica o vegetal, en donde la enzima que degrada o modifica una fuente de nutrientes bacteriana, fúngica o vegetal comprende una celulasa, una lipasa, una lignina oxidasa, una proteasa, una glucósido hidrolasa, una fosfatasa, una nucleasa, una amidasa, una nitrato reductasa, una nitrito reductasa, una amilasa, una ligninasa, una glucosidasa, una fosfolipasa, una fitasa, una pectinasa, una glucanasa, una sulfatasa, una ureasa o una xilanasa; y

(B) una secuencia de direccionamiento, una proteína de exosporio o un fragmento de proteína de exosporio que dirige la proteína de fusión al exosporio de la bacteria *Bacillus* recombinante, en donde la secuencia de direccionamiento, la proteína de exosporio o el fragmento de proteína de exosporio comprenden la secuencia X_1 - X_2 - X_3 - X_4 - X_5 - X_6 - X_7 - X_8 - X_9 - X_{10} - X_{11} - X_{12} - X_{13} - X_{14} - X_{15} - X_{16} , en donde:

X_1 es alanina (A), lisina (K), isoleucina (I), serina (S), arginina (R), metionina (M), asparagina (N), leucina (L) o está ausente;

X_2 es fenilalanina (F), leucina (L), isoleucina (I) o metionina (M);

X_3 es ácido aspártico (D), ácido glutámico (E), leucina (L), glicina (G), asparagina (N), serina (S) o prolina (P);

X_4 es prolina (P) o serina (S);

X_5 es asparagina (N), ácido aspártico (D), ácido glutámico (E), glicina (G), cisteína (C) o lisina (K);

X_6 es leucina (L), asparagina (N), serina (S) o isoleucina (I);

X_7 es valina (V) o isoleucina (I);

X_8 es glicina (G);

X_9 es prolina (P);

X_{10} es treonina (T) o prolina (P);

X_{11} es leucina (L) o fenilalanina (F);

X_{12} es prolina (P);

X_{13} es prolina (P), valina (V), serina (S) o isoleucina (I);

X_{14} es isoleucina (I), valina (V), leucina (L) o metionina (M);

X_{15} es prolina (P), glutamina (Q) o treonina (T); y

X_{16} es prolina (P), treonina (T) o serina (S);

en donde la proteína o el péptido estimulantes del crecimiento vegetal están unidos operativamente a la secuencia de direccionamiento, a la proteína de exosporio o al fragmento de proteína de exosporio; y

en donde las plantas cultivadas en presencia de la bacteria *Bacillus* recombinante presentan un crecimiento mayor en comparación con las plantas cultivadas en ausencia de la bacteria *Bacillus* recombinante, en las mismas condiciones.

2. Un método de la reivindicación 1, en donde la proteína de fusión comprende:

(a) una secuencia de direccionamiento que comprende los aminoácidos 20-35 de la SEQ ID NO: 1;

- (b) una secuencia de direccionamiento que comprende la SEQ ID NO: 60;
- (c) una secuencia de direccionamiento que comprende los aminoácidos 1-35 de la SEQ ID NO: 1;
- (d) una secuencia de direccionamiento que comprende la SEQ ID NO: 1;
- 5 (e) una proteína de exosporio que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 85 % de identidad con la SEQ ID NO: 2;
- (f) una secuencia de direccionamiento que comprende los aminoácidos 1-27 de la SEQ ID NO: 3;
- (g) una secuencia de direccionamiento que comprende los aminoácidos 12-27 de la SEQ ID NO: 3;
- (h) una secuencia de direccionamiento que comprende la SEQ ID NO: 3;
- 10 (i) una proteína de exosporio que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 85 % de identidad con la SEQ ID NO: 4;
- (j) una secuencia de direccionamiento que comprende los aminoácidos 1-38 de la SEQ ID NO: 5;
- (k) una secuencia de direccionamiento que comprende los aminoácidos 23-38 de la SEQ ID NO: 5;
- (l) una secuencia de direccionamiento que comprende la SEQ ID NO: 5;
- 15 (m) una proteína de exosporio que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 85 % de identidad con la SEQ ID NO: 6;
- (n) una secuencia de direccionamiento que comprende los aminoácidos 1-28 de la SEQ ID NO: 7;
- (o) una secuencia de direccionamiento que comprende los aminoácidos 13-28 de la SEQ ID NO: 7;
- (p) una secuencia de direccionamiento que comprende la SEQ ID NO: 7;
- 20 (q) una proteína de exosporio que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 85 % de identidad con la SEQ ID NO: 8;
- (r) una secuencia de direccionamiento que comprende los aminoácidos 1-24 de la SEQ ID NO: 9;
- (s) una secuencia de direccionamiento que comprende los aminoácidos 9-24 de la SEQ ID NO: 9;
- (t) una secuencia de direccionamiento que comprende la SEQ ID NO: 9;
- 25 (u) una proteína de exosporio que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 85 % de identidad con la SEQ ID NO: 10;
- (v) una secuencia de direccionamiento que comprende los aminoácidos 1-33 de la SEQ ID NO: 11;
- (w) una secuencia de direccionamiento que comprende los aminoácidos 18-33 de la SEQ ID NO: 11;
- (x) una secuencia de direccionamiento que comprende la SEQ ID NO: 11;
- 30 (y) una proteína de exosporio que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 85 % de identidad con la SEQ ID NO: 12;
- (z) una secuencia de direccionamiento que comprende los aminoácidos 1-33 de la SEQ ID NO: 13;
- (aa) una secuencia de direccionamiento que comprende los aminoácidos 18-33 de la SEQ ID NO: 13;
- (ab) una secuencia de direccionamiento que comprende la SEQ ID NO: 13;
- 35 (ac) una proteína de exosporio que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 85 % de identidad con la SEQ ID NO: 14;
- (ad) una secuencia de direccionamiento que comprende los aminoácidos 1-43 de la SEQ ID NO: 15;
- (ae) una secuencia de direccionamiento que comprende los aminoácidos 28-43 de la SEQ ID NO: 15;
- (af) una secuencia de direccionamiento que comprende la SEQ ID NO: 15;
- 40 (ag) una proteína de exosporio que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 85 % de identidad con la SEQ ID NO: 16;
- (ah) una secuencia de direccionamiento que comprende los aminoácidos 1-27 de la SEQ ID NO: 17;
- (ai) una secuencia de direccionamiento que comprende los aminoácidos 12-27 de la SEQ ID NO: 17;
- (aj) una secuencia de direccionamiento que comprende la SEQ ID NO: 17;
- 45 (ak) una proteína de exosporio que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 85 % de identidad con la SEQ ID NO: 18;
- (al) una secuencia de direccionamiento que comprende los aminoácidos 1-33 de la SEQ ID NO: 19;
- (am) una secuencia de direccionamiento que comprende los aminoácidos 18-33 de la SEQ ID NO: 19;
- (an) una secuencia de direccionamiento que comprende la SEQ ID NO: 19;
- 50 (ao) una proteína de exosporio que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 85 % de identidad con la SEQ ID NO: 20;
- (ap) una secuencia de direccionamiento que comprende los aminoácidos 1-33 de la SEQ ID NO: 21;
- (aq) una secuencia de direccionamiento que comprende los aminoácidos 18-33 de la SEQ ID NO: 21;
- (ar) una secuencia de direccionamiento que comprende la SEQ ID NO: 21;
- 55 (as) una proteína de exosporio que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 85 % de identidad con la SEQ ID NO: 22;
- (at) una secuencia de direccionamiento que comprende los aminoácidos 1-24 de la SEQ ID NO: 23;
- (au) una secuencia de direccionamiento que comprende los aminoácidos 9-24 de la SEQ ID NO: 23;
- (av) una secuencia de direccionamiento que comprende la SEQ ID NO: 23;
- 60 (aw) una proteína de exosporio que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 85 % de identidad con la SEQ ID NO: 24;
- (ax) una secuencia de direccionamiento que comprende los aminoácidos 1-24 de la SEQ ID NO: 25;
- (ay) una secuencia de direccionamiento que comprende los aminoácidos 9-24 de la SEQ ID NO: 25;
- (az) una secuencia de direccionamiento que comprende la SEQ ID NO: 25;
- 65 (ba) una proteína de exosporio que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 85 % de identidad con la SEQ ID NO: 26;
- (bb) una secuencia de direccionamiento que comprende los aminoácidos 1-30 de la SEQ ID NO: 27;

- (bc) una secuencia de direccionamiento que comprende los aminoácidos 15-30 de la SEQ ID NO: 27;
- (bd) una secuencia de direccionamiento que comprende la SEQ ID NO: 27;
- (be) una proteína de exosporio que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 85 % de identidad con la SEQ ID NO: 28;
- 5 (bf) una secuencia de direccionamiento que comprende los aminoácidos 1-33 de la SEQ ID NO: 29;
- (bg) una secuencia de direccionamiento que comprende los aminoácidos 18-33 de la SEQ ID NO: 29;
- (bh) una secuencia de direccionamiento que comprende la SEQ ID NO: 29;
- (bi) una proteína de exosporio que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 85 % de identidad con la SEQ ID NO: 30;
- 10 (bj) una secuencia de direccionamiento que comprende los aminoácidos 1-24 de la SEQ ID NO: 31;
- (bk) una secuencia de direccionamiento que comprende los aminoácidos 9-24 de la SEQ ID NO: 31;
- (bl) una secuencia de direccionamiento que comprende la SEQ ID NO: 31;
- (bm) una proteína de exosporio que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 85 % de identidad con la SEQ ID NO: 32;
- 15 (bn) una secuencia de direccionamiento que comprende los aminoácidos 1-15 de la SEQ ID NO: 33;
- (bo) una secuencia de direccionamiento que comprende la SEQ ID NO: 33;
- (bp) una proteína de exosporio que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 85 % de identidad con la SEQ ID NO: 34;
- (bq) una secuencia de direccionamiento que comprende los aminoácidos 1-16 de la SEQ ID NO: 35;
- 20 (br) una secuencia de direccionamiento que comprende la SEQ ID NO: 35;
- (bs) una proteína de exosporio que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 85 % de identidad con la SEQ ID NO: 36;
- (bt) una secuencia de direccionamiento que comprende los aminoácidos 1-29 de la SEQ ID NO: 43;
- (bu) una secuencia de direccionamiento que comprende los aminoácidos 14-29 de la SEQ ID NO: 43;
- 25 (bv) una secuencia de direccionamiento que comprende la SEQ ID NO: 43;
- (bw) una proteína de exosporio que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 85 % de identidad con la SEQ ID NO: 44;
- (bx) una secuencia de direccionamiento que comprende los aminoácidos 1-35 de la SEQ ID NO: 45;
- (by) una secuencia de direccionamiento que comprende los aminoácidos 20-35 de la SEQ ID NO: 45;
- 30 (bz) una secuencia de direccionamiento que comprende la SEQ ID NO: 45;
- (ca) una proteína de exosporio que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 85 % de identidad con la SEQ ID NO: 46;
- (cb) una secuencia de direccionamiento que comprende los aminoácidos 1-43 de la SEQ ID NO: 47;
- (cc) una secuencia de direccionamiento que comprende los aminoácidos 28-43 de la SEQ ID NO: 47;
- 35 (cd) una secuencia de direccionamiento que comprende la SEQ ID NO: 47;
- (ce) una proteína de exosporio que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 85 % de identidad con la SEQ ID NO: 48;
- (cf) una secuencia de direccionamiento que comprende los aminoácidos 1-32 de la SEQ ID NO: 49;
- (cg) una secuencia de direccionamiento que comprende los aminoácidos 17-32 de la SEQ ID NO: 49;
- 40 (ch) una secuencia de direccionamiento que comprende la SEQ ID NO: 49;
- (ci) una proteína de exosporio que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 85 % de identidad con la SEQ ID NO: 50;
- (cj) una secuencia de direccionamiento que comprende los aminoácidos 1-33 de la SEQ ID NO: 51;
- (ck) una secuencia de direccionamiento que comprende los aminoácidos 18-33 de la SEQ ID NO: 51;
- 45 (cl) una secuencia de direccionamiento que comprende la SEQ ID NO: 51;
- (cm) una proteína de exosporio que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 85 % de identidad con la SEQ ID NO: 52;
- (cn) una secuencia de direccionamiento que comprende los aminoácidos 1-33 de la SEQ ID NO: 53;
- (co) una secuencia de direccionamiento que comprende los aminoácidos 18-33 de la SEQ ID NO: 53;
- 50 (cp) una secuencia de direccionamiento que comprende la SEQ ID NO: 53;
- (cq) una proteína de exosporio que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 85 % de identidad con la SEQ ID NO: 54;
- (cr) una secuencia de direccionamiento que comprende los aminoácidos 1-30 de la SEQ ID NO: 55;
- (cs) una secuencia de direccionamiento que comprende los aminoácidos 15-30 de la SEQ ID NO: 55;
- 55 (ct) una secuencia de direccionamiento que comprende la SEQ ID NO: 55;
- (cu) una proteína de exosporio que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 85 % de identidad con la SEQ ID NO: 56;
- (cv) una secuencia de direccionamiento que comprende los aminoácidos 1-130 de la SEQ ID NO: 57;
- (cw) una secuencia de direccionamiento que comprende los aminoácidos 115-130 de la SEQ ID NO: 57;
- 60 (cx) una secuencia de direccionamiento que comprende la SEQ ID NO: 57;
- (cy) una proteína de exosporio que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 85 % de identidad con la SEQ ID NO: 58;
- (cz) un fragmento de proteína de exosporio que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 85 % de identidad con la SEQ ID NO: 59;
- 65 (da) una secuencia de direccionamiento que comprende la SEQ ID NO: 61;
- (db) una secuencia de direccionamiento que comprende la SEQ ID NO: 62;

- (dc) una secuencia de direccionamiento que comprende la SEQ ID NO: 63;
 (dd) una secuencia de direccionamiento que comprende la SEQ ID NO: 64;
 (de) una secuencia de direccionamiento que comprende la SEQ ID NO: 65;
 (df) una secuencia de direccionamiento que comprende la SEQ ID NO: 66;
 5 (dg) una secuencia de direccionamiento que comprende la SEQ ID NO: 67;
 (dh) una secuencia de direccionamiento que comprende la SEQ ID NO: 68;
 (di) una secuencia de direccionamiento que comprende la SEQ ID NO: 69; o
 (dj) una secuencia de direccionamiento que comprende la SEQ ID NO: 70.
- 10 3. Un método para estimular el crecimiento vegetal que comprende introducir una bacteria *Bacillus* recombinante, que expresa una proteína de fusión, en un medio de crecimiento vegetal o aplicar una bacteria *Bacillus* recombinante que expresa una proteína de fusión a una planta, una semilla vegetal, o un área que rodea una planta o una semilla vegetal, en donde:
- 15 la bacteria *Bacillus* recombinante comprende *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus pseudomycoides*, *Bacillus samanii*, *Bacillus gaemokensis*, *Bacillus weihenstephensis*, o una combinación de los mismos, en donde cuando la bacteria *Bacillus* recombinante comprende *Bacillus anthracis*, el método comprende además inactivar la bacteria *Bacillus* recombinante antes de su introducción en el medio de crecimiento vegetal o de su aplicación a la planta, la semilla vegetal o el área que rodea la planta o la semilla vegetal; y
- 20 la proteína de fusión comprende:
- (A) al menos una proteína o un péptido estimulantes del crecimiento vegetal, en donde la proteína o el péptido estimulantes del crecimiento vegetal comprenden:
- 25 una hormona peptídica que comprende una fitosulfocina, una clavata 3 (CLV3) o una sistemina;
 un péptido no hormonal que comprende un péptido eNOD40, RHPP, POLARIS o inhibidor de la tripsina de Kunitz (KTI);
 una enzima implicada en la producción o activación de un compuesto estimulante del crecimiento vegetal,
 30 en donde la enzima implicada en la producción o activación de un compuesto estimulante del crecimiento vegetal comprende una aminotransferasa, una amina oxidasa, una peptidasa, una proteasa, una adenosina fosfato isopenteniltransferasa, una fosfatasa, una quitosanasa, una quitinasa, una β -1,3-glucanasa, una β -1,4-glucanasa, una β -1,6-glucanasa o una desaminasa del ácido aminociclopropano-1-carboxílico; o
 una enzima que degrada o modifica una fuente de nutrientes bacteriana, fúngica o vegetal, en donde la
 35 enzima que degrada o modifica una fuente de nutrientes bacteriana, fúngica o vegetal comprende una celulasa, una lipasa, una lignina oxidasa, una proteasa, una glucósido hidrolasa, una fosfatasa, una nucleasa, una amidasa, una nitrato reductasa, una nitrito reductasa, una amilasa, una ligninasa, una glucosidasa, una fosfolipasa, una fitasa, una pectinasa, una glucanasa, una sulfatasa, una ureasa o una xilanasa; y
- 40 (B) una proteína de exosporio que dirige la proteína de fusión al exosporio de la bacteria *Bacillus* recombinante, comprendiendo la proteína de exosporio:
- (a) una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 95 % de identidad con la SEQ ID NO: 72;
 45 (b) una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 95 % de identidad con la SEQ ID NO: 73;
 (c) una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 95 % de identidad con la SEQ ID NO: 74;
 (d) una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 95 % de identidad con la SEQ ID NO: 76;
 (e) una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 95 % de identidad con la SEQ ID NO: 80;
 (f) una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 95 % de identidad con la SEQ ID NO: 81; o
 50 (g) una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 95 % de identidad con la SEQ ID NO: 83;
- en donde la proteína o el péptido estimulantes del crecimiento vegetal están unidos operativamente a la proteína de exosporio; y
 en donde las plantas cultivadas en presencia de la bacteria *Bacillus* recombinante presentan un crecimiento mayor
 55 en comparación con las plantas cultivadas en ausencia de la bacteria *Bacillus* recombinante, en las mismas condiciones.
4. Un método de la reivindicación 2, en donde la proteína de fusión comprende una proteína de exosporio o un fragmento de proteína de exosporio que comprenden una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 % de identidad con las SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58 o 59 o un método de la reivindicación 3, en donde la proteína de fusión comprende una proteína de exosporio que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 % de identidad con las SEQ ID NO: 72, 73, 74, 76, 80, 81 u 83.
- 60 5. Un método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde la proteína de fusión comprende además un enlazador de aminoácidos entre la secuencia de direccionamiento, la proteína de exosporio o el fragmento de proteína

de exosporio y la proteína o el péptido estimulantes del crecimiento vegetal.

6. Un método de la reivindicación 5, en donde el enlazador comprende:

- 5 un enlazador de polialanina, un enlazador de poliglicina o un enlazador que comprende una mezcla de restos tanto de alanina como de glicina; y/o
un sitio de reconocimiento de proteasa.

7. Un método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde la enzima comprende la celulasa, la proteasa o la fosfolipasa.

8. Un método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde:

- 15 la celulasa comprende una endocelulasa, una exocelulasa o una β -glucosidasa;
la lipasa comprende una lipasa de *Bacillus subtilis*, una lipasa de *Bacillus thuringiensis*, una lipasa de *Bacillus cereus* o una lipasa de *Bacillus clausii*;
la lignina oxidasa comprende una lignina peroxidasa, una laccasa, una glioxal oxidasa, una ligninasa o una manganeso peroxidasa;
la proteasa comprende una subtilisina, una proteasa ácida, una proteasa alcalina, una proteinasa, una peptidasa,
20 una endopeptidasa, una exopeptidasa, una carboxilasa, una serina proteasa, una ácido glutámico proteasa, una aspartato proteasa, una cisteína proteasa, una treonina proteasa o una metaloproteasa;
la proteasa o la peptidasa comprenden una proteasa o una peptidasa que escinden proteínas, péptidos, proproteínas o preproproteínas para crear un péptido bioactivo; o
la fosfatasa comprende una monoéster fosfórico hidrolasa, una fosfomonoesterasa, una diéster fosfórico hidrolasa,
25 una fosfodiesterasa, una monoéster trifosfórico hidrolasa, una anhídrido de fosforilo hidrolasa, una pirofosfatasa, una fitasa, una trimetafosfatasa o una trifosfatasa.

9. Un método de la reivindicación 8, en donde:

- 30 la endocelulasa comprende una endoglucanasa;
la exocelulasa comprende una exocelulasa de *Trichoderma reesei*;
la β -glucosidasa comprende una β -glucosidasa de *Bacillus subtilis*, una β -glucosidasa de *Bacillus thuringiensis*, una β -glucosidasa de *Bacillus cereus* o una β -glucosidasa de *Bacillus clausii*;
la fosfomonoesterasa comprende PhoA4; o
35 la fitasa comprende fitasa de *Bacillus subtilis* EE148 o fitasa de *Bacillus thuringiensis* BT013A.

10. Un método de la reivindicación 9, en donde la endoglucanasa comprende una endoglucanasa de *Bacillus subtilis*, una endoglucanasa de *Bacillus thuringiensis*, una endoglucanasa de *Bacillus cereus* o una endoglucanasa de *Bacillus clausii*.

40 11. Un método para estimular el crecimiento vegetal de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en donde la bacteria *Bacillus* recombinante comprende una cepa de *Bacillus* que promueve el crecimiento vegetal.

45 12. Un método de la reivindicación 11, en donde la cepa de bacterias que promueve el crecimiento vegetal comprende *Bacillus mycoides* BT155 (NRRL N.º B-50921), *Bacillus mycoides* EE118 (NRRL N.º B-50918), *Bacillus mycoides* EE141 (NRRL N.º B-50916), *Bacillus mycoides* BT46-3 (NRRL N.º B-50922), *Bacillus sp.* EE128 (NRRL N.º B-50917), *Bacillus thuringiensis* BT013A (NRRL N.º B-50924) o *Bacillus sp.* EE349 (NRRL N.º B-50928).

50 13. Un método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en donde la proteína de fusión se expresa bajo el control de un promotor de esporulación nativo de la secuencia de direccionamiento, de la proteína de exosporio o del fragmento de proteína de exosporio de la proteína de fusión y/o en donde la proteína de fusión se expresa bajo el control de un promotor de esporulación de alta expresión.

55 14. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-13, en donde la bacteria *Bacillus* recombinante comprende *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus pseudomycoides*, *Bacillus samanii*, *Bacillus gaemokensis*, *Bacillus weihenstephensis* o una combinación de los mismos, y el método comprende además inactivar la bacteria recombinante *Bacillus* bacteria antes de su introducción en el medio de crecimiento vegetal o de su aplicación a una planta, una semilla vegetal o un área que rodea una planta o una semilla vegetal.

60 15. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-14, en donde el medio de crecimiento vegetal se suplementa con un sustrato para una enzima.

16. Un método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-15, que comprende:

- 65 recubrir semillas con la bacteria *Bacillus* recombinante o una formulación que contiene la bacteria *Bacillus* recombinante antes de la siembra;

aplicar la bacteria *Bacillus* recombinante o la formulación a una porción aérea de una planta; y/o introducir la bacteria *Bacillus* recombinante en el medio de crecimiento vegetal aplicando una formulación líquida o sólida que contiene la bacteria *Bacillus* recombinante al medio.

5 17. Un método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-16, que comprende además introducir al menos un producto agroquímico en el medio de crecimiento vegetal o aplicar al menos un producto agroquímico a plantas o semillas, en donde el producto agroquímico comprende un fertilizante, un material fertilizante de micronutrientes, un insecticida, un herbicida, un fungicida, un molusquicida, un algicida, una enmienda para el crecimiento vegetal, un inoculante bacteriano, un inoculante fúngico o una combinación de los mismos.

10 18. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-17, en donde introducir la bacteria *Bacillus* recombinante en el medio de crecimiento vegetal o aplicar la bacteria *Bacillus* recombinante a la planta, una semilla vegetal o el área que rodea la planta o la semilla vegetal comprende introducir o aplicar la bacteria *Bacillus* recombinante en una formulación que comprende la bacteria *Bacillus* recombinante y un vehículo agrícolamente aceptable.

15

FIG. 1

	SEQ ID NO.	20-35 % de identidad	20-35 % de identidad
MSNNYSNGLNPDESLSASAFDPNLVGTLPPIPPFTLPTG	1	100%	100%
MSEKYIILHGTALEPNLIGTLPPIPPFTFNG	3	81,3%	90,9%
MVKVVEGNGGSKIKSPNSNEKILSDLVGPTFRFVPTGWTGIT	5	50,0%	72,7%
MKQNDKLWLDKGIIGPENIGTFFVLPPIHPTG	7	43,8%	54,5%
MDEFSSAALNPGSVGPTLPPMQPQERTG	9	62,5%	72,7%
MEFKNEIQKINGILOQANALNPENLIGTLPPIPPFTLPTG	11	81,3%	90,9%
MEFKNEIKKTNEVLQANALDENLIGTLPPIPPFTLPTG	13	81,3%	81,8%
MSRKDKFNRSRMSRKDRFNSPKIKSEISISPDVVGTFPPISFTLPTG	15	62,5%	81,8%
MNEEYSILHGPALNPENLIGTLPISIRFETFTG	17	75,0%	81,8%
MKNRDNRKQNSLSNFRIPPELIGTFFPVPTGFTGIG	19	50,0%	63,6%
MSDNHQMKKISEVLQAHALDENLIGTLPPIPPFTLPTG	21	75,0%	72,7%
MDEFLSFAALNPGSIGTLPFPVPRQERTG	23	62,5%	72,7%
MDEFSSYALNPGSIGTLPMPQFQERTG	25	56,2%	63,6%
MKERDRQNSLSNFRISPNLIGTFFPVPTGFTGIG	27	56,2%	63,6%
VEFKNEIQKINGILOQANALNPENLIGTLPPIPPFTLPTG	29	81,3%	90,9%
MDEFLYFAALNPGSIGTLPFPVQFQERTG	31	56,2%	63,6%
MDSKNIGTFFPLPSINFPTG	33	43,8%	54,5%
MIGPENIGTFFPLPIVPTG	35	43,8%	54,5%
MSNNNIPSPFTFKNFNPELIGTFFRIPPLTLPTG	43	68,8%	81,8%
MFSEKZKDLIPDNFLSAPALDENLIGTFFRIPPSFTLPTG	45	75,0%	72,7%
MTRKDKFNRSRISRRDRFNSPKIKSEILISPDVVGTFPPISFTLPTG	47	62,5%	81,8%
MSRKDRFNSPKIKSEISISPDVVGTFPPISFTLPTG	49	62,5%	81,8%
MKERDNKGKQHSLSNFRIPPELIGTFFPVPTGFTGIG	51	50,0%	63,6%
MRERDNKRQOHSLSNFRISPELIGTFFPVPTGFTGIG	53	50,0%	63,6%
MKNRDNKGKQOHSNFRIPPELIGTFFPVPTGFTGIG	55	50,0%	63,6%
MKFSKSKSTVDSSIVGKRWSKVNIILRFYDARSCQDKVDGFDVGELETFIFRKLNMEGVSQKAHNSI	57	81,3%	90,9%
GKTYIITINEVYVFVTVILLQYSITLIGGSYVFDKNEIQKINGILOQANALNPENLIGTLPPIPPFTLPTG			

FIG. 2

