



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0088342
(43) 공개일자 2020년07월22일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/74 (2006.01) C12N 15/52 (2006.01)
C12N 15/82 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/74 (2013.01)
C12N 15/52 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2020-7014831
(22) 출원일자(국제) 2018년10월23일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2020년05월25일
(86) 국제출원번호 PCT/US2018/057174
(87) 국제공개번호 WO 2019/084059
국제공개일자 2019년05월02일
(30) 우선권주장
62/577,148 2017년10월25일 미국(US)

(71) 출원인
피벳 바이오, 인크.
미국 캘리포니아 94710 버클리 스위트 120 7번가
2929
(72) 발명자
탐서 엘빈
미국 캘리포니아 94710 버클리 스위트 120 7번가
2929
블로흐 사라
미국 캘리포니아 94710 버클리 스위트 120 7번가
2929
히긴스 더클라스
미국 캘리포니아 94710 버클리 스위트 120 7번가
2929
(74) 대리인
강명구

전체 청구항 수 : 총 80 항

(54) 발명의 명칭 질소를 고정하는 유전자조작 미생물을 개선하는 방법 및 조성물

(57) 요약

20 lbs 초과 질소/에이커로 시비된 농업 시스템에서 대기 질소를 고정시키는 적어도 하나의 유전자 조작 박테리아 균주를 포함하는 박테리아 조성물을 생성 및 이용하기 위한 방법 및 시스템이 제공된다.

(52) CPC특허분류

C12N 15/8227 (2013.01)

C12N 15/8243 (2013.01)

C12Y 118/06001 (2013.01)

C12Y 301/03012 (2013.01)

C12Y 302/01141 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

유전자 조작 박테리아로서, 서열번호 1-72로 이루어진 군으로부터 선택된 서열에 적어도 약 80% 서열 동일성을 가지고 있는 삽입된 서열을 포함하는, 유전자 조작 박테리아.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 삽입된 서열이 천연 프로모터 서열을 대체하는, 유전자 조작 박테리아.

청구항 3

제 1 항에 있어서, 상기 삽입된 서열이 서열번호 1-72로 이루어진 군으로부터 선택된 서열에 적어도 약 85% 서열 동일성을 포함하는, 유전자 조작 박테리아.

청구항 4

제 1 항에 있어서, 상기 삽입된 서열이 서열번호 1-72로 이루어진 군으로부터 선택된 서열에 적어도 약 90% 서열 동일성을 포함하는, 유전자 조작 박테리아.

청구항 5

제 1 항에 있어서, 상기 삽입된 서열이 서열번호 1-72로 이루어진 군으로부터 선택된 서열에 적어도 약 95% 서열 동일성을 포함하는, 유전자 조작 박테리아.

청구항 6

제 1 항에 있어서, 상기 삽입된 서열이 서열번호 1-72로 이루어진 군으로부터 선택된 서열에 적어도 약 97% 서열 동일성을 포함하는, 유전자 조작 박테리아.

청구항 7

제 1 항에 있어서, 상기 삽입된 서열이 서열번호 1-72로 이루어진 군으로부터 선택된 서열에 적어도 약 98% 서열 동일성을 포함하는, 유전자 조작 박테리아.

청구항 8

제 1 항에 있어서, 상기 삽입된 서열이 서열번호 1-72로 이루어진 군으로부터 선택된 서열에 적어도 약 99% 서열 동일성을 포함하는, 유전자 조작 박테리아.

청구항 9

서열번호 1-72로 이루어진 군으로부터 선택된 서열에 적어도 80% 서열 동일성을 가진 삽입된 서열에 작동가능하게 연결된 천연 코딩 서열을 포함하는, 유전자 조작 박테리아.

청구항 10

제 9 항에 있어서, 상기 삽입된 서열이 천연 프로모터 서열을 대체하는, 유전자 조작 박테리아.

청구항 11

제 9 항에 있어서, 상기 삽입된 서열이 서열번호 1-72로 이루어진 군으로부터 선택된 서열에 적어도 약 85% 서열 동일성을 포함하는, 유전자 조작 박테리아.

청구항 12

제 9 항에 있어서, 상기 서열이 서열번호 1-72로 이루어진 군으로부터 선택된 서열에 적어도 약 90% 서열 동일성을 포함하는, 유전자 조작 박테리아.

청구항 13

제 9 항에 있어서, 상기 삽입된 서열이 서열번호 1-72로 이루어진 군으로부터 선택된 서열에 적어도 약 95% 서열 동일성을 포함하는, 유전자 조작 박테리아.

청구항 14

제 9 항에 있어서, 상기 삽입된 서열이 서열번호 1-72로 이루어진 군으로부터 선택된 서열에 적어도 약 97% 서열 동일성을 포함하는, 유전자 조작 박테리아.

청구항 15

제 9 항에 있어서, 상기 삽입된 서열이 서열번호 1-72로 이루어진 군으로부터 선택된 서열에 적어도 약 98% 서열 동일성을 포함하는, 유전자 조작 박테리아.

청구항 16

제 9 항에 있어서, 상기 삽입된 서열이 서열번호 1-72로 이루어진 군으로부터 선택된 서열에 적어도 약 99% 서열 동일성을 포함하는, 유전자 조작 박테리아.

청구항 17

제 9 항 내지 제 16 항 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 천연 코딩 서열이 *cysZ*, *otsB*, *bcs* 유전자, 및 *treZ* 로 이루어진 군으로부터 선택되는, 유전자 조작 박테리아.

청구항 18

제 9 항 내지 제 16 항 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 천연 코딩 서열이 수송체 유전자, 이온 수송체 유전자, 엑소폴리사카라이드 생합성 유전자, 셀룰로스 생합성 유전자, 및 트레할로스 생합성 유전자로 이루어진 군으로부터 선택되는, 유전자 조작 박테리아.

청구항 19

서열번호 1-72로 이루어진 군으로부터 선택된 서열에 적어도 약 80% 서열 동일성을 가지고 있는 삽입된 서열에 작동가능하게 연결된 질소 고정 또는 질소 동화 코딩 서열을 포함하는, 유전자 조작 박테리아.

청구항 20

제 19 항에 있어서, 서열번호 1-72로 이루어진 군으로부터 선택된 서열에 적어도 약 80% 서열 동일성을 가지고 있는 상기 삽입된 서열이 천연 프로모터 서열을 대체하는, 유전자 조작 박테리아.

청구항 21

제 19 항에 있어서, 상기 삽입된 서열이 서열번호 1-72로 이루어진 군으로부터 선택된 서열에 적어도 약 85% 서열 동일성을 포함하는, 유전자 조작 박테리아.

청구항 22

제 19 항에 있어서, 상기 삽입된 서열이 서열번호 1-72로 이루어진 군으로부터 선택된 서열에 적어도 약 90% 서열 동일성을 포함하는, 유전자 조작 박테리아.

청구항 23

제 19 항에 있어서, 상기 삽입된 서열이 서열번호 1-72로 이루어진 군으로부터 선택된 서열에 적어도 약 95% 서열 동일성을 포함하는, 유전자 조작 박테리아.

청구항 24

제 19 항에 있어서, 상기 삽입된 서열이 서열번호 1-72로 이루어진 군으로부터 선택된 서열에 적어도 약 97% 서열 동일성을 포함하는, 유전자 조작 박테리아.

청구항 25

제 19 항에 있어서, 상기 삽입된 서열이 서열번호 1-72로 이루어진 군으로부터 선택된 서열에 적어도 약 98% 서열 동일성을 포함하는, 유전자 조작 박테리아.

청구항 26

제 19 항에 있어서, 상기 삽입된 서열이 서열번호 1-72로 이루어진 군으로부터 선택된 서열에 적어도 약 99% 서열 동일성을 포함하는, 유전자 조작 박테리아.

청구항 27

제 19 항 내지 제 26 항 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 질소 고정 또는 질소 동화 코딩 서열이 nifA, nifL, ntrB, ntrC, 글루타민 합성효소를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드, glnA, glnB, glnK, drat, amtB, 글루타미나제를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드, glnD, glnE, nifJ, nifH, nifD, nifK, nifY, nifE, nifN, nifU, nifS, nifV, nifW, nifZ, nifM, nifF, nifB, nifQ, 및 니트로게나제 효소의 생합성과 관련된 유전자로 이루어진 군으로부터 선택되는, 유전자 조작 박테리아.

청구항 28

제 1 항 내지 제 27 항 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 유전자 조작 박테리아가 유전자 조작 디아조트로프식 박테리아인, 유전자 조작 박테리아.

청구항 29

제 1 항 내지 제 28 항 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 유전자 조작 박테리아가 비-속간(non-intergeneric)인, 유전자 조작 박테리아.

청구항 30

제 1 항 내지 제 28 항 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 유전자 조작 박테리아 속간인, 유전자 조작 박테리아.

청구항 31

제 1 항 내지 제 30 항 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 유전자 조작 박테리아가 비 질소 제한 조건 하에서 대기 질소를 고정시키는, 유전자 조작 박테리아.

청구항 32

제 1 항 내지 제 31 항 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 유전자 조작 박테리아가 상기 동일한 종의 비-조작 박테리아보다 더 많은 대기 질소를 고정시키는, 유전자 조작 박테리아.

청구항 33

제 1 항 내지 제 32 항 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 유전자 조작 박테리아가 *라벨라 아쿠아틸리스*, *클레브시엘라 베리이콜라*, *코사코니아 슈도사카리*, *클루이베라 인터메디아*, *클레브시엘라 sp.*, *엔테로박터 sp.*, 및 *코사코니아 사카리*로 이루어진 군으로부터 선택되는, 유전자 조작 박테리아.

청구항 34

제 1 항 내지 제 32 항 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 유전자 조작 박테리아가 *라벨라* 속이고 상기 삽입된 서열이 서열번호 41-59, 및 63-66으로 이루어진 군으로부터 선택된 서열에 적어도 약 80% 서열 동일성을 포함하는, 유전자 조작 박테리아.

청구항 35

제 1 항 내지 제 32 항 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 유전자 조작 박테리아가 *라벨라 아쿠아틸리스*이고 상기 삽입된 서열이 서열번호 41-59, 및 63-66으로 이루어진 군으로부터 선택된 서열에 적어도 약 80% 서열 동일

성을 포함하는, 유전자 조작 박테리아.

청구항 36

제 1 항 내지 제 32 항 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 유전자 조작 박테리아가 *코사코니아* 속이고 상기 삽입된 서열이 서열번호 1-10으로 이루어진 군으로부터 선택된 서열에 적어도 약 80% 서열 동일성을 포함하는, 유전자 조작 박테리아.

청구항 37

제 1 항 내지 제 32 항 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 유전자 조작 박테리아가 *코사코니아 사카리*이고 상기 삽입된 서열이 서열번호 1-10으로 이루어진 군으로부터 선택된 서열에 적어도 약 80% 서열 동일성을 포함하는, 유전자 조작 박테리아.

청구항 38

제 1 항 내지 제 32 항 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 유전자 조작 박테리아가 *클레브시엘라* 속이고 상기 삽입된 서열이 서열번호 11-40으로 이루어진 군으로부터 선택된 서열에 적어도 약 80% 서열 동일성을 포함하는, 유전자 조작 박테리아.

청구항 39

제 1 항 내지 제 32 항 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 유전자 조작 박테리아가 *클레브시엘라 베리이콜라이*고 상기 삽입된 서열이 서열번호 11-40으로 이루어진 군으로부터 선택된 서열에 적어도 약 80% 서열 동일성을 포함하는, 유전자 조작 박테리아.

청구항 40

제 1 항 내지 제 32 항 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 유전자 조작 박테리아가 *클루이베라* 속이고 상기 삽입된 서열이 서열번호 60에 적어도 약 80% 서열 동일성을 포함하는, 유전자 조작 박테리아.

청구항 41

제 1 항 내지 제 32 항 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 유전자 조작 박테리아가 *클루이베라 인터메디아*이고 상기 삽입된 서열이 서열번호 60에 적어도 약 80% 서열 동일성을 포함하는, 유전자 조작 박테리아.

청구항 42

제 1 항 내지 제 32 항 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 유전자 조작 박테리아가 *코사코니아 슈도사카리*이고 상기 삽입된 서열이 서열번호 61, 및 70-72로 이루어진 군으로부터 선택된 서열에 적어도 약 80% 서열 동일성을 포함하는, 유전자 조작 박테리아.

청구항 43

제 1 항 내지 제 32 항 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 유전자 조작 박테리아가 *엔테로박터* 종이고 상기 삽입된 서열이 서열번호 62에 적어도 약 80% 서열 동일성을 포함하는, 유전자 조작 박테리아.

청구항 44

제 1 항 내지 제 32 항 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 유전자 조작 박테리아가 *클레브시엘라* 종이고 상기 삽입된 서열이 서열번호 67-69로 이루어진 군으로부터 선택된 서열에 적어도 약 80% 서열 동일성을 포함하는, 유전자 조작 박테리아.

청구항 45

제 1 항 내지 제 44 항 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 삽입된 서열이 비-천연 맥락(non-native context)으로 삽입된 천연 서열인, 유전자 조작 박테리아.

청구항 46

식물 종자 및 제 1 항 내지 제 45 항 중 어느 하나의 유전자 조작 박테리아를 포함하는, 조성물.

청구항 47

제 46 항에 있어서, 상기 식물 종자가 옥수수 종자, 밀 종자, 벼 종자, 보리 종자, 콩 종자, 수수 종자, 및 호밀 종자로 이루어진 군으로부터 선택되는, 조성물.

청구항 48

식물 및 제 1 항 내지 제 45 항 중 어느 하나의 유전자 조작 박테리아를 포함하는, 조성물.

청구항 49

제 48 항에 있어서, 상기 식물이 묘목인, 조성물.

청구항 50

제 48 항에 있어서, 상기 식물이 옥수수, 밀, 쌀, 보리, 밀, 콩, 및 사탕 수수로 이루어진 군으로부터 선택되는, 조성물.

청구항 51

미생물 유전자의 천연 프로모터 서열을 서열번호 1-72로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열에 적어도 80% 서열 동일성을 포함하는 프로모터 서열로 대체함으로써 미생물에서 미생물 유전자의 발현을 증가시키는, 방법.

청구항 52

제 51 항에 있어서, 상기 프로모터 서열이 서열번호 1-72로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열에 적어도 85% 서열 동일성을 포함하는, 방법.

청구항 53

제 51 항에 있어서, 상기 프로모터 서열이 서열번호 1-72로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열에 적어도 90% 서열 동일성을 포함하는, 방법.

청구항 54

제 51 항에 있어서, 상기 프로모터 서열이 서열번호 1-72로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열에 적어도 95% 서열 동일성을 포함하는, 방법.

청구항 55

제 51 항에 있어서, 상기 프로모터 서열이 서열번호 1-72로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열에 적어도 97% 서열 동일성을 포함하는, 방법.

청구항 56

제 51 항에 있어서, 상기 프로모터 서열이 서열번호 1-72로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열에 적어도 98% 서열 동일성을 포함하는, 방법.

청구항 57

제 51 항에 있어서, 상기 프로모터 서열이 서열번호 1-72로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열에 적어도 99% 서열 동일성을 포함하는, 방법.

청구항 58

제 51 항 내지 제 57 항 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 미생물 유전자의 발현 증가가 상기 미생물에 의해 암모늄 배출을 증가시키는, 방법.

청구항 59

제 51 항 내지 제 57 항 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 미생물 유전자의 발현 증가가 상기 미생물에 의해 질소 고정을 증가시키는, 방법.

청구항 60

제 51 항 내지 제 57 항 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 미생물 유전자의 발현 증가가 상기 미생물에 의해 식물의 콜로니화를 증가시키는, 방법.

청구항 61

질소 고정 또는 동화와 관련된 단백질에 대한 코딩 서열 및 서열번호 1-72로 이루어진 군으로부터 선택된 서열에 적어도 80% 서열 동일성을 포함하는 서열을 포함하는, 폴리뉴클레오티드.

청구항 62

제 61 항에 있어서, 질소 고정 또는 동화와 관련된 단백질에 대한 상기 코딩 서열이 *nifA*, *nifL*, *ntrB*, *ntrC*, 글루타민 합성효소를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드, *glnA*, *glnB*, *glnK*, *drat*, *amtB*, 글루타민아제를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드, *glnD*, *glnE*, *nifJ*, *nifH*, *nifD*, *nifK*, *nifY*, *nifE*, *nifN*, *nifU*, *nifS*, *nifV*, *nifW*, *nifZ*, *nifM*, *nifF*, *nifB*, *nifQ*, 및 니트로게나제 효소의 생합성과 관련된 유전자로 이루어진 군으로부터 선택되는, 폴리뉴클레오티드.

청구항 63

관심 단백질에 대한 코딩 서열 및 서열번호 1-72로 이루어진 군으로부터 선택된 서열에 적어도 80% 서열 동일성을 포함하는 서열을 포함하는, 폴리뉴클레오티드.

청구항 64

제 63 항에 있어서, 상기 관심 단백질이 수송체 유전자, 이온 수송체 유전자, 엑소폴리사카라이드 생합성 유전자, 셀룰로스 생합성 유전자, 및 트레할로스 생합성 유전자로 이루어지는 군으로부터 선택되는, 폴리뉴클레오티드.

청구항 65

제 63 항에 있어서, 상기 관심 단백질이 *CysZ* 유전자, *bcs* 유전자, *treZ* 유전자 및 *otsB* 유전자로 이루어지는 군으로부터 선택되는, 폴리뉴클레오티드.

청구항 66

제 61 항 내지 제 65 항 중 어느 하나의 항에 있어서, 서열번호 1-72로 이루어진 군으로부터 선택된 서열에 적어도 85% 서열 동일성을 가진 서열을 포함하는, 폴리뉴클레오티드.

청구항 67

제 61 항 내지 제 65 항 중 어느 하나의 항에 있어서, 서열번호 1-72로 이루어진 군으로부터 선택된 서열에 적어도 90% 서열 동일성을 가진 서열을 포함하는, 폴리뉴클레오티드.

청구항 68

제 61 항 내지 제 65 항 중 어느 하나의 항에 있어서, 서열번호 1-72로 이루어진 군으로부터 선택된 서열에 적어도 95% 서열 동일성을 가진 서열을 포함하는, 폴리뉴클레오티드.

청구항 69

제 61 항 내지 제 65 항 중 어느 하나의 항에 있어서, 서열번호 1-72로 이루어진 군으로부터 선택된 서열에 적어도 97% 서열 동일성을 가진 서열을 포함하는, 폴리뉴클레오티드.

청구항 70

제 61 항 내지 제 65 항 중 어느 하나의 항에 있어서, 서열번호 1-72로 이루어진 군으로부터 선택된 서열에 적

어도 98% 서열 동일성을 가진 서열을 포함하는, 폴리뉴클레오티드.

청구항 71

제 61 항 내지 제 65 항 중 어느 하나의 항에 있어서, 서열번호 1-72로 이루어진 군으로부터 선택된 서열에 적어도 99% 서열 동일성을 가진 서열을 포함하는, 폴리뉴클레오티드.

청구항 72

식물에서 대기 유래 질소의 양을 증가시키는 방법으로서, 상기 식물을 유전자 조작 박테리아와 접촉시키는 단계를 포함하고, 상기 유전자 조작 박테리아가 서열번호 1-72로 이루어진 군으로부터 선택된 서열에 적어도 80% 서열 동일성을 포함하는 프로모터에 작동가능하게 연결된 질소 고정 코딩 서열을 포함하는, 방법.

청구항 73

제 72 항에 있어서, 상기 프로모터가 서열번호 1-72로 이루어진 군으로부터 선택된 서열에 적어도 85% 서열 동일성을 포함하는, 방법.

청구항 74

제 72 항에 있어서, 상기 프로모터가 서열번호 1-72로 이루어진 군으로부터 선택된 서열에 적어도 90% 서열 동일성을 포함하는, 방법.

청구항 75

제 72 항에 있어서, 상기 프로모터가 서열번호 1-72로 이루어진 군으로부터 선택된 서열에 적어도 95% 서열 동일성을 포함하는, 방법.

청구항 76

제 72 항에 있어서, 상기 프로모터가 서열번호 1-72로 이루어진 군으로부터 선택된 서열에 적어도 97% 서열 동일성을 포함하는, 방법.

청구항 77

제 72 항에 있어서, 상기 프로모터가 서열번호 1-72로 이루어진 군으로부터 선택된 서열에 적어도 98% 서열 동일성을 포함하는, 방법.

청구항 78

제 72 항에 있어서, 상기 프로모터가 서열번호 1-72로 이루어진 군으로부터 선택된 서열에 적어도 99% 서열 동일성을 포함하는, 방법.

청구항 79

제 72 항 내지 제 78 항 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 유전자 조작 박테리아가 *라벨라 아쿠아틸리스*, *클레브시엘라 베리이콜라*, *아크로모박터 스피리티무스*, *아크로모박터 마르플라텐시스*, *마이크로박테리움 무랄레*, *클루이베라 인테메디아*, *코사코니아 슈도사카리*, *엔테로박터 sp.*, *아조스피릴룸 리포페룸*, 및 *코사코니아 사카리*로 이루어진 군으로부터 선택되는, 방법.

청구항 80

작물의 식재와 수확 사이에 요구되는 질소 비료의 양을 감소시키는 방법으로서, 상기 작물을 제 1 항 내지 제 45 항 중 어느 하나의 항의 유전자 조작 박테리아와 접촉시키는 단계를 포함하는, 방법.

발명의 설명

기술 분야

교차-참조

[0001]

[0002] 본 출원은 2017년 10월 25일자로 출원된 미국 가특허 출원 제 62/577,148 호를 우선권으로 주장하며, 이는 전체적으로 본 명세서에 참고로 포함된다.

[0003] **연방정부 지원된 연구에 관한 진술**

[0004] 본 발명은 국립 과학 재단 (National Science Foundation)에 의해 수여된 SBIR 교부금 1520545에 따라 미국 정부의 지원으로 이루어졌다. 정부는 개시된 청구대상에 대해 특정 권리를 보유한다.

배 경 기 술

[0005] **발명의 배경**

[0006] 식물은 공유 대사 물질을 통해 마이크로바이옴에 연결된다. 특정 작물 특성과 기본 대사체 간의 다차원 관계는 다수의 국부 최대값을 가진 상황을 특징으로 한다. 대사체에 대한 마이크로바이옴의 영향을 변경함으로써 열악한 국소 최대치부터 더 나은 특성을 나타내는 또 다른 것까지 최적화하는 것은 작물 최적화와 같은 다양한 이유로 바람직할 수 있다. 증가하는 전세계 인구의 요구를 충족시키기 위해서는 경제적으로-, 환경적으로-, 사회적으로-지속가능한 농업 및 식량 생산 접근법이 필요하다. 2050년까지 유엔 식량 농업기구는 담수 자원 감소, 가경지에 대한 경쟁 증가, 에너지 가격 상승, 투입 비용 증가, 그리고 작물이 건조하고 더 뜨겁고 더 극단적인 지구 기후의 압력에 적응해야 할 가능한 필요성을 포함하는, 수많은 요인에 의해 악화되는 과제인, 증가하는 인구의 요구를 충족시키기 위해 총 식량 생산이 70 % 증가해야 한다는 것을 예상한다.

[0007] 관심 분야 중 하나는 질소 고정의 개선에 있다. 질소 가스 (N_2)는 지구 대기의 주요 성분이다. 또한, 원소 질소 (N)는 살아있는 유기체를 구성하는 많은 화학 화합물의 중요한 성분이다. 그러나 많은 유기체는 성장과 번식과 같은 생리학적 공정에 사용되는 화학물질을 합성하기 위해 N_2 를 직접 사용할 수 없다. N_2 를 이용하기 위해, N_2 가 수소와 조합되어야 한다. 수소와 N_2 의 조합이 질소 고정이라고 지칭된다. 화학적으로든 생물학적으로든 질소 고정은 많은 양의 에너지 투자를 필요로 한다. 생물학적 시스템에서, 니트로게나제로 알려진 효소는 반응을 촉매하여 질소 고정을 초래한다. 질소 고정 연구의 중요한 목표는 이 표현형을 비-콩과 식물, 특히 밀, 쌀 및 옥수수과 같은 중요한 농경지로 확장하는 것이다. 근균류와 콩과 식물 사이의 질소 고정 공생의 발달을 이해하는데 엄청난 진전이 있었음에도 불구하고, 비-콩과 농작물에 질소-고정 혹은 유도하기 위해 이 지식을 사용하는 경로는 여전히 명확하지 않다. 한편, 비료와 같이 충분한 보충 질소원을 제공해야 하는 과제는 식품 생산 증가에 대한 필요성이 증가함에 따라 계속 증가할 것이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

과제의 해결 수단

[0008] **발명의 요약**

[0009] 일부 구현예에서, 본 개시내용은 서열번호 1-72로 이루어진 군으로부터 선택된 서열에 적어도 약 80% 서열 동일성을 가지고 있는 삽입된 서열을 포함하는 유전자 조작 박테리아를 제공한다. 일부 경우에, 삽입된 서열은 천연 프로모터 서열을 대체한다. 일부 경우에, 삽입된 서열은 서열번호 1-72로 이루어진 군으로부터 선택된 서열에 적어도 약 85% 서열 동일성을 포함한다. 일부 경우에, 삽입된 서열은 서열번호 1-72로 이루어진 군으로부터 선택된 서열에 적어도 약 90% 서열 동일성을 포함한다. 일부 경우에, 삽입된 서열은 서열번호 1-72로 이루어진 군으로부터 선택된 서열에 적어도 약 95% 서열 동일성을 포함한다. 일부 경우에, 삽입된 서열은 서열번호 1-72로 이루어진 군으로부터 선택된 서열에 적어도 약 97% 서열 동일성을 포함한다. 일부 경우에, 상기 삽입된 서열은 서열번호 1-72로 이루어진 군으로부터 선택된 서열에 적어도 약 98% 서열 동일성을 포함한다. 일부 경우에, 삽입된 서열은 서열번호 1-72로 이루어진 군으로부터 선택된 서열에 적어도 약 99% 서열 동일성을 포함한다.

[0010] 일부 구현예에서, 본 개시내용은 서열번호 1-72로 이루어진 군으로부터 선택된 서열에 적어도 80% 서열 동일성을 가지고 있는 삽입된 서열에 작동가능하게 연결된 천연 코딩 서열을 포함하는 유전자 조작 박테리아를 제공한다. 일부 경우에, 삽입된 서열은 천연 프로모터 서열을 대체한다. 일부 경우에, 삽입된 서열은 서열번호 1-72로 이루어진 군으로부터 선택된 서열에 적어도 약 85% 서열 동일성을 포함한다. 일부 경우에, 서열은 서열번호 1-

72로 이루어진 군으로부터 선택된 서열에 적어도 약 90% 서열 동일성을 포함한다. 일부 경우에, 삽입된 서열은 서열번호 1-72로 이루어진 군으로부터 선택된 서열에 적어도 약 95% 서열 동일성을 포함한다. 일부 경우에, 삽입된 서열은 서열번호 1-72로 이루어진 군으로부터 선택된 서열에 적어도 약 97% 서열 동일성을 포함한다. 일부 경우에, 상기 삽입된 서열은 서열번호 1-72로 이루어진 군으로부터 선택된 서열에 적어도 약 98% 서열 동일성을 포함한다. 일부 경우에, 삽입된 서열은 서열번호 1-72로 이루어진 군으로부터 선택된 서열에 적어도 약 99% 서열 동일성을 포함한다. 일부 경우에, 천연 코딩 서열은 *cysZ*, *otsB*, *bcs* 유전자, 및 *treZ*로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 경우에, 천연 코딩 서열은 수송체 유전자, 이온 수송체 유전자, 엑소폴리사카라이드 생합성 유전자, 셀룰로스 생합성 유전자, 및 트레할로스 생합성 유전자로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0011]

일부 구현예에서, 본 개시내용은 서열번호 1-72로 이루어진 군으로부터 선택된 서열에 적어도 약 80% 서열 동일성을 가지고 있는 삽입된 서열에 작동가능하게 연결된 질소 고정 또는 질소 동화 코딩 서열을 포함하는 유전자 조작 박테리아를 제공한다. 일부 경우에, 서열번호 1-72로 이루어진 군으로부터 선택된 서열에 적어도 약 80% 서열 동일성을 가지고 있는 삽입된 서열은 천연 프로모터 서열을 대체한다. 일부 경우에, 삽입된 서열은 서열번호 1-72로 이루어진 군으로부터 선택된 서열에 적어도 약 85% 서열 동일성을 포함한다. 일부 경우에, 삽입된 서열은 서열번호 1-72로 이루어진 군으로부터 선택된 서열에 적어도 약 90% 서열 동일성을 포함한다. 일부 경우에, 삽입된 서열은 서열번호 1-72로 이루어진 군으로부터 선택된 서열에 적어도 약 95% 서열 동일성을 포함한다. 일부 경우에, 삽입된 서열은 서열번호 1-72로 이루어진 군으로부터 선택된 서열에 적어도 약 97% 서열 동일성을 포함한다. 일부 경우에, 삽입된 서열은 서열번호 1-72로 이루어진 군으로부터 선택된 서열에 적어도 약 98% 서열 동일성을 포함한다. 일부 경우에, 삽입된 서열은 서열번호 1-72로 이루어진 군으로부터 선택된 서열에 적어도 약 99% 서열 동일성을 포함한다. 일부 경우에, 질소 고정 또는 질소 동화 코딩 서열은 *nifA*, *nifL*, *ntrB*, *ntrC*, 글루타민 합성효소를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드, *glnA*, *glnB*, *glnK*, *drat*, *amtB*, 글루타민아제를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드, *glnD*, *glnE*, *nifJ*, *nifH*, *nifD*, *nifK*, *nifY*, *nifE*, *nifN*, *nifU*, *nifS*, *nifV*, *nifW*, *nifZ*, *nifM*, *nifF*, *nifB*, *nifQ*, 및 니트로게나제 효소의 생합성과 관련된 유전자로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 경우에, 유전자 조작 박테리아는 유전자 조작된 디아조트로프식 박테리아이다. 일부 경우에, 유전자 조작 박테리아는 비-속간이다. 일부 경우에, 유전자 조작 박테리아가 속간이다. 일부 경우에, 유전자 조작 박테리아는 비 질소 제한 조건 하에서 대기 질소를 고정시킨다. 일부 경우에, 유전자 조작 박테리아는 동일한 종의 조작되지 않은 박테리아보다 더 많은 대기 질소를 고정시킨다. 일부 경우에, 유전자 조작 박테리아는 라벨라 아쿠아틸리스(*Rahnella aquatilis*), 클레브시엘라 베리이콜라(*Klebsiella variicola*), 코사코니아 슈도사카리(*Kosakonia pseudosacchari*), 클루이베라 인터메디아(*Kluyvera intermedia*), 클레브시엘라 sp., 엔테로박터(*Enterobacter*) sp., 및 코사코니아 사카리로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 경우에, 유전자 조작 박테리아는 라벨라 속이고, 상기 삽입된 서열은 서열번호 41-59, 및 63-66으로 이루어진 군으로부터 선택된 서열에 적어도 약 80% 서열 동일성을 포함한다. 일부 경우에, 유전자 조작 박테리아는 라벨라 아쿠아틸리스이고, 상기 삽입된 서열은 서열번호 41-59, 및 63-66으로 이루어진 군으로부터 선택된 서열에 적어도 약 80% 서열 동일성을 포함한다. 일부 경우에, 유전자 조작 박테리아는 코사코니아 속이며, 상기 삽입된 서열은 서열번호 1-10으로 이루어진 군으로부터 선택된 서열에 적어도 약 80% 서열 동일성을 포함한다. 일부 경우에, 유전자 조작 박테리아는 코사코니아 사카리이고, 상기 삽입된 서열은 서열번호 1-10으로 이루어진 군으로부터 선택된 서열에 적어도 약 80% 서열 동일성을 포함한다. 일부 경우에, 유전자 조작 박테리아는 클레브시엘라 속이고, 상기 삽입된 서열은 서열번호 11-40으로 이루어진 군으로부터 선택된 서열에 적어도 약 80% 서열 동일성을 포함한다. 일부 경우에, 상기 유전자 조작 박테리아는 클레브시엘라 베리이콜라이고, 상기 삽입된 서열은 서열번호 11-40으로 이루어진 군으로부터 선택된 서열에 적어도 약 80% 서열 동일성을 포함한다. 일부 경우에, 유전자 조작 박테리아는 클루이베라 속이며, 상기 삽입된 서열은 서열번호 60에 적어도 약 80% 서열 동일성을 포함한다. 일부 경우에, 유전자 조작 박테리아는 클루이베라 인터메디아이고, 상기 삽입된 서열은 서열번호 60에 적어도 약 80% 서열 동일성을 포함한다. 일부 경우에, 유전자 조작 박테리아는 코사코니아 슈도사카리이며, 상기 삽입된 서열은 서열번호 61, 및 70-72로 이루어진 군으로부터 선택된 서열에 적어도 약 80% 서열 동일성을 포함한다. 일부 경우에, 유전자 조작 박테리아는 엔테로박터 종이며, 상기 삽입된 서열은 서열번호 62에 적어도 약 80% 서열 동일성을 포함한다. 일부 경우에, 유전자 조작 박테리아는 클레브시엘라 종이며, 상기 삽입된 서열은 서열번호 67-69로 이루어진 군으로부터 선택된 서열에 적어도 약 80% 서열 동일성을 포함한다. 일부 경우에, 삽입된 서열은 비-천연 맥락으로 삽입된 천연 서열이다.

[0012]

일부 구현예에서, 본 개시내용은 본원에 기재된 유전자 조작 박테리아 및 식물 종자를 포함하는 조성물을 제공한다. 일부 경우에, 식물 종자는 옥수수 종자, 밀 종자, 벼 종자, 보리 종자, 콩 종자, 수수 종자, 및 호밀 종자로 이루어진 군으로부터 선택된다.

- [0013] 일부 구현예에서, 본 개시내용은 본원에 제공된 유전자 조작 박테리아 및 식물을 포함하는 조성물을 제공한다. 일부 경우에, 식물은 묘목이다. 일부 경우에, 식물은 옥수수, 밀, 쌀, 보리, 호밀, 콩, 및 수수로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0014] 일부 구현예에서, 본 개시내용은 미생물 유전자의 천연 프로모터 서열을 서열번호 1-72로 이루어진 군으로부터 선택된 서열에 적어도 80% 서열 동일성을 포함하는 프로모터 서열로 대체함으로써 미생물에서의 미생물 유전자의 발현을 증가시키는 방법을 제공한다. 일부 경우에, 프로모터 서열은 서열번호 1-72로 이루어진 군으로부터 선택된 서열에 적어도 85% 서열 동일성을 포함한다. 일부 경우에, 프로모터 서열은 서열번호 1-72로 이루어진 군으로부터 선택된 서열에 적어도 90% 서열 동일성을 포함한다. 일부 경우에, 프로모터 서열은 서열번호 1-72로 이루어진 군으로부터 선택된 서열에 적어도 95% 서열 동일성을 포함한다. 일부 경우에, 프로모터 서열은 서열번호 1-72로 이루어진 군으로부터 선택된 서열에 적어도 97% 서열 동일성을 포함한다. 일부 경우에, 프로모터 서열은 서열번호 1-72로 이루어진 군으로부터 선택된 서열에 적어도 98% 서열 동일성을 포함한다. 일부 경우에, 프로모터 서열은 서열번호 1-72로 이루어진 군으로부터 선택된 서열에 적어도 99% 서열 동일성을 포함한다. 일부 경우에, 상기 미생물 유전자의 발현 증가는 상기 미생물에 의한 암모늄 배출을 증가시킨다. 일부 경우에, 상기 미생물 유전자의 발현 증가는 상기 미생물에 의한 질소 고정을 증가시킨다. 일부 경우에, 상기 미생물 유전자의 발현 증가는 상기 미생물에 의한 식물의 콜로니화를 증가시킨다.
- [0015] 일부 구현예에서, 본 개시내용은 질소 고정 또는 동화와 관련된 단백질에 대한 코딩 서열 및 서열번호 1-72로 이루어진 군으로부터 선택된 서열에 적어도 80% 서열 동일성을 포함하는 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다. 일부 경우에, 질소 고정 또는 동화와 관련된 단백질에 대한 코딩 서열은 *nifA*, *nifL*, *ntrB*, *ntrC*, 글루타민 합성효소를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드, *glnA*, *glnB*, *glnK*, *drat*, *amtB*, 글루타민아제를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드, *glnD*, *glnE*, *nifJ*, *nifH*, *nifD*, *nifK*, *nifY*, *nifE*, *nifN*, *nifU*, *nifS*, *nifV*, *nifW*, *nifZ*, *nifM*, *nifF*, *nifB*, *nifQ*, 및 니트로게나제 효소의 생합성과 관련된 유전자로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0016] 일부 구현예에서, 본 개시내용은 관심 단백질에 대한 코딩 서열 및 서열번호 1-72로 이루어진 군으로부터 선택된 서열에 적어도 80% 서열 동일성을 포함하는 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다. 일부 경우에, 관심 단백질은 수송체 유전자, 이온 수송체 유전자, 엑소폴리사카라이드 생합성 유전자, 셀룰로스 생합성 유전자, 및 트레할로스 생합성 유전자로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 경우에, 관심 단백질은 *CysZ* 유전자, *bcs* 유전자, *treZ* 유전자 및 *otsB* 유전자로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 경우에, 폴리뉴클레오티드는 서열번호 1-72로 이루어진 군으로부터 선택된 서열에 적어도 85% 서열 동일성을 가진 서열을 포함한다. 일부 경우에, 폴리뉴클레오티드는 서열번호 1-72로 이루어진 군으로부터 선택된 서열에 적어도 90% 서열 동일성을 가진 서열을 포함한다. 일부 경우에, 폴리뉴클레오티드는 서열번호 1-72로 이루어진 군으로부터 선택된 서열에 적어도 95% 서열 동일성을 가진 서열을 포함한다. 일부 경우에, 폴리뉴클레오티드는 서열번호 1-72로 이루어진 군으로부터 선택된 서열에 적어도 97% 서열 동일성을 가진 서열을 포함한다. 일부 경우에, 폴리 뉴클레오티드는 서열번호 1-72로 이루어진 군으로부터 선택된 서열에 적어도 98% 서열 동일성을 가진 서열을 포함한다. 일부 경우에, 폴리뉴클레오티드는 서열번호 1-72로 이루어진 군으로부터 선택된 서열에 적어도 99% 서열 동일성을 가진 서열을 포함한다.
- [0017] 일부 구현예에서, 본 개시내용은, 상기 식물을 유전자 조작 박테리아와 접촉시키는 단계를 포함하는, 식물에서 대기 유래 질소의 양을 증가시키는 방법을 제공하며, 여기서 상기 유전자 조작 박테리아는 서열번호 1-72로 이루어진 군에서 선택된 서열에 적어도 80% 서열 동일성을 포함하는 프로모터에 작동가능하게 연결된 질소 고정 코딩 서열을 포함한다. 일부 경우에, 프로모터는 서열번호 1-72로 이루어진 군으로부터 선택된 서열에 적어도 85% 서열 동일성을 포함한다. 일부 경우에, 프로모터는 서열번호 1-72로 이루어진 군으로부터 선택된 서열에 적어도 90% 서열 동일성을 포함한다. 일부 경우에, 프로모터는 서열번호 1-72로 이루어진 군으로부터 선택된 서열에 적어도 95% 서열 동일성을 포함한다. 일부 경우에, 프로모터는 서열번호 1-72로 이루어진 군으로부터 선택된 서열에 적어도 97% 서열 동일성을 포함한다. 일부 경우에, 프로모터는 서열번호 1-72로 이루어진 군으로부터 선택된 서열에 적어도 98% 서열 동일성을 포함한다. 일부 경우에, 상기 미생물 유전자의 발현 증가는 상기 미생물에 의한 암모늄 배출을 증가시킨다. 일부 경우에, 상기 미생물 유전자의 발현 증가는 상기 미생물에 의한 질소 고정을 증가시킨다. 일부 경우에, 상기 미생물 유전자의 발현 증가는 상기 미생물에 의한 식물의 콜로니화를 증가시킨다.
- [0018] 일부 경우에, 프로모터는 서열번호 1-72로 이루어진 군으로부터 선택된 서열에 적어도 99% 서열 동일성을 포함한다. 일부 경우에, 유전자 조작 박테리아는 라벨라 아쿠아틸리스, 클레브시엘라 베리이콜라, 아크로모박터 스피리티누스(*Achromobacter spiritinus*), 아크로모박터 마르플라텐시스(*marplatensis*), 마이크로박테리움 무랄

레(*Microbacterium murale*), 클루이베라 인터메디아, 코사코니아 슈도사카리, 엔테로박터 sp., 아조스피릴룸 리포페룸(*Azospirillum lipoferum*), 및 코사코니아 사카리로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0019] 일부 구현예에서, 본 개시내용은 작물의 식재 및 수확 사이에 요구되는 질소 비료의 양을 감소시키는 방법을 제공하며, 상기 방법은 상기 작물을 본원에 기재된 유전자 조작 박테리아와 접종하는 것을 포함한다.

[0020] **참조에 의한 통합**

[0021] 본 명세서에 언급된 모든 간행물, 특허 및 특허 출원은 각각의 개별 간행물, 특허 또는 특허 출원이 구체적이고 개별적으로 참조로 포함된 것으로 표시되는 것과 동일한 정도로 본원에 참조로 포함된다.

도면의 간단한 설명

[0022] **도면의 간단한 설명**

본 발명의 신규한 특징은 첨부된 청구항들에 구체적으로 기재되어있다. 본 발명의 특징 및 장점에 대한 더 나은 이해는 본 발명의 원리가 이용되는 예시적인 구현예 및 첨부 도면을 설명하는 다음의 상세한 설명을 참조하여 달성될 것이다:

도 1a-b는 질소 고정 박테리아의 농축 및 단리를 도시한다. (a) Nfb 한천 플레이트는 질소 고정 박테리아의 단일 콜로니를 단리하는데 사용되었다. (b) 발치(Balch) 튜브에서 주조된 반(半)고체 Nfb 한천. 화살표는 농축된 질소 고정 박테리아의 펠리클을 가리킨다.

도 2는 대표적인 *nifH* PCR 스크린을 묘사한다. 이 스크린에서 2 개의 콜로니에 대하여 ~350bp에서 양성 밴드가 관찰되었다. 보다 낮은 밴드는 프라이머-이량체를 나타낸다.

도 3은 CRISPR-Cas-선택된 돌연변이유발로부터 콜로니의 PCR 스크린의 예를 묘사한다. CI006 콜로니는 *nifL* 유전자좌에 특이적인 프라이머로 스크리닝되었다. 야생형 PCR 생성물은 ~2.2kb로 예상되는 반면, 돌연변이체는 ~1.1kb로 예상된다. 10 개의 콜로니 중 7 개는 원하는 결실을 분명하게 보여준다.

도 4a-d는 다양한 균주의 시험관내 표현형을 묘사한다. 0 내지 10mM 글루타민이 보충된 질소 고정 배지에서 성장된 균주 CI010의 돌연변이체 (**도 4a**) 및 균주 CI006의 돌연변이체 (**도 4b**)의 아세틸렌 환원 검정 (ARA) 활성. 추가 균주의 ARA 활성은 **도 4c**에 도시되어 있고, 2 개의 균주의 시간에 걸친 암모늄 배출 프로파일은 **도 4d**에 도시되어 있다.

도 5는 디아조트로프식 질소 고정에 관련된 균주 CI006에서 9 개의 상이한 유전자의 배양 발현 프로파일에서 묘사한다. 숫자는 각 전사체의 카운트를 나타낸다. 다양한 조건 (0, 1, 10 mM 글루타민 및 N₂내 0 %, 10 %, 20 % 대기)이 표시된다.

도 6은 옥수수 뿌리의 CI006 콜로니화를 묘사한다. 옥수수 묘목은 RFP 발현 플라스미드를 보유한 CI006으로 접종되었다. 2 주 성장 및 적절한 항생제와 물을 통한 플라스미드 유지 후, 뿌리는 수확되었고 형광 현미경을 통해 이미지화되었다. 뿌리 세포간 공간의 콜로니화가 관찰된다.

도 7은 WT (CI050) 및 최적화된 (CM002) 균주에서 미생물 수준으로부터 유래된 질소를 묘사한다.

도 8은 마이크로-톰(Micro-Tom) 결실(fruiting) 질량 검정용 실험 설정을 보여준다.

도 9는 마이크로-톰 식물 열매 질량에서 증가에 대한 10 개 균주의 스크린을 도시한다. 6 개의 복제물에 대한 결과는 제공된다. 3번째 컬럼의 경우, $p = 0.07$. 7번째 컬럼의 경우, $p = 0.05$.

도 10a-c는 0 내지 10mM 글루타민이 보충된 질소 고정 배지에서 성장된 후보 미생물 및 상대 후보 돌연변이체의 ARA 활성에 대한 추가 결과를 묘사한다.

도 11은 이것이 유래된 단일 돌연변이체보다 높은 암모니아 배출을 나타내는 이중 돌연변이체를 묘사한다.

도 12는 시비된 조건에서 옥수수 식물내 NDFA를 측정하기 위해 (노출된 날을 사용하여 다시 외삽된) 15N 가스 흡수 실험으로부터 수득된 NDFA를 묘사한다.

도 13은 시비된 조건에서 세타리아 식물에서 NDFA를 측정하기 위해 (노출된 날을 사용하여 다시 외삽된) 15N 가스 흡수 실험으로부터 수득된 NDFA 값을 묘사한다.

도 14a는 15N 가스의 혼입 속도를 묘사한다. 진화된 균주로 접종된 식물은 접종되지 않은 식물과 비교하여 15N

가스 혼입의 증가를 나타냈다.

도 14b는, 식재 4 주 후, 진화된 균주로 접종된 식물에서 질소의 최대 7 %가 미생물 고정된 질소로부터 유래되는 것을 묘사한다.

도 14c는 접종되지 않은 또는 야생형 접종된 식물과 비교된 경우 진화된 균주로 접종된 식물에서 잎 면적 (및 다른 바이오매스 측정, 데이터 미도시)가 증가되는 것을 묘사한다.

도 15a는, 식물체내 전사체학 연구에서 측정된 경우, 뿌리 조직에서 상당히 높은 nifH 생산을 나타내는 진화된 균주를 묘사한다.

도 15b는 식물 조직에서 발견된 고정 질소의 속도가 특정 식물이 HoME 최적화된 균주에 의해 콜로니화되는 속도와 상관관계가 있음을 묘사한다.

도 16a는 콜로니화용으로 시험된 다양한 들판 토양의 토양 조직도를 묘사한다. 몇 개의 미생물이 원천인 토양은 별로 표시된다.

도 16b는 4 가지 상이한 토양 유형 (원형)에 걸쳐 시험된 균주 1 및 균주 5의 콜로니화 속도를 묘사한다. 두 균주는 다양한 토양 유형에 걸쳐 비교적 강력한 콜로니화 프로파일을 나타냈다.

도 16c는 성장 시기에 걸친 들판 시험에서 시험된 경우 균주 1의 콜로니화를 묘사한다. 균주 1은 식재 후 12 주까지 옥수수 조직에서 유지하고 그 시간 이후에 콜로니화의 감소를 나타내기 시작한다.

도 17은 구현예에 따른 미생물 육종의 개략도를 묘사한다.

도 18은 **도 17**에 도시된 바와 같은 마이크로바이옴 조성물의 측정의 확대도를 묘사한다.

도 19a는 *코사코니아 사카리*에서 nifA 전사의 증가를 나타내는 프로모터 삽입의 몇몇 예를 도시한다. 일부 구현예에 따라, NifA 전사는, 3회 반복하고, 전사체 카운트의 정규화를 위한 하우스키핑 유전자로서 heID를 사용하여 qPCR에 의해 측정되었다. 세포는 최소 질소 자유 배지에서 배양되었다.

도 19b는 *코사코니아 사카리*에서 증가된 니트로게나제 활성을 유도하는 nifA 유전자의 상류에 프로모터 삽입의 여러 예를 도시한다. 활성은, 일부 구현예에 따라, 단독 N 공급원으로서 5mM 글루타민이 보충된 최소 배지에서 ARA 검정으로 측정되었다.

도 20a는 *클레브시엘라 베리이콜라*에서 nifA 전사의 증가를 나타내는 프로모터 삽입의 예를 도시한다. 일부 구현예에 따라, nifA 전사는, 전사체 카운트의 정규화를 위한 하우스키핑 유전자로서 heID를 사용하여 qPCR에 의해 측정되었다. 세포는 유일한 N 공급원으로서 10mM 글루타민이 보충된 최소 배지에서 배양되었다.

도 20b는 **도 20a**의 변형이 *클레브시엘라 베리이콜라*에서 니트로게나제 활성을 증가시킨다는 것을 도시한다. 일부 구현예에 따라, 활성은, 단독 N 공급원으로서 10mM 글루타민이 보충된 최소 배지에서 ARA 검정으로 측정되었다.

도 21 및 **도 22**는 *클레브시엘라 베리이콜라*에서 nifA 전사의 증가를 나타내는 삽입 프로모터의 추가 예를 도시한다. 일부 구현예에 따라, nifA 전사는, 전사체 카운트의 정규화를 위한 하우스키핑 유전자로서 heID를 사용하여, qPCR에 의해 측정되었다. 세포는 유일한 N 공급원으로서 10mM 글루타민이 보충된 최소 배지에서 배양되었다.

도 23은 **도 22**의 변형이 *클레브시엘라 베리이콜라*에서 증가된 니트로게나제 활성을 야기시킨다는 것을 도시한다. 일부 구현예에 따라, 활성은, 단독 N 공급원으로서 10mM 글루타민이 보충된 최소 배지에서 ARA 검정으로 측정되었다. 오차 막대는 평균의 표준 편차를 나타냅니다.

도 24a 및 **도 24b**는, 일부 구현예에 따라, *클레브시엘라 베리이콜라*에서 증가된 니트로게나제 활성을 야기하는 nifA 유전자의 상류에 프로모터 삽입의 예를 도시한다. 5mM 인산암모늄이 보충된 최소 배지에서 ARA 검정으로 측정된, 2개의 생물학적 복제물의 산점도는 도시된다.

도 25a는, 일부 구현예에 따라, *라벨라 아쿠아틸리스*에서 증가된 니트로게나제 활성을 야기하는 nifA 유전자의 상류에 프로모터 삽입의 예를 도시한다. 활성은 5mM 인산암모늄이 보충된 최소 배지에서 ARA 검정으로 측정되었다.

도 25b는, 일부 구현예에 따라, *라벨라 아쿠아틸리스*에서 증가된 니트로게나제 활성을 야기하는 nifA 유전자의

상류에 프로모터 삽입의 예를 도시한다. 활성은 10mM 인산암모늄이 보충된 최소 배지에서 ARA 검정으로 측정되었다.

도 26은, 일부 구현예에 따라, *코사코니아 슈도사카리*에서 증가된 니트로게나제 활성을 야기하는 nifA 유전자의 상류에 프로모터 삽입의 예를 도시한다. 활성은 5mM 글루타민이 보충된 최소 배지에서 ARA 검정으로 측정되었다.

도 27은, 일부 구현예에 따라, *엔테로박터* 중에서 증가된 니트로게나제 활성을 야기하는 nifA 유전자의 상류에 프로모터 삽입의 예를 도시한다. 활성은 5mM 인산암모늄이 보충된 최소 배지에서 ARA 검정으로 측정되었다.

도 28은, 일부 구현예에 따라, *클레브시엘라* 중에서 증가된 니트로게나제 활성을 야기하는 nifA 유전자의 상류에 프로모터 삽입의 예를 도시한다. 활성은 5mM 인산암모늄이 보충된 최소 배지에서 ARA 검정으로 측정되었다.

도 29는, 일부 구현예에 따라, 증가된 니트로게나제 활성을 야기하는 nifA 유전자의 상류에 프로모터 삽입의 2 가지 예를 도시한다. 활성은 5mM 글루타민이 보충된 최소 배지에서 ARA 검정으로 측정되었다.

도 30은 *코사코니아 사카리*에서 bcsI 전사의 증가를 나타내는 프로모터 삽입의 예를 도시한다. 일부 구현예에 따라, BcsI 전사는, 전사체 카운트의 정규화를 위한 하우스키핑 유전자로서 heID를 사용하여, qPCR에 의해 측정되었다. 세포는 최소 질소 자유 배지에서 배양되었다.

도 31a는 *코사코니아 사카리*에서 cysZ 전사의 증가를 나타내는 프로모터 삽입의 예를 도시한다. 일부 구현예에 따라, CysZ 전사는 전사체 카운트의 정규화를 위한 하우스키핑 유전자로서 heID를 사용하여 qPCR에 의해 측정되었다. 세포는 5mM 글루타민이 보충된 최소 배지에서 배양되었다.

도 31b는 *코사코니아 사카리*에서 otsB 전사의 증가를 나타내는 프로모터 삽입의 예를 도시한다. 일부 구현예에 따라, OtsB 전사는 전사체 카운트의 정규화를 위한 하우스키핑 유전자로서 heID를 사용하여 qPCR에 의해 측정되었다. 세포는 5mM 글루타민이 보충된 최소 배지에서 배양되었다.

도 31c는 *코사코니아 사카리*에서 treZ 전사의 증가를 나타내는 프로모터 삽입의 예를 도시한다. 일부 구현예에 따라, TrePC 전사는 전사체 카운트의 정규화를 위한 하우스키핑 유전자로서 heID를 사용하여, 그리고 qPCR에 의해 측정되었다. 세포는 5mM 글루타민이 보충된 최소 배지에서 배양되었다.

도 32a는 도 20a-23에 사용된 프로모터 삽입 방법을 도시한다.

도 32b는 도 19a, 19b 및 24a-31c에 사용된 프로모터 삽입 방법을 도시한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

발명의 상세한 설명

용어 "폴리뉴클레오티드", "뉴클레오티드", "뉴클레오티드 서열", "핵산" 및 "올리고뉴클레오티드"는 호환적으로 사용된다. 이들은, 임의의 길이의 뉴클레오티드, 어느 한쪽 데옥시리보뉴클레오티드 또는 리보뉴클레오티드, 또는 이들의 유사체의 중합체 형태를 지칭한다. 폴리뉴클레오티드는 임의의 3 차원 구조를 가질 수 있고, 공지된 또는 미공지된 임의의 기능을 수행할 수 있다. 다음은 폴리뉴클레오티드의 비-제한적인 예이다: 유전자 또는 유전자 단편의 코딩 또는 비-코딩 영역, 연결 분석으로 정의된 유전자좌들 (유전자좌), 엑손, 인트론, 메신저 RNA (mRNA), 전달 RNA (tRNA), 리보솜 RNA (rRNA), 짧은 간섭 RNA (siRNA), 짧은-헤어핀 RNA (shRNA), 마이크로-RNA (miRNA), 리보자임, cDNA, 재조합 폴리뉴클레오티드, 분지형 폴리뉴클레오티드, 플라스미드, 벡터, 임의의 서열의 단리된 DNA, 임의의 서열의 단리된 RNA, 핵산 프로브, 및 프라이머. 폴리뉴클레오티드는 메틸화된 뉴클레오티드 및 뉴클레오티드 유사체와 같은 하나 이상의 변형된 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 존재하는 경우, 뉴클레오티드 구조에 대한 변형은 중합체의 조립 전 또는 후에 부여될 수 있다. 뉴클레오티드의 서열은 비-뉴클레오티드 성분에 의해 중단될 수 있다. 폴리뉴클레오티드는 예를 들어 표지 성분과의 집합에 의해 중합화 후에 추가로 변형될 수 있다.

"하이브리드화"는 하나 이상의 폴리뉴클레오티드가 반응하여 뉴클레오티드 잔기의 염기 사이의 수소 결합을 통해 안정화되는 복합체를 형성하는 반응을 지칭한다. 수소 결합은 왓슨 크릭 짝짓기, 후그스테인(Hoogsteen) 결합, 또는 염기 상보성에 따른 임의의 다른 서열 특이적 방식으로 발생할 수 있다. 복합체는 이중 구조를 형성하는 2 개의 가닥, 다중 가닥 복합체를 형성하는 3 개 이상의 가닥, 단일 자가-하이브리드화 가닥, 또는 이들의 임의의 조합을 포함할 수 있다. 하이브리드화 반응은 PCR의 개시 또는 엔도뉴클레아제에 의한 폴리뉴클레오티드의 효소적 절단과 같은 보다 광범위한 공정에서 단계를 구성할 수 있다. 제 1 서열에 상보적인 제 2 서열은 제

1 서열의 "보체"로서 지칭된다. 폴리뉴클레오티드에 적용되는 경우 용어 "하이브리드화가능한"은 하이브리드화 반응에서 뉴클레오티드 잔기의 염기 사이의 수소 결합을 통해 안정화되는 복합체를 형성하는 폴리뉴클레오티드의 능력을 지칭한다.

[0026] "상보성"은 전통적인 왓슨-크릭 또는 다른 비-전통적인 유형에 의해 또 다른 핵산 서열과 수소 결합을 형성하는 핵산의 능력을 지칭한다. 퍼센트 상보성은 제 2 핵산 서열과 수소 결합 (예를 들어, 왓슨-크릭 염기 짝짓기)를 형성할 수 있는 핵산 분자에서 잔기의 백분율을 나타낸다 (예를 들어, 10 개 중 5, 6, 7, 8, 9, 10 개는 각각 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % 및 100 % 상보적이다). "완벽하게 상보적"은 핵산 서열의 모든 인접 잔기가 제 2 핵산 서열에서 동일한 수의 인접 잔기와 수소 결합할 것을 의미한다. 본원에 사용된 바와 같이 "실질적으로 상보적"은 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40, 45, 50개 이상의 뉴클레오티드의 영역에서 적어도 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 %, 또는 100 %인 상보성 정도를 지칭하거나, 엄격한 조건 하에서 하이브리드화하는 2 개의 핵산을 지칭한다. 퍼센트 상보성을 평가하기 위한 목적과 같은, 서열 동일성은, 비제한적으로 Needleman-Wunsch 알고리즘 (예를 들어, www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/nucleotide.html에서 이용가능한 EMBoss Needle 정렬기 참조, 선택적으로 디폴트 설정 사용), BLAST 알고리즘 (예를 들어, blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi에서 이용가능한 BLAST 정렬 도구 참조, 선택적으로 디폴트 설정 사용), 또는 Smith-Waterman 알고리즘 (예를 들어, www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_water/nucleotide.html에서 이용가능한 EMBoss Water 정렬기 참조, 선택적으로 디폴트 설정 사용)을 포함하는, 임의의 적합한 정렬 알고리즘에 의해 측정될 수 있다. 최적 정렬은, 디폴트 파라미터를 포함하는, 선택된 알고리즘의 임의의 적절한 파라미터를 사용하여 평가될 수 있다.

[0027] 일반적으로, 하이브리드화에 대한 "엄격한 조건"은 표적 서열에 상보성을 가진 핵산이 표적 서열과 주로 하이브리드화하고 비-표적 서열에 실질적으로 하이브리드화되지 않는 조건을 지칭한다. 엄격한 조건은 일반적으로 서열-의존적이고 다수의 요인에 따라 변한다. 일반적으로, 서열이 길수록, 서열이 그의 표적 서열에 특이적으로 하이브리드화하는 온도가 더 높아진다. 엄격한 조건의 비-제한적인 예는 Tijssen (1993), *Laboratory Techniques In Biochemistry And Molecular Biology-Hybridization With Nucleic Acid Probes Part I, Second Chapter "Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid probe assay"*, Elsevier, N.Y.에 자세히 기재된다.

[0028] 일반적으로, "서열 동일성"은 각각 2 개의 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드 서열의 정확한 뉴클레오티드 대 뉴클레오티드 또는 아미노산 대 아미노산 대응을 지칭한다. 전형적으로, 서열 동일성을 결정하는 기술은 폴리뉴클레오티드의 뉴클레오티드 서열의 결정 및/또는 이에 의해 인코딩된 아미노산 서열의 결정, 그리고 제 2 뉴클레오티드 또는 아미노산 서열과 이들 서열의 비교를 포함한다. 2 개 이상의 서열 (폴리뉴클레오티드 또는 아미노산)은 "퍼센트 동일성"을 결정함으로써 비교될 수 있다. 핵산 또는 아미노산 서열에 관계없이, 2 개의 서열의 퍼센트 동일성은 2 개의 정렬된 서열 사이의 정확한 일치 횟수를 더 짧은 서열의 길이로 나눈 후 100을 곱한 것으로 계산될 수 있다. 일부 경우에, 핵산 또는 아미노산 서열에 관계없이, 시험 서열 및 기준 서열의 퍼센트 동일성은 2 개의 정렬된 서열 사이의 정확한 일치의 수를 기준 서열의 길이로 나눈 후 100을 곱한 것으로 계산될 수 있다. 예를 들어, 퍼센트 동일성은 또한, 예를 들어, 미국 국립 보건원으로부터 입수가 가능한, 버전 2.2.9를 포함하는, 고급 BLAST 컴퓨터 프로그램을 사용하여 서열 정보를 비교함으로써 결정될 수 있다. BLAST 프로그램은 Karlin and Altschul, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:2264-2268 (1990)의 정렬 방법을 기반으로 하고 Altschul, 등, *J. Mol. Biol.* 215:403-410 (1990); Karlin And Altschul, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:5873-5877 (1993); 및 Altschul 등, *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402 (1997)에서 논의된 바와 같다. 간단히 말해서, BLAST 프로그램은 동일하게 정렬된 기호 (일반적으로 뉴클레오티드 또는 아미노산)의 수를 두 서열 중 더 짧은 것에서 기호의 총 수로 나눈 것으로서 동일성을 정의한다. 이 프로그램은 비교되는 단백질의 전체 길이에 대한 퍼센트 동일성을 결정하는데 사용될 수 있다. 디폴트 파라미터는, 예를 들어, blastp 프로그램에서 짧은 쿼리 서열로 검색을 최적화하기 위해 제공된다. 이 프로그램은 또한 Wootton and Federhen, *Computers and Chemistry* 17 : 149-163 (1993)의 SEG 프로그램에 의해 결정된 바와 같이 SEG 필터를 사용하여 쿼리 서열의 세그먼트를 마스킹 제거한다. 원하는 정도의 서열 동일성의 범위는 대략 80 % 내지 100 %이고 그 사이의 정수 값이다. 전형적으로, 개시된 서열과 청구된 서열 사이의 퍼센트 동일성은 적어도 80 %, 적어도 85 %, 적어도 90 %, 적어도 95 %, 적어도 98 % 또는 적어도 99 %이다.

[0029] 본원에 사용된 바와 같이, "발현"은 폴리뉴클레오티드가 DNA 템플레이트로부터 (예컨대 및 mRNA 또는 다른 RNA 전사체로) 전사되는 공정 및/또는 전사된 mRNA가 이어서 펩티드, 폴리펩티드, 또는 단백질로 번역되는 공정을 지칭한다. 전사체 및 인코딩된 폴리펩티드는 통칭하여 "유전자 산물"로서 지칭될 수 있다. 폴리뉴클레오티드가

게놈 DNA로부터 유래된 경우, 발현은 진핵 세포에서 mRNA의 스플라이싱을 포함할 수 있다.

- [0030] 용어 "폴리펩티드", "펩티드" 및 "단백질"은 임의의 길이의 아미노산의 중합체를 지칭하기 위해 본원에서 호환적으로 사용된다. 중합체는 선형 또는 분지형일 수 있고, 변형된 아미노산을 포함할 수 있고, 비-아미노산에 의해 중단될 수 있다. 상기 용어는 또한 변형된 아미노산 중합체를 포괄하고; 예를 들어, 이황화 결합 형성, 글리코실화, 지질화, 아세틸화, 인산화, 또는 표지 성분과의 컨주게이션과 같은, 임의의 다른 조작. 본원에 사용된 바와 같이 용어 "아미노산"은, 글리신 및 D 또는 L 광학 이성질체 둘 모두, 그리고 아미노산 유사체 및 펩티도미메틱을 포함하는, 천연 및/또는 비천연 또는 합성 아미노산을 포함한다.
- [0031] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "약"은 용어 "대략"과 동의어로 사용된다. 예시적으로, 양과 관련하여 용어 "약"의 사용은 인용된 값의 약간 밖에 있는 값, 예를 들어 0.1 % 내지 10 %의 플러스 또는 마이너스를 나타낸다.
- [0032] 용어 "생물학적으로 순수한 배양물" 또는 "실질적으로 순수한 배양물"은 배양물의 복제를 방해하거나 정상적인 세균학 기술에 의해 검출될 정도로 충분한 양의 다른 박테리아 종을 함유하지 않는 본원에 기재된 박테리아 종의 배양물을 지칭한다.
- [0033] "식물 생산성"은 일반적으로 식물이 성장하는 이유인 식물의 성장 또는 발달의 모든 측면을 지칭한다. 곡식 또는 야채와 같은 식량 작물의 경우, "식물 생산성"은 특정 작물에서 수확된 곡식 또는 열매의 수확량을 의미할 수 있다. 본원에 사용된 바와 같이, 개선된 식물 생산성은 다양한 목적으로 수확된 곡식, 열매, 꽃, 또는 다른 식물 부분의 수율 개선, 줄기, 잎 및 뿌리를 포함한, 식물 부분의 성장 개선, 식물 성장의 촉진, 잎의 높은 엽록소 함량의 유지, 열매 또는 종자 수의 증가, 열매 또는 종자 단위 중량의 증가, 감소된 질소 비료 사용으로 인한 NO₂ 배출 감소 그리고 식물의 성장 및 발달의 유사한 개선을 지칭한다.
- [0034] 식량 작물에서 및 주변에서 미생물은 그 작물의 특성에 영향을 줄 수 있다. 미생물에 의해 영향을 받을 수 있는 식물 특성은 하기를 포함한다: 수율 (예를 들어, 곡식 생산, 바이오매스 생성, 열매 발육, 착화); 영양 (예를 들어, 질소, 인, 칼륨, 철, 미량 영양소 획득); 비생물적 스트레스 관리 (예를 들어, 내건성, 내염성, 내열성); 및 생물적 스트레스 관리 (예를 들어, 해충, 잡초, 곤충, 진균 및 박테리아). 작물 특성을 변경하기 위한 전략은 하기를 포함한다: 주요 대사산물 농도 증가; 주요 대사산물에 대한 미생물 영향의 시간적 역학 변화; 미생물 대사산물 생산/분해의 새로운 환경 신호에의 연결; 음성 대사산물 감소; 및 대사산물 또는 기초 단백질의 균형 개선.
- [0035] 본원에 사용된 바와 같이, "제어 서열"은 조작자, 프로모터, 사일런서 또는 터미네이터를 지칭한다.
- [0036] 일부 구현예에서, 본 개시내용의 유전자의 천연 또는 내인성 제어 서열은 하나 이상의 유전자내 제어 서열로 대체된다.
- [0037] 본원에 사용된 바와 같이, "도입된"은 자연 발생 도입이 아닌 현대 생명 공학에 의한 도입을 지칭한다.
- [0038] 일부 구현예에서, 본 개시내용의 박테리아는 이들이 자연 발생 박테리아가 아니도록 변형되었다.
- [0039] 일부 구현예에서, 본 개시내용의 박테리아는 식물의 생 중량 또는 건조 중량의 그램 당 적어도 10^3 cfu, 10^4 cfu, 10^5 cfu, 10^6 cfu, 10^7 cfu, 10^8 cfu, 10^9 cfu, 10^{10} cfu, 10^{11} cfu, 또는 10^{12} cfu의 양으로 식물에 존재한다. 일부 구현예에서, 본 개시내용의 박테리아는 식물의 생 중량 또는 건조 중량의 그램 당 적어도 약 10^3 cfu, 약 10^4 cfu, 약 10^5 cfu, 약 10^6 cfu, 약 10^7 cfu, 약 10^8 cfu, 약 10^9 cfu, 약 10^{10} cfu, 약 10^{11} cfu, 또는 약 10^{12} cfu의 양으로 식물에 존재한다. 일부 구현예에서, 본 개시내용의 박테리아는 식물의 생 중량 또는 건조 중량의 그램 당 적어도 10^3 내지 10^9 , 10^3 내지 10^7 , 10^3 내지 10^5 , 10^5 내지 10^9 , 10^5 내지 10^7 , 10^6 내지 10^{10} , 10^6 내지 10^7 cfu의 양으로 식물에 존재한다.
- [0040] 본 개시내용의 비료 및 외인성 질소는 하기 질소-함유 분자를 포함할 수 있다: 암모늄, 질산염, 아질산염, 암모니아, 글루타민 등. 본 개시내용의 질소원은 무수 암모니아, 암모니아 설페이트, 우레아, 디암모늄 포스페이트, 우레아-포름, 모노암모늄 포스페이트, 질산 암모늄, 질소 용액, 질산 칼슘, 질산 칼륨, 질산 나트륨 등을 포함할 수 있다.
- [0041] 본원에 사용된 바와 같이, "외인성 질소"는, 암모니아, 암모늄, 질산염, 아질산염, 우레아, 요산, 암모늄 산 등

을 포함하여, 비-질소 제한 조건 하에 존재하는 토양, 들판, 또는 성장 배지에서 쉽게 이용가능한 비-대기 질소를 지칭한다.

- [0042] 본원에 사용된 바와 같이, "비-질소 제한 조건"은, 본원에 참고로 포함되는, Kant 등. (2010. J. Exp. Biol. 62 (4) : 1499-1509)에 의해 개시된 바와 같이, 약 4 mM 질소 초과 농도로 토양, 들판, 배지에서 이용가능한 비-대기 질소를 지칭한다.
- [0043] 본원에 사용된 바와 같이, "도입된 유전자 물질"은 수용자의 게놈에 첨가되고 그 성분으로서 남아있는 유전자 물질을 의미한다.
- [0044] 일부 구현예에서, 질소 고정 및 동화 유전자 조절 네트워크는 미생물 질소 고정 및/또는 동화를 지시, 조절 및/또는 규제하는 유전자 및 비-코딩 서열을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하고 *nif* 클러스터 (예를 들어, *nifA*, *nifB*, *nifC*, …… *nifZ*)의 폴리뉴클레오티드 서열, 질소 조절 단백질 C를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드, 질소 조절 단백질 B를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드, *gln* 클러스터 (예를 들어 *glnA* 및 *glnD*)의 폴리뉴클레오티드 서열, *draT*, 및 암모니아 수송체/투과효소를 포함할 수 있다. 일부 경우에, Nif 클러스터는 NifB, NifH, NifD, NifK, NifE, NifN, NifX, 헤사(hesa), 및 NifV를 포함할 수 있다. 일부 경우에, Nif 클러스터는 NifB, NifH, NifD, NifK, NifE, NifN, NifX, 헤사, 및 NifV의 서브세트를 포함할 수 있다.
- [0045] 일부 구현예에서, 본 개시내용의 비료는 적어도 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 11 %, 12 %, 13 %, 14 %, 15 %, 16 %, 17 %, 18 %, 19 %, 20 %, 21 %, 22 %, 23 %, 24 %, 25 %, 26 %, 27 %, 28 %, 29 %, 30 %, 31 %, 32 %, 33 %, 34 %, 35 %, 36 %, 37 %, 38 %, 39 %, 40 %, 41 %, 42 %, 43 %, 44 %, 45 %, 46 %, 47 %, 48 %, 49 %, 50 %, 51 %, 52 %, 53 %, 54 %, 55 %, 56 %, 57 %, 58 %, 59 %, 60 %, 61 %, 62 %, 63 %, 64 %, 65 %, 66 %, 67 %, 68 %, 69 %, 70 %, 71 %, 72 %, 73 %, 74 %, 75 %, 76 %, 77 %, 78 %, 79 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 중량 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % 질소를 중량 기준으로 포함한다.
- [0046] 일부 구현예에서, 본 개시내용의 비료는 적어도 약 5 %, 약 6 %, 약 7 %, 약 8 %, 약 9 %, 약 10 %, 약 11 %, 약 12 %, 약 13 %, 약 14 %, 약 15 %, 약 16 %, 약 17 %, 약 18 %, 약 19 %, 약 20 %, 약 21 %, 약 22 %, 약 23 %, 약 24 %, 약 25 %, 약 26 %, 약 27 %, 약 28 %, 약 29 %, 약 30 %, 약 31 %, 약 32 %, 약 33 %, 약 34 %, 약 35 %, 약 36 %, 약 37 %, 약 38 %, 약 39 %, 약 40 %, 약 41 %, 약 42 %, 약 43 %, 약 44 %, 약 45 %, 약 46 %, 약 47 %, 약 48 %, 약 49 %, 약 50 %, 약 51 %, 약 52 %, 약 53 %, 약 54 %, 약 55 %, 약 56 %, 약 57 %, 약 58 %, 약 59 %, 약 60 %, 약 61 %, 약 62 %, 약 63 %, 약 64 %, 약 65 %, 약 66 %, 약 67 %, 약 68 %, 약 69 %, 약 70 %, 약 71 %, 약 72 %, 약 73 %, 약 74 %, 약 75 %, 약 76 %, 약 77 %, 약 78 %, 약 79 %, 약 80 %, 약 81 %, 약 82 %, 약 83 %, 약 84 %, 약 85 %, 약 86 %, 약 87 %, 약 88 %, 약 89 %, 약 90 %, 약 91 %, 약 92 %, 약 93 %, 약 94 %, 약 95 %, 약 96 %, 약 97 %, 약 98 %, 또는 약 99 %의 질소를 중량 기준으로 포함한다.
- [0047] 일부 구현예에서, 본 개시내용의 비료는 약 5 % 내지 50 %, 약 5 % 내지 75 %, 약 10 % 내지 50 %, 약 10 % 내지 75 %, 약 15 % 내지 50 %, 약 15 % 내지 75 %, 약 20 % 내지 50 %, 약 20 % 내지 75 %, 약 25 % 내지 50 %, 약 25 % 내지 75 %, 약 30 % 내지 50 %, 약 30 % 내지 75 %, 약 35 % 내지 50 %, 약 35 % 내지 75 %, 약 40 % 내지 50 %, 약 40 % 내지 75 %, 약 45 % 내지 50 %, 약 45 % 내지 75 %, 또는 약 50 % 내지 75 % 질소를 중량 기준으로 포함한다.
- [0048] 일부 구현예에서, 식물에서 질소 고정의 증가 및/또는 1 % 이상의 질소 생산은 본 개시내용의 박테리아에 노출되지 않은 대조 식물에 대해 측정된다. 박테리아의 모든 증가 또는 감소는 대조 박테리아에 비해 측정된다. 식물의 모든 증가 또는 감소는 대조 식물에 비해 측정된다.
- [0049] 본원에 사용된 바와 같이, "구성적 프로모터"는 대부분의 조건 및/또는 대부분의 개발 단계에서 활성인 프로모터이다. 생명 공학에 사용되는 발현 벡터에서 구성적 프로모터를 사용하는 것에는 다음과 같은 몇 가지 이점이 있다: 형질전환 세포 또는 유기체를 선택하는데 사용된 단백질의 높은 수준의 생산; 쉽게 검출 및 정량화할 수 있는, 리포터 단백질 또는 채점가능한 마커의 높은 수준의 발현; 조절 전사 시스템의 일부인 전사 인자의 높은 수준의 생산; 유기체에서 편재된 활성을 요구하는 화합물의 생산; 그리고 모든 개발 단계동안 요구되는 화합물의 생산. 비-제한적인 예시적인 구성적 프로모터는 CaMV 35S 프로모터, 오픈 프로모터, 유비퀴틴 프로모터, 알코올 탈수소효소 프로모터 등을 포함한다.
- [0050] 본원에 사용된 바와 같이, "비-구성적 프로모터"는 특정 조건 하에서, 특정 유형의 세포에서, 및/또는 특정 발

달 단계 동안 활성인 프로모터이다. 예를 들어, 조직 특이적, 조직 선호된, 세포 유형 특이적, 세포 유형 선호된, 유도성 프로모터, 및 발달 조절 하의 프로모터는 비-구성적 프로모터이다. 발달 조절 하의 프로모터의 예는 특정 조직에서 전사를 우선적으로 개시하는 프로모터를 포함한다.

[0051] 본원에 사용된 바와 같이, "유도성" 또는 "억제성" 프로모터는 화학적 또는 환경적 요인 제어 하에 있는 프로모터이다. 유도성 프로모터에 의해 전사에 영향을 줄 수 있는 환경 조건의 예는 혐기성 조건, 특정 화학물질, 빛의 존재, 산성 또는 염기성 조건 등을 포함한다.

[0052] 본원에 사용된 "조직 특이적" 프로모터는 특정 조직에서만 전사를 개시하는 프로모터이다. 유전자의 구성적 발현과는 달리, 조직-특이적 발현은 몇몇 상호작용 수준의 유전자 조절의 결과이다. 이와 같이, 당 업계에서는 때때로 특정 조직에서 이식유전자의 효율적이고 신뢰할 수 있는 발현을 달성하기 위해 상동성 또는 밀접하게 관련된 종으로부터 프로모터를 사용하는 것이 바람직하다. 이것은 과학 및 특허 문헌 모두에서 발견되는 특정 조직으로부터 단리된 다량의 조직-특이적 프로모터에 대한 주된 이유 중 하나이다.

[0053] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "작동가능하게 연결된"은 하나의 기능이 다른 것에 의해 조절되도록 단일 핵산 단편상의 핵산 서열의 회합을 지칭한다. 예를 들어, 프로모터는 코딩 서열의 발현을 조절할 수 있을 때 (즉, 코딩 서열이 프로모터의 전사 조절하에 있음) 코딩 서열과 작동가능하게 연결된다. 코딩 서열은 센스 또는 안티센스 배향으로 조절 서열에 작동가능하게 연결될 수 있다. 또 다른 예에서, 본 개시내용의 상보적 RNA 영역은, 직접적으로 또는 간접적으로, 5'를 표적 mRNA에, 또는 3'를 표적 mRNA에, 또는 표적 mRNA 내에 작동가능하게 연결시킬 수 있거나, 또는 제 1 상보적 영역은 5'이고 그의 상보체는 표적 mRNA에 대해 3'이다.

[0054] 질소 고정 조절

[0055] 본원에 기재된 방법에 의해 규제에 표적화될 수 있는 한 가지 특성은 질소 고정이다. 질소 비료는 농장에서 가장 큰 운영비이며 옥수수 및 밀 같은 줄뿌림 작물에서 더 높은 수확량을 발생시키는 가장 큰 원동력이다. 비-콩과 작물에서 재생 가능한 형태의 질소를 전달할 수 있는 미생물 제품이 본 명세서에 기재되어 있다. 일부 내생식물은 순수한 배양물에서 질소를 고정시키는데 필요한 유전학을 가지고 있지만, 근본적인 기술적 과제는 곡류와 풀의 야생형 내생식물이 시비된 들판에서 질소 고정을 멈추는 것이다. 들판 토양에 화학 비료 및 잔류 질소 수준을 적용하면 미생물이 질소 고정을 위한 생화학적 경로를 차단하게 된다.

[0056] 비료의 존재 하에서 질소를 옥수수에 고정 및 전달할 수 있는 미생물을 개발하기 위해 전사 및 번역 후 수준의 질소 고정 조절 네트워크의 변화가 요구된다. 이를 위해, 조절 네트워크를 정확하게 진화시키기 위한 그리고 신규한 표현형을 도출하기 위한 숙주-미생물 진화 (Host-Microbe Evolution; HoME) 기술이 본원에 기재된다. 또한, 질소 스트레스 및 과량과 같은 다른 환경 조건 하에서 미생물과 숙주 식물의 상호작용을 둘러싼 광범위한 체계 데이터와 짝을 이룬, 옥수수에서 단리된 질소-고정 내생식물의 독특하고, 독점적인 라이브러리가 본원에 기재된다. 이 기술은 내생식물의 유전자 조절 네트워크의 정밀한 진화를 통해 들판에서 비료의 존재 하에서조차 질소를 적극적으로 고정시키는 미생물을 생산할 수 있다. 또한, 옥수수 뿌리 조직을 콜로니화하고 시비된 식물을 위한 질소를 생산하는 진화 미생물의 기술적 잠재력에 대한 평가 그리고 미생물을 현대 질소 관리 전략에 통합시키는 타당성을 결정하기 위해 표준 제형화 관행 및 다양한 토양과 내생식물의 상용성에 대한 평가가 본원에 기재된다.

[0057] 화학적 합성용 원소 질소 (N)를 이용하기 위해, 생명 형태는 질소 고정으로 공지된 공정에서 수소와 대기에서 이용 가능한 질소 가스 (N₂)를 조합시킨다. 생물학적 질소 고정의 에너지-집약적 특성으로 인해, 디아조트로프 (대기 질소 가스를 고정시키는 박테리아 및 고세균)은 환경 산소 및 이용가능한 질소에 반응하여 *nif* 유전자 클러스터의 정교하고 엄격한 조절을 발전시켰다. *Nif* 유전자는 질소 고정에 관여된 효소 (예컨대 니트로게나제 복합체) 및 질소 고정을 조절하는 단백질을 인코딩한다. 샴셀딘(Shamseldin) (2013, Global J. Biotechnol. Biochem. 8(4):84-94)는 *nif* 유전자 및 이들의 생성물의 상세한 설명을 개시하고, 본원에 참조로 포함된다. 제 1 식물로부터 박테리아를 단리시키는 단계, 단리된 박테리아의 *nif* 유전자에 유전자 변이를 도입하는 단계, 제 2 식물을 변이체 박테리아에 노출시키는 단계, 제 1 식물에 비해 개선된 특성을 가지고 있는 제 2 식물로부터 박테리아를 단리시키는 단계, 그리고 제 2 식물로부터 단리된 박테리아로 상기 단계를 반복하는 단계를 포함하는 개선된 특성을 가진 식물의 생산 방법이 본원에 기재된다.

[0058] 프로테오박테리아에서, 질소 고정의 조절은, *nif* 클러스터의 양성 전사 조절제인, σ_{54} -의존적 인핸서-결합 단백질 NifA를 집중한다. 활성 NifA의 세포내 수준은 두 가지 주요 인자: *nifLA* 오페론의 전사 및 NifL과의 단백질-단백질 상호작용에 의한 NifA 활성의 억제에 의해 제어된다. 이들 공정 둘 모두는 PII 단백질 신호전달 캐스케

이드를 통해 세포내 글루타민 수준에 반응한다. 이 캐스케이드는 GlnD에 의해 매개되는데, 이는 글루타민을 직접 감지하고 각각 결합된 글루타민의 부재 또는 존재에 반응하여 2 개의 PII 조절 단백질 - GlnB 및 GlnK - 의 우리딜틸화 또는 테우리딜틸화를 촉매한다. 질소 과량의 조건 하에서, 변형되지 않은 GlnB는 *nifLA* 프로모터의 불활성화를 신호한다. 그러나, 질소 제한의 조건 하에서, GlnB는 번역후 변형되어, 그의 활성을 억제하고 *nifLA* 오페론의 전사를 초래한다. 이러한 방식으로, *nifLA* 전사는 PII 단백질 신호전달 캐스케이드를 통해 환경 질소에 반응하여 엄격하게 제어된다. NifA 조절의 번역후 수준에서, GlnK는 세포내 유리 GlnK의 전체 수준에 의존하는 물질에서 NifL/NifA 상호작용을 억제시킨다.

[0059] NifA는, 그의 프로모터가 인산화된 NtrC, 또 다른 σ_{54} -의존적 조절제에 의해 활성화되는, *nifLA* 오페론으로부터 전사된다. NtrC의 인산화 상태는, 우리딜틸화된 GlnB가 아닌 테우리딜틸화된 GlnB와 상호작용하는, 히스티딘 키나제 NtrB에 의해 매개된다. 질소 과량의 조건 하에서, 글루타민의 높은 세포내 수준은 GlnB의 테우리딜틸화를 초래하고, 이어서 NtrB와 상호작용하여 그의 인산화 활성을 비활성화시키고 그의 포스파타제 활성을 활성화시켜, NtrC의 탈인산화 및 *nifLA* 프로모터의 비활성화를 초래한다. 그러나, 질소 제한의 조건 하에서, 세포내 글루타민의 낮은 수준은 GlnB의 우리딜틸화를 초래하여, NtrB와의 상호작용을 억제하고 NtrC의 인산화 및 *nifLA* 오페론의 전사를 허용한다. 이러한 방식으로, *nifLA* 발현은 PII 단백질 신호전달 캐스케이드를 통해 환경 질소에 반응하여 엄격하게 제어된다. *nifA*, *ntrB*, *ntrC* 및 *glnB*는 본원에 기재된 방법에서 돌연변이될 수 있는 모든 유전자이다. 이들 공정은 또한 세포내, 또는 세포의 수준의 암모니아, 우레아 또는 질산염에 반응할 수 있다.

[0060] NifA의 활성은 또한 환경 질소에 대한 반응으로 번역 후, 가장 전형적으로는 NifA 활성의 NifL-매개된 억제를 통해 조절된다. 일반적으로, NifL과 NifA의 상호작용은, 비록 GlnK와 NifL/NifA 사이의 상호작용의 특성이 디아조트로프 사이에서 상당히 변하여도, GlnK를 통해 PII 단백질 신호전달 캐스케이드에 의해 영향을 받는다. 클렙 시엘라 뉴모니아에(*pneumoniae*)에서, 두 가지 형태의 GlnK는 NifL/NifA 상호작용을 억제하고, GlnK와 NifL/NifA 사이의 상호작용은 세포내에서 유리 GlnK의 전체 수준에 의해 결정된다. 질소 과량 조건 하에서, 테우리딜틸화된 GlnK는, AmtB에 의한 암모늄 흡수를 차단하는 그리고 막에 대한 GlnK를 격리시키는 역할을 하는, 암모늄 수송체 AmtB와 상호작용하여, NifL에 의한 NifA의 억제를 허용한다. 한편, 아조토박터 비벨란디(*Azotobacter vinelandii*)에서, 테우리딜틸화된 GlnK와의 상호작용은 NifL/NifA 상호작용 및 NifA 억제를 위해 요구되는 반면, GlnK의 우리딜틸화는 NifL과의 상호작용을 억제한다. *nifL* 유전자가 결여된 디아조트로프에서, NifA 활성이 질소 과량 조건 하에서 두 GlnK 및 GlnB의 테우리딜틸화된 형태와의 상호작용에 의해 직접적으로 억제된다는 증거가 있다. 일부 박테리아에서 *Nif* 클러스터는 *glnR*에 의해 조절될 수 있으며, 일부 경우에 이것은 음성 조절을 포함할 수 있다. 메커니즘에 관계없이, NifA의 번역후 억제는 대부분의 공지된 디아조트로프에서 *nif* 클러스터의 중요한 조절제이다. 추가적으로, *nifL*, *amtB*, *glnK* 및 *glnR*는 본원에 기재된 방법에서 돌연변이될 수 있는 유전자이다.

[0061] *nif* 유전자 클러스터의 전사를 조절하는 것 외에도, 많은 디아조트로프는 직접 번역후 변형 그리고 니트로게나제 차단으로 알려진 니트로게나제 효소 자체의 억제를 위한 메커니즘을 발전시켰다. 이것은 질소-과량 조건 하에서 Fe 단백질 (NifH)의 ADP-리보실화에 의해 매개되며, 이는 MoFe 단백질 복합체 (NifDK)와의 상호작용을 방해하고 니트로게나제 활성을 제거한다. DraT는 Fe 단백질의 ADP-리보실화 및 니트로게나제의 차단을 촉매하는 반면, DraG는 ADP-리보스의 제거 및 니트로게나제의 재활성화를 촉매한다. *nifLA* 전사 및 NifA 억제에서와 같이, 니트로게나제 차단은 또한 PII 단백질 신호전달 캐스케이드를 통해 조절된다. 질소-과량 조건 하에서, 테우리딜틸화된 GlnB는 DraT와 상호작용하고 이를 활성화하는 반면, 테우리딜틸화된 GlnK는 DraG 및 AmtB 둘 모두와 상호작용하여, DraG를 막에 대해 격리시키는, 복합체를 형성한다. 질소-제한 조건 하에서, 우리딜틸화된 형태의 GlnB 및 GlnK는 각각 DraT 및 DraG와 상호작용하지 않아, DraT의 불활성화 및 DraG의 Fe 단백질로의 확산을 초래하고, 여기에서 ADP-리보스를 제거하고 니트로게나제를 활성화시킨다. 본원에 기재된 방법은 또한 *nifH*, *nifD*, *nifK* 및 *draT* 유전자 내로 유전자 변이를 도입하는 것을 고려한다.

[0062] 일부 내생식물이 체외로 질소를 고정시키는 능력을 가지고 있어도, 종종 유전학은 외인성 화학 비료의 높은 수준에 의해 들판에서 침묵화된다. 들판-기반 질소 고정을 용이하게 하기 위해 니트로게나제 효소의 발현으로부터 외인성 질소의 감지를 디커플링할 수 있다. 시간이 지남에 따라 니트로게나제 활성의 통합을 개선하는 것은 작물에 의한 질소 생산을 증대시키는 역할을 한다. 본원에 기재된 방법을 사용하여 들판-기반 질소 고정을 용이하게 하는 유전자 변이에 대한 특정 표적은 *nifA*, *nifL*, *ntrB*, *ntrC*, *glnA*, *glnB*, *glnK*, *draT*, *amtB*, *glnD*, *glnE*, *nifJ*, *nifH*, *nifD*, *nifK*, *nifY*, *nifE*, *nifN*, *nifU*, *nifS*, *nifV*, *nifW*, *nifZ*, *nifM*, *nifF*, *nifB* 및 *nifQ*로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자를 포함한다.

- [0063] 본원에 기재된 방법을 사용하여 들판-기반 질소 고정을 용이하게 하는 유전자 변이에 대한 추가의 표적은 NifA 단백질이다. NifA 단백질은 전형적으로 질소 고정 유전자의 발현을 활성화제이다. (구성적으로 또는 높은 암모니아 조건 동안) NifA의 생산 증가는 천연 암모니아-감지 경로를 우회한다. 또한, NifA의 공지된 억제제인, NifL 단백질의 생산 감소는 또한 자유 활성 NifA의 수준을 증가시킨다. 또한, (구성적으로 또는 높은 암모니아 조건 동안) nifAL 오페론의 전사 수준 증가는 또한 전체적으로 높은 수준의 NifA 단백질을 초래한다. 상승된 수준의 nifAL 발현은 프로모터 자체를 변경하거나 NtrB (높은 질소 조건 동안 nifAL 오페론의 차단을 원래 초래할 ntrB 및 ntrC 신호전달 캐스케이드의 일부)의 발현을 감소시킴으로써 달성된다. 본원에 기재된 이들 또는 임의의 다른 방법에 의해 달성된 높은 수준의 NifA는 내생식물의 질소 고정 활성을 증가시킨다.
- [0064] 본원에 기재된 방법을 사용하여 들판-기반 질소 고정을 용이하게 하는 유전자 변이에 대한 또 다른 표적은 GlnD/GlnB/GlnK PII 신호전달 캐스케이드이다. 세포내 글루타민 수준은 GlnD/GlnB/GlnK PII 신호전달 캐스케이드를 통해 감지된다. GlnD의 우리딜릴-제거 활성을 폐지하는 GlnD의 활성 부위 돌연변이는 질소-감지 캐스케이드를 파괴한다. 또한, GlnB 농도의 감소는 글루타민-감지 캐스케이드를 단락시킨다. 이들 돌연변이는 세포를 질소 제한 상태를 인지하도록 "기만"함으로써, 질소 고정 수준 활성을 증가시킨다. 이들 공정은 또한 세포내 또는 세포외 수준의 암모니아, 우레아 또는 질산염에 반응할 수 있다.
- [0065] amtB 단백질은 또한 본원에 기재된 방법을 사용하여 들판-기반 질소 고정을 용이하게 하는 유전자 변이 표적이다. 환경으로부터 암모니아 흡수는 amtB 단백질의 발현 수준을 감소시킴으로써 감소될 수 있다. 세포내 암모니아가 없으면, 내생식물은 높은 수준의 암모니아를 감지할 수 없어, 질소 고정 유전자의 하향-조절을 방지한다. 세포내 구획으로 들어가는 암모니아는 글루타민으로 전환된다. 세포내 글루타민 수준은 질소 감지의 주요 통용이다. 세포내 글루타민 수준 감소는 세포가 환경에서 높은 암모늄 수준을 감지하는 것을 방지한다. 이 효과는 글루타민을 글루타메이트로 전환시키는 효소인 글루타미나제의 발현 수준을 증가시킴으로써 달성될 수 있다. 또한, 세포내 글루타민은 글루타민 신타제 (암모니아를 글루타민으로 전환시키는 효소)를 감소시킴으로써 감소될 수 있다. 디아조트로프에서, 고정된 암모니아는 글루타민 및 글루타메이트로 빠르게 동화되어 세포 공정에 사용된다. 암모니아 동화에 대한 중단은 고정된 질소의 전환을 세포에서 암모니아로서 내보내는 것을 가능하게 할 수 있다. 고정된 암모니아는 글루타민 합성효소 (GS)에 의해 글루타민으로 주로 동화되고, glnA에 의해 인코딩되고, 이어서 글루타민 옥소글루타레이트 아미노트랜스퍼라제 (GOGAT)에 의해 글루타민으로 인코딩된다. 일부 예에서, *glnS*는 글루타민 합성효소를 인코딩한다. GS는, 이의 아데닐릴-트랜스퍼라제 (AT) 및 아데닐릴-제거 (AR) 도메인, 각각의 활성을 통해 GS의 아데닐화 및 탈아데닐화 둘 모두를 촉매하는 glnE에 의해 인코딩된 2 작용성 효소인, GS 아데닐릴 트랜스퍼라제 (GlnE)에 의해 번역후 조절된다. 질소 제한 조건 하에서, glnA는 발현되고, GlnE의 AR 도메인은 GS를 탈-아데닐릴화시켜 활성화시킬 수 있다. 질소 과량의 조건 하에서, glnA 발현은 작동되지 않고, GlnE의 AT 도메인은 글루타민에 의해 동종이계적으로 활성화되어, GS의 아데닐릴화 및 불활성화를 야기한다.
- [0066] 게다가, *draT* 유전자는 또한 본원에 기재된 방법을 사용하여 들판-기반 질소 고정을 용이하게 하기 위해 유전자 변이 표적이 될 수 있다. 일단 질소 고정 효소가 세포에 의해 생산되면, 니트로게나제 차단은 세포가 높은 질소 조건에서 고정 활성을 하향조절하는 또 다른 수준을 나타낸다. 이 차단은 DraT의 발현 수준을 감소시킴으로써 제거될 수 있다.
- [0067] 새로운 미생물 표현형을 부여하는 방법은 전사, 번역 및 번역후 수준에서 수행될 수 있다. 전사 수준은 프로모터에서의 변화 (예를 들어, 프로모터의 전부 또는 일부의 결실을 포함하는, 시그마 인자 친화도 또는 전사 인자에 대한 결합 부위의 변화) 또는 전사 종결자 및 감쇠기의 변화를 포함한다. 번역 수준은 리보솜 결합 부위에서의 변화 및 mRNA 분해 신호 변화를 포함한다. 번역후 수준은 효소의 활성 부위 돌연변이 그리고 단백질-단백질 상호작용 변화를 포함한다. 이들 변화는 다양한 방법으로 달성될 수 있다. 발현 수준 (또는 완전한 폐지)의 감소는 천연 리보솜 결합 부위 (RBS) 또는 프로모터를 더 낮은 강도/효율을 가진 또 다른 것으로 교환함으로써 달성될 수 있다. ATG 시작 부위는 GTG, TTG 또는 CTG 시작 코돈으로 교환될 수 있으며, 이는 코딩 영역의 번역 활성을 감소시킨다. 발현의 완전한 폐지는 유전자의 코딩 영역을 녹아웃 (결실)시킴으로써 실시될 수 있다. 개방형 해독틀 (ORF)의 프레임시프팅은 아마 ORF를 따라 조기 중지 코돈을 초래하여, 이에 의해 비-기능성 절단 산물을 창출할 것이다. 인프레임 중지 코돈의 삽입은 비-기능성 절단 산물도 비슷하게 창출할 것이다. N 또는 C 말단에 분해 태그의 부가는 특정 유전자의 유효 농도를 감소시키도록 실시될 수도 있다.
- [0068] 반대로, 본원에 기재된 유전자의 발현 수준은 더 강한 프로모터를 사용함으로써 달성될 수 있다. 높은 질소 수준 조건 (또는 임의의 다른 조건) 동안 높은 프로모터 활성을 보장하기 위해, 높은 질소 수준 조건에서 전체 게놈의 전사 프로파일은 수득될 수 있고 원하는 전사 수준의 활성 프로모터는 해당 데이터 세트에서 선택되어 약

한 프로모터를 대체할 수 있다. 약한 시작 코돈은 ATG 시작 코돈으로 교환되어 번역 개시 효율을 높일 수 있다. 약한 리보솜 결합 부위 (RBS)는 또한 높은 번역 개시 효율을 가진 상이한 RBS와 교환될 수 있다. 또한, 부위 특이적 돌연변이유발은 또한 효소의 활성을 변경시키기 위해 수행될 수 있다.

[0069] 본원에 기재된 바와 같은 유전자의 발현을 구동하는데 사용될 수 있는 프로모터의 예는 **표 8**의 프로모터를 포함한다. 이들 서열에 대한 추가 자세한 내용은 **표 9**에 제공된다. **표 9**는 각각의 서열이 유래된 종, 뿐만 아니라 천연 유전자, 및 몇몇 서열의 천연 유전자 기능을 열거한다. 또한 서열 중 일부는 프로모터로서 어느 한쪽 시/협 관내 전사 검정, 식물체내 전사 검정 또는 둘 모두로 확인되어 왔다, 실시예 8 참조

[0070] 식물에서 발생하는 질소 고정의 수준 증가는 작물 생산에 필요한 화학 비료의 양에서 감소를 초래할 수 있고 온실 가스 배출량 (예를 들어, 아산화 질소)를 감소시킬 수 있다.

[0071] **박테리아 모집단의 생성**

[0072] **박테리아의 단리**

[0073] 본원에 개시된 방법 및 조성물에 유용한 미생물은 천연 식물의 표면 또는 조직으로부터 미생물을 추출함으로써 획득될 수 있다. 미생물은 종자를 분쇄하여 미생물을 단리시킴으로써 획득될 수 있다. 미생물은 다양한 토양 샘플에 종자를 식재하고 조직에서 미생물을 회수함으로써 획득될 수 있다. 추가적으로, 미생물은 식물에 외인성 미생물을 접종하고 식물 조직에 어떤 미생물이 나타나는지를 결정함으로써 획득될 수 있다. 식물 조직의 비-제한적인 예는 종자, 묘목, 잎, 절단물, 식물, 구근 또는 괴경을 포함할 수 있다.

[0074] 미생물을 얻는 방법은 토양에서 박테리아를 단리하는 것이다. 박테리아는 다양한 토양 유형에서 수집될 수 있다. 일부 예에서, 토양은 높거나 낮은 지력, 수분 수준, 미네랄 수준 및 다양한 작물화 관행과 같은 특성을 특징으로 할 수 있다. 예를 들어, 토양은 연속 재배 기간에서 동일한 토양에 서로 다른 작물이 식재되는 작물 회전에 관여될 수 있다. 동일한 토양에서 상이한 작물의 순차적 성장은 특정 미네랄의 불균형 고갈을 방지할 수 있다. 박테리아는 선택된 토양에서 성장하는 식물로부터 단리될 수 있다. 묘목 식물은 2-6 주 성장할 수 있다. 예를 들어, 적어도 400 개의 단리물은 한 라운드의 수확으로 수집될 수 있다. 토양 및 식물 유형은, 특정 표현형의 하류 농축을 허용하는, 조건 뿐만 아니라 식물 표현형을 나타낸다.

[0075] 미생물은 미생물 특성을 평가하기 위해 식물 조직으로부터 단리될 수 있다. 조직 샘플을 처리하기 위한 파라미터는 상이한 유형의 회합성 미생물, 예컨대 근권 박테리아, 착생식물 또는 내생식물을 단리하기 위해 다양화될 수 있다. 단리물은 무 질소 배지에서 배양되어 질소 고정을 수행하는 박테리아를 풍부하게 할 수 있다. 대안적으로, 미생물은 세계 균주 은행에서 획득될 수 있다.

[0076] 식물체내 분석에서 미생물 특성을 평가하기 위해 수행된다. 일부 구현예에서, 식물 조직은 DNA 및 RNA에 대한 고 처리량 처리에 의해 스크리닝용으로 처리될 수 있다. 추가적으로, 비-침습적 측정은 콜로니화와 같은 식물 특성을 평가하는데 사용될 수 있다. 야생 미생물에 대한 측정은 식물별로 획득될 수 있다. 야생 미생물에 대한 측정은 또한 중간 처리량 방법을 사용하여 들판에서 획득될 수 있다. 측정은 시간이 지남에 따라 연속적으로 실시될 수 있다. 비제한적으로, 세타리아를 포함한 모델 식물 시스템은 사용될 수 있다.

[0077] 식물 시스템에서 미생물은 식물 시스템에서 미생물의 전사 프로파일링을 통해 스크리닝될 수 있다. 전사 프로파일링을 통한 스크리닝의 예는 정량적 폴리머라제 연쇄 반응 (qPCR), 전사체 검출을 위한 분자 바코드, 차세대 서열분석 및 형광 마커를 이용한 미생물 태깅의 방법을 사용하는 것이다. 영향 인자는, 비제한적으로, 마이크로바이옴, 비생물적 인자, 토양 조건, 산소, 수분, 온도, 접종원 조건, 및 뿌리 국소화를 포함하는 온실에서 콜로니화를 평가하기 위해 측정될 수 있다. 질소 고정은 본원에 기재된 바와 같이 IRMS 또는 NanoSIMS로 ^{15}N 가스/비료 (희석)을 측정함으로써 박테리아에서 평가될 수 있다 NanoSIMS는 고해상도 2 차 이온 질량 분석 기술이다. NanoSIMS 기술은 생물학적 샘플의 화학적 활성을 조사하는 방식이다. 미생물의 대사를 구동하는 산화 반응의 환원 촉매작용은 세포, 세포이하, 분자 및 원소 수준에서 조사될 수 있다. NanoSIMS는 $0.1\ \mu\text{m}$ 초과와 높은 공간 분해능을 제공할 수 있다. NanoSIMS는 ^{13}C , ^{15}N , 및 ^{18}O 와 같은 동위원소 추적프로그램의 사용을 검출할 수 있다. 따라서 NanoSIMS는 세포에서 질소 고정의 활성을 측정하는데 사용될 수 있다.

[0078] 자동화된 온실은 식물성 분석에 사용될 수 있다. 미생물 노출에 반응하는 식물 메트릭스는, 비제한적으로, 바이오매스, 엽록체 분석, CCD 카메라, 체적 단층 촬영 측정을 포함한다.

[0079] 미생물 모집단을 풍부하게 하는 한 가지 방식은 유전자형에 따른 것이다. 예를 들어, 표적화된 프라이머 또는 특정 프라이머를 사용한 폴리머라제 연쇄 반응 (PCR) 검정. 디아조트로프가 질소 고정의 공정에서 nifH 유전자

를 발현시키기 때문에 nifH 유전자 용으로 설계된 프라이머는 디아조트로프를 식별하는데 사용될 수 있다. 미생물 모집단은 또한 단일-세포 배양-독립적 접근법 및 화학 주성-유도된 단리 접근법을 통해 농축될 수 있다. 대안적으로, 미생물의 표적화된 단리는 선택 배지상에서 미생물을 배양함으로써 수행될 수 있다. 원하는 특성에 대한 미생물 모집단을 풍부하게 하기 위한 미리 계획된 접근법은 생물 정보학 데이터에 의해 안내 될 수 있고 본원에 기재되어 있다.

[0080] 생물 정보학을 이용한 질소 고정 능력을 가진 미생물의 농축

[0081] 생물정보학 도구는, 식물 성장 촉진 리조박테리아(rhizobacteria) (PGPRs)를 식별하고 분리하는데 사용될 수 있으며, 이들은 질소 고정을 수행하는 능력에 기초하여 선택된다. 질소 고정 능력이 높은 미생물은 식물에서 선호하는 특성을 촉진할 수 있다. PGPR의 식별을 위한 생체정보학 모드는, 비제한적으로, 유전체학, 균유전체학, 표적된 단리, 유전자 서열분석, 전사체 서열분석 및 모델링을 포함한다.

[0082] 유전체학 분석은 본원에 기재된 바와 같이 차세대 서열분석의 방법 및 미생물 버전 제어로 PGPR을 식별하고 돌연변이의 존재를 확인하는데 사용될 수 있다.

[0083] 균유전체학은 콜로니화용 예측 알고리즘을 사용하여 PGPR를 식별하고 단리하는데 사용될 수 있다. 메타데이터는 환경 및 온실 샘플에서 조작된 균주의 존재를 식별하는데 사용될 수도 있다.

[0084] 전사체 서열분석은 PGPR 표현형을 유도하는 유전자형을 예측하는데 사용될 수 있다. 추가적으로, 전사체 데이터는 유전자 발현을 변경시키기 위한 프로모터를 식별하는데 사용된다. 전사체 데이터는 전체 게놈 서열 (WGS)과 조합으로 분석되어 대사 및 유전자 조절 네트워크의 모델을 생성할 수 있다.

[0085] 미생물의 재배화

[0086] 자연으로부터 분리된 미생물은 미생물이 유전적으로 추적가능하고 식별가능한 형태로 전환되는 재배화 공정을 겪을 수 있다. 미생물을 재배화하는 한 가지 방식은 항생제 내성으로 이를 조작하는 것이다. 항생제 내성을 조작하는 공정은 야생형 미생물 균주에서 항생제 감도를 결정함으로써 시작할 수 있다. 박테리아가 항생제에 민감하다면, 항생제는 항생제 내성 조작의 양호한 후보가 될 수 있다. 이어서, 항생제 내성 유전자 또는 역선택가능한 자살 벡터는 재조합 방법을 사용하여 미생물의 게놈에 편입될 수 있다. 역선택가능한 자살 벡터는 관심있는 유전자, 선택가능한 마커, 및 역선택가능한 마커 *sacB*의 결실로 이루어질 수 있다. 역선택은 천연 미생물 DNA 서열을 항생제 내성 유전자와 교환하는데 사용될 수 있다. 중간 처리량 방법은 병렬 재배화가 가능한 여러 미생물을 동시에 평가하는데 사용될 수 있다. 대안적인 재배화 방법은 자살 벡터 서열이 루핑되거나 개재 벡터 서열을 얻는 것을 방지하기 위해 귀환 뉴클레아제의 사용을 포함한다.

[0087] DNA 벡터는 전기천공 및 화학적 형질전환을 포함하는 여러 방법을 통해 박테리아에 도입될 수 있다. 표준 벡터 라이브러리는 형질전환에 사용될 수 있다. 유전자 편집 방법의 예는 미생물에서 Cas9의 활성을 보장하기 위해 Cas9 테스트가 선행된 CRISPR이다.

[0088] 미생물의 비-형질전환 조작

[0089] 선호하는 특성을 가진 미생물 모집단은 직접 진화를 통해 수득될 수 있다. 직접 진화는 자연 선택의 공정이 사용자 정의 목표를 향해 단백질 또는 핵산을 진화시키기 위해 모방되는 접근법이다. 직접 진화의 예는 랜덤 돌연변이가 미생물 모집단에 도입되고, 가장 선호하는 특성을 가진 미생물이 선택되고, 선택된 미생물의 성장이 계속되는 경우이다. 성장 촉진 리조박테리아 (PGPRs)에서 가장 선호하는 특성은 질소 고정에 있을 수 있다. 직접된 진화 방법은 각 반복 후의 선택 프로세스에 기초하여 반복적 및 적응적일 수 있다.

[0090] 질소 고정 능력이 높은 식물 성장 촉진 리조박테리아 (PGPR)은 생성될 수 있다. PGPR의 진화는 유전자 변이의 도입을 통해 수행될 수 있다. 유전자 변이는 폴리머라제 연쇄 반응 돌연변이유발, 올리고뉴클레오티드-지정 돌연변이유발, 포화 돌연변이유발, 단편 서플링 돌연변이유발, 상동성 재조합, CRISPR/Cas9 시스템, 화학적 돌연변이유발, 및 이들의 조합을 통해 도입될 수 있다. 이들 접근법은 미생물 모집단에 랜덤 돌연변이를 도입할 수 있다. 예를 들어, 돌연변이체는 올리고뉴클레오티드-지정 돌연변이유발을 통한 합성 DNA 또는 RNA를 사용하여 생성될 수 있다. 돌연변이체는, 나중에 경화되는, 플라스미드상에 함유된 도구를 사용하여 생성될 수 있다.

[0091] 일부 경우에, 돌연변이체, 즉 숙주 세포에 내인성인 이중성 서열은 숙주 세포에 외인성인 임의의 서열을 도입하지 않고 도입될 수 있다. 일부 경우에, 숙주 세포와 동일한 종의 세포로부터의 이중성 서열은 숙주 세포의 종에 외인성인 임의의 서열을 도입하지 않고 도입될 수 있다. 이와 같은 세포를 작제하는데 사용된 임의의 플라스미드는 그 다음 세포에 외인성인 유전자 물질에 함유하는 유전자 조작 세포를 생성하도록 경화될 수 있다. 일부

경우에, 숙주 세포와 동일한 속의 세포로부터의 이중성 서열은 숙주 세포의 속에 외인성인 임의의 서열을 도입하지 않고 도입될 수 있다. 이와 같은 세포를 작제하는데 사용된 임의의 플라스미드는 그 다음 숙주 세포의 속에 외인성인 유전자 물질에 함유하는 유전자 조작 세포를 생성하도록 경화될 수 있으며, 이에 따라 비-숙주 세포를 창출할 수 있다.

[0092] 관심 유전자는, 비제한적으로, 개선된 PGPR 특성, 개선된 곡류의 콜로니화, 증가된 산소 감도, 증가된 질소 고정, 및 증가된 암모늄 배출을 포함하는 개선된 특성을 가진 다른 종으로부터 라이브러리를 사용하여 식별될 수 있다. 유전자내 유전자는 제네이오우스(Geneious) 또는 플라티푸스(Platypus) 설계 소프트웨어와 같은 소프트웨어를 사용하여 이들 라이브러리를 기반으로 설계될 수 있다. 돌연변이는 기계 학습을 통해 설계될 수 있다. 돌연변이는 대사 모델의 도움으로 설계될 수 있다. 돌연변이의 자동화된 설계는 *아 라(a la)* 플라티푸스를 사용하여 실시될 수 있고 Cas-유도된 돌연변이유발에 대한 RNA를 안내할 것이다.

[0093] 유전자내 유전자는 숙주 미생물 내로 전달될 수 있다. 추가적으로, 리포터 시스템은 미생물로 전달될 수도 있다. 리포터 시스템은 프로모터를 특성규명하고, 형질전환 성공 여부를 결정하고, 돌연변이체를 스크리닝하며, 음성 스크리닝 도구로서 작용한다.

[0094] 돌연변이를 가진 미생물은 연속 계대를 통해 배양될 수 있다. 미생물 콜로니는 미생물의 단일 변이체를 함유한다. 미생물 콜로니는 자동화된 콜로니 피커 및 액체 핸들러를 사용하여 스크리닝된다. 유전자 복제 및 증가된 카피 수를 가진 돌연변이체는 원하는 특성의 더 높은 유전자형을 발현한다.

[0095] **질소 고정을 기반으로 식물 성장 촉진 미생물의 선택**

[0096] 미생물 콜로니는 다양한 분석법을 사용하여 스크리닝되어 질소 고정을 평가할 수 있다. 질소 고정을 측정하는 한 가지 방식은, 질소 배출을 측정하는, 단일 발효 검정을 이용하는 것이다. 대안적 방법은 시간에 따른 인라인 샘플링이 있는 아세틸렌 환원 검정 (ARA)이다. ARA는 마이크로튜브 어레이의 고 처리량 플레이트에서 수행될 수 있다. ARA는 살아있는 식물 및 식물 조직으로 수행될 수 있다. 배지 제형 및 배지 산소 농도는 ARA 검정에서 달라질 수 있다. 미생물 변이체를 스크리닝하는 또 다른 방법은 바이오센서를 사용하는 것이다. NanoSIMS 및 Raman 현미경의 사용은 미생물의 활성을 조사하는데 사용될 수 있다. 일부 경우에, 박테리아는 생물반응기에서 발효의 방법을 사용하여 배양 및 확장될 수도 있다. 생물반응기는 박테리아 성장의 견고성을 개선하도록 그리고 산소에 대한 박테리아의 감도를 감소하도록 설계된다. 중간 내지 높은 TP 플레이트-기반 마이크로발효기는 산소 감도, 영양 요구, 질소 고정, 및 질소 배출을 평가하는데 사용된다. 박테리아는 암호 경로를 밝히기 위해 경쟁적 또는 유리한 미생물과 공동-배양될 수 있다. 유세포 분석법은 화학, 비색 또는 형광 지표를 사용하여 높은 수준의 질소를 생산하는 박테리아를 스크리닝하는데 사용될 수 있다. 박테리아는 질소원의 존재 또는 부재 하에서 배양될 수 있다. 예를 들어, 박테리아는 글루타민, 암모니아, 우레아 또는 질산염과 함께 배양될 수 있다.

[0097] **미생물 육종**

[0098] 미생물 육종은 작물 마이크로바이옴 내에서 종의 역할을 체계적으로 식별하고 개선하는 방법이다. 상기 방법은 하기 3 단계를 포함한다: 1) 식물-미생물 상호작용을 맵핑하고 특정 표현형에 연결된 조절 네트워크를 예측함으로써 후보 종의 선택, 2) 조절 네트워크 및 유전자 클러스터의 중간 교차를 통한 미생물 표현형의 실용적이고 예측가능한 개선, 및 3) 원하는 작물 표현형을 생산하는 새로운 미생물 유전자형의 스크리닝 및 선택. 군주의 개선을 체계적으로 평가하기 위해, 미생물 군집의 콜로니화 역학을 주요 종별의 유전적 활성에 연결하는 모델은 창출된다. 상기 모델은 유전자 표적 육종을 예측하는데 그리고 농업학적 관련성의 마이크로바이옴-인코딩된 특성의 선택 개선의 빈도를 개선하는데 사용된다.

[0099] 식물 특성 (예를 들어, 질소 고정)을 개선하기 위한 박테리아의 생산은 연속 계대를 통해 달성될 수 있다. 이 박테리아의 생산은, 하나 이상의 식물에 하나 이상의 개선된 특성을 부여할 수 있는 박테리아 및/또는 조성물을 식별하는 것 외에, 미생물 군집에 의해 영향을 받는 특정한 개선된 특성을 가진, 식물을 선택함으로써 수행될 수 있다. 식물 특성을 개선하기 위해 박테리아를 생산하는 한 가지 방식은 하기의 단계를 포함한다: (a) 제 1 식물의 조직 또는 토양으로부터 박테리아를 분리하는 단계; (b) 하나 이상의 변이체 박테리아를 생성하기 위해 박테리아 중 하나 이상에 유전자 변이를 도입하는 단계; (c) 복수의 식물을 변이체 박테리아에 노출시키는 단계; (d) 복수의 식물 중 하나의 조직 또는 토양으로부터 박테리아를 단리하는 단계로서, 박테리아가 단리되는 식물은 복수의 식물에서 다른 식물에 비해 개선된 특성을 가진 단계; 및 (e) 개선된 특성을 가진 식물로부터 단리된 박테리아 (단계 (d))로 단계 (b) 내지 (d)를 반복하는 단계. 단계 (b) 내지 (d)는 식물에서 개선된 특성이 원하는 수준에 도달할 때까지 임의의 횟수 (예를 들어, 1 회, 2 회, 3 회, 4 회, 5 회, 10 회 또는 그 이상) 반

복될 수 있다. 또한, 복수의 식물은 10 개 내지 20 개 식물, 또는 20 개 이상, 50 개 이상, 100 개 이상, 300 개 이상, 500 개 이상, 또는 1000 개 이상의 식물과 같은 2 개 이상의 식물일 수 있다.

[0100] 개선된 특성을 가진 식물을 수득하는 것에 더하여, 하나 이상의 유전자 (예를 들어, 질소 고정을 조절하는 유전자)에 도입된 하나 이상의 유전자 변이를 포함하는 박테리아를 포함하는 박테리아 모집단은 수득된다. 상기 기재된 단계를 반복함으로써, 관심 식물 특성과 상관하는 모집단의 가장 적절한 구성원을 포함하는 박테리아의 모집단은 수득될 수 있다. 이 모집단에서 박테리아는 식별될 수 있고 유전자 및/또는 표현형 분석과 같은 이들의 유리한 특성은 결정될 수 있다. 유전자 분석은 단계 (a)에서 단리된 박테리아의 발생할 수 있다. 표현형 및/또는 유전형 정보는 하기를 포함하는 기술을 사용하여 수득될 수 있다: 식물 기원의 화학 성분의 고 처리량 스크리닝, 유전자 물질의 고 처리량 서열분석을 포함하는 서열분석 기술, 차등 디스플레이 기술 (DDRT-PCR, 및 DD-PCR 포함), 핵산 마이크로어레이 기술, RNA-서열분석 (전체 전사체 샷건 서열분석), 및 qRT-PCR (정량적 실시간 PCR). 수득된 정보는 rRNA 오픈로 또는 기타 분류학적으로 유익한 유전자좌의 성분을 코딩하는 핵산의 마이크로어레이-기반 스크리닝 또는 계통발생학적 분석과 같은, 존재하는 박테리아의 동일성 및 활성화에 관한 커뮤니티 프로파일링 정보를 수득하는데 사용될 수 있다. 분류학적으로 유익한 유전자좌의 예는 16S rRNA 유전자, 23S rRNA 유전자, 5S rRNA 유전자, 5.8S rRNA 유전자, 12S rRNA 유전자, 18S rRNA 유전자, 28S rRNA 유전자, gyrB 유전자, rpoB 유전자, fusA 유전자, recA 유전자, coxI 유전자, nifD 유전자. 모집단에 존재하는 분류군을 결정하기 위한 분류학적 프로파일링 공정의 예는 US20140155283에 기재되어 있다. 박테리아 식별은 하나 이상의 유전자 또는 하나 이상의 신호전달 경로, 예컨대 질소 고정 경로와 관련된 유전자의 활성을 특징구명하는 것을 포함할 수 있다. 상이한 박테리아 종들 사이의 상승적인 상호작용 (두 성분이, 이들의 조합에 의해, 원하는 효과를 첨가량 이상 증가시키는 경우)는 또한 박테리아 모집단에 존재할 수 있다.

[0101] 유전자 변이는 하기로 이루어진 군으로부터 선택된 유전자일 수 있다: nifA, nifL, ntrB, ntrC, glnA, glnB, glnK, draT, amtB, glnD, glnE, nifJ, nifH, nifD, nifK, nifY, nifE, nifN, nifU, nifS, nifV, nifW, nifZ, nifM, nifF, nifB, 및 nifQ. 유전자 변이는 하기로 이루어진 군으로부터 선택된 기능성을 가진 단백질을 인코딩하는 유전자의 변이일 수 있다: 글루타민 합성효소, 글루타민아제, 글루타민 합성효소 아데닐릴트랜스퍼라제, 전사 활성화제, 항-전사 활성화제, 피루베이트 플라보독신 옥시도리덕타제, 플라보독신, 또는 NAD⁺-디니트로겐-환원효소 aDP-D-리보실트랜스퍼라제. 유전자 변이는 다음 중 하나 이상을 초래하는 돌연변이일 수 있다: NifA 또는 글루타민아제의 증가된 발현 또는 활성; NifL, NtrB, 글루타민 합성효소, GlnB, GlnK, DraT, AmtB의 감소된 발현 또는 활성; GlnE의 감소된 아데닐릴-제거 활성; 또는 GlnD의 감소된 우리딜릴-제거 활성. 유전자 변이를 도입하는 것은 표적 부위에서 하나 이상의 뉴클레오타이드, 예컨대 1, 2, 3, 4, 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 또는 초과 뉴클레오타이드의 삽입 및/또는 결실을 포함할 수 있다. 본원에 개시된 방법의 하나 이상의 박테리아에 도입된 유전자 변이는 녹아웃 돌연변이 (예를 들어, 프로모터의 결실, 조기 중지 코돈을 생성하기 위한 삽입 또는 결실, 전체 유전자의 결실)일 수 있거나, 단백질 도메인의 활성 (예를 들어, 활성 부위에 영향을 미치는 점 돌연변이, 또는 단백질 생성물의 관련 부분을 인코딩하는 유전자의 일부의 결실)의 제거 또는 폐지일 수 있거나, 표적 유전자의 조절 서열을 변경 또는 폐지할 수 있다. 유전자 변이가 도입되는 박테리아에 상응하는 박테리아 종 또는 속의 계통 내에서 발견된 조절 서열 및 이중성 조절 서열을 포함하는, 하나 이상의 조절 서열은 또한 삽입될 수 있다. 더욱이, 조절 서열은 박테리아 배양물에서 또는 식물 조직 내에서 유전자의 발현 수준에 기초하여 선택될 수 있다. 일부 경우에, 삽입된 조절 서열은 서열번호 1-72로부터 선택될 수 있다. 유전자 변이는 표적 부위에 특이적으로 도입되는 미리-결정된 유전자 변이일 수 있다. 유전자 변이는 표적 부위 내의 랜덤 돌연변이일 수 있다. 유전자 변이는 하나 이상의 뉴클레오타이드의 삽입 또는 결실일 수 있다. 일부 경우에, 복수의 상이한 유전자 변이 (예를 들어, 2, 3, 4, 5, 10, 또는 초과)는 특성 개선 평가를 위하여 박테리아를 식물에 노출시키기 전에 단리된 박테리아 중 하나 이상에 도입된다. 복수의 유전자 변이는 임의의 상기 유형, 동일하거나 상이한 유형, 및 임의의 조합일 수 있다. 일부 경우에, 복수의 상이한 유전자 변이는 연속적으로 도입되어, 관련된 식물상에서 점진적으로 개선된 특성을 부여하는 박테리아에서 복수의 유전자 변이를 축적하기 위해 제 1 단리 단계 후의 제 1 유전자 변이, 제 2 단리 단계 후의 제 2 유전자 변이, 기타 등등을 도입한다.

[0102] 일부 구현예에서, 미생물은 조절 서열을 도입함으로써 유전자 변경될 수 있다. 예를 들어, 서열번호 1-72로부터 선택된 서열, 또는 서열번호 1-72 중 하나의 단편을 포함하는 서열, 또는 서열번호 1-72로부터 선택된 서열에 적어도 약 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 또는 99% 서열 동일성을 가진 서열. 일부 경우에, 조절 서열은 서열번호 1-72로부터 선택된 서열의 단편에 적어도 약 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 또는 99%의 서열 동일성을 가진 서열을 포함할 수 있다.

- [0103] 일부 경우에, 본원에 기재된 바와 같이, 유전자 조작 미생물은 삽입된 서열을 포함할 수 있다. 일부 경우에, 상기 삽입된 서열은 비-천연 문맥으로 삽입된 천연 서열을 포함할 수 있다. 예를 들어, 상기 삽입된 서열은 상기 미생물의 제 2 유전자의 프로모터의 위치에서 삽입된 상기 유전자 조작 미생물의 제 1 유전자로부터의 프로모터를 포함할 수 있다. 일부 경우에, 상기 삽입된 서열은 비-천연 문맥으로 삽입된 비-천연 프로모터를 포함할 수 있다. 일부 경우에, 상기 삽입된 서열은 그의 천연 문맥과 동등한 위치에서 삽입된 비-천연 프로모터를 포함할 수 있다. 예를 들어, 제 1 종의 상기 미생물은 제 2 종에서 상기 유전자의 천연 프로모터에 작동가능하게 연결된 유전자를 포함할 수 있다.
- [0104] 일부 경우에, 조절 서열은 유전자의 상류에 삽입되어 상기 유전자에 작동가능하게 연결될 수 있다. 일부 경우에, 유전자의 상류에 조절 서열의 삽입은 또한 상기 유전자의 천연 조절 서열의 결실을 포함할 수 있다. 일부 경우에, 조절 서열은 Nif 클러스터 유전자의 상류에 삽입되어 상기 Nif 클러스터 유전자를 제어할 수 있다. 일부 경우에, 조절 서열은 수송체 유전자의 상류에 삽입되어 상기 수송체 유전자를 제어할 수 있다. 일부 경우에, 조절 서열은 이온 수송체 유전자의 상류에 삽입되어 상기 이온 수송체 유전자를 제어할 수 있다. 일부 경우에, 조절 서열은 CysZ 유전자의 상류에 삽입되어 상기 CysZ 유전자를 제어할 수 있다. 일부 경우에, 조절 서열은 엑소폴리사카라이드 생합성 유전자의 상류에 삽입되어 엑소폴리사카라이드 생합성 유전자를 제어할 수 있다. 일부 경우에, 조절 서열은 셀룰로스 생합성 유전자의 상류에 삽입되어 상기 셀룰로스 생합성 유전자를 제어할 수 있다. 일부 경우에, 조절 서열은 bcs 유전자의 상류에 삽입되어 상기 bcs 유전자를 제어할 수 있다. 일부 경우에, 조절 서열은 트레할로스 생합성 유전자의 상류에 삽입되어 상기 트레할로스 생합성 유전자를 제어할 수 있다. 일부 경우에, 조절 서열은 treZ 유전자의 상류에 삽입되어 상기 treZ 유전자를 제어할 수 있다. 일부 경우에, 조절 서열은 원하는 표현형을 가진 유전자의 발현을 증가시키기 위해 삽입될 수 있다. 바람직한 표현형은 질소 고정, 암모늄 배출, 니트로게나제 효소 보조인자에 필요한 성분(수송, 생물막 형성, 식물 콜로니화, 근권에서의 체력 또는 경쟁력, 반응성 산소 중 소거, 식물 세포벽 분해 효소의 발현, 및 뿌리 부착)을 포함할 수 있다.
- [0105] 일부 경우에, 조절 서열은 조절 서열의 기원의 미생물의 속이 그것이 삽입되는 미생물의 속과 동일하도록 선택될 수 있다. 일부 경우에, 조절 서열은 조절 서열의 기원의 종이 그것이 삽입되는 종과 동일하도록 선택될 수 있다. 예를 들어, 제 1 *코사코니아 사카리* 박테리아에서 확인된 조절 요소는 제 2 *코사코니아 사카리* 박테리아에서 새로운 위치에 삽입되고, 따라서 속간 DNA 서열을 함유하지 않는 유전자 변형된 *코사코니아 사카리* 박테리아를 창출한다. 또 다른 예에서, *코사코니아 슈도사카리* 박테리아에서 확인된 조절 요소는 *코사코니아 사카리* 박테리아에 삽입되고, 따라서 속간 DNA 서열을 함유하지 않는 유전자 변형된 *코사코니아 사카리* 박테리아를 창출한다. 일부 경우에, *라벨라 아쿠아틸리스* 박테리아는 서열번호 41-59, 및 63-66으로 이루어진 군으로부터 선택된 서열을 사용하여 변형된다. 일부 경우에, *코사코니아 사카리* 박테리아는 서열번호 1-10으로 이루어진 군으로부터 선택된 서열을 사용하여 변형된다. 일부 경우에, *코사코니아 사카리* 박테리아는 서열번호 61, 및 70-72로 이루어진 군으로부터 선택된 서열을 사용하여 변형된다. 일부 경우에, *클레브시엘라 베리이콜라* 박테리아는 서열번호 11-40으로 이루어진 군으로부터 선택된 서열을 사용하여 변형된다. 일부 경우에, *클루이베라 인터메디아* 박테리아는 서열번호 60을 사용하여 변형된다. 일부 경우에, *코사코니아 슈도사카리* 박테리아는 서열번호 1-10으로 이루어진 군으로부터 선택된 서열을 사용하여 변형된다. 일부 경우에, *코사코니아 슈도사카리* 박테리아는 서열번호 61, 및 70-72로 이루어진 군으로부터 선택된 서열을 사용하여 변형된다. 일부 경우에, *엔테로박터* 종 박테리아는 서열번호 62를 사용하여 변형된다. 일부 경우에, *클레브시엘라* 종 박테리아는 서열번호 67-69로 이루어진 군으로부터 선택된 서열을 사용하여 변형된다. 일부 경우에, 조절 서열은 조절 서열의 기원의 종이 삽입되는 종과 동일하도록 선택될 수 있지만, 조절 서열은 더 많은 돌연변이 중 하나를 포함할 수 있다.
- [0106] 일부 경우에, 조절 서열은 조절 서열의 기원의 종이 그것이 삽입되는 종과 동일하지 않도록 선택될 수 있다. 예를 들어, *코사코니아 사카리* 박테리아에서 확인된 조절 요소는 *클레브시엘라 베리이콜라* 박테리아에 삽입되어, 따라서 속간 DNA 서열을 함유하는 유전자 변형된 *클레브시엘라 베리이콜라*를 창출한다.
- [0107] 일반적으로, "유전자 변이"라는 용어는 참조 폴리뉴클레오티드, 예컨대 참조 게놈 또는 이의 일부, 또는 참조 유전자 또는 이의 일부와 관련하여 폴리뉴클레오티드 서열에 도입된 임의의 변화를 지칭한다. 유전자 변이는 "돌연변이"로서 지칭될 수 있고, 유전자 변이를 포함하는 서열 또는 유기체는 "유전자 변이체" 또는 "돌연변이체"로서 지칭될 수 있다. 유전자 변이는 유전자 발현, 대사, 및 세포 신호전달을 포함하여, 일부 생물학적 활성의 증가 또는 감소와 같은 임의의 수의 효과를 가질 수 있다. 유전자 변이는 표적 부위에 특이적으로 도입될 수 있거나, 무작위로 도입될 수 있다. 유전자 변이를 도입하기 위한 다양한 분자 도구 및 방법은 이용가능하다. 예를 들어, 유전자 변이는 폴리머라제 연쇄 반응 돌연변이유발, 올리고뉴클레오티드-지정

돌연변이유발, 포화 돌연변이유발, 단편 서플링 돌연변이유발, 상동성 재조합, 리컴비너링, 람다 레드 매개된 재조합, CRISPR/Cas9 시스템, 화학적 돌연변이유발, 및 이들의 조합을 통해 도입될 수 있다. 유전자 변이를 도입하는 화학적 방법은 DNA를 화학적 돌연변이유발원, 예를 들어 에틸 메탄설폰네이트 (EMS), 메틸 메탄설폰네이트 (MMS), N-니트로소우레아 (EN U), N-메틸-N-니트로-N'-니트로소구아니딘, 4-니트로퀴놀린 N-옥시드, 디에틸 설페이트, 벤조페렌, 시클로포스파미드, 블레오마이신, 트리메틸렐라민, 아크릴아미드 모노머, 질소 머스타드, 빈크리스틴, 디에폭시알칸 (예를 들어, 디에폭시부탄), ICR-170, 포름알데히드, 프로카르바진 히드로클로라이드, 에틸렌 옥사이드, 디메틸니트로사민, 7,12 디메틸벤즈(a)안트라센, 클로람부실, 핵사메틸포스포라미드, 비설관 등에 노출시키는 것을 포함한다. 방사선 돌연변이-유발제는 자외선, γ -조사, X-선 및 빠른 중성자 충격을 포함한다. 유전자 변이는 또한 예를 들어 자외선을 가진 트리메틸프로살렌을 사용하여 핵산에 도입될 수 있다. 이동성 DNA 요소, 예를 들어, 치환가능한 요소의 랜덤 또는 표적화된 삽입은 유전자 변이를 생성하기 위한 또 다른 적합한 방법이다. 유전자 변이는, 예를 들어, 오류가 발생하기 쉬운 PCR과 같은 폴리머라제 연쇄 반응 (PCR) 기술을 사용하여, 무 세포 시험관내 시스템에서 증폭 동안 핵산에 도입될 수 있다. 유전자 변이는 DNA 서플링 기술 (예를 들어, 엑손 서플링, 도메인 스와핑, 기타 등등)을 사용하여 시험관내 핵산에 도입될 수 있다. 유전자 변이는 또한 세포에서 DNA 수복 효소에서 결핍의 결과로서 핵산에 도입될 수 있으며, 예를 들어, 돌연변이체 DNA 수복 효소를 인코딩하는 돌연변이체 유전자의 세포에서의 존재는 세포의 게놈에서 돌연변이의 높은 빈도 (즉, 약 1 돌연변이/100 유전자 - 1 돌연변이/10,000 유전자)를 생성하는 것으로 예상된다. DNA 수복 효소를 인코딩하는 유전자의 예는 비제한적으로 Mut H, Mut S, Mut L, 및 Mut U, 그리고 다른 종 (예를 들어, MSH 1 6, PMS 1 2, MLH 1, GTBP, ERCC-1, 기타 등등)에서의 상동체를 포함한다. 유전자 변이를 도입하기 위한 다양한 방법의 예시적인 설명은, 예를 들어, Stemple (2004) Nature 5:1-7; Chiang 등. PCR Methods Appl 2(3): 210-217; Stemmer (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:10747-10751; 및 미국 특허 번호 6,033,861 및 6,773,900에서 제공된다.

[0108] 미생물에 도입된 유전자 변이는 유전자이식, 시스템, 유전체내, 유전자내, 유전자간, 합성, 진화, 재배열, 또는 SNP로서 분류될 수 있다.

[0109] 유전자 변이는 미생물 내의 수많은 대사 경로에 도입되어 상기 기재된 특성의 개선을 유도할 수 있다. 대표적인 경로는 황 흡수 경로, 글리코젠 생합성, 글루타민 조절 경로, 몰리브덴 흡수 경로, 질소 고정 경로, 암모니아 동화, 암모니아 배출 또는 분비, 질소 흡수, 글루타민 생합성, 안나모क्स(annamox), 인산 가용화, 유기산 수송, 유기산 생산, 응집소 생산, 반응성 산소 라디칼 소거 유전자, 인돌 아세트산 생합성, 트레할로스 생합성, 식물 세포벽 분해 효소 또는 경로, 뿌리 부착 유전자, 엑소폴리사카라이드 분비, 글루타메이트 신타제 경로, 철 흡수 경로, 철포획체 경로, 키틴아제 경로, ACC 데아미나제, 글루타민 생합성, 인 신호전달 유전자, 퀴럼 퀴칭 경로, 시토크롬 경로, 헤모글로빈 경로, 박테리아 헤모글로빈 유사 경로, 소형 RNA rsmZ, 리조비톡신 생합성, lapA 부착 단백질, AHL 퀴럼 감지 경로, 페나진 생합성, 고리형 리포펩티드 생합성, 및 항생제 생산을 포함한다.

[0110] CRISPR/Cas9 (클러스터링된 규칙적으로 간격을 둔 짧은 회문 반복부)/CRISPR -관련 (Cas) 시스템은 원하는 돌연변이를 도입하는데 사용될 수 있다. CRISPR/Cas9는 침입 핵산의 침묵화를 안내하기 위해 CRISPR RNA (crRNA)를 사용함으로써 바이러스 및 플라스미드에 대한 적응 면역성을 박테리아 및 고세균에 제공한다. Cas9 단백질 (또는 이의 기능적 등가물 및/또는 그의 변이체, 즉 Cas9-유사 단백질)은 crRNA 및 tracrRNA라 불리는 2 개의 자연 발생 또는 합성 RNA 분자 (가이드 RNA라고도 함)와 단백질과의 회합에 의존하는 DNA 엔도뉴클레아제 활성을 자연적으로 함유한다. 일부 경우에, 2 개의 분자는 공유적으로 연결되어 단일 분자 (단일 가이드 RNA ("sgRNA"))로도 불림을 형성한다. 따라서, Cas9 또는 Cas9-유사 단백질은 DNA-표적화 RNA (이 용어는 2-분자 가이드 RNA 배치구성 및 단일-분자 가이드 RNA 배치구성 둘 다를 포함함)와 회합하며, 이는 Cas9 또는 Cas9-유사 단백질을 활성화시키고 표적 핵산 서열에 단백질을 안내한다. Cas9 또는 Cas9-유사 단백질이 이의 자연적인 효소 기능을 유지하면, 표적 DNA를 절단하여 이중 가닥 파괴를 생성할 것이며, 게놈 변경 (즉, 편집: 결실, 삽입 (공여자 폴리뉴클레오타이드가 존재하는 경우), 대체 등)을 초래할 수 있고, 이에 의해 유전자 발현을 변경한다. (변이체가 용어 Cas9-유사 용어에 의해 포괄되는) Cas9의 일부 변형은 DNA 절단 활성이 감소되도록 변경되었다 (일부 경우에, 이들은 표적 DNA의 두 가닥 대신 단일 가닥을 절단하지만, 다른 경우에, 이들은 DNA 절단 활성이 없는 것으로 심각하게 감소되었다). 유전자 변이를 도입하기 위한 CRISPR 시스템의 추가의 예시적인 설명은 예를 들어 US8795965에서 찾을 수 있다.

[0111] 고리형 증폭 기술로서, 폴리머라제 연쇄 반응 (PCR) 돌연변이유발은 돌연변이유발 프라이머를 사용하여 원하는 돌연변이를 도입한다. PCR은 변성, 어닐링, 및 연장의 사이클에 의해 수행된다. PCR에 의한 증폭 후, 돌연변이

된 DNA의 선택 및 모 플라스미드 DNA의 제거는 하기에 의해 달성될 수 있다: 1) PCR 동안 dCTP를 하이드록시메틸화된-dCTP로 교체한 후, 제한 효소로 소화하여 비-하이드록시메틸화된 모체 DNA만을 제거함; 2) 항생제 내성 유전자 및 연구된 유전자 둘 모두의 동시 돌연변이유발이 플라스미드를 다른 항생제 내성으로 변화시키고, 새로운 항생제 내성이 이후 원하는 돌연변이의 선택을 용이하게 함; 3) 원하는 돌연변이 도입 후, 메틸화된 DNA만을 절단하는 제한 효소 DpnI에 의해 모체 메틸화된 템플레이트 DNA의 소화, 이에 의해 돌연변이유발된 비메틸화된 사슬이 회수됨; 또는 4) 돌연변이된 DNA의 형질전환 효율을 증가시키기 위해 추가의 결찰 반응에서 돌연변이된 PCR 생성물의 원형화. 예시적인 방법의 추가 설명은 예를 들어 US7132265, US6713285, US6673610, US6391548, US5789166, US5780270, US5354670, US5071743, 및 US20100267147에서 찾을 수 있다.

[0112] 부위-지정 돌연변이유발이라고도 하는 올리고뉴클레오타이드-지정 돌연변이유발은 전형적으로 합성 DNA 프라이머를 이용한다. 이 합성 프라이머는 원하는 돌연변이를 함유하고, 돌연변이 부위 주위의 템플레이트 DNA에 상보적 이어서 관심 유전자에서 DNA와 하이브리드화할 수 있다. 돌연변이는 단일 염기 변화 (점 돌연변이), 다중 염기 변화, 결실, 또는 삽입, 또는 이들의 조합일 수 있다. 이어서 단일 가닥 프라이머는 DNA 폴리머라제를 사용하여 연장되며, 이는 나머지 유전자를 카피한다. 이와 같이 카피된 유전자는 돌연변이 부위를 함유하고, 벡터로서 숙주 세포에 도입될 수 있고 클로닝될 수 있다. 마지막으로, 돌연변이체는 DNA 서열분석에 의해 선택되어 이들이 원하는 돌연변이를 함유하는지 체크할 수 있다.

[0113] 유전자 변이는 오류가 발생하기 쉬운 PCR을 사용하여 도입될 수 있다. 이 기술에서 관심 유전자는 서열 복제의 충실도가 부족한 조건 하에서 DNA 폴리머라제를 사용하여 증폭된다. 결과적으로 증폭 산물은 서열에서 적어도 하나의 오류를 포함한다. 유전자가 증폭되고 반응의 생성된 생성물(들)이 템플레이트 분자와 비교할 때 서열에서 하나 이상의 변경을 포함하는 경우, 생성된 생성물은 템플레이트와 비교하여 돌연변이유발된다. 랜덤 돌연변이를 도입하는 또 다른 수단은 세포를 니트로소구아니딘 또는 에틸 메탄설포네이트와 같은 화학적 돌연변이유발원에 노출시키는 것 (Nestmann, Mutat Res 1975 June; 28(3):323-30)이며, 유전자를 함유하는 벡터는 숙주로부터 단리된다.

[0114] 포화 돌연변이유발은 랜덤 돌연변이유발의 또 다른 형태이며, 특정 부위 또는 유전자의 좁은 영역에서 모든 또는 거의 모든 가능한 돌연변이를 생성하려고 시도한다. 일반적으로, 포화 돌연변이유발은 돌연변이화될 정의된 폴리뉴클레오타이드 서열 (여기서 돌연변이유발될 서열은, 예를 들어, 15 내지 100,000 개 염기의 길이이다)에서 돌연변이유발 카세트 (여기에서 각 카세트는, 예를 들어, 1-500 개 염기의 길이이다)의 완전한 세트를 돌연변이유발시키는 것으로 구성된다. 따라서, 돌연변이의 그룹 (예를 들어, 1 내지 100 개의 돌연변이 범위)은 돌연변이유발되도록 각 카세트에 도입된다. 하나의 카세트에 도입될 돌연변이의 그룹화는 한 라운드의 포화 돌연변이유발의 적용 동안 제 2 카세트에 도입될 돌연변이의 제 2 그룹화와 상이 또는 동일할 수 있다. 이러한 그룹화는 결실, 부가, 특정 코돈의 그룹화, 및 특정 뉴클레오타이드 카세트의 그룹화로 예시된다.

[0115] DNA 서플링이라고도 하는 단편 서플링 돌연변이유발은 유익한 돌연변이를 빠르게 전파하는 방식이다. 서플링 공정의 예에서, DNase는 일련의 모체 유전자를 예를 들어 약 50-100 bp 길이의 조각으로 단편화하는데 사용된다. 그런 다음 프라이머가 없는 폴리머라제 연쇄 반응 (PCR)이 이어진다--충분히 중첩하는 상동성 서열을 가진 DNA 단편은 서로 어닐링할 것이고 DNA 폴리머라제에 의해 연장된다. 일부 DNA 분자가 모체 유전자의 크기에 도달한 후, 이 PCR 연장의 여러 라운드가 일어나게된다. 이들 유전자는 또 다른 PCR로 증폭될 수 있으며, 이번에는 가닥의 끝을 보완하도록 설계되는 프라이머를 부가하여 증폭될 수 있다. 프라이머는 클로닝 벡터로의 결찰에 필요한 제한 효소 인식 부위용 서열과 같은 이들의 5' 말단에 부가된 추가의 서열을 가질 수 있다. 서플링 기술의 추가 예는 US20050266541에 제공된다.

[0116] 상동성 재조합 돌연변이유발은 외인성 DNA 단편과 표적화된 폴리뉴클레오타이드 서열 사이의 재조합을 포함한다. 이중 가닥 파괴가 발생한 후, 파괴의 5' 말단 주위의 DNA 부분이 절제술이라는 공정에서 절단된다. 뒤따르는 가닥 침입 단계에서, 파괴된 DNA 분자의 돌출된 3' 말단은 그 다음 파괴되지 않은 유사한 또는 동일한 DNA 분자를 "침입"한다. 이 방법은 유전자를 결실, 엑손을 제거, 유전자를 부가 그리고 점 돌연변이를 도입하는데 사용될 수 있다. 상동성 재조합 돌연변이유발은 영구적이거나 조건적일 수 있다. 전형적으로, 재조합 템플레이트도 제공된다. 재조합 템플레이트는 또 다른 벡터의 성분일 수 있거나, 별도의 벡터에 포함될 수 있거나, 또는 별도의 폴리뉴클레오타이드로서 제공될 수 있다. 일부 구현예에서, 재조합 템플레이트는 부위-특이적 뉴클레아제에 의해 니킹된 또는 절단된 표적 서열 내에서 또는 근처에서와 같은 상동성 재조합에서 템플레이트로서 작용하도록 설계된다. 템플레이트 폴리뉴클레오타이드는 임의의 적합한 길이, 예컨대 약 10, 15, 20, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 500, 1000 개 이상의 뉴클레오타이드 길이일 수 있다. 일부 구현예에서, 템플레이트 폴리뉴클레오타이드는 표적 서열을 포함하는 폴리뉴클레오타이드의 일부에 상보적이다. 최적으로 정렬될 때, 템플레이트 폴리뉴클레오타이드

는 표적 서열의 하나 이상의 뉴클레오타이드 (예를 들어, 약 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100 개 또는 약 상기 이상 초과 뉴클레오타이드)와 중첩될 수 있다. 일부 구현예에서, 템플레이트 서열 및 표적 서열을 포함하는 폴리뉴클레오타이드가 최적으로 정렬될 때, 템플레이트 폴리뉴클레오타이드의 가장 가까운 뉴클레오타이드는 표적 서열로부터 약 1, 5, 10, 15, 20, 25, 50, 75, 100, 200, 300, 400, 500, 1000, 5000, 10000 개 이상의 뉴클레오타이드내에 있다. 상동성 재조합의 방법에 유용한 부위-지정 뉴클레아제의 비-제한적인 예는 징크 핑거 뉴클레아제, CRISPR 뉴클레아제, TALE 뉴클레아제 및 메가뉴클레아제를 포함한다. 이러한 뉴클레아제의 사용의 추가 설명에 대하여, 예를 들어 US8795965 및 US20140301990 참조.

[0117] 화학적 돌연변이 또는 조사를 포함하여, 주로 점 돌연변이 및 짧은 결실, 삽입, 염기전환, 및/또는 전이를 창출하는 돌연변이유발원은 유전자 변이를 창출하는데 사용될 수 있다. 돌연변이유발원은, 비제한적으로, 에틸 메탄설포네이트, 메틸 메탄설포네이트, N-에틸-N-니트로소우레아, 트리에틸멜라민, N-메틸-N-니트로소우레아, 프로카르바진, 클로람부실, 시클로포스파미드, 디에틸 설페이트, 아크릴아미드 모노머, 멜팔란, 질소 머스타드, 빈크리스틴, 디메틸니트로사민, N-메틸-N'-니트로-니트로소구아니딘, 니트로소구아니딘, 2-아미노푸린, 7,12 디메틸-벤즈(아)안트라센, 에틸렌 옥사이드, 헥사메틸포스포르아미드, 비설판, 디에폭시알칸 (디에폭시옥탄, 디에폭시부탄, 기타 등등), 2-메톡시-6-클로로-9[3-(에틸-2-클로로-에틸)아미노프로필아미노]아크리딘 디히드로클로라이드 및 포름알데히드를 포함한다.

[0118] 유전자 변이 도입은 불완전한 공정일 수 있으며, 그 결과 처리된 박테리아 모집단의 일부 박테리아는 원하는 돌연변이를 갖고 다른 박테리아는 그렇지 않다. 일부 경우에, 원하는 유전자 변이를 가진 박테리아를 풍부하게 하기 위해 선택 압력을 적용하는 것이 바람직하다. 전통적으로, 성공적인 유전자 변이체에 대한 선택은 항생제 내성 유전자를 삽입하는 경우 또는 치명적이지 않은 화합물을 치명적인 대사산물로 전환시킬 수 있는 대사 활성을 폐지하는 경우와 같이 유전자 변이에 의해 부여되거나 폐지된 일부 기능을 찬성하는 또는 반대하는 선택을 수반하였다. 폴리뉴클레오타이드 서열 자체에 기초한 선택 압력을 적용하여, 원하는 유전자 변이 만이 도입될 필요가 있다는 것 (예를 들어, 선택 가능한 마커를 요구하지 않음)도 가능하다. 이 경우에, 선택 압력은, 선택이 유전자 변이를 도입하고자 하는 기준 서열에 대해 효과적으로 유도되도록, 표적 부위로 도입된 유전자 변이를 결여시키는 게놈 절단을 포함할 수 있다. 전형적으로, 절단은 표적 부위의 100 개 뉴클레오타이드 내에서 (예를 들어, 표적 부위에서 또는 내에서 절단을 포함하여, 표적 부위로부터의 75, 50, 25, 10 개 이하의 뉴클레오타이드 내에서) 발생한다. 제거는 징크 핑거 뉴클레아제, CRISPR 뉴클레아제, TALE 뉴클레아제 (TALEN), 또는 메가뉴클레아제로 이루어진 군으로부터 선택된 부위-특이적 뉴클레아제에 의해 유도될 수 있다. 이와 같은 공정은 상동성 재조합용 템플레이트가 제공되지 않는다는 점을 제외하고 표적 부위에서 상동성 재조합을 향상시키는 공정과 유사하다. 결과적으로, 원하는 유전자 변이를 결여시키는 박테리아는 미수복된 채로 남아서 세포 사멸을 초래하는 절단을 경험할 가능성이 더 높다. 이어서, 개선된 특성의 부여를 평가하기 위해 식물에의 노출에서 사용을 위하여 박테리아 생존 선택은 단리될 수 있다.

[0119] CRISPR 뉴클레아제는 표적 부위로의 절단을 유도하기 위해 부위-특이적 뉴클레아제로서 사용될 수 있다. 돌연변이된 미생물의 개선된 선택은 돌연변이되지 않은 세포를 사멸시키기 위해 Cas9를 사용함으로써 수득될 수 있다. 이어서, 식물은 돌연변이된 미생물로 접종하여 공생을 재확인하고 효율적인 공생체를 선택하기 위한 진화 압력을 창출한다. 그런 다음 미생물은 식물 조직에서 다시 분리될 수 있다. 비-변이체에 대한 선택에 사용된 CRISPR 뉴클레아제 시스템은 상동성 재조합용 템플레이트가 제공되지 않는 것을 제외하고 유전자 변이 도입과 관련하여 상기 기재된 것과 유사한 요소를 이용할 수 있다. 표적 부위에 유도된 절단은 그래서 감염된 세포의 사멸을 향상시킨다.

[0120] 징크 핑거 뉴클레아제, TALE 뉴클레아제 (TALEN) 시스템, 및 메가뉴클레아제와 같은 표적 부위에서 절단을 특이적으로 유도하기 위한 다른 옵션은 이용가능하다. 징크-핑거 뉴클레아제 (ZFN)는 징크 핑거 DNA 결합 도메인을 DNA 절단 도메인에 융합시킴으로써 생성된 인공 DNA 엔도뉴클레아제이다. ZFN은 원하는 DNA 서열을 표적화하도록 조작될 수 있으며, 이는 징크-핑거 뉴클레아제가 독특한 표적 서열을 절단할 수있게 한다. 세포내로 도입될 때, ZFN은 이중 가닥 파괴를 유도함으로써 세포 (예를 들어, 세포의 게놈)에서 표적 DNA를 편집하는데 사용될 수 있다. 전사 활성화제-유사 이펙터 뉴클레아제 (TALEN)는 TAL (전사 활성화제-유사) 이펙터 DNA 결합 도메인을 DNA 절단 도메인에 융합시킴으로써 생성된 인공 DNA 엔도뉴클레아제이다. TALENS는 실질적으로 임의의 원하는 DNA 서열을 결합하도록 신속하게 조작 될 수 있고, 세포에 도입될 때, TALEN은 이중 가닥 파괴를 유도함으로써 세포 (예를 들어, 세포의 게놈)에서 표적 DNA를 편집하는데 사용될 수 있다. 메가뉴클레아제 (귀소 엔도뉴클레아제)는 대형 인식 부위 (12 내지 40 개의 염기쌍의 이중 가닥 DNA 서열을 특징으로 하는 엔도데옥시리보뉴클레아제이다. 메가뉴클레아제는 고도로 표적화된 방식으로 서열을 대체, 제거 또는 변형하는데 사용될 수 있다.

단백질 조작을 통해 이들의 인식 서열을 변형함으로써, 표적 서열은 변화될 수 있다. 메가뉴클레아제는, 박테리아, 식물 또는 동물이 4개의 패밀리로 흔히 그룹화되든, 모든 게놈 유형을 변형하는데 사용될 수 있다: LAGLIDADG 패밀리, GIY-YIG 패밀리, His-Cyst 박스 패밀리 및 HNH 패밀리. 예시적인 귀소 엔도뉴클레아제는 I-SceI, I-CeuI, PI-PspI, PI-Sce, I-SceIV, I-CsmI, I-PanI, I-SceII, I-PpoI, I-SceIII, I-CreI, I-TevI, I-TevII 및 I-TevIII을 포함한다.

[0121] 본 개시내용의 방법은 하나 이상의 다양한 바람직한 특성을 도입 또는 개선하는데 이용될 수 있다. 도입 또는 개선될 수 있는 특성의 예는 하기를 포함한다: 뿌리 바이오매스, 뿌리 길이, 높이, 싹 길이, 잎 수, 물 사용 효율, 전체 바이오매스, 수율, 열매 크기, 난알 크기, 광합성율, 가뭄에 대한 내성, 내열성, 염분 내성, 선충 스트레스에 대한 내성, 곰팡이 병원체에 대한 내성, 세균성 병원체에 대한 내성, 바이러스성 병원체에 대한 내성, 대사 산물의 수준 및 프로테옴 발현. 높이, 전체 바이오매스, 뿌리 및/또는 싹 바이오매스, 종자 발아, 묘목 생존, 광합성 효율, 증산율, 종자/열매 수 또는 질량, 식물 입자 또는 열매 수율, 잎 엽록소 함량, 광합성 비율, 뿌리 길이, 또는 이들의 임의의 조합을 포함하는 바람직한 특성은 성장을 측정하는데 사용될 수 있고, 동일한 조건 하에서 성장된 기준 농업 식물 (예를 들어, 특성이 개선되지 않은 식물)의 성장 속도와 비교될 수 있다.

[0122] 도입될 또는 개선될 바람직한 특성은 본원에 기재된 바와 같은 질소 고정이다. 일부 경우에, 본원에 기재된 방법으로 생성된 식물은 토양에서 동일한 조건 하에서 성장된 기준 농업 식물보다 적어도 약 5 % 초과, 예를 들어 적어도 약 5 %, 적어도 약 8 %, 적어도 약 10 %, 적어도 약 15 %, 적어도 약 20 %, 적어도 약 25 %, 적어도 약 30 %, 적어도 약 40 %, 적어도 약 50 %, 적어도 약 60 %, 적어도 약 75 %, 적어도 약 80 %, 적어도 약 80 %, 적어도 약 90 %, 또는 적어도 약 100 %, 적어도 약 200 %, 적어도 약 300 %, 적어도 약 400 % 또는 초과인 특성의 차이를 나타낸다. 추가의 예에서, 본원에 기재된 방법으로 생성된 식물은 토양에서 동일한 조건 하에서 성장된 기준 농업 식물보다 적어도 약 5 % 초과, 예를 들어 적어도 약 5 %, 적어도 약 8 %, 적어도 약 10 %, 적어도 약 15 %, 적어도 약 20 %, 적어도 약 25 %, 적어도 약 30 %, 적어도 약 40 %, 적어도 약 50 %, 적어도 약 60 %, 적어도 약 75 %, 적어도 약 80 %, 적어도 약 80 %, 적어도 약 90 %, 또는 적어도 약 100 %, 적어도 약 200 %, 적어도 약 300 %, 적어도 약 400 % 이상인 특성의 차이를 나타낸다.

[0123] 개선될 특성은 하나 이상의 생물적 또는 비생물적 스트레스요인의 적용을 포함하는 조건 하에서 평가될 수 있다. 스트레스요인의 예는 비생물적 스트레스 (예컨대 열 스트레스, 염분 스트레스, 가뭄 스트레스, 냉기 스트레스, 및 저 영양소 스트레스) 및 생물적 스트레스 (예컨대 선충 스트레스, 곤충 초식성 스트레스, 곰팡이 병원체 스트레스, 박테리아 병원체 스트레스, 및 바이러스 병원체 스트레스)를 포함한다.

[0124] 본 개시내용의 방법 및 조성물에 의해 개선된 특성은 이전에 질소 고정이 불가능한 식물을 포함하여 질소 고정일 수 있다. 일부 경우에, 본원에 기재된 방법에 따라 단리된 박테리아는, 임의의 유전자 변이를 도입하기 전에 제 1 식물로부터 단리된 박테리아와 비교할 때 적어도 2 배 (예를 들어, 3 배, 4 배, 5 배, 6 배, 7 배, 8 배, 9 배, 10 배, 20 배, 50 배, 100 배, 1000 배 이상)의 질소 고정 능력의 증가를 나타낼 수 있는 식물의 질소의 1 % 이상 (예를 들어, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 15 %, 20% 이상)를 생산한다. 일부 경우에, 박테리아는 식물의 질소의 5 % 이상을 생산한다. 원하는 수준의 질소 고정은 유전자 변이 도입, 복수의 식물에의 노출, 및 개선된 특성을 가진 식물로부터 박테리아의 1 회 이상 (예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 25 회 이상) 격리의 단계를 반복한 후, 달성될 수 있다. 일부 경우에, 향상된 수준의 질소 고정은 글루타민, 암모니아, 또는 다른 화학적 질소 공급원이 보충된 비료의 존재 하에서 달성된다. 질소 고정의 정도를 평가하는 방법은 공지되어 있으며, 이의 예는 본원에 기재되어있다.

[0125] 미생물 육종은 작물 마이크로바이옴 내에서 종의 역할을 체계적으로 식별하고 개선하는 방법이다. 상기 방법은 하기 3 단계를 포함한다: 1) 식물-미생물 상호작용을 맵핑하고 특정 표현형에 연결된 조절 네트워크를 예측하는 것에 의한 후보 종의 선택 단계, 2) 조절 네트워크 및 유전자 클러스터의 중간 교차를 통한 미생물 표현형의 실용적이고 예측가능한 개선 단계, 및 3) 원하는 작물 표현형을 생산하는 새로운 미생물 유전자형의 스크리닝 및 선택 단계. 군주의 개선을 체계적으로 평가하기 위해, 미생물 군집의 콜로니화 역학을 주요 종별의 유전자 활성화에 연결하는 모델은 창출된다. 상기 모델은 유전자 표적 육종을 예측하고 농업학적 관련성의 마이크로바이옴-인코딩된 특성의 개선 선택의 빈도를 개선하는데 사용된다.

[0126] **질소 고정**

[0127] 질소 고정을 조절하는 하나 이상의 유전자에 도입된 하나 이상의 유전자 변이를 포함하는 박테리아에 식물을 노출시키는 것을 포함하는, 식물에서 질소 고정을 증가시키는 방법은 본원에 기재되며, 여기서 박테리아는, 박테리아의 부재 하에서 식물과 비교하여 적어도 2 배의 질소-고정 능력을 나타낼 수 있는, 식물에서 1 % 이상 (예

를 들어 2 %, 5 %, 10 % 이상)의 질소를 생산한다. 박테리아는 글루타민, 우레아, 질산염 또는 암모니아가 보충된 비료의 존재 하에서 질소를 생산할 수 있다. 유전자 변이는 상기 제공된 예를 포함하여 본원에 기재된 임의의 수 및 임의의 조합의 임의의 유전자 변이일 수 있다. 유전자 변이는 nifA, nifL, ntrB, ntrC, 글루타민 합성효소, glnA, glnB, glnK, draT, amtB, 글루타민아제, glnD, glnE, nifJ, nifH, nifD, nifK, nifY, nifE, nifN, nifU, nifS, nifV, nifW, nifZ, nifM, nifF, nifB, 및 nifQ로 이루어진 군으로부터 선택된 유전자에 도입될 수 있다. 유전자 변이는 하기 중 하나 이상을 초래하는 돌연변이일 수 있다: NifA 또는 글루타민아제의 증가된 발현 또는 활성; nifL, ntrB, 글루타민 합성효소, glnB, glnK, draT, amtB의 감소된 발현 또는 활성; GlnE의 감소된 아데닐릴-제거 활성; 또는 GlnD의 감소된 우리딜릴-제거 활성. 본원에 개시된 방법의 하나 이상의 박테리아에 도입된 유전자 변이는 녹아웃 돌연변이일 수 있거나 표적 유전자의 조절 서열을 폐지할 수 있거나, 또는 이중성 조절 서열의 삽입, 예를 들어, 동일한 박테리아 종 또는 속의 계통 내에서 발견되는 조절 서열의 삽입을 포함할 수 있다. 조절 서열은 박테리아 배양물에서 또는 식물 조직 내에서 유전자의 발현 수준에 기초하여 선택될 수 있다. 유전자 변이는 화학적 돌연변이유발에 의해 생산될 수 있다. 단계 (c)에서 성장된 식물은 생물적 또는 비생물적 스트레스요인에 노출될 수 있다.

[0128] 본원에 기재된 식물에서 발생하는 질소 고정의 양은 예를 들어 아세틸렌-환원 (AR) 검정에 의해 여러 방식으로 측정될 수 있다. 아세틸렌-환원 검정은 시험 관내 또는 생체내 수행될 수 있다. 특정 박테리아가 식물에 고정된 질소를 제공하고 있다는 증거는 하기를 포함할 수 있다: 1) 접종시, 총 식물 N이 바람직하게는 식물에서 N 농도의 동반 증가와 함께 상당히 증가함; 2) 접종시, 질소 결핍 증상이 (건조물의 증가를 포함해야 하는) N-제한 조건 하에서 완화됨; 3) N_2 고정이 (동위 원소 회석 실험, $^{15}N_2$ 환원 검정 또는 ^{15}N 자연 풍부 검정일 수 있는) ^{15}N 접근법을 사용하여 문서화됨; 4) 고정된 N이 식물 단백질 또는 대사산물에 편입됨; 그리고 5) 이러한 효과 모두가 비-접종된 식물에서 또는 접종 균주의 돌연변이체로 접종된 식물에서는 나타나지 않음.

[0129] 야생형 질소 고정 조절 캐스케이드는 입력 O_2 및 NH_4^+ 가 NOR 게이트를 통과하는 디지털 논리 회로로서 표시될 수 있으며, 그 출력은 ATP 외에 AND 게이트로 들어간다. 일부 구현예에서, 본원에 개시된 방법은 조절 캐스케이드의 여러 지점에서 이 회로상에 NH_4^+ 의 영향을 방해하여, 시비된 들판에서조차도 미생물이 질소를 생산할 수 있다. 그러나, 본원에 개시된 방법은 또한 회로상에 ATP 또는 O_2 의 영향 변경, 또는 세포의 다른 조절 캐스케이드로 회로의 대체, 또는 질소 고정 이외의 유전자 회로 변경을 고려한다. 유전자 클러스터는 이중성 조절 시스템의 제어 하에서 기능적 생성물을 생성하도록 재-조작될 수 있다. 유전자 클러스터의 코딩 서열의 외부 및 내부에서 천연 조절 요소를 제거하고 이를 대체 조절 시스템으로 대체함으로써, 복잡한 유전자 오페론 및 다른 유전자 클러스터의 기능적 생성물은, 천연 유전자가 유래된 종 이외의 상이한 종의 세포를 포함하는 이중성 세포로 이동될 수 있고/있거나 제어될 수 있다. 일단 재-조작되면, 합성 유전자 클러스터는 유전자 회로 또는 다른 유도성 조절 시스템에 의해 제어될 수 있으며, 이로써 원하는 대로 생성물의 발현을 제어할 수 있다. 발현 카세트는 논리 게이트, 펄스 발생기, 발진기, 스위치, 또는 메모리 장치로서 작동하도록 설계될 수 있다. 발현 카세트가 산소, 온도, 접촉, 삼투 스트레스, 막 스트레스, 또는 산화환원 센서와 같은 환경 센서로서 기능하도록 제어 발현 카세트가 프로모터에 연결될 수 있다.

[0130] 예로서, nifL, nifA, nifT, 및 nifX 유전자는 nif 유전자 클러스터에서 제거될 수 있다. 합성 유전자는 각각의 아미노산 서열을 인코딩하는 DNA를 코돈 랜덤 화함으로써 설계될 수 있다. 코돈 선택이 수행되어, 코돈 사용이 천연 유전자에서 코돈 사용으로부터 가능한 한 분기적임을 명시한다. 제안된 서열은 제한 효소 인식 부위, 트랜스포존 인식 부위, 반복 서열, 시그마 54 및 시그마 70 프로모터, 암호 리보솜 결합 부위 및 rho 독립 종결자와 같은 임의의 원하지 않는 특징에 대해 스캔된다. 합성 리보솜 결합 부위는, 예컨대 유전자의 시작 코돈 (-60 내지 +90)을 둘러싸는 150 bp가 형광 유전자에 융합되는 형광 리포터 플라스미드를 구축함으로써, 각각의 상응하는 천연 리보솜 결합 부위의 강도와 일치하도록 선택된다. 이 키메라는 Ptac 프로모터의 제어 하에서 발현될 수 있고, 형광은 유세포 분석을 통해 측정된다. 합성 리보솜 결합 부위를 생성하기 위해, 150 bp (-60 내지 +90)의 합성 발현 카세트를 사용하는 리포터 플라스미드의 라이브러리는 생성된다. 간략하게, 합성 발현 카세트는 랜덤 DNA 스페이서, RBS 라이브러리를 인코딩하는 축퇴 서열, 및 각각의 합성 유전자에 대한 코딩 서열로 이루어질 수 있다. 다중 클론은 천연 리보솜 결합 부위와 가장 일치하는 합성 리보솜 결합 부위를 식별하기 위해 스크리닝된다. 이와 같이 천연 오페론과 동일한 유전자로 이루어지는 합성 오페론이 작제되고 기능적 상보성에 대해 시험된다. 합성 오페론의 추가 예시적인 설명은 US20140329326에 제공된다.

[0131] **박테리아 종**

- [0132] 본원에 개시된 방법 및 조성물에 유용한 미생물은 임의의 공급원으로부터 수득될 수 있다. 일부 경우에, 미생물은 박테리아, 고세균, 원생동물 또는 진균일 수 있다. 본 개시내용의 미생물은 질소 고정 미생물, 예를 들어 질소 고정 박테리아, 질소 고정 고세균, 질소 고정 진균, 질소 고정 효모, 또는 질소 고정 원생동물일 수 있다. 본원에 개시된 방법 및 조성물에 유용한 미생물은 포자 형성 미생물, 예를 들어 포자 형성 박테리아일 수 있다. 일부 경우에, 본원에 개시된 방법 및 조성물에 유용한 박테리아는 그람 양성 박테리아 또는 그람 음성 박테리아일 수 있다. 일부 경우에, 박테리아는 피르미쿠테 필름(Firmicute phylum)의 내생포자 형성 박테리아일 수 있다. 일부 경우에, 박테리아는 디아자트로프(diazotroph)일 수 있다. 일부 경우에, 박테리아는 디아조트로프가 아닐 수 있다.
- [0133] 본 개시내용의 방법 및 조성물은 예를 들어 메타노테르모박터 서모오토트로피쿠스 (*Methanothermobacter thermoautotrophicus*)와 같은 고세균과 함께 사용될 수 있다.
- [0134] 일부 경우에, 유용할 수 있는 박테리아는, 비제한적으로, 하기를 포함한다: 아그로박테리움 라디오박터 (*Agrobacterium radiobacter*), 바실러스 아시도칼다리우스(*Bacillus acidocaldarius*), 바실러스 아시도테레스 트리스(*Bacillus acidoterrestris*), 바실러스 아그리(*Bacillus agri*), 바실러스 아이자와이(*Bacillus aizawai*), 바실러스 알볼락티스(*Bacillus albolactis*), 바실러스 알칼로필루스(*Bacillus alcalophilus*), 바실러스 알베이(*Bacillus alvei*), 바실러스 아미노글루코시디쿠스(*Bacillus aminoglucosidicus*), 바실러스 아미노보란스(*Bacillus aminovorans*), 바실러스 아밀롤리티쿠스(*Bacillus amylolyticus*) (파에니바실러스 아밀롤리티쿠스(*Paenibacillus amylolyticus*)라고도 함) 바실러스 아밀롤리쿠에파시엔스(*Bacillus amyloliquefaciens*), 바실러스 아네우리놀리티쿠스(*Bacillus aneurinolyticus*), 바실러스 아트로파에우스(*Bacillus atrophaeus*), 바실러스 아조토포르만스(*Bacillus azotoformans*), 바실러스 바디우스(*Bacillus badius*), 바실러스 세레우스(*Bacillus cereus*) (동의어: 바실러스 엔도리트모스(*Bacillus endorhythmos*), 바실러스 메두사(*medusa*)), 바실러스 키티노스포루스(*Bacillus chitinosporus*), 바실러스 시르쿨란스(*Bacillus circulans*), 바실러스 코아굴란스(*Bacillus coagulans*), 바실러스 엔도파라시티쿠스(*Bacillus endoparasiticus*), 바실러스 파스티디오수스(*Bacillus fastidiosus*), 바실러스 피르무스(*Bacillus firmus*), 바실러스 쿠르스타키(*Bacillus kurstaki*), 바실러스 락티콜라(*Bacillus lacticola*), 바실러스 락티모르부스(*Bacillus lactimorbus*), 바실러스 락티스(*Bacillus lactis*), 바실러스 라테로스포루스(*Bacillus laterosporus*) (브레비바실러스 라테로스포루스(*Brevibacillus laterosporus*)라고도 함), 바실러스 라우투스(*Bacillus lautus*), 바실러스 렌티모르부스(*Bacillus lentimorbus*), 바실러스 렌투스(*Bacillus lentus*), 바실러스 리첸리포르미스(*Bacillus licheniformis*), 바실러스 마록카누스(*Bacillus maroccanus*), 바실러스 메가테리움(*Bacillus megaterium*), 바실러스 메티엔스(*Bacillus metiens*), 바실러스 미코이데스(*Bacillus mycoides*), 바실러스 닛토(*Bacillus natto*), 바실러스 네마토시다(*Bacillus nematocida*), 바실러스 니그리피칸스(*Bacillus nigrificans*), 바실러스 니그룸(*Bacillus nigrum*), 바실러스 판토텐티쿠스(*Bacillus pantothenicus*), 바실러스 포필리아에(*Bacillus popilliae*), 바실러스 사이크로사카롤리티쿠스(*Bacillus psychrosaccharolyticus*), 바실러스 푸밀루스(*Bacillus pumilus*), 바실러스 시아멘시스(*Bacillus siamensis*), 바실러스 스미티이(*Bacillus smithii*), 바실러스 사파에리쿠스(*Bacillus sphaericus*), 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*), 바실러스 투링기엔시스(*Bacillus thuringiensis*), 바실러스 유니플라겔라투스(*Bacillus uniflagellatus*), 브라디리조비움 자포니쿰(*Bradyrhizobium japonicum*), 브레비바실러스 브레비스(*Brevibacillus brevis*) 브레비바실러스 라테로스포루스(*laterosporus* (이전에 바실러스 라테로스포루스)), 크로모박테리움 서브트스구아에(*Chromobacterium subtsugae*), 델프트아 아시도보란스(*Delftia acidovorans*), 락토바실러스 아시도필루스(*Lactobacillus acidophilus*), 리소박터 안티비오티쿠스(*Lysobacter antibioticus*), 리소박터 엔지모게네스(*Lysobacter enzymogenes*), 파에니바실러스 알베이(*Paenibacillus alvei*), 파에니바실러스 폴리믹사(*Paenibacillus polymyxa*), 파에니바실러스 포필리아에(*Paenibacillus popilliae*) (이전에 바실러스 포필리아에(*Bacillus popilliae*)), 판토에아 아글로메란스(*Pantoea agglomerans*), 파스테우리아 페네트란스(*Pasteuria penetrans*) (이전에 바실러스 페네트란스(*Bacillus penetrans*)), 파스테우리아 우스가에(*Pasteuria usgae*), 펙토박테리움 카로토보룸(*Pectobacterium carotovorum*) (이전에 에르위니아 카로토보라(*Erwinia carotovora*)), 슈도모나스 아에루기노사(*Pseudomonas aeruginosa*), 슈도모나스 아우레오파시엔스(*Pseudomonas aureofaciens*), 슈도모나스 세파시아(*Pseudomonas cepacia*) (이전에 부르크홀데리아 세파시아(*Burkholderia cepacia*)라고도 함), 슈도모나스 클로로라피스(*Pseudomonas chlororaphis*), 슈도모나스 플루오레스센스(*Pseudomonas fluorescens*), 슈도모나스 프로라딕스(*Pseudomonas proradix*), 슈도모나스 푸티다(*Pseudomonas putida*), 슈도모나스 시링가에(*Pseudomonas syringae*), 세라티아 엔토모필라(*Serratia entomophila*), 세라티아 마르세스센스(*Serratia marcescens*), 스트렙토마이세스 콜롬비엔시스(*Streptomyces colombiensis*), 스트렙토마이세스 갈부스

(*Streptomyces galbus*), 스트렙토마이세스 고시키엔시스(*Streptomyces goshikiensis*), 스트렙토마이세스 그리세오비리디스(*Streptomyces griseoviridis*), 스트렙토마이세스 라벤둘라에(*Streptomyces lavendulae*), 스트렙토마이세스 프라시누스(*Streptomyces prasinus*), 스트렙토마이세스 사라세티쿠스(*Streptomyces saraceticus*), 스트렙토마이세스 베네주엘라에(*Streptomyces venezuelae*), 산토모나스 캄페스트리스(*Xanthomonas campestris*), 크세노르하브두스 루미네스센스(*Xenorhabdus luminescens*), 크세노르하브두스 네마토폰라(*Xenorhabdus nematophila*), 로도코쿠스 글로베룰루스(*Rhodococcus globerulus*) AQ719 (NRRL 수탁 번호 B-21663), 바실러스 sp. AQ175 (ATCC 수탁 번호 55608), 바실러스 sp. AQ 177 (ATCC 수탁 번호 55609), 바실러스 sp. AQ178 (ATCC 수탁 번호 53522), 및 스트렙토마이세스 sp. 균주 NRRL 수탁 번호 B-30145. 일부 경우에 박테리아는 아조토박터 크루코쿰(*Azotobacter chroococcum*), 메타노사르시나 바르케리(*Methanosarcina barkeri*), 클레시엘라 뉴모니아에(*pneumoniae*), 아조토박터 비벨란디이, 로도박터 스파로이데스(*Rhodobacter sphaeroides*), 로도박터 캡슐라투스(*Rhodobacter capsulatus*), 로도박터 팔루스트리스(*Rhodobacter palustris*), 로도스포릴룸 루브룸(*Rhodospirillum rubrum*), 리조비움 레구미노사룸(*Rhizobium leguminosarum*) 또는 리조비움 에틀리(*Rhizobium etli*)일 수 있다.

[0135] 일부 경우에, 박테리아는 클로스트리듐의 종, 예를 들어 클로스트리듐 파스테우리아눔(*Clostridium pasteurianum*), 클로스트리듐 베이제린키이(*Clostridium beijerinckii*), 클로스트리듐 퍼프린젠스(*Clostridium perfringens*), 클로스트리듐 테타니(*Clostridium tetani*), 클로스트리듐 아세토부틸리쿰(*Clostridium acetobutylicum*)일 수 있다.

[0136] 일부 경우에, 본 개시내용의 방법 및 조성물과 함께 사용되는 박테리아는 시아노박테리아일 수 있다. 시아노박테리아 속의 예는 아나바에나(*Anabaena*) (예를 들어 아나가에나(*Anagaena*) sp. PCC7120), 노스톡(*Nostoc*) (예를 들어 노스톡 푼크티포르메(*punctiforme*)), 또는 시네초시스티스(*Synechocystis*) (예 시네초시스티스 sp. PCC6803)을 포함한다.

[0137] 일부 경우에, 본 개시내용의 방법 및 조성물과 함께 사용된 박테리아는 예를 들어 클로로비움 테피둠(*Chlorobium tepidum*)과 같은 필룸 클로로비(phylum Chlorobi)에 속할 수 있다.

[0138] 일부 경우에, 본 개시내용의 방법 및 조성물과 함께 사용된 미생물은 공지된 NifH 유전자에 상동성인 유전자를 포함할 수 있다. 공지된 NifH 유전자의 서열은 예를 들어 Zehr lab NifH 데이터베이스, (www.zehr.pmc.ucsc.edu/nifH_Database_Public/, 2014년 4월 4일) 또는 Buckley lab NifH 데이터베이스 (www.css.cornell.edu/faculty/buckley/nifH.htm, 및 Gaby, John Christian and Daniel H. Buckley. "A comprehensive aligned nifH gene database: a multipurpose tool for studies of nitrogen-fixing bacteria." *Database* 2014 (2014): bau001.)에서 찾을 수 있다. 일부 경우에, 본 개시내용의 방법 및 조성물과 함께 사용된 미생물은 Zehr lab NifH 데이터베이스, (www.zehr.pmc.ucsc.edu/nifH_Database_Public/, 2014년 4월 4일)로부터의 서열과 적어도 60 %, 70 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 96 %, 98 %, 99 % 또는 99 % 초과 서열 동일성을 가진 폴리펩타이드를 인코딩하는 서열을 포함할 수 있다. 일부 경우에, 본 개시내용의 방법 및 조성물과 함께 사용된 미생물은 Buckley lab NifH 데이터베이스, (Gaby, John Christian, and Daniel H. Buckley. "A comprehensive aligned nifH gene database: a multipurpose tool for studies of nitrogen-fixing bacteria." *Database* 2014 (2014): bau001.)로부터의 서열과 적어도 60 %, 70 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 96 %, 98 %, 99 % 또는 99 % 초과 서열 동일성을 가진 폴리펩타이드를 인코딩하는 서열을 포함할 수 있다.

[0139] 본원에 개시된 방법 및 조성물에 유용한 미생물은 천연 식물의 표면 또는 조직으로부터 미생물을 추출함으로써; 미생물을 분리하기 위해 종자를 분쇄함으로써; 다양한 토양 샘플에 종자를 심고 조직에서 미생물을 회수함으로써; 또는 외인성 미생물로 식물을 접종하고 식물 조직에 어떤 미생물이 나타나는지 결정함으로써 수득될 수 있다. 식물 조직의 비-제한적인 예는 종자, 묘목, 잎, 절단물, 식물, 구근 또는 괴경을 포함한다. 일부 경우에, 박테리아는 종자에서 분리된다. 샘플을 처리하기 위한 파라미터는 상이한 형태의 회합성 미생물, 예컨대 근권, 착생식물 또는 내생식물을 분리하도록 변화될 수 있다. 박테리아는 초기에 제 1 식물에서 분리하는 대신, 환경적 균주 수집과 같은 저장소로부터 공급될 수도 있다. 미생물은 분리된 미생물의 계통을 서열분석; 식물체내 군집의 조성을 프로파일링; 군집 또는 분리된 미생물의 전사 기능성을 특성규명; 또는 선택적 또는 표현형 배지 (예를 들어, 질소 고정 또는 포스페이트 가용화 표현형)을 사용하여 미생물 특징을 스크리닝함으로써 유전자형 및 표현형이 될 수 있다. 선택된 후보 균주 또는 모집단은 서열 데이터; 표현형 데이터; 식물 데이터 (예를 들어, 계통, 표현형, 및/또는 수율 데이터); 토양 데이터 (예를 들어, pH, N/P/K 함량 및/또는 벌크 토양 생물 군

집); 또는 이들의 임의의 조합을 통해 수득될 수 있다.

[0140] 본원에 기재된 박테리아 및 박테리아를 생산하는 방법은 식물 방어 반응을 손상시키지 않으면서 잎 표면, 뿌리 표면, 또는 식물 조직 내부에서 효율적으로 자가-증식할 수 있는 박테리아, 또는 식물 방어 반응에 내성인 박테리아에 적용할 수 있다. 본원에 기재된 박테리아는 식물 조직 추출물 또는 잎 표면 세척을 질소가 첨가되지 않은 배지에서 배양함으로써 단리될 수 있다. 그러나, 박테리아는 배양불가능할 수 있다, 즉, 당업계에서 공지된 표준 방법을 사용하여 배양가능한 것으로 알려져 있지 않거나 배양하기 어려울 수 있다. 본원에 기재된 박테리아는 식물 근권 (근권 박테리아)에 서식하는 내생식물 또는 착생식물 또는 박테리아일 수 있다. 유전자 변이의 도입, 복수의 식물에의 노출, 및 특성이 개선된 식물로부터 1 회 이상 (예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 25 회 이상) 박테리아를 단리하는 단계를 반복한 후 수득된 박테리아는 내생식물성, 착생식물성 또는 근권성일 수 있다. 내생식물은 질병 증상을 일으키거나 공생 구조의 형성을 유발하지 않고 식물의 내부로 진입하는 유기체이며, 이들이 (예를 들어 질소 고정을 통해) 식물 성장을 향상시키고 식물의 영양을 개선시킬 수 있기 때문에 농업에 관심이 있다. 박테리아는 종자-전염 내생식물일 수 있다. 종자-전염 내생식물은 잔디 또는 식물의 종자와 관련되거나 그로부터 유래된 박테리아, 예컨대 성숙, 건조, 미손상된 (예를 들어, 균열 없음, 눈에 보이는 곰팡이 감염, 또는 조기 발아된) 종자에서 발견된 종자감염 박테리아 내생식물을 포함합니다. 종자감염 박테리아 내생식물은 종자의 표면과 관련되거나 종자 표면으로부터 유래될 수 있으며; 대안적으로, 또는 추가로, 이는 (예를 들어, 표면-살균 종자의) 내부 종자 구획과 관련되거나 이로부터 유래될 수 있다. 일부 경우에, 종자감염 박테리아 내생식물은 식물 조직 내에서, 예를 들어, 종자의 내부에서 복제할 수 있다. 또한, 일부 경우에, 종자감염 박테리아 내생식물은 건조에 생존할 수 있다.

[0141] 본 개시내용의 방법에 따라 단리된, 또는 본 개시내용의 방법 또는 조성물에 사용된 박테리아는 복수의 상이한 박테리아 분류군을 조합하여 포함할 수 있다. 예로써, 박테리아는 프로테오박테리아 (예 : 슈도모나스, 엔테로박터, 스테노트로포모나스, 부르크홀데리아, 리조비움, 허바스피리움, 파노토에아, 세라티아, 라벨라, 아조스피리움, 아조르히조비움, 아조토박터, 두가벨라, 텔프티아, 브라디르히조비움, 시노르히조비움 및 할로모나스), 피르미쿠테스 (예컨대 바실러스, 파에니바실러스, 락토바실러스, 미코플라스마, 및 아세타박테리움), 및 악티노박테리아 (예컨대 스트렙토마이세스, 로다코쿠스, 마이크로박테리움, 및 쿠르트박테리움)을 포함할 수 있다. 본 개시내용의 방법 및 조성물에 사용된 박테리아는 2 종 이상의 질소 고정 박테리아 컨소시엄을 포함할 수 있다. 일부 경우에, 박테리아 컨소시엄의 하나 이상의 박테리아 종은 질소를 고정시킬 수 있다. 일부 경우에, 박테리아 컨소시엄의 하나 이상의 종은 질소를 고정시키는 다른 박테리아의 능력을 촉진 또는 향상시킬 수 있다. 질소를 고정시키는 박테리아 및 다른 박테리아의 질소 고정 능력을 향상시키는 박테리아는 동일 또는 상이할 수 있다. 일부 예에서, 박테리아 군주는 상이한 박테리아 군주 또는 특정 박테리아 컨소시엄과 조합으로 사용될 때 질소를 고정시킬 수 있지만, 단일재배에서 질소를 고정할 수는 없을 수 있다. 질소 고정 박테리아 컨소시엄에서 발견될 수 있는 박테리아 속의 예는, 비제한적으로, 허바스피리움, 아조스피리움, 엔테로박터, 및 바실러스를 포함한다.

[0142] 본원에 개시된 방법에 의해 생산될 수 있는 박테리아는 아조토박터 sp., 브라디르히조비움 sp. 클레브시엘라 sp. 및 시노르히조비움 sp.를 포함한다. 일부 경우에, 박테리아는 하기로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다: 아조토박터 비벨란디이, 브라디르히조비움 자포니쿰, 클레브시엘라 뉴모니아에, 및 시노르히조비움 펠로티. 일부 경우에, 박테리아는 엔테로박터 또는 라벨라 속일 수 있다. 일부 경우에, 박테리아는 프랑키아(Frankia) 또는 클로스트리듐 속일 수 있다. 클로스트리듐 속 세균의 예는, 비제한적으로, 클로스트리듐 아세토부틸리쿰, 클로스트리듐 파스테우리아눔, 클로스트리듐 베이제린치이, 클로스트리듐 퍼프린젠스, 및 클로스트리듐 테타니를 포함한다. 일부 경우에, 박테리아는 파에니바실러스 속, 예를 들어, 파에니바실러스 아조토평산스 (Paenibacillus azotofixans), 파에니바실러스 보레알리스(Paenibacillus borealis), 파에니바실러스 두루스 (Paenibacillus durus), 파에니바실러스 마세란스(Paenibacillus macerans), 파에니바실러스 폴리믹사 (Paenibacillus polymyxa), 파에니바실러스 알베이(Paenibacillus alvei), 파에니바실러스 아밀로리티쿠스 (Paenibacillus amylolyticus), 파에니바실러스 캄피나센시스(Paenibacillus campinasensis), 파에니바실러스 치벤시스(Paenibacillus chibensis), 파에니바실러스 글루카놀리티쿠스(Paenibacillus glucanolyticus), 파에니바실러스 일리노이센시스(Paenibacillus illinoisensis), 파에니바실러스 라르바에(Paenibacillus larvae) subsp. 라르바에, 파에니바실러스 라르바에 subsp. 풀비파시엔스(Pulvifaciens), 파에니바실러스 라우투스 (Paenibacillus lautus), 파에니바실러스 마세란스(Paenibacillus macerans), 파에니바실러스 막쿠아리엔시스 (Paenibacillus macquariensis), 파에니바실러스 막쿠아리엔시스, 파에니바실러스 파블리(Paenibacillus pabuli), 파에니바실러스 페오리아에(Paenibacillus peoriae), 또는 파에니바실러스 폴리믹사일 수 있다.

[0143] 일부 예에서, 본 개시내용의 방법에 따라 분리된 박테리아는 하기 분류군 중 하나 이상의 구성원일 수 있다: 아크로모박터(*Achromobacter*), 아시디티오바실러스(*Acidithiobacillus*), 아시도보락스(*Acidovorax*), 아시도보라즈(*Acidovoraz*), 아시네토박터(*Acinetobacter*), 악티노플라네스(*Actinoplanes*), 아들러크레우트지아(*Adlercreutzia*), 아에로코쿠스(*Aerococcus*), 아에로모나스(*Aeromonas*), 아피피아(*Afipia*), 아그로마이세스(*Agromyces*), 안실로박터(*Ancylobacter*), 아르트로박터(*Arthrobacter*), 아토포스티페스(*Atopostipes*), 아조스피릴룸(*Azospirillum*), 바실러스, 브델로비브리오(*Bdellovibrio*), 베이제린치아(*Beijerinckia*), 보세아(*Bosea*), 브라디르히조비움, 브레비바실러스, 브레분디모나스(*Brevundimonas*), 부르크홀데리아, 칸디다투스 할로레디비부스(*Candidatus Haloredivivus*), 카울로박터(*Caulobacter*), 셀룰로모나스(*Cellulomonas*), 셀비브리오(*Cellvibrio*), 크리세오박테리움(*Chryseobacterium*), 시트로박터(*Citrobacter*), 클로스트리듐, 코랄리오마르가리타(*Coralimargarita*), 코리네오박테리움(*Corynebacterium*), 쿠프리아비두스(*Cupriavidus*), 쿠르토박테리움(*Curtobacterium*), 쿠르비박터(*Curvibacter*), 데이노코쿠스(*Deinococcus*), 델프트아(*Delftia*), 데셈지아(*Desemzia*), 데보시아(*Devosia*), 독도넬라(*Dokdonella*), 디엘라(*Dyella*), 엔히드로박터(*Enhydrobacter*), 엔테로박터(*Enterobacter*), 엔테로코쿠스(*Enterococcus*), 에르위니아, 에스케리치아(*Escherichia*), 에스케리치아/쉬겔라(*Shigella*), 엑시구오박테리움(*Exiguobacterium*), 페로글로부스(*Ferroglobus*), 필리모나스(*Filimonas*), 피네골디아(*Finegoldia*), 플라비솔리박터(*Flavisolibacter*), 플라보박테리움(*Flavobacterium*), 프리고리박테리움(*Frigoribacterium*), 글루코나세토박터(*Gluconacetobacter*), 하프니아(*Hafnia*), 할로바쿨룸(*Halobaculum*), 할로모나스(*Halomonas*), 할로심플렉스(*Halosimplex*), 허바스피릴룸, 히메노박터(*Hymenobacter*), 클레브시엘라, 코쿠리아(*Kocuria*), 코사코니아(*Kosakonia*), 락토바실러스, 레클레르시아(*Leclercia*), 렌트제아(*Lentzea*), 루테이박터(*Luteibacter*), 루테이모나스(*Luteimonas*), 마스실리아(*Massilia*), 메소르히조비움(*Mesorhizobium*), 메틸박테리움, 마이크로박테리움, 마이크로코쿠스(*Micrococcus*), 마이크로비르가(*Microvirga*), 마이코박테리움(*Mycobacterium*), 네이스세리아(*Neisseria*), 노카르디아(*Nocardia*), 오세아니바쿨룸(*Oceanibaculum*), 오크로박트럼(*Ochrobactrum*), 오키박테리움(*Okibacterium*), 올리고트로파(*Oligotropha*), 오리지후무스(*Oryzihumus*), 옥살로파구스(*Oxalophagus*), 파에니바실러스, 판테오아(*Panteoa*), 판토에아(*Pantoea*), 펠로모나스(*Pelomonas*), 페르루시디바카(*Perlucidibaca*), 플란티박터(*Plantibacter*), 폴리뉴클레오박터(*Polynucleobacter*), 프로피오니박테리움(*Propionibacterium*), 프로피오니시클라바(*Propioniciclava*), 슈도클라비박터(*Pseudoclavibacter*), 슈도모나스, 슈도노카르디아(*Pseudonocardia*), 슈독산토모나스(*Pseudoxanthomonas*), 사이크로박터(*Psychrobacter*), 랄스토니아(*Ralstonia*), 라인헤이메라(*Rheinheimera*), 리조비움(*Rhizobium*), 로도코쿠스(*Rhodococcus*), 로도슈도모나스(*Rhodopseudomonas*), 로세아텔레스(*Roseateles*), 루미노코쿠스(*Ruminococcus*), 세발델라(*Sebaldella*), 세디미니바실러스(*Sediminibacillus*), 세디미니박테리움(*Sediminibacterium*), 세라티아(*Serratia*), 쉬겔라, 쉬넬라(*Shinella*), 시노르히조비움, 시노스포랑기움(*Sinosporangium*), 스펅고박테리움(*Sphingobacterium*), 스펅고모나스(*Sphingomonas*), 스펅고픽시스(*Sphingopyxis*), 스펅고시니셀라(*Sphingosinicella*), 스탕필로코쿠스(*Staphylococcus*), 25 스테노트로포모나스(*Stenotrophomonas*), 스트레노트로포모나스(*Strenotrophomonas*), 스트렙토코쿠스, 스트렙토마이세스, 스티기올로부스(*Stygiolobus*), 설푸리스파에라(*Sulfurisphaera*), 타투멜라(*Tatumella*), 테피디모나스(*Tepidimonas*), 테르모모나스(*Thermomonas*), 티오바실러스(*Thiobacillus*), 바리오보락스(*Variovorax*), WPS-2 제네라 인세르타에 세디스(*genera incertae sedis*), 크산토모나스(*Xanthomonas*), 및 짐머만넬라(*Zimmermannella*).

[0144] 박테리아는 호수와 강의 퇴적물, 물 그리고 생물상을 포함하는 이의 토양, 식물, 곰팡이, 동물 (무척추 동물 포함) 및 기타 생물상을 포함하는 임의의 일반 육지 환경; 해양 환경, 이의 생물상 및 퇴적물 (예를 들어, 해수, 해양 진흙, 해양 식물, 해양 무척추 동물 (예를 들어, 해면동물), 해양 척추 동물 (예를 들어, 물고기)); 육지 및 해양 지구 (표토 및 암석, 예를 들어, 쇄석된 지하 암, 모래 및 점토); 빙권 및 그 용융수; 대기 (예를 들어, 여과된 공중 먼지, 구름 및 빗방울); 도시, 산업 및 기타 인공 환경 (예를 들어, 콘크리트, 길가 흙통, 지붕 표면, 및 노면에 축적된 유기 및 무기 물질)로부터 수득될 수 있다.

[0145] 박테리아가 수득되는 식물은 하나 이상의 바람직한 특성을 가지고 있는 식물, 예를 들어 특정 환경에서 또는 특정 관심 조건 하에서 자연적으로 성장하는 식물일 수 있다. 예로써, 특정 식물은 사질 토양이나 염분이 높은 모래에서, 또는 극한의 온도 하에서, 또는 거의 물 없이 자연적으로 성장할 수 있거나, 환경에 존재하는 특정 해충이나 질병에 내성을 가질 수 있으며, 특히 이들이, 예를 들어, 특정한 지리학적 위치에서 이용가능한 유일한 조건이면, 상업적 작물이 그러한 조건에서 성장되는 것이 바람직할 수 있다. 추가 예의 방식으로써, 박테리아는 그러한 환경에서 성장된 상업적 작물로부터, 또는 보다 구체적으로 임의의 특정 환경에서 성장된 작물 중에서 관심 특성을 가장 잘 나타내는 개별 작물 식물: 예를 들어, 식염수-제한 토양에서 성장된 작물 중에서 가장 빨리-성장하는 식물, 또는 심각한 곤충 손상 또는 질병 전염병에 노출된 작물에서 가장 손상이 적은 식물, 또는

섬유 함량, 오일 함량, 기타 등등을 포함하는, 원하는 양의 특정 대사산물 및 기타 화합물을 가지고 있는 식물, 또는 바람직한 색, 맛 또는 냄새를 표시하는 식물로부터 수집될 수 있다. 박테리아는, 미리 언급된 바와 같이 진균 그리고 다른 동물 및 식물 생물상, 토양, 물, 퇴적물, 및 환경의 다른 요소를 포함하여, 관심 식물 또는 관심 환경에서 발생하는 임의의 물질로부터 수집될 수 있다.

[0146] 박테리아는 식물 조직으로부터 단리될 수 있다. 이 단리는 예를 들어 뿌리, 줄기 및 잎, 식물 생식 조직을 포함하는 식물에서 임의의 적절한 조직으로부터 발생할 수 있다. 예로써, 식물로부터 통상적인 단리 방법은 전형적으로 관심 식물 물질 (예를 들어 뿌리 또는 줄기 길이, 잎)의 멸균 절제, 적절한 용액 (예를 들어 2 % 차아염소산 나트륨)으로 표면 멸균을 포함하며, 그 후 식물 물질은 미생물 성장용 영양 배지에 배치된다. 대안적으로, 표면-살균된 식물 물질은, 적합한 고체 한천 배지의 표면에 퍼진 분쇄된 식물 물질의 작은 조각을 포함하는, 멸균 액체 (보통 물) 및 액체 현탁액, 또는 선택적일 수 있거나 아닐 수 있는 (예를 들어, 인의 공급원으로 피트산만 포함하는), 배지에서 분쇄될 수 있다. 이러한 접근법은 단리된 콜로니를 형성하고 영양 배지의 플레이트를 분리하기 위해 개별적으로 떨어질 수 있고, 널리 공지된 방법에 의해 단일 종으로 추가로 정제될 수 있는 박테리아에 특히 유용하다. 대안적으로, 식물 뿌리 또는 잎 샘플은 표면 살균되지 않을 수 있지만 단리 공정에서 표면-거주 착생식물성 미생물을 포함하여 부드럽게 세척될 뿐이거나, 착생식물성 미생물은, 식물 뿌리 조각, 줄기 또는 잎의 조각을 한천 배지의 표면에 각인시키고 그 다음 위와 같이 개별 콜로니를 단리시킴으로써, 개별적으로 단리될 수 있다. 이 접근법은, 예를 들어, 박테리아에 특히 유용하다. 대안적으로, 뿌리는 뿌리에 부착된 소량의 토양을 세척제거없이 처리될 수 있으며, 따라서 식물 권근을 콜로니화하는 미생물을 포함할 수 있다. 그렇지 않으면, 뿌리에 부착된 토양은 제거될 수 있고, 희석될 수 있고 적절한 선택성 및 비-선택성 배지의 한천에 뿌려져서 권근성 박테리아의 개별 콜로니를 단리시킬 수 있다.

[0147] 라벨라 아쿠아틸리스 및 엔테로박터 사카리의 생물학적으로 순수한 배양물은 2015년 7월 14일 미국 버지니아주 마나사스에 있는 American Type Culture Collection (ATCC; International Depository Authority)에 기탁되었으며, ATCC 특허 기탁 번호 PTA-122293 및 PTA-122294으로 각각 지정되었다. 이들 기탁은 특허 절차 및 규정 (부다페스트 조약)의 목적으로 미생물 기탁에 대한 국제 인정에 관한 부다페스트 조약의 규정에 따라 이루어졌다.

[0148] 조성물

[0149] 본원에 기재된 방법에 따라 생산된 박테리아 또는 박테리아 모집단을 포함하고/하거나 본원에 기재된 바와 같은 특징을 가지고 있는 조성물은 액체, 발포체, 또는 건조 생성물의 형태일 수 있다. 일부 예에서, 박테리아 모집단을 포함하는 조성물은 건조 분말, 분말 및 물의 슬러리, 또는 유동성 종자 처리물의 형태일 수 있다.

[0150] 조성물은 연속 교반 탱크 반응기, 배치 반응기와 같은 생물 반응기에서, 그리고 농장에서 제조될 수 있다. 일부 예에서, 조성물은 물병과 같은 용기에서 또는 미니 벌크에서 저장될 수 있다. 일부 예에서, 조성물은 병, 단지, 앰플, 패키지, 용기, 백, 박스, 뚜껑있는 상자, 봉투, 판지상자, 컨테이너, 사일로, 선적 컨테이너, 트럭 베드 및/또는 또는 케이스로 이루어진 군으로부터 선택된 물체 내에서 저장될 수 있다.

[0151] 조성물은 또한 식물 특성을 개선시키는데 사용될 수 있다. 일부 예에서, 하나 이상의 조성물은 종자 상에 코팅될 수 있다. 일부 예에서, 하나 이상의 조성물은 묘목에 코팅될 수 있다. 일부 예에서, 하나 이상의 조성물은 종자의 표면에 코팅될 수 있다. 일부 예에서, 하나 이상의 조성물은 종자 표면 위의 층으로서 코팅될 수 있다. 일부 예에서, 종자 상에 코팅되는 조성물은 액체 형태, 건조 생성물 형태, 발포체 형태, 분말 및 물의 슬러리 형태, 또는 유동성 종자 처리물일 수 있다. 일부 예에서, 하나 이상의 조성물은 하나 이상의 조성물로 종자 및/또는 묘종을 분무, 침지, 코팅, 캡슐화, 및/또는 살포함으로써 종자 및/또는 묘목에 적용될 수 있다. 일부 예에서, 다중 박테리아 또는 박테리아 모집단은 식물의 종자 및/또는 묘목에 코팅될 수 있다. 일부 예에서, 박테리아 조합의 적어도 2 개, 적어도 3 개, 적어도 4 개, 적어도 5 개, 적어도 6 개, 적어도 7 개, 적어도 8 개, 적어도 9 개, 적어도 10 개 또는 10 개 초과 박테리아는 하기 속 중 하나로부터 선택될 수 있다: *아시도보락스*, *아그로박테리움*, *바실러스*, *부르크홀데리아*, *크리세오박테리움*, *쿠르트박테리움*, *엔테로박터*, *에스케리치아*, *메틸로박테리움*, *파에니바실러스*, *판토에아*, *슈도모나스*, *랄스토니아*, *사카리바실러스(Saccharibacillus)*, *스핑크모나스*, 및 *스테노트로포모나스*.

[0152] 일부 예에서, 내생식물성 조합의 박테리아 모집단 그리고 박테리아의 적어도 2 개, 적어도 3 개, 적어도 4 개, 적어도 5 개, 적어도 6 개, 적어도 7 개, 적어도 8 개, 적어도 9 개, 적어도 10 개, 또는 10 개 초과는 하기 과 중 하나로부터 선택된다: *바실라세아에(Bacillaceae)*, *부르크홀데리아세아에(Burkholderiaceae)*, *코마모나다세아에(Comamonadaceae)*, *엔테로박테리아세아에(Enterobacteriaceae)*, *플라보박테리아세아에*

(*Flavobacteriaceae*), 메틸로박테리아세아에(*Methylobacteriaceae*), 마이크로박테리아세아에(*Microbacteriaceae*), 파에니바실릴레아에(*Paenibacillileae*), 슈도모나세아에(*Pseudomonaceae*), 리조비아세아에(*Rhizobiaceae*), 스팅고모나다세아에(*Sphingomonadaceae*), 크산토모나다세아에(*Xanthomonadaceae*), 클라도스포리아세아에(*Cladosporiaceae*), 그노모니아세아에(*Gnomoniaceae*), 인세르타에 세디스(*Incertae sedis*), 라시오스파에리아세아에(*Lasioisphaeriaceae*), 네트리아세아에(*Netriaceae*), 및 플레오스포라세아에(*Pleosporaceae*).

[0153] 일부 예에서, 내생식물성 조합의 박테리아 모집단 그리고 박테리아의 적어도 2 개, 적어도 3 개, 적어도 4 개, 적어도 5 개, 적어도 6 개, 적어도 7 개, 적어도 8 개, 적어도 9 개, 적어도 10 개, 또는 10 개 초과는 하기 과 중 하나로부터 선택된다: 바실라세아에, 부르크홀데리아세아에, 코마모나다세아에, 엔테로박테리아세아에, 플라보박테리아세아에, 메틸로박테리아세아에, 마이크로박테리아세아에, 파에니바실릴레아에, 슈도모나세아에, 리조비아세아에, 스팅고모나다세아에, 크산토모나다세아에, 클라도스포리아세아에, 그노모니아세아에, 인세르타에 세디스, 라시오스파에리아세아에, 네트리아세아에, 및 플레오스포라세아에.

[0154] 조성물의 예는 상업적으로 중요한 농업 작물, 예를 들어, 수수, 카놀라, 토마토, 딸기, 보리, 쌀, 옥수수, 및 밀용 종자 코팅물을 포함할 수 있다. 조성물의 예는 또한 옥수수, 대두, 카놀라, 수수, 감자, 쌀, 야채, 곡류 및 지방 종자용 종자 코팅물을 포함할 수 있다. 본원에 제공된 바와 같은 종자는 유전자 변형 유기체 (GMO), 비-GMO, 유기성 또는 통상적일 수 있다. 일부 예에서, 조성물은 식물 공중 부에 분무되거나, 식물 종자가 식재되는 고랑에 삽입하거나, 토양에 물을 주거나, 조성물의 현탁액에 뿌리를 담그어 뿌리에 적용될 수 있다. 일부 예에서, 조성물은 세포 생존력 그리고 숙주 식물을 인공적으로 접종하고 콜로니화하는 능력을 유지하는 적절한 방식으로 탈수될 수 있다. 박테리아 종은 10^8 내지 10^{10} CFU/ml의 농도로 조성물에 존재할 수 있다. 일부 예에서, 조성물에는 미량 금속 이온, 예컨대 폴리브덴 이온, 철 이온, 망간 이온, 또는 이들 이온의 조합이 보충될 수 있다. 본원에 기재된 바와 같은 조성물의 예에서 이온의 농도는 약 0.1 mM 내지 약 50 mM일 수 있다. 조성물의 일부 예는 또한 담체, 예컨대 베타-글루칸, 카르복실메틸셀룰로스 (CMC), 박테리아 세포의 중합체성 물질 (EPS), 당류, 동물성 우유, 또는 다른 적합한 담체와 함께 제형화될 수 있다. 일부 예에서, 이탄 또는 식재는 담체로서 사용될 수 있거나, 조성물이 바이오폴리머에 포획되는 바이오폴리머는 담체로서 사용될 수 있다.

[0155] 본원에 기재된 박테리아 모집단을 포함하는 조성물은 종자의 표면에 코팅될 수 있다. 이와 같이, 본원에 기재된 하나 이상의 박테리아로 코팅된 종자를 포함하는 조성물은 또한 고려된다. 종자 코팅물은 박테리아 모집단을 다공성, 화학적으로 불활성 과립상 담체와 혼합함으로써 형성될 수 있다. 대안적으로, 조성물은 종자가 식물 잎에 식재되거나 뿌려지는 고랑에 직접 삽입될 수 있거나 뿌리를 조성물의 현탁액에 침지시킴으로써 적용될 수 있다. 유효량의 조성물은 식물의 뿌리에 인접한 하층-토양 영역을 생존가능한 박테리아 성장으로 채우거나 식물의 잎을 생존가능한 박테리아 성장으로 채우는데 사용될 수 있다. 일반적으로, 유효량은 특성이 개선된 (예를 들어 원하는 수준의 질소 고정) 식물을 초래하기에 충분한 양이다.

[0156] 본원에 기재된 박테리아 조성물은 농업적으로 허용가능한 담체를 사용하여 제형화될 수 있다. 이들 구현예에 유용한 제형은 점착제, 미생물 안정제, 살진균제, 항균제, 보존제, 안정제, 계면활성제, 항-복합제, 제초제, 살선충제, 살충제, 식물 성장 조절제, 비료, 살서제, 건조제, 살균제, 영양소, 또는 이들의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 구성원을 포함할 수 있다. 일부 예에서, 조성물은 저장 안정성일 수 있다. 예를 들어, 본원에 기재된 임의의 조성물은 농업적으로 허용가능한 담체 (예를 들어, 비-천연 발생 비료와 같은 비료, 비-천연 발생 점착제와 같은 점착제, 및 비-천연 발생 농약과 같은 농약 중 하나 이상)을 포함할 수 있다. 비-천연 발생 점착제는, 예를 들어, 중합체, 공중합체 또는 합성 왁스일 수 있다. 예를 들어, 본원에 기재된 임의의 코팅된 종자, 묘목, 또는 식물은 종자 코팅물에 이와 같은 농업적으로 허용가능한 담체를 함유할 수 있다. 본원에 기재된 임의의 조성물 또는 방법에서, 농업적으로 허용가능한 담체는 비-천연 발생 화합물 (예를 들어, 비-천연 발생 비료, 비-천연 발생 점착제 예컨대 중합체, 공중합체, 또는 합성 왁스, 또는 비-천연 발생 농약)을 포함할 수 있다. 농업적으로 허용가능한 담체의 비-제한적인 예는 하기에 기재되어 있다. 농업적으로 허용가능한 담체의 추가 예는 당업계에 공지되어 있다.

[0157] 일부 경우에, 박테리아는 농업적으로 허용가능한 담체와 혼합된다. 담체는 고체 담체 또는 액체 담체일 수 있고, 미소구체, 분말, 에멀전 기타 등등을 포함하는 다양한 형태일 수 있다. 담체는 증가된 안정성, 습윤성 또는 분산성과 같은 다양한 특성을 부여하는 다수의 담체 중 임의의 하나 이상일 수 있다. 비이온성 또는 이온성 계면활성제일 수 있는, 천연 또는 합성 계면활성제와 같은 습윤제, 또는 이들의 조합은 조성물에 포함될 수 있다. 유중수 에멀전은 또한 단리된 박테리아를 포함하는 조성물을 제형화하는데 사용될 수 있다 (참조, 예를 들

어, 미국 특허 번호 7,485,451). 제조될 수 있는 적합한 제형은 습윤성 분말, 과립, 겔, 한천 스트립 또는 펠릿, 증점제 기타 등등, 미세캡슐화된 입자 기타 등등, 수성 유동화제, 수성 현탁액, 유중수 에멀전 등과 같은 액체를 포함한다. 제형은 곡물 또는 콩류 생산물, 예를 들어 분쇄된 곡물 또는 콩, 곡물 또는 콩, 전분, 당류 또는 오일로부터 유래된 즙 또는 밀가루를 포함할 수 있다.

[0158] 일부 구현예에서, 농업용 담체는 토양 또는 식물 성장 매지일 수 있다. 사용될 수 있는 다른 농업용 담체는 물, 비료, 식물계 오일, 습윤제, 또는 이들의 조합을 포함한다. 대안적으로, 농업용 담체는 규조토, 양토, 실리카, 알기네이트, 점토, 벤토나이트, 질석, 종자 케이스, 다른 식물 및 동물 제품, 또는 과립, 펠릿 또는 현탁액을 포함한 조합물과 같은 고체일 수 있다. 상기 언급된 성분들 중 임의의 혼합물은 또한 담체, 예컨대 비제한적으로 페스타 (밀가루 및 카울린 점토), 한천 또는 밀가루 기반 펠릿으로서 양토, 모래, 또는 점토 등에서 고려된다. 제형은 박테리아용 식품 공급원, 예컨대 보리, 쌀 또는 다른 생물학적 물질 예컨대 종자, 식물 부분, 사탕수수 바가스, 곡물 가공으로부터의 겉껍질 또는 줄기, 분쇄된 식물 물질 또는 건축 현장 쓰레기로부터의 목재, 종이, 식물, 또는 목재의 재활용으로부터의 톱밥 또는 작은 섬유를 포함할 수 있다.

[0159] 예를 들어, 비료는 성장 촉진을 돕거나 종자, 묘목 또는 식물에 영양분을 제공하는데 사용될 수 있다. 비료의 비-제한적인 예는 질소, 인, 칼륨, 칼슘, 황, 마그네슘, 붕소, 클로라이드, 망간, 철, 아연, 구리, 몰리브덴 및 셀레늄 (또는 그의 염)을 포함한다. 비료의 추가적인 예는 하나 이상의 아미노산, 염, 탄수화물, 비타민, 포도당, NaCl, 효모 추출물, $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 글리세롤, 발린, L-류신, 락트산, 프로피온산, 숙신산, 말산, 시트르산, KH 타르트레이트, 자일로스, 리코스, 및 레시틴을 포함한다. 일 구현예에서, 제형은 다른 활성제를 서브스텐스 (예를 들어, 종자의 표면)에 결합시키는 것을 돕기 위해 점착제 또는 점착제 (점착 제제로서 지칭됨)를 포함할 수 있다. 이러한 제제는 박테리아를 다른 화합물 (예를 들어, 생물학적으로 안정한 제어제)을 함유할 수 있는 담체와 조합하여 코팅 조성물을 산출하는데 유용하다. 이러한 조성물은 식물 또는 종자 주위에 코팅물을 창출을 도와 미생물 및 다른 제제와 식물 또는 식물 부분과의 접촉을 유지시킨다. 일 구현예에서, 점착제는 알기네이트, 검, 전분, 레시틴, 포모노네틴, 폴리비닐 알코올, 알칼리 포모노네티네이트, 헤스페레틴, 폴리비닐 아세테이트, 세팔린, 검 아라빅, 크산탄 검, 미네랄 오일, 폴리에틸렌 글리콜 (PEG), 폴리비닐 피롤리돈 (PVP), 아라비노-갈락탄, 메틸 셀룰로오스, PEG 400, 키토산, 폴리아크릴아미드, 폴리아크릴레이트, 폴리아크릴로니트릴, 글리세롤, 트리에틸렌 글리콜, 비닐 아세테이트, 젤란 검, 폴리스티렌, 폴리비닐, 카르복시메틸셀룰로스, 검 가티(Ghatti), 폴리옥시에틸렌-폴리옥시부틸렌 블록 공중합체로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0160] 일부 구현예에서, 점착제는 예를 들어 카르나우바 왁스, 밀랍, 차이니즈 왁스, 셀락 왁스, 스퍼마세티 왁스, 칸델릴라 왁스, 피마자 왁스, 오우리큐리(ouricury) 왁스 및 쌀겨 왁스와 같은 왁스, 다당류 (예를 들어, 전분, 텍스트린), 말토텍스트린, 알기네이트, 및 키토산), 지방, 오일, 단백질 (예를 들어, 젤라틴 및 제인), 검 아라블레스(arabes) 및 셀라일 수 있다. 점착제는 비-천연 발생 화합물, 예를 들어 중합체, 공중합체, 및 왁스일 수 있다. 예를 들어, 점착 제제로서 사용될 수 있는 중합체의 비-제한적인 예는 하기를 포함한다: 폴리비닐 아세테이트, 폴리비닐 아세테이트 공중합체, 에틸렌 비닐 아세테이트 (EVA) 공중합체, 폴리비닐 알코올, 폴리비닐 알코올 공중합체, 셀룰로스 (예를 들어, 에틸셀룰로스, 메틸셀룰로스, 히드록시메틸셀룰로스), 히드록시프로필셀룰로스, 및 카르복시메틸셀룰로스), 폴리비닐피롤리돈, 염화 비닐, 염화 비닐리덴 공중합체, 칼슘 리그노설포네이트, 아크릴 공중합체, 폴리비닐아크릴레이트, 폴리에틸렌 옥사이드, 아실아미드 중합체 및 공중합체, 폴리히드록시에틸 아크릴레이트, 메틸아크릴아미드 단량체, 및 폴리클로로프렌.

[0161] 일부 예에서, 하나 이상의 점착 제제, 항-진균 제제, 성장 조절제 및 농약 (예를 들어, 살충제)는 (예를 들어, 임의의 조합으로) 비-천연 발생 화합물이다. 농업적으로 허용가능한 담체의 추가 예는 분산제 (예를 들어, 폴리비닐피롤리돈/비닐 아세테이트 PVPIVA S-630), 계면활성제, 결합제, 및 충전제를 포함한다.

[0162] 제형은 또한 계면활성제를 함유할 수 있다. 계면활성제의 비-제한적인 예는 질소-계면활성제 블렌드, 예컨대 Prefer 28 (Cenex), Surf-N (US), Inhance (Brandt), P-28 (Wilfarm) 및 Patrol (Helena)를 포함하고; 에스테르화된 종자 오일은 Sun-It II (AmCy), MSO (UAP), Scoil (Agasco), Hasten (Wilfarm) 및 Mes-100 (Drexel)을 포함하고; 그리고 유기-실리콘 계면활성제는 Silwet L77 (UAP), Silikin (Terra), Dyne-Amic (Helena), Kinetic (Helena), Sylgard 309 (Wilbur-Ellis) 및 Century (Precision)을 포함한다. 일 구현예에서, 계면활성제는 0.01 % v/v 내지 10 % v/v의 농도로 존재한다. 또 다른 구현예에서, 계면활성제는 0.1 % v/v 내지 1 % v/v의 농도로 존재한다.

[0163] 특정 경우에, 제형은 미생물 안정제를 포함한다. 이와 같은 제제는 건조제를 포함할 수 있으며, 상기 건조제는 액체 점착제에 대해 실제로 건조 효과를 가진 농도로 화합물 또는 화합물들이 사용되는지에 관계없이 건조제로

분류될 수 있는 임의의 화합물 또는 화합물들의 혼합물을 포함할 수 있다. 이와 같은 건조제는 사용된 박테리아 모집단과 이상적으로 양립 가능하며, 종자에 대한 적용에서 생존하고 건조에서 생존하는 미생물 모집단의 능력을 촉진시켜야 한다. 적합한 건조제의 예는 트레할로스, 수크로스, 글리세롤, 및 메틸렌 글리콜 중 하나 이상을 포함한다. 다른 적합한 건조제는 비제한적으로 비 환원 당류 및 당 알코올 (예를 들어, 만니톨 또는 소르비톨) 을 포함한다. 제형에 도입된 건조제의 양은 중량/부피 기준으로 약 5 % 내지 약 50 %, 예를 들어 약 10 % 내지 약 40 %, 약 15 % 내지 약 35 %, 또는 약 20 % 내지 약 30 % 범위일 수 있다. 일부 경우에, 제제가 살진균제, 항균제, 제초제, 살선충제, 살충제, 식물 성장 조절제, 살서제, 살균제, 또는 영양소와 같은 제제를 함유하는 것이 유리하다. 일부 예에서, 제제는 종자 표면-매개 병원체에 대한 보호를 제공하는 보호제를 포함할 수 있다. 일부 예에서, 보호제는 토양-매개 병원체의 어느 정도의 제어 수준을 제공할 수 있다. 일부 예에서, 보호제는 종자 표면에서 주로 효과적일 수 있다.

[0164] 일부 예에서, 살진균제는, 화학적 또는 생물학적이든, 곰팡이의 성장을 억제하거나 곰팡이를 사멸시킬 수 있는 화합물 또는 제제를 포함할 수 있다. 일부 예에서, 살진균제는 정진균성 또는 살진균성일 수 있는 화합물을 포함할 수 있다. 일부 예에서, 살진균제는, 종자 표면-매개 병원체에 대한 보호를 제공하고 토양-매개 병원체에 대한 어느 정도의 제어 수준을 제공하는, 종자 표면에 주로 효과적인 제제 또는, 보호제일 수 있다. 보호 살진균제의 비-제한적인 예는 캡탄, 마네브(maneb), 티람(thiram) 또는 플루디옥소닐(fludioxonil)을 포함한다.

[0165] 일부 예에서, 살진균제는 침투성 살진균제(systemic fungicide)일 수 있어서, 이는 신생 모종에 흡수되어 숙주 식물 조직 내부의 진균을 억제 또는 사멸시킬 수 있다. 종자 처리에 사용되는 침투성 살진균제는 비제한적으로 하기를 포함한다: 아쿠시스트로빈, 카르복신, 메페녹삼, 메탈락실, 티아벤다졸, 트리플록시스트로빈, 및 디페노코나졸, 이프코나졸, 테부코나졸 및 트리티코나졸을 포함하는 다양한 트리아졸 살진균제. 메페녹삼 및 메탈락실은 주로 물곰팡이 진균 피티움(Pythium) 및 피토프토라(Phytophthora)를 표적하는데 사용된다. 일부 살진균제는, 식물 중에 따라, 병원성 진균 종의 감도에서의 미묘한 차이 때문에, 또는 식물의 살진균제 분포 또는 감도에서의 차이 때문에, 다른 것보다 바람직하다. 일부 예에서, 살진균제는 박테리아 또는 진균과 같은 생물학적 제어제일 수 있다. 이와 같은 유기체는 병원성 진균에 기생할 수 있거나, 진균의 성장을 사멸 또는 달리 방지할 수 있는 독소 또는 다른 서브스턴스를 분비할 수 있다. 임의의 유형의 살진균제, 특히 식물에 일반적으로 사용되는 살진균제는 종자 조성물에서 제어제로서 사용될 수 있다.

[0166] 일부 예에서, 종자 코팅 조성물은 항균 특성을 가진 제어제를 포함한다. 일 구현예에서, 항균 특성을 가진 제어제는 본원의 다른 곳에 기재된 화합물로부터 선택된다. 또 다른 구현예에서, 화합물은 스트렙토마이신, 옥시테트라사이클린, 옥솔린산, 또는 젠타마이신이다. 종자 코팅 조성물의 일부로서 사용될 수 있는 항균성 화합물의 다른 예는 디클로로펜 및 벤질알코올 헤미 포르말 (ICI의 Proxel® 또는 Thor Chemie의 Acticide® RS 및 Rohm & Haas의 Kathon® MK 25) 그리고 이소티아졸리논 유도체 예컨대 알킬이소티아졸리논 및 벤즈이소티아졸리논 (Thor Chemie의 Acticide® MBS)를 기초로 한 것들을 포함한다.

[0167] 일부 예에서, 성장 조절제는 하기로 이루어진 군으로부터 선택된다: 아브시스산, 아미도클로르(amidochlor), 안시미돌(ancymidol), 6-벤질아미노퓨린(benzylaminopurine), 브라시놀리드(brassinolide), 부트랄린(butralin), 클로르메콰트(chlormequat) (클로르메콰트 클로라이드), 콜린 클로라이드, 시클라닐리드, 다미노지드(daminozide), 디케굴락(dikegulac), 디메티핀(dimethipin), 2,6-디메틸푸리딘, 에테폰(ethephon), 플루메트랄린(flumetralin), 플루프리미돌(flurprimidol), 플루티아세트(fluthiacet), 포르클로르페누론(forchlorfenuron), 지베렐린산, 이나벤피드(inabenfide), 인돌-3-아세트산, 말레산 하이드라이드, 메플루이다이드(mefluidide), 메피콰트(mepiquat) (메피콰트 클로라이드), 나프탈렌아세트산, N-6-벤질아데닌, 파클로부트라졸(paclobutrazol), 프로헥사디온 포스포트리티오에이트, 2,3,5-트리-요오도벤조산, 트리넥사팍-에틸(trinexapac-ethyl) 및 유니코나졸(uniconazole). 성장 조절제의 추가적인 비-제한적인 예는 브라시노스테로이드, 시토키닌 (예를 들어, 키네티 및 제아틴), 옥신 (예를 들어, 인돌릴아세트산 및 인돌릴아세틸 아스파르테이트), 플라보노이드 및 이소플라보노이드 (예를 들어, 포르모노네티 및 디오스메틴(diosmetin)), 피토아익신(phytoalexins) (예를 들어, 글리세올린(glyceollin)), 및 피토알렉신(phytoalexin)-유도 올리고당 (예를 들어, 펙틴, 키티, 키토산, 폴리갈라쿠론산, 및 올리고갈락투론산), 및 지벨레린(gibellerin)을 포함한다. 이와 같은 제제는 제형이 적용되는 농업 종자 또는 묘목과 이상적으로 호환가능하다 (예를 들어, 식물의 성장 또는 건강에 해롭지 않아야 한다). 또한, 상기 제제는 인간, 동물 또는 산업 용도에 대한 안전 문제를 일으키지 않는 이상적인 것이다 (예를 들어, 안전 문제가 없거나, 또는 식물로부터 유래된 물품 식물 제품이 무시할만한 양의 화합물을 함유할 정도로 화합물이 충분히 유연하다).

[0168] 선충-길항 생물제어제의 일부 예는 ARF18; 30 아트로보트리스(Arthrobotrys) 종; 차에토뮴(Chaetomium) 종; 실

린드로카르폰(*Cylindrocarpum*) 종; 엑소필리아(*Exophilia*) 종; 푸사륨(*Fusarium*) 종; 글리오클라둠(*Gliocladium*) 종; 히르수텔라(*Hirsutella*) 종; 레카니실룸(*Lecanicillium*) 종; 모나크로스포름(*Monacrosporium*) 종; 미로테시움(*Myrothecium*) 종; 네오코스모스포라(*Neocosmospora*) 종; 파에실로마이세스(*Paecilomyces*) 종; 포초니아(*Pochonia*) 종; 스타고노스포라(*Stagonospora*) 종; 내생균근, 부르크홀데리아 종; 파스테우리아 종, 브레비박실러스 종; 슈도모나스 종; 및 리조 박테리아를 포함한다. 특히 바람직한 선충-길항 생물제어제는 ARF18, 아트로보트리스 올리고스포라, 아트로보트리스 닥틸로이데스, 차에토름 글로보숨(*globosum*), 실린드로카르폰 헤테로네마(*heteronema*), 엑소필리아 진셀메이(*Exophilia jeanselmei*), 엑소필리아 피스시필라(*pisciphila*), 푸사리움 아스페르길루스(*Fusarium aspergillus*), 푸사리움 솔라니(*Fusarium solani*), 글리오클라둠 카테놀라툼(*Gliocladium catenulatum*), 글리오클라둠 로세움(*roseum*), 글리오클라둠 빅센스(*vixens*), 히르수텔라 로스실리엔시스(*Hirsutella rhossiliensis*), 히르수텔라 민네소텐시스(*minnesotensis*), 레카니실룸 레카니이(*Lecanicillium lecanii*), 모나크로스포름 드레크슬레리(*Monacrosporium drechleri*), 모나크로스포름 게피로파굼(*gephyropagum*), 미로테시움 베루카리아(*Myrothecium verrucaria*), 네오코스모스포라 바신팩타(*Neocosmospora vasinfecta*), 파에실로마이세스 릴라시누스(*Paecilomyces lilacinus*), 포초니아 클라미도스포리아(*Pochonia chlamydosporia*), 스타고노스포라 헤테로데라에(*Stagonospora heteroderae*), 스타고노스포라 파세올리(*phaseoli*), 내생균근, 부르크홀데리아 세파시아(*cepacia*), 파스테우리아 페네트란스(*penetrans*), 파스테우리아 토르네이(*thornei*), 파스테우리아 니시자와에(*nishizawae*), 파스테우리아 라모사(*ramosa*), 파스트루에이아 우사게(*Pastrueia usage*), 브레비박실러스 라테로스포르루스(*laterosporus*) 균주 G4, 슈도모나스 플루오레스센스(*fluorescens*) 및 리조박테리아를 포함한다.

[0169] 영양소의 일부 예는, 비제한적으로, 우레아, 질산 암모늄, 황산 암모늄, 비-압력 질소 용액, 액체 암모니아, 무수 암모니아, 티오황산 암모늄, 황-코팅 우레아, 우레아-포름알데히드, IBDU, 중합체-코팅 우레아, 질산 칼슘, 우레아포름, 및 메틸렌 우레아를 포함하는 질소 비료, 디암모늄 포스페이트, 모노암모늄 포스페이트, 암모늄 폴리포스페이트, 농축된 수퍼포스페이트 및 삼중 수퍼포스페이트와 같은 인 비료, 그리고 염화 칼륨, 황산 칼륨, 황산칼륨-망간, 질산 칼륨과 같은 칼륨 비료로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다. 이와 같은 조성물은 종자 코트 조성물 내에서 유리 염 또는 이온으로서 존재할 수 있다. 대안적으로, 영양소/비료는 시간이 지남에 따라 서방성을 제공하도록 복합화 또는 킬레이트화될 수 있다.

[0170] 살서제의 일부 예는 2-이소발레린단-1,3-디온, 4-(퀴녹살린-2-일아미노)벤젠 설펜아미드, 알파-클로로히드린, 알루미늄 포스파이드, 안투(*antu*), 산화 비소, 탄산 바륨, 비스티오세미(*bisthiosemi*), 브로디파코움(*brodifacoum*), 브로마디올론(*bromadiolone*), 브로메탈린(*bromethalin*), 시안화 칼슘, 클로랄로스, 클로로파시논, 콜레칼시페롤, 코우마클로르(*coumachlor*), 코우마푸릴(*coumafuryl*), 코우마테트라릴(*coumatetralyl*), 크리미딘(*crimidine*), 디페나코움(*difenacoum*), 디페티알론(*difethialone*), 디파시논(*diphacinone*), 에르고칼시페롤(*ergocalciferol*), 플로코우마펜(*flocoumafen*), 플루오로아세트아미드, 플루프로파딘(*flupropradine*), 플루프로파딘 히드로클로라이드, 시안화 수소, 요오도메탄, 린덴, 인화 마그네슘, 브롬화 메틸, 노르보르미드(*norbormide*), 포사세티움(*phosacetim*), 포스핀, 인, 핀돈(*pindone*), 아비산 칼륨, 피리누론(*pyrinuron*), 실리로사이드(*scilliroside*), 아비산 나트륨, 시안화 나트륨, 나트륨 플루오로아세테이트, 스트리크닌(*strychnine*), 황산 탈륨, 와파린 및 인화 아연으로 이루어진 서브스텐스의 군으로부터 선택된 포함할 수 있다.

[0171] 액체 형태, 예를 들어 용액 또는 현탁액에서, 박테리아 모집단은 물 또는 수용액에서 혼합되거나 현탁될 수 있다. 적합한 액체 희석제 또는 담체는 물, 수용액, 석유 증류액 또는 다른 액체 담체를 포함한다.

[0172] 고체 조성물은 이탄, 밀, 밀기울, 질석, 점토, 활석, 벤토나이트, 규조토, 풀러토, 저온살균 토양, 기타 등등과 같은 적절하게 분할된 고체 담체에 박테리아 모집단을 분산시킴으로써 제조될 수 있다. 이와 같은 제형이 습윤성 분말로서 사용되는 경우, 비이온성, 음이온성, 양쪽성, 또는 양이온성 분산 제제 및 에멀전화 제제와 같은 생물학적으로 적합한 분산제는 사용될 수 있다.

[0173] 제형화시 사용된 고체 담체는, 예를 들어, 카올린 클레이, 피로필라이트, 벤토나이트, 몬모릴로나이트, 규조토, 산성 백토, 질석, 및 펄라이트와 같은 무기물 담체, 및 황산 암모늄, 인산 암모늄, 질산 암모늄, 우레아, 염화 암모늄, 및 탄산 칼슘과 같은 무기 염류를 포함한다. 또한, 밀가루, 밀기울, 및 쌀겨와 같은 유기 미세 분말은 사용될 수 있다. 액체 담체는 대두유 및 면실유와 같은 식물성 오일, 글리세롤, 에틸렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 프로필렌 글리콜, 폴리 프로필렌 글리콜 등을 포함한다.

[0174] **작물에 박테리아 모집단의 적용**

[0175] 본원에 기재된 박테리아 또는 박테리아 모집단의 조성물은 고랑에서, 활석에서, 또는 종자 처리로서 적용될 수

있다. 조성물은 벌크, 미니 벌크, 백, 또는 탈크에서 종자 패키지에 적용될 수 있다.

[0176] 과종기는 처리된 종자를 심고 기존 방식, 쌍줄 또는 경작이 필요없는 방식에 따라 작물을 성장시킬 수 있다. 종자는 제어 호퍼 또는 개별 호퍼를 사용하여 분배될 수 있다. 종자는 유압 공기를 사용하거나 수동으로 분배될 수도 있다. 종자 배치는 가변 속도 기술을 사용하여 수행될 수 있다. 추가적으로, 본원에 기재된 박테리아 또는 박테리아 모집단의 적용은 가변 속도 기술을 사용하여 적용될 수 있다. 일부 예에서, 박테리아는 옥수수, 대두, 카놀라, 수수, 감자, 쌀, 야채, 곡류, 유사곡류 및 오일시드의 종자에 적용될 수 있다. 곡류의 예는 보리, 포니오, 귀리, 팔머 풀, 호밀, 진주 기장, 수수, 스펀트, 테프, 라이밀, 및 밀을 포함할 수 있다. 유사곡류의 예는 브레드넛, 메밀, 캣테일(cattail), 치아(chia), 아마, 곡물 아마란스, 한자(hanza), 퀴노아, 및 참깨를 포함할 수 있다. 일부 예에서, 종자는 유전자 변형 유기체 (GMO), 비-GMO, 유기 또는 통상적인 것일 수 있다.

[0177] 미세-비료, PGR, 제초제, 살충제 및 살진균제와 같은 첨가제는 추가로 사용하여 작물을 처리할 수 있다. 첨가제의 예는 살충제, 살선충제, 살진균제와 같은 작물 보호제, 착색제, 중합체, 펠릿화, 프라이밍 및 소독제와 같은 증강제, 및 접종제, PGR, 연화제, 및 미량 영양소와 같은 다른 제제를 포함한다. PGR은 뿌리 성장, 개화, 또는 줄기 높이에 영향을 미치는 천연 또는 합성 식물 호르몬일 수 있다. PGR은 옥신, 지베렐린, 시토키닌, 에틸렌, 및 아브시스산 (ABA)를 포함할 수 있다.

[0178] 조성물은 액체 비료와 조합되어 고랑에 적용될 수 있다. 일부 예에서, 액체 비료는 탱크에 보유될 수 있다. NPK 비료는 나트륨, 인, 및 칼륨의 다량 영양소를 함유한다.

[0179] 조성물은 식물 성장 촉진, 잎에서 높은 엽록소 함량 유지, 열매 또는 종자 수 증가, 그리고 열매 또는 종자 단위 중량 증가와 같은 식물 특성을 개선할 수 있다. 본 개시내용의 방법은 하나 이상의 다양한 바람직한 특성을 도입 또는 개선하는데 사용될 수 있다. 도입 또는 개선될 수 있는 특성의 예는 하기를 포함한다: 뿌리 바이오매스, 뿌리 길이, 높이, 싹 길이, 잎 수, 물 사용 효율, 전체 바이오매스, 수율, 열매 크기, 입자 크기, 광합성율, 가뭄에 대한 내성, 내열성, 염분 내성, 저 질소 스트레스에 대한 내성, 질소 사용 효율, 선충 스트레스에 대한 내성, 진균 병원체에 대한 내성, 박테리아 병원체에 대한 내성, 바이러스 병원체에 대한 내성, 대사산물의 수준, 대사산물의 수준의 조절, 프로테옴 발현. 높이, 전체 바이오매스, 뿌리 및/또는 싹 바이오매스, 종자 발아, 묘목 생존, 광합성 효율, 증산율, 종자/열매 수 또는 질량, 식물 입자 또는 열매 수율, 잎 엽록소 함량, 광합성 비율, 뿌리 길이, 또는 이들의 임의의 조합을 포함한 바람직한 특성은 성장을 측정하는데 사용될 수 있고, 동일한 조건 하에서 성장된 기준 농업 식물 (예를 들어, 도입된 및/또는 개선된 특성이 없는 식물)의 성장 속도와 비교될 수 있다. 일부 예에서, 높이, 전체 바이오매스, 뿌리 및/또는 싹 바이오매스, 종자 발아, 묘목 생존, 광합성 효율, 증산율, 종자/열매 수 또는 질량, 식물 입자 또는 열매 수율, 잎 엽록소 함량, 광합성 속도, 뿌리 길이, 또는 이들의 임의의 조합을 포함하는 바람직한 특성은 성장을 측정하는데 사용될 수 있고, 유사한 조건 하에서 성장된 기준 농업 식물 (예를 들어, 도입된 및/또는 개선된 특성이 없는 식물)의 성장 속도와 비교될 수 있다.

[0180] 숙주 식물에 대한 농업학적 특성은 상기 종자 처리 제형이 없는 종자로부터 성장된 등치선 식물과 비교하여, 하기를 비제한적으로 포함할 수 있다: 변경된 오일 함량, 변경된 단백질 함량, 변경된 종자 탄수화물 조성물, 변경된 종자 오일 조성물 및 변경된 종자 단백질 조성물, 내화학적, 내한성, 지연된 노화, 질병 저항성, 가뭄 내성, 이삭 중량, 성장 개선, 건강 증4진, 내열성, 제초제 내성, 초식 저항성 개선 질소 고정, 개선된 질소 이용률, 개선된 뿌리 구조, 개선된 물 사용 효율, 증가된 바이오매스, 증가된 뿌리 길이, 증가된 종자 중량, 증가된 싹 길이, 증가된 수율, 수분 제한 조건 하에서 증가된 수율, 낱알 질량, 낱알 수분 함량, 금속 내성, 이삭의 수, 이삭당 낱알 수, 꼬투리의 수, 영양 강화, 병원체 저항성, 해충 저항성, 광합성 능력 개선, 염분 내성, 스테이-그린(stay-green), 활력 개선, 성숙한 종자의 증가된 건조 중량, 성숙한 종자의 증가된 생 중량, 식물 당 성숙한 종자의 증가된 수, 증가된 엽록소 함량, 식물 당 꼬투리의 증가된 수, 식물 당 꼬투리의 증가된 길이, 식물 당 시든 잎의 감소된 수, 식물 당 심하게 시든 잎의 감소된 수, 및 식물 당 시들지 않은 잎의 증가된 수, 대사산물의 수준에서 검출가능한 조절, 전사체의 수준에서 검출가능한 조절, 및 프로테옴에서의 검출가능한 조절.

[0181] 일부 경우에, 식물은 접종된 식물의 식물 요소와 동일한 종의 식물로부터 단리되는 박테리아 또는 박테리아 모 집단으로 접종된다. 예를 들어, 하나의 다양한 제아 메이스(Zea mays) (옥수수)에서 정상적으로 발견되는 박테리아 또는 박테리아 모집단은 자연 상태에서 상기 박테리아 및 박테리아 모집단이 결여된 또 다른 다양한 제아 메이스의 식물의 식물 요소와 관련된다. 일 구현예에서, 박테리아 및 박테리아 모집단은 접종된 식물의 식물 요소로서 식물의 관련된 종의 식물로부터 유래된다. 예를 들어, 제아 디플로페렌니스 이틀리스(Zea diploperennis

Iltis) 등, (Diploperennial teosinte)에서 일반적으로 발견되는 박테리아 및 박테리아 모집단은 제아 메이스 (옥수수)에 적용되거나 그 반대로 마찬가지이다. 일부 경우에, 식물은 접종된 식물의 식물 요소와 이중성인 박테리아 및 박테리아 모집단으로 접종된다. 일 구현예에서, 박테리아 및 박테리아 모집단은 또 다른 종의 식물로부터 유래된다. 예를 들어, 일반적으로 쌍떡잎식물에서 발견되는 박테리아 및 박테리아 모집단은 외떡잎 식물에 적용 (예를 들어, 대두-유래된 박테리아 및 박테리아 모집단으로 옥수수를 접종)되거나 그 반대로 마찬가지이다. 다른 경우에, 식물에 접종될 박테리아 및 박테리아 모집단은 접종되고 있는 식물의 관련된 종으로부터 유래된다. 일 구현예에서, 박테리아 및 박테리아 모집단은 관련된 분류군, 예를 들어 관련된 종으로부터 유래된다. 또 다른 종의 식물은 농업 식물일 수 있다. 또 다른 구현예에서, 박테리아 및 박테리아 모집단은 임의의 숙주 식물 요소에 접종된 설계된 조성물의 일부이다.

[0182] 일부 예에서, 박테리아 또는 박테리아 모집단은 박테리아 및 박테리아 모집단이 접종된 식물과 상이한 식물로부터 단리되는 외인성이다. 예를 들어, 일 구현예에서, 박테리아 또는 박테리아 모집단은 접종된 식물과 동일한 종의 상이한 식물로부터 단리될 수 있다. 일부 경우에, 박테리아 또는 박테리아 모집단은 접종된 식물과 관련된 종으로부터 단리될 수 있다.

[0183] 일부 예에서, 본원에 기재된 박테리아 및 박테리아 모집단은 한 조직 유형에서 다른 조직 유형으로 이동할 수 있다. 예를 들어, 종자 외부에 코팅한 후 식물의 성숙한 조직 내에서 본 발명의 박테리아 및 박테리아 모집단의 검출 및 분리는 종자 외부에서 성숙 식물의 식물 조직으로 이동하는 능력을 증명한다. 따라서, 일 구현예에서, 박테리아 및 박테리아 모집단의 개체군은 종자 외부로부터 식물의 식물 조직으로 이동할 수 있다. 일 구현예에서, 식물의 종자에 코팅되는 박테리아 및 박테리아 모집단은, 종자를 식물 상태로 발아시, 식물의 다른 조직에 국한시킬 수 있다. 예를 들어, 박테리아 및 박테리아 모집단은, 하기를 포함하는, 식물에서의 조직 중 어느 하나에 국한시킬 수 있다: 뿌리, 부정근, 종자 5 근, 근모, 싹, 잎, 꽃, 새싹, 술, 분열조직, 꽃가루, 암술, 씨방, 수술, 열매, 기는 줄기, 근경, 뿌리혹, 덩이줄기, 모상체, 공변 세포, 배수 조직, 꽃잎, 꽃받침, 영포, 꽃대, 유관속 형성층, 체관부 및 물관부. 일 구현예에서, 박테리아 및 박테리아 모집단은 식물의 뿌리 및/또는 근모에 국한시킬 수 있다. 또 다른 구현예에서, 박테리아 및 박테리아 모집단은 식물의 광합성 조직, 예를 들어 잎 및 싹에 국한시킬 수 있다. 다른 경우에, 박테리아 및 박테리아 모집단은 식물의 유관속 조직에, 예를 들어, 물관부 및 체관부에서 국한된다. 더욱 또 다른 구현예에서, 박테리아 및 박테리아 모집단은 식물의 생식 조직 (꽃, 꽃가루, 암술, 씨방, 수술, 열매)에 국한시킬 수 있다. 또 다른 구현예에서, 박테리아 및 박테리아 모집단은 식물의 뿌리, 싹, 잎 및 생식 조직에 국한시킬 수 있다. 더욱 또 다른 구현예에서, 박테리아 및 박테리아 모집단은 식물의 열매 또는 종자 조직을 콜로니화한다. 더욱 또 다른 구현예에서, 박테리아 및 박테리아 모집단은 식물의 표면에 존재하도록 식물을 콜로니화할 수 있다 (즉, 식물의 존재는 식물 외부, 또는 식물의 외권상에서 검출가능하게 존재한다). 더욱 다른 구현예에서, 박테리아 및 박테리아 모집단은 식물의 실질적으로 모든 또는 모든 조직을 국한시킬 수 있다. 특정 구현예에서, 박테리아 및 박테리아 모집단은 식물의 뿌리에 국한되지 않는다. 다른 경우에, 박테리아 및 박테리아 모집단은 식물의 광합성 조직에 국한되지 않는다.

[0184] 조성물의 효과는 작물 또는 작물 가열 유닛 (CHU)의 상대 성숙도를 측정함으로써 평가될 수도 있다. 예를 들어, 박테리아 모집단은 옥수수에 적용될 수 있고, 옥수수 성장은 옥수수 낱알의 상대 성숙도 또는 옥수수 낱알이 최대 중량인 시간에 따라 평가될 수 있다. 작물 가열 유닛 (CHU)는 또한 옥수수 작물의 성숙화를 예측하는데 사용될 수 있다. CHU는 작물 성장에 대한 일일 최대 온도를 측정함으로써 열 축적량을 결정한다.

[0185] 예에서, 박테리아는 하기를 포함하는 식물의 조직 중 어느 하나에 국한시킬 수 있다: 뿌리, 부정근, 종자근, 근모, 싹, 잎, 꽃, 꽃 봉오리 술, 분열조직, 꽃가루, 암술, 씨방, 수술, 열매, 기는 줄기, 근경, 뿌리혹, 덩이줄기, 모상체, 공변 세포, 배수 조직, 꽃잎, 꽃받침, 영포, 꽃대, 유관속 형성층, 체관부 및 물관부. 또 다른 구현예에서, 박테리아 또는 박테리아 모집단은 식물의 광합성 조직에, 예를 들어, 잎 및 싹에서 국한시킬 수 있다. 다른 경우에, 박테리아 및 박테리아 모집단은 식물의 유관속 조직에, 예를 들어, 물관부 및 체관부에서 국한된다. 또 다른 구현예에서, 박테리아 또는 박테리아 모집단은 식물의 생식 조직 (꽃, 꽃가루, 암술, 씨방, 수술 또는 열매)에 국한시킬 수 있다. 또 다른 구현예에서, 박테리아 및 박테리아 모집단은 식물의 뿌리, 싹, 잎 및 생식 조직에 국한시킬 수 있다. 또 다른 구현예에서, 박테리아 또는 박테리아 모집단은 식물의 열매 또는 종자 조직을 콜로니화한다. 더욱 또 다른 구현예에서, 박테리아 또는 박테리아 모집단은 식물의 표면에 존재하도록 식물을 콜로니화할 수 있다. 또 다른 구현예에서, 박테리아 또는 박테리아 모집단은 식물의 실질적으로 모든 또는 모든 조직에 국한시킬 수 있다. 특정 구현예에서, 박테리아 또는 박테리아 모집단은 식물의 뿌리에 국한되지 않는다. 다른 경우에, 박테리아 및 박테리아 모집단은 식물의 광합성 조직에 국한되지 않는다.

[0186] 작물에 적용된 박테리아 조성물의 효과는 식재 속도, 파종 활력, 뿌리 강도, 가뭄 내성, 식물 높이, 건조 및 시

협 중량을 비제한적으로 포함하는 작물 성장의 다양한 특징을 측정함으로써 평가될 수 있다.

[0187] 식물 중

[0188] 본원에 기재된 방법 및 박테리아는 호르데움(*Hordeum*), 오리자, 제아(*Oryza Zea*), 및 트리티세아에(*Triticeae*) 속의 식물과 같은 임의의 다양한 식물에 적합하다. 적합한 식물의 다른 비-제한적인 예는 선류, 지의류 및 조류를 포함한다. 일부 경우에, 식물은 식량 작물, 섬유 작물, 오일 작물, 임업 또는 펄프 및 제지 산업의 식물, 바이오연료 생산용 공급 원료 및/또는 관상용 식물과 같은 경제적, 사회적 및/또는 환경적 가치를 가진다. 일부 예에서, 식물은 곡물, 밀가루, 전분, 시럽, 밀(meal), 기름, 펄프, 포장재, 기능성 식품, 펄프, 동물 사료, 어류 사료, 산업 화학물질용 벌크 재료, 곡물 제품, 가공된 인간-식품, 당류, 알코올, 및/또는 단백질과 같은 경제적으로 가치있는 생산물을 생산하는데 사용될 수 있다. 작물 식물의 비-제한적인 예는 옥수수, 쌀, 밀, 보리, 수수, 기장, 귀리, 호밀 삼피, 메밀, 단 옥수수, 사탕수수, 양파, 토마토, 딸기, 및 아스파라거스를 포함한다.

[0189] 일부 예에서, 본원에 개시된 방법 및 조성물을 사용하여 수득 또는 개선될 수 있는 식물은 농업, 원예, 바이오연료 분자 및 다른 화학 물질의 생산용 바이오매스, 및/또는 임업에 중요하거나 흥미로운 식물을 포함할 수 있다. 이들 식물의 일부 예는 파인애플, 바나나, 코코넛, 백합, 그라스콩, 알팔파, 파리토마토, 멜론, 병아리콩, 치커리, 클로버, 케일, 렌즈콩, 대두, 담배, 감자, 고구마, 무, 양배추, 갯목, 사과 나무, 포도, 면화, 해바라기, 탈곡 유채과 야채, 카놀라, 감귤류 (오렌지, 만다린, 금귤, 레몬, 라임, 자몽, 귤, 탄젤로, 시트론, 및 포멜로 포함), 후추, 콩, 양상추, 큰개기장 (스위치), 소르굼 비콜로르(*Sorghum bicolor*) (수수, 수단), 미스칸투스 기간테우스(*Miscanthus giganteus*) (미스칸투스), 사카룸(*Saccharum*) sp. (에너지케인(energy cane)), 포플루스 발사미페라(*Populus balsamifera*) (포플러), 제아 메이스 (옥수수), 글리신 맥스(*Glycine max*) (대두), 브라스리카 나푸스(*Brassica napus*) (카놀라), 트리티쿰 아에스티붐(*Triticum aestivum*) (밀), 고시피움 히르수툼(*Gossypium hirsutum*) (면화), 오리자 사티바(*Oryza sativa*) (쌀), 헬리안투스 안누우스(*Helianthus annuus*) (해바라기), 메디카고 사티바(*Medicago sativa*) (알팔파), 베타 불가리스(*Beta vulgaris*) (사탕무), 페니세툼 글라우쿰(*Pennisetum glaucum*) (필 밀렛), 파니쿰(*Panicum*) 중 수수 중, 미스칸투스 중, 사카룸(*Saccharum*) 중, 에리안투스(*Erianthus*) 중, 포플루스 중, 세칼레 세레알레(*Secale cereale*) (호밀), 살릭스(*Salix*) 중 (버들), 유칼립투스 중 (유칼립투스), 트리티코세칼레(*Triticosecale*) 중 (트리티쿰-25 밀 X 호밀), 대나무, 카르타무스 텅토리우스(*Carthamus tinctorius*) (홍화), 자트로파 쿠르카스(*Jatropha curcas*) (자트로파), 리시누스 콤무니스(*Ricinus communis*) (캐스터), 엘라에이스 구이네엔시스(*Elaeis guineensis*) (오일 팜), 페닉스 닥틸리페라(*Phoenix dactylifera*) (데이트 팜), 아콘토페닉스 쿤닝가미아나(*Archontophoenix cunninghamiana*) (킹 팜), 시아그루스 로만조피아나(*Syagrus romanzoffiana*) (퀸 팜), 리눔 우시타티시뮴(*Linum usitatissimum*) (플렉스(flax)), 브라스리카 준세아(*Brassica juncea*), 마니호트 에스쿨렌타(*Manihot esculenta*) (카사야(cassaya)), 리코페르시콘 에스쿨렌툼(*Lycopersicon esculentum*) (토마토), 락투카 살리바(*Lactuca saliva*) (상추), 무사 파라디시아카(*Musa paradisiaca*) (바나나), 솔라눔 투베로숨(*Solanum tuberosum*) (감자), 브라스리카 올레라세아(*Brassica oleracea*) (브로콜리, 콜리플라워, 브뤼셀 콩나물), 카멜리아 시넨시스(*Camellia sinensis*) (차), 프라가리아 아나나사사(*Fragaria ananassa*) (딸기), 테오브로마(*Theobroma*) 카카오 (코코아), 코페아 아라비카(*Coffea arabica*) (커피), 비티스 비니페라(*Vitis vinifera*) (포도), 아나나스 코모수스(*Ananas comosus*) (파인애플), 캅시쿰 안눔(*Capsicum annum*) (핫 & 스위트 후추), 알리움 세파(*Allium cepa*) (양파), 쿠쿠미스 멜로(*Cucumis melo*) (멜론), 쿠쿠미스 사티부스(*Cucumis sativus*) (오이), 쿠쿠르비타 막시마(*Cucurbita maxima*) (스쿼시), 쿠쿠르비타 모스차타(*Cucurbita moschata*) (스쿼시), 스피나세아 올레라세아(*Spinacea oleracea*) (시금치), 시트룰루스 라나투스(*Citrullus lanatus*) (수박), 아벨모스추스 에스쿨렌투스(*Abelmoschus esculentus*) (오クラ), 솔라눔 멜롱게나(*Solanum melongena*) (가지), 파파베르 솜니페룸(*Papaver somniferum*) (양귀비), 파파베르 오리엔탈레(*orientale*), 탁수스 박카타(*Taxus baccata*), 탁수스 브레비폴리아(*Taxus brevifolia*), 아르테미시아 안누아(*Artemisia annua*), 칸나비스 살리바(*Cannabis saliva*), 캄프토테카 아쿠미네이트(*Camptotheca acuminata*), 카타란투스 로세우스(*Catharanthus roseus*), 빈카 로세아(*Vinca rosea*), 신초나 오피시날리스(*Cinchona officinalis*), 코이치쿰 아우툼날레(*Coichicum autumnale*), 베라트룸 칼리포르니카(*Veratrum californica*), 디지털리스 라나타(*Digitalis lanata*), 디지털리스 푸르푸레아(*Digitalis purpurea*), 디오스코레아(*Dioscorea*) 5 종, 안드로그라피스 파니쿨라타(*Andrographis paniculata*), 아트로파 벨라돈나(*Atropa belladonna*), 다투라 스톰onium(*Datura stomonium*), 베르베리스(*Berberis*) 중, 세팔로탁수스(*Cephalotaxus*) 중, 에페드라 시니카(*Ephedra sinica*), 에페드라 중, 에리트록실룸 코카(*Erythroxylum coca*), 갈란투스 워르노리이(*Galanthus wornorii*), 스코폴리아(*Scopolia*) 중, 리코포듐 세라툼(*Lycopodium serratum*) (후페르지아 세라타(*Huperzia serrata*)), 리코포듐 중, 라우볼피아 세르프티나(*Rauwolfia serpentina*), 라우볼피아 중, 상구이나리아 카나덴시스(*Sanguinaria canadensis*), 효스시아

무스(Hyoscyamus) 중, 칼렌둘라 오피시날리스(Calendula officinalis), 크리스탄테뮴 파르테늄(Chrysanthemum parthenium), 콜레우스 포르스콜리이(Coleus forskohlii), 타나세툼 파르테늄(Tanacetum parthenium), 파르테늄 아르겐타툼(Parthenium argentatum) (과울고무나무), 헤베아(Hevea 중 (고무), 멘타 스피카타(Mentha spicata) (민트), 멘타 피페리타(piperita) (민트), 빅사 오렐라나(Bixa orellana), 알스트로메리아(Alstroemeria) 중, 로사(Rosa) 중 (장미), 디안투스 카리오필루스(Dianthus caryophyllus) (카네이션), 페튜니아(Petunia) 중, (페튜니아), 포인세티아 폴케리마(Poinsettia pulcherrima) (포인세티아), 니코티아나 타바쿰(Nicotiana tabacum) (담배), 루피너스 알버스(Lupinus albus) (루핀), 우니올라 파니쿨라타(Uniola paniculata) (귀리), 호르데움 불가레 (Hordeum vulgare) (보리), 및 롤리움(Lolium) 중 (호밀)을 포함할 수 있다.

[0190] 일부 예에서, 외떡잎 식물이 사용될 수 있다. 외떡잎 식물은 알리스마탈레스(Alismatales), 아랄레스(Arales), 아레칼레스(Arecalales), 브로멜리알레스(Bromeliales), 콤멜리날레스(Commelinales), 시클란탈레스(Cyclanthales), 사이퍼알레스(Cyperales), 에리오카울탈레스(Eriocaulales), 하이드로차리탈레스(Hydrocharitales), 준칼레스(Juncalales), 릴리알레스(Lilliales), 나자달레스(Najadales), 오키달레스(Orchidales), 판다날레스(Pandanales), 포알레스(Poales), 레스티오날레스(Restionales), 트리우리달레스(Triuridales), 티팔레스(Typhales), 및 진지바렐레스(Zingiberales)의 목에 속한다. 짐노스페르마에(Gymnospermae)의 강에 속하는 식물은 시카달레스(Cycadales), 징크고알레스(Ginkgoales), 그네탈레스(Gnetales), 및 피날레스(Pinales)이다. 일부 예에서, 외떡잎 식물은 옥수수, 쌀, 밀, 보리, 및 사탕수수로서 이루어진 군에서 선택될 수 있다.

[0191] 일부 예에서, 아리스토키알레스(Aristochiales), 아스테랄레스(Asterales), 바탈레스(Batales), 캄파눌랄레스(Campanulales), 카파랄레스(Capparales), 카리오필탈레스(Caryophyllales), 카수아리날레스(Casuarinales), 셀라스트랄레스(Celastrales), 코르날레스(Cornales), 디아펜살레스(Diapensales), 딜레니알레스(Dilleniales), 덩사칼레스(Dipsacales), 에베날레스(Ebenales), 에리칼레스(Ericales), 에우코미알레스(Eucomiales), 파발레스(Fabales), 파갈레스(Fagales), 겐티아날레스(Gentianales), 게라니알레스(Geraniales), 할로라갈레스(Haloragales), 하마멜리달레스(Hamamelidales), 미들레스(Middle), 주글란달레스(Juglandales), 라미알레스(Lamiales), 라우랄레스(Laurales), 레시티달레스(Lecythidales), 레이트네리알레스(Leitneriales), 마그니올랄레스(Magniolales), 말발레스(Malvales), 미리칼레스(Myricales), 미르탈레스(Myrtales), 님파에알레스(Nymphaeales), 파페베랄레스(Papeverales), 피페랄레스(Piperiales), 플란타기날레스(Plantaginales), 플룸브 아기날레스(Plumbaginales), 포도스테말레스(Podostemales), 폴레모니알레스(Polemoniales), 폴리갈랄레스(Polygalales), 폴리고날레스(Polygonales), 프리물랄레스(Primulales), 프로테알레스(Proteales), 라플레시알레스(Rafflesiales), 라누쿨랄레스(Ranunculales), 램날레스(Rhamnales), 로살레스(Rosales), 루비알레스(Rubiales), 살리칼레스(Salicales), 산탈레스(Santales), 사핀달레스(Sapindales), 사라세니아세아에(Sarraceniaceae), 스크로폴라리알레스(Scrophulariales), 테알레스(Theales), 트로코덴드랄레스(Trochodendrales), 움베탈레스(Umbellales), 우르티칼레스(Urticales), 및 비올라테스의 목에 속하는 것들을 포함하는 쌍떡잎 식물이 사용될 수 있다. 일부 예에서, 쌍떡잎 식물은 면화, 대두, 후추, 및 토마토로서 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.

[0192] 일부 경우에, 개선된 식물은 실험 조건에 쉽게 맞지 않을 수 있다. 예를 들어, 작물 식물은 여러 번의 반복에 걸쳐 연속적으로 개선된 특성을 평가하기에 충분히 성장하는데 시간이 오래 걸릴 수 있다. 따라서, 박테리아가 초기에 단리되는 제 1 식물, 및/또는 유전자 조작 박테리아가 적용되는 복수의 식물은 원하는 조건 하에서 평가하기에 더 적합한 식물과 같은 모델 식물일 수 있다. 모델 식물의 비-제한적인 예는 세타리아, 브라키폴륨(Brachypodium), 및 아라비도시스(Arabidopsis)를 포함한다. 모델 식물을 사용하여 본 개시내용의 방법에 따라 단리된 박테리아의 능력은 그 다음 개선된 특성의 부여를 확인하기 위해 또 다른 유형의 식물 (예를 들어 작물 식물)에 적용될 수 있다.

[0193] 본원에 개시된 방법에 의해 개선될 수 있는 특성은, 예를 들어, 성장 속도, 높이, 중량, 색, 맛, 냄새, (예를 들어, 대사산물, 단백질, 약물, 탄수화물, 오일, 및 임의의 기타 화합물을 포함하는) 식물에 의한 하나 이상의 화합물의 생산 변화를 포함하는 식물의 임의의 관찰가능한 특징을 포함한다. 유전자형 정보에 기초한 식물의 선택이 또한 예상된다 (예를 들어, 박테리아에 반응하여 식물 유전자 발현의 패턴을 포함하거나 증가된 질소 고정과 관련된 것과 같은 유전자 마커의 존재를 식별함). 식물은 또한 특정 특징 또는 특성 (예를 들어, 바람직한 특징 또는 특성)의 존재와 대조적으로 특정 특징 또는 특성 (예를 들어, 바람직하지 않은 특징 또는 특성)의 부재, 억압 또는 억제에 기초하여 선택될 수 있다.

[0194] 실시예

[0195] 본원에 제공된 예는 박테리아 단리, 박테리아 및 식물 분석, 그리고 식물 특성 개선의 방법을 기재한다. 실시예는 단지 예시를 위한 것이며 어떠한 식으로도 제한하는 것으로 해석되지 않아야 한다.

[0196] 실시예 1: 식물 조직으로부터 미생물의 단리

[0197] 표토는 캘리포니아 중부의 다양한 농업 지역으로부터 수득되었다. 중식토, 이탄식 양토, 미사질식 양토 및 사양토를 포함하여 다양한 질감 특성을 가진 20 개의 토양은 수집되었다. 다양한 들판 옥수수, 단 옥수수, 전통 옥수수 및 토마토의 종자는 표 1에 나타낸 바와 같이 각 토양에 식재되었다.

작물 유형	들판 옥수수	단 옥수수	전통 옥수수	토마토
품종	Mo17	페리-모르세 '골든 크로스 반탐 T-51'	빅토리 종자 '모세비 프롤리픽'	페리-모르세 로마 VF
	873	페리-모르세 '실버 퀸 하이브리드'	빅토리 종자 '레이드 의 옐로우 덴트'	스토버 로마
	DKC 66-40	페리-모르세 '슈가 도트'	빅토리 종자 '히코리 킹'	완전히 토마토 '마이크로 톰 하이브리드'
	DKC 67-07			하인즈 1015
	DKC 70-01			하인즈 2401
				하인즈 3402
				하인즈 5508
				하인즈 5608
				하인즈 8504

[0198] 표 1: 다양한 특성을 가진 토양에 식재된 작물 유형 및 품종

[0199] 식물은 2-4 주 성장 후 뿌리째 뽑고 뿌리 표면의 과량 토양은 탈이온수로 제거되었다. 토양 제거 후, 식물은 표백제로 표면 멸균되었고 멸균수로 격하게 린스되었다. 세척된, 1 cm 섹션의 뿌리는 식물로부터 절제되었고 3 mm 강철 비드를 함유하는 포스페이트 완충 식염수 용액에 배치되었다. Qiagen TissueLyser II로 용액을 격렬하게 진탕시킴으로써 슬러리가 생성되었다.

[0200] 뿌리 및 식염수 슬러리가 희석되었고 다양한 유형의 성장 배지에 접종되어 근권, 내생식물, 착생식물, 및 다른 식물-관련 미생물을 단리시켰다. R2A 및 Nfb 한천 배지는 단일 콜로니를 수득하는데 사용되고, 반고체 Nfb 배지 경사는 질소 고정 박테리아 집단을 수득하는데 사용되었다. 반고체 Nfb 배지 경사에서 2-4 주 인큐베이션 후, 미생물 모집단은, 도 1a-b에 나타낸 바와 같이, R2A 한천에서 단일 콜로니를 수득하기 위해 수집 및 스트리킹되었다. 단일 콜로니는 R2A 및 글리세롤의 혼합물에 재현탁되었고, PCR 분석에 적용되었고, 이후 분석을 위해 -80 °C에서 동결되었다. 대략 1,000 개의 단일 콜로니는 수득되었고 "단리된 미생물"로 지정되었다.

[0201] 이어서, 단리물은 디아조트로프를 확인하기 위해 *nifH* 유전자의 존재를 검출 하도록 콜로니 PCR 스크린에 적용되었다. 스크린에서 디아조트로프의 90 % 이상을 검출하는 것으로 나타난, 전술된 프라이머 세트 Ueda 19F/388R은 각 단리물에서 *nif* 클러스터의 존재를 조사하는데 사용되었다 (Ueda 등 1995; J. Bacteriol. 177: 1414-1417). 정제된 단리물의 단일 콜로니는 채집되었고, PBS에 재현탁되었고, 도 2에서 나타낸 바와 같이, 콜로니 PCR용 템플레이트로서 사용되었다. 양성 PCR 밴드를 제공한 단리물의 콜로니는 리스트리킹되었고, 콜로니 PCR 및 리스트리킹 공정은 디아조트로프의 위양성 식별을 방지하기 위해 2 회 반복되었다. 이어서 정제된 단리물은 "후보 미생물"로서 지정되었다.

[0202] 실시예 2: 단리된 미생물의 특성규명

[0203] 서열분석, 분석 및 계통발생 특성규명

[0204] 515f-806r 프라이머 세트를 사용한 16S rDNA의 서열분석은 단리된 및 후보 미생물에 대한 예비 계통발생적 동일성을 생성하는데 사용되었다 (참조 예를 들어, Vernon 등; BMC Microbiol. 2002년 12월 23일; 2:39.). 미생물은, 표 2에 나타낸 바와 같이, 하기를 포함하는 다양한 속을 포함한다: 엔테로박터, 부르크홀데리아, 클레브시

엘라, 브라디리조비움, 라넬라, 크산토모나스, 라오울텔라(Raoultella), 판토에아, 슈도모나스, 브레분디모나스, 아그로박테리움, 및 파에니바실러스.

속	단리물	속	단리물
아크로모박터	7	파에니바실러스	1
아그로박테리움	117	파에니스포르사르시나	3
아그로마이세스	1	판토에아	14
알리시클로바실러스	1	페도박터	16
아스티카카울리스	6	피멜로박터	2
바실러스	131	슈도모나스	212
브라디리조비움	2	리조비움	4
브레비바실러스	2	로도페락스	1
부르크홀데리아	2	스핑고박테리움	13
카울로박터	17	스핑고비움	23
크리세오박테리움	42	스핑고모나스	3
코마모나스	1	스핑고픽시스	1
디아도박터	2	스테노트로포모나스	59
플라보박테리움	46	스트렙토코쿠스	3
할로모나스	3	바리오박스	37
렙토트릭스	3	크실라니마이크로비움	1
리소박터	2	미식별	75
네이세리아	13		

표 2: 심층 16S rDNA 서열분석에 의해 결정된 경우 토마토 식물로부터 단리된 미생물의 다양성.

이어서, 39 개의 후보 미생물의 게놈은 일루미나 미세크(Illumina Miseq) 플랫폼을 사용하여 서열분석되었다. 순수한 배양물로부터의 게놈 DNA는 QIAmp DNA 미니 키트 (QIAGEN)를 사용하여 추출되었고, 서열분석용 총 DNA 라이브러리는 제3의 공급업체 (SeqMatic, Hayward)를 통해 준비되었다. 이어서, 게놈 조립은 A5 파이프라인을 통해 수행되었다 (Tritt 등 2012; PLoS One 7(9):e42304). 유전자는 확인되었고 주석이 달렸으며, 질소 고정의 조절 및 발현과 관련된 것들은 돌연변이유발용 표적으로 언급되었다.

후보 미생물의 전사체 프로파일링

균주 CI010의 전사체 프로파일링은 환경 질소의 존재 하에서 활성인 프로모터를 확인하기 위해 수행되었다. 균주 CI010은 10 mM 글루타민이 보충된 한정된, 무 질소 배지에서 배양되었다. 총 RNA는 이들 배양물 (QIAGEN RNeasy 키트)로부터 추출되었고 Illumina HiSeq (SeqMatic, Fremont CA)를 통해 RNAseq 서열분석에 수행되었다. 서열분석 관독은 Geneious를 사용하여 CI010 게놈 데이터에 맵핑되었고, 근위 전사 프로모터의 제어 하에서 고도로 발현된 유전자가 확인되었다. 표 3A-C는 총 RNA의 RNAseq 서열분석을 통해 측정된 유전자 및 이들의 상대 발현 수준을 열거한다. 근위 프로모터의 서열은 *nif* 경로의 돌연변이유발, 질소 이용 관련 경로, 또는 원하는 발현 수준을 가진 다른 유전자에서 사용하기 위해 기록되었다.

유전자 도야성(tractability)의 평가

후보 미생물은 형질전환성 및 유전자 도야성에 기초하여 특성규명되었다. 첫째, 최적의 탄소원 활용은 질소가 없는 및 풍부한 배지 둘 모두에서 성장 곡선 뿐만 아니라 관련 배지의 소형 패널에서 성장에 의해 결정되었다. 둘째, 각 균주의 자연 항생제 내성은 돌연변이유발에 대한 선택적 마커로 사용되는 항생제의 패널을 함유하는 액체 배양물에서 스팟-플레이팅 및 성장을 통해 결정되었다. 셋째, 각각의 균주는 플라스미드 모음의 전기천공법을 통해 그의 형질전환성에 대해 시험되었다. 플라스미드 수집은 7 개의 복제 기원, 즉 p15a, pSC101, CloDF,

colA, RK2, pBBR1 및 pR01600의 조합 확장 그리고 4 개의 항생제 내성 마커, 즉 CmR, KmR, SpecR, 및 TetR을 포함한다. 기원 및 내성 마커 호환성에 대한 이 체계적 평가는 후보 미생물에서 플라스미드-기반 돌연변이유발용 벡터를 확인하는데 사용되었다.

실시예 3: 후보 미생물의 돌연변이유발

람다-레드 매개 녹아웃

후보 미생물의 여러 돌연변이체는 플라스미드 pKD46 또는 카나마이신 내성 마커를 함유하는 유도체를 사용하여 생성되었다 (Datsenko 등 2000; PNAS 97(12): 6640-6645). 녹아웃 카세트는 표적 유전자를 축적하는 250bp 상동성으로 설계되었고 중첩 연장 PCR을 통해 생성되었다. 후보 미생물은 pKD46으로 형질전환되었고, 아라비노스의 존재하에 배양되어 람다-레드 기계식 발현을 유도하였고, 전기천공을 위하여 준비되었고, 녹아웃 카세트에 형질전환되어 후보 돌연변이체 균주를 생산하였다. 4 개의 후보 미생물 및 1 개의 실험실 균주, *클레브시엘라 옥시토카(oxytoca)* M5A1은, 표 4에 나타난 바와 같이, 질소 고정 조절 유전자 *nifL*, *glnB* 및 *amtB*의 13 개의 후보 돌연변이체를 생성하는데 사용되었다.

균주	<i>nifL</i>	<i>glnB</i>	<i>amtB</i>
M5A1	X	X	X
CI006	X	X	X
CI010	X	X	X
CI019	X	X	
CI028	X	X	

표 4: 람다-레드 돌연변이유발을 통해 생성된 단일 녹아웃 돌연변이체의 목록

Cas9 선택을 가진 올리고-유도 돌연변이유발

올리고-유도 돌연변이유발은 대장균 DH10B에서 *rpoB* 유전자에 게놈 변화를 표적하는데 사용되었고, 돌연변이체는 CRISPR-Cas 시스템으로 선택되었다. 돌연변이유발성 올리고 (ss1283 :

"G T T G A T C A G A C C G A T G T T C G G A C C T T C c a a g G T T C G A T C G G A C A T A C G C G A C

CGTAGTGGGTCGGGTGTACGTCTCGAACTTCAAAGCC", 여기서 *는 포스포로티오에이트 결합을 나타냄)는 4-bp 돌연변이를 통해 리팜피신 내성을 *rpoB* 유전자에 부여하도록 설계되었다. Cas9를 인코딩하는 플라스미드를 함유하는 세포는 Cas9 발현을 위해 유도되었고, 전기천공을 위하여 준비되었고, 그 다음 WT *rpoB* 서열의 Cas9 절단을 표적하는 가이드 RNA (gRNA)의 구성적 발현을 인코딩하는 플라스미드 및 돌연변이유발성 올리고 둘 모두로 전기천공되었다. 전기천공된 세포는 생성된 돌연변이체 염색체의 충분한 분리를 허용하기 위해 밤새 비선택 배지에서 회수되었다. gRNA-인코딩 플라스미드용 선택에서 플레이팅 후, 스크리닝된 10 개 콜로니 중 2 개가 원하는 돌연변이를 함유하는 것으로 나타났고, 나머지는 gRNA 플라스미드 또는 Cas9 플라스미드 손실에서 프로토스페이서 돌연변이를 통해 생성된 탈출 돌연변이체인 것으로 나타났다.

Cas9 선택을 가진 람다-레드 돌연변이유발

후보 미생물 CI006 및 CI010의 돌연변이체는 CRISPR-Cas에 의한 선택을 가진 람다-레드 돌연변이유발을 통해 생성되었다. 녹아웃 카세트는 (실시예 2에 기재된 그리고 표 3에 도시된 바와 같이) 전사 프로파일링을 통해 확인된 내인성 프로모터 및 결실 표적을 축적하는 ~ 250bp 상동성 영역을 함유하였다. CI006 및 CI010은 아라비노스 유도성 프로모터의 제어 하에서 람다-레드 재조합 시스템 (엑소, 베타, 감(gam) 유전자) 그리고 IPTG 유도성 프로모터의 제어 하에서 Cas9를 인코딩하는 플라스미드로 형질전환되었다. 레드 재조합 및 Cas9 시스템은 생성된 형질전환체에서 유도되었고, 균주는 전기천공을 위하여 준비되었다. 녹아웃 카세트 및 플라스미드-인코딩된 선택 gRNA는 이어서 적격 세포로 형질전환되었다. Cas9 플라스미드 및 gRNA 플라스미드 둘 모두에 대하여 선택적인 항생제에서 플레이팅 후, 스크리닝된 10 개 콜로니 중 7 개는, 도 3에 도시된 바와 같이, 의도된 녹아웃 돌연변이를 나타냈다.

[0221] **실시예 4: 후보 분자의 시험관내 표현형화**

[0222] 다양한 돌연변이체에서 니트로게나제 생합성 및 활성화에 관한 외인성 질소의 영향은 평가되었다. 아세틸렌 환원 검정 (ARA) (Temme 등 2012; 109(18): 7085-7090)은 순수한 배양 조건에서 니트로게나제 활성을 측정하는데 사용되었다. 균주는 기밀 시험 튜브에서 성장되었고, 아세틸렌의 에틸렌으로의 환원은 애질런트(Agilent) 6890 기체 크로마토그래피로 정량화되었다. 0 내지 10mM 글루타민이 보충된 질소 고정 배지에서 성장된 후보 미생물 및 상대 후보 돌연변이체의 ARA 활성은 **도 4a-b** 및 **도 10a-c**에 도시된다.

[0223] 혐기성 배양 조건 하에서, 다양한 글루타민 및 암모니아 농도는 질소 고정 활성화에 미치는 영향을 정량화하기 위해 시험되었다. 야생형 세포에서, 글루타민 농도가 증가함에 따라 활성화는 빠르게 감소되었다. 그러나, 일련의 초기 녹-아웃 돌연변이에서, 야생형에서 활성을 달리 차단할 글루타민의 농도 하에서 질소 고정 유전자의 발현을 가능하게 하는 돌연변이의 클래스는 확인되었다. 이 프로파일은, **도 4c**에 도시된 바와 같이, 4 개 상이한 종의 디아조트로프에서 생성되었다. 또한, 확인된 유전자 부분을 사용하여 조절 네트워크를 재배치함으로써, 질소 고정 활성화 수준은 예측가능하게 미세조정되었다. 이것은, 균주 CM023, CM021, CM015, 및 CI006을 나타내는, **도 4b**에 도시된다. 균주 CM023은 진화된 균주 저이고; 균주 CM021은 진화된 균주 고이고; 균주 CM015는 진화된 균주 중이며; 균주 CI006은 야생형이다 (균주 2). 배양 상청액에 분비된 암모니아는 효소 기반 검정 (MEGAZYME)을 사용하여 시험되었다. 검정은 340 nm의 흡광도에서 소비된 NADPH의 양을 측정한다. 검정은 시작 밀도가 1E9 CFU/ml인 무 질소, 혐기성 환경에서 성장된 박테리아 배양물에서 수행되었다. 6 개의 진화된 균주의 패널에 걸쳐, 1 개의 균주는, **도 4d**에 나타낸 바와 같이, 48 시간 주기에 걸쳐 최대 100 μ M의 암모니아를 배출하였다. 추가로, 이중 돌연변이체는, **도 11**에 나타낸 바와 같이, 유래를 발생시킨 단일 돌연변이체보다 높은 암모니아 배출을 나타냈다. 이것은 생리학적 요구를 초과하는 암모니아를 생산하는 미생물 능력을 증명한다.

[0224] 순수한 배양물의 전사 프로파일링

[0225] CI006의 전사 활성화는 Nanostring Elements 플랫폼을 사용하여 측정되었다. 세포는 무 질소 배지에서 성장되었고 10E8 세포는 4 시간 점종 후 수집되었다. 총 RNA는 Qiagen RNeasy 키트를 사용하여 추출되었다. 정제된 RNA는, **도 5**에 도시된 바와 같이, 프로브 하이브리드화 및 디지털 분석기 분석을 위하여, 캘리포니아주 팔로 알토 소재의 Core Diagnostics에 제출되었다.

[0226] **실시예 5: 후보 미생물의 식물체내 표현형화**

[0227] 후보 미생물에 의한 식물의 콜로니화

[0228] 후보 미생물에 의한 원하는 숙주 식물의 콜로니화는 단기 식물 성장 실험을 통해 정량화되었다. 옥수수 식물은 플라스미드로부터 또는 Tn5-통합 RFP 발현 카세트로부터 RFP를 발현하는 균주로 접종되었다. 식물은 멸균된 모래 및 비멸균 이탄 배지 둘 모두에서 성장되었고, 접종은 발아 후 3 일에 출현하는 식물 자엽초에 직접 1 mL의 세포 배양물을 피펫팅함으로써 수행되었다. 플라스미드는 적절한 항생제를 함유하는 용액으로 식물에 관수하는 것에 의해 유지되었다. 3 주 후, 식물 뿌리는 수집되었고, 멸균수로 3 회 린스되어 보이는 토양을 제거하였고, 2 개의 샘플로 분할되었다. 하나의 뿌리 샘플은 형광 현미경을 통해 분석되어 후보 미생물의 국소화 패턴을 확인하였다. 현미경은 **도 6**에 도시된 바와 같이 10mm 길이의 가장 온전한 식물 뿌리에서 수행되었다.

[0229] 콜로니화 평가를 위한 제 2 정량적 방법은 개발되었다. 정량적 PCR 검정은 내생식물로 접종된 식물의 뿌리로부터 전체 DNA 제제에 대해 수행되었다. 옥수수의 종자 (Dekalb DKC-66-40)은 2.5 인치 x 2.5 인치 x 10 인치 포트에서 미리 가압멸균된 모래에서 발아되었다. 식재 다음날, 1mL의 내생식물 하룻밤 배양물 (SOB 배지)는 종자가 위치한 지점에서 빠르게 흠뻑 적셔졌다. 이 하룻밤 배양물의 1mL는 약 10^9 cfu와 대략 동등하며, 어떤 균주가 사용되는 지에 따라, 서로 3 배 이내에서 변한다. 각 묘목은 2.5mM 또는 0.25mM 질산 암모늄으로 보충된 50mL 변형된 호아글랜드(Hoagland) 용액으로 매주 3 회 시비되었다. 식재 후 4 주에, 뿌리 샘플은 DNA 추출을 위하여 수집되었다. 토양 파편은 유압수 스프레이를 사용하여 세척되었다. 이들 조직 샘플은 그 다음 QIAGEN Tissuelyzer를 사용하여 균질화되었고 DNA는 그 다음 권장 프로토콜에 따라 QIAmp DNA Mini Kit (QIAGEN)를 사용하여 추출되었다. qPCR 검정은 각 내생식물의 계통에서 유전자좌에 특이적이도록 설계된 프라이머를 사용하여 (NCBI의 Primer BLAST를 사용하여) 이들 DNA 추출물에 대해 Stratagene Mx3005P RT-PCR을 사용하여 수행되었다. 내생식물의 계통 카피의 존재는 정량화되었다. 내생식물의 동일성을 추가로 확인하기 위해, PCR 증폭 산물은 서열분석되었고 정확한 서열을 가진 것으로 확인된다. 후보 미생물로부터 균주 CI006 및 CI008의 콜로니화 프로파일의 요약은 **표 5**에 제시된다. 뿌리의 10^7 cfu/g fw만큼 높은 콜로니화율은 균주 CI10에서 증명되었다.

균주	콜로니화 속도 (CFU / g fw)
CI006	1.45×10^5
CI008	1.24×10^7

표 5: qPCR에 의해 측정된 경우 옥수수의 콜로니화

식물체내 RNA 프로파일링

식물체내 nif 경로 성분의 생합성은 nif 유전자의 전사를 측정함으로써 추정되었다. 총 RNA는 CI006 접종된 식물의 뿌리 식물 조직으로부터 획득되었다 (전술한 바와 같은 이식 방법). RNA 추출은 권장 프로토콜 (QIAGEN)에 따라 RNEasy Mini Kit를 사용하여 수행되었다. 이어서, 이들 식물 조직으로부터 총 RNA는 균주 CI006의 게놈에서 nif 유전자에 특이적인 프로브를 사용하여 Nanostring Elements 키트 (NanoString Technologies, Inc.)를 사용하여 검정되었다. 식물체내 nif 유전자 발현의 데이터는 표 6에 요약된다. nifH 유전자의 발현이 CM013 균주에 의해 접종된 식물에서 검출되는 반면 nifH 발현은 CI006 접종된 식물에서는 검출되지 않았다. 균주 CM013은 nifL 유전자가 녹아웃된 균주 CI006의 유도체이다.

전사체/킬로베이스 백만 (TPM)에 의해 순위가 매겨진, CM011의 고도로 발현된 유전자는 시비된 조건 하에서 식물체내 측정되었다. 이들 고도로 발현된 유전자 중 일부의 발현을 제어하는 프로모터는 표적화된 질소 고정 및 동화 유전자좌와의 상동성 재조합용 템플레이트로서 사용되었다. 온실 성장된 CM011 접종 식물로부터 RNA 샘플이 추출되었고, rRNA는 Ribo-Zero 키트를 사용하여 제거되었고, Illumina의 Truseq 플랫폼을 사용하여 서열분석되었고 CM011의 게놈에 역으로 맵핑되었다. CM011로부터 고도로 발현된 유전자는 표 7에 열거된다.

균주	상대 전사체 발현
CI006	9.4
CM013	103.25

표 6: 식물체내 nifH의 발현

유전자 명칭	유전자 위치	방향	미가공 판독 카운트	TPM (전사체/킬로베이스 백만)
rpsH CDS	18196-18588	역	4841.5	27206.4
rplQ CDS	11650-12039	역	4333	24536.2
rpsJ CDS	25013-25324	역	3423	24229
rplV CDS	21946-22278	역	3367.5	22333
rpsN CDS	18622-18927	역	2792	20150.1
rplN CDS	19820-20191	역	3317	19691.8
rplF CDS	17649-18182	역	4504.5	18628.9
rpsD CDS	13095-13715	역	5091.5	18106.6
rpmF CDS	8326-8493	정	1363.5	17923.8
rplW CDS	23429-23731	역	2252	16413.8
rpsM CDS	14153-14509	역	2269	14036.2
rplR CDS	17286-17639	역	2243.5	13996.1
rplC CDS	24350-24979	역	3985	13969.2
rplK CDS	25526-25954	역	2648.5	13634.1
rplP CDS	20807-21217	역	2423	13019.5
rplX CDS	19495-19809	역	1824	12787.8
rpsQ CDS	20362-20616	역	1460.5	12648.7
bhsA 3 CDS	79720-79977	역	1464	12531.5
rpmC CDS	20616-20807	역	998.5	11485
rpoA CDS	12080-13069	역	4855	10830.2
rplD CDS	23728-24333	역	2916.5	10628.5
bhsA 1 CDS	78883-79140	역	1068	9141.9

[0235]

유전자 명칭	유전자 위치	방향	미가공 판독 카운트	TPM (전사체/킬로베이스 백만)
rpsS CDS	22293-22571	역	1138.5	9011.8
rpmA CDS	2210-2467	정	1028.5	8803.7
rpmD CDS	16585-16764	역	694.5	8520.8
rplB CDS	22586-23410	역	3132	8384
rpsC CDS	21230-21928	역	2574.5	8133.9
rplE CDS	18941-19480	역	1972.5	8066.9
rplO CDS	16147-16581	역	1551	7874.2
단백질원 트랜스카제 서브유닛 SecY CDS	14808-16139	역	4657	7721.2
rpsE CDS	16771-17271	역	1671.5	7368
rpsK CDS	13746-14135	역	1223.5	6928.2
tufA CDS	27318-28229	역	2850	6901.3
rpmI CDS	38574-38771	정	615	6859.5
rplU CDS	1880-2191	정	935.5	6621.7
rplT CDS	38814-39170	정	1045	6464.4
bhsA 2 CDS	79293-79550	역	754	6454.1
rpmB CDS	8391-8627	역	682	6355.1
rplJ CDS	23983-24480	역	1408	6243.9
fusA 2 CDS	481-2595	역	5832	6089.6
rpsA CDS	25062-26771	역	4613	5957.6
rpmJ CDS	14658-14774	역	314	5926.9
rpsR CDS	52990-53217	정	603	5840.7

[0236]

유전자 명칭	유전자 위치	방향	미가공 판독 카운트	TPM (전사체/킬로베이스 백만)
rpsG CDS	2692-3162	역	1243	5828.2
rpsI CDS	11354-11746	역	980.5	5509.8
cspC 1 CDS	8091-8300	역	509	5352.8
rpsF CDS	52270-52662	정	916	5147.4
rpsT CDS	55208-55471	역	602	5035.9
infC CDS	38128-38478	정	755	4750.3
cspG CDS	30148-30360	정	446	4624.2

[0237]

표 7

[0238]

¹⁵N 검정

[0239]

고정을 입증하기 위한 주요 방법은 질소 동위 원소 ¹⁵N을 사용하는 것으로, 이는 대기에서 ¹⁴N에 대한 설정 속도로 발견된다. ¹⁵N의 농축된 수준으로 비료 또는 대기를 보충함으로써, ¹⁵N₂ 가스가 보충된 대기(Yoshida

1980)로부터 고정된 15N 의 증가된 양으로 직접적으로, 또는 식물 조직에서 대기 N_2 가스(Iniguez 2004)에 의한 농축 비료의 회석을 통해 역으로 고정을 관찰할 수 있다. 회석법은 식물 성장의 공정에서 누적 고정된 질소를 관찰할 수 있는 반면, 15N_2 가스 방법은 포함된 대기에서 식물이 성장될 수 있는 짧은 간격 동안 발생하는 고정을 측정하는 것으로 제한된다 (속도 측정). 따라서, 가스 방법은 특이성이 우수하지만 (대기 속도보다 높은 식물에서 임의의 상승된 15N_2 수준이 고정에 모호하게 기인될 수 있기 때문에) 누적 활동을 나타낼 수 없다.

[0240] 검정의 유형 모두가 야생형 및 미접종된 옥수수 식물에 비해 개선된 균주의 고정 활성을 측정하기 위해 수행되었고, 상승된 고정 비율은 여러 개선된 균주에 대하여 식물체내 관찰되었다 (도 12, 도 14a, 및 도 14b). 이들 검정은 시험관내 관찰된 균주의 활성이 생체내 결과로 해석됨을 증명하는데 도움이된다. 게다가, 이들 검정은, 농업 환경에서 적합한 기능성을 시사하는, 균주 활성에 대한 비료의 영향을 측정하게 한다. 세타리아 식물이 야생형 및 개선된 균주로 접종되었을 때 유사한 결과는 관찰되었다 (도 13). 도 14a-14c에 도시된 식물체내 고정 활성은 전사체 데이터에 의해 추가로 백업된다. 진화된 균주는 야생형 대응물에 비해 증가된 $nifH$ 전사체 수준을 나타낸다. 게다가, 식물체내 미생물 유래 질소 수준은 또한 식물 단위별로 콜로니화 수준과 상관 관계가 있다. 이들 결과 (도 12, 도 13, 도 14a-14c, 도 15a, 및 도 15b)는 nif 유전자 클러스터의 개선된 조절을 통해 미생물이 식물 조직에서 보여진 대기 유래 질소의 증가에 대한 가능성이 있다는 가설을지지한다. 고정을 직접 측정하는 것 외에, 질소-스트레스된 식물 바이오매스 검정에서 개선된 균주로 접종 식물의 영향은 측정되었다. 식물 바이오매스가 식물과의 가능한 많은 미생물 상호작용과 관련될 수 있지만, 질소가 제한되는 때 고정된 질소의 첨가가 식물 표현형에 영향을 미칠 것으로 예상할 것이다. 접종된 식물은 질소가 완전히 없는 상태에서 성장되었으며, 미처리 대조군과 비교하여 접종된 식물에서 잎 면적, 새싹 생 중량 및 건조 중량, 및 뿌리 생 중량 및 건조 중량에서의 현저한 증가는 관찰되었다 (도 14c). 이들 차이가 질소 고정에 배타적으로 기인될 수 없어도, 이들은 개선된 균주가 식물에 질소를 적극적으로 공급하고 있다는 결론을 지지한다. 옥수수 및 세타리아 식물은 상기 기재된 바와 같이 성장 및 접종되었다. 1.2% ^{15}N 을 포함하는 비료는 관수를 통해 식물에 정기적으로 공급되었다. 미생물에 의한 질소 고정은 식물 조직에서 ^{15}N 수준을 측정함으로써 정량화되었다. 제 4 잎 조직은 식재 후 4 주에 수집 및 건조되었다. 건조된 잎 샘플은 비드 (QIAGEN TissueLyser)를 사용하여 균질화되었고 IRMS (메사추세츠주 우즈 홀 에코시스템 센터의 MBL 안정 동위 원소 실험실)용 주석 캡슐로 분취되었다. 대기에서 유래된 질소 (NDFA)가 계산되었고, CI050 및 CM002에 의한 질소 생산은 도 7에 도시된다.

[0241] 식물호르몬 생산 검정

[0242] 난쟁이 토마토 (솔라눔 리코페르시쿰(*Solanum lycopersicum*)) 품종 '마이크로-톰'은 시험관내 검정을 통해 열매 숙성에 대한 인돌-3-아세트산의 영향을 연구하기 위해 이전에 사용되었다 (Cohen 1996; J Am Soc Hortic Sci 121: 520-524). 후보 미생물에 의한 식물호르몬 생산 및 분비를 평가하기 위해, 미성숙한 마이크로-톰 열매를 사용하는 플레이트-기반 스크리닝 검정은 개발되었다. 12-웰 조직 배양 시험 플레이트는, 도 8에 도시된 바와 같이, 한천 배지로 웰을 채우고, 이를 고화시키고, 10 μL 의 하룻밤 미생물 배양물을 한천 표면 상에 스팟팅함으로써 제조되었다. 증가된 양의 지베렐린산 (GA)을 함유하지만 세균 배양물이 없는 한천을 가진 웰은 양성 대조군 및 표준물로서 사용되었다. 성장하는 마이크로-톰 식물로부터 제거된 개화 후 다음 날 꽃은 박테리아 스폿 배양의 지점에서 한천에 줄기-우선 삽입되었다. 이들 꽃들은 2-3 주 동안 모니터링되었고, 이후 열매는 수확되었고 칭량되었다. 여러 번의 복제에 걸쳐 식물 열매 질량의 증가는, 도 9에 도시된 바와 같이, 접종 미생물에 의한 식물호르몬의 생산을 나타낸다.

[0243] 실시예 6: 주기적 숙주-미생물 진화

[0244] 옥수수 식물은 CM013으로 접종되었고 대략 V5 성장기까지 4 주 성장되었다. ^{15}N 의 분석을 통해 미생물 소스로부터 개선된 질소 축적을 보여주는 것들은 뿌리째 뽑고, 뿌리는 벌크 토양을 제거하기 위해 유압수를 사용하여 세척되었다. 뿌리의 0.25g 부분은 절단되었고 PBS 용액으로 린스되어 미세한 토양 입자 및 비-부착성 미생물을 제거하였다. 조직 샘플은 QIAGEN TissueLyser II에서 3mm 강철 비드를 사용하여 균질화되었다. 균질물은 회석되었고 SOB 한천 배지 상에 플레이트되었다. 단일 콜로니는 액체 배지에 재현탁되었고 접종 균주에 고유한 돌연변이 및 16s rDNA의 PCR 분석에 적용되었다. 미생물 단리, 돌연변이유발, 접종, 및 재-단리의 공정은 미생물 특성, 식물 특성, 및 미생물의 콜로니화 능력을 개선하기 위해 반복적으로 반복될 수 있다.

[0245] 실시예 7: 지역간 상용성

[0246] 접종된 식물을 콜로니화하기 위한 개선된 미생물의 능력은 들판 조건 하에서 식물의 성공에 중요하다. 기재된

단리 방법이 옥수수과 같은 작물 식물과 밀접한 관계를 가질 수 있는 토양 미생물로부터 선택하도록 설계되었지만, 많은 균주는 다양한 식물 유전자형, 환경, 토양 유형, 또는 접종 조건에 걸쳐 효과적으로 콜로니화하지 않을 수 있다. 콜로니화가 미생물 균주와 숙주 식물 사이의 다양한 상호작용을 요구하는 복잡한 공정이기 때문에, 콜로니화 역량에 대한 스크리닝은 추가 개발을 위해 우선순위 균주 선택에 중심적인 방법이 되었다. 콜로니화를 평가하기 위한 초기의 노력은 균주의 형광 태깅을 사용하였는데, 이는 효과적이지만 시간이 걸리고 균주별로 확장할 수 없었다. 콜로니화 활성이 직접적인 개선이 불가능하기 때문에, 잠재적인 생성물 후보가 천연 콜로니이저인 균주로부터 선택되는 것이 필수적이다.

[0247] 검정은 qPCR 및 균집 샘플에서 균주-특이적하도록 설계된 프라이머를 사용하여 임의의 주어진 숙주 식물에서 야생형 균주의 강력한 콜로니화를 시험하도록 설계되었다. 이 검정은 옥수수 조직 샘플로부터 미생물의 콜로니화 속도를 신속하게 측정하기 위한 것이다. 형광 현미경 및 플레이트-기반 기술을 사용하여 가능한 콜로니이저로서 평가된 균주를 사용하는 초기 시험은 qPCR 접근법이 정량적이며 확장가능할 것임을 나타낸다.

[0248] 전형적인 검정은 다음과 같이 수행된다: 대부분 품종이 옥수수과 및 밀인 식물은 온실에서 이탄 포팅 믹스에서 균주 당 6 개 복제물로 성장된다. 식재 후 4 일 또는 5 일에, 0.6-1.0 (대략 $5E + 08$ CFU/mL)의 OD590으로 희석된 박테리아의 초기 고정상 배양물의 1mL 흡집은 신생 자엽초 위로 피펫팅된다. 식물은 수돗물로만 관수되고 샘플링 전 4 주 동안 성장하게 되는데, 이때, 식물은 뿌리째 뽑고 뿌리는 철저히 세척되어 대부분의 이탄 잔류물을 제거한다. 깨끗한 뿌리의 샘플은 절제되고 균질화되어 식물 세포 파편 및 관련 박테리아 세포의 슬러리를 창출한다. 우리는 qPCR용 템플릿으로서 사용하기 위해 식물과 박테리아 DNA의 혼합물을 효과적으로 생산하였던 고-처리량 DNA 추출 프로토콜을 개발했다. 박테리아 세포 스파이크-인 실험에 기초하여, 이 DNA 추출 공정은 뿌리의 생 중량에 대한 정량적 박테리아 DNA 샘플을 제공한다. 각 균주는 Primer BLAST (Ye 2012)를 사용하여 설계된 균주-특이적 프라이머를 사용하여 평가되고 미접종된 식물의 배경 증폭과 비교된다. 일부 프라이머가 미접종된 식물에서 표적의 증폭을 나타내므로, 콜로니화는 배경 수준과 비교하여 정확한 생성물의 상승된 증폭 또는 증폭의 존재에 의해 결정된다.

[0249] 이 검정은 상이한 토양 지리에 걸친 미생물 생성물의 상용성을 측정하는데 사용되었다. 들판 토양 품질 및 들판 조건은 미생물 생성물의 효과에 큰 영향을 줄 수 있다. 토양 pH, 수분 보유 용량, 및 경쟁 미생물은 접종된 생 존 및 콜로니화 능력에 영향을 줄 수 있는 토양에서 요소의 몇 가지 예일 뿐이다. 콜로니화 검정은 식물 성장 배지로서 캘리포니아의 농업 분야로부터 샘플링된 3 개의 다양한 토양 유형을 사용하여 수행되었다 (도 16a). 중간 접종 밀도는 실제 농업 조건에 근사하는데 사용되었다. 3 주 이내에, 균주 5는 모든 식물을 $1E + 06$ 내지 $1E + 07$ CFU/g FW로 콜로니화시켰다. 식물 성장 7 주 후, 변형된 균주 1의 진화된 버전은 모든 토양 유형에서 높은 콜로니화 속도 ($1E+06$ CFU/g FW)를 나타냈다. (도 16b).

[0250] 추가적으로, 들판 조건의 복잡성에서 콜로니화를 평가하기 위해, 2015년 6월 San Luis Obispo에서 1 에이커의 들판 시험은 시작되어 2 품종의 들판 옥수수에서 7 개의 야생형 균주의 영향과 콜로니화를 평가하였다. 농업 설계 및 시험의 시행은 계약의 들판 연구 기관인 Pacific Ag Research에 의해 수행되었다. 접종을 위해, 접종 방법 실험에서 시험된 동일한 이탄 배양 종자 코팅 기술은 사용되었다. 성장 기간 동안, 식물 샘플은 뿌리와 줄기 내부의 콜로니화를 평가하기 위해 수집되었다. 샘플은 식재 후 4 주 및 8 주에 각각의 처리의 3 회 반복 플롯으로부터, 그리고 16 주에 수확 직전 각 처리의 모두 6 회 반복으로부터 수집되었다. 추가의 샘플은, 12 주째에, 미처리 대조군 뿐만 아니라, 균주 1 및 균주 2로 접종된 6 개의 처리 반복 플롯 모두로부터 수집되었다. 세척된 뿌리의 생 중량 그램 당 세포의 수는 qPCR 및 균주-특이적 프라이머를 사용한 다른 콜로니화 검정에서와 같이 평가되었다. 균주 1 및 균주 2의 2 개 균주는 12 주에 정점에 도달한 후 급격히 감소하는 일관되고 널리 퍼진 뿌리 콜로니화를 보여주었다 (도 16c). 균주 2가 균주 1보다 수습 배 낮은 것으로 나타났지만, 식물마다 더 일관된 수로 발견되었다. 줄기 내부를 효과적으로 콜로니화하는 균주는 나타나지 않았다. qPCR 콜로니화 데이터를 지지하며, 두 균주는 일치하는 서열의 단리물을 확인하기 위해 플레이팅 및 16S서열분석을 사용하여 뿌리 샘플로부터 성공적으로 재-단리되었다.

[0251] 미생물 육종의 예는 도 17 및 도 18의 개략도에 요약될 수 있다. 도 17은 미생물 육종을 나타내며 여기서 마이크로바이옴의 조성은 먼저 측정될 수 있고 관심 종이 식별된다. 마이크로바이옴의 대사는 맵핑될 수 있고 유전학에 연결될 수 있다. 그 후, 표적화된 유전자 변이는, 비제한적으로, 컨주게이션 및 재조합, 화학적 돌연변이 유발, 적응 진화, 및 유전자 편집을 포함하는 방법을 사용하여 도입될 수 있다. 파생 미생물은 작물을 접종하는데 사용된다. 일부 예에서, 최상의 표현형을 가진 작물은 선택된다.

[0252] 도 17에 제공된 바와 같이, 마이크로바이옴의 조성은 먼저 측정될 수 있고 관심 종이 식별된다. 마이크로바이옴

의 대사는 맵핑될 수 있고 유전학에 연결될 수 있다. 질소의 대사는 근권에서 AmtB 수송기를 통해 박테리아의 시토플로 암모니아 (NH_4^+) 진입을 포함할 수 있다. 암모니아 및 L-글루타메이트 (L-Glu)는 글루타민 합성효소 및 ATP에 의해 글루타민으로 축매된다. 글루타민은 바이오매스의 형성 (식물 성장)을 야기할 수 있고, 또한 *nif* 오페론의 발현을 억제시킬 수 있다. 그 후, 표적화된 유전자 변이는, 비제한적으로, 컨주게이션 및 재조합, 화학적 돌연변이유발, 적응 진화, 및 유전자 편집을 포함하는 방법을 사용하여 도입될 수 있다. 파생 미생물은 작물을 접종하는데 사용된다. 최고의 표현형을 가진 작물은 선택된다.

[0253] 본 발명을 설명하는 맥락에서 (특히, 하기 청구항의 맥락에서) 용어 "한" 및 "하나" 및 "상기" 및 유사한 지시어의 사용은, 본 문서에 달리 명시되지 않거나 문맥상 명백히 모순되지 않는 한, 단수형 및 복수형을 모두 포함하는 것으로 해석되어야 한다. 용어 "포함하는(comprising)", "갖는", "포함하는(including)" 및 "함유하는"은 달리 언급되지 않는 한 개방형 용어 (즉, "비제한적으로 포함하는")로 해석되어야 한다. 본원에서 값의 범위의 언급은, 본원에서 달리 지시되지 않는 한, 범위 내에 속하는 각각의 개별 값을 개별적으로 지칭하는 속기 방법으로서 기능하기 위한 것이며, 각각의 개별 값은 본원에서 개별적으로 인용된 것처럼 명세서에 통합된다. 예를 들어, 범위 10-15가 개시되면, 11, 12, 13, 및 14도 개시된다. 본원에 기재된 모든 방법은 본원에 달리 지시되지 않거나 문맥상 명백하게 모순되지 않는 한 임의의 적합한 순서로 수행될 수 있다. 본원에 제공된 임의의 모든 예, 또는 예시적인 언어 (예를 들어, "예컨대")의 사용은 단지 본 발명을 더 잘 설명하기 위한 것이며 달리 청구되지 않는 한 본 발명의 범위에 제한을 두지 않는다. 본 명세서의 어떤 언어도 본 발명의 실시예에 필수적인 것으로 주장되지 않은 요소를 나타내는 것으로 해석되어서는 안된다.

[0254] 실시예 8 프로모터 검증

[0255] 각 선택된 프로모터에 대해, *nifL* 유전자가 결실되는 그리고 *nifA* 유전자의 상류에 삽입된 프로모터로 대체되는 균주가 생성되었으며, 이는 *nifL*의 부재 하에서 니트로게나제 발현의 전사 활성화제이다. 이들 돌연변이체 각각은, 가스 크로마토 그래피를 통해 검출될 수 있는, 에틸렌 가스로 니트로게나제 효소가 환원하는, 아세틸렌 가스에 혐기성 배양물이 노출되는, 아세틸렌 환원 검정에서 시험되었다. 아세틸렌 환원의 속도는 샘플에서 존재하는 니트로게나제의 양에 해당하며, 따라서 *nifA* 전사에 대한 판독 값으로 작용하였다. 일부 경우에, 아세틸렌 환원 검정으로부터의 샘플은 RNA 추출되었고, *nifA* 및 니트로게나제 유전자의 전사는 qPCR을 통해 측정되었다. 결과는 표 6에 나타난다.

[0256] 추가 결과는 도 19-31c에 도시되어 있다. 도 19a, 19b, 및 24a에서 - *NifL* 유전자는 결실되었고 이중성 프로모터로 대체되었다 - 도면에 나타난 바와 같이. 숙주 세포에 외인성인 DNA 서열은 이 과정에 의해 게놈에 도입되지 않았다. 도 19a, 20a, 21 및 22에 나타난 바와 같이, *nifA*가 서열번호: 1, 5, 9, 11-24, 26, 27, 30, 33-37 및 40 중 어느 하나에 작동가능하게 연결되는 경우 *nifA* 발현은 야생형 수준과 비교해서 증가된다. 도 19b, 20b, 23, 24a, 24b, 25a, 25b, 26, 27, 28, 및 29에 나타난 바와 같이, *nifA*가 서열번호: 1, 2, 5-7, 9-12, 26-28, 32-38, 40, 42, 45, 50-51, 61-63, 67 및 70 중 어느 하나에 작동가능하게 연결되는 경우, 니트로게나제 활성은 야생형 수준과 비교하여 증가된다. 도 24a, 24b, 25b, 및 26-29에 묘사된 유전자 조작 균주는 경화되어 모든 비-천연 프로모터 서열을 제거하였다. 도 19a-23, 25a, 30 및 31에 묘사된 유전자 조작 균주는 검정 전에 경화되지 않았다.

[0257] 도 30-31c는 본 개시내용의 이중성 프로모터가 또한 *NifA* 이외의 다른 유전자를 상향조절하는데 사용될 수 있음을 도시한다. 도 30-31c에서 *bcsI*, *otsB*, *CysZ*, 또는 *treZ*의 천연 프로모터 서열은 본 개시내용의 이중성 서열로 대체되었다. 도 30에 도시된 바와 같이, *bcsI*의 발현은 유전자가 서열번호 2에 작동가능하게 연결될 때 증가되었다. 도 31a에 도시된 바와 같이, *CysZ*의 발현은 유전자가 서열번호 1에 작동가능하게 연결될 때 증가되었다. 도 31b에 도시된 바와 같이, *otsB*의 발현은 유전자가 서열번호 1 또는 서열번호 2에 작동가능하게 연결될 때 증가되었다. 마지막으로, 도 31c에 도시된 바와 같이 *treZ*의 발현은 유전자가 서열번호 2에 작동가능하게 연결될 때 증가되었다.

[0258] 본 발명의 바람직한 구현예들이 본원에 도시되고 기재되었지만, 이와 같은 구현예가 단지 예시의 방식으로 제공되는 것이 당업자에게 명백할 것이다. 다수의 변형, 변화, 및 치환이 이제 본 발명을 벗어나지 않고 당업자에게 일어날 것이다. 본원에 기재된 본 발명의 구현예에 대한 다양한 대안이 본 발명을 실시하는데 사용될 수 있음이 이해되어야 한다. 하기 청구항들이 본 발명의 범위를 정의하고 이들 청구항들 및 그 등가물의 범위 내의 방법 및 구조가 이에 의해 포함되는 것으로 의도된다.

표 3A

명칭	최소	최대	길이	방향
뮤린 지단백질 CDS	2,929,898	2,930,134	237	정
막 단백질 CDS	5,217,517	5,217,843	327	정
아연/카드뮴-결합 단백질 CDS	3,479,979	3,480,626	648	정
아실 운반체 단백질 CDS	4,563,344	4,563,580	237	역
ompX CDS	4,251,002	4,251,514	513	정
DNA-결합 단백질 HU-베타 CDS	375,156	375,428	273	정
sspA CDS	629,998	630,636	639	역
tatE CDE	3,199,435	3,199,638	204	역
LexA 리프레서 CDS	1,850,457	1,851,065	609	정
hisS CDS	<3999979	4,001,223	> 1245	정

[0259]

표 3B

명칭	차등 발현 절대 신뢰	차등 발현 비율	RNASeq_ nifL-미가 공 판독 카운트	RNASeq_nif L-미가공 전 사체 카운트	RNASeq_ WT-미가공 판독 카운 트	RNASeq_ WT-미가 공 전사체 카운트
뮤린 지단백질 CDS	1000	-1.8	12950.5	10078.9	5151.5	4106.8
막 단백질 CDS	1000	-1.3	9522.5	5371.3	5400	3120
아연/카드뮴-결 합 단백질 CDS	3.3	1.1	6461	1839.1	5318	1550.6
아실 운반체 단 백질 CDS	25.6	1.6	1230.5	957.6	1473.5	1174.7
ompX CDS	1.7	1.1	2042	734.2	1687.5	621.5
DNA-결합 단백 질 HU-베타 CDS	6.9	-1.3	1305	881.7	725	501.8
sspA CDS	0.2	1	654	188.8	504.5	149.2
tatE CDE	1.4	1.3	131	118.4	125	115.8
LexA 리프레서 CDS	0.1	-1.1	248	75.1	164	50.9
hisS CDS	0	-1.1	467	69.2	325	49.3

[0260]

표 4. 균주의 표

종 류	제1 참조	현재 명칭	보편적 명칭	혈통	돌연변이원성 DNA 설명	유전자형
1	출원 본문	CI006	CI006	엔테로박터 속 으로부터 단리 된 균주	없음	WT
2	출원 본문	CI008	CI008	부르크홀데리아 속으로부터 단 리된 균주	없음	WT
3	출원 본문	CI010	CI010	클레브시엘라 속으로부터 단 리된 균주	없음	WT
4	출원 본문	CI019	CI019	라넬라 속으로 부터 단리된 균 주	없음	WT
5	출원 본문	CI028	CI028	엔테로박터 속 으로부터 단리 된 균주	없음	WT
6	출원 본문	CI050	CI050	클레브시엘라 속으로부터 단 리된 균주	없음	WT
7	출원 본문	CM002	CM002	CI050의 돌연변 이체	삽입된 아미노글리코시드 O-포스 포트랜스퍼라제 유전자 aph1을 인 코딩하는 카나마이신 저항성 발현 카세트 (KanR)에 의한 nifL 유전자 의 파괴.	Δ nifL::KanR
8	출원 본문	CM011	CM011	CI019의 돌연변 이체	삽입된 스트렙토마이신 3''-O-아데 닐릴트랜스퍼라제 유전자 aadA를 인코딩하는 스펙티노마이신 저항 성 발현 카세트 (SpecR)에 의한 nifL 유전자의 파괴.	Δ nifL::SpecR

[0261]

종류	제1 참조	현재 명칭	보편적 명칭	혈통	돌연변이원성 DNA 설명	유전자형
9	출원 본문	CM013	CM013	CI006의 돌연변이체	삽입된 아미노글리코시드 O-포스포트랜스퍼라제 유전자 aph1을 인코딩하는 카나마이신 저항성 발현 카세트 (KanR)에 의한 nifL 유전자의 파괴.	ΔnifL::KanR
10	도 4a	CM004	CM004	CI010의 돌연변이체	삽입된 아미노글리코시드 O-포스포트랜스퍼라제 유전자 aph1을 인코딩하는 카나마이신 저항성 발현 카세트 (KanR)에 의한 amtB 유전자의 파괴.	ΔamtB::KanR
11	도 4a	CM005	CM005	CI010의 돌연변이체	삽입된 아미노글리코시드 O-포스포트랜스퍼라제 유전자 aph1을 인코딩하는 카나마이신 저항성 발현 카세트 (KanR)에 의한 nifL 유전자의 파괴.	ΔnifL::KanR
12	도 4b	CM015	CM015	CI006의 돌연변이체	삽입된 ompX 유전자의 상류 영역의 단편(Prm5)에 의한 nifL 유전자의 파괴.	ΔnifL::Prm5
13	도 4b	CM021	CM021	CI006의 돌연변이체	주석이없는 유전자의 상류 영역 단편 및 삽입된 그 유전자의 제 1 73bp(Prm2)에 의한 nifL 유전자의 파괴.	ΔnifL::Prm2
14	도 4b	CM023	CM023	CI006의 돌연변이체	acpP 유전자의 상류 영역의 단편 및 삽입된 acpP 유전자의 제 1 121bp(Prm4)에 의한 nifL 유전자의 파괴.	ΔnifL::Prm4
15	도 10a	CM014	CM014	CI006의 돌연변이체	lpp 유전자의 상류 영역 단편 및 삽입된 lpp 유전자의 제 1 29bp(Prm1)에 의한 nifL 유전자의 파괴.	ΔnifL::Prm1

[0262]

종류	제1 참조	현재 명칭	보편적 명칭	혈통	돌연변이원성 DNA 설명	유전자형
16	도 10a	CM016	CM016	CI006의 돌연변이체	lexA 3 유전자의 상류 영역 단편 및 삽입된 lexA 3 유전자의 제 1 21bp(Prm9)에 의한 nifL 유전자의 파괴.	Δ nifL::Prm9
17	도 10a	CM022	CM022	CI006의 돌연변이체	mntP 1 유전자의 상류 영역의 단편 및 삽입된 mntP 1 유전자의 제 1 53bp(Prm3)에 의한 nifL 유전자의 파괴.	Δ nifL::Prm3
18	도 10a	CM024	CM024	CI006의 돌연변이체	삽입된 sspA 유전자의 상류 영역의 단편(Prm7)에 의한 nifL 유전자의 파괴.	Δ nifL::Prm7
19	도 10a	CM025	CM025	CI006의 돌연변이체	hisS 유전자의 상류 영역의 단편 및 삽입된 hisS 유전자의 제 1 52bp(Prm10)에 의한 nifL 유전자의 파괴.	Δ nifL::Prm10
20	도 10b	CM006	CM006	CI010의 돌연변이체	삽입된 아미노글리코시드 O-포스포트랜스퍼라제 유전자 aph1을 인코딩하는 카나마이신 저항성 발현 카세트 (KanR)에 의한 glnB 유전자의 파괴.	Δ glnB::KanR
21	도 10c	CI028 nifL::KanR	CM017	CI028의 돌연변이체	삽입된 아미노글리코시드 O-포스포트랜스퍼라제 유전자 aph1을 인코딩하는 카나마이신 저항성 발현 카세트 (KanR)에 의한 nifL 유전자의 파괴.	Δ nifL::KanR
22	도 10c	CI019 nifL::SpecR	CM011	CI019의 돌연변이체	삽입된 스트렙토마이신 3''-O-아데닐릴트랜스퍼라제 유전자 aadA를 인코딩하는 스펙티노마이신 저항성 발현 카세트 (SpecR)에 의한 nifL 유전자의 파괴.	Δ nifL::SpecR

[0263]

종류	제1 참조	현재 명칭	보편적 명칭	혈통	돌연변이원성 DNA 설명	유전자형
23	도 10c	CI006 nifL::Kan R	CM013	CI006의 돌연변이체	삽입된 아미노글리코사이드 O-포스포트랜스퍼라제 유전자 aph1을 인코딩하는 카나마이신 저항성 발현 카세트 (KanR)에 의한 nifL 유전자의 파괴.	ΔnifL::KanR
24	도 10c	CI010 nifL::Kan R	CM005	CI010의 돌연변이체	삽입된 아미노글리코사이드 O-포스포트랜스퍼라제 유전자 aph1을 인코딩하는 카나마이신 저항성 발현 카세트 (KanR)에 의한 nifL 유전자의 파괴.	ΔnifL::KanR
25	도 4c	균주 2	CI006	엔테로박터 속으로부터 단리된 균주	없음	WT
26	도 4c	균주 4	CI010	클레브시엘라 속으로부터 단리된 균주	없음	WT
27	도 4c	균주 1	CI019	라넬라 속으로부터 단리된 균주	없음	WT
28	도 4c	균주 3	CI028	엔테로박터 속으로부터 단리된 균주	없음	WT
29	도 4b	균주 2	CI006	엔테로박터 속으로부터 단리된 균주	없음	WT
30	도 4b	고	CM014	CI006의 돌연변이체	lpp 유전자의 상류 영역의 단편 및 삽입된 lpp 유전자의 제 1 29bp(Prm1)에 의한 nifL 유전자의 파괴.	ΔnifL::Prm1

[0264]

종류	제1 참조	현재 명칭	보편적 명칭	혈통	돌연변이원형 DNA 설명	유전자형
31	도 4b	중	CM015	CI006의 돌연변이체	삽입된 ompX 유전자의 상류 영역의 단편(Prm5)에 의한 nifL 유전자의 파괴.	ΔnifL::Prm5
32	도 4b	저	CM023	CI006의 돌연변이체	acpP 유전자의 상류 영역의 단편 및 삽입된 acpP 유전자의 제 1 121bp(Prm4)에 의한 nifL 유전자의 파괴.	ΔnifL::Prm4
33	도 4d	균주 2	CI006	엔테로박터 속으로부터 분리된 균주	없음	WT
34	도 4d	진화	CM029	CI006의 돌연변이체	삽입된 ompX 유전자의 상류 영역의 단편(Prm5)에 의한 nifL 유전자의 파괴 및 글루타메이트-암모니아-리가제 아데닐릴트랜스퍼라제 (ΔglnE-AR_KO1)의 아데닐릴 제거 도메인을 함유하는 glnE 유전자의 시작 코돈 후 1287bp의 결실.	ΔnifL::Prm5 ΔglnE-AR_KO1
35	도 14c	야생	CI006	엔테로박터 속으로부터 분리된 균주	없음	WT
36	도 14c	진화	CM014	CI006의 돌연변이체	lpp 유전자의 상류 영역의 단편 및 삽입된 lpp 유전자의 제 1 29bp(Prm1)에 의한 nifL 유전자의 파괴.	ΔnifL::Prm1
37	도 14b	야생	CI019	라넬라 속에서 분리된 균주	없음	WT
38	도 14b	진화	CM011	CI019의 돌연변이체	삽입된 스트렙토마이신 3''-O-아데닐릴트랜스퍼라제 유전자 aadA를 인코딩하는 스펙티노마이신 저항성 발현 카세트(SpecR)에 의한 nifL 유전자의 파괴.	ΔnifL::SpecR

[0265]

종류	제1 참조	현재 명칭	보편적 명칭	혈통	돌연변이원성 DNA 설명	유전자형
39	도 14a	진화	CM011	CI019의 돌연변이체	삽입된 스트렙토마이신 3"-O-아데닐트랜스퍼라제 유전자 aadA를 인코딩하는 스펙티노마이신 저항성 발현 카세트 (SpecR)에 의한 nifL 유전자의 파괴.	Δ nifL::SpecR
40	도 15a	야생	CI006	엔테로박터 속으로부터 단리된 균주	없음	WT
41	도 15a	진화	CM013	CI006의 돌연변이체	아미노글리코시드 O-포스포트랜스퍼라제 유전자 aph1을 인코딩하는 카나마이신 저항성 발현 카세트 (KanR)에 의한 nifL 유전자의 파괴.	Δ nifL::KanR
42	도 15b	명칭이 없습니다	CM011	CI019의 돌연변이체	삽입된 스트렙토마이신 3"-O-아데닐트랜스퍼라제 유전자 aadA를 인코딩하는 스펙티노마이신 저항성 발현 카세트 (SpecR)에 의한 nifL 유전자의 파괴.	Δ nifL::SpecR
43	도 16b	균주 5	CI008	부르크홀데리아 속으로부터 단리된 균주	없음	WT
44	도 16b	균주 1	CM011	CI019의 돌연변이체	삽입된 스트렙토마이신 3"-O-아데닐트랜스퍼라제 유전자 aadA를 인코딩하는 스펙티노마이신 저항성 발현 카세트 (SpecR)에 의한 nifL 유전자의 파괴.	Δ nifL::SpecR

[0266]

균주의 표 (계속)

종류	제 1 참조	현재 명칭	보편적 명칭	혈통	돌연변이원성 DNA 설명	유전자형	유전자 2 돌연변이
34	도 4d	진화	CM029	CI006의 돌연변이체	삽입된 ompX 유전자의 상류 영역의 단편(Prm5)에 의한 nifL 유전자의 파괴 및 글루타메이트-암모니아-리가제 아데닐트랜스퍼라제 (Δ glnE-AR_KO1)의 아데닐릴-제거 도메인을 함유하는 glnE 유전자의 시작 코돈 후 1287bp의 결실.	Δ nifL::Prm5 Δ glnE-AR_KO1	

[0267]

도 8: 프로모터 서열

서열 번호	서열
1	CGTCCTGTAATAATAACCGGACAATTCCGACTGATTAATAAAGCGCCCTTGTGGCGCTTTT TTATATTTCCCGCTCCATTAAAAATAAAAAATCCAATCGGATTTCACTATTTAACTGGCCAT TATCTAAGATGAATCCGATGGAAGCTCGCTGTTTTAACACGCGTTTTTAACTTTTATTGAA AGTCGGTGCTTTCTTTGAGCGAACGATCAAAATTTAAGTGGATTCCCATCAAAAAATATTCTC AACCTAAAAAGTTTGTGTAATACTTGAACGCTACATGGAGATTAACCTCAATCTAGAGGGT ATTAATAATGAATCGTACTAACTGGTACTGGGCGC
2	TCACCACGGCGATAACCATAGGTTTTTCGGCGTGGCCACATCCATGGTGAATCCCACTTTTTCC AGCACGCGCGCCACTTCATCGGCTCTTAAATACATAGATTTTCCTCGTCATCTTTCCAAAGCC TCGCCACCTTACATGACTGAGCATGGACCGTGACTCAGAAAATCCACAAACGAACCTGAAA GGCGTGATTGCCGTCTGGCCTTAAAAATTATGGTCTAACTAAAAATTTACATCGAAAAACGAG GGAGGATCCTATGTTTAAACAAACCGAATCGCCGTGACGTAGATGAAGGTGTTGAGGATATTA ACACGATGTAAACAGCTCG
3	ATCATATTGCGCTCCCTGGTTATCATTTGTTACTAAATGAAATGTTATAATATAACAATTATA AATACCACATCGCTTTCAATTACCAGCCAAATGAGAGGAGCGCCGTCTGACATAGCCAGCG CTATAAACATAGCATTATCTATATGTTTATGATTAACTGATTTTTCGCTTTTGGATTTG GCTGTGGCATCCTTGCCGCTCTTTTCGACGCTCTGCGTTTTTGCCCTCCGGTCAGGGCATT AAGGTCAGCAATGATTTTACGCAATTACGATTCTTGCCCTCGGCATGTCGATGGATGCTT T
4	TGACGAGGCAGGTTACATCACTGGTGAAACCCCTGCACGTCAATGGCGGAATGTATATGGTTT AACCACGATGAAAATTATTTGCGTTATTAGGCGGAAAGGCCTCAAAATAGCGTAAATCGTG GTAAGAAGTGCCTGGGATTAGTTGCAAAATTTTCAACATTTTATACACTACGAAAACCATCG CGAAAGCGAGTTTGTATAGGAAATTTAAGAGTATGAGCACTATCGAAGAACGCGTTAAGAA AATTATCGGCGAACAGCTGGGCGTTAAGCAGGAAGAAGTTACCAACAATGCTTCTTCTGTTG AAGACCTGGGCGCTGATTCTCTTGACACCG
5	GGACATCATCGCGACAAACAATATTAATACCGGCAACCACACCGGCAATTTACGAGACTGC GCAGGCATCCTTTCTCCGTCATTTCTGTCAAATAAAGTAAAGAGGCGAGTCTACTTGAAT TACCCCCGGCTGGTTGAGCGTTTGTGAAAAAAGTAAGTAAAAATCCGTAGAAATAGCGCC ACTCTGATGGTTAATTAACCTATTCAATTAAGAATTATCTGGATGAATGTGCCATTAAATGCG CAGCATAATGGTGCGTTGTGCGGGAACCTGCTTTTTTTTGAAGGGTTGGTCAGTAGCGGA AAC
6	CCATCCGGTTAAGCGTATCGAAGAAGTTCTTGCCCTTGCGCTGCAGAATGAACCTTTGGTA TGCAAGTCGTAAACGGCAAAATAGTGACCTTGCGCAAAAGTGCGTTAATAAAAAACAAGGTTGG TGAGTGATTTCCGACTTGCCAGCCTTTTTTTGTATAGCTAATTTAGATTGCTGGTTGGGTGTG CCATCATCACTGGTGTTGTAAGGGCATGACAGGCCTGATATAACTGCTGCGCGGTGCGCT GTGAAGGATTGAGGTGCGATATAAATTATAAAGAGAGGAAGAGTAGAGTGAATAAATCTCA ACTGGTAGACAAGATTGCCGC
7	CGCGTCAGGTTGAACGTAAAAAAGTCGGTCTGCGCAAAGCACGTCGTCGTCGCGAGTTCTCC AAACGTTAATTGGTTTCTGCTTCGGCAGAACGATTGGCGAAAAAACCCGGTGCGAACCGGGT TTTTTTATGGATAAAGATCGTGTTATCCACAGCAATCCATTGATTCTCTTTTTCAGCAT TTCCAGAATCCCTCACCAAAAGCCGCAAAATCTGGTAACTATCATCCAATTTTCTGCC AAATGGCTGGGATTGTTCAATTTTGTGTTGCTTACAACGAGAGTGACAGTACGCGCGGTA GTTAACTCAACATCTGACCGGTCGAT
8	CAGAGCCGGGTTGTTGATCCGCGAGGCGTGACGGTTGCGGCAGCAGCAGAAGCGCCACAGC TGATTTTCGACAGAGGTACGCGCTGAACGCGTGGCGCAGACACGCGAGAACTGCCGTTATTA CGCAATCGCCGTTTCGCTGTACCGCATTTATTGTGATGTTTTTTAAACAATGCTTGATTATC TCGTTACACATTGCTATTGTGTGCGCGCTCGAATGACCGTTAATGAAGTCCGGTTATAATG GCGTTTTATGCAGCCTGTTTTAAGAAAGAAGGTATCTATGGGTGAGATTAGTATTACCAAAC TGCTGGTTGTGGCCGCACTGTTGTTCTGCTGTT

[0268]

서열 번호	서열
9	ATATTGACACCATGACGCGCGTAATGCTGATTGGTTCTGTGACGCTGGTAATGATTGTCGAA ATTCTGAACAGTGCCATCGAAGCCGTAGTAGACCGTATTGGTGCAGAATTCCATGAACTTTC CGGGCGGGCGAAGGATATGGGGTTCGGCGGCGGTGCTGATGTCATCCTGCTGGCGATGTTTA CCTGGATCGCATTACTCTGGTCACATTTTCGATAACGCTTCCAGAATTTCGATAACGCCCTGGT TTTTTGCCTAAATTTGGTTCCAAAATCGCCTTAGCTGTATATACTCACAGCATAACTGTATA TACACCCAGGGGGCGGGATGAAAGCATTAAACGGCCAGG
10	CCTGTATGAAGATGGCGTGCACAAAGATCGCCTGGATAACAGCGATATGATTAGCCAGCTTG AAGCCCGCATTCGCGCGAAAGCGTCAATGCTGGACGAAGCGCGTCGTATCGATGTGCAACA GGTAGAAAAATAAGGTTGCTGGGAAGCGGCAGGCTTCCCGTGTATGATGAACCCGCCCCGCG GCGACCCGTTGTTTCGTCGCGGCCCGAGGGTTTCATTTTTGTATTATAAAGAGAATAAACG TGGCAAAAAATATTCAAGCCATTTCGCGCATGAACGATTATCTGCCTGGCG
11	TTGCTAAGTCTTAGCAATAAATGAGATAAGCGGTGTGTCTTGTGAAAAACAAGGACTAAA GCGTTACCCCAATAAAAAAGATAGCGACTTTTATCACTTTTAGCAAAAGTTGCACTGGACAAA AGGTACCACAATTGGTGTACTGATACTCGACACAGCATTAGTGTGATTTTTCATATAAAGG TAATTTTG
12	GCCGCTGACCGACAGAACTTCCACCTTGGACTCGGCTATACCTTGGCGTGACGGCGCGC GATAACTGGGACTACATCCCCATTCCGGTGATCTTACCATTGGCGTCAATAGGTTACGGTCC GGCGACTTTCAGATGACCTATATTCGCGCACCTACAATAACGGTAACGTTTACTTCGCGCTG GGCTCGTATACAGTTTTAATTCGCTAAGTCTTAGCAATAAATGAGATAAAGCGGTGTGCTTGT GGAAAAACAAGGACTAAAGCGTTACCCACTAAAAAGATAGCGACTTTTATCACTTTTATAGC AAAGTTGCACTGGCAAAAGGTACCCACAATTGGTGTACTGATACTCGACACAGCATTAGTGT CGATTTTTTCATATAAAGGTAATTTTG
13	TCCCGGCTGTGCGTGAGGGAGACTGTTCTTAATCTGGCGCGCGAAGGTTGCTATTGCCCTGA AAATGGACCACCTAGCTGAGGTGCGCAAAAAACGTCGCGCGGACTTTGGGTTACATTTCA TCCGGTCAACCACGGGTTTGCCCTTGAAACCAGAACAGGATAAAGGAGTCAGA
14	CCCGCAGCGGGTGATCCCTGGTCATTACCTCGGCACCCCGCGGAGGGAGACAGCGCGGTG CGCTTCAAAAAACGTATCTCCAGCAGTTTGAGCAGGCGCTGAAGACGCATCAGGATTGCGG CGGGGTGATCAAGGCCATGGAGACGCAAGTGGCCGGGCTGGCGGAGTCCAGCTCGCTGGAG TTAAGCGCCAAAGTTAATACCGGCGAGATGAAGTGGTGATCCCGGCTGTGCGTGAGGGAGA CTGTTCTTAATCTGGCGCGCGAAGGTTGCTATTGCCCTGAAAAATGGACCACCTAGCTGAGG TCGCACAAAAAACGTGCGGCCGACTTTGGGTTACATTTTCATCCGCTCACCACCGGGTTTGC CTTGAAACCAGAACAGGATAAAGGAGTCAGA
15	TGAGTATTGTGAGCCGGAAGTTTGATCGGAAGGATGTGGGAACGGTATTTTCGCCATGCGGTG ACCTGAAAAGTTTTGTGCCGTCTGGAGGTAAAACTGACTGCAGAAAGACAGGGAGCAGTTAC TGTCCTTAATCAGTCTGGTGATTCGCGCCGAGAGAACGCGGTAGTGAACAACGGGCGGTT GAAATCCGGCAGGCGCTGGGTTTACAGACAGAAAAACGAGTCAGGAGGTGTTTGAGGATATA TTCAGTTATCAGGCTGTTAGTCTGGGTGGATTTCGATACGACAGGGTATAATGACGTCGGCG CTTGAGGCTTTTGCCTCATGACGTAAAGGTGGTTTGTACCGTGTGTGCGGCAGAAAGCA GAAAGCCCCGTAGTTAATTTTCATTAACCCACGAGGCCCTGTATGTCTCATCAACAACAG TATGGCCTCTTACCGTGCTCAATGCAAGGAGGAGTAAACC
16	AGTCAGGAGGTGTTTGAAGGATATATTCAGTTATCAGGCTGTTAGTCTGGGTGGATTTCGATA CGACAGGGTATAATGACGTCGGCGCTTGAGGCTTTTGCCTCATGACGTAAAGGTGGTTTGT TACCGTGTGTGCGGCAGAAAGCAGAAAGCCCCGTAGTTAATTTTCATTAACCCACGAGGCC CCCTGTATGTCTCATCAACAACAGTATGGCCTCTTACCGTGCTCAATGCAAGGAGGAGTAA CC
17	ACGCTTCGCGCCGAAAAATAAGCGCATCGGTAGCACGCTCAGTAAATCGCCGTCTATACTGAA AGAGCCTGACTGAAGGCTAATTCCAAGGAGATTGCAGG
18	GAGCGCACGCCGCGCTGGCGAGCGCCGAGGTACGCGCGGCTGGATGAATCAGATTATCG AACAGTGATCCTGATGGCGCCGAGCAATATATGTGGCTGCACCGGCGTTTAAAGACTCGC CCGGAAGGGGTACCGCCGCTTACTGAACGCTTCGGCCGAAAAATAAGCGCATCGGTAGCA CGCTCAGTAAATCGCCGTCTATACTGAAAGAGCCTGACTGAAGGCTAATTCCAAGGAGATTG CAGG

[0269]

서열 번호	서열
19	CCAGCGCGCAGCGCATGGGTACGTAAGGGGGCTTTGCCGCTGCACCGTAAAAAAAGTT TGCTATCAGGTGCTGAACGTGCGTTAATGCTCGCAGGTTTGATGTACAGACCACAGAGCAGT CGAATAGAGCAGTCCTTCTAAGGTTATCCAAAGATACCCCGTAGTGAACCTTCCCTTTATCG CTTTAAATCTGTAGTCCAGACCGCTACGCCGCAAGGCTCACTTATTTTTTAAAGGTAATTCA CT
20	AGTGGGAGTCGAGACGGGTTAGACCGTCTCCACCGAGCTGAAATTGATGCGCCTGATTACG GCCAATCCACAGCTTTTACGACAGTTACTCGATTAATCCAGCGCGCAGCGGCATGGGTCACT AAGGGGGCTTTTGCCGCTGCACCGTAAAAAAAGTTTGCTATCAGGTGCTGAACGTGCGTTA ATGCTCGCAGGTTTGATGTACAGACCACAGAGCAGTCGAATAGAGCAGTCCTTCTAAGGTTA TCCAAAGATACCCCGTAGTGAACCTTCCCTTTATCGCTTTAAATCTGTAGTCCAGACCGCTA CGCCGCAAGGCTCACTTATTTTTTAAAGGTAATTCACT
21	GCCGGCGATCAAAAAAGCAGCGATTAAATCGTTGCATAGGGCGCGAAATTGGCATACAATTT CGCGCTTTTGTGTTTTATGGGCTGGCCCGTAAAAACGATGTTAATCACGGGGAGCTTCTCTG AAGCGTTAATACCAATTTGAGGATTAAGA
22	GCTAAAGTCTCGGCTAATCGCTGATAACATTTGACGCAATGCGCAATAAAAGGGCATCATT TGATGCCCTTTTGCACGCTTTTACACGAACTTGGCTCATCAGTGATTTTTTTGTGATAAT CATTGCTGAGACAGGCTCTGAAGAGGGCGTTTATACACCAAAACATTGAGCGGTAGCGCG ACGGCAAGTCAGCGTTCTCCTTTGCAATAGCAGGGAAGAGGCGCCAGAACCAGCGCGTTG AAGCAGTTTGAACGCGTTCACTGTATAATCCGAACTTAATTTGCGTTTGA
23	CTTGTGGCTGAACGACTCATCATTGTTTGTAAACAGGATGTAGCGCCAGAGTAACTGGCAAC AAAGCAGATGCTGCAGGCAGTATAAAGGCTAATGGCGTAAATCCATACTACAGAAATGGTGC CAGCGGCGCGATACCCCTCCAGGAATTATCTTAGAATCGAAGCGCAATGAAACCGCGCAA CAACGCTGACCACTGCGATATTGACAAAGTACAGGCGGAAGAATCGCACGAAATAACAAG ACATTTGGCTGAATAAGGGCAATTGACAGGCTAATTGATTGATTAAATAGTCGTTAGGGAAATTT TTTGCCGTAGCACAGATAAATTAAAGTTGTGTAAGAAGGGTAAAAAAACCGGATGCGAG GCATCCGTTGAAATAGGGGTAACAGACATTCAGAACTGAATGACGGTAATAAATAAAGT TAATGATGATAGCGACTGTTATTTTAGTCACCAATGATAGTTTTGTTTTACCATTCACTGTCTA TAGAGTTATTTGTCTGTATGTGATTGATTGTGAGGAAATAAATATTTTTTTGATTATTAGTG CGTATTTCCAGACCATTTTGTGGTGCAAAAAGTCCGCCATTTTACAAATTGAAACATCTT GTGGGCATTTTGAACATCTTAGAAGTTTGTAGTATCATATTCTTGTGGATTATTCTGCATTTT GCAGCACAAATGAAATAGCCGACTGATTAGAAGGGTAATCAGTAAGCAGTGGCATAATAAAA GGCATATAACAAACAGAGGGTTAATAAC
24	TGAGGAAATAAATATTTTTTTGATTATTAGTCGCTATTTCCAGACCATTTTGTGGTGCAAA AAGTTCCGCCATTTTACAAATTGAAACATCTTGTGGGCATTTTGAACATCTTAGAAGTTTT AGTATCATATTCTTGTGGATTATTCTGCATTTTGCAGCACAAATGAAATAGCCGACTGATTAG AAGGGTAATCAGTAAGCAGTGGCATAATAAAGGCATATAACAAACAGAGGGTTAATAAC
25	TTCTGCGAGTTTCAGAAAAAGGGGCTGACGGCCCTTTTTCGACCGGGCGGCAGCAATTC ATTCAAAACTCATGTATTGTTGCTAGTAATGATCTTCATGCAGAGGTTTCGCGCGGCTAATGA GAGGCTTCATCCGAGGGCGGGTAAAGGTTGTCATTAGTCGCGAGGATGCAGAGGATCGG GTCAATAGACGCTATATCTTTGATATGGCGTGATTATAGATAAAAAGGATAGAATT
26	CGCGCTCTCGCAGTACCATTTGCAACCGACTTTACAGCAAGAAGTGATTCTGGCACGCATGG AACAAATTTCTGCCAGTCGGGCTTTATCCGATGACGAACGCGCACAGCTTTTATATGAGCGC GGAGTGTTGTATGATAGTCTCGGTCTGAGGGCATTAGCGCGAAATGATTTTCAACAGCGCT GGCAATCCGACCGATATGCCTGAAGTATTCATTAATCTTAGGCATTTACTTAACGCAGGCAG GCAATTTTGATGCTGCCTATGAAGCGTTTGATTCTGTACTTGAGCTTGATC
27	AAACAAGGGTATAAGGCTATCTTGTGTTGCCATTTTAGCTCCGGGGTGTGCTCGAAATGCTCA CGTACTACGTGTACGCTCCGCTTTCTGCGCGCACGCCGGAACATAACTAGCTGCACCGATAT ACGCCTTCTATCCCTTGTGTTAATGCTCAGTACCAAGATGCTGATTGCATTTTCCCGAGAAATC AGTAAAAATTTTCGGGCTTTAATATGACACCGGGCTCCGTTCTCGATGGGGCCCGGTTGTTT TATTCACACAAGAGGATGTT

[0270]

서열 번호	서열
28	TCGGTTTCAGGGCAATTCATTGGTCTGATAAAGATAATATGTCCCCGTTCTCAGGGGGAAAA GATTGTGCGCGCATTACCAAAAAATGCGATATTCGCGCAGGGCCTCCATCTTAATACGATA AAAGGGCGGTACAGCCGTTGTACATAACCCCTTCATTGTGGATCTCGCGGTTAATCGCCA AAAATAGCGCTAAATGACAACAAATATCATTTGCCTTCCATTAGATAAATACTTACATTCAT AACTATTAGTAATGTTTGGCGCCAGGGCGCTTTTATATTTCGAGGTGGAT
29	ACTATCGCGAAGACGCGCAATCCCGGTGATGATTTCTAAACAGCGCTTGCCTCGTGCCAG AATTTGCGTATAATGCGCGGGCTGTCAAAGTTGACAGCCGTTGATATGAACCCCTGATAG TGCTTTTGTATCAAACAATGTCCCAATCGGGGACTATGTAAGAACGGTTACACTCTCCC ATCAATCGTAATGGGTATGAGGAGTAATCATTTCTGCTATAAAATAATTGGAGCTCTGGACT C
30	ATATCGATCAATAAATTTGAACAATGACAGCAAACTCCTCCGCTTTTGTATTAGCGATGTGCG GGCTACTATTTAACACATCAAGGCACGGCGCTTATCTAAACAATAAATGAAAGGGTTTAT ATC
31	TGAAATGGTGCAGAAGGCCGCGATGTGCGGCGTCGAGATCCTGTTGCGAGTCTCGGCGGCCA CTACCTTAGCGGTGGAAGTGGCCGAGCGCTGCAATCTGACGCTGGTGGGCTTTTGCAAGCCG GGCAGGGCGACAGTCTACACCCATCCGACGCTTTAATTGCGGGTTAAATATCGATCAATAA ATTTGAACAATGACAGCAAACTCCTCCGCTTTTGTATTAGCGATGTGCGGGCTACTATTTAAC ACATCAAGGCACGGCGCTTATCTAAACAATAAATGAAAGGGTTTATATC
32	ATGAAATTAGGATTATTCCTGGAATTTTTTACCAGTGGTAAAGACACAGCGTTTTTCAGGG ACTTTTTGCGCAATGCCTGTACACGGGGATTTCGCTTTTTTCTGCGTACGAAAAATCAAC CATATTTGTTAAATATTGTGTACACAACCTTTTTTTCATATGCCTGACAGAGTTCACACTT GTAAGTTTCGAACTAAGTTGTAGACTTTACATCGCCAGGGGTGATCGGCTTACGCTGCATGT ATCAGCATAGTTAACAACAAGTCACGCCCCGGGTGAAGGATTAAACCGTGAGGTCTTTTGTA ACTTCATGGCGAATTTTGATGATAATGAGCGCAAAAA
33	ACCCTTTTTTTCATATGCTGACAGAGTTCACACTTGTAAGTTTCGAACTAAGTTGTAGACT TTACATCGCCAGGGGTGATCGGCTTACGCTGCATGTATCAGCATAGTTAACAACAAGTCACG CCCCGGGTGAAGGATTTAACCGTGAGGTCTTTTGTAACCTTCATGGCGAATTTTGATGATAA TGAGGCGCAAAAA
34	GCCGACGAAGCCTCGCCGCGCGCTTCGTTATATACCTCAACAGGAGTACTCCGGTTGTATC GATAATGCGAGGGCTGCAGGTATTATTTCCCTGCACACAGTAAGTTAGCGGTGATGTGCCGT CTGGTTATTTTTAATGTGTGTTGTAGAATTATCCGAATTACTGCTGAAAGACGTCGGGAAAA CGGAATAATAATTTGACTAACCAGCATTACCCGCTAGAGTTAAATATCGAACGACGAGTGAT ACGGAATATTTTCGTATCGTACTGACATAACCGATATACATGAGGTGAAAT
35	TAGAGTACGCATTCTCGATACGGATAAACGGCTCAGCGATGAGCCGTTTATTTTTCTACCCA TATCTGGTTTGTGGTGTATAATGCCGCGCCCTCGATATGGGGCTTTTAAACGACCCTAATTT TCGGGACTCAGTAGTAGTTGACATTAGCGGAGCACTAAA
36	ACGACCAAACTGCACGTACATGACGAGAACAACGAATGCGGTATCGGTGACGTGGTTGAAA TCCGCGAATGCCGTCCGCTGTCCAAGACTAAGTCCTGGACGCTGTTTCGCGTTGTAGAGAAA GCGGTTCTGTAATAGAGTACGCATTCTCGATACGGATAAACGGCTCAGCGATGAGCCGTTTA TTTTTCTACCCATATCTGGTTTGTGGTGTATAATGCCGCGCCCTCGATATGGGGCTTTTAA CGACCCTAATTTTCGGGACTCAGTAGTAGTTGACATTAGCGGAGCACTAAA
37	GAATTTACTTACATTAAGGCGGCGAGGGGCGCCTATACTTGATAGTTCTGATACCAGAAGAA GGAAGAACT
38	ATGCCACGGCCTCCCGGATCGGGTGGTGGAGCAGATTATGACCATGCTGTGCGCGCGACG GCAACCCCGGTAAGTTAAGAATTTACTTACATTAAGGCGGCGAGGGGCGCCTATACTTGATA GTTCTGATACCAGAAGAAGGAAGAACT
39	TAACTATAAACGCCTATACCTAAATAATTCGAGTGGCAGGAAGGCGGCGACGACGCAAT CCCCAGGAGCTTACTCAAGTAAGTACTGGGGTGAGTGAGGAAAGCCAACACACAGGCAAC TTGAAGTATGGCGGGTATAGGTGCCGTAACCTCGGGGGAACGGCACCTTGCGTCATAAGTAC TGATAACGATAAAGTCGGGTTGAAATTGTGTATATCGGCTAAACTTAGGTTTAAACAGAATGT GATGCCATGACTGCCTTATACCGCAAGGTATTTGTATCGCTTACTTTTGGCGTTATATGAT GGATAATGCCGGGATACGAGAGTCCCGACTCTTTAATCTTTCAAGGAGCAAAGA

[0271]

서열 번호	서열
40	GCACCTTGCCTCATAAGTACTGATAACGATAAAGTCGGGTTGAAATTGTGTATATCGGCTAA ACTTAGGTTTAAACAGAAATGTGATGCCATGACTGCCCTTATACCGCAAGGTATTTGTCATCGCTT ACTTTTTGGCGTTATATGATGGATAATGCCGGGATACGAGAGTCCCGACTCTTTTAATCTTTC AAGGAGCAAAGA
41	AGTATTAAGGCGGAAACAGAGTTCAACCGGCGCGTCTAATCGCATTAAACAAAGAGATT GCGCGCAAGAAGTTGCGCTCACAGGCGTCGATGGCGAGCAGATTGGTATTGTCAGTCTGAAT GAAGCTCTTGAAAAAGCTGAGGAAGCGGGCGTCGATTAGTAGAAATCAGTCCGAATGCCG AGCGCCAGTTTGTGCAATC
42	TGAACATCACTGATGCACAAGCTACCTATGTGCAAGAATTAATAAAAACTGCAAGATGC AGGCATTGCGGTTAAAGCCGACTTGAGAAATGAGAAGATTGGCTTTAAAAATTCGCGAACAC ACGCTACGCCGTGTTCTTATATGTTAGTTTGTGGCGATAAAGAGGTCGAAGCAGGCAAGT TGCTGTTCTGTAACCGCGCGGCAAGACTTAGGAAGCATGGATGTTAGCGAAGTCGTTGACA AACTGCTGGCGGAAATCCGCAAGCAGAAAGTCTTCATCAACTGGAGGAATAAAGTATTAAAGG CGGAAACAGAGTTCAACCGCGCGCTCCTAATCGCATTAAACAAAGAGATTGCGCGCAAGAA GTTGCGCTCACAGGCGTCGATGGCGAGCAGATTGGTATTGTCAGTCTGAATGAAGCTCTTGA AAAAGCTGAGGAAGCGGGCGTCGATTAGTAGAAATCAGTCCGAATGCCGAGCGCCAGTT TGCGAATC
43	TCTGGCTTAATCTGGTGCTGAAGAATATTCAGTGCCGGTTTTGGCTATAGTTTTTTTAACC TCGCCGAAGGATCTGTAGCGGGCATTTGAAACAACCCCATCCAGCAGGACGCCAG
44	TGCACCGGTGAAGATATTTCTGGATGCCAGTTCGGAAGAACGTGCAACAGAAAGTATGCTA CAGTTGCAAGGAAAAAGGCTTGTAGTTAACTTTGAACGGCTTTTAGCCGAGATCAAGAAGC CGATGACCGTGATCGTAACAGGCTATCGCGCCTTTAGTGGTCTTCCGATGCACTGTTGCT GGATTCAACCAGTATGTCTATCGACGAAGTCATCGAAAAAGCACTGGCTTATGCCACAGAAA TTCTAGGATTACCGCAAAACAAACCCGTAATCTGGCCTTAATCTGGTGCTGAAGAATATT CAGTGCCGGTTTTGGCTATAGTTTTTTTAACCTCGCCGCAAGGATCTGTAGCGGGGCATTTG AAACAACCCCATCCAGCAGGACGCCAG
45	TACAGTAGCGCTCTCAAAAATAGATAAACGGCTCATGTACGTGGGCCGTTATTTTTCTAC CCATAATCGGGAACCGGTGTTATAATGCCGCGCCCTCATATTGTGGGGATTCTTAATGACCT ATCCTGGGTCCTAAAGTTGTAGTTGACATTAGCGGAGCACTAAC
46	TCTGTAACAGAAAGTTTTACAGCTCCTTTCCATCTGGAAGGAGCTGTCGTCTACGGACGC AGGACGCGTTTGTGTTAAGCAAGCGGATGACAGGATGTTTATCCAATGTTTGTCTCCGGGAG TAGAA
47	TCAAGCGAGTTTCAGTGTAAAGGGGCCAATAGGCCCTTTATTCTAGGAAGCGCAGCCAAAT CAGGGTACTGTATGGCTGCGGTTTCTACTGTTATTCTAAGAACATGAACCTCCGTTACAGATG TTTTCGCGCGGCTAATGAGAGACTTTATTACCACATTGCCAGGTATATAAGGATTGTCATTAG TCGCGAGAATGTAGTGAGAAGCTCGGATATTTATCGGCGTGAACGTGTCATAACAGCTGC GCGTCATACAAAAGGATATTACA
48	AAATTACGAAATATTATGCGTTTTTTCGGTAAAAACCGCAAAATAGAGCAAAATTCGTGGTT TGACCGCTGGATTTAGTTGCATCTTTTCAACATTTTATACACTACGAAAACCATCGCGAA AGCGAGTTTGTATAGGAAATTTAAGAGT
49	GAATATTAGCGAAAAATGGCAAGGGTATCATGCTCAATGTGGTTGATTCTGCATCTATTGA GCAAGTATTGGCGACGATTGAGCTGAATTTGGCGAAATTGATATTTAGTTAATAATGCCG GCATACCCGTGATAACCTTCTCATGCGTATGAAGGATGATGAGTGGCAGGATATCCTGGAT ACGAACCTGACTTCAGTGTTTCGGCTGTCAAAAGCTGTATGCGAGCTATGATGAAGAAACG GTGTGGACGGAATTATTACAATTGGTTCCGTTGTTGGCACCATGGGTAACGCAGGGCAGGCGA ACTACGCGGCGGCTAAAGCTGGCTTGATTGGTTTTAGTAAGTCTTTGGCACGTGAGGTCGCT TCACGTGGCATTACTGTCAACGTCGTGGCTCCCGGCTTTATTGAGACGGATATGACAAGGGC GTTGACAGATGATCAACGCGCAGGCATTTTGTATCAGTTCAGCCAACCGGTTGGGCGATG CCAAAGAAATTGCCAGCGCCGTTGCTTTTTAGCCTCTGACGAGGCCAGCTACATCACGGGT GAAACATTACATGTCAATGGCGGATGTATATGATTTAAAAATTACGAAATTTATGCGTTTT TTGCGGTAAAAACCGCAAAATAGAGCAAAATTCGTGGTTTGACCGCTGGATTTAGTTGCAT CTTTTCAACATTTTATACACTACGAAAACCATCGCGAAAGCGAGTTTGTATAGGAAATTTA AGAGT

[0272]

서열 번호	서열
50	AATTTTTTTTACAAAGCGTAGCGTTATTGAATCGCACATTTTAACTGTTGGCCGCTGTGGA AGCGAATATTGGTGAAGGTGCGGTTTTAAGGCCTTTTTCTTTGACTCTCTGTCGTTACAAAG TTAATATGCGCGCCCT
51	TAAAAACGTGACCACGAGCATTAAATAAACGCCACGAAATGTGGCGTTTATTATTCAAAAA GTATCTTCTTTTATAAAAAAGTGCTAAATGCAGTAGCAGCAAAATTTGGGATAAGTCCCATGGA ATACGGCTGTTTTCGCTGCAATTTTAACTTTTTCGTAAAAAAGATGTTCTTTGAGCGAAC GATCAAAATATAGCGTTAACCGCAAAAAATTATTCTCATTAGAAAAATAGTTTGTAATAC TTGTAACGCTACATGGAGATTAACTTAATCTAGAGGGTTTTATA
52	ACACCCTCCTCCATCACCATTTGTGATTATGGTTATTAAATTTTTATAGAAATAACTTAACGA TCATTATTAATAATAGTTGCGCACAAGTCCAGCGGAGTTTATTATTTAATTATCGAGCGATA AGAAAAATCGCTCAAACCCGCAAAACTGCGCAGCTAAAAACGCTTTTAAAGCATACTATCCAG GACGTAACATC
53	TAAAAAATTCCTGAACGGGCGGTAAATGAAAAAGGTTTTATCAATCATTTCATGCTGTGAGCA CGGTTTGCAAGGCTTGCGATATGAATTGATGCAACAATGTGTGGTGACCAAGAAATCACTGCC GGTTCATTTCAGATAGGTCAAAGGTATCGGACTGACAGGTAATTCCTGCTTTTTTTATGATCT GCAACAGGCATAGTATCGACATCAAAAAGGTGATGTGGATAACAAAAACAAACATTCCCT TTTCATTATCTCGTTGGCATTAAACAAAGGAGTCTCC
54	TCAATCTCATAGTTCTGTGAACCGTCCCGCAATTCCTGCAATACAAGAGGTTGTTGTTAAA GAACTCTGAGACTTACGTCAAAGACTGATAGCCGGATACTATCTGATTGATTGGTGGCATGG GGTTTATTCACCCGACGCTTGCCCTATCTGACAGTCGTTTTGTCATCTTCTTCCCTTACCT ACGACGCCCTCTTGGGTTTCATAAGGAGTAATATT
55	TACCGGCGGTTTGCAACCAGGTAAGACATCCGGCCACTGCCAGCTTGATTTCATCGATAATC ACCTGCGGTGTTGCCGCAATACGCGGGGGATATTTCCCAAGCCGCCACCGGTGAGATG GACGATGCCGTGAACATCCACGTTTTGCGATCAGGTTGAGGATCGATTTACGTAATTTTGGT CGGTGCGAGCAATGATCAGCCAGCGGTTGCTGCCAGATCGGTGGTTTCCGGGTGCGTCT TGCTGACTTCCAGAAATTTTGGCACCAGAGAATAACCGTTAGAATGCGGGCCACTGGCGGCC AGACCAATCAGCACATCCCGTCAGCCACTTTGCTGCCGTCGATGATTTCTGATTTTCCACC ACGCCCACGCAAGCCTGCCACGTGTAATCTTCCCGTGATACATGCCCGGCATTTACGC GGTTTACCGCCAATAACGCACAGCCAGACTGTTTACAGCCTTCTGCGATAACCGTGATCA CGCTGGCAGCCGTATCGACGTCCAGTTTCCCGGTAGCGTAATAATCGAGGAAGAACAGGGG TTCCGGCGCCTGAACGATCAATCCTTGACGCACATCGCGACCAAGGTCGATACCGATAGTAT CGTGGCGTTTCAATCCATCGCCAGACGCGAGCTTGGTGCCAACGCGTCGGTACCCGATACC AGCAGGGTTTACGATATTTTGGCGCAGCGCGCAGAGGGCACCAAAACCGCCAGTCCAC CCATGACTTCAGGGCGCGGAGTCTGTTTTACTACACCTTTAATGCGGTCTACCAATGCGTTAC CGGCATCGATATCTACGCCTGCGTCTTTATAGCTGAGAGAGGTTTTGTCGGTCACTGCGAAG TCCCCACGGCGGTTTGGGTTGGTGGTTGAAGAATAAAGCGGGGCAATTCTAACAGTGCAAGC AAACGTTTTCGAGCGCCTTATTCAGAGTCACTATCTATACTTAAAAATACAACACTTAGCCG AAGTCATTGGAGTTGACGCAAGGCAGCAAAACGAGCGAATCCCGATGAGCTGACTTGAGTCA GTGATTCGGGTGAGAGAGAGCAGCTAACGCGAGCTGCGGCTTCAATGAAGCAGGGTAAGTTG ATCCAGATCAGGCTATTTGGTATGGCGTTCAAAAAAATGGCGTTATAATCTCGCGATTTTTT TTTGAGCTCAACCACCTTAGGAGAATAAATAATGAAGATCGTCGAGGTGAAACACCCGCTG GTGAACACAAGCTGG
56	CGGCATCGATATCTACGCCTGCGTCTTTATAGCTGAGAGAGGTTTTGTCGGTCACTGCGAAG TCCCCACGGCGGTTTGGGTTGGTGGTTGAAGAATAAAGCGGGGCAATTCTAACAGTGCAAGC AAACGTTTTCGAGCGCCTTATTCAGAGTCACTATCTATACTTAAAAATACAACACTTAGCCG AAGTCATTGGAGTTGACGCAAGGCAGCAAAACGAGCGAATCCCGATGAGCTGACTTGAGTCA GTGATTCGGGTGAGAGAGAGCAGCTAACGCGAGCTGCGGCTTCAATGAAGCAGGGTAAGTTG ATCCAGATCAGGCTATTTGGTATGGCGTTCAAAAAAATGGCGTTATAATCTCGCGATTTTTT TTTGAGCTCAACCACCTTAGGAGAATAAATAATGAAGATCGTCGAGGTGAAACACCCGCTG GTGAACACAAGCTGG

[0273]

서열 번호	서열
57	CGCGGTTTGGTTGGTCAAATTTACACAAAAATCACGTTGATCGACTATACTGGTTTCGTCGCG CTGACTGAGAAACATGCCAGCAAAACAGCATGGTGAAACATCGATGTGCTGTATATTTCTTG ACACCTCTTAGGTCAGCCCTAAAAATTCTGCGTCCCCATATTAGCTAATGCTTTTTATGGGGC GATTTATCACGCGTTTACAAAAGTAGTTTATGAACCAAAATCCAGGAGCTTTTAAATGGCAAC AATTAATCAGCTGGTACGCAAAACCACGCTCTACGAAGGTTGCTAAAAGCAACGTTCCAGCGC
58	CCTGTTGAGTCTGCTCCAGCAGCTCTGAAAAGAAGGCATCAGCAAGATGACGCTGAAGCTC TGAAAAAATCTCTGGAAGAAGCTGGTGCTTCTGTTGAAGTTAAGTAAGTTTAACTTCCGGA GTGCACTCTGTCTTAACAGGCTGATGGCTGGTGACTTTTTAGTCACCAGCCTTTTTGCGCTAT AGAGTGTCAAGTGTGTTTACACTGTTTGAAGCACTGAACTACTCTAATATCTTTCTATAGA CGCCTTAATATATTGTTGCCTCTTGCTGTAGCTCATCTACAGATAACGCACAACGAAATGATT TAAGAGTGGTAGAAAAAGATATTGCGGAAAGCGTTTCTGCTTTCGGGTCGACATAAACGGT GTTGCATGAAGTGTCTTCTCAGGGCAGACAAGATTGGGTCACTGATCAGCGAGCTGAGGAA CCCTATGGTTTACTCCTATACCGAGAAAAAACGCATTTCGTAAGGATTTTGGT
59	TGAATATCACTGACTCACAAAGCTACCTATGTGCAAGAATTAATAAAAACTGCAAGATGCA GGCATTTCGCGTTAAAGCCGACTTGAGAAATGAGAAGATTGGCTTTAAAAATTCGCGAACACAC GCTACGCGGTGTTCTTATATGTTAGTTTGTGGCGATAAAGAGGTGCAAGCAGGCAAAAGTTG CTGTTCTGACTCGTCGCGGCAAGACTTAGGAAGCATGGATGTTAGCGAAGTCGTTACAAAC TGCGGCGGAAATCCGACAGCAGAAGTCTTCATCACTGGAGGAATAAAGTATTAAAGGCGGGA AAACGAGTTCAACCGGCGCGTCTAATCGCATTAAACAAGAGATTGCGCGCAAGAAAGTTT GCCTACCGGCGTCGATTGGCGAGCAGATTGGTATTGTCACTGTAATGAAGCTCTTGA AAAA GCTGAGGAAGCGGCGTCGATTAGTAGAAATCAGTCCGAATGCCGAGCCGCGCAGTTTGTGCG AATC
60	CTGGGGTCACTGGAGCGCTTTATCGGCATCCTGACCGAAGAATTTGCCGTTTCTTCCGACC TGCTGGCCCTGTTCAGGTTGTGGTGATGAATATCACTGATTCTCAAGCTGAATATGTCAAC GAATTGACCCGTAAATTGCAAAATGCGGGCATTCTGTGTAAGAGCGGACTTGAGAAACGAGA AGATTGGCTTTAAATCCGCGAGCACACTTTACGTCGTGCCCTATATGTTGGTCTGTGGTG ATAAAGAGGTGGAAGCAGGCAAAAGTGGCCGTTTCGACCCGCGCGGTAAAGACCTGGGCAG CCTGGACGTAAAGTGAAGTGAATGAGAAGCTGCAACAAGAGATTGCGAGCCGAGTCTTCAA CAACTGGAGGAATAAGGTATTAAGGCGGAAACGAGTTCAAACGGCAGTCCGAATCGTA TCAATGGCGAGATTGCGGCCACGGAAGTTCGCTTAAGTGGTCTGGAAGGTGAGCAGCTGGGT ATT
61	TTCTTGGTTCTCTGGAGCGCTTTATCGGCATCCTGACTGAAGAATTTGCAGGCTTCTTCCAA CCTGGCTTGCACCCGTGCAGGTAGTTGTGATGAACATCACTGATTTCGAGGCTGAATACGTT AACGAATTGACCCGTAAATGCAAAATGCGGGCATTCTGTGTAAGAGCAGACTTGAGAAACG AGAAGATTGGCTTTAAATCCGCGAGCACACTTTACGTCGTGCCCTATATGCTGGTTTGTG GTGACAAAGAGGTGGAAGCCGGCAAAAGTTGCTGTGCGTACCCGTGCGGTAAGACCTGGG TAGCCTGGACGTAAATGATGTTATCGAGAAGCTGCAACAAGAGATTGCGAGCCGCGAGTCTTC AACAACTGGAGGAATAAGGTATTAAGGCGGAAACGAGTTCAAACGGCAGTCCGAATCG TATTAATGGCGAGATTGCGGCCACGGAAGTTCGCTTAACAGGTCTGGAAGGCGAGCAGCTTG GTATT
62	TGAATATTACCGATTCTCAGGCGGATTACGTTAAAGAATTGACGCAGAACTTCAAAATGCG GGCATTTCGCGTAAAGCAGACTTGAGAAATGAGAAGATTGGCTTTAAATCCGCGAGCACA CTTTACGTCGTGTCCCGTATATGTTGGTCTGTGGTGATAAAGAGGTGGAAGCAGGCAAGTT GCCGTTTCGACCCGCGGTGGTAAAGACCTGGGCAGCCTGGACGTAAGTGAAAGTATTGAGA AGCTGCAACAAGAGATTGCGAGCCGAGTCTTCAACAAGTGGAGGAATAAGGTATTAAAGG CGGAAAACGAGTTCAAACGGCACGTCGGAATCGTATCAATGGCGAGATTGCGGCCAGGAA GTTTCGCTTAACAGATCTTGAAGGTGAACCACTGGGGATTGTGAGTCTGAGAGAAGCGATCGA AAAAGCTGAAGAAGCTGGAGTAGATTAGTTGAAATCAGCCCTAACGCCAACGCCAGTT TGTCGTATT

[0274]

서열 번호	서열
63	TGAATATCACTGACTCACAAAGCTACCTATGTCGAAGAATTAACATAAAAACTGCAAGATGCA GGCATTGCGCTTAAAGCCGACTTGAGAAATGAGAAGATTGGCTTTAAATTCGCGAACACAC GCTACGCCGTGTTCTTATATGTTAGTTTGTGGCGATAAAGAGGTGCAAGCAGGCAAGTTG CTGTTTCGTACTCGTCGCGGCAAAAGACTTAGGAAGCATGGATGTTAGCGAAGTCGTTGACAAA CTGCTGGCGGAAATCCCGAGCAGAAGTCTTCATCAACTGGAGGAATAAAGTATTAAAGGCG GAAAACGAGTTCAACCGCGCGTCCTAATCGCATTAAACAAAGAGATTGCGCGCAAGAAGT TCGCCTCACCGCGCTGATGGCGAGCAGATTGGTATTGTCAGTCTGAATGAAGCTCTTGAAA AAGCTGAGGAAGCGGGCGTCGATTAGTAGAAATCAGTCCGAATGCCGAGCGCCAGTTTG TCGAATC
64	TACAGTAGCGCTCTCAAAAAATAGATAAACCGGCTCATGTACGTGGGCGTTTATTTTTCTAC CCATAATCGGGAACCGGTGTTATAATGCCGCGCCCTCATATTGTGGGATTCTTAAACGACC TATCTGGGTCTCTAAAGTTGAGTTGACATTAGCGGAGCACTAAC
65	AATTTTTTTTACAAAAGCGTAGCGTTATTGAATCGCACATTTTAACTGTTGGCGCTGTGGA AGCGAATATTGTGAAAGGTGCGGTTTTAAGGCCCTTTTCTTTGACTCTCTGCTGTACAAAAG TTAATATGCGCGCCCT
66	TTAAAAACGTGACCACGAGCATTAAATGAACGCTGCGAAATGTGGCGTTTATTTATTCAAAAA GTATCTTCTTTTCAAAAAAGTGCTAAATGCAGTAGCCGCAAAATTTGGGATAAGTCCCATGGA ATACGGCTGTTTTTCGTGCAATTTTAACTTTTTCGTAAAAAAGATGCTTCTTTGAGCGAAC GATCAAAATATAGCGCTTACCAGACAAAAAATTATTCTCATTAGAAAAATAGTTTGTGTAATAC TTGTAACGCTACATGGAGATTAACCTAATCTAGAGGGTTTTATA
67	AGCGTCAGGTACCGGTACGATTACCGTGCAGTTCTCGGTTCCCTGGAGCGCTTCATTGGC ATCCTGACCGAAGAGTTTCGCTGGCTTCTTCCCAACCTGGATTGCACCAAGTGCAGGTAGTGGT CATGAATATTACCGATTCTCAGGCTGAATACGTTAACGAATTGACGCGTAAACTACAAAATG CGGGCATTCTGTGTAAGAGCAGACTTGAGAAATGAGAAGATTGGCTTTAAATCCGCGAGCA CACTTTACGTGCTGTCCTGATATGTTGGTCTGTGGCGACAAAGAAGTGAAGCCGGCAAG TGCCCGTGCGCACCCGTCGCGGGAAGACCTCGGCAGCATGGACGTAAGTGAAGTATTGA GAAGCTGCAACAAGAGATTGCGAGCCGAGTCTTCAACAAGTGGAGGAATAAGGTATTAAG GGCGGAAAACGAGTTCAACCGGCACGTCGGAATCGTATCAATGGCGAGATTGCGCGCCCTGG AAGTTCCG
68	GCCCGCTGACCGACAGAACTTCCACCTTGGACTCGGCTATACCCTTGGCGTGACGGCGCGC GATAACTGGGACTACATCCCCATTCCGGTGATCTTACCATTGGCGTCAATAGGTTACGGTCC GGCGACTTTCAGATGACCTATATTTCCCGGCACCTACAATAACGGTAACGTTTACTTCGCTG GGCTCGTATACAGTTTTAATTCGCTAAGTCTTAGCAATAAATGAGATAAGCGGTGTGCTTGT GGAAAAACAAGGACTAAAGCGTTACCCACTAAAAAAGATAGCGACTTTTATCACTTTTTAGC AAAGTTGCACTGGACAAAGGTACCAATTTGGTGTACTGATACTCGACACAGCATTAGTGT CGATTTTTCATATAAAGGTAATTTTG
69	GCTAAAGTTCTCGGCTAATCGCTGATAACATTTGACGCAATGCGCAATAAAAGGGCATCATT TGATGCCCTTTTTGCACGCTTTTATACCAGAACCTGGCTCATCAGTGATTTTTTTGTCATAAT CATTGCTGAGACAGGCTCTGAAGAGGGCGTTTATACACCAAACCTTCGAGCGGTAGCGCG ACGGCAAGTCAGCGTTCTCTTTGCAATAGCAGGGAAGAGGGCCAGAACCCGCCAGCGTTG AAGCAGTTTGAACGCGTTCAAGTGATAATCCGAAACTTAATTTTCGGTTTGA
70	TCGCCACGGCGATAACCATAGGTTTTTCGGCGTGCCCATCCATGGTAAATCCCANTTTTTCC AGCACGCGCGCCACTTCATCGGGTCTTAAATACATAGATTTTCTCGTCACTTTCCAAAGCC TCGCCACCTTACATGACTGAGCATGGACCGTGACTCAGAAAATTCACACAAACGAACCTGAAA GGCGTGATTGCGGTCTGGCCTTAAAAATTATGGTCTAACTAAATTCACATCGAAAACGAG GGAGGATCCTATGTTTAAACAGACCGAATCGCCGTGACGTAGATGAAGGTGTTGAGGATATTA ACCACGATGTTAACCAGCTCG
71	CGCGTCAGGTTGAACGTAATAAAGTCTGGTCTGCGCAAAAGCAGTCGTCGTCGCGAGTTCTCC AAACGTTAATTGGTTTCTGCTTCGGCAGAACGATTGGCGAAAAAACCCGGTTCGGAACCGGGT TTTTTTATGGATAAAGATCGTGTTATCCACAGCAATCCATTGATTCTCTTTTTCAGCAT TTCCAGAAATCCCTCACCAAAAGCCCGCAAAATCTGGTAACTATCATCCAATTTTCTGCC AAATGGCTGGGATTGTTCAATTTTTGTTTGCCTTACAACGAGAGTGACAGTACGCGCGGGTA GTTAACTCAACATCTGACCGGTCTGAT

서열 번호	서열
72	ATATTGACACAATGACGCGCTACTGCTGATTGGTCTGTGACGCTGGTGATGATTGTCGAA ATTCTGAACAGCGCCATCGAAGCTGTGGTAGACCGTATTGGTGCAGAAATCCATGAACTTTC CGGGCGGGCGAAGGATATGGGGTCGGCGCGGTGCTGATGTCCATCCTGCTGGCGCTGTTTA CCTGGATCGCATTAATCTGGTCACATTTTGATAACGCTTCCAGAATTCGATAACGCCCTGGT TTTTTGCTTAAATTTGGTTCCAAAATCGCCTTAGCTGTATATACTCACAGCATAACTGTATA TACACCCAGGGGCGGGATGAAAGCATTAAACGGCCAGG

표 9: 시험관내 및 식물체내 프로모터 활성

	종	천연 유전자 명칭	천연 유전자 기능	관찰된 시험관 내 전사	관찰된 식물체내 전사
1	코사코니아 사카리	lpp	세포 표면 지단백질	유	유
2	코사코니아 사카리	가상 단 단백질	미공지	유	NA
3	코사코니아 사카리	mntP 1	추정 당간 유출 펌프	무	NA
4	코사코니아 사카리	acpP	아실 운반체 단백질	무	NA
5	코사코니아 사카리	ompX	외막 단백질 X 전구체	유	유
6	코사코니아 사카리	hupB	DNA-결합 단백질 HU-베타	NA	NA
7	코사코니아 사카리	sspA	엄격한 기아 단백질 A	유	NA
8	코사코니아 사카리	tatE	Sec-독립성 단백질 트랜스 로카제 단백질 TatE	NA	NA
9	코사코니아 사카리	lexA 3	LexA 리프레서	유	NA
10	코사코니아 사카리	hisS	히스티딘--tRNA 리가제	유	NA
11	클레브시엘라 베리이콜라			유	NA
12	클레브시엘라 베리이콜라			유	NA
13	클레브시엘라 베리이콜라			무	NA
14	클레브시엘라 베리이콜라			무	NA
15	클레브시엘라 베리이콜라			무	NA
16	클레브시엘라 베리이콜라			유	NA
17	클레브시엘라 베리이콜라			유	NA
18	클레브시엘라 베리이콜라			유	NA
19	클레브시엘라 베리이콜라			유	NA
20	클레브시엘라 베리이콜라			유	NA
21	클레브시엘라 베리이콜라			무	NA
22	클레브시엘라 베리이콜라			유	NA
23	클레브시엘라 베리이콜라			NA	NA
24	클레브시엘라 베리이콜라			유	NA
25	클레브시엘라 베리이콜라			NA	NA
26	클레브시엘라 베리이콜라			유	NA
27	클레브시엘라 베리이콜라			무	NA
28	클레브시엘라 베리이콜라			유	NA
29	클레브시엘라 베리이콜라			무	NA
30	클레브시엘라 베리이콜라			무	NA
31	클레브시엘라 베리이콜라			유	NA
32	클레브시엘라 베리이콜라			유	NA
33	클레브시엘라 베리이콜라			유	NA
34	클레브시엘라 베리이콜라			유	NA
35	클레브시엘라 베리이콜라			유	NA
36	클레브시엘라 베리이콜라			유	NA
37	클레브시엘라 베리이콜라			유	NA
38	클레브시엘라 베리이콜라			유	NA
39	클레브시엘라 베리이콜라			유	NA
40	클레브시엘라 베리이콜라			유	NA
41	테날레 아르카틸리스	infC		NA	NA

[0277]

	종	천연 유전자 명칭	천연 유전자 기능	관찰된 시험관 내 전사	관찰된 식물체내 전사
42	레날레 아쿠아틸리스	infC		NA	NA
43	레날레 아쿠아틸리스	rpsA		NA	NA
44	레날레 아쿠아틸리스	rpsA		NA	NA
45	레날레 아쿠아틸리스	rpIN		NA	NA
46	레날레 아쿠아틸리스	nlpI		NA	NA
47	레날레 아쿠아틸리스	pnp		NA	NA
48	레날레 아쿠아틸리스	acpP 1		NA	NA
49	레날레 아쿠아틸리스	acpP 1		NA	NA
50	레날레 아쿠아틸리스	가상 단 백질	미공지	NA	NA
51	레날레 아쿠아틸리스	lpp	세포 표면 지단백질	NA	NA
52	레날레 아쿠아틸리스	가상 단 백질	미공지	NA	NA
53	레날레 아쿠아틸리스	grxA		NA	NA
54	레날레 아쿠아틸리스	tsaA		NA	NA
55	레날레 아쿠아틸리스	upp		NA	NA
56	레날레 아쿠아틸리스	upp		NA	NA
57	레날레 아쿠아틸리스	rpsL		NA	NA
58	레날레 아쿠아틸리스	rpoB		NA	NA
59	레날레 아쿠아틸리스	infC		NA	NA
60	클루이베라 인터메디아	infC		NA	NA
61	코사코니아 슈도사카리	infC		NA	NA
62	엔테로박터 sp.	infC		NA	NA
63	레날레 아쿠아틸리스	infC		NA	NA
64	레날레 아쿠아틸리스	rpIN		NA	NA
65	레날레 아쿠아틸리스	가상 단 백질	미공지	NA	NA
66	레날레 아쿠아틸리스	lpp	세포 표면 지단백질	NA	NA
67	클레브시엘라 sp.	infC		NA	NA
68	클레브시엘라 sp.			NA	NA
69	클레브시엘라 sp.			NA	NA
70	코사코니아 슈도사카리	가상 단 백질	미공지	NA	NA
71	코사코니아 슈도사카리	sspA	염격한 기아 단백질 A	NA	NA
72	코사코니아 슈도사카리	lexA 3	LexA 리프레서	NA	NA

[0278]

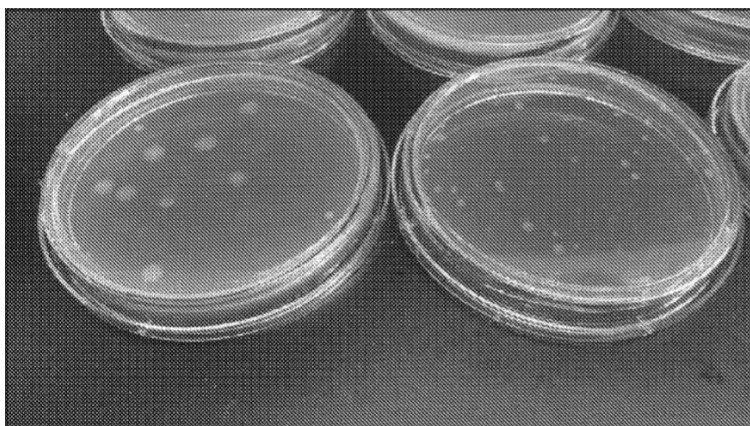
표 10: 본원에 개시된 프로모터 서열의 종 기원

서열번호:	종
1-10	코사코니아 사카리
11-40	클레브시엘라 베리이콜라
41-59, 63-66	레날레 아쿠아틸리스
60	클루이베라 인터메디아
61, 70-72	코사코니아 슈도사카리
62	엔테로박터 sp.
67-69	클레브시엘라 sp.

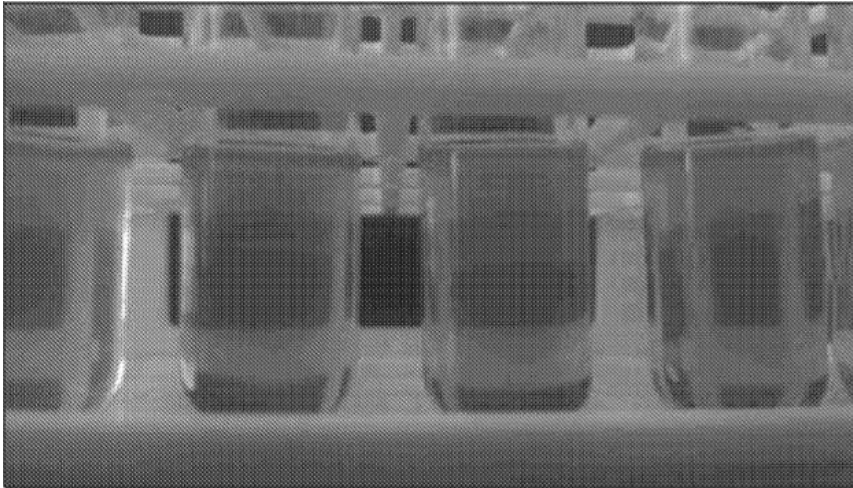
[0279]

도면

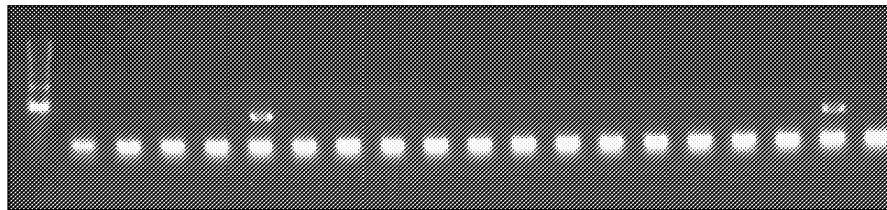
도면1a



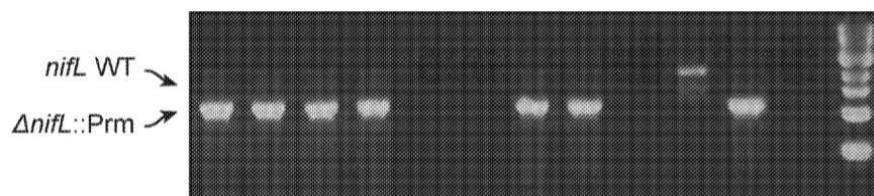
도면1b



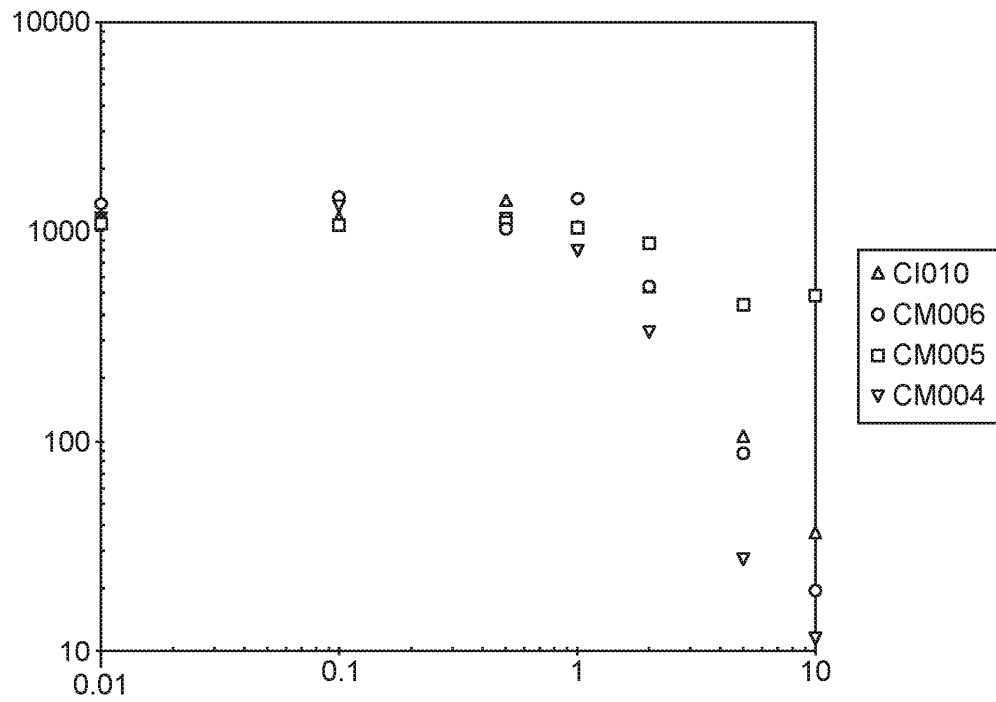
도면2



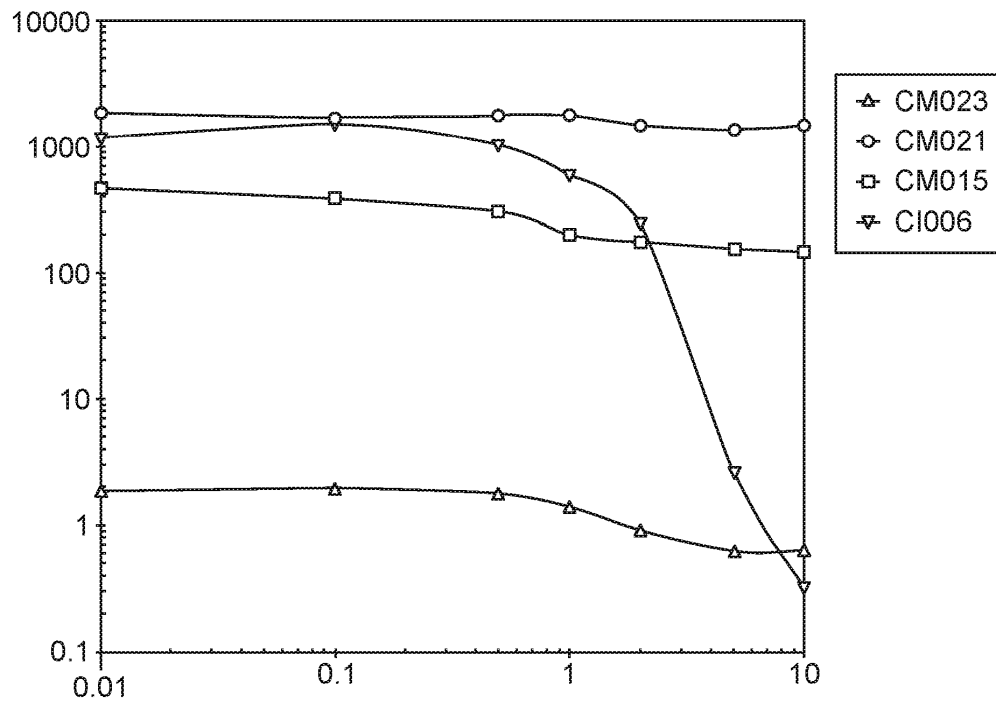
도면3



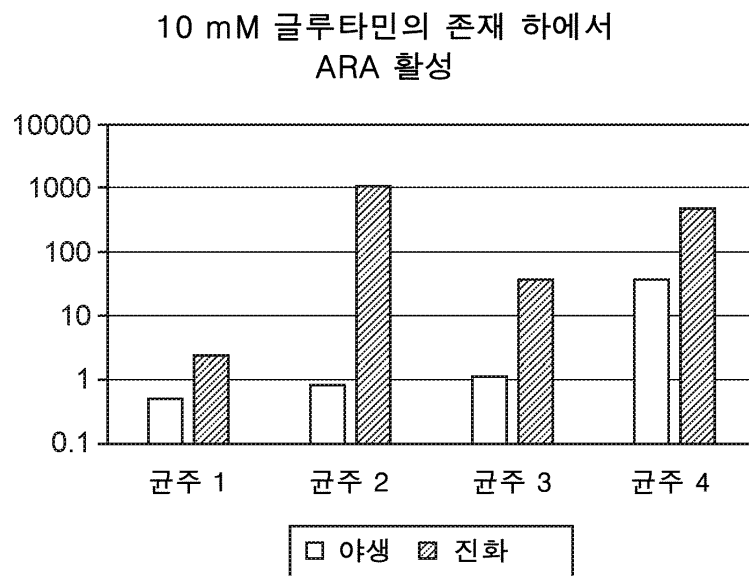
도면4a



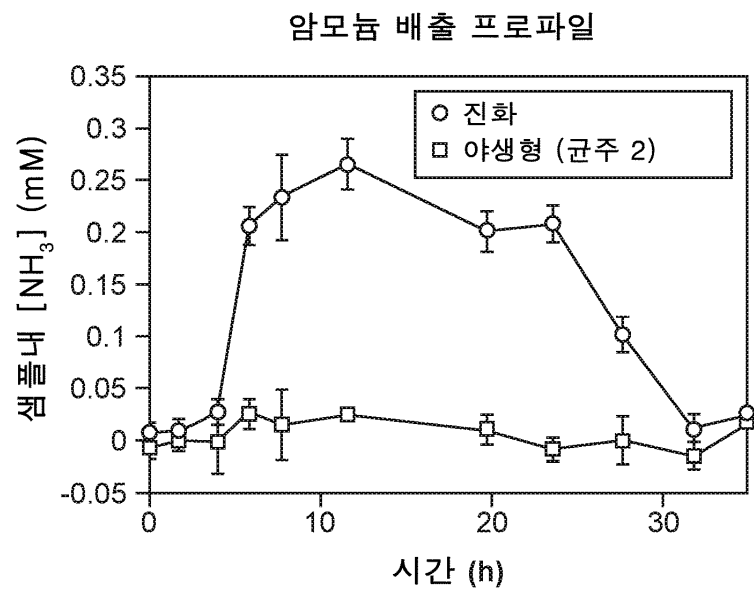
도면4b



도면4c



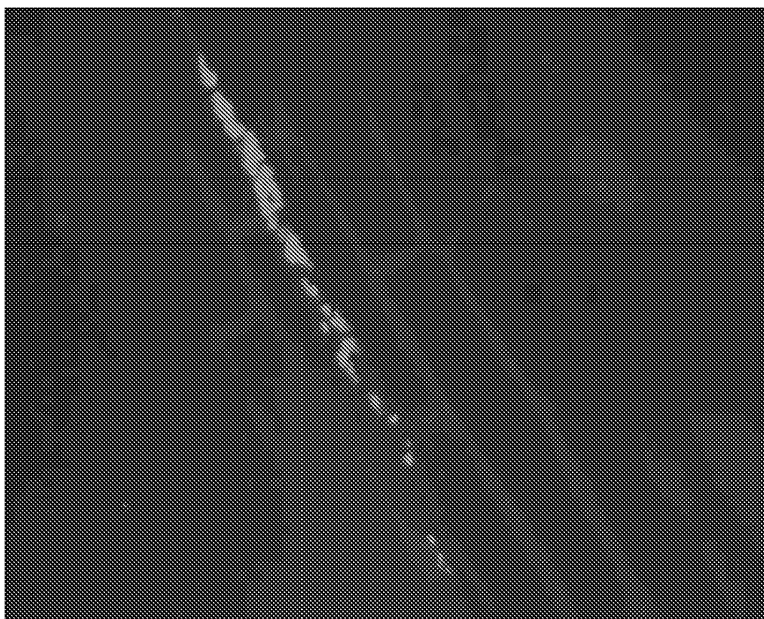
도면4d



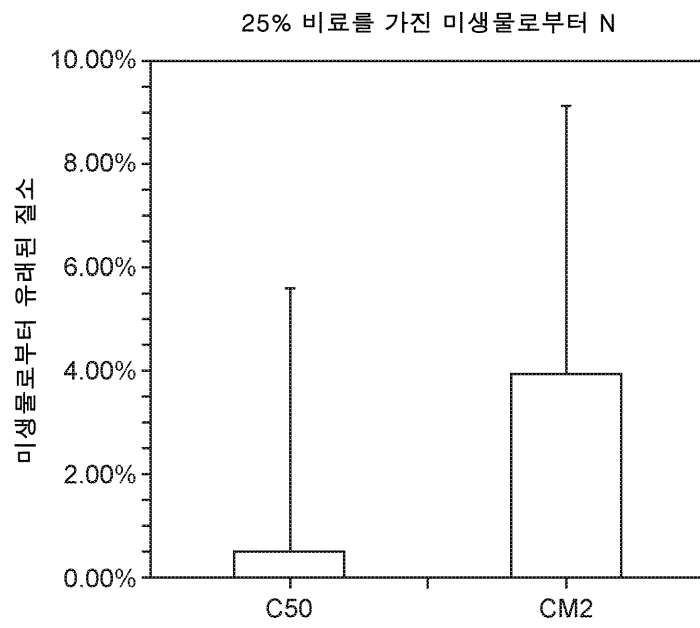
도면5

	무 글루타민	1mM 글루타민	10mM 글루타민	
amtB	716462	175150	1045	0% 공기
galK	15	405	814	
glnB	8025	10275	7493	
glnK	752360	183994	320	
nifA	306663	92963	194	
nifH	12387186	3599183	161	
nifL	226368	42825	123	
ntrB	50439	25236	1081	
ntrC	78056	35760	1216	
amtB	241247	139599	1207	10% 공기
galK	404	770	1012	
glnB	8296	6899	9376	
glnK	241645	158973	288	
nifA	237483	115545	197	
nifH	4702957	2448758	108	
nifL	173765	66818	75	
ntrB	25676	19630	1118	
ntrC	40312	30703	1295	
amtB	160293	167736	1353	20% 공기
galK	1311	976	1200	
glnB	8522	8185	9445	
glnK	166653	191992	366	
nifA	200774	164973	198	
nifH	862984	2337297	80	
nifL	129054	99096	80	
ntrB	17326	21370	1146	
ntrC	24115	31446	1370	

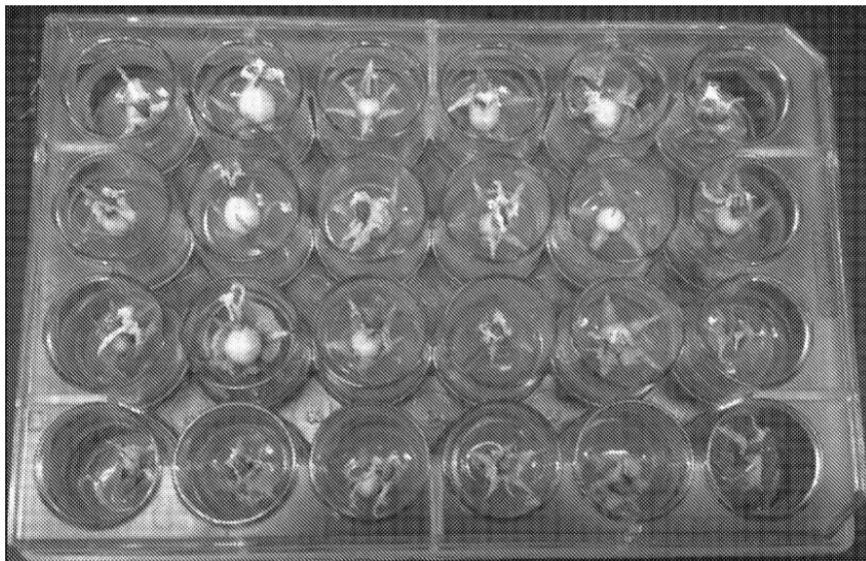
도면6



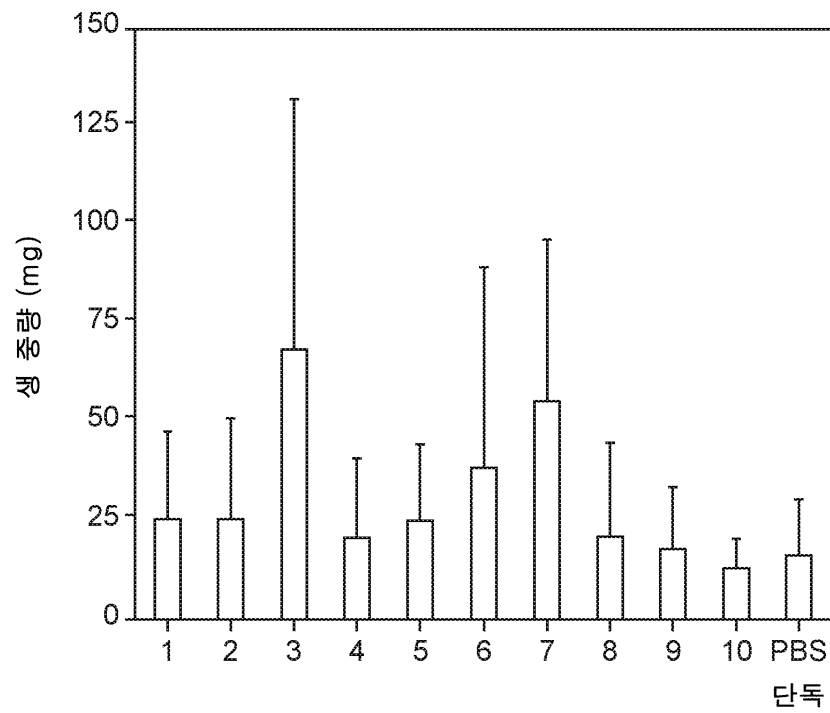
도면7



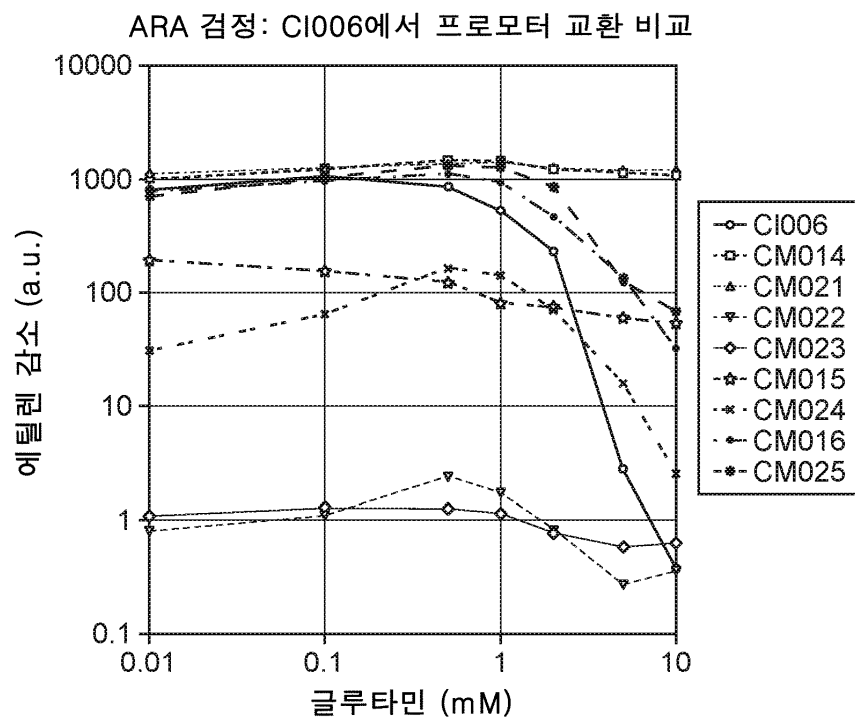
도면8



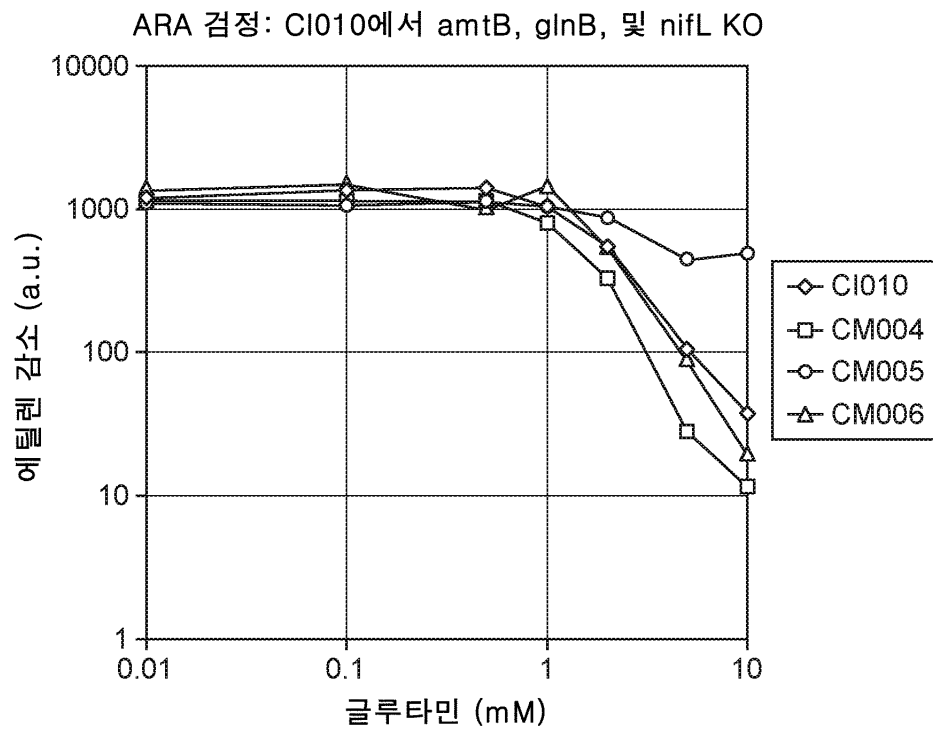
도면9



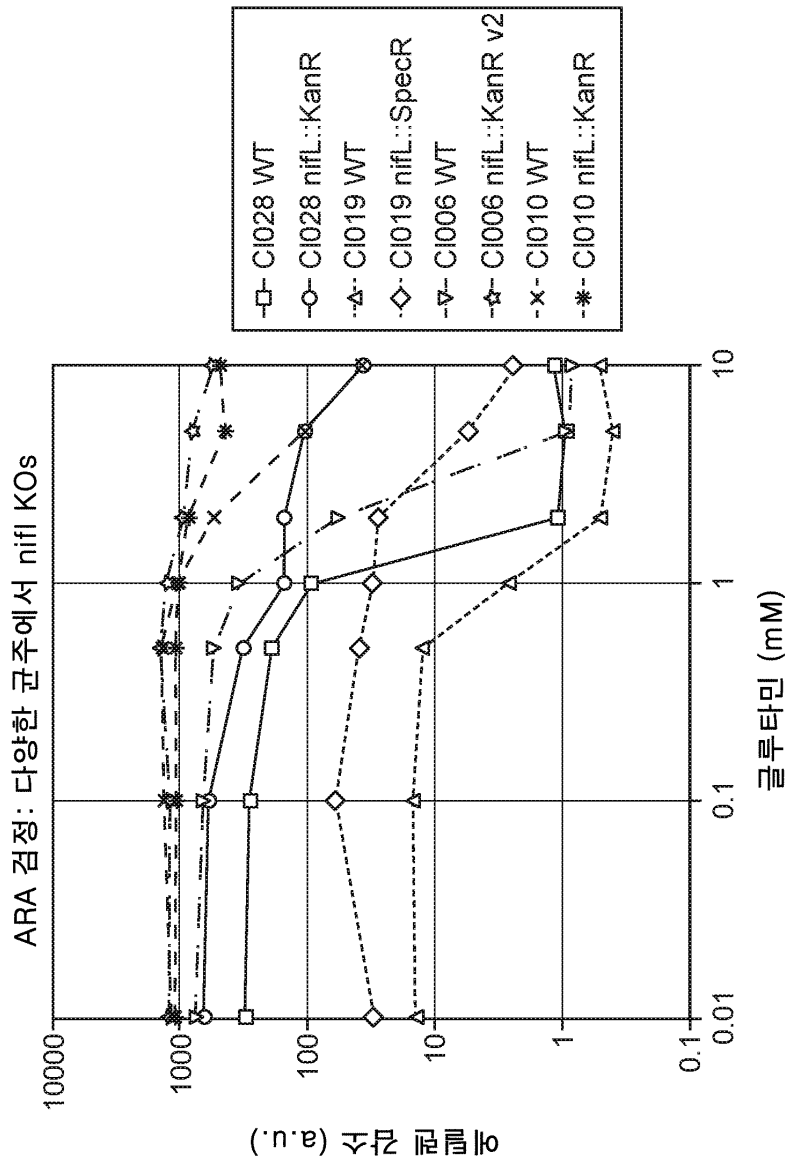
도면10a



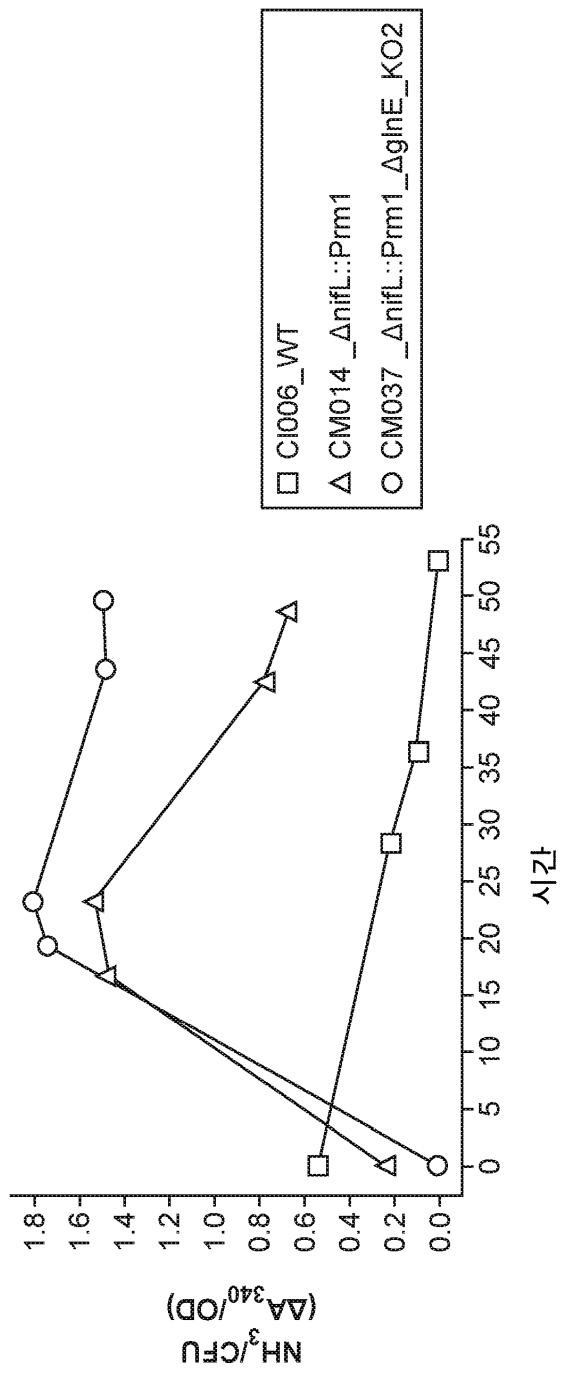
도면10b



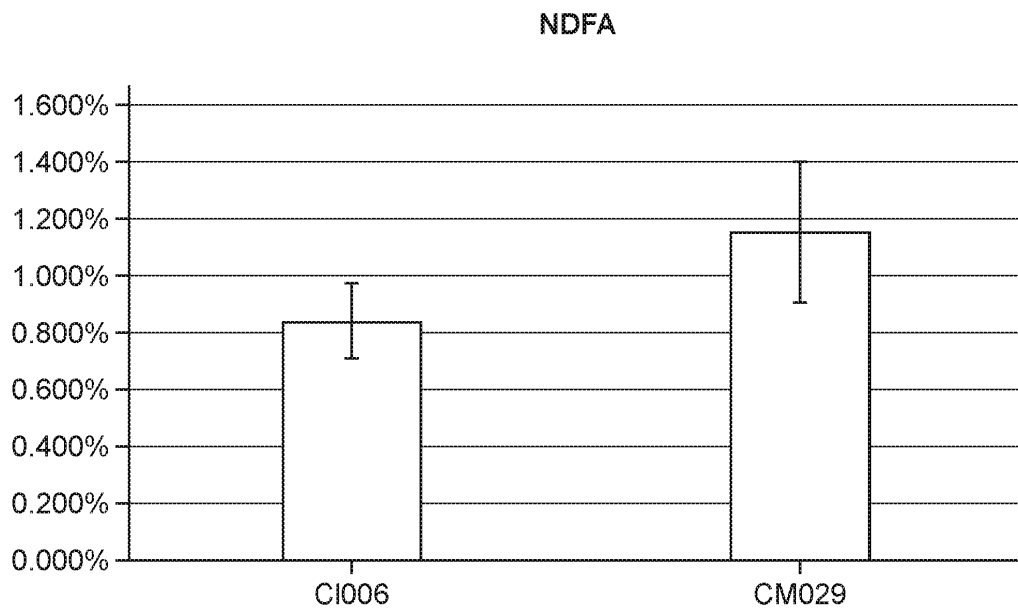
도면10c



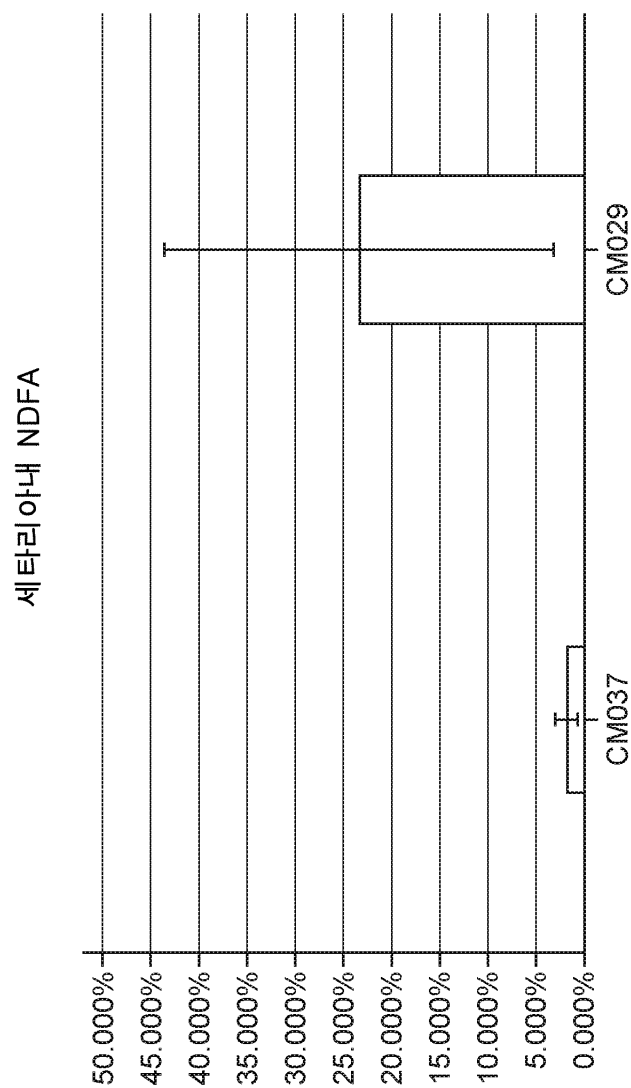
도면11



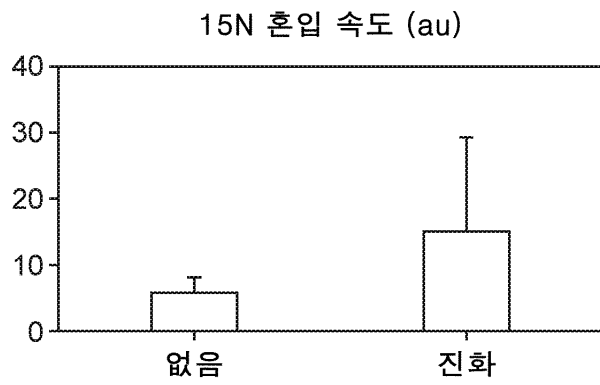
도면12



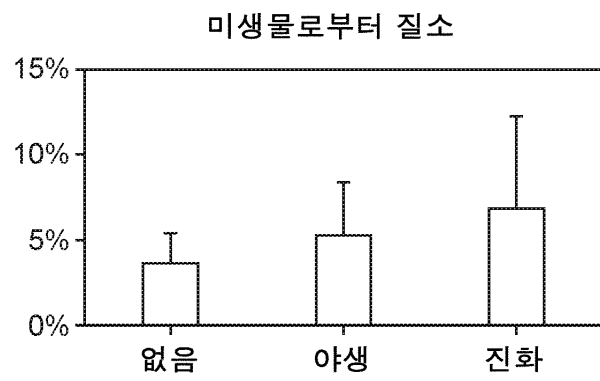
도면13



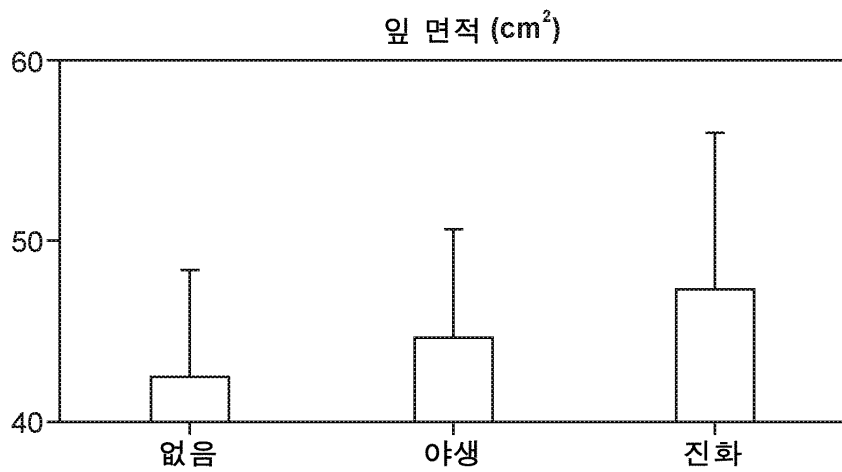
도면14a



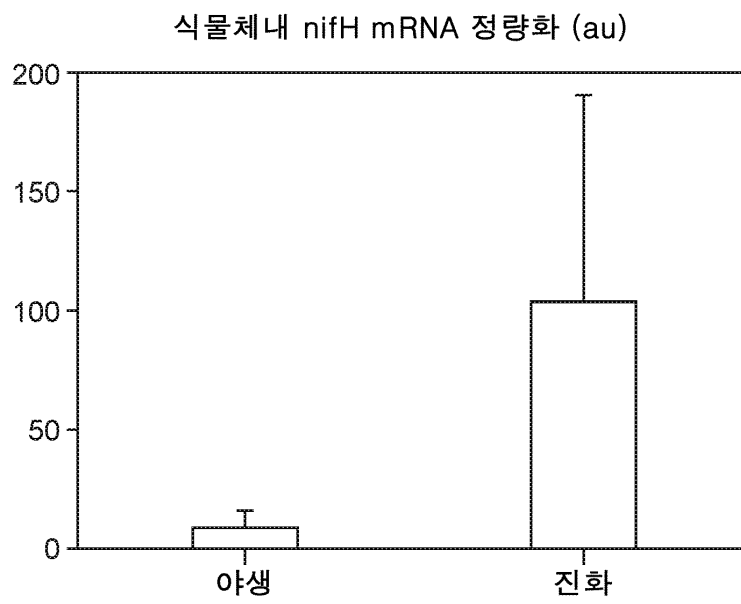
도면14b



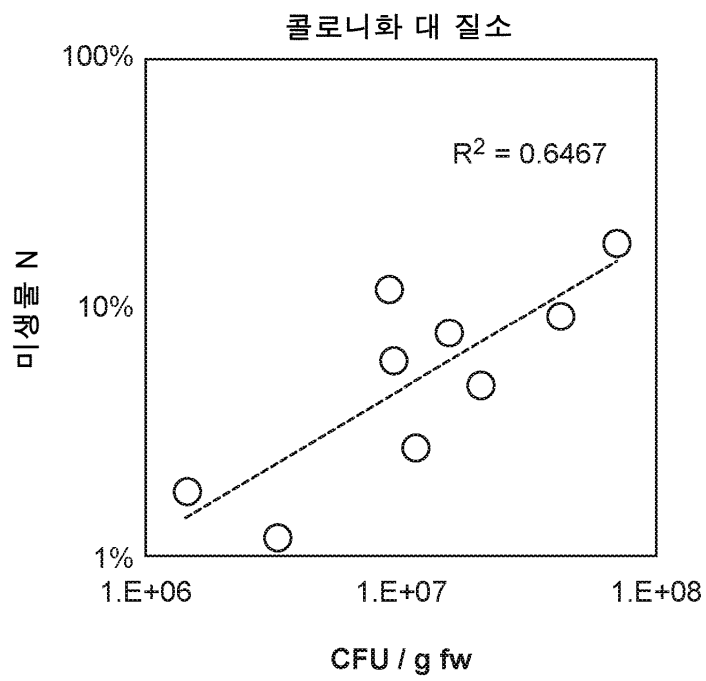
도면14c



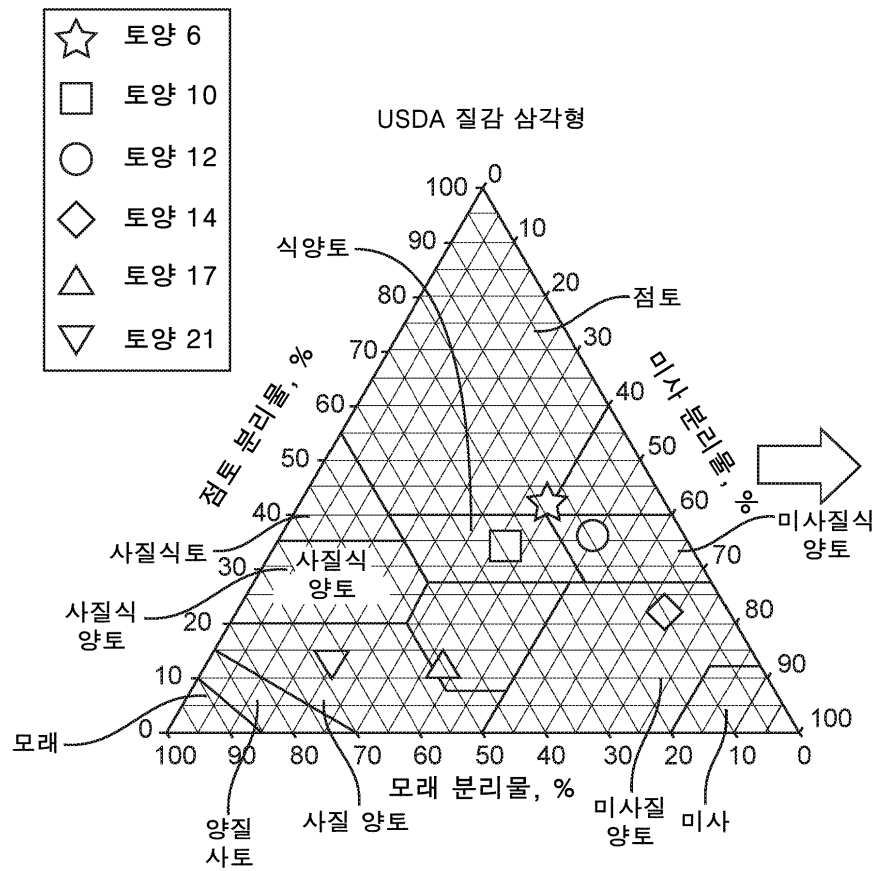
도면15a



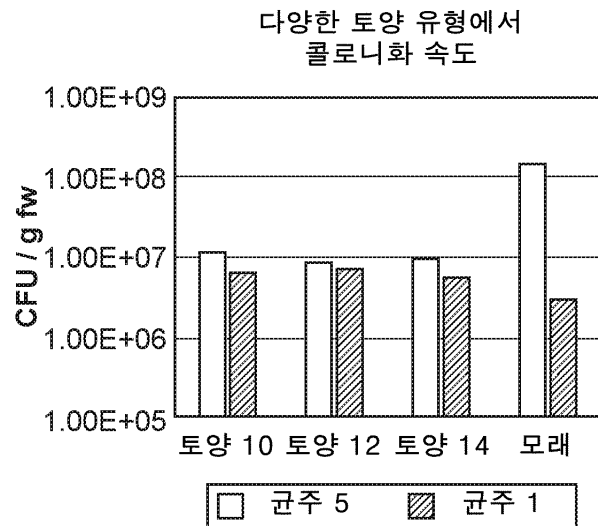
도면15b



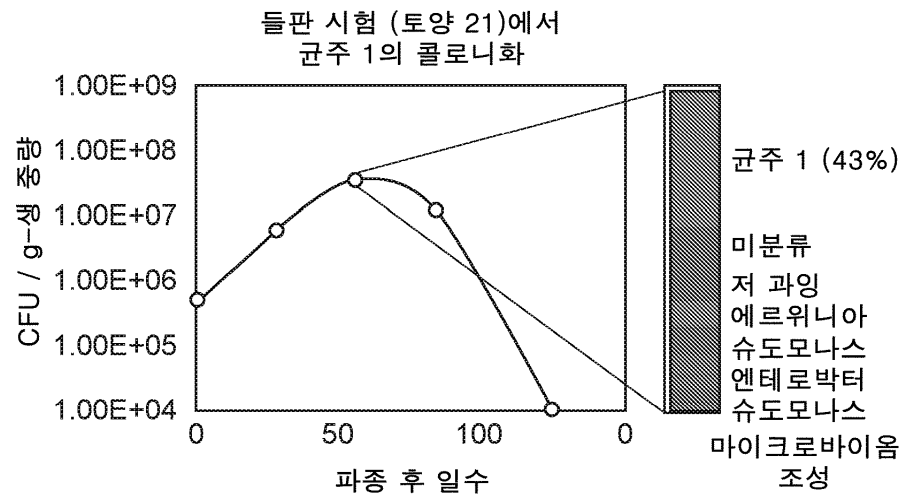
도면16a



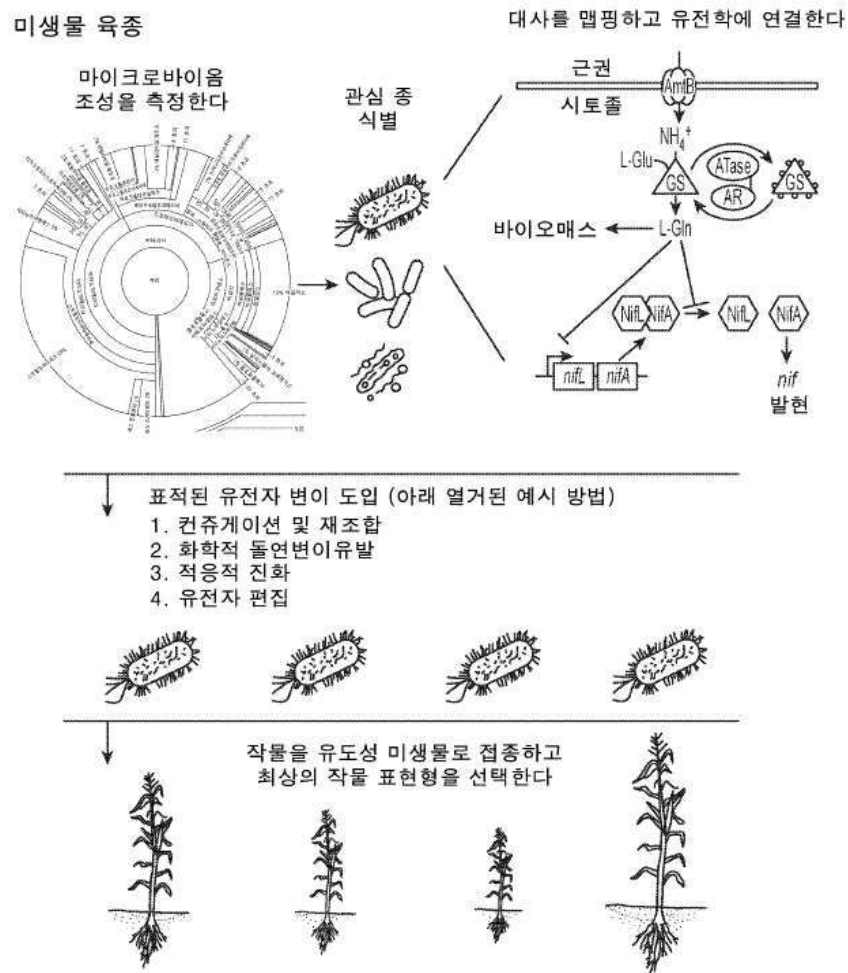
도면16b



도면16c

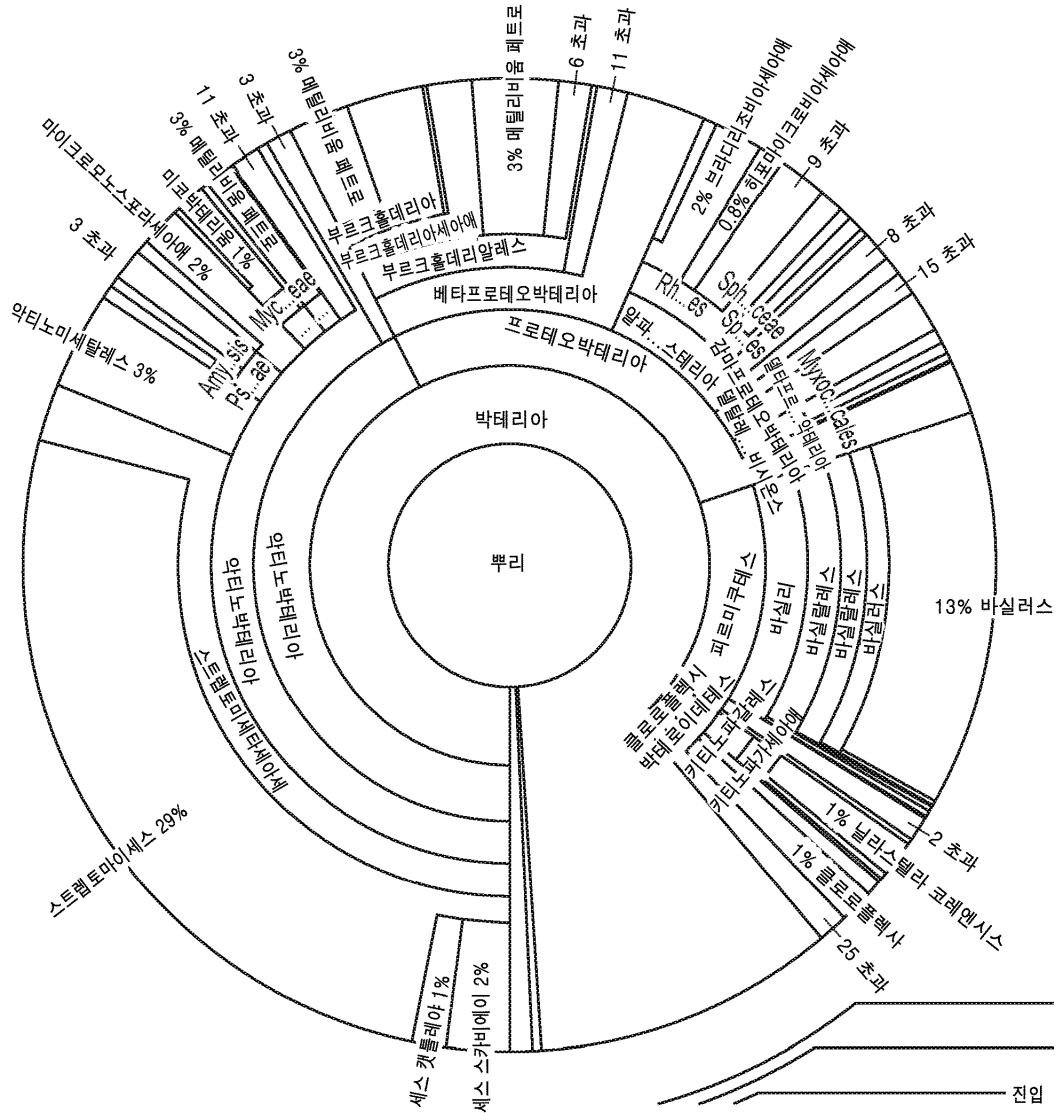


도면17

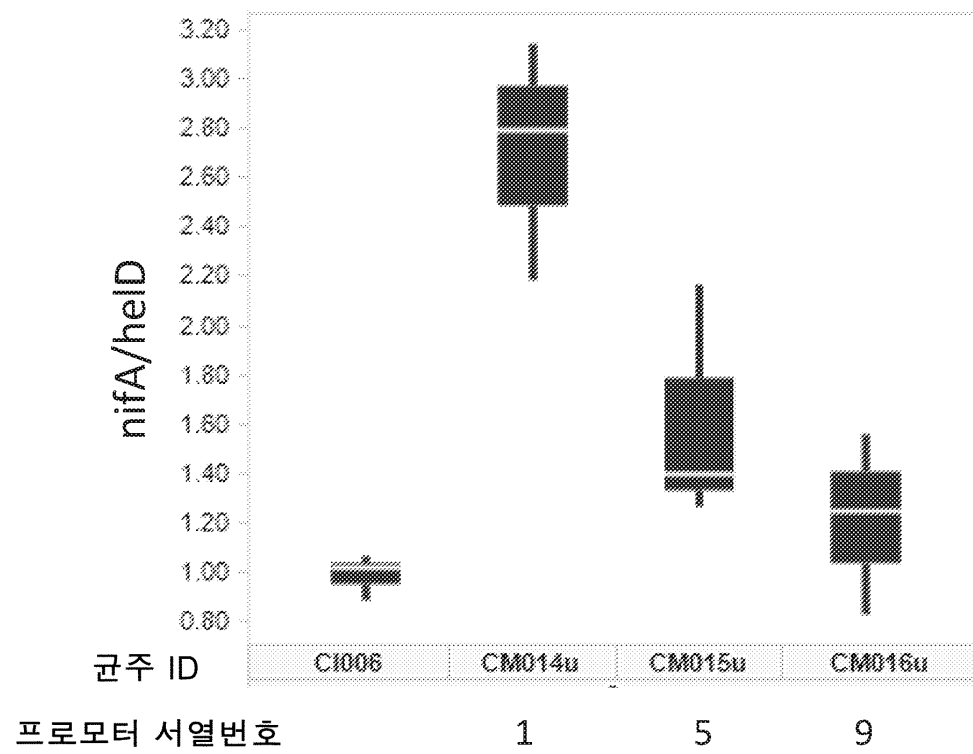


도면 18

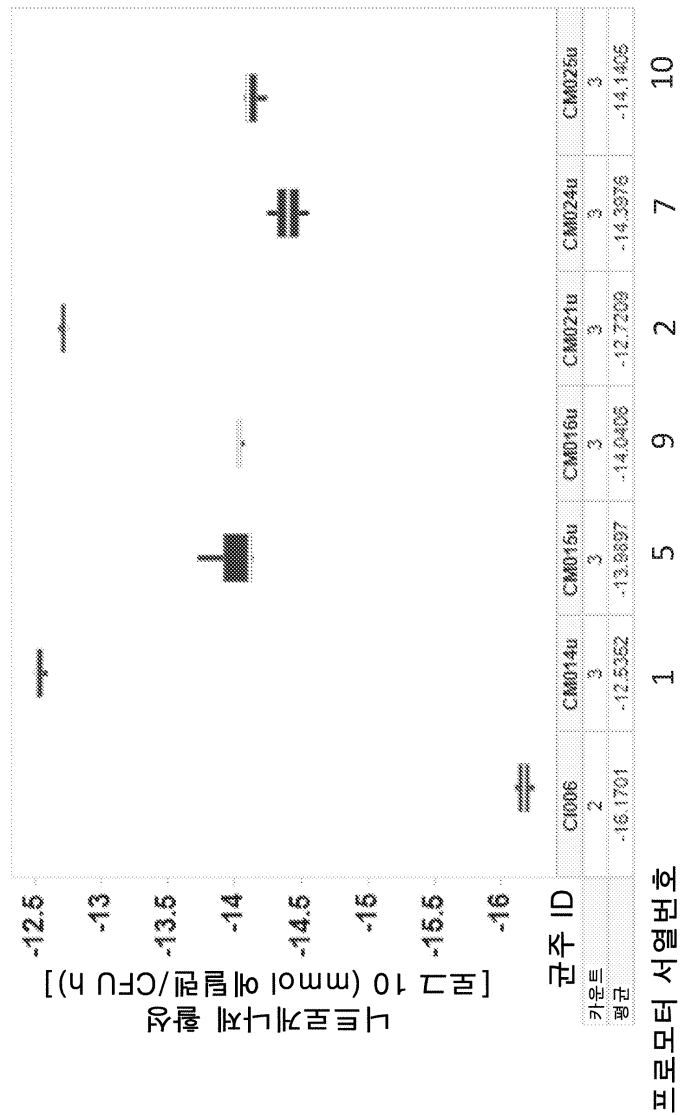
마이크로바이옴 조성 측정



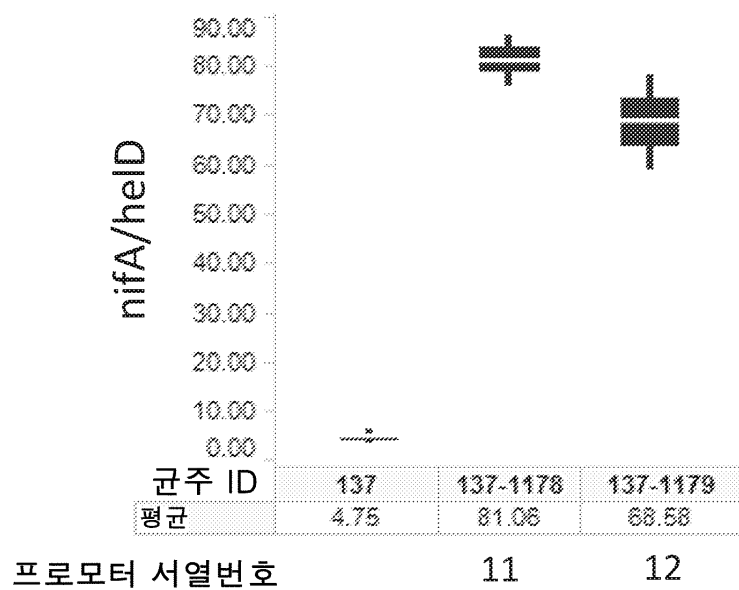
도면 19a



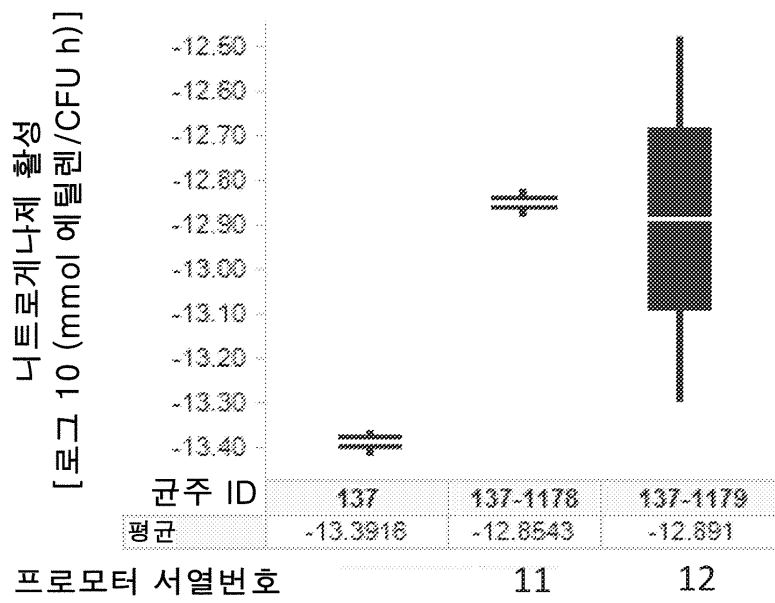
도면19b



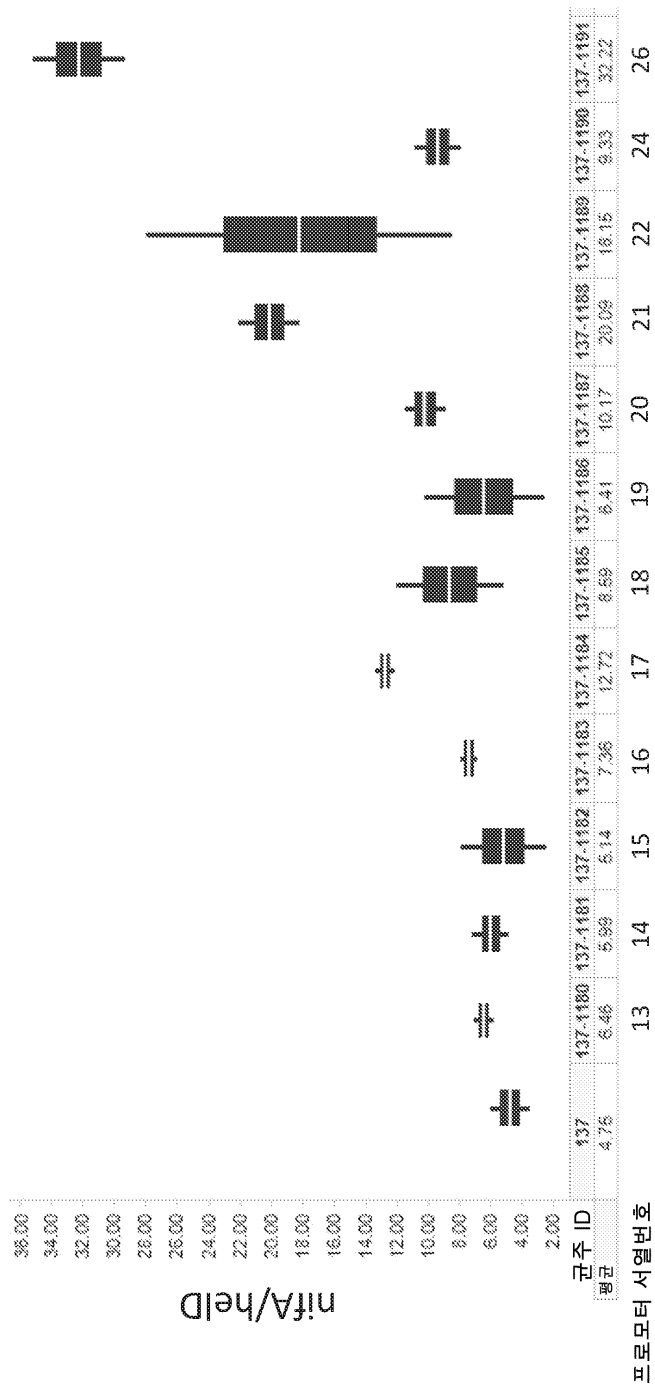
도면20a



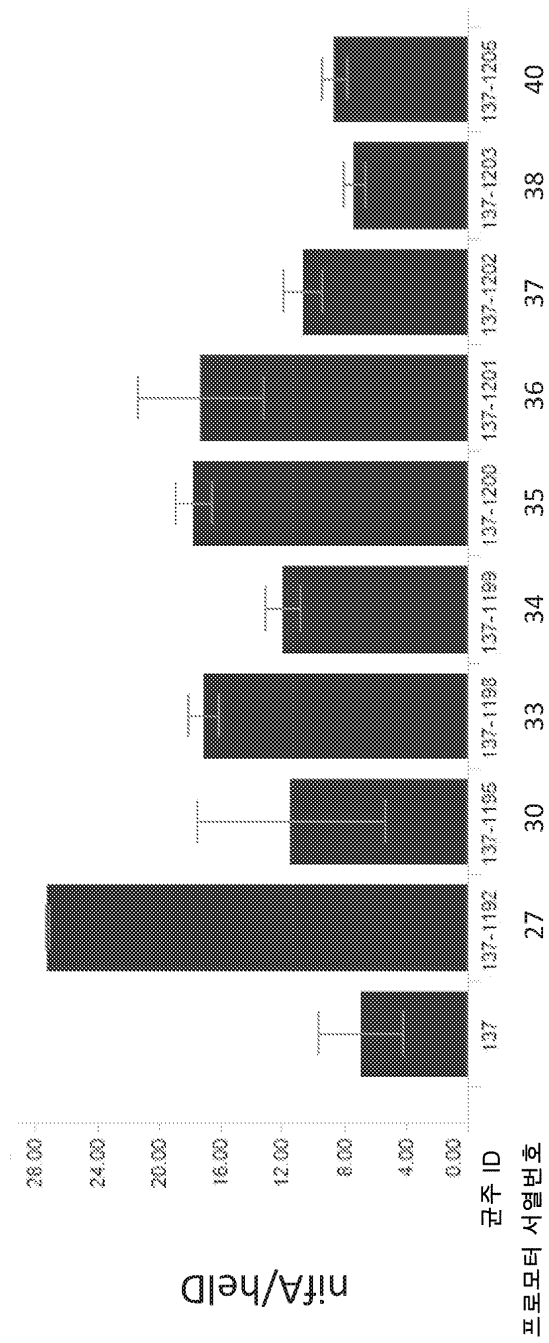
도면20b



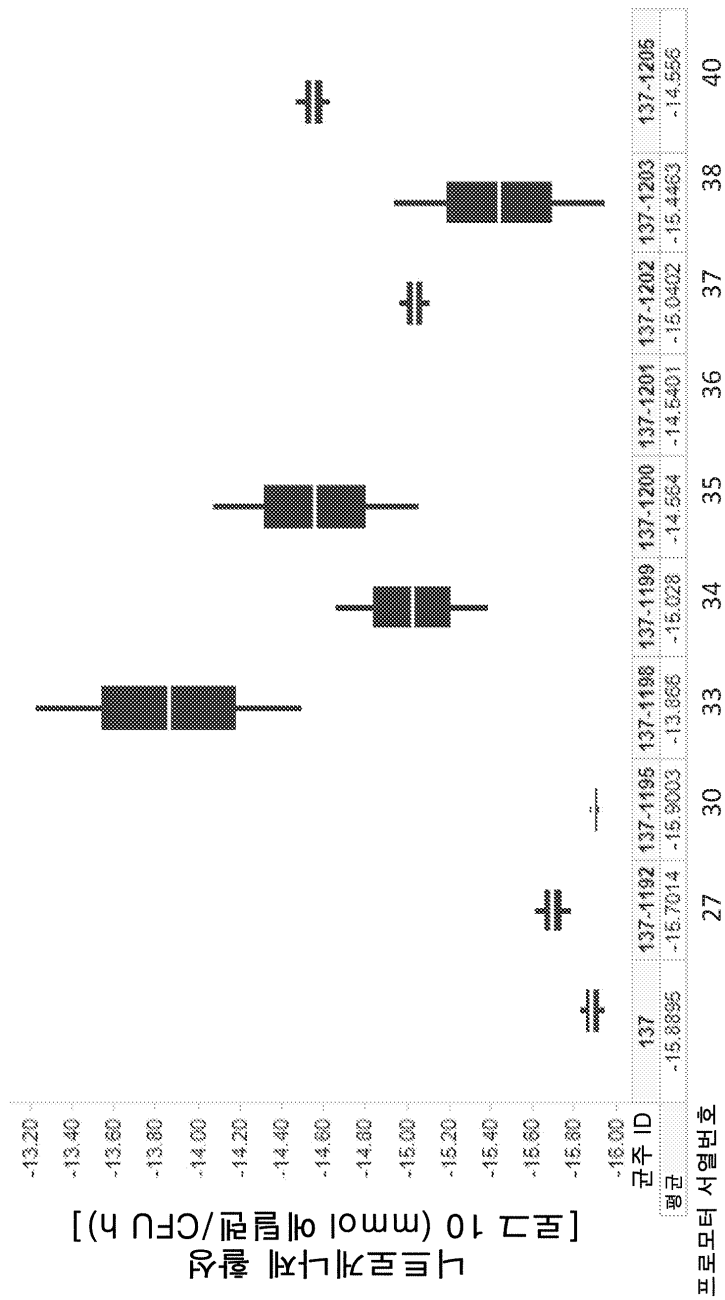
도면21



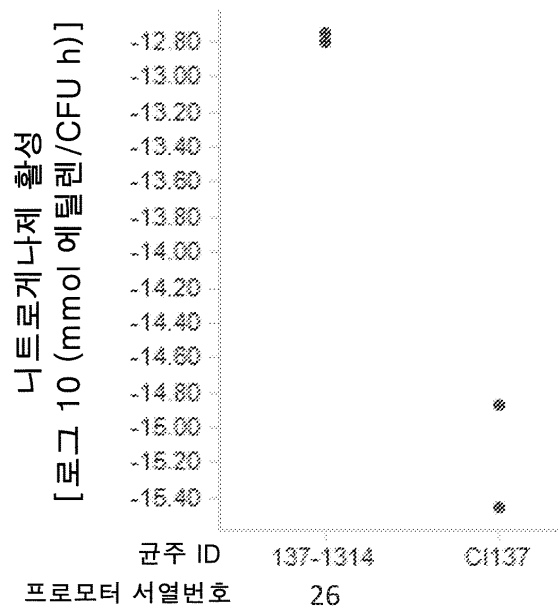
도면22



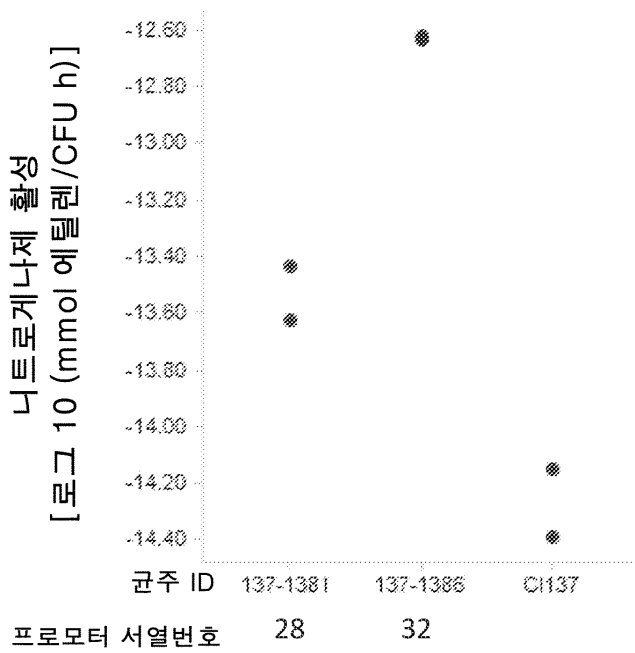
도면23



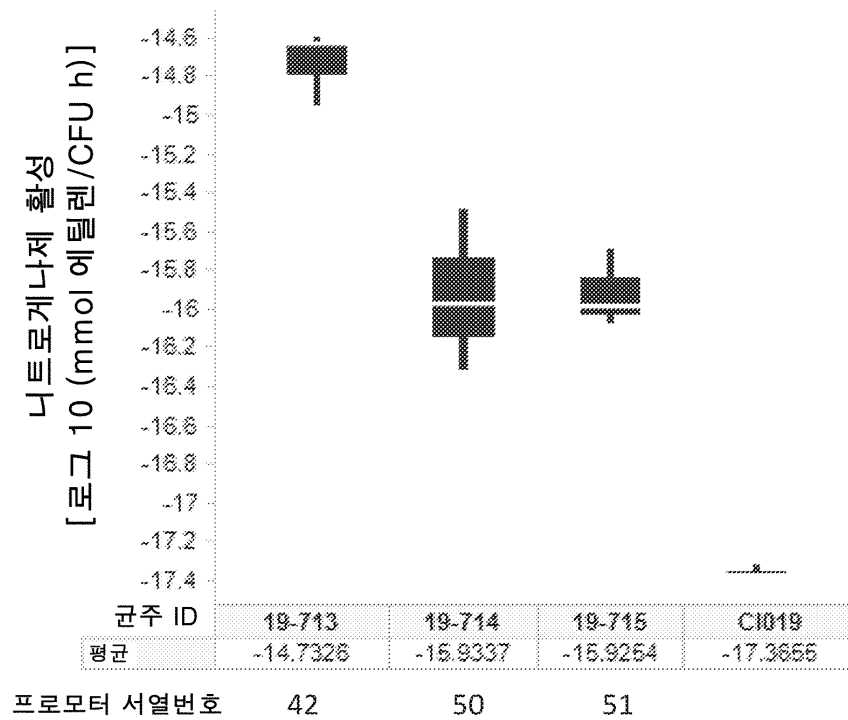
도면24a



도면24b

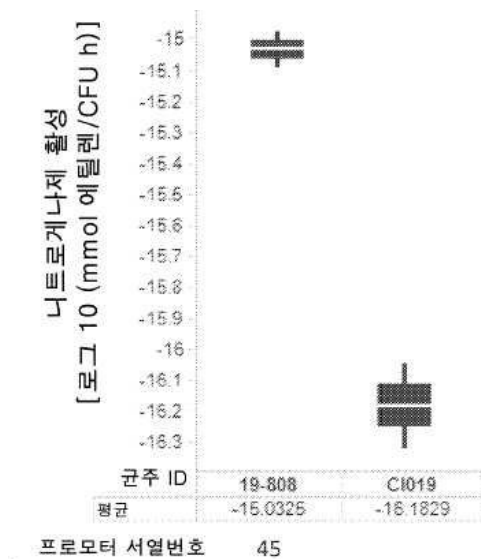


도면25a

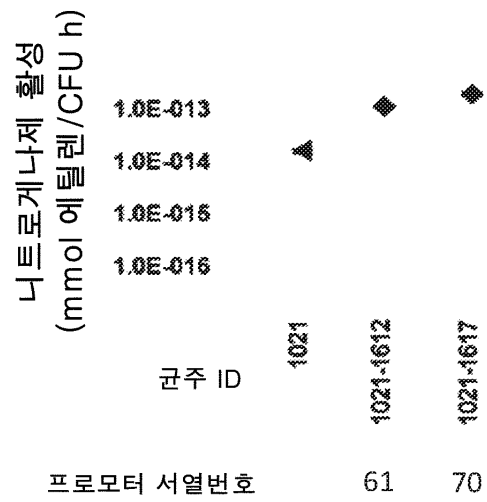


도 6 - nifA 유전자의 상류에 프로모터 삽입은
증가된 nifA 전사를 야기하고,
이는 증가된 니트로게나제 발현 및 활성을 초래한다.
2개 생물학적 복제물의 산점도는 나타나고,
A) 5mM 글루타민 또는 B) 10mM 글루타민을 가진
최소 배지 보충물에서 ARA 검정으로 측정된다

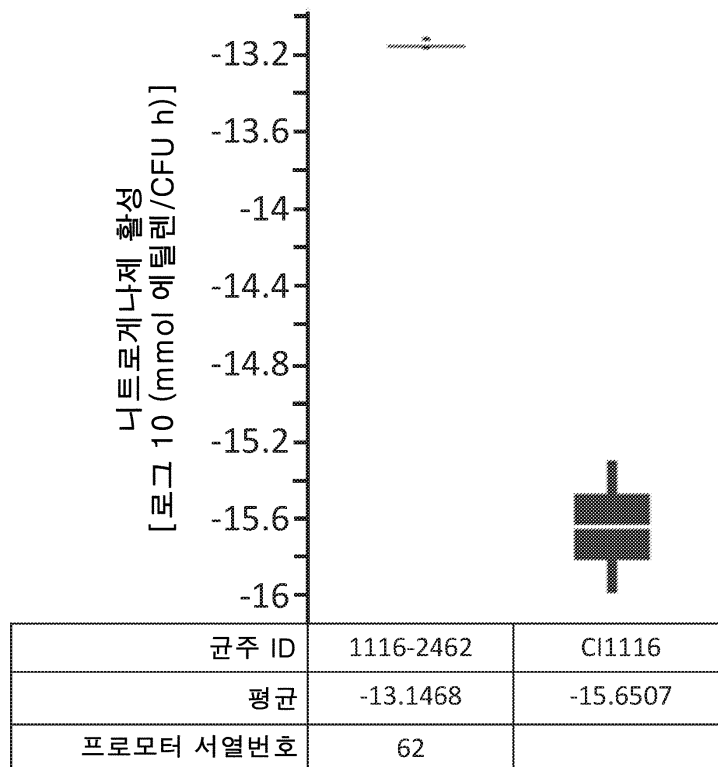
도면25b



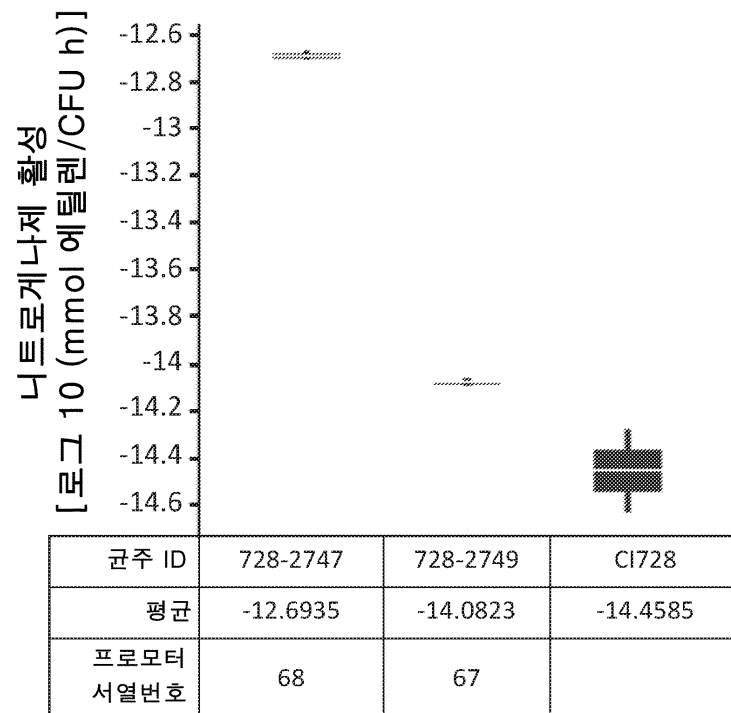
도면26



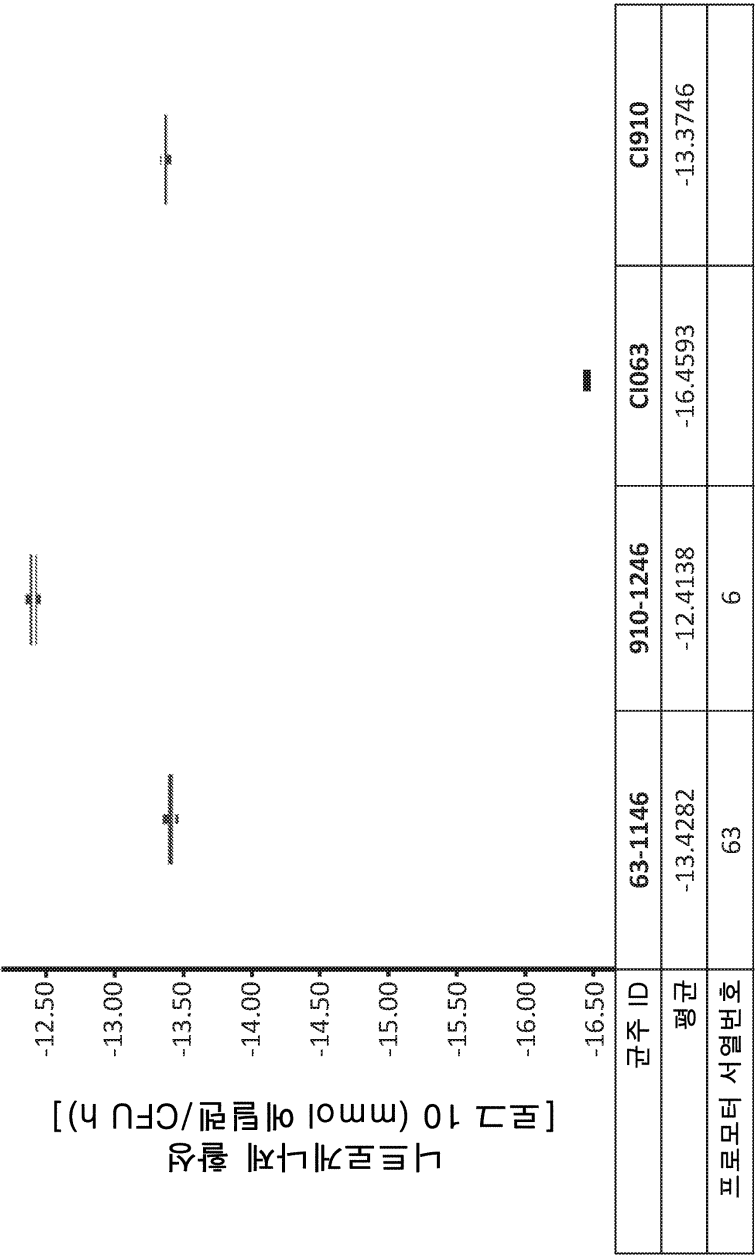
도면27



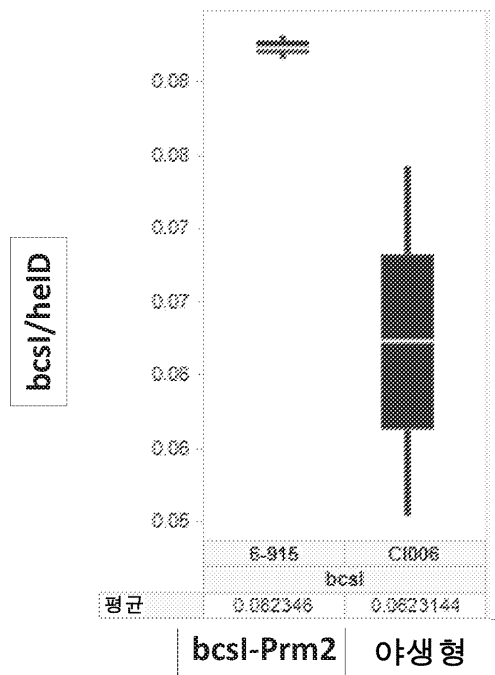
도면28



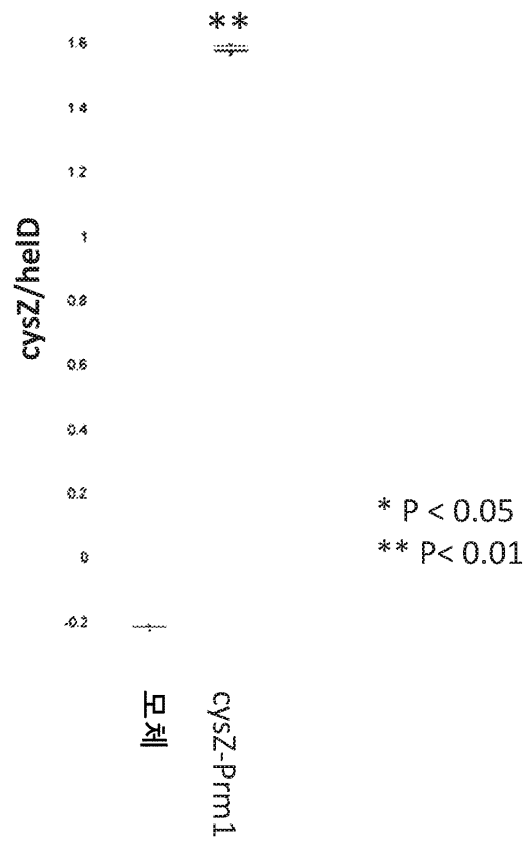
도면29



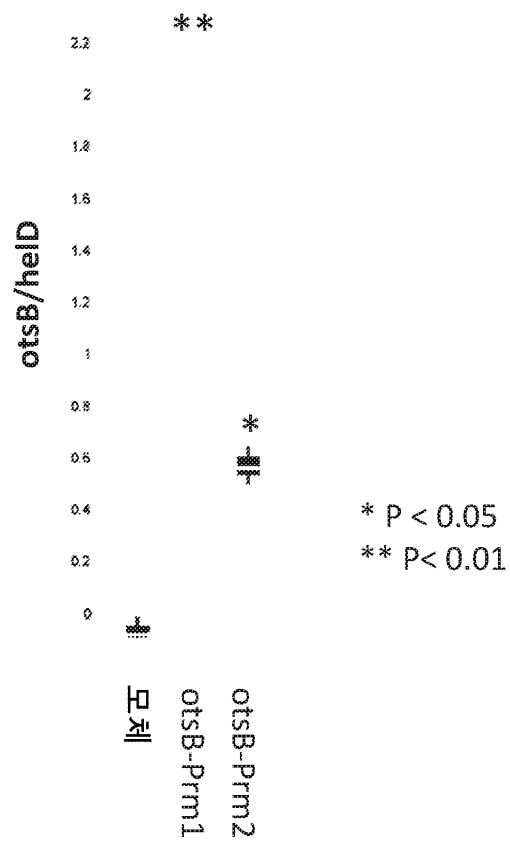
도면30



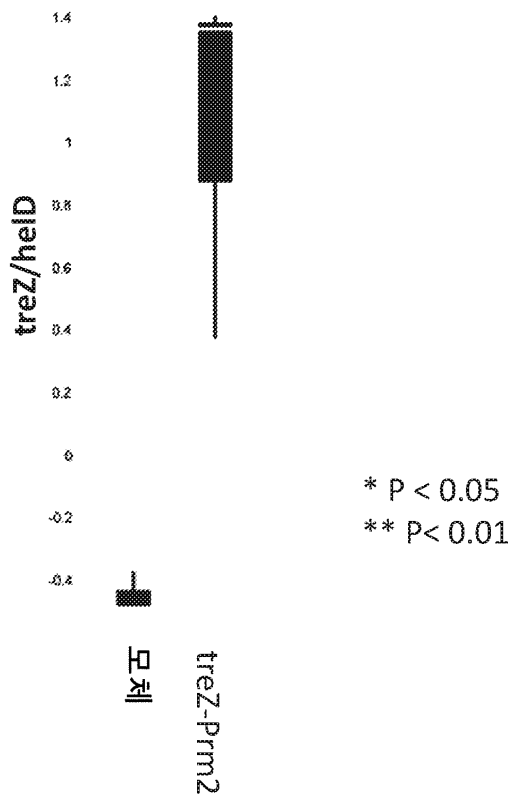
도면31a



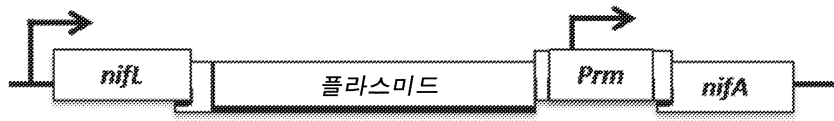
도면31b



도면31c

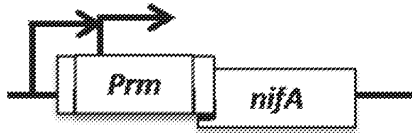


도면32a



플라스미드 삽입에 의한
nifA의 상류에 프로모터 삽입 (속간)

도면32b



nifA의 상류에
비-속간 프로모터 삽입

서 열 목 록

<110>	PIVOT BIO, INC.	
<120>	METHODS AND COMPOSITIONS FOR IMPROVING ENGINEERED MICROBES THAT FIX NITROGEN	
<130>	47736-714.601	
<140>	PCT/US2018/057174	
<141>	2018-10-23	
<150>	62/577,148	
<151>	2017-10-25	
<160>	73	
<170>	PatentIn version 3.5	
<210>	1	
<211>	348	
<212>	DNA	
<213>	Kosakonia sacchari	
<400>	1	
	cgctcgtgtaa taataaccgg acaattcgga ctgattaaaa aagcgccctt gtggcgcttt	60
	ttttatattc ccgcctccat ttaaaataaa aaatccaatc ggatttcact atttaaactg	120
	gccattatct aagatgaatc cgatggaagc tcgctgtttt aacacgcgtt ttttaacctt	180
	ttattgaaag tcggtgcttc tttagcgaa cgatcaaatt taagtggatt cccatcaaaa	240
	aaatattctc aacctaaaaa agtttgtgia atacttgtaa cgctacatgg agattaactc	300

aatctagagg gtattaataa tgaatcgta taaactggta ctgggcgc	348
<210> 2	
<211> 333	
<212> DNA	
<213> Kosakonia sacchari	
<400> 2	
tcaccacggc gataaccata ggttttcggc gtggccacat ccatggtgaa tcccactttt	60
tccagcacgc gcgccacttc atcggtgtctt aaatacatag attttcctcg tcatttttc	120
aaagcctgc caccctacat gactgagcat ggaccgtgac tcagaaaatt ccacaaacga	180
acctgaaagg cgtgattgcc gtctggcctt aaaaattatg gtctaaacta aaatttacat	240
cgaacacgag ggaggatcct atgtttaaca aaccgaatcg ccgtgacgta gatgaagggtg	300
ttgaggatat taaccacgat gttaccacgc tcg	333
<210> 3	
<211> 315	
<212> DNA	
<213> Kosakonia sacchari	
<400> 3	
atcatattgc gtcctctggt tatcatttgt tactaaatga aatgttataa tataacaatt	60
ataaatacca catcgcttcc aattcaccag ccaaatgaga ggagcgccgt ctgacatagc	120
cagcgtata aaacatagca ttatctatat gtttatgatt aataactgat ttttgcgttt	180
tggatttggc tgtggcatcc ttgccgtctt tttcgacgcg tctgcgtttt tgccctccgg	240
tcagggcatt taagggtcag caatgagttt ttacgcaatt acgattcttg ccttcggcat	300
gtcgatggat gcttt	315
<210> 4	
<211> 339	
<212> DNA	
<213> Kosakonia sacchari	
<400> 4	
tgacgaggca ggttacatca ctggtgaaac cctgcacgta aatggcggaa tgtatatggt	60
ttaaccacga tgaaaattat ttgcgttatt agggcgaaag gcctcaaaat agcgtaaaat	120
cgtaggtaaga actgcccggg tttagtgtga aatttttcaa cattttatac actacgaaaa	180
ccatcgcgaa agcgagtttt gataggaaat ttaagagtat gagcactatc gaagaacgcg	240

ttaagaaaat tatcggcgaa cagctgggcg ttaagcagga agaagttacc aacaatgctt	300
ccttcgttga agacctgggc gctgattctc ttgacaccg	339
<210> 5	
<211> 313	
<212> DNA	
<213> Kosakonia sacchari	
<400> 5	
ggacatcatc gcgacaaaca atattaatac cggcaaccac accggcaatt tacgagactg	60
cgcaggcatc ctttctcccg tcaatttctg tcaataaag taaaagaggc agtctacttg	120
aattaccccc ggctgggtga gcgtttgttg aaaaaaagta actgaaaaat ccgtagaata	180
gcgccactct gatggttaat taacctattc aattaagaat tatctggatg aatgtgcat	240
taaatgcgca gcataatggt gcgtttgtcg ggaaaactgc tttttttga aagggttggt	300
cagtagcgga aac	313
<210> 6	
<211> 330	
<212> DNA	
<213> Kosakonia sacchari	
<400> 6	
ccatccggtt aagcgtatcg aagaagttct tgcccttgcg ctgcagaatg aaccctttgg	60
tatgcaagtc gtaacggcaa aatagtgacc ttgcgcaaag tgcgttaata aaaacaaggt	120
tggtgagtga tttcggactt gccagccttt ttttgtatag ctaatttaga ttgctggttg	180
ggtgtgccat catcaactgg tgttgtaagg gcatgacagg cctgatataa ctgctgcgcg	240
gtcgcgctgt gaaggattca ggtgcgatat aaattataaa gagaggaaga gtagagtga	300
taaatctcaa ctggtagaca agattgccgc	330
<210> 7	
<211> 339	
<212> DNA	
<213> Kosakonia sacchari	
<400> 7	
cgcgtcaggt tgaacgtaaa aaagtcggtc tgcgcaaagc acgtcgtcgt ccgcagttct	60
ccaaacgtta attggtttct gcttcggcag aacgattggc gaaaaaaccc ggtgcgaacc	120
gggttttttt atggataaag atcgtgttat ccacagcaat ccattgatta tctcttcttt	180

ttcagcatTTT ccagaatccc ctaccacaaa agcccgcaaa atctggtaaa ctatcatcca	240
attttctgcc caaatggctg ggattgttca tttttgttt gccttacaac gagagtgaca	300
gtacgcgcgg gtagttaact caacatctga ccggtcgat	339
<210> 8	
<211> 345	
<212> DNA	
<213> Kosakonia sacchari	
<400> 8	
cagagccggg ttgttgatcc gcagggcgtg acggttgagg cagcagcaga agcgccacag	60
ctgattttcg cagaggtcac gcctgaacgc gtggcgagaa actgccggtg	120
ttacgcaatc gccgtttcgc tgtaccgat ttattgtgat gtttttttaa acaatgcttg	180
attcatctcg ttacacattg ctattgtgtg cgcgcgtcga atgaccgtta atgaagtccg	240
gttataatgg cgttttatgc agcctgtttt aagaaagaag gtatctatgg gtgagattag	300
tattacaaaa ctgctggttg tggccgcact ggtgtgtctg ctgtt	345
<210> 9	
<211> 350	
<212> DNA	
<213> Kosakonia sacchari	
<400> 9	
atattgacac catgacgcgc gtaatgctga ttggttctgt gacgttggtg atgattgtcg	60
aaattctgaa cagtgccatc gaagccgtag tagaccgtat tggtcagaa ttccatgaac	120
tttccgggcg ggcgaaggat atggggtcgg cggcgggtgct gatgtccatc ctgctggcga	180
tgtttacctg gatcgatta ctctggtcac attttcgata acgcttcag aattcgataa	240
cgccttggtt ttttcttaa atttggttcc aaaatgcct ttagctgtat atactcacag	300
cataactgta tatacaccca gggggcggga tgaagcatt aacggccagg	350
<210> 10	
<211> 297	
<212> DNA	
<213> Kosakonia sacchari	
<400> 10	
cctgtatgaa gatggcgtgc gcaaagatcg cctggataac agcgatatga ttagccagct	60
tgaagccgcg attcgcgcga aagcgtcaat gctggacgaa gcgcgtcgta tcgatgtgca	120

acaggtagaa aaataaggtt gctgggaagc ggcaggcttc ccgtgtatga tgaacccgcc	180
cggcgcgacc cgttgttcgt cgcggcccg agggttcatt tttgtatta ataaagagaa	240
taaacgtggc aaaaaatatt caagccattc gcggcatgaa cgattatctg cctggcg	297
<210> 11	
<211> 194	
<212> DNA	
<213> Klebsiella variicola	
<400> 11	
ttcgctaagt cttagcaata aatgagataa gcggtgtgtc ttgtggaaaa acaaggacta	60
aagcgttacc cactaaaaa gatagcgact tttatcactt tttagcaaag ttgactgga	120
caaaaggtag cacaattggt gtactgatac tcgacacagc attagtgtcg atttttcata	180
taaaggtaat ttg	194
<210> 12	
<211> 400	
<212> DNA	
<213> Klebsiella variicola	
<400> 12	
gcccgtgac cgaccagaac ttccaccttg gactcggcta tacccttggc gtgacggcgc	60
gcgataactg ggactacatc cccattccgg tgatcttacc attggcgtca ataggttacg	120
gtccggcgac ttccagatg acctatattc ccggcaccta caataacggt aacgtttact	180
tcgcctgggc tcgtatacag ttttaattcg ctaagtctta gcaataaatg agataagcgg	240
tgtgtcttgt ggaaaaacaa ggactaaagc gttaccact aaaaaagata gcgactttta	300
tcacttttta gcaaagttgc actggacaaa aggtaccaca attggtgtac tgatactga	360
cacagcatta gtgtcgattt ttcataaaa ggtaattttg	400
<210> 13	
<211> 177	
<212> DNA	
<213> Klebsiella variicola	
<400> 13	
tcccgtgtg gcgtgagga gactgttctt aatctggcgc gcgaaggttg ctattgccct	60
gaaaatggac caccctagct gaggtcgac aaaaaacgtg cggccgactt tgggttacat	120
ttcatccggt caccaccggg ttgccccttg aaaccagaac aggataaagg agtcaga	177
<210> 14	

<211> 400

<212> DNA

<213> Klebsiella variicola

<400> 14

cccgcagcgg gtgatccctg gtcattacct cggcaccg cggaggagg acagcgcggt 60
gcgcttcaca aaaacgtatc tccagcagtt tgagcaggcg ctgaagacgc atcaggattc 120
ggccgggggtg atcaaggcca tggagacgca gtggccgggc ctggcggagt ccagctcgct 180
ggagttaagc gccaaagtta ataccgcgga gatgaagtgg tgatccggcg tgtgcgtgag 240
ggagactgtt cttaatctgg cgcgcgagg ttgctattgc cctgaaaatg gaccacccta 300
gctgaggctg cacaaaaaac gtgcggcgga ctttgggtta catttcatcc ggtcaccacc 360

gggtttgccc ttgaaaccag aacaggataa aggagtcaga 400

<210> 15

<211> 472

<212> DNA

<213> Klebsiella variicola

<400> 15

tgagtattgt cagccggaag tttgatcgga aggatgtggg aacggtattt cgccatgcgg 60
tgacctgaaa agttttgtgc cgtctggagg taaaactgac tgcagaagac agggagcagt 120
tactgtcctt aatcagctcg gtgtatcgcg ccggagagaa cgccggtagt gaacaacggg 180
cggttgaaat ccggcaggcg ctgggtttac agacagaaaa cgagtcagga ggtgtttgag 240
gatatattca gttatcagcg tgttagtcct gggtggattc gatacgacag ggtataatga 300

cgtcggcgct tgaggctttt tgcctcatga cgtaaagggt gtttgttacc gtgttgtgcg 360

gcagaaagca gaaagcccg tagttaattt tcattaaccc acgaggcccc ctgtatgtct 420

catcaacaac agtatggcct cttaccgtgc tcaatgcaag gaggagtaaa cc 472

<210> 16

<211> 250

<212> DNA

<213> Klebsiella variicola

<400> 16

agtcaggagg tgtttgagga tatattcagt tatcaggctg ttagtcctgg gtggattcga 60
tacgacaggg tataatgacg tcggcgcttg aggctttttg cctcatgacg taaagtggt 120

ttgttaccgt gttgtgcggc agaaagcaga aagccccgta gttaatTTTC attaacccac	180
gaggccccct gtatgtctca tcaacaacag tatggcctct taccgtgctc aatgcaagga	240
ggagtaaacc	250
<210> 17	
<211> 100	
<212> DNA	
<213> Klebsiella variicola	
<400> 17	
acgcttcggc cgaaaaataa gcgcacTcgt agcacgctca gtaaategcc gtctatactg	60
aaagagcctg actgaaggct aattccaagg agattgcagg	100
<210> 18	
<211> 250	
<212> DNA	
<213> Klebsiella variicola	
<400> 18	
gagcgcacgc cgccgctggc gagcgccgag gtcacggcgg cctggatgaa tcagattatc	60
gaacagtgca tectgatggc gcccagacaa tatatgtggc tgcaccggcg ttttaagact	120
cgcccgaag gggTaccgcc gcgttactga acgcttcggc cgaaaaataa gcgcacTcgt	180
agcacgctca gtaaategcc gtctatactg aaagagcctg actgaaggct aattccaagg	240
agattgcagg	250
<210> 19	
<211> 251	
<212> DNA	
<213> Klebsiella variicola	
<400> 19	
ccagcgcgca gcggcatggg tcagtaaggg ggcttttgcc gctgcaccgt aaaaaaaagt	60
ttgctatcag gtgctgaacg tgcgttaatg ctgcaggtt tgatgtacag accacagagc	120
agtcgaatag agcagtcctt ctaaggttat ccaaagatac cccgtagtg aactttccct	180
ttatcgcttt aaatctgtag tccagaccgc tacgccgcaa ggctcactta tttttttaa	240
ggtaattcac t	251
<210> 20	
<211> 350	

<212> DNA

<213> *Klebsiella variicola*

<400> 20

agtgggagtc gagacgggtt agaccgtctc ccaccgagct gaaattgatg cgcctgattc 60

aggccaatcc acagctttca cgacagttac tcgattaatc cagcgcgcag cggcatgggt 120

cagtaagggg gcttttgccg ctgcaccgta aaaaaagtt tgctatcagg tgctgaacgt 180

gcgttaatgc tcgcaggttt gatgtacaga ccacagagca gtcgaataga gcagtccttc 240

taaggttacc caaagatacc cccgtagtga actttccctt tatcgcttta aatctgtagt 300

ccagaccgct acgccgcaag gctcacttat ttttttaaag gtaattcact 350

<210> 21

<211> 156

<212> DNA

<213> *Klebsiella variicola*

<400> 21

gccggcgatc aaaaaagcag cgatttaatc gttgcatagg gcgcgaaatt ggcatacaat 60

ttcgcgcctt ttgtttttat gggcctggcc cgtaaaacga tgtttaatca cggggagctt 120

ctctgaagcg ttaataccca atttgaggat ttaaga 156

<210> 22

<211> 300

<212> DNA

<213> *Klebsiella variicola*

<400> 22

gctaaagttc tcggctaate gctgataaca ttgacgcaa tgcgcaataa aagggcataca 60

tttgatgccc tttttgcacg ctttcatacc agaacctggc tcatcagtga tttttttgt 120

cataatcatt gctgagacag gctctgaaga gggcgtttat acaccaaacc attcgagcgg 180

tagcgcgacg gcaagtcagc gttctccttt gcaatagcag ggaagaggcg ccagaaccgc 240

cagcgttgaa gcagtttgaa cgcgttcagt gtataatccg aaacttaatt tcggtttgga 300

300

<210> 23

<211> 771

<212> DNA

<213> *Klebsiella variicola*

<400> 23

cttgtggctg aacgactcat cattgtttgt aaacaggatg tagcgccaga gtaactggca	60
acaaagcaga tgctgcaggc agtataaagg ctaatggcgt aaatccatac tacagaatgg	120
tgccagcggc gcgataccct ccaggaattt tcttagaatc gaagcgcaaa tgaaaccgcg	180
ccaacaacgc tgaccagtcg cgatattgac aaagtacagg cggaagaatc gcacgaaata	240
acaagacatt ggctgaataa gggcaattga caggctaatt gattgattaa tagtcgttag	300
ggaatttttt gccgtagcac agataaattt aagttgtgta aagaagggtt aaaaaaccg	360
gatgcgaggc atccggttga aataggggtt aacagacatt cagaactgaa tgacggtaat	420
aaataaagtt aatgatgata gcgactgtta ttttagtcac caatgatagt ttgtttttac	480
cattcagtgc tatagagtta ttgtctgtta tgtgattgat tgtgaggaaa taaatatatt	540
ttttgattat tagtgcgtat ttcccagacc attttgttgt gcaaaaagtt ccgccatttt	600
tacaaattga aacatcttgt gggcattttt aaacatctta gaagtttttag tatcatattc	660
ttgttggatt attctgcatt ttgcagcaca atgaaatagc cgactgatta gaagggtaat	720
cagtaagcag tggcataata aaaggcatat aacaaacaga gggttaataa c	771

<210> 24

<211> 249

<212> DNA

<213> Klebsiella variicola

<400> 24

tgaggaaata aatatttttt ttgattatta gtgcgtattt cccagacat ttgttggtgc	60
aaaaagttcc gccattttta caaattgaaa catcttgttg gcattttgaa acatcttaga	120
agtttttagta tcatattctt gttggattat tctgcatttt gcagcacaat gaaatagccg	180
actgattaga agggtaatca gtaagcagtg gcataataaa aggcatataa caaacagagg	240
gttaataac	249

<210> 25

<211> 242

<212> DNA

<213> Klebsiella variicola

<400> 25

ttctgcgagt ttcagaaaaa ggggcctgac ggcccctttt ttcgaccggg cggcagcaat	60
tcattcaaaa ctcatgtatt gttgctagta atgatcttca tgcagagggt cgcgcggtta	120
atgagaggct tcatccgcag gggcgggtta aggttgtcat tagtcgcgag gatgcagagg	180

atcgggtcaa tagacgctat atctttgata tggcgtgatt tatagataaa aaggatagaa	240
tt	242
<210> 26	
<211> 299	
<212> DNA	
<213> Klebsiella variicola	
<400> 26	
cgccgtcctc gcagtaccat tgcaaccgac ttacagcaa gaagtgattc tggcacgcat	60
ggaacaaatt ctgtccagtc gggctttatc cgtatgacgaa cgcgcacagc ttttatatga	120
gcgcgggagtg ttgtatgata gtctcggctc gagggcatta gcgcgaaatg attttcaca	180
agcgttgga atccgaccg atatgcctga agtattcaat tacttaggca ttacttaac	240
gcaggcaggc aattttgatg ctgcctatga agcgtttgat tctgtacttg agcttgatc	299
<210> 27	
<211> 270	
<212> DNA	
<213> Klebsiella variicola	
<400> 27	
aaacaagggt ataaggctat ctgttttgc attttagctc cggggtgtgc tcgaaatgct	60
caggtactac gtgtacgctc cgctttctgc gcgcacgccg gaactaaact agctgcaccg	120
atatacgct tctatccctt gtttaatgct cagtaccaag atgtgattg cattttccc	180
agaaatcagt aaaaatttcg ggcttttaat atgacaccg gctccgttcc tcgatggggc	240
ccggttgttt tattcacaca agaggatgtt	270
<210> 28	
<211> 300	
<212> DNA	
<213> Klebsiella variicola	
<400> 28	
tcggttcagg gcaattccat tggctgata aagataatat gtccccgttc tcagggggaa	60
aagattgtcg ccgattcac caaaaatgcg atattccgcg cagggcctcc atcttaatac	120
gataaaaggc cgctacaagc cgttggtaca taacccttc attgtggatc tcgcggttaa	180
tcgcaaaaa tagcgctaaa tgacaacaaa tatcatttgc cttccattca gataaactt	240
acattcataa ctattagtaa tgttttggcg ccaggcgct ttttatattt cgagggtgat	300

	300
<210> 29	
<211> 250	
<212> DNA	
<213> Klebsiella variicola	
<400> 29	
actatcgca agacgcgcaa atcccggtga tgattttcta aacagcgctt gcgtcgtgcc	60
agaatttgcg tataatgcgc gggcctgtca aagttgacag ccggttcgat atgaaccctg	120
atagtgcctt ttgctatcaa acaatgtccc caatcggggg actatgtaag aacggttaca	180
ctctcccatc aatcgtaatg ggtatgagga gtaatcattt cgtctataaa ataattggag	240
ctctggactc	250
<210> 30	
<211> 128	
<212> DNA	
<213> Klebsiella variicola	
<400> 30	
atatcgatca ataaatttga acaatgacag caaatccttc cgctttttgt ttagcgatgt	60
gcgggctact atttaacaca tcaaggcacg gcgccttatac taaacaacta aatgaaaggg	120
tttatatc	128
<210> 31	
<211> 300	
<212> DNA	
<213> Klebsiella variicola	
<400> 31	
tgaaatggtg cagaaggccg cgatgtgcgg cgtcgagatc ctgttcgcag tctcggcggc	60
cactacctta gcggtggaag tggccgagcg ctgcaatctg acgctggtgg gcttttgcaa	120
gccgggcagg gcgacagtct acacccatcc gcagcgttta attgcgggtt aaatatcgat	180
caataaattt gaacaatgac agcaaatcct tccgcttttt gtttagcgat gtgcgggcta	240
ctatttaaca catcaaggca cggcgcctta tctaacaac taaatgaaag ggtttatatc	300
	300
<210> 32	
<211> 352	

<212> DNA
 <213> Klebsiella variicola
 <400> 32
 atgaaattag gattattcct ggaatttttt ttaccgatgg taaagacaca gcgtttttca 60
 gggacttttt cgcgcaatgc ctgtcacacg gggattttctg ctttttttct gcgtacgaaa 120
 atcaaccata tttgttaaatt atttgtgtaca caaccctttt ttttcatatg cctgacagag 180
 ttcacacttg taagtttcga actaagttgt agactttaca tcgccagggg tgatcggctt 240
 acgctgcatg tatcagcata gttaacaaca agtcacgccc cgggtgaagg atttaaccgt 300
 gaggtctttt gtaacttcat ggcgaaatttt ggatgataat gaggcgcaaa aa 352

<210> 33
 <211> 200
 <212> DNA
 <213> Klebsiella variicola
 <400> 33
 accctttttt ttcatatgcc tgacagagtt cacacttgta agtttcgaac taagttgtag 60
 actttacatc gccaggggtg atcggtttac gctgcatgta tcagcatagt taacaacaag 120
 tcacgccccg ggtgaaggat ttaaccgtga ggtcttttgt aacttcatgg cgaattttgg 180
 atgataatga ggcgcaaaaa 200

<210> 34
 <211> 300
 <212> DNA
 <213> Klebsiella variicola
 <400> 34
 gccgacgaag cctcgccgcg ccgcttcgtt atatacctca acaggagtac tccggttgta 60

tcgataatgc gagggtgca ggtattattt cctgcacac agtaagtttag cggtgatgtg 120
 ccgtctggtt atttttaatg tgtgttgtag aattattccg aattactgct gaaagacgtc 180
 gggaaaacgg aataataatt tgactaacca gcattaccg ctagagttaa atatcgaacg 240
 acgagtgata cggaatatit tcgtatcgta ctgacataac cgatatacat gaggtgaaat 300
 300

<210> 35
 <211> 165
 <212> DNA
 <213> Klebsiella variicola

<400>	35	
tagagtacgc attctcgata cggataaacg gctcagcgat gagccgttta tttttctac	60	
ccatactcgg tttgtggtgt tataatgccg cgcctcgat atggggcttt ttaacgaccc	120	
taattttcgg gactcagtag tagttgacat tagcggagca ctaaa	165	
<210>	36	
<211>	300	
<212>	DNA	
<213>	Klebsiella variicola	
<400>	36	
acgaccaaac tgcacgtaca tgacgagaac aacgaatgcg gtatcgggtga cgtgggtgaa	60	
atccgcgaat gccgtccgct gtccaagact aagtcctgga cgctggttcg cgtttagtag	120	
aaagcggttc tgtaatagag tacgcattct cgatacggat aaacggctca gcgatgagcc	180	
gtttatTTTT tctaccata tctggtttgt ggtgttataa tgccgcgccc tcgatatggg	240	
gctttttaac gaccctaatt ttcgggactc agtagtagtt gacattagcg gagcactaaa	300	
	300	
<210>	37	
<211>	71	
<212>	DNA	
<213>	Klebsiella variicola	
<400>	37	
gaatttactt acattaaggc ggcgaggggc gcctatactt gatagttctg ataccagaag	60	
aaggaagaac t	71	
<210>	38	
<211>	151	
<212>	DNA	
<213>	Klebsiella variicola	
<400>	38	
atgccacggc ctccccggat cgggtggtgg agcagattat gaccatgctg tgcggcgca	60	
cggcaacccc ggtaagttaa gaatttactt acattaaggc ggcgaggggc gcctatactt	120	
gatagttctg ataccagaag aaggaagaac t	151	
<210>	39	
<211>	364	

<212> DNA

<213> *Klebsiella variicola*

<400> 39

taactataaa cgctataacc ctataataatt cgagtggcag gaaggcggcg acgcagcgaa 60

tccccaggag cttactcaag taagtgactg gggtgagtga ggaaagccaa cacacaggca 120

acttgaagta tggcgggtat aggtgccgta acctcggggg aacggcacct tgcgtcataa 180

gtactgataa cgataaagtc gggttgaaat tgtgtatatc ggctaaactt aggtttaaca 240

gaatgtgatg ccatgactgc cttataccgc aaggtatttg tcacgcctta ctttttggcg 300

ttatatgatg gataatgccg ggatacgaga gtcccgactc ttttaattctt tcaaggagca 360

aaga 364

<210> 40

<211> 200

<212> DNA

<213> *Klebsiella variicola*

<400> 40

gcaccttgcg tcataagtac tgataacgat aaagtcgggt tgaaattgtg tatatcggt 60

aaacttaggt ttaacagaat gtgatgccat gactgcctta taccgcaagg tatttgtcat 120

cgcttacttt ttggcggtat atgatggata atgccgggat acgagagtcc cgactctttt 180

aatctttcaa ggagcaaaga 200

<210> 41

<211> 204

<212> DNA

<213> *Rahnella aquatilis*

<400> 41

agtattaaag gcggaaaacg agttcaaccg gcgcgtccta atcgattaa caaagagatt 60

cgcgcgcaag aagttcgctt cacaggcgct gatggcgagc agattggtat tgtcagtctg 120

aatgaagctc ttgaaaaagc tgaggaagcg ggcgtcgatt tagtagaaat cagtccgaat 180

gccgagccgc cagtttgcg aatc 204

<210> 42

<211> 500

<

212> DNA

<213> *Rahnella aquatilis*

<400>	42	
tgaacatcac tgatgcacaa gctacatatg tcgaagaatt aactaaaaaa ctgcaagatg	60	
caggcattcg cgttaaagcc gacttgagaa atgagaagat tggcttttaa attcgcgaa	120	
acacgtctacg ccgtgttcct tataatgtag ttgtggcga taaagaggtc gaagcaggca	180	
aagttgctgt tcgtaccgcg cgcggcaaag acttaggaag catggatgtt agcgaagtcg	240	
ttgacaaact gctggcggaa atccgcagca gaagtcttca tcaactggag gaataaagta	300	
ttaaaggcgg aaaacgagtt caaccggcgc gtcctaatacg cattaacaaa gagattcgcg	360	
cgcaagaagt tcgcctcaca ggctgcgatg gcgagcagat tggattgtc agtctgaatg	420	
aagctcttga aaaagctgag gaagcgggcg tcgatttagt agaaatcagt ccgaatgccg	480	
agccgccagt ttgtcgaatc	500	
<210>	43	
<211>	120	
<212>	DNA	
<213>	Rahnella aquatilis	
<400>	43	
tctggcctta atctggtgct gaagaatatt cagtgccggt ttggctata gttttttta	60	
acctgccgcg aaggatctgt agcggggcat ttgaaacaac cccatccagc aggacgccag	120	
	120	
<210>	44	
<211>	400	
<212>	DNA	
<213>	Rahnella aquatilis	
<400>	44	
tgcaccggtg aagatatttc tggatgccag ttcggaagaa cgtgcaaaca gaagaatgct	60	
acagttgcag gaaaaaggct ttagtgtaa cttigaacgg cttttagccg agatcaaaga	120	
acgcgatgac cgigatcgta acaggcctat cgcgccttta gtggctgctt ccgatgcact	180	
gttgctggat tcaaccagta tgtctatcga cgaagtcac gaaaaagcac tggcttatgc	240	
cacagaaatt ctaggattac cgcaaaaaca aaccggtaa tctggcctta atctggtgct	300	
gaagaatatt cagtgccggt ttggctata gttttttta acctgccgcg aaggatctgt	360	
agcggggcat ttgaaacaac cccatccagc aggacgccag	400	
<210>	45	
<211>	170	

<212> DNA

<213> *Rahnella aquatilis*

<400> 45

tacagtagcg ccctcaaaa atagataaac ggctcatgta cgtgggccgt ttattttttc 60

taccataat cggaaccgg tgttataatg ccgcgcctc atattgtggg gattttctaa 120

tgacctatcc tgggtcctaa agttgtagt gacattagcg gagcactaac 170

<210> 46

<211> 129

<212> DNA

<213> *Rahnella aquatilis*

<400> 46

tctgtaacag aagttttaca gctcctttcc atctggaaag gagctgttcg tctcacggac 60

gcaggacgcg tttgtgttaa gcaagcggat gacaggatgt tcatccaatg tttgtctcgg 120

ggagtagaa 129

<210> 47

<211> 273

<212> DNA

<213> *Rahnella aquatilis*

<400> 47

tcaagcgagt ttcagtgtaa aggggccaat agggcccttt attctaggaa ggcgagccaa 60

atcagggtac tgiatggctg cggtttctac tgtattctta agaacatgaa cttccgttac 120

agatgttttc gcgcggctaa tgagagactt tattaccaca ttgccaggta tataaggatt 180

gtcattagtc gcgagaatgt agtgagaagc tcggatatatt atcggcgtga actgctgtca 240

taacagctgc gcgtcataca aaaggatatt aca 273

<210> 48

<211> 153

<212> DNA

<213> *Rahnella aquatilis*

<400> 48

aaattacgaa attatttgcg ttttttgcgg taaaaaccgc aaaatagagc aaattcgtgg 60

tttgaccagc ctggatttag ttgcatcttt ttcaacattt tatacactac gaaaaccatc 120

gcgaaagcga gttttgatag gaaatttaag agt 153

<210> 49

<211> 750
 <212> DNA
 <213> *Rahnella aquatilis*
 <400> 49
 gaatatatttag gcgaaaatgg caagggtatc atgctcaatg tggttgattc tgcattctatt 60

 gagcaagtat tggcgacgat tcgagctgaa ttggcgaaa ttgatatttt agttaataat 120
 gccggcatca cccgtgataa ccttctcatg cgtatgaagg atgatgagtg gcaggatc 180
 ctggatacga acctgacttc agtgtttcgg ctgtcaaaag ctgtcatgag agctatgatg 240
 aagaaacggt gtggacggat tattacaatt ggttccgttg ttggcaccat gggtaacgca 300
 gggcaggcga actacgcggc ggctaaagct ggcttgattg gttttagtaa gtctttggca 360
 cgtgaggtcg cttcacgtgg cattactgtc aacgtcgtgg ctcccggtt tattgagacg 420
 gatatgacaa gggcgttgac agatgatcaa cgcgcaggca ttttgtcatc agttccagcc 480

 aaccggttgg gcgatgcaa agaaattgcc agcgcgttg ctttttttagc ctctgacgag 540
 gccagctaca tcacgggtga aacattacat gtcaatggcg gcatgtatat gatttaaaaa 600
 ttacgaaatt atttgcgttt ttgcggttaa aaaccgcaa atagagcaa ttcgtggttt 660
 gaccagcctg gatttagttg catctttttc aacattttat acactacgaa aaccatcgcg 720
 aaagcgagtt ttgataggaa atttaagagt 750
 <210> 50
 <211> 142
 <212> DNA
 <213> *Rahnella aquatilis*
 <400> 50
 aatttttttt cacaagcgt agcgttattg aatcgacat tttaaactgt tggccgctgt 60

 ggaagcgaat attggtgaaa ggtgcggttt taaggccttt tctttgact ctctgtcgtt 120
 acaaagttaa tatgcgcgcc ct 142
 <210> 51
 <211> 293
 <212> DNA
 <213> *Rahnella aquatilis*
 <400> 51
 ttaaaaacgt gaccacgagc attaataaac gccacgaaat gtggcggtta ttattcaaa 60
 aagtatcttc ttccataaaa agtgctaaat gcagtagcag caaaattggg ataagtccca 120

tggaatacgg ctgttttcgc tgcaattttt aactttttcg taaaaaaga tgtttctttg 180
agcgaacgat caaaatatag cgtaaacggg caaaaaatta ttctcattag aaaatagttt 240

gtgtaatact tgtaacgcta catggagatt aacttaatct agagggtttt ata 293

<210> 52
<211> 198
<212> DNA
<213> Rahnella aquatilis
<400> 52

acaccctcct tccatcacca ttgtgattat gggtattaaa tttttataga aataacttaa 60
cgatcattat taaaaatagt tgcgcacaag tccagcggag ttattatttt aattatcgag 120
cgataagaaa atcgctcaaa cccgcaaac tgcgcagcta aaaacgcttt ttaagcatac 180
tatccaggac gtaacatc 198

<210> 53
<211> 285
<212> DNA
<213> Rahnella aquatilis
<400> 53

taaaaaatc ctgaacgggc ggtaaatgaa aaagggttta tcaatcattc atgctgtgag 60
cacggtttgc aaggcttgca gtatgaattg atgcaacaat gtgtggtgac cagaaatcac 120
tgccggttca ttcatagtag tcaaaggtat cggactgaca ggtaattcct gctttttttt 180
atgatctgca acaggcatag tatcgacatc aaaaagggtga tgtggataac aaaaaacaaa 240
cattcccttt tcatttatct cgttggcatt aacaaaggag tctcc 285

<210> 54
<211> 224
<212> DNA
<213> Rahnella aquatilis
<400> 54

tcaatctcat cagtctctg aaccgtcccg caattccctg caatacaaga ggttgttgtt 60
aaagaactct gagacttacg tcaaagactg atagccggat actatctgat tgattggtgc 120
gatgggggtt attcaccgcg agcttgcccc tatactgaca gtcgttttgt tcatcctttc 180
ctttcaccta cgacgccctc ttgggtttca taaggagtaa tatt 224

<210> 55

<211> 1256

<212> DNA

<213> *Rahnella aquatilis*

<400> 55

taccggcggg ttgcaaccag gtaaagacat cggccactg ccagcttgat tcatcgataa 60

tcacctgcgt gttgtccggc aatacgcggg ggatatTTTC ccagaagcgg ccaccggTca 120

gatggacgat gccgtgaaca tccacgtttt cgaTcaggTt caggatcgat tTcacgTaaa 180

TTTTggTcgg Tgcgagcaaa Tgatcagcca gcggtttgcc Tgccagatcg Tgggtttccg 240

ggTcggTctt gctgacttcc agaattttgc gcaccagaga ataaccgtta gaatgcgggc 300

cactggcggc cagaccaatc agcacatccc cgtcagccac tttgctgccg Tcgatgattt 360

ctgatttttc caccacgccc acgcagaagc ctgccacgtc gtaatcttcg ccgtgataca 420

Tgcccggcat tTcagcggTt Tcaccgcaa ctaacgcaca gccagactgt ttacagcctt 480

ctgcgatacc cgtgatcacg ctggcagccg tatcgacgtc cagtttgccg gtagcgtaat 540

aatcgaggaa gaacaggggt Tcggcgcctt gaacgatcaa atcgTtgacg cacatcgga 600

ccaggTcgat accgatagta TcgtggcgTt tcaaTccat cgccagacgc agctTggTgc 660

caacgccgtc ggtaccgat accagcacgg gTtcacgata tttttgcggc agcgcgcaga 720

gggcacaaaa accgcccagt ccaTccatga cTtcagggcg gcgagTctgt tTtactacac 780

ctTtaatgcg gTctaccaat gcgtTaccgg catcgatac tacgcctgcg tctttatagc 840

Tgagagaggt tttgtcggtc actgcgaagt cccacggcg gTttgggttg TgggtTgaag 900

aataaagcgg ggcaattcta acagtgcagg caaacgtttg cgagcgctt attcagagtc 960

actatctata cttaaaaaa caacacttag ccgaagtcac TggagTtgca gcaaggcagc 1020

aaacgagcga atcccgatga gctgacttga gTcagTgatt cgggtgagag agagcagcta 1080

acgcagctgc ggcttcaatg aagcagggtt agTtgatcca gatcaggcta tttggtatgg 1140

cgttcaaaaa aaatggcgTt ataatctcgc gatTTTTTTT Tgcagctcaa ccacttagg 1200

agaataaata atgaagatcg Tcgaggtgaa acaccgctg gtgaaacaca agctgg 1256

<210> 56

<211> 449

<212> DNA

<213> *Rahnella aquatilis*

<400> 56

cggcacgat atctacgct gcgtctttat agctgagaga ggttttgcg gTcactgcga 60

agtccccacg gcggtttggg ttggtggttg aagaataaag cggggcaatt ctaacagtgc 120
aagcaaactg ttgcgagcgc cttattcaga gtcactatct atacttaaaa atacaacact 180
tagccgaagt cattggagtt gcagcaaggc agcaaacgag cgaatcccga tgagctgact 240
tgagtcagtg attcgggtga gagagagcag ctaacgcagc tgcggcttca atgaagcagg 300
gtaagtgtat ccagatcagg ctatttggta tggcgttcaa aaaaaatggc gttataatct 360
cgcgattttt ttttgcagct caaccacctt aggagaataa ataatgaaga tcgtcgaggt 420
gaaacacccg ctggtgaaac acaagctgg 449

<210> 57

<211> 312

<212> DNA

<213> Rahnella aquatilis

<400> 57

cgcggtttgg ttggtcaaatt ttcacacaaa atcacgttga tcgactatac tggtttcgtc 60
gcgctgactg agaacaatgc ccagcaaaaca gcatgggtga acatcgatgt gctgtatatt 120
tcttgacacc ctcttaggtc agccctaaaa tcttgcgtcc ccatattagc taatgctttt 180
tatggggcga tttatcacgc gtttacaag tagtttatga accaaaatcc aggagctttt 240
taatggcaac aattaatcag ctggtacgca aaccacgctc tacgaaggtt gctaaaagca 300
acgttccagc gc 312

<210> 58

<211> 489

<212> DNA

<213> Rahnella aquatilis

<400> 58

cctggttagg tctgctccag cagctctgaa agaaggcatc agcaaagatg acgtgaagc 60
tctgaaaaaa tctctggaag aagctggtgc tctgttgaa gtttaagtaag tttaacttcc 120
cggagtcagc tctgtcctaa caggctgatg gctggtgact ttttagtcac cagccttttt 180
gcgctataga gtgtcagtga tgtttcacac tgtttgagca ctgaactact ctaatatctc 240
tttctataga cgccttaata tattgttgcc tcttgctgta gctcatctac agataacgca 300
caacgaaatg atttaagagt ggtagaaaac agatattgcg gaaagcgttt ctgctttccg 360

gtcgacataa acggtgttgc atgaactgtc cttctcaggg cagacaagat tgggtcactg 420
atcagcgagc tgaggaaccc tatggtttac tcctataccg agaaaaaacg cattcgtaag 480
gatttttgt 489

<210>	59	
<211>	498	
<212>	DNA	
<213>	Rahnella aquatilis	
<400>	59	
	tgaatatcac tgactcacia gctacctatg tcgaagaatt aactaaaaaa ctgcaagatg	60
	caggcattcg cgittaaagcc gacttgagaa atgagaagat tggcttttaa attcgcgaa	120
	acacgctacg ccgtgttcct tatatgttag ttgtggcga taaagaggtc gaagcaggca	180
	aagttgctgt tcgtactcgt cgcggaag acttaggaag catggatgtt agcgaagtcg	240
	ttacaaactg cgcggaat ccgcagcaga agtcttcac aactggagga ataaagtatt	300
	aaaggcgaa aacgagttca accggcgct cctaactgca ttaacaaaga gattcgcg	360
	caagaagttc gcctcacgg cgctgatggc gagcagattg gtattgtcag tctgaatgaa	420
	gctcttgaaa aagctgagga agcggcgctc gatttagtag aaatcagtc gaatgccgag	480
	ccgccagttt gtcgaatc	498
<210>	60	
<211>	498	
<212>	DNA	
<213>	Kluyvera intermedia	
<400>	60	
	ctggggtcac tggagcgtt tatcgcatc ctgaccgaag aatttgccgg ttcttcccg	60
	acctggctgg cccctgttca ggttgtgtg atgaatatca ctgatttca agctgaatat	120
	gtcaacgaat tgaccgtaa attgcaaat gcgggcattc gtgtaaaagc ggacttgaga	180
	aacgagaaga ttggctttaa aatccgcgag cacactttac gtcgtgtccc ttatatgttg	240
	gtctgtgtg ataaagaggt ggaagcaggc aaagtggccg ttcgcacccg ccgcggtaaa	300
	gacctgggca gcctggacgt aagtgaagtg attgagaagc tgcaacaaga gattcgagc	360
	cgcagtttc aacaactgga ggaataaggt attaaaggcg gaaaacgagt taaaacggca	420
	cgctccgaatc gtatcaatgg cgagattcgc gccaggaag ttgcgttaac tggcttgaa	480
	ggtgagcagc tgggtatt	498
<210>	61	
<211>	500	
<212>	DNA	
<213>	Kosakonia pseudosacchari	

<400>	61	
ttcttgggttc tctggagcgc tttatcggca tcctgactga agaatttgca ggctttcttc	60	
caacctggct tgcacccgtg caggtagttg tgatgaacat cactgattcg caggctgaat	120	
acgttaacga attgacccgt aaactgcaaa atgcgggcat tcgtgtaaaa gcagacttga	180	
gaaacgagaa gattggcttt aaaatccgcg agcacacttt acgtcgtgtc ctttatatgc	240	
tggtttgtgg tgacaaagag gtcgaagccg gcaaagtgc tgtgcgtacc cgtcgcggtg	300	
aagacctggg tagcctggac gtaaatgatg ttatcgagaa gctgcaacaa gagattcgca	360	
gccgcagtct tcaacaactg gaggaataag gtattaaagg cggaaaacga gttcaaacgg	420	
cgcgccccaa tcgtattaat ggcgagattc gcgccacgga agttcgctta acaggctcgg	480	
aaggcgagca gcttgggtatt	500	
<210>	62	
<211>	500	
<212>	DNA	
<213>	Enterobacter sp.	
<400>	62	
tgaatattac cgattctcag gcggattacg ttaaagaatt gacgcagaaa cttcaaatg	60	
cgggcattcg cgtaaaagca gacttgagaa atgagaagat tggctttaaa atccgcgagc	120	
acactttacg tcgtgtcccg tataatgttg tctgtggtga taaagagtg gaagcaggca	180	
aagttgccgt tcgcacccgc cgtggtaaag acctgggcag cctggacgta agtgaagtga	240	
ttgagaagct gcaacaagag attcgagcc gcagtcttca acaactggag gaataaggta	300	
ttaaaggcgg aaaacgagtt caaacggcac gtccgaatcg tatcaatggc gagattcgcg	360	
cccaggaagt tcgcttaaca gatcttgaag gtgaaccact ggggattgtg agtctgagag	420	
aagcgatcga aaaagctgaa gaagctggag tagatttagt tgaaatcagc cctaacgccg	480	
aaccgccagt ttgtcgtatt	500	
<210>	63	
<211>	500	
<212>	DNA	
<213>	Rahnella aquatilis	
<400>	63	
tgaatatcac tgactcaca gctacctatg tcgaagaatt aactaaaaaa ctgcaagatg	60	
caggcattcg cgtaaagcc gacttgagaa atgagaagat tggctttaaa attcggaac	120	

acacgtacg ccgtgttcct tataatgtag ttgtggcga taaagaggtc gaagcaggca	180
aagttgctgt tcgtactcgt cgcggcaaag acttaggaag catggatgtt agcgaagtcg	240
ttgacaaact gctggcggaa atccgcagca gaagtcttca tcaactggag gaataaagta	300
ttaaaggcgg aaaacgagtt caaccggcgc gtctaatcg cattaacaaa gagattcgcg	360
cgcaagaagt tcgcctcacc ggctcgatg gcgagcagat tggattgtc agtctgaatg	420
aagctcttga aaaagctgag gaagcgggcg tcgatttagt agaaatcagt ccgaatgccg	480
agccgccagt ttgtcgaatc	500
<210> 64	
<211> 170	
<212> DNA	
<213> Rahnella aquatilis	
<400> 64	
tacagtagcg cctctcaaaa atagataaac ggctcatgta cgtgggccgt ttattttttc	60
taccataat cggaaccgg tggtataatg ccgcgccctc atattgtggg gatttcttaa	120
cgacctatcc tgggtcctaa agttgtagtt gacattagcg gagcactaac	170
<210> 65	
<211> 142	
<212> DNA	
<213> Rahnella aquatilis	
<400> 65	
aatttttttt cacaagcgt agcgttattg aatcgacat tttaactgt tggccgctgt	60
ggaagcgaat attggtgaaa ggtgcggttt taaggccttt ttctttgact ctctgtcgtt	120
acaaagttaa tatgcgcgcc ct	142
<210> 66	
<211> 293	
<212> DNA	
<213> Rahnella aquatilis	
<400> 66	
ttaaaaacgt gaccacgagc attaatgaac gctgcgaat gtggcgttta ttattcaaa	60
aagtatcttc ttccataaaa agtgctaaat gcagtagccg caaaattggg ataagtccea	120
tggaatacgg ctgttttcgc tgcaattttt aactttttcg taaaaaaga tgcttctttg	180
agcgaacgat caaaatatag cgcttaccga caaaaaatta ttctcattag aaaatagttt	240

gtgtaatact tgtaacgcta catggagatt aacttaatct agagggtttt ata	293
<210> 67	
<211> 500	
<212> DNA	
<213> Klebsiella sp.	
<400> 67	
agcgtcaggt accggtcattg attcaccgtg cgattctcgg ttccttgag cgcttcattg	60
gcacctgac cgaagagttc gctggcttct tccaacctg gattgcacca gtgcaggtag	120
tggtcatgaa tattaccgat tctcaggctg aatacgttaa cgaattgacg cgtaaaactac	180
aaaatgcggg cattcgtgta aaagcagact tgagaaatga gaagattggc tttaaaatcc	240
gcgagcacac tttagctgt gtcccgata tgttggtctg tggcgacaaa gaagtcgaag	300
ccggcaaagt ggccgtgcgc acccgctcgc ggaaagacct cggcagcatg gacgtaagtg	360
aagtgattga gaagctgcaa caagagattc gcagccgcag tcttcaaca ctggaggaat	420
aaggtattaa aggcggaaaa cgagttcaaa cggcacgtcc gaatcgtatc aatggcgaga	480
ttcgcgccct ggaagttcgc	500
<210> 68	
<211> 400	
<212> DNA	
<213> Klebsiella sp.	
<400> 68	
gcccgtgac cgaccagaac ttccaccttg gactcggcta tacccttggc gtgacggcgc	60
gcgataactg ggactacatc cccattccgg tgatcttacc attggcgtca ataggttacg	120
gtccggcgac tticcagatg acctatattc ccggcaccta caataacggt aacgtttact	180
tcgcctgggc tcgtatacag ttttaattcg ctaagtctta gcaataaatg agataagcgg	240
tgtgtcttgt ggaaaaacaa ggactaaagc gttaccact aaaaagata gcgactttta	300
tcacttttta gcaaagttgc actggacaaa aggtaccaca attggtgtac tgatactcga	360
cacagcatta gtgtcgattt ttcatataaa ggtaattttg	400
<210> 69	
<211> 300	
<212> DNA	
<213> Klebsiella sp.	
<400> 69	

gctaaagttc tcggctaatac gctgataaca tttagacgcaa tgcgcaataa aaggcatca	60
tttgatgcc ttttgcacg ctttcatacc agaacctggc tcacagtga tttttttgt	120
cataatcatt gctgagacag gctctgaaga gggcgtttat acaccaaacc attcgagcgg	180
tagcgcgacg gcaagtcagc gttctccttt gcaatagcag ggaagaggcg ccagaaccgc	240
cagcgttgaa gcagtttgaa gcggttcagt gtataatccg aaacttaatt tcggtttgga	300
	300
<210> 70	
<211> 333	
<212> DNA	
<213> Kosakonia pseudosacchari	
<220><221> modified_base	
<222> (56)	
<223> a, c, t, g, unknown or other	
<400> 70	
tcgccacggc gataaccata gggtttcggc gtggccacat ccatggtaaa tcccantttt	60
tccagcacgc gcgccacttc atcggtcttt aaatacatag attttctctg tcattcttcc	120
aaagcctcgc caccctacat gactgagcat ggaccgtgac tcagaaaatt ccacaaacga	180
acctgaaagg cgtgattgcc gtctggcctt aaaaattatg gtctaaacta aaattcacat	240
cgaaaacgag ggaggatcct atgtttaaca gaccgaatcg ccgtgacgta gatgaagggtg	300
ttgaggatat taaccacgat gttaaccagc tcg	333
<210> 71	
<211> 339	
<212> DNA	
<213> Kosakonia pseudosacchari	
<400> 71	
cgcgtcaggt tgaacgtaaa aaagtcggtc tgcgcaaagc acgtcgtcgt ccgcagttct	60
ccaaacgtta attggtttct gcttcggcag aacgattggc gaaaaaaccc ggtgcgaacc	120
gggttttttt atggataaag atcgtgttat ccacagcaat ccattgatta tctcttcttt	180
ttcagcattt ccagaatccc ctaccacaa agcccgcaa atctggtaaa ctatcatcca	240
atcttctgcc caaatggctg ggattgttca tttttgttt gccttacaac gagagtgaca	300
gtacgcgcgg gtagttaact caacatctga ccggtcgat	339
<210> 72	

<211> 350
 <212> DNA
 <213> Kosakonia pseudosacchari
 <400> 72
 atattgacac aatgacgcgc gtactgctga ttggttctgt gacgctgggtg atgattgtcg 60

 aaattctgaa cagcgccatc gaagctgtgg tagaccgtat tggcgaggaa ttccatgaac 120
 ttccggggcg ggcgaaggat atggggtcgg cggcgggtgct gatgtccatc ctgctggcgc 180
 tgtttacctg gatgcatta ctctggtcac attttgata acgcttcag aattcgataa 240
 cgccctggtt ttttgcttaa atttggttcc aaaatcgctt ttagctgtat atactcacag 300
 cataactgta tatacaccca gggggcggga tgaaagcatt aacggccagg 350
 <210> 73
 <211> 90
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide

 <400> 73
 gtgatcaga ccgatgttcg gaccttccaa ggtttcgatc ggacatacgc gaccgtagtg 60
 ggtcgggtgt acgtctcgaa cttcaaagcc 90