

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公開特許公報(A)

(11)公開番号

特開2024-103698

(P2024-103698A)

(43)公開日 令和6年8月1日(2024.8.1)

(51)国際特許分類

F I

A 0 1 H 6/46 (2018.01) A 0 1 H 6/46 Z N A
 A 0 1 H 6/00 (2018.01) A 0 1 H 6/00
 C 1 2 N 15/09 (2006.01) C 1 2 N 15/09 Z
 A 0 1 G 7/00 (2006.01) A 0 1 G 7/00 6 0 5 Z
 C 1 2 N 1/20 (2006.01) A 0 1 H 6/46

審査請求 有 請求項の数 15 O L 外国語出願 (全346頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2024-89992(P2024-89992)
 (22)出願日 令和6年6月3日(2024.6.3)
 (62)分割の表示 特願2021-545687(P2021-545687)
)の分割
 原出願日 令和2年2月4日(2020.2.4)
 (31)優先権主張番号 62/801,504
 (32)優先日 平成31年2月5日(2019.2.5)
 (33)優先権主張国・地域又は機関
 米国(US)
 (31)優先権主張番号 62/960,633
 (32)優先日 令和2年1月13日(2020.1.13)
 (33)優先権主張国・地域又は機関
 米国(US)

(71)出願人 518011220
 ピボット バイオ, インコーポレイテッド
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 7
 1 0, パークリー, セブンス ストリ
 ート 2 9 1 0
 (74)代理人 100078282
 弁理士 山本 秀策
 (74)代理人 100113413
 弁理士 森下 夏樹
 (74)代理人 100181674
 弁理士 飯田 貴敏
 (74)代理人 100181641
 弁理士 石川 大輔
 (74)代理人 230113332
 弁理士 山本 健策

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 生物学的窒素固定による作物収穫高の一貫性の向上

(57)【要約】

【課題】生物学的窒素固定による作物収穫高の一貫性の向上の提供。

【解決手段】本開示は、持続可能な生物学的固定窒素に基づいた、作物に窒素を供給するための新しいプラットフォームを農業従事者に提供する。教示されたプラットフォームは、天候、環境、または土壌条件に関係なく、全ての耕作面積にわたって収穫高の一貫性を向上させることができる。教示された開示によって可能になった収穫高の一貫性の向上の結果として、農業従事者は、彼らが植える各エーカーにわたる収穫高の予測可能性の度合いの高いものが得られ、これは、過去の合成窒素供給パラダイムでは不可能であった。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

作物の対照セットと比較して農業場所において、収穫高の一貫性が改善された複数の作物であって、

複数のリモデリングされた窒素固定微生物と関連した複数の作物を含み、それにより、前記複数の作物が、それらの植物内固定 N の少なくとも 1 % を前記リモデリングされた微生物から受け取り、前記複数の作物が単一種に由来する複数の作物であり、前記複数のリモデリングされた窒素固定微生物の各メンバーが、窒素固定または同化遺伝子調節ネットワークの少なくとも 1 つの遺伝子または非コードポリヌクレオチドに導入された少なくとも 1 つの遺伝子変異を含み、

10

前記場所全体で測定された平均収穫高の標準偏差が、1 エーカー当たりのブッシュで、対照の複数の作物が前記場所に提供される場合の前記対照の複数の作物と比較して、前記窒素固定微生物と関連する前記複数の作物についてより低くなり、前記対照の複数の作物が、前記リモデリングされた窒素固定微生物に曝露されていない複数の作物である、前記作物。

【請求項 2】

前記リモデリングされた窒素固定微生物と関連する前記複数の作物の平均収穫高の前記標準偏差は、前記対照の複数の作物の前記標準偏差よりもエーカー当たり少なくとも 1.5 ブッシュ低い、または

前記リモデリングされた窒素固定微生物と関連する前記複数の作物間の前記平均収穫高が、前記対照の複数の作物の前記平均収穫高の 1 ~ 10 % 以内である、の 1 つであり、前記対照の複数の作物は、前記窒素固定微生物と関連していない、請求項 1 に記載の複数の作物。

20

【請求項 3】

前記場所が農業的に困難な土壌を含む、請求項 1 に記載の複数の作物。

【請求項 4】

前記リモデリングされた窒素固定微生物が、少なくとも 10 日 ~ 60 日の間に、1 エーカー当たり少なくとも 1.5 ポンドの固定 N を全体で生成するか、または前記リモデリングされた窒素固定微生物が、それぞれ、1 時間当たり CFU 当たり N の少なくとも 2.75×10^{-12} mmol の固定 N を生成する、の 1 つである、請求項 1 に記載の複数の作物。

30

【請求項 5】

前記複数のリモデリングされた窒素固定微生物の各メンバーが、前記窒素固定または同化遺伝子調節ネットワークの少なくとも 1 つの遺伝子または非コードポリヌクレオチドに導入された 2 つ以上の異なる遺伝子変異を含む、請求項 1 に記載の複数の作物。

【請求項 6】

細菌コロニー形成植物の収穫高値に基づいて販売する作物の量を決定するためのプロセッサ実装方法であって、前記方法は、

プロセッサを介して、及び前記プロセッサに動作可能に結合されたデータベースから、細菌コロニー形成植物の収穫高値を取得することであって、前記収穫高値が、細菌がコロニーを形成していない植物の収穫高値の標準偏差よりも低い関連標準偏差を有する、ことと

40

、前記プロセッサを介して、及び前記プロセッサに動作可能に結合されたデータベースから、ある量の細菌コロニー形成植物の現在及び将来の販売に関連する価格を取得することと

、前記プロセッサを介して、前記細菌コロニー形成植物の収穫高値ならびに現在及び将来の販売価格に基づいて、前記細菌コロニー形成植物の物理的送達量を計算することと、

前記細菌コロニー形成植物の前記計算された物理的送達量に基づいて市場ベース商品を識別することと、

50

前記プロセッサを介して、前記識別された市場ベース商品を取引するための命令を表す信号を送信することと、

前記プロセッサで、前記識別された市場ベース商品を取引するための前記命令を送信することに応答して、前記識別された市場ベース商品の取引の確認を表す信号を受信することと、を含む前記プロセッサ実装方法。

【請求項 7】

前記細菌コロニー形成植物の前記物理的送達量を生成することをさらに含む、請求項 6 に記載のプロセッサ実装方法。

【請求項 8】

前記細菌コロニー形成植物を生成することが、

a. 場所に、それぞれ、1時間当たりCFU当たりNの少なくとも 5.49×10^{-13} mmolの固定Nを生成する、複数の非属間リモデリング細菌を提供することであって、前記複数の非属間リモデリング細菌の各メンバーが、窒素固定または同化遺伝子調節ネットワークの少なくとも1つの遺伝子または非コードポリヌクレオチドに導入された少なくとも1つの遺伝子変異を含み、非属間リモデリング細菌が、元々は異なる分類学的属の生物から単離された遺伝物質の組合せにより形成されない細菌である、ことと、

b. 前記場所に前記コロニー形成前植物を提供することと、を含む請求項 7 に記載のプロセッサ実施方法。

【請求項 9】

保険商品の価格設定及び取引のためのプロセッサ実装方法であって、前記方法は、提案された保険商品に関する情報をプロセッサを介して受信することと、前記プロセッサを介して、細菌コロニー形成植物の収穫高値に基づいて前記提案された保険商品の価格を計算することであって、前記収穫高値が、細菌がコロニーを形成していない植物の収穫高値の標準偏差よりも低い関連標準偏差を有する、計算することと、を含む、前記方法。

【請求項 10】

前記プロセッサを介して、販売者の計算機から、保険を販売するオファーを表す信号を送信することであって、保険を販売する前記オファーが、前記提案された保険商品の計算された価格を含む、送信することと、

前記プロセッサで、前記提案された保険商品の前記価格を送信することに応答して、保険販売の前記オファーの受諾を表す信号を受信することと、をさらに含む、請求項 9 に記載のプロセッサ実装方法。

【請求項 11】

前記収穫高値が、

a. 場所に、それぞれ、1時間当たりCFU当たりNの少なくとも 5.49×10^{-13} mmolの固定Nを生成する、複数の非属間リモデリング細菌を提供することであって、前記複数の非属間リモデリング細菌の各メンバーが、窒素固定または同化遺伝子調節ネットワークの少なくとも1つの遺伝子または非コードポリヌクレオチドに導入された少なくとも1つの遺伝子変異を含み、非属間リモデリング細菌が、元々は異なる分類学的属の生物から単離された遺伝物質の組合せにより形成されない細菌である、ことと、

b. 前記場所にコロニー形成前植物を提供することと、を含むプロセスによる前記細菌コロニー形成植物の生成に基づく、請求項 9 に記載のプロセッサ実装方法。

【請求項 12】

商品の価値を高める方法であって、前記方法が、栄養素供給微小生物の存在下で前記商品を栽培することにより、前記商品の収穫高のばらつきを低減させることを含む、前記方法。

【請求項 13】

前記商品が作物であり、前記栄養素供給微小生物の存在下で前記作物を成長させることが、前記作物への前記提供された栄養素の利用可能性を改善する、請求項 12 に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 14】

商品の保険費用を低減する方法であって、前記方法が、
栄養素供給微小生物の存在下で前記商品を栽培することにより、前記商品の収穫高のばらつきを低減させることを含む、前記方法。

【請求項 15】

前記商品が作物であり、前記栄養素供給微小生物の存在下で前記作物を栽培することが、前記作物への前記提供された栄養素の利用可能性を改善する、請求項 14 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

10

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2020年1月13日に提出された米国仮出願第62/960,633号、及び2019年2月5日に提出された米国仮出願第62/801,504号の利益及び優先権を主張するものであり、その記載内容は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【0002】

配列表に関する記載

本明細書と共に電子的に提出されるテキストファイルの内容は、参照により全体が本明細書に組み込まれる：配列表のコンピューター可読形式のコピー（ファイル名：PIVO_013_01WO_SeqList_ST25.txt、データ記録日：2020年1月28日、ファイルサイズ約632キロバイト）。

20

【背景技術】

【0003】

国連食糧農業機関は、増加し続ける人口の必要性を満たすために、2050年までに総食糧生産が70%増加しなければならないと予測している。この難問は、真水資源の減少、耕地競合の増加、エネルギー価格の上昇、投入コストの増加、及び作物が、より乾燥し温暖化したより極端な全地球的気候の圧力に適応する必要がある可能性が高いことなど、多数の要因のためにさらに難しいものになっている。

【0004】

30

現行の農業慣行は、この増大し続ける食料生産の需要を満たしながらも、同時に農業集中の増加からもたらされる環境影響との均衡を保つための十分な装備がない。

【0005】

世界の食料需要を満たすために必要な主要な農業投入物の1つは、窒素肥料である。しかし、窒素肥料の製造に利用されている現在の工業規格は、ハーバーボッシュ法と呼ばれる人工窒素固定法であり、高温高压下で金属触媒を使用して、水素（ H_2 ）との反応により大気中の窒素（ N_2 ）をアンモニア（ NH_3 ）に変換する。このプロセスは、資源集約的であり、環境に悪影響を及ぼす。

【0006】

合成ハーバーボッシュ法とは対照的に、ある特定の生物系は、大気中の窒素を固定するように進化してきた。これらのシステムは、 N_2 と H_2 との反応を触媒するニトロゲナーゼと呼ばれる酵素を利用し、窒素固定をもたらす。例えば、根粒菌は、マメ科植物の根粒内で定着した後に窒素を固定するシアゾ栄養細菌である。窒素固定研究の重要な目標は、この表現型を非マメ科植物、特にコムギ、イネ、及びトウモロコシなどの重要な農学的な草本に拡張することである。しかしながら、根粒菌とマメ科植物との間の窒素固定共生関係の発達の理解において顕著な進歩が遂げられたにもかかわらず、その知識を使用して、非マメ科作物において窒素固定瘤を誘発させる目処は依然として立っていない。

40

【0007】

結果として、大多数の現代的な条播作物農業は、資源集約的で環境的に有害なハーバーボッシュ法を介して生産される窒素肥料を利用する。例えば、USDAは、米国における

50

平均的なトウモロコシ農業従事者が典型的に、1エーカー当たり130～200lbの窒素（146～224kg/ha）を施用すると述べている。この窒素は、資源集約的な合成プロセスで生産されるだけでなく、圃場の土壌を横断し/それに衝撃を与え、石油を燃焼し、何時間もの人間の労働を必要とする重機械によって施用される。

【0008】

さらに、工業用ハーバー・ボッシュ法によって生成された窒素肥料は、対象作物によって十分に利用されていない。雨、排水、熱、揮発、及び土壌マイクロバイームは、施用された化学肥料を劣化させる。これでは、お金を無駄にするだけでなく、収穫高が増えるどころか、汚染を増やすことにもなる。このために、国際連合は、80%近い肥料が、作物がそれを利用することができる前に失われると算出している。結果として、現代的な農業用肥料の生産及び送達は、環境に有害なだけでなく、極めて非効率的でもある。

10

【0009】

世界の増大し続ける食料供給のニーズを満たしながらも、同時に資源利用との均衡を保ち、環境システムへの影響を最小化するために、窒素固定及び植物への窒素送達に向けたより良好な手法が緊急に必要とされている。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0010】

本開示は、作物に持続的に生物学的に固定されたNを供給できるだけでなく、農業従事者に作物の収穫高の一貫性及び予測性を高めることができる微生物/組成/及び方法を教えることで、世界の農業における主要な問題を解決する。したがって、本開示は、現代の農業にプラットフォームを提供するものであり、これまでの有害な合成固定窒素から脱却し、作物へのN供給のための新パラダイムを採用することで、従来のN供給プロセスに比べて多くの利点がある。本明細書で詳述するように、本開示は、微生物、及び微生物を投与方法を提供し、これは、農業従事者の栽培面積全体での収穫高の一貫性を高めることにつながる。大規模なデータセット（31の農場からの300万を超えるデータポイント）で実証されているこの収穫高の一貫性の向上（例えば、収穫高のばらつきの減少）により、農業従事者は、土壌、天気、または環境に関係なく、耕作中の各エーカーに何を植えるかについてより自信を持つことができる。本開示の微生物及び方法によって可能になった収穫高の一貫性及び予測可能性の劇的な進歩により、ビジネスを行うための新たな方法が登場する（例えば、作物のマーケティング、または作物の保険の購入）、これは開示のデータによって示されるように、非常に不均一な作物収穫高をもたらす、これまでの合成N送達に基づいては実現可能ではなかったものである。

20

30

【0011】

いくつかの実施形態では、複数の作物収穫高の一貫性を改善するための方法は、複数の作物及び複数のリモデリングされた窒素固定微生物を場所に提供することを含む。リモデリングされた窒素固定微生物は、作物の根圏にコロニーを形成し、固定Nを供給する。該場所全体で測定された平均収穫高の標準偏差は、1エーカー当たりのブッシュで、該場所に対照の複数の作物が提供される場合、対照の複数の作物と比較して、窒素固定微生物によってコロニー形成された複数の作物についてより低くなる。

40

【0012】

いくつかの実施形態では、作物の対照セットと比較して農業場所において、収穫高の一貫性が改善された複数の作物は、複数のリモデリングされた窒素固定微生物と関連した複数の作物を含み、それにより、該複数の作物が、それらの植物内固定Nの少なくとも1%をリモデリングされた微生物から受け取る。該場所全体で測定された平均収穫高の標準偏差は、1エーカー当たりのブッシュで、該場所に対照の複数の作物が提供される場合、対照の複数の作物と比較して、窒素固定微生物と関連する複数の作物についてより低くなる。

【0013】

いくつかの実施形態では、細菌コロニー形成植物の収穫高値に基づいて販売する作物の

50

量を決定するためのプロセッサ実施方法は、プロセッサを介して、及びプロセッサに動作可能に結合されたデータベースから、細菌コロニー形成植物の収穫高値を取得することを含む。収穫高値には、細菌がコロニー形成していない植物の収穫高値の標準偏差よりも低い、関連する標準偏差を有する。この方法はまた、プロセッサを介して、及びプロセッサに動作可能に結合されたデータベースから、ある量の作物の現在及び将来の販売に関連する価格を取得することを含む。プロセッサは、細菌コロニー形成植物の収穫高値と現在及び将来の販売価格に基づいて、細菌コロニー形成植物の物理的送達量を計算する。市場ベース商品は、細菌コロニー形成植物の計算された物理的送達量に基づいて識別する。プロセッサは、識別された市場ベース商品を取引するための命令を表す信号を送信する。識別された市場ベース商品を取引するための命令を送信することに応答して、信号がプロセッサで受信され、その信号は、識別された市場ベース商品の取引の確認を表す。

10

【0014】

いくつかの実施形態では、保険商品の価格設定及び取引のためのプロセッサ実装方法は、提案された保険商品に関する情報をプロセッサを介して受信することを含む。プロセッサは、細菌コロニー形成植物の収穫高値に基づいて、提案された保険商品の価格を計算する。収穫高値には、細菌がコロニー形成していない植物の収穫高値の標準偏差よりも低い、関連する標準偏差を有する。

【0015】

いくつかの実施形態では、商品の価値を高める方法は、栄養素供給微小生物の存在下で商品を栽培することによって商品の収穫高のばらつきを減らすことを含む。

20

【0016】

いくつかの実施形態では、商品の保険費用を低減する方法は、栄養素供給微小生物の存在下で商品を栽培することにより、商品の収穫高のばらつきを低減させることを含む。

【図面の簡単な説明】

【0017】

【図1A】複数の実施形態に従った、誘導型微生物リモデリングプロセスの概要を図示する。

【図1B】図1Aに示されるようなマイクロバイーム組成の測定の拡大図を図示する。

【図1C】教示される誘導型微生物リモデリング(GMR)プラットフォームと比較していくつかの欠点を有する、問題のある「慣習的なバイオプロスペクティング」手法を図示する。

30

【図1D】教示される誘導型微生物リモデリング(GMR)プラットフォームと比較していくつかの欠点を有する、問題のある「バイオプロスペクティングに向けた圃場ファーストアプローチ」システムを図示する。

【図1E】植物によって窒素が最も必要とされる、トウモロコシ成長周期における時間枠を図示する。

【図1F】リモデリングされた微生物のための圃場開発プロセスの概要を図示する。

【図1G】誘導型微生物リモデリングプラットフォーム実施形態の概要を図示する。

【図1H】計算誘導型(computationally-guided)微生物リモデリングプラットフォームの概要を図示する。

40

【図1I】誘導型微生物リモデリングプラットフォームの態様におけるモデリングと組み合わせられた圃場データの使用を図示する。

【図1J】本開示のリモデリングされた微生物が持つことのできる5つの特性を図示する。

【図1K】微生物PBC6.1のためのリモデリング手法の概略図を図示する。

【図1L】リモデリングされた微生物における内因性窒素調節から切り離されたnifA発現を図示する。

【図1M】リモデリングされた微生物による固定窒素の改善された同化及び排出を図示する。

【図1N】リモデリングされた微生物に起因するトウモロコシ収穫高の改善を図示する。

50

【図10】施肥不足の圃場、過剰施肥された圃場、及び環境的に有害な窒素流出をもたらす、現行の窒素送達システムの非効率性を例示する。

【図2】PBC6.1が、根付随微生物叢のほぼ21%存在量までトウモロコシ根でコロニー形成することを示す。存在量データは、PBC6.1を接種し、温室条件で栽培したトウモロコシ植物の根圏及び内圏の16Sアンプリコン配列決定に基づいている。

【図3】A~Eは、高硝酸塩農業土壌と同様の条件下で、*in vitro*で窒素を固定及び排出する誘導体微生物を示す。Aは、PBC6.1における窒素固定及び同化を制御する調節ネットワークが示されていることを示し、主要なノードNifL、NifA、GS、2ドメインATase-AR酵素として示されるGlnE、及びAmtBを含む。Bは、Kosakonia sacchari単離株PBC6.1のゲノムが示されていることを示す。ゲノムに外接する3つのトラックは、PBC6.1、PBC6.38からの転写データ、及びそれぞれの菌株間の差次的発現を伝達する。Cは、窒素固定遺伝子クラスターを示しており、転写データは、より詳細に拡張されている。Dは、様々な濃度の外因性窒素下でのニトロゲナーゼ活性がアセチレン還元アッセイで測定されることを示す。野生型菌株は、グルタミン濃度が増加するにつれてニトロゲナーゼ活性の抑制を示すが、誘導体菌株は、さまざまな程度の堅牢性を示す。線グラフでは、三角形はPBC6.22菌株を表し、円はPBC6.1菌株を表し、四角はPBC6.15菌株を表し、ひし形はPBC6.14菌株を表す。エラーバーは、少なくとも3つの生物学的複製の平均の標準誤差を表す。Eは、誘導体菌株によるアンモニアの一時的な排出がmM濃度で観察されることを示す。野生型株は固定窒素を排出することが観察されておらず、ごくわずかなアンモニアが培地に蓄積する。エラーバーは、平均の標準誤差を表す。

10

20

【図4】PBC6.1の誘導体菌株におけるnifAの転写率が、アセチレン還元速度と相関していたことを示す。ARAアッセイを、「方法」に記載の通りに実施し、その後、培養物を試料採取し、qPCR分析にかけて、nifA転写物レベルを決定した。エラーバーは、各測定値における少なくとも3つの生物学的複製の平均の標準誤差を示す。

【図5】A~Cは、トウモロコシにおける微生物の窒素固定を実証する温室実験を示す。Aは、PBC6.1誘導体菌株によるトウモロコシ植物の接種の6週間後の微生物コロニー形成を示す。エラーバーは、少なくとも8つの生物学的複製の平均の標準誤差を示す。Bは、根からの全RNAの抽出、及びその後のNanostRING分析によって測定されたnifHの植物内転写を示す。誘導体菌株のみが根の環境でnifH転写を示す。エラーバーは、少なくとも3つの生物学的複製の平均の標準誤差を示す。Cは、植物組織における同位体トレーサーの希釈によって測定された微生物の窒素固定を示す。誘導体微生物は、固定窒素の植物への実質的な移動を示す。エラーバーは、少なくとも10の生物学的複製の平均の標準誤差を示す。

30

【図6】CI006菌株に由来する改変菌株の系統を示す。

【図7】CI019菌株に由来する改変菌株の系統を示す。

【図8】mmol窒素/微生物-時間による生重量1g当たりの微生物の関数として記録された、本開示の微生物による1エーカー-季節当たりの送達された窒素のポンドのヒートマップを示す。より大きな画像を横切る細線の下方は、1エーカー-季節当たり1ポンド未満の窒素を送達する微生物であり、この線の上方は、1エーカー-季節当たり1ポンドよりも多くの窒素を送達する微生物である。ヒートマップの下の表には、ヒートマップに示された各微生物の生重量1g当たりの正確なCFU(CFU/gfw)とともに、1時間当たり1微生物当たりの産生されたmmolNの正確な値(mmolN/微生物時間)が示されている。ヒートマップで利用した微生物を、トウモロコシのN生成についてアッセイした。WT菌株CI006及びCI019の場合、トウモロコシ根コロニー形成データを、単一の圃場サイトから得た。残りの菌株の場合、コロニー形成は、WT圃場レベルと同じであると仮定した。N固定活性を、5mMグルタミンでの*in vitro*ARAアッセイを使用して決定した。

40

【図9】CI006菌株に曝露された植物の植物収穫高を示す。円の面積は、相対的収穫高に対応し、濃淡は、特定のMRTN処理に対応する。x軸はp値であり、y軸は成功率

50

である。

【図10】CM029菌株に曝露された植物の植物収穫高を示す。円の面積は、相対的収穫高に対応し、濃淡は、特定のMRTN処理に対応する。x軸はp値であり、y軸は成功率である。

【図11】CM038菌株に曝露された植物の植物収穫高を示す。円の面積は、相対的収穫高に対応し、濃淡は、特定のMRTN処理に対応する。x軸はp値であり、y軸は成功率である。

【図12】CI019菌株に曝露された植物の植物収穫高を示す。円の面積は、相対的収穫高に対応し、濃淡は、特定のMRTN処理に対応する。x軸はp値であり、y軸は成功率である。

【図13】CM081菌株に曝露された植物の植物収穫高を示す。円の面積は、相対的収穫高に対応し、濃淡は、特定のMRTN処理に対応する。x軸はp値であり、y軸は成功率である。

【図14】CM029及びCM081菌株に曝露された植物の植物収穫高を示す。円の面積は、相対的収穫高に対応し、濃淡は、特定のMRTN処理に対応する。x軸はp値であり、y軸は成功率である。

【図15】集計したブッシュ増加/喪失として植物の植物収穫高を示す。円の面積は、相対的収穫高に対応し、濃淡は、特定のMRTN処理に対応する。x軸はp値であり、y軸は成功率である。

【図16】2017年夏の圃場試験実験の結果を示す。得られた収穫高の結果は、本開示の微生物が、潜在的な肥料置換物としての役目を果たすことができることを実証する。例えば、本開示の微生物(すなわち、6-403)の利用は、野生型菌株(WT)より高い収穫高及び未処理対照(UTC)よりも高い収穫高をもたらした。「-251b N」処理では、その地域の標準的農業慣行よりも1エーカー当たり251b少ないNが使用される。「100% N」UTC処理は、その地域の標準的農業慣行を示すことが意図されており、Nの標準的使用の100%が、農業従事者により配置される。微生物「6-403」は、NCMA201708004として寄託され、表1に見出すことができる。これは、突然変異体*Kosakonia sacchari*(CM037とも呼ばれる)であり、CI006 WTに由来する後代突然変異体菌株である。

【図17】2017年夏の圃場試験実験の結果を示す。得られた収穫高の結果は、本開示の微生物が、栽培地(location)全体にわたって一貫して性能を発揮することを実証する。さらに、収穫高の結果は、本開示の微生物が、窒素ストレス環境ならびに十分な窒素供給を有する環境の両方で良好な性能を発揮することを実証する。微生物「6-881」(CM094、PBC6.94としても知られている)は、CI006 WTに由来する後代突然変異体*Kosakonia sacchari*菌株であり、NCMA201708002として寄託され、表1に見出すことができる。微生物「137-1034」は、CI137 WTに由来する後代突然変異体*Klebsiella variicola*菌株であり、NCMA201712001として寄託され、表1に見出すことができる。微生物「137-1036」は、CI137 WTに由来する後代突然変異体*Klebsiella variicola*菌株であり、NCMA201712002として寄託され、表1に見出すことができる。微生物「6-404」(CM38、PBC6.38としても知られている)は、CI006 WTに由来する後代突然変異体*Kosakonia sacchari*菌株であり、NCMA201708003として寄託され、表1に見出すことができる。「栄養ストレス」条件は、0%窒素管理体制に相当する。「十分な肥料」条件は、100%窒素管理体制に相当する。

【図18】菌株CI006(「6」、*Kosakonia sacchari* WTとも名付けられている)に由来する改変菌株の系統を示す。

【図19】菌株CI019(「19」、*Rahnella aquatilis* WTとも名付けられている)に由来する改変菌株の系統を示す。

【図20】菌株CI137(「137」、*Klebsiella variicola*

10

20

30

40

50

WTとも名付けられている)に由来する改変菌株の系統を示す。

【図21】菌株1021 (*Kosakonia pseudosacchari* WT)に由来する改変菌株の系統を示す。

【図22】菌株910 (*Kluyvera intermedia* WT)に由来する改変菌株の系統を示す。

【図23】菌株63 (*Rahnella aquatilis* WT)に由来する改変菌株の系統を示す。

【図24】mmol窒素/微生物-時間による生重量1g当たりの微生物の関数として記録された、本開示の微生物による1エーカー-季節当たりの送達された窒素のポンドのヒートマップを示す。より大きな画像を横切る細線の下方は、1エーカー-季節当たり1ポンド未満の窒素を送達する微生物であり、この線の上方は、1エーカー-季節当たり1ポンドよりも多くの窒素を送達する微生物である。実施例5の表28は、ヒートマップに示されている各微生物の生重量1グラム当たりの正確なCFU (CFU/g fw)と共に、1時間当たり1微生物当たりの産生されたmmol Nの正確な値 (mmol N/微生物-時間)を示している。図24のデータは、圃場条件におけるトウモロコシ中のN産生をアッセイした微生物菌株に由来する。各点は、単一の圃場サイトからのトウモロコシ根コロニー形成データを使用した、微生物により産生されたlb N/エーカーを表わす。N固定活性を、グルタミンまたはリン酸アンモニウムの形態の5mM Nでの*in vitro* ARAアッセイを使用して決定した。

10

【図25】mmol窒素/微生物-時間による生重量1g当たりの微生物の関数として記録された、本開示の微生物による1エーカー-季節当たりの送達された窒素のポンドのヒートマップを示す。より大きな画像を横切る細線の下方は、1エーカー-季節当たり1ポンド未満の窒素を送達する微生物であり、この線の上方は、1エーカー-季節当たり1ポンドよりも多くの窒素を送達する微生物である。実施例5の表29は、ヒートマップに示されている各微生物の生重量1グラム当たりの正確なCFU (CFU/g fw)と共に、1時間当たり1微生物当たりの産生されたmmol Nの正確な値 (mmol N/微生物-時間)を示している。図25のデータは、実験室及び温室条件におけるトウモロコシ中のN産生をアッセイした微生物菌株に由来する。各点は、単一の菌株により産生されたlb N/エーカーを表わす。白色点は、トウモロコシ根コロニー形成データが温室条件で収集された菌株を表わす。黒色点は、トウモロコシ根コロニー形成レベルが、野生型親菌株の平均圃場トウモロコシ根コロニー形成レベルから導き出されている突然変異体菌株を表わす。斜線付き点は、平均圃場トウモロコシ根コロニー形成レベルの野生型親菌株を表わす。全ての場合で、N固定活性は、グルタミンまたはリン酸アンモニウムの形態の5mM Nでの*in vitro* ARAアッセイによって決定した。

20

30

【図26】土壌中の生物学的N₂固定システムの種類、エネルギー源、及び固定能力を示す。

【図27】成長期におけるトウモロコシ植物の窒素必要量を示す。窒素固定微生物が、トウモロコシ植物に成長期全体にわたる窒素必要量をすべて供給し、合成肥料に完全に取って代わるためには、微生物は(全体で)1エーカー当たり約200ポンドの窒素を生産する必要がある。また、図27は、菌株PBC 137-1036 (すなわち、リモデリングされた*Klebsiella variicola*)が1エーカー当たり約20ポンドの窒素を供給することを示す。

40

【図28A】肥料が本開示のリモデリングされた微生物によって置き換えられ得るシナリオを提供する。図27で前述したように、大きな破線はトウモロコシが必要とする窒素(1エーカー当たり約200ポンド)である。実線は、すでに説明したように、リモデリングされた137-1036菌株によって供給できる現在の窒素量である(1エーカー当たり約20ポンド)。「A」パブルのシナリオでは、本発明者らは、137-1036菌株の活性を5倍に高めることを期待している(そのようなことを達成するためのGMRCAMP戦略については、図29を参照)。「B」シナリオにおいて、本発明者らは、137-1036菌株のものと相補的であり、成長サイクルの後期の段階で植物に窒素を供

50

給する特定のコロニー形成プロファイルを有するリモデリングされた微生物を利用することを期待する。

【図 28 B】は、暫定適用時からの菌株 137 - 1036 による窒素生成と比較した、本適用時のさらにリモデリングされた菌株 137 - 3890 による窒素生成を示す。破線は、成長期を通してのトウモロコシ植物の窒素必要量を示す。

【図 29 A】PBC6 . 1 (*Kosakonia sacchari*) の GMR キャンペーンに関して使用された遺伝的機能 (すなわち、非属間遺伝子改変) を示す。見てわかるように、生成される予測される N (ポンドの N / エーカー) は、微生物菌株に導入操作された追加の機能ごとに増加した。図 29 A に示した PBC6 . 1 の GMR キャンペーンに加えて、PBC137 (*Klebsiella variicola*) に対しても GMR キャンペーンが実施されていることがわかる。仮出願の時点で、ニトロゲナーゼ発現機能 (F1) は宿主菌株に導入操作されていた。機能 2 ~ 6 が実行されており、仮出願が提出された時点で生成された N への期待される寄与 (1 エーカー当たりの N のポンド) は、破線の棒グラフで示されている。これらの期待は、PBC6 . 1 GMR キャンペーンからのデータによって通知された。図 28 A シナリオ「A」に見られるように、PBC137 で GMR キャンペーンが完了すると、非属間リモデリング菌株 (全体として、1 エーカー内の全ての微生物 / コロニー形成植物を考慮する) は、植物の初期成長サイクルを通じて、トウモロコシ植物に必要な窒素のほぼすべてを供給できると予想される。

【図 29 B】PBC6 . 1 (*Kosakonia sacchari*) の GMR キャンペーンに関して使用された遺伝的機能 (すなわち、非属間遺伝子改変) を示す。見てわかるように、生成される予測される N (ポンドの N / エーカー) は、微生物菌株に導入操作された追加の機能ごとに増加した。図 29 A に示した PBC6 . 1 の GMR キャンペーンに加えて、PBC137 (*Klebsiella variicola*) に対しても GMR キャンペーンが実施されていることがわかる。現在、機能 F1 ~ F3 は宿主菌株に導入操作され、機能 F4 ~ F6 が実行されている。図 28 A シナリオ「A」に見られるように、PBC137 で GMR キャンペーンが完了すると、非属間リモデリング菌株 (全体として、1 エーカー内の全ての微生物 / コロニー形成植物を考慮する) は、植物の初期成長サイクルを通じて、トウモロコシ植物に必要な窒素のほぼすべてを供給できると予想される。

【図 30 A】図 29 A に提示されたものと同じ期待を示し、期待される窒素生成量の増加を該当する機能セットにマッピングする。

【図 30 B】F1 (ニトロゲナーゼ発現)、F2 (窒素同化)、及び F3 (アンモニウム排出) の機能を組み込んだ場合の、PBC137 のリモデリング菌株による 1 時間当たりの N 生成量を mmol の N / CFU として表したものである。

【図 31】137 - 1036 の非属リモデリング微生物の、コロニー形成日数 1 ~ 130 日目及び 1 エーカー当たりの総 CFU を表したものである。

【図 32】提案された非属間リモデリング微生物 (137 - 1036 の子孫、提案された遺伝子改変機能については図 29 及び図 30 を参照) の、コロニー形成日数 1 ~ 130 日及び 1 エーカー当たりの総 CFU を表したものである。

【図 33】137 - 1036 微生物に対して相補的なコロニー形成プロファイルを有する提案された非属間リモデリング微生物の、コロニー形成日数 1 ~ 130 日及び 1 エーカー当たりの総 CFU を表したものである。前述のように、この微生物は、1 エーカー当たり約 100 ポンドの窒素 (全体で) を生成すると予想され (図 28 のシナリオ「B」)、137 - 1036 微生物が減少し始めるのとほぼ同時にコロニー形成を開始する必要がある。

【図 34】上部パネルに 137 - 1036 のコロニー形成プロファイルを提供し、下部パネルに後期段階 / 相補的コロニー形成ダイナミクスを伴う微生物のコロニー形成プロファイルを提供する。

【図 35】2 つのシナリオを示している: (1) 描写されたコロニー形成プロファイルを有する非属間リモデリング微生物の提案されたコンソーシアの、コロニー形成日数 1 ~ 130 日及び 1 エーカー当たりの総 CFU、または (2) 示されたコロニー形成プロファイ

10

20

30

40

50

ルを有する、提案された単一の非属間リモデリング微生物の、コロニー形成日数 1 ~ 130 日及び 1 エーカー当たりの総 CFU。

【図 36】実施例 9 で利用された一般的な実験計画を示しており、これは、10 週間にわたってトウモロコシからコロニー形成及び転写物試料を収集することを必要とした。これらの試料は、微生物のコロニー形成能力、及び微生物の活性の計算を可能にした。

【図 37】実施例 9 で利用されるサンプリングスキームの態様の視覚的表現を提供し、これにより、「標準」の種子・節根 (seminal node root) 試料と、より「周辺」の根試料との間のコロニー形成パターンの区別が可能になる。

【図 38】実施例 9 で利用されるサンプリングスキームの態様の視覚的表現を提供する。

【図 39】WT 137 (*Klebsiella variicola*)、019 (*Rahnella aquatilis*)、及び 006 (*Kosakonia sacchari*) のいずれも、同様のコロニー形成パターンを有することを示している。 10

【図 40】実施例 9 のトウモロコシの根をサンプリングするために利用される実験スキームを示している。プロット：各正方形は時点であり、Y 軸は距離であり、X 軸はノードである。標準試料は、常に成長の最先端部とともに収集した。周辺試料と中間試料を週ごとに変更したが、一貫性を保つための試みは実施した。

【図 41】図 40 のサンプリング方式で取得された全てのデータを利用及び平均化した、実施例 9 の全体的な結果を示す。図 41 から分かるように、菌株 137 は菌株 6 または菌株 19 よりも末梢根で高いコロニー形成を維持する。「標準試料」は、他の根の栽培地の試料と比較した場合、この菌株の最も代表的なものであった。 20

【図 42】本開示の微生物が、該微生物に曝露されたトウモロコシ作物の圃場内変動の低減を可能にし、それが農業従事者の収穫高安定性の改善につながることを示す NDVI データを示す。

【図 43】8 つのリモデリングされた細菌株から排出されたアンモニウムの量を示す。菌株 137 - 1036 は、1 エーカー当たり 22.15 ポンドの窒素を生成すると推定される。菌株 137 - 2084 は、1 エーカー当たり 38.77 ポンドの窒素を生成すると推定される。菌株 137 - 2219 は、1 エーカー当たり 75.74 ポンドの窒素を生成すると推定される。

【図 44】データ収集（この農場で分析された 299,460 のデータポイント）及び収穫の品質管理を示しており、137 - 1036 または標準的農業規範で処理された圃場の例のモニターデータを組み合わせている。収穫コンバインの速度が安定していないデータは削除され、フィールドプロット画像に白いギャップとして示されている。 30

【図 45】単一の農場での収穫高の分布プロットの例を示す。リモデリング微生物 137 - 1036 で処理した農場面積の標準偏差 (32.2 収穫高 標準偏差 bu / エーカー) は、137 - 1036 を利用せず、むしろ、栽培者標準規範 (GSP)、すなわち合成 N 応用のみを利用した「対照」農場 (47.3 収穫高 標準偏差 bu / エーカー) と比較して、収穫高の標準偏差が低かった。

【図 46】単一の農場での収穫高の分布プロットの例を示す。リモデリング微生物 137 - 1036 で処理した農場面積の標準偏差 (34.3 収穫高 標準偏差 bu / エーカー) は、137 - 1036 を利用せず、むしろ、栽培者標準規範 (GSP)、すなわち合成 N 応用のみを利用した「対照」農場 (47.2 収穫高 標準偏差 bu / エーカー) と比較して、収穫高の標準偏差が低かった。 40

【図 47】単一の農場での収穫高の分布プロットの例を示す。リモデリング微生物 137 - 1036 で処理した農場面積の標準偏差 (33.7 収穫高 標準偏差 bu / エーカー) は、137 - 1036 を利用せず、むしろ、栽培者標準規範 (GSP)、すなわち合成 N 応用のみを利用した「対照」農場 (42.7 収穫高 標準偏差 bu / エーカー) と比較して、収穫高の標準偏差が低かった。

【図 48】単一の農場での収穫高の分布プロットの例を示す。リモデリング微生物 137 - 1036 で処理した農場面積の標準偏差 (17.4 収穫高 標準偏差 bu / エーカー) は、137 - 1036 を利用せず、むしろ、栽培者標準規範 (GSP)、すなわち合成 N 50

応用のみを利用した「対照」農場（26.0 収穫高 標準偏差 bu / エーカー）と比較して、収穫高の標準偏差が低かった。

【図49】農場による137-1036処理及び未処理（栽培者標準規範）管理間の収穫高の一貫性の改善とばらつきを減少を示す。農場の64%は、0.8~15.1 bu / エーカーの範囲のより小さな標準偏差で改善を示す。青いバーは有意差を示し、灰色のバー（アスタリスク）は差が有意ではなかったことを示す。

【図50】いくつかの実施形態による、金融商品及び保険商品の取引のためのシステム図である。

【図51】いくつかの実施形態による、細菌コロニー形成植物の収穫高値に基づいて販売する作物の量を決定するための方法を示す流れ図である。

【図52】いくつかの実施形態による、細菌コロニー形成植物の収穫高値に基づいて、保険商品保険証券の価格設定及び取引を行うための方法を示す流れ図である。

【発明を実施するための形態】

【0018】

本開示の種々の実施形態が本明細書に示され、説明されているが、そのような実施形態が例として提供されるにすぎないことは、当業者には明白であろう。本開示から逸脱することなく多数の変形、変更、及び置換が当業者に想到され得る。本明細書に記載の本開示の実施形態に対する種々の代替例が用いられてもよいことを理解されたい。

【0019】

肥料使用の増加は、それと共に環境上の懸念をもたらし、また、多くの経済的苦境にある地球上の地域では可能でない可能性が高い。さらに、出願人は、合成肥料を使用して作物に窒素などの栄養素を供給することが、高レベルの不均一性を生じ得、その結果、農業従事者が作物の収穫高を予測できなくなる可能性があることを示している。

【0020】

本開示は、出願人が現在、本明細書で提供される窒素固定微生物などの植物関連微生物を使用して作物の栄養素を供給することによって、作物の収穫高の不均一性を減少させることができることを実証するように、前述の問題を解決する。さらに、教示される微生物は、21世紀の農業従事者が、かつてなく増加している量の外因性窒素肥料の利用により依存しなくなるよう助ける役目を果たすであろう。

【0021】

定義

本開示を説明する文脈における（特に以下の特許請求の範囲の文脈における）用語「a」及び「an」及び「the」ならびに同様の指示語の使用は、本明細書において別段の指示がない限り、または文脈に明らかに矛盾するものでない限り、単数及び複数の両方を網羅すると解釈されるべきである。「備える」、「有する」、「含む」、及び「含有する」という用語は、別様が述べられない限り、オープンエンド用語（すなわち、「含むがそれに限定されない」ことを意味する）であると解釈されるべきである。本明細書の値の範囲の列挙は、本明細書で別様が示されない限り、単に、範囲内に収まるそれぞれの別個の値を個々に指す速記方法としての役割を果たすことが意図され、それぞれの別個の値は、本明細書に個々に列挙されるかのように、本明細書に組み込まれる。例えば、10~15の範囲が開示されている場合、11、12、13、14も開示されている。本明細書に記載される全ての方法は、本明細書に別様が示されない限り、または文脈によって別様が明らかに矛盾しない限り、任意の好適な順序で実行され得る。本明細書に提供される例の一部及び全ての例または例示的な言語（例えば、「~など」）の使用は、単に本開示を良好に例示することを意図しており、別段の主張がない限り、本開示の範囲を限定するものではない。本明細書のいかなる言葉も、本開示の実施にとって必須として任意の請求されていない要素を示すものと解釈されるべきではない。

【0022】

用語「ポリヌクレオチド」、「ヌクレオチド」、「ヌクレオチド配列」、「核酸」、及び「オリゴヌクレオチド」は、相互交換可能に使用される。それらは、デオキシリボヌク

10

20

30

40

50

レオチドまたはリボヌクレオチドのいずれかの、任意の長さのヌクレオチドのポリマー形態、またはそれらの類似体を指す。ポリヌクレオチドは、あらゆる3次元構造も有してもよく、公知か未知かに関わらず、あらゆる機能を発揮してもよい。ポリヌクレオチドの非限定的な例としては、下記：遺伝子または遺伝子断片のコードまたは非コード領域、連鎖解析で規定された遺伝子座、エキソン、イントロン、メッセンジャーRNA (mRNA)、トランスファーRNA (tRNA)、リボソームRNA (rRNA)、低分子干渉RNA (siRNA)、短鎖ヘアピンRNA (shRNA)、マイクロRNA (miRNA)、リボザイム、cDNA、組換えポリヌクレオチド、分岐ポリヌクレオチド、プラスミド、ベクター、任意の配列の単離されたDNA、任意の配列の単離されたRNA、核酸プローブ、及びプライマーが挙げられる。ポリヌクレオチドは、メチル化ヌクレオチド及びヌクレオチド類似体などのうちの1つ以上の改変ヌクレオチドを含んでもよい。ヌクレオチド構造への改変は、存在する場合、ポリマー構築の前に付与されてもよく、または後に付与されてもよい。ヌクレオチドの配列は、非ヌクレオチド成分により中断されてもよい。ポリヌクレオチドは、標識成分とのコンジュゲーションなどによって、重合後にさらに改変されてもよい。

10

【0023】

「ハイブリダイゼーション」は、1つ以上のポリヌクレオチドを反応させて、ヌクレオチド残基の塩基間の水素結合により安定化される複合体を形成する反応を指す。水素結合は、ワトソン-クリック型塩基対により生じてもよく、フーグスティン結合により生じてもよく、または塩基相補性による任意の他の配列特異的様式で生じてもよい。複合体は、二本鎖構造を形成する2本の鎖、複数鎖複合体を形成する3本以上の鎖、単一の自己ハイブリダイズ鎖、またはそれらの任意の組合せを含んでもよい。ハイブリダイゼーション反応は、PCRの開始、またはエンドヌクレアーゼによるポリヌクレオチドの酵素切断などの、より広範なプロセスのステップを構成してもよい。第1の配列に相補的な第2の配列は、第1の配列の「相補体」と呼ばれる。用語「ハイブリダイズ可能な」は、ポリヌクレオチドに適用される場合、ポリヌクレオチドが、ハイブリダイゼーション反応にて、ヌクレオチド残基の塩基間の水素結合により安定化される複合体を形成する能力を指す。

20

【0024】

「相補性」は、核酸が、従来のワトソン-クリック型または他の非従来型のいずれかにより別の核酸配列と水素結合(複数可)を形成する能力を指す。相補性パーセントは、第2の核酸配列と水素結合(例えば、ワトソン-クリック型塩基対)を形成することができる、核酸分子中の残基のパーセントを示す(例えば、10個のうち5、6、7、8、9、10個は、それぞれ50%、60%、70%、80%、90%、及び100%相補性である)。「完全に相補的」は、核酸配列の隣接残基が全て、第2の核酸配列中の同数の隣接残基と水素結合することになることを意味する。「実質的に相補的」は、本明細書で使用される場合、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、30、35、40、45、50個、またはそれよりも多くのヌクレオチドの領域にわたって、少なくとも60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%、または100%である相補性の度合いを指すか、またはストリンジентな条件下でハイブリダイズする2つの核酸を指す。相補性パーセントを評価する目的のためなどの配列同一性は、これらに限定されないが、Needleman-Wunschアルゴリズム(例えば、www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/nucleotide.htmlで入手可能なEMBOSS Needleアライナーを参照。任意選択で初期設定を使用してもよい)、BLASTアルゴリズム(例えば、blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgiで入手可能なBLASTアラインメントツールを参照。任意選択で初期設定を使用してもよい)、またはSmith-Watermanアルゴリズム(例えば、www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_water/nucleotide.htmlで入手可能なEMBOSS Waterアライナーを参照。任意選択で初期設定を使用してもよい)を含む任意の好適なアラ

30

40

50

インメントアルゴリズムにより測定することができる。デフォルトパラメータを含む、選択したアルゴリズムの任意の好適なパラメータを使用して、最適なアラインメントを評価することができる。

【0025】

一般的に、ハイブリダイゼーションのための「ストリンジェントな条件」は、標的配列との相補性を有する核酸が、主に標的配列とハイブリダイズするが、非標的配列とは実質的にハイブリダイズしない条件を指す。ストリンジェントな条件は、一般的に配列依存性であり、いくつかの要因に応じて様々である。一般的に、配列が長いほど、その配列がその標的配列と特異的にハイブリダイズする温度は高くなる。ストリンジェントな条件の非限定的な例は、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. に詳細に記載されている。

10

【0026】

本明細書で使用される場合、「発現」は、ポリヌクレオチドがDNA鋳型から(mRNAまたは他のRNA転写物へなど)転写されるプロセス、及び/または転写されたmRNAが引き続きペプチド、ポリペプチド、もしくはタンパク質へと翻訳されるプロセスを指す。転写物及びコードポリペプチドは、「遺伝子産物」と総称される場合がある。ポリヌクレオチドが、ゲノムDNAに由来する場合、発現は、真核細胞でのmRNAスプライシングを含む場合がある。

20

【0027】

用語「ポリペプチド」、「ペプチド」、及び「タンパク質」は、本明細書では相互交換可能に使用され、任意の長さのアミノ酸のポリマーを指す。ポリマーは、直鎖であってもよくまた分岐していてもよく、改変アミノ酸を含んでもよく、非アミノ酸により中断されてもよい。また、これら用語は、改変されているアミノ酸ポリマー、例えば、ジスルフィド結合形成、グリコシル化、脂質化、アセチル化、リン酸化、または標識成分とのコンジュゲーションなどの任意の他の操作を包含する。用語「アミノ酸」は、本明細書で使用される場合、グリシン及びDまたはLの両光学異性体を含む天然及び/または非天然または合成アミノ酸、ならびにアミノ酸類似体及びペプチド模倣体を含む。

30

【0028】

本明細書で使用される場合、用語「約」は、用語「およそ」と同義的に使用される。例示的には、量に関する用語「約」の使用は、数値が、言及されている数値のわずかに外側にあること、例えば、プラスまたはマイナス0.1%~10%であることを示す。

【0029】

用語「生物学的に純粋な培養物」または「実質的に純粋な培養物」は、培養物の複製を妨げたり、または通常の細菌学的技法によって検出されたりするほどの量の他の細菌種を含まない、本明細書に記載の細菌種の培養を指す。

40

【0030】

「植物生産性」は、一般的に、植物を成長させる根拠となる植物の成長または発達のあらゆる態様を指す。穀物または野菜などの食用作物の場合、「植物生産性」は、特定の作物から収穫される穀物または果実の収穫高を指す場合がある。本明細書で使用される場合、植物生産性の向上は、穀物、果実、花、または種々の目的で収穫される他の植物部分の収穫高の向上；茎、葉、及び根を含む植物部分の成長の向上；植物成長の促進；葉における高葉緑素含有量の維持；果実数または種子数の増加；果実単位重量または種子単位重量の増加；窒素肥料使用量の削減によるNO₂排出削減；及び植物の成長及び発達の類似の向上を、幅広く指す。

【0031】

50

食用作物内及び周囲の微生物は、それらの作物の形質に影響を及ぼす場合がある。微生物により影響を受ける場合がある植物形質としては、以下のものが挙げられる：収穫高（例えば、穀物生産、バイオマス生成、果実形成、着花）；栄養（例えば、窒素、リン、カリウム、鉄、微量栄養素の獲得）；非生物ストレス管理（例えば、干ばつ耐性、耐塩性、耐熱性）；及び生物ストレス管理（例えば、有害生物、雑草、昆虫、真菌、及び細菌）。作物形質を変更するための戦略としては、以下のものが挙げられる：重要な代謝物濃度を増加させること；重要な代謝物に対する微生物影響の経時的動態を変更すること；微生物代謝物産生/分解を新しい環境的要因と関連させること；負の代謝物を減少させること；及び代謝物またはそれらの根底をなすタンパク質のバランスを向上させること。

【0032】

10

本明細書で使用される場合、「制御配列」は、オペレーター、プロモーター、サイレンサー、またはターミネーターを指す。

【0033】

本明細書で使用される場合、「植物内」は、使用状況（例えば、内生、着生、または根圏関連）に応じて、植物内、植物上、または植物と密接に関連していることを指す場合がある。植物は、植物の部分、組織、葉、根、根毛、根茎、茎、種子、胚珠、花粉、花、果実などを含み得る。

【0034】

いくつかの実施形態では、本開示の遺伝子の天然または内因性制御配列は、1つ以上の属内制御配列と置換されている。

20

【0035】

本明細書で使用される場合、「導入された」とは、自然に発生する導入ではなく、現代のバイオテクノロジーによる導入を指す。

【0036】

いくつかの実施形態では、本開示の細菌は、それらが天然に存在する細菌ではないように改変されている。

【0037】

いくつかの実施形態では、本開示の細菌は、植物の生重量または乾燥重量の1グラム当たり、少なくとも 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、または 10^{12} cfuの量で植物中に存在する。いくつかの実施形態では、本開示の細菌は、植物の生重量または乾燥重量の1グラム当たり、少なくとも約 10^3 cfu、約 10^4 cfu、約 10^5 cfu、約 10^6 cfu、約 10^7 cfu、約 10^8 cfu、約 10^9 cfu、約 10^{10} cfu、約 10^{11} cfu、または約 10^{12} cfuの量で植物中に存在する。いくつかの実施形態では、本開示の細菌は、植物の生重量または乾燥重量の1グラム当たり、少なくとも $10^3 \sim 10^9$ 、 $10^3 \sim 10^7$ 、 $10^3 \sim 10^5$ 、 $10^5 \sim 10^9$ 、 $10^5 \sim 10^7$ 、 $10^6 \sim 10^{10}$ 、 $10^6 \sim 10^7$ cfuの量で植物中に存在する。

30

【0038】

本開示の肥料及び外因性窒素は、以下の窒素含有分子を含み得る：アンモニウム、硝酸塩、亜硝酸塩、アンモニア、グルタミンなど。本開示の窒素源は、無水アンモニア、硫酸アンモニア、尿素、リン酸二アンモニウム、尿素形態、リン酸一アンモニウム、硝酸アンモニウム、窒素溶液、硝酸カルシウム、硝酸カリウム、硝酸ナトリウムなどを含み得る。

40

【0039】

本明細書で使用される場合、「外因性窒素」は、アンモニア、アンモニウム、硝酸塩、亜硝酸塩、尿素、尿酸、アンモニウム酸などを含む、非窒素制限条件下で存在する土壌、圃場、または増殖培地で容易に利用可能な非大気窒素を指す。

【0040】

本明細書で使用される場合、「非窒素制限条件」は、Kant et al. (2010, J. Exp. Biol. 62(4): 1499-1509)に開示されているような、約4 mM窒素を超える濃度で土壌、圃場、培地で利用可能な非大気窒素を指し、参照に

50

より本明細書に組み込まれる。

【0041】

本明細書で使用される場合、「属間微小生物」は、元々は異なる分類学的属の生物から単離された遺伝物質の意図的な組合せにより形成されている微小生物である。「属間突然変異」は、「属間微小生物」と相互交換可能に使用される場合がある。例示的な「属間微小生物」は、レシピエント微小生物とは異なる属の微小生物で最初に同定された可動遺伝要素を含有する微小生物を含む。さらなる説明は、特に、連邦規則集第40巻セクション725.3に見出すことができる。

【0042】

一態様では、本明細書で教示された微生物は「非属間」であり、これは、微生物が属間ではないことを意味する。

【0043】

本明細書で使用される場合、「属内微小生物」は、元々は同じ分類学的属の生物から単離された遺伝物質の意図的な組合せにより形成されている微小生物である。「属内突然変異」は、「属内微小生物」と相互交換可能に使用される場合がある。

【0044】

本明細書で使用される場合、「導入された遺伝物質」は、レシピエントのゲノムに付加され、レシピエントのゲノムの成分として残留する遺伝物質を意味する。

【0045】

本明細書で使用される場合、非属間微小生物の文脈において、「リモデリングされた」という用語は、「導入操作された」という用語と同義的に使用される。結果として、「リモデリングされた非属間微小生物」は、「導入操作された非属間微小生物」と同義を有し、互換的に利用されよう。さらに、本開示は、「導入操作された株」または「導入操作された派生物」または「導入操作された非属間微小生物」を指す場合があり、これらの用語は、「リモデリングされた菌株」または「リモデリングされた誘導體」または「リモデリングされた非属間微小生物」と同義で使用される。

【0046】

いくつかの実施形態では、窒素固定及び同化の遺伝子調節ネットワークは、遺伝子をコードするポリヌクレオチドならびに微生物の窒素固定及び/または同化を指示、調整、及び/または調節する非コード配列を含み、*nif*クラスター（例えば、*nifA*、*nifB*、*nifC*、...*nifZ*）のポリヌクレオチド配列、窒素調節タンパク質Cをコードするポリヌクレオチド、窒素調節タンパク質Bをコードするポリヌクレオチド、*gln*クラスター（例えば、*glnA*及び*glnD*）のポリヌクレオチド配列、*draT*、及びアンモニア輸送体/パーミアーズを含んでもよい。場合によっては、*Nif*クラスターは、*NifB*、*NifH*、*NifD*、*NifK*、*NifE*、*NifN*、*NifX*、*hesa*、及び*NifV*を含んでもよい。場合によっては、*Nif*クラスターは、*NifB*、*NifH*、*NifD*、*NifK*、*NifE*、*NifN*、*NifX*、*hesa*、及び*NifV*のサブセットを含んでもよい。

【0047】

いくつかの実施形態では、本開示の肥料は、重量で少なくとも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%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%の窒素を含む。

10

20

30

40

50

【 0 0 4 8 】

いくつかの実施形態では、本開示の肥料は、重量で少なくとも約 5 %、約 6 %、約 7 %、約 8 %、約 9 %、約 10 %、約 11 %、約 12 %、約 13 %、約 14 %、約 15 %、約 16 %、約 17 %、約 18 %、約 19 %、約 20 %、約 21 %、約 22 %、約 23 %、約 24 %、約 25 %、約 26 %、約 27 %、約 28 %、約 29 %、約 30 %、約 31 %、約 32 %、約 33 %、約 34 %、約 35 %、約 36 %、約 37 %、約 38 %、約 39 %、約 40 %、約 41 %、約 42 %、約 43 %、約 44 %、約 45 %、約 46 %、約 47 %、約 48 %、約 49 %、約 50 %、約 51 %、約 52 %、約 53 %、約 54 %、約 55 %、約 56 %、約 57 %、約 58 %、約 59 %、約 60 %、約 61 %、約 62 %、約 63 %、約 64 %、約 65 %、約 66 %、約 67 %、約 68 %、約 69 %、約 70 %、約 71 %、約 72 %、約 73 %、約 74 %、約 75 %、約 76 %、約 77 %、約 78 %、約 79 %、約 80 %、約 81 %、約 82 %、約 83 %、約 84 %、約 85 %、約 86 %、約 87 %、約 88 %、約 89 %、約 90 %、約 91 %、約 92 %、約 93 %、約 94 %、約 95 %、約 96 %、約 97 %、約 98 %、または約 99 %の窒素を含む。

10

【 0 0 4 9 】

いくつかの実施形態では、本開示の肥料は、重量で約 5 % ~ 50 %、約 5 % ~ 75 %、約 10 % ~ 50 %、約 10 % ~ 75 %、約 15 % ~ 50 %、約 15 % ~ 75 %、約 20 % ~ 50 %、約 20 % ~ 75 %、約 25 % ~ 50 %、約 25 % ~ 75 %、約 30 % ~ 50 %、約 30 % ~ 75 %、約 35 % ~ 50 %、約 35 % ~ 75 %、約 40 % ~ 50 %、約 40 % ~ 75 %、約 45 % ~ 50 %、約 45 % ~ 75 %、または約 50 % ~ 75 %の窒素を含む。

20

【 0 0 5 0 】

いくつかの実施形態では、窒素固定の増加及び/または植物における窒素の 1 %またはそれよりも多くの産生は、本開示の細菌に曝露していない対照植物と比較して測定される。細菌の増加または減少は全て、対照細菌と比較して測定される。植物の増加または減少は全て、対照植物と比較して測定される。

【 0 0 5 1 】

本明細書で使用される場合、「構成的プロモーター」は、ほとんどの条件下で及び/またはほとんどの発生段階中で活性なプロモーターである。バイオテクノロジーで使用される発現ベクターの構成的プロモーターを使用することには、トランスジェニック細胞または生物を選択するために使用されるタンパク質の高レベル産生；容易な検出及び定量化を可能にするレポータータンパク質またはスコア化可能なマーカーの高レベル発現；転写調節系の一部である転写因子の高レベル産生；生物中で遍在活性が必要とされる化合物の産生；及び全ての発生段階中に必要とされる化合物の産生などのいくつかの利点がある。非限定的で例示的な構成的プロモーターとしては、CaMV 35Sプロモーター、オパインプロモーター、ユビキチンプロモーター、アルコールデヒドロゲナーゼプロモーターなどが挙げられる。

30

【 0 0 5 2 】

本明細書で使用される場合、「非構成的プロモーター」は、ある特定の条件下で、ある特定のタイプの細胞で、及び/またはある特定の発生段階中に活性なプロモーターである。例えば、組織特異的、組織優先的、細胞タイプ特異的、細胞タイプ優先的な、誘導性プロモーター、及び発生制御下にあるプロモーターは、非構成的プロモーターである。発生制御下にあるプロモーターの例としては、ある特定の組織で優先的に転写を開始させるプロモーターが挙げられる。

40

【 0 0 5 3 】

本明細書で使用される場合、「誘導性」または「抑制可能な」プロモーターは、化学因子または環境因子の制御下にあるプロモーターである。誘導性プロモーターによる転写に影響を及ぼし得る環境条件の例としては、嫌気条件、ある特定の化学物質、光の存在、酸性または塩基性条件などが挙げられる。

【 0 0 5 4 】

50

本明細書で使用される場合、「組織特異的」プロモーターは、ある特定の組織でのみ転写を開始させるプロモーターである。遺伝子の構成的発現とは異なり、組織特異的な発現は、いくつかの相互作用レベルの遺伝子調節の結果である。したがって、当技術分野では、時には、同種のまたは緊密に関連する種に由来するプロモーターを使用して、特定の組織における効率的で信頼性の高い導入遺伝子の発現を達成することが好ましい。これは、特定の組織から単離された組織特異的プロモーターが大量に、科学文献及び特許文献の両方に見出されることの主な理由の1つである。

【0055】

本明細書で使用される場合、用語「作動可能に連結した」は、一方の機能が他方により調節されるように、核酸配列を単一の核酸断片上で関連させることを指す。例えば、プロモーターは、コード配列の発現を調節することが可能な（つまり、コード配列がプロモーターの転写制御下にある）場合、そのコード配列と作動可能に連結している。コード配列は、センス配向性で、またはアンチセンス配向性で調節配列に作動可能に連結してもよい。別の例では、本開示の相補的RNA領域は、標的mRNAの5'に、もしくは標的mRNAの3'に、もしくは標的mRNA内に、直接もしくは間接のいずれかで作動可能に連結してもよく、または、第1の相補的領域が5'であり、その相補体は標的mRNAの3'である。

【0056】

一態様では、「植物に複数の非属間細菌を適用する」は、植物（種子、根、茎、組織などの植物部分を含む）を、植物の生活環の任意の段階にて細菌と接触させる（つまり、曝露する）ための任意の手段を含む。したがって、「植物に複数の非属間細菌を適用する」は、植物（種子、根、茎、組織などの植物部分を含む）を細菌に曝露するための以下の手段のいずれかを含む：植物に噴霧すること、植物に滴下すること、種子被膜として塗布すること、その後種子を植栽することになる圃場に施すこと、種子を既に植栽した圃場に施すこと、成体植物を有する圃場に施すことなど。

【0057】

本明細書で使用される場合、「MRTN」は、対窒素最大収益（maximum return to nitrogen）の頭字語であり、実施例の実験処理として使用されている。MRTNはIowa State Universityが開発したもので、情報は次のサイトで見ることができる：cnrc.agron.iastate.edu/。MRTNは、窒素適用の経済的純収益が最大化される窒素割合である。MRTNを算出する手法は、個々の状態のトウモロコシ窒素割合ガイドラインを開発するための地域別手法である。ダイズ後のトウモロコシ植栽及びトウモロコシ後のトウモロコシ植栽に関して適切な数の研究試験が入手可能であったイリノイ州、アイオワ州、ミシガン州、ミネソタ州、オハイオ州、及びウィスコンシン州の窒素割合試験データが評価された。試験は、噴出施肥、側方施肥、または植栽前/側方分割施肥（split preplant/sidedress）で適用した窒素で実施され、サイトは、ウィスコンシン州の灌漑砂地で必要とされたものを除いて灌漑されなかった。MRTNは、トウモロコシ生産に必要とされる示唆された窒素割合を決定するための方法に明白な差異があること、窒素割合ガイドラインに関する誤解、及び適用割合に対する懸念があるため、Iowa State Universityにより開発された。MRTNの算出により、実施者は、以下のことを決定することができる：（1）窒素適用の経済的純収益が最大化される窒素割合、（2）窒素の最終増分が、追加の窒素の費用を賄うのに十分大きな収穫高増加を生み出すポイントである経済的に最適な窒素割合、（3）窒素適用に起因するトウモロコシ穀物増加の値、及びより多くの窒素の適用がトウモロコシ収穫高の増加をもたらさない収穫高である最大収穫高。したがって、MRTN計算は、様々な地域でのトウモロコシ作物を最大化しつつ、窒素適用からの金融上の利得を最大化する手段を実施者に提供する。

【0058】

用語「mmol」は、ミリモルの略語であり、本明細書ではmolと略されるモルの1000分の1（ 10^{-3} ）である。

10

20

30

40

50

【0059】

本明細書で使用される場合、用語「植物」は、植物の部分、組織、葉、根、根毛、根茎、茎、種子、胚珠、花粉、花、果実などを含み得る。したがって、本開示が複数のトウモロコシ植物を特定の場所に提供することを論じる場合、これは、特定の場所にトウモロコシ種子を植栽することを伴う可能性があることが理解される。

【0060】

本明細書で使用される場合、用語「微小生物」または「微生物」は、広義に解釈されるべきである。これらの用語は、相互交換可能に使用され、2つの原核生物ドメインである細菌及び古細菌を含むが、それらに限定されない。この用語は、真核生物真菌及び原生動物を包含することもできる。

【0061】

本明細書で使用される場合、本開示が受託番号によって特定の微生物寄託を論じる場合、本開示はまた、寄託微生物のすべての識別特性を有する微生物菌株、及び/またはその変異体を企図することが理解される。

【0062】

用語「微生物コンソーシア」または「微生物コンソーシアム」は、個々の微生物種または種の菌株の微生物共同体のサブセットを指し、共通の機能を実施すると説明することができるか、または目的の表現型形質などの認識可能なパラメータに関与する、もしくは結び付く、もしくは相関すると説明することができる。

【0063】

用語「微生物共同体」は、2つ以上の種または株を含む微生物の群を意味する。微生物コンソーシアとは異なり、微生物共同体は、共通の機能を実施している必要はないか、または目的の表現型形質などの認識可能なパラメータに関与する、もしくは結び付く、もしくは相関する必要はない。

【0064】

本明細書で使用される場合、「単離」、「単離された」、「単離された微生物」、及び同様の用語は、1つ以上の微小生物が、特定の環境においてそれが関連する材料の少なくとも1つから分離されたことを意味することを意図する（例えば、土壌、水、植物組織など）。したがって、「単離された微生物」は、その天然に存在する環境に存在せず、むしろ、微生物は、本明細書に記載の種々の技法により、その自然状況から取り出されており、天然に存在しない存在状態に置かれている。したがって、単離された菌株または単離された微生物は、例えば、生物学的に純粋な培養物または孢子（または菌株の他の形態）として存在していてもよい。一態様では、単離された微生物は、農業的に許容される担体であってもよい許容される担体に付随していてもよい。

【0065】

本開示のある特定の態様では、単離された微生物は、「単離された生物学的に純粋な培養物」として存在する。当業者であれば、特定の微生物の単離された生物学的に純粋な培養物は、培養物が、他の生存生物を実質的に含まず、問題としている個々の微生物のみを含むことを示すことを理解すると予想される。培養物は、様々な濃度の微生物を含むことができる。本開示では、単離された生物学的に純粋な微生物は、「より純粋でないかまたは不純な物質とは必然的に異なる」ことが多いことが留意される。例えば、Bergstromに関して、427 F.2d 1394 (CCPA 1970) (精製プロスタグランジンに関する考察)を参照されたい。またBergyに関して、596 F.2d 952 (CCPA 1979) (精製微生物に関する考察)を参照されたい。またParkes-Davis & Co. v. H.K. Mulford & Co., 189 F.95 (S.D.N.Y. 1911) (精製アドレナリンに関するLearned Handの考察)、部分的に支持され部分的に破棄されている196 F.496 (2d Cir. 1912)を参照されたい。これらの各々は、参照により本明細書に組み込まれる。さらに、一部の態様では、本開示は、単離された生物学的に純粋な微生物培養物内に見出されなければならない濃度または純度限定に関するある特定の定量的尺度を提供する。ある特定の実施

10

20

30

40

50

形態では、こうした純度値の存在は、本開示の微生物を、天然の状態で存在する微生物と区別するさらなる属性である。例えば、参照により本明細書に組み込まれる Merck & Co. v. Olin Mathieson Chemical Corp., 253 F.2d 156 (4th Cir. 1958) (微生物により産生されるビタミンB12の純度限定に関する考察)を参照されたい。

【0066】

本明細書で使用される場合、「個々の単離株」は、1つ以上の他の微小生物からの分離後の、微小生物の単一の属、種、または株の優勢を含む組成物または培養物を意味すると解釈されるべきである。

【0067】

本開示の微生物は、孢子及び/または栄養細胞を含んでいてもよい。一部の実施形態では、本開示の微生物は、生存可能であるが培養不能な(VBNC)状態の微生物を含む。本明細書で使用される場合、「孢子(複数可)」は、生存及び散布に適した、細菌及び真菌により生成された構造を指す。孢子は、一般的には、休眠構造と特徴付けられるが、孢子は、発芽プロセスにより分化することが可能である。発芽は、孢子が、代謝活性、成長、及び生殖が可能な栄養細胞へと分化することである。単一の孢子の発芽は、単一の真菌または細菌栄養細胞をもたらす。真菌孢子は、無性生殖の単位であり、一部の場合では、真菌生活環に必要な構造である。細菌孢子は、通常は、栄養細胞の生存または成長に貢献しない場合がある生存条件のための構造である。

【0068】

本明細書で使用される場合、「微生物組成物」は、本開示の1つ以上の微生物を含む組成物を指す。一部の実施形態では、微生物組成物は、植物(種々の植物部分を含む)及び/または農業圃場に投与される。

【0069】

本明細書で使用される場合、「担体」、「許容される担体」、または「農業的に許容される担体」は、微生物を共に投与することができ、微生物に有害な影響を及ぼさない希釈剤、アジュバント、賦形剤、またはビヒクルを指す。

【0070】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示される微生物及び/または遺伝子改変は、2018年1月12日に出願された Methods and Compositions for Improving Plant Traits と題された PCT/US2018/013671 (WO2018/132774 A1) で教示された微生物ではない。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される方法は、2018年1月12日に出願された Methods and Compositions for Improving Plant Traits と題された PCT/US2018/013671 (WO2018/132774 A1) で教示された方法ではない。したがって、本開示は、本出願において開示された微生物、方法、及び遺伝子改変の否定的な但し書きを有する実施形態を企図する。

【0071】

窒素固定の調節

一部の場合では、窒素固定経路は、遺伝子導入操作及び最適化の標的としての役目を果たす場合がある。本明細書に記載の方法による調節の標的となり得る1つの形質は、窒素固定である。窒素肥料は、農場における最も大きな運営上の出費であり、トウモロコシ及びコムギのような条植え作物の収穫高を向上させる最大の誘因である。本明細書には、非マメ科作物に再生可能な形態の窒素を送達することができる微生物製品が記載されている。一部の内生菌は、純粋培養中で窒素固定に必要な遺伝的特質を有するが、根本的な技術的課題は、穀類及びイネ科草本の野生型内生菌が、施肥された圃場では窒素固定を中止することである。化学肥料の施肥及び圃場土壌中の残留窒素レベルは、微生物に対して、窒素固定の生化学経路を停止するようにシグナルを送る。

【0072】

10

20

30

40

50

肥料の存在下において窒素を固定してトウモロコシへと移行させることが可能な微生物の開発のためには、窒素固定調節ネットワークの構成成分の転写レベル及び翻訳後レベルを変更することが有益であり得る。そのため、本明細書には、調節ネットワークを的確に進化させ、新規の表現型を誘発させるための宿主微生物進化 (H o M E) 技術が記載されている。また、本明細書には、トウモロコシから単離された窒素固定内生菌の固有の独自ライブラリーが、窒素ストレス及び窒素過剰のような異なる環境条件下での微生物及び宿主植物の相互作用を取り巻く広範なオミクスデータと対にして記載されている。一部の実施形態では、この技術により、内生菌の遺伝子調節ネットワークを的確に進化させて、圃場に肥料が存在する場合であっても活発に窒素を固定する微生物を産生することが可能になる。また、本明細書には、トウモロコシ根組織をコロニー形成させ、施肥されている植物のために窒素を産生する微生物に進化させる技術的可能性の評価、ならびに微生物を現代的窒素管理戦略に統合する実現可能性を決定するために、内生菌と、標準的配合規範及び多様な土壌との適合性の評価が記載されている。

10

【0073】

窒素元素 (N) を化学合成に利用するために、生命体は、窒素固定として公知であるプロセスにおいて、大気中で利用可能な窒素ガス (N_2) を水素と化合させる。生物学的窒素固定はエネルギーを多消費する性質のため、ジアゾトロフ (大気中の窒素ガスを固定する細菌及び古細菌) は、環境中の酸素及び利用可能な窒素に反応して *nif* 遺伝子クラスターを精巧及び厳密に調節するように進化している。*Nif* 遺伝子は、窒素固定に関与する酵素 (ニトロゲナーゼ複合体などの) 及び窒素固定を調節するタンパク質をコードする。*Shamseldin (2013, Global J. Biotechnol. Biochem. 8 (4): 84-94)* には、*nif* 遺伝子及びそれらの産物の詳細な記載が開示されており、参照により本明細書に組み込まれる。本明細書には、向上された形質を有する植物を産生するための方法であって、第1の植物から細菌を単離すること；単離された細菌の遺伝子に遺伝子変異を導入して窒素固定を増加させること；第2の植物を変異体細菌に曝露すること；第1の植物と比べて向上された形質を有する第2の植物から細菌を単離すること；及び第2の植物から単離された細菌を用いてステップを繰り返すことを含む方法が記載されている。

20

【0074】

プロテオバクテリアでは、*nif* クラスターの正の転写制御因子である、54依存性エンハンサー結合タンパク質 *NifA* が、窒素固定の調節に中心的な役割を果たす。活性 *NifA* の細胞内レベルは、2つの主な因子：*nifLA* オペロンの転写及び *NifL* とのタンパク質間相互作用による *NifA* 活性の阻害により制御される。これらのプロセスは両方とも、*PII* タンパク質シグナル伝達カスケードを介して、細胞内グルタミンレベルに反応性である。このカスケードは、*GlnD* により媒介され、*GlnD* は、グルタミンを直接的に感知し、結合グルタミンの非存在または存在に反応して、2つの *PII* 調節タンパク質 *GlnB* 及び *GlnK* のウリジリル化または脱ウリジリル化をそれぞれ触媒する。窒素過剰条件下では、未変換 *GlnB* が、*nifLA* プロモーターの非活性化シグナルを送る。しかしながら、窒素制限条件下では、*GlnB* は翻訳後修飾を受け、それによりその活性が阻害され、*nifLA* オペロンの転写に結びつく。このように、*nifLA* 転写は、*PII* タンパク質シグナル伝達カスケードにより、環境窒素に反応して厳密に制御されている。*NifA* の翻訳後レベル調節では、*GlnK* は、細胞内の遊離 *GlnK* の全体的レベルに依存する様式で *NifL/NifA* 相互作用を阻害する。

30

40

【0075】

NifA は、*nifLA* オペロンから転写され、そのプロモーターは、別の54依存性制御因子であるリン酸化 *NtrC* により活性化される。*NtrC* のリン酸化状態は、ヒスチジンキナーゼ *NtrB* により媒介され、*NtrB* は、脱ウリジリル化 *GlnB* とは相互作用するが、ウリジリル化 *GlnB* とは相互作用しない。窒素過剰条件下では、高い細胞内レベルのグルタミンは、*GlnB* の脱ウリジリル化に結び付き、脱ウリジリル化された *GlnB* は、その後 *NtrB* と相互作用して、そのリン酸化活性を不活化し、そのホス

50

ファクターゼ活性を活性化させて、NtrCの脱リン酸化及びnifLAプロモーターの不活化をもたらされる。しかしながら、窒素制限条件下では、低レベルの細胞内グルタミンは、GlnBのウリジリル化をもたらし、それにより、NtrBとのその相互作用が阻害され、NtrCのリン酸化及びnifLAオペロンの転写を可能にする。このように、nifLA発現は、PIIタンパク質シグナル伝達カスケードにより、環境窒素に応答して厳密に制御される。nifA、ntrB、ntrC、及びglnBは全て、本明細書に記載の方法で突然変異させることができる遺伝子である。また、こうしたプロセスは、アンモニア、尿素、または硝酸塩の細胞内または細胞外レベルに応答する場合がある。

【0076】

また、NifAの活性は、最も典型的にはNifA活性のNifL媒介性阻害により、環境窒素に応答して翻訳後に調節される。一般的に、NifLとNifAとの相互作用は、GlnKを介したPIIタンパク質シグナル伝達カスケードにより影響を受けるが、GlnKとNifL/NifAとの相互作用の性質は、ジアゾトロフ間で著しく異なる。Klebsiella pneumoniaeでは、両形態のGlnKが、NifL/NifA相互作用を阻害し、GlnKとNifL/NifAとの相互作用は、細胞内の遊離GlnKの全体的レベルにより決定される。窒素過剰条件下では、脱ウリジリル化GlnKは、アンモニウム輸送体AmtBと相互作用し、これは、AmtBによるアンモニウム取り込みを阻止すると共に、GlnKを膜に隔離し、NifLによるNifAの阻害を可能にする役目を果たす。一方、Azotobacter vinelandiiでは、NifL/NifA相互作用及びNifA阻害には、脱ウリジリル化GlnKとの相互作用が必要であるが、GlnKのウリジリル化は、NifLとの相互作用を阻害する。nifL遺伝子が欠如したジアゾトロフでは、NifA活性は、窒素過剰条件下では、GlnK及びGlnBの両方の脱ウリジリル化形態との相互作用により直接的に阻害されるという証拠が存在する。一部の細菌では、Nifクラスターが、glnRにより調節される場合があり、さらに一部の場では、これは、負の調節を含む場合がある。その機序に関わらず、ほとんどの既知のジアゾトロフでは、NifAの翻訳後阻害は、nifクラスターの重要な制御因子である。加えて、nifL、amtB、glnK、及びglnRは、本明細書に記載の方法で突然変異させることができる遺伝子である。

【0077】

多くのジアゾトロフは、nif遺伝子クラスターの転写調節に加えて、ニトロゲナーゼ遮断として公知である、ニトロゲナーゼ酵素自体の直接的翻訳後修飾及び阻害の機序を進化させている。これは、窒素過剰条件下でのFeタンパク質(NifH)のADPリボシル化により媒介され、それにより、MoFeタンパク質複合体(NifDK)との相互作用が妨害され、ニトロゲナーゼ活性が消失する。DraTは、Feタンパク質のADPリボシル化及びニトロゲナーゼの遮断を触媒する一方で、DraGは、ADPリボースの除去及びニトロゲナーゼの再活性化を触媒する。nifLA転写及びNifA阻害の場合と同様に、ニトロゲナーゼ遮断は、PIIタンパク質シグナル伝達カスケードによっても調節される。窒素過剰条件下では、脱ウリジリル化GlnBは、DraTと相互作用してDraTを活性化する一方で、脱ウリジリル化GlnKは、DraG及びAmtBの両方と相互作用して複合体を形成し、DraGを膜に隔離する。窒素制限条件下では、GlnB及びGlnKのウリジリル化形態は、それぞれDraT及びDraGと相互作用せず、DraTの不活化及びDraGのFeタンパク質への拡散に結び付き、そこでADPリボースが除去され、ニトロゲナーゼが活性化される。また、本明細書に記載の方法では、nifH、nifD、nifK、及びdraT遺伝子に遺伝子変異を導入することが企図される。

【0078】

一部の内生菌は、in vitroで窒素を固定する能力を有するが、多くの場合、この遺伝的特徴は、圃場では高レベルの外因性化学肥料によりサイレンシングされる。圃場に基づく窒素固定を容易にするために、外来性窒素の感知をニトロゲナーゼ酵素の発現と切り離すことができる。さらに、経時的なニトロゲナーゼ活性の積分を改善させることは

、作物により利用される窒素の産生を増大させる役目を果たす。本明細書に記載の方法を使用して圃場に基づく窒素固定を容易にする遺伝子変異のための具体的な標的としては、*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*、及び*nifQ*からなる群より選択される1つ以上の遺伝子が挙げられる。

【0079】

本明細書に記載の方法を使用して圃場に基づく窒素固定を容易にする遺伝子変異のための追加の標的は、*NifA*タンパク質である。*NifA*タンパク質は、典型的には、窒素固定遺伝子発現の活性化因子である。*NifA*の産生を増加させることにより（構成的にまたは高アンモニア条件中のいずれかで）、天然アンモニア感知経路が回避される。加えて、*NifA*の公知の阻害剤である*NifL*タンパク質の産生を低減することは、遊離活性*NifA*レベルの増加にも結び付く。加えて、*nifAL*オペロンの転写レベルを増加させることは（構成的にまたは高アンモニア条件中のいずれかで）、全体的により高いレベルの*NifA*タンパク質にも結び付く。*nifAL*発現のレベル上昇は、プロモーター自体を変更することにより、または*NtrB*（元々は高窒素条件中に*nifAL*オペロンの遮断をもたらすことになる*ntrB*及び*ntrC*シグナル伝達カスケードの一部）の発現を低減させることにより達成される。これらの方法または本明細書に記載の任意の他の方法により達成される高レベルの*NifA*は、内生菌の窒素固定活性を増加させる。

10

20

【0080】

本明細書に記載の方法を使用して圃場に基づく窒素固定を容易にする遺伝子変異のための別の標的は、*GlnD*/*GlnB*/*GlnK* *PII*シグナル伝達カスケードである。細胞内グルタミンレベルは、*GlnD*/*GlnB*/*GlnK* *PII*シグナル伝達カスケードにより感知される。*GlnD*のウリジリル除去活性を消失させる*GlnD*の活性部位突然変異は、窒素感知カスケードを妨害する。加えて、*GlnB*濃度の低減は、グルタミン感知カスケードを短絡させる。これらの突然変異により、細胞を「騙して」窒素制限状態であると認識させ、それにより窒素固定レベル活性を増加させる。また、これらのプロセスは、アンモニア、尿素、または硝酸塩の細胞内または細胞外レベルに応答する場合がある。

30

【0081】

*amtB*タンパク質も、本明細書に記載の方法を使用して圃場に基づく窒素固定を容易にする遺伝子変異のための標的である。環境からのアンモニア取り込みは、*amtB*タンパク質の発現レベルを減少させることにより低減させることができる。細胞内アンモニアが存在しないと、内生菌は、アンモニアのレベルが高いことを感知することができず、窒素固定遺伝子の下方制御が防止される。細胞内区画への進入を果たしたアンモニアは全てグルタミンに変換される。細胞内グルタミンレベルは、窒素を感知するための主要な媒介物である。細胞内グルタミンレベルを減少させることにより、細胞が、環境中のアンモニウムレベルが高いことを感知することが防止される。この効果は、グルタミンをグルタミン酸に変換する酵素であるグルタミンナーゼの発現レベルを増加させることにより達成できる。加えて、細胞内グルタミンは、グルタミン合成酵素（アンモニアをグルタミンに変換する酵素）を減少させることによっても低減させることができる。ジアゾトロフでは、固定されたアンモニアは、細胞プロセスに使用されることになるグルタミン及びグルタミン酸へと迅速に同化される。アンモニア同化の妨害は、固定窒素を変換して、アンモニアとして細胞から排出されることを可能にする場合がある。固定アンモニアは、主に*glnA*によりコードされているグルタミン合成酵素（*GS*）によりグルタミンへと、その後はグルタミンオキソグルタル酸アミノトランスフェラーゼ（*GOGAT*）によりグルタミンへと同化される。いくつかの例では、*glnS*は、グルタミン合成酵素をコードする。*GS*は、*GS*アデニリルトランスフェラーゼ（*GlnE*）、つまり、それぞれアデニリルトランスフェラーゼ（*AT*）ドメイン及びアデニリル除去（*AR*）ドメインの活性により*GS*

40

50

のアデニリル化及び脱アデニリル化の両方を触媒する、glnEによりコードされた二機能性酵素により、翻訳後に調節される。窒素制限条件下では、glnAが発現され、GlnEのARドメインは、GSを脱アデニリル化し、その活性化を可能にする。窒素過剰条件下では、glnA発現は遮断され、GlnEのATドメインは、グルタミンによりアロステリックに活性化され、GSのアデニリル化及び不活化が引き起こされる。

【0082】

さらに、draT遺伝子もまた、本明細書に記載の方法を使用して圃場に基づく窒素固定を容易にする遺伝子変異のための標的であってもよい。細胞により窒素固定酵素が産生されると、ニトロゲナーゼ遮断が、細胞が高窒素条件で固定活性を下方制御する別のレベルを表す。この遮断は、DraTの発現レベルを減少させることにより除去することができる可能性がある。

10

【0083】

新しい微生物表現型を付与するための方法は、転写レベル、翻訳レベル、及び翻訳後レベルで実施することができる。転写レベルでは、プロモーターを変更すること（プロモーターの全てまたは一部の欠失を含む、転写因子に対するシグマ因子親和性または結合部位の変更など）または転写ターミネーター及びアテニューエーターを変更することが含まれる。翻訳レベルでは、リボソーム結合部位での変更、及びmRNA分解シグナルを変更することが含まれる。翻訳後レベルでは、酵素の活性部位を突然変異させること、及びタンパク質間相互作用を変更させることが含まれる。こうした変更は、数多くの方法で達成することができる。発現レベルの低減（または完全な消失）は、天然リボソーム結合部位（RBS）またはプロモーターを、強度/効率がより低いものと交換することにより達成することができる。ATG開始部位を、GTG、TTG、またはCTG開始コドンと交換してもよく、それにより、コード領域の翻訳活性の低減がもたらされる。発現の完全な消失は、遺伝子のコード領域をノックアウト（欠失）することにより行うことができる。オープンリーディングフレーム（ORF）をフレームシフトすると、ORFに中途終止コドンがもたらされ、非機能性の短縮産物が作成されることになる可能性がある。インフレーム終止コドンの挿入も、同様に、非機能性の短縮産物を作成することになる。N末端またはC末端に分解タグを付加することでも、特定の遺伝子の有効濃度を低減することができる。

20

【0084】

反対に、本明細書に記載されている遺伝子の発現レベルは、より強力なプロモーターを使用することにより達成することができる。高窒素レベル条件（または任意の他の条件）中のプロモーター活性を確実に高くするために、高窒素レベル条件における全ゲノムの転写プロファイルを取得し、そのデータセットから、所望の転写レベルを有する活性プロモーターを選択して、弱いプロモーターを置換してもよい。弱い開始コドンを、より良好な翻訳開始効率のために、ATG開始コドンと交換してもよい。また、弱いリボソーム結合部位（RBS）を、より高い翻訳開始効率を有する異なるRBSと交換してもよい。また、加えて、部位特異的突然変異を実施して、酵素の活性を改変してもよい。

30

【0085】

植物において生じる窒素固定のレベルを増加させることは、作物生産に必要とされる化学肥料の量の低減に結びつき、温室効果ガス排出（例えば、亜酸化窒素）を削減することができる。

40

【0086】

コロニー形成能の制御

本明細書に記載の方法によって調節の対象となり得る形質の1つは、コロニー形成能である。したがって、いくつかの実施形態では、コロニー形成に関与する経路及び遺伝子が、遺伝子導入操作及び最適化の標的として作用する可能性がある。

【0087】

場合によっては、エキソポリサッカライドが植物の細菌コロニー形成に関与している可能性がある。場合によっては、植物コロニー形成微生物がバイオフィルムを生成し得る。一部の場では、植物コロニー形成微生物は、植物への接着または植物免疫応答の回避を

50

補助し得る分子を分泌する。場合によっては、植物コロニー形成微生物は、微生物に対する植物の応答を変化させるシグナル伝達分子を排出し得る。場合によっては、植物コロニー形成微生物は、局所的な微小環境を変化させる分子を分泌し得る。一部の場合では、植物コロニー形成微生物は、該微生物が近接する植物に適合するように遺伝子の発現を改変し得る。場合によっては、植物コロニー形成微生物は、局所環境における植物の存在を検出し、それに応じて遺伝子の発現を変化させ得る。

【0088】

いくつかの実施形態では、コロニー形成を改善するために、エキソポリサッカライド産生、エンドポリガラクトナーゼ産生、トレハロース産生、及びグルタミン変換からなる群から選択される経路に關与する遺伝子を、遺伝子導入操作及び最適化の標的とし得る。

10

【0089】

いくつかの実施形態では、エキソポリサッカライドの産生に關与する酵素または経路は、コロニー形成を改善するように遺伝子改変され得る。コロニー形成を改善するために標的とされ得るエキソポリサッカライド産生酵素をコードする例示的な遺伝子には、*bcsii*、*bcsiii*、及び *yjbE* が含まれるが、これらに限定されない。

【0090】

いくつかの実施形態では、糸状ヘマグルチニンの産生に關与する酵素または経路は、コロニー形成を改善するように遺伝子改変され得る。例えば、糸状ヘマグルチニンをコードする *fhaB* 遺伝子は、コロニー形成を改善するために標的化され得る。

【0091】

いくつかの実施形態では、エンドポリガラクトナーゼの産生に關与する酵素または経路は、コロニー形成を改善するように遺伝子改変され得る。例えば、エンドポリガラクトナーゼ前駆体をコードする *pehA* 遺伝子は、コロニー形成を改善するために標的とされ得る。

20

【0092】

いくつかの実施形態では、トレハロースの産生に關与する酵素または経路は、コロニー形成を改善するように遺伝子改変され得る。コロニー形成を改善するために標的とされ得るトレハロース産生酵素をコードする例示的な遺伝子には、*otsB* 及び *treZ* が含まれるが、これらに限定されない。

【0093】

いくつかの実施形態では、グルタミンの変換に關与する酵素または経路は、コロニー形成を改善するように遺伝子改変され得る。例えば、*glsA2* 遺伝子は、グルタミンをアンモニウム及びグルタミン酸に変換するグルタミンナーゼをコードする。*glsA2* の上方制御は、細胞のグルタミン酸プールを増加させることによって適合性を改善し、それによって細胞に利用可能な N を増加させる。したがって、いくつかの実施形態では、*glsA2* 遺伝子が、コロニー形成を改善するための標的となり得る。

30

【0094】

いくつかの実施形態では、*bcsii*、*bcsiii*、*yjbE*、*fhaB*、*pehA*、*otsB*、*treZ*、*glsA2*、及びそれらの組み合わせからなる群から選択されるコロニー形成遺伝子は、コロニー形成を改善するように遺伝子改変され得る。

40

【0095】

コロニー形成能を改善するための標的となり得るコロニー形成遺伝子はまた、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる PCT 公開、WO/2019/032926 に記載されている。

【0096】

細菌集団の生成

細菌の単離

本明細書で開示された方法及び組成物に有用な微生物は、天然植物の表面または組織から微生物を抽出することにより得ることができる。微生物は、種子を粉碎して微生物を単離することにより得ることができる。微生物は、種子を多様な土壌試料に植栽し、組織か

50

ら微生物を回収することにより得ることができる。加えて、微生物は、植物に外因性微生物を接種し、どの微生物が植物組織に出現するかを決定することにより得ることができる。植物組織の非限定的な例としては、種子、実生、葉、挿穂、植物、鱗茎、または塊茎を挙げることができる。

【0097】

微生物を得るための方法は、細菌を土壌から分離することによるものであってもよい。細菌は、種々の土壌タイプから収集することができる。いくつかの例では、土壌は、高肥沃度または低肥沃度、水分のレベル、鉍物のレベル、及び種々の作付け慣習などの特色により特徴付けされ得る。例えば、土壌は、異なる作物が連続した植栽季節で同じ土壌に植栽される輪作に関与する場合がある。同じ土壌での異なる作物の順次栽培は、ある特定の鉍物の不均衡な枯渇を防止し得る。細菌は、選択された土壌で成長している植物から単離することができる。実生植物は、2～6週間の栽培で収穫することができる。例えば、少なくとも400個の単離株を、1ラウンドの収穫で収集することができる。土壌及び植物タイプは、植物表現型、ならびにある特定の表現型の下流濃縮を可能にする条件を明らかにする。

10

【0098】

微生物を植物組織から単離して、微生物の形質を評価することができる。組織試料を処理するためのパラメータを変化させて、根圏細菌、着生菌、または内部寄生菌などの、異なるタイプの付随性微生物を単離してもよい。単離株を無窒素培地で培養して、窒素固定を実施する細菌を濃縮することができる。あるいは、世界の菌株バンクから微生物を得ることができる。

20

【0099】

植物内分析を実施して、微生物の形質を評価する。いくつかの実施形態では、DNA及びRNAのハイスループット処理によりスクリーニングを行うために、植物組織を処理することができる。加えて、非侵襲性測定を使用して、コロニー形成などの植物特性を評価することができる。野生微生物の測定は、植物ごとに得ることができる。また、野生微生物の測定は、圃場でメディアスループット法を使用して得ることができる。測定は、経時的に順次に行うことができる。Setariaを含むがこれに限定されないモデル植物系を使用することができる。

【0100】

植物系中の微生物は、植物系での微生物の転写プロファイリングを介してスクリーニングすることができる。転写プロファイリングによるスクリーニングの例は、定量的ポリメラーゼ連鎖反応(qPCR)法、転写物検出用の分子バーコード法、次世代配列決定法、及び蛍光マーカーでの微生物のタグ付け法を使用することである。マイクロバイーム、非生物要因、土壌条件、酸素、水分、温度、接種材料条件、及び根局在化を含むがこれらに限定されない影響要因を測定して、温室におけるコロニー形成を評価することができる。窒素固定は、細菌中で、本明細書に記載されるようなIRMSまたはNanoSIMSを用いて15N気体/肥料(希釈)を測定することによって評価することができる。NanoSIMSは、高分解能二次イオン質量分析法である。NanoSIMS技法は、生物学的試料に由来する化学活性を調査するための方式である。微小生物の代謝を促進する酸化反応を還元する触媒作用を、細胞レベル、細胞内レベル、分子レベル、及び元素レベルで調査することができる。NanoSIMSは、0.1µm超の高空間分解能を提供することができる。NanoSIMSは、 ^{13}C 、 ^{15}N 、及び ^{18}O などの同位体トレーサーの使用を検出することができる。したがって、NanoSIMSは、細胞の化学的活性窒素に対して使用することができる。

30

40

【0101】

植物分析には、自動化温室を使用することができる。微生物曝露に応答した植物測定基準には、バイオマス、葉緑体分析、CCDカメラ、容積トモグラフィ測定が含まれるが、これらに限定されない。

【0102】

50

微生物集団を濃縮するための1つの方式は、遺伝子型によるものである。例えば、標的化プライマーまたは特異的プライマーを用いたポリメラーゼ連鎖反応（PCR）アッセイである。ジアゾトロフは窒素固定のプロセス中に *nifH* 遺伝子を発現するため、*nifH* 遺伝子に対して設計されたプライマーを使用して、ジアゾトロフを特定することができる。また、微生物集団は、単一細胞培養非依存的手法及び走化性誘導単離手法を介して濃縮することもできる。あるいは、微生物の標的化単離は、微生物を選択培地で培養することにより実施することができる。微生物集団を所望の形質について濃縮するための計画的な手法は、バイオインフォマティクスデータによって誘導され得、これは本明細書に記載される。

【0103】

バイオインフォマティクスを使用した窒素固定能を有する微生物の濃縮

バイオインフォマティクスツールを使用して、植物成長促進性根圏細菌（PGPR）を特定及び単離することができ、それらは、窒素固定を実施する能力に基づいて選択される。高い窒素固定能を有する微生物は、植物の好ましい形質を促進することができる。PGPRを特定するためのバイオインフォマティクス分析モードとしては、これらに限定されないが、ゲノミクス、メタゲノミクス、標的化単離、遺伝子配列決定、トランスクリプトーム配列決定、及びモデリングが挙げられる。

【0104】

ゲノミクス分析を使用して、PGPRを特定し、本明細書に記載の次世代配列決定法及び微生物バージョン管理法（*microbe version control*）により突然変異の存在を確認することができる。

【0105】

コロニー形成の予測アルゴリズムを使用してPGPRを特定及び単離するためにメタゲノミクスを使用することができる。また、メタデータを使用して、環境試料及び温室試料中の導入操作された菌株の存在を特定することができる。

【0106】

トランスクリプトーム配列決定を使用して、PGPR表現型に結び付く遺伝子型を予測することができる。加えて、トランスクリプトームデータを使用して、遺伝子発現を変更するためのプロモーターを特定する。トランスクリプトームデータを、全ゲノム配列（WGS）と併せて分析して、代謝及び遺伝子調節ネットワークのモデルを生成することができる。

【0107】

微生物の順化

自然界から単離された微生物は、微生物が、遺伝学的に追跡可能及び特定可能な形態に変換される順化プロセスを起こす場合がある。微生物を順化させる1つの方式は、抗生物質耐性を微生物に導入操作することである。抗生物質耐性を導入操作するプロセスは、野生型微生物菌株の抗生物質感受性を決定することから開始することができる。細菌が抗生物質に感受性である場合、その抗生物質は、抗生物質耐性導入操作の良好な候補であり得る。その後、組換え法を使用して、抗生物質耐性遺伝子または対抗選択可能な自殺ベクターを、微生物のゲノムに組み込むことができる。対抗選択可能な自殺ベクターは、目的の遺伝子の欠失、選択可能なマーカー、及び対抗選択可能なマーカー *sacB* で構成されていてもよい。対抗選択を使用して、天然微生物DNA配列を抗生物質耐性遺伝子と交換することができる。メディアムスループット法を使用して、複数の微生物を同時に評価して、並行順化を可能にすることができる。順化の代替方法としては、ホーミングヌクレアーゼを使用して、自殺ベクター配列がループアウトすることまたは介在ベクター配列を得ることを防止することを含む。

【0108】

DNAベクターは、エレクトロポレーション及び化学的形質転換を含むいくつかの方法により細菌に導入することができる。ベクターの標準的ライブラリーを形質転換に使用することができる。遺伝子編集法の例は、Cas9試験を行って微生物でのCas9の活性

10

20

30

40

50

を確実にした後のCRISPRである。

【0109】

微生物工学

有利な特性を持つ微生物集団は、指向性進化によって得ることができる。指向性進化は、自然淘汰プロセスを模倣して、タンパク質または核酸をユーザ設定目標に向かって進化させる手法である。指向性進化の例は、ランダム突然変異を微生物集団に導入した場合、最も好ましい形質を有する微生物を選択し、選択した微生物の増殖を継続させることである。成長促進性根圏細菌(PGPR)の最も好ましい形質は、窒素固定であってもよい。指向性進化法は、各反復後の選択プロセスに基づき、反復性及び適応性であってもよい。

【0110】

高い窒素固定能力を有する植物成長促進性根圏細菌(PGPR)を生成することができる。PGPRの進化は、遺伝子変異の導入により実施することができる。遺伝子変異は、ポリメラーゼ連鎖反応突然変異誘発、オリゴヌクレオチド誘導突然変異誘発、飽和突然変異誘発、断片シャッフリング突然変異誘発、相同組換え、CRISPR/Cas9系、化学的突然変異誘発、及びそれらの組合せにより導入することができる。こうした手法は、ランダム突然変異を微生物集団に導入することができる。例えば、突然変異体は、オリゴヌクレオチド誘導突然変異誘発により合成DNAまたはRNAを使用して生成することができる。突然変異体は、プラスミドに含まれるツールであって、後で治癒されるツールを使用して生成することができる。目的の遺伝子は、これらに限定されないが、PGPR特性の向上、穀類のコロニー形成の向上、酸素感受性の増加、窒素固定の増加、及びアンモニア排出の増加を含む、形質の向上を有する他の種に由来するライブラリーを使用して特定することができる。こうしたライブラリーに基づき、GeneiousまたはPlatypus設計ソフトウェアなどのソフトウェアを使用して、属内遺伝子及び属間遺伝子を設計することができる。突然変異は、機械学習の支援により設計することができる。突然変異は、代謝モデルの支援により設計することができる。alaPlatypusを使用して突然変異の自動設計を実施することができ、Cas誘導突然変異誘発のためのRNAが誘導されることになる。

【0111】

属内遺伝子または属間遺伝子を、宿主微生物に移入することができる。加えて、レポーター系も微生物に移入することができる。レポーター系は、プロモーターを特徴付け、形質転換成功を決定し、突然変異体をスクリーニングし、陰性スクリーニングツールとして作用する。

【0112】

突然変異を保持する微生物は、連続継代により培養することができる。微生物コロニーは、微生物の単一変異体を含む。微生物コロニーは、自動コロニーピッカー及び液体ハンドラーの支援によりスクリーニングされる。遺伝子重複及びコピー数増加を有する突然変異体は、所望の形質のより高い遺伝子型を発現する。

【0113】

窒素固定に基づく植物成長促進性微生物の選択

微生物コロニーは、種々のアッセイを使用してスクリーニングして、窒素固定を評価することができる。窒素固定を測定するための1つの様式は、窒素排出が測定される単一の発酵アッセイによる。代替方法は、経時的なインライン試料採取によるアセチレン還元アッセイ(ARA)である。ARAは、マイクロチューブアレイのハイスループットプレートで実施することができる。ARAは、生植物及び植物組織で実施することができる。ARAアッセイでは、培地配合及び培地酸素濃度を変化させることができる。微生物変異体をスクリーニングするための別の方法は、バイオセンサーの使用による。NanoSIMS及びラマン顕微分光法の使用は、微生物の活性を調査するために使用することができる。また、一部の 경우에는、細菌を、バイオリアクターでの発酵法を使用して培養及び増殖させることができる。バイオリアクターは、細菌成長の頑強性を向上させ、細菌の酸素感受性を減少させるように設計されている。中～高TPプレートに基づくマイクロ発酵槽を

10

20

30

40

50

使用して、酸素感受性、栄養必要性、窒素固定、及び窒素排出を評価する。また、細菌を、競合性のまたは有益な微生物と共培養して、クリブティック経路を明らかにすることができる。化学的、比色定量的、または蛍光性の指示薬を使用して、高レベルの窒素を産生する細菌をスクリーニングするために、フローサイトメトリーを使用することができる。細菌を、窒素源の存在下または非存在下で培養してもよい。例えば、細菌を、グルタミン、アンモニア、尿素、または硝酸塩と共に培養してもよい。

【0114】

誘導型微生物リモデリング - 概要

誘導型微生物リモデリングは、作物マイクロバイーム内の種の役割を系統的に特定及び向上する方法である。いくつかの態様では、そしてグループ化/分類の特定の方法論によれば、本方法は3つのステップからなる：1) 植物-微生物の相互作用をマッピングし、特定の表現型に関連する調節ネットワークを予測することにより候補種を選択するステップと、2) 微生物のゲノム内の調節ネットワーク及び遺伝子クラスターの種内交配により、微生物の表現型を実用的かつ予測可能に改良するステップと、3) 所望の作物表現型を生成する新たな微生物の遺伝子型をスクリーニングして選択するステップ。

10

【0115】

菌株の改善を系統的に評価するために、微生物群落のコロニー形成動力学を主要な種による遺伝子活性に結び付けるモデルを作出する。このモデルは、非遺伝子間遺伝子リモデリングの遺伝的標的を予測するために使用される(つまり、非トランスジェニックな方法で微生物の遺伝子構造を導入操作する)。プロセスの実施形態のグラフ表示については、図1Aを参照のこと。

20

【0116】

図1Aに示されるように、作物マイクロバイームの合理的な改善は、土壌の生物多様性を高め、キーストーン種の影響を調整し、及び/または重要な代謝経路のタイミング及び発現を変更するために使用することができる。

【0117】

この目的のために、本発明者らは、作物マイクロバイームの株の役割を特定及び改善するためのプラットフォームを開発した。いくつかの態様では、本発明者らは、このプロセスを微生物育種と呼ぶ。

【0118】

前述の「誘導型微生物リモデリング」プロセスは、例えば、「誘導型微生物リモデリング-農業用微生物種の合理的改善のためのプラットフォーム」と題された、実施例1などの実施例においてさらに詳しく説明される。

30

【0119】

連続継代

植物形質(例えば、窒素固定)を向上させる細菌の産生は、連続継代により達成することができる。この細菌の生産は、1つ以上の植物に1つ以上の向上された形質を付与することが可能な細菌及び/または組成物を同定することに加えて、微生物叢により影響を受ける特定の向上された形質を有する植物を選択することにより行うことができる。植物形質を向上させる細菌を産生するための1つの方法は、(a) 第1の植物の組織または土壌から細菌を単離するステップ；(b) 細菌のうち1つ以上に遺伝子変異を導入して、1つ以上の変異細菌を産生するステップ；(c) 複数の植物を変異細菌に曝露するステップ；(d) 複数の植物のうち1つの組織または土壌から細菌を単離するステップであって、細菌を単離した植物が、複数の植物中の他の植物と比べて向上された形質を有する、ステップ；及び(e) 向上された形質を有する植物から単離された細菌(ステップ(d))を用いて、ステップ(b)~(d)を繰り返すステップを含む。ステップ(b)~(d)は、植物の向上された形質が所望のレベルに達するまで、何回でも(例えば、1回、2回、3回、4回、5回、10回、またはそれよりも多く)繰り返すことができる。さらに、複数の植物は、3つ以上の植物、例えば、10~20の植物、または20以上、50以上、100以上、300以上、500以上、または1000以上の植物であり得る。

40

50

【0120】

向上された形質を有する植物を得ることに加えて、1つ以上の遺伝子（例えば、窒素固定を調節する遺伝子）に導入された1つ以上の遺伝子変異を含む細菌を含む細菌集団が得られる。上述のステップを繰り返すことにより、目的の植物形質と相関する集団の最も適切なメンバーを含む細菌の集団を得ることができる。遺伝子分析及び/または表現型分析などにより、この集団内の細菌を同定して、それらの有益な特性を決定することができる。ステップ(a)にて、単離された細菌の遺伝子分析を行ってもよい。表現型及び/または遺伝子型の情報は、以下のものを含む技法を使用して得ることができる：植物由来の化学成分のハイスループットスクリーニング；遺伝物質のハイスループット配列決定を含む配列決定技法；ディファレンシャルディスプレイ技法（DDRT-PCR及びDD-PCRを含む）；核酸マイクロアレイ技法；RNA配列決定（全トランスクリプトームショットガン配列決定）；及びqRT-PCR（定量リアルタイムPCR）。得られた情報を使用して、系統発生分析、またはrRNAオペロンもしくは他の分類学的に有益な遺伝子座の成分をコードする核酸のマイクロアレイに基づくスクリーニングなど、存在する細菌の同一性及び活性に関する共同体プロファイル情報を得ることができる。分類学的に有益な遺伝子座の例としては、16S rRNA遺伝子、23S rRNA遺伝子、5S rRNA遺伝子、5.8S rRNA遺伝子、12S rRNA遺伝子、18S rRNA遺伝子、28S rRNA遺伝子、gyrB遺伝子、rpoB遺伝子、fusA遺伝子、recA遺伝子、coxI遺伝子、nifD遺伝子が挙げられる。集団に存在する分類群を決定するための分類学的プロファイリングの例示的な方法は、米国特許出願公開第20140155283号に記載されている。細菌の同定は、窒素固定経路に関連する遺伝子などの、1つ以上の遺伝子または1つ以上のシグナル経路の活性を特徴付けることを含んでもよい。また、異なる細菌種間の相乗効果的な相互作用（2つの成分を組み合わせることにより、付加的な量を超えて所望の効果が増加すること）が、細菌集団に存在している場合がある。

【0121】

遺伝子変異 - ゲノム変更の位置及び供給源

遺伝子変異は、以下のものからなる群より選択される遺伝子であってもよい：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、及びnifQ。遺伝子変異は、以下のものからなる群より選択される機能性を有するタンパク質をコードする遺伝子の変異であってもよい：グルタミン合成酵素、グルタミナーゼ、グルタミン合成酵素アデニリルトランスフェラーゼ、転写活性化因子、抗転写活性化因子、ピルビン酸フラボドキシノキシドレダクターゼ、フラボドキシノ、及びNAD⁺二窒素レダクターゼaDP-D-リボシルトランスフェラーゼ。遺伝子変異は、以下のうちの1つ以上をもたらず突然変異であってもよい：NifAもしくはグルタミナーゼの発現もしくは活性の増加；NifL、NtrB、グルタミン合成酵素、GlnB、GlnK、DraT、AmtBの発現もしくは活性の減少；GlnEのアデニリル除去活性の減少；またはGlnDのウリジリル除去活性の減少。遺伝子変異は、bcssi、bcssii、yjbE、fhaB、pehA、otsB、treZ、glsA2、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される遺伝子の変異であり得る。いくつかの実施形態では、遺伝子変異は、本開示を通して記載される遺伝子のいずれかにおける変異であり得る。

【0122】

遺伝子変異の導入は、1、2、3、4、5、10、25、50、100、250、500個、またはそれよりも多くのヌクレオチドなどの、標的部位のうちの1つ以上のヌクレオチドの挿入及び/または欠失を含んでもよい。本明細書に開示されている方法の1つ以上の細菌に導入された遺伝子変異は、ノックアウト突然変異（例えば、プロモーターの欠失、中途終止コドンを生じる挿入または欠失、全遺伝子の欠失）であってもよく、また

は、タンパク質ドメインの活性の排除もしくは消失（例えば、活性部位に影響を及ぼす点突然変異、またはタンパク質産物の関連部分をコードする遺伝子の部分の欠失）であってもよく、または標的遺伝子の調節配列の変更もしくは消失であってもよい。また、異種調節配列、及び遺伝子変異が導入されている細菌に対応する細菌種または属のゲノム内に見出される調節配列を含む、1つ以上の調節配列を挿入してもよい。さらに、調節配列は、細菌培養物の、または植物組織内の遺伝子の発現レベルに基づいて選択してもよい。遺伝子変異は、標的部位に特異的に導入される所定の遺伝子変異であってもよい。遺伝子変異は、標的部位内のランダム突然変異であってもよい。遺伝子変異は、1つ以上のヌクレオチドの挿入または欠失であってもよい。一部の場合では、形質向上を評価するために細菌を植物に曝露する前に、複数の異なる遺伝子変異（例えば、2、3、4、5、10個、またはそれよりも多く）が、単離された細菌のうちの1つ以上に導入される。複数の遺伝子変異は、上記のタイプのいずれであってもよく、同じタイプであってもよく、または異なるタイプであってもよく、任意の組合せであってもよい。一部の場合では、複数の異なる遺伝子変異は、複数の遺伝子変異が細菌に蓄積され、向上された形質が関連する植物に徐々に付与されるように、連続的に、第1の単離ステップ後に第1の遺伝子変異を導入し、第2の単離ステップ後に第2の遺伝子変異を導入するなど導入される。

10

【0123】

遺伝子変異 - ゲノム変更を導入する方法

一般的に、用語「遺伝子変異」は、基準ゲノムもしくはその部分または基準遺伝子もしくはその部分などの基準ポリヌクレオチドと比べた、ポリヌクレオチド配列に導入される任意の変更を指す。遺伝子変異は、「突然変異」と呼ばれる場合もあり、遺伝子変異を含む配列または生物は、「遺伝子変異体」または「突然変異体」と呼ばれる場合がある。遺伝子変異は、遺伝子発現、代謝、及び細胞シグナル伝達を含む、ある生物活性の増加または減少などの、任意の数の効果を示してもよい。遺伝子変異は、標的部位に特異的に導入されてもよく、またはランダムに導入されてもよい。遺伝子変異を導入するための様々な分子ツール及び方法が利用可能である。例えば、遺伝子変異は、ポリメラーゼ連鎖反応突然変異誘発、オリゴヌクレオチド誘導突然変異誘発、飽和突然変異誘発、断片シャッフリング突然変異誘発、相同組換え、組換え操作（*recombineering*）、*Lambda* *red* 媒介性組換え、*CRISPR/Cas9*系、化学的突然変異誘発、及びそれらの組合せにより導入することができる。遺伝子変異を導入するための化学的方法としては、DNAを、化学的突然変異原、例えば、エチルメタンスルホン酸（EMS）、メチルメタンスルホン酸（MMS）、N-ニトロソ尿素（ENU）、N-メチル-N-ニトロ-N'-ニトロソグアニジン、4-ニトロキノリンN-オキシド、硫酸ジエチル、ベンゾピレン、シクロホスファミド、プレオマイシン、トリエチルメラミン、アクリルアミドモノマー、ナイトロジェンマスタード、ピンクリスチン、ジエポキシアルカン（例えば、ジエポキシブタン）、ICR-170、ホルムアルデヒド、塩酸プロカルバジン、エチレンオキシド、ジメチルニトロソアミン、7,12ジメチルベンズ（a）アントラセン、クロラムブシル、ヘキサメチルホスホラミド、ビスルファン（*bisulfan*）などに曝露することが挙げられる。放射線突然変異誘導因子としては、紫外線、線、X線、及び高速中性子衝撃が挙げられる。また、例えば、トリメチルソラレンを紫外光と共に使用して、核酸に遺伝子変異を導入することができる。可動DNA要素、例えば転移因子のランダムな挿入または標的挿入は、遺伝子変異を生成するための別の好適な方法である。遺伝子変異は、例えば、エラープローンPCRなどのポリメラーゼ連鎖反応（PCR）技法を使用して、無細胞 *in vitro*系での増幅中に核酸に導入してもよい。遺伝子変異は、DNAシャッフリング技法（例えば、エクソンシャッフリング、ドメインスワッピングなど）を使用して、*in vitro*で核酸に導入してもよい。また、遺伝子変異は、細胞のDNA修復酵素の欠損の結果として核酸に導入することができ、例えば、突然変異DNA修復酵素をコードする突然変異遺伝子が細胞に存在すると、その細胞のゲノムには、高頻度の突然変異（つまり、約1個の突然変異/100遺伝子~1個の突然変異/10,000遺伝子）が生成されることが予想される。DNA修復酵素をコードする遺伝子の例と

20

30

40

50

しては、これらに限定されないが、Mut H、Mut S、Mut L、及びMut U、ならびに他の種におけるそれらのホモログ（例えば、MSH 16、PMS 12、MLH 1、GTBP、及びERCC-1など）が挙げられる。遺伝子変異を導入するための種々の方法の例示的な記載は、例えば、Stemple (2004) Nature 5: 1-7; Chiang et al. (1993) PCR Methods Appl 2(3): 210-217; Stemmer (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 10747-10751; ならびに米国特許第6,033,861号及び同第6,773,900号に提供されている。

【0124】

微生物に導入される遺伝子変異は、トランスジェニック、シスジェニック、ゲノム内、属内、属間、合成、進化、再構成、またはSNPとして分類することができる。

10

【0125】

遺伝子変異を、微生物内の多数の代謝経路に導入して、上述の形質の向上を誘発することができる。代表的な経路としては、硫黄取込み経路、グリコーゲン合成、グルタミン調節経路、モリブデン取込み経路、窒素固定経路、アンモニア同化、アンモニア排出または分泌、窒素取込み、グルタミン合成、コロニー形成経路、アナモックス、リン酸塩可溶化、有機酸輸送、有機酸産生、凝集素産生、活性酸素ラジカルスカベンジング遺伝子、インドール酢酸合成、トレハロース合成、植物細胞壁分解酵素または経路、根付着遺伝子、菌体外多糖分泌、グルタミン酸合成酵素経路、鉄取込み経路、シデロフォア経路、キチナーゼ経路、ACCデアミナーゼ、グルタチオン合成、亜リン酸シグナル伝達遺伝子、クオラムクエンチング経路、チトクロム経路、ヘモグロビン経路、細菌ヘモグロビン様経路、スモールRNA rsmZ、リゾビトキシン合成、lapA接着タンパク質、AHLクオラムセンシング経路、フェナジン合成、環状リポペプチド合成、及び抗生物質産生が挙げられる。

20

【0126】

CRISPR/Cas9（クラスターを形成し規則正しい間隔を持つ短いパンドロームリピート）/CRISPR関連（Cas）系を使用して、所望の変異を導入することができる。CRISPR/Cas9は、CRISPR RNA（crRNA）を使用して、侵入核酸のサイレンシングをガイドすることにより、ウイルス及びプラスミドに対する適応免疫を細菌及び古細菌に提供する。Cas9タンパク質（またはその機能的等価体及び/または変異体、つまりCas9様タンパク質）は、このタンパク質と、crRNA及びtracrRNA（ガイドRNAとも呼ばれる）と呼ばれる2つの天然または合成RNA分子との結合に依存するDNAエンドヌクレアーゼ活性を天然で含有する。一部の場合では、2つの分子は、共有結合で連結され、単一分子（単鎖ガイドRNA（「sgRNA」）とも呼ばれる）を形成する。したがって、Cas9またはCas9様タンパク質は、DNAを標的とするRNA（この用語は、2分子ガイドRNA構成及び単一分子ガイドRNA構成を両方とも包含する）と結合し、それによりCas9またはCas9様タンパク質を活性化し、このタンパク質が標的核酸配列にガイドされる。Cas9またはCas9様タンパク質は、その天然酵素機能が維持されている場合、標的DNAを切断して、二本鎖切断を作成し、それによりゲノム変更（つまり、編集：欠失、挿入（ドナーポリヌクレオチドが存在する場合）、置換など）をもたらすことができ、それにより遺伝子発現が変更される。Cas9の一部の変異体（変異体は、用語Cas9様により包含される）は、DNA切断活性の減少を示すように変更されている（一部の場合では、標的DNAの両鎖ではなく1本の鎖を切断し、他の場合には、著しく還元されて、DNA切断活性を示さない）。遺伝子変異を導入するためのCRISPR系のさらなる例示的な記載は、例えば、US8795965に見出すことができる。

30

40

【0127】

サイクル増幅技法として、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）突然変異誘発では、変異原性プライマーを使用して、所望の突然変異を導入する。PCRは、変性、アニーリング、及び伸長のサイクルで実施される。PCRによる増幅後、突然変異DNAの選択及び親ブ

50

ラスミドDNAの除去は、以下のようにして達成することができる：1) PCR中にdCTPをヒドロキシメチル化dCTPで置換し、その後制限酵素で消化して、非ヒドロキシメチル化親DNAのみを除去する；2) 抗生物質耐性遺伝子及び研究対象遺伝子を両方とも同時に突然変異誘発させ、プラスミドを異なる抗生物質耐性を有するように変化させ、新たな抗生物質耐性により、その後の所望の突然変異の選択が容易になる；3) 所望の突然変異を導入した後、メチル化DNAのみを切断する制限酵素DpnIにより親メチル化鋳型DNAを消化し、それにより突然変異誘発非メチル化鎖を回収する；または4) 突然変異PCR産物を、追加のライゲーション反応で環状化して、突然変異DNAの形質転換効率を増加させる。例示的な方法のさらなる記載は、例えば、US 7 1 3 2 2 6 5、US 6 7 1 3 2 8 5、US 6 6 7 3 6 1 0、US 6 3 9 1 5 4 8、US 5 7 8 9 1 6 6 号、US 5 7 8 0 2 7 0、US 5 3 5 4 6 7 0、US 5 0 7 1 7 4 3、及びUS 2 0 1 0 0 2 6 7 1 4 7に見出すことができる。

【0128】

部位特異的突然変異誘発とも呼ばれるオリゴヌクレオチド誘導突然変異誘発では、典型的には、合成DNAプライマーが利用される。この合成プライマーは、所望の突然変異を含有し、目的の遺伝子のDNAとハイブリダイズすることができるように、突然変異部位付近の鋳型DNAと相補的である。突然変異は、単一塩基の変更(点突然変異)、複数塩基の変更、欠失、または挿入、またはこれらの組合せであってもよい。その後、DNAポリメラーゼを使用して、一本鎖プライマーを伸長させ、それにより遺伝子の残りを複製する。このように複製された遺伝子は、突然変異部位を含有し、その後ベクターとしての宿主細胞に導入し、クローニングしてもよい。最後に、突然変異体をDNA配列決定により選択して、それらが所望の突然変異を含有することを確認することができる。

【0129】

遺伝子変異は、エラープローンPCRを使用して導入してもよい。この技法では、目的の遺伝子は、配列複製の忠実度が不十分である条件下でDNAポリメラーゼを使用して増幅される。その結果、増幅産物は、少なくとも1つのエラーを配列に含有する。遺伝子を増幅し、得られた反応産物(複数可)が、鋳型分子と比較して1つ以上の変更を配列に含有する場合、得られた産物は、鋳型と比較して突然変異誘発されている。ランダム突然変異を導入する別の手段は、細胞を、ニトロソグアニジンまたはエチルメタンスルホン酸などの化学的突然変異原に曝露し(Nestmann, Mutat Res 1975 June; 28(3): 323-30)、その後、その遺伝子を含むベクターを宿主から単離することである。

【0130】

飽和突然変異誘発は、別の形態のランダム突然変異誘発であり、特異的部位にまたは遺伝子の狭い領域に、全ての、またはほぼ全ての考え得る突然変異を生成しようとするものである。一般的な意味では、飽和突然変異誘発は、突然変異誘発させようとする確定ポリヌクレオチド配列(突然変異誘発させようとする配列の長さは、例えば15~100,000塩基である)に変異原性カセットの完全なセット(各カセットの長さは、例えば1~500塩基である)を突然変異誘発させることで構成されている。したがって、一群の突然変異(例えば、1~100個までの範囲の突然変異)が、突然変異誘発させようとする各カセットに導入される。1つのカセットに導入される突然変異のグループ分けは、飽和突然変異誘発の1ラウンドを行っている間に第2のカセットに導入される突然変異の第2のグループ分けと異なってもよく、または同じであってもよい。そのようなグループ分けは、欠失、付加、特定のコドンのグループ分け、及び特定のヌクレオチドカセットのグループ分けにより例示される。

【0131】

DNAシャッフリングとも呼ばれる断片シャッフリング突然変異誘発は、有益な突然変異を迅速に増幅させる方法である。シャッフリングプロセスの一例では、DNAseを使用して、1セットの親遺伝子を、例えば長さが約50~100bpの小片に断片化する。その後、プライマーを用いないポリメラーゼ連鎖反応(PCR)が続き、十分な重複相同

性配列を有するDNA断片が互いにアニーリングすることになり、その後DNAポリメラーゼにより伸長される。DNA分子のいくつかが親遺伝子のサイズに到達した後も、このPCR伸長を数ラウンド行う。その後、これら遺伝子を、次に、鎖の末端に相補的になるように設計したプライマーを添加した別のPCRで増幅してもよい。プライマーは、クローニングベクターへのライゲーションに必要とされる制限酵素認識部位の配列などの追加の配列が、それらの5'末端に付加されてもよい。シャッフリング技法のさらなる例は、US 20050266541に提供されている。

【0132】

相同組換え突然変異誘発は、外因性DNA断片と標的ポリヌクレオチド配列との間の組換えを含む。二本鎖切断が生じた後、切断の5'末端付近のDNAの区画は、切除と呼ばれるプロセスで切り離される。その後のストランド侵入ステップでは、切断されたDNA分子の突出3'末端が、切断されていない類似のまたは同一のDNA分子に「侵入」する。この方法を使用すると、遺伝子を欠失させ、エキソンを除去し、遺伝子を付加し、点突然変異を導入することができる。相同組換え突然変異誘発は、恒久的であってもよく、または暫定的であってもよい。典型的には、組換え鑄型も提供される。組換え鑄型は、別のベクターの成分であってもよく、別個のベクターに含有されていてもよく、または別個のポリヌクレオチドとして提供されてもよい。いくつかの実施形態では、組換え鑄型は、部位特異的ヌクレアーゼによりニックまたは切断される標的配列内または付近などで相同組換えの鑄型としての役目を果たすように設計されている。鑄型ポリヌクレオチドは、長さが約10個もしくはそれよりも多く、約15個もしくはそれよりも多く、約20個もしくはそれよりも多く、約25個もしくはそれよりも多く、約50個もしくはそれよりも多く、約75個もしくはそれよりも多く、約100個もしくはそれよりも多く、約150個もしくはそれよりも多く、約200個もしくはそれよりも多く、約500個もしくはそれよりも多く、約1000個もしくはそれよりも多く、またはそれよりも多くのヌクレオチドなど、任意の好適な長さであってもよい。いくつかの実施形態では、鑄型ポリヌクレオチドは、標的配列を含むポリヌクレオチドの部分に相補的である。鑄型ポリヌクレオチドは、最適にアランメントされる場合、標的配列のうちの1つ以上のヌクレオチドと重複してもよい（例えば、約1個もしくはそれよりも多く、約5個もしくはそれよりも多く、約10個もしくはそれよりも多く、約15個もしくはそれよりも多く、約20個もしくはそれよりも多く、約25個もしくはそれよりも多く、約30個もしくはそれよりも多く、約35個もしくはそれよりも多く、約40個もしくはそれよりも多く、約45個もしくはそれよりも多く、約50個もしくはそれよりも多く、約60個もしくはそれよりも多く、約70個もしくはそれよりも多く、約80個もしくはそれよりも多く、約90個もしくはそれよりも多く、約100個もしくはそれよりも多く、またはそれよりも多くのヌクレオチド）。いくつかの実施形態では、鑄型配列及び標的配列を含むポリヌクレオチドが最適にアランメントされる場合、鑄型ポリヌクレオチドの最も近いヌクレオチドは、標的配列から、約1個、5個、10個、15個、20個、25個、50個、75個、100個、200個、300個、400個、500個、1000個、5000個、10000個またはそれよりも多くのヌクレオチド内にある。相同組換えの方法に有用な部位特異的ヌクレアーゼの非限定的な例としては、ジンクフィンガーヌクレアーゼ、CRISPRヌクレアーゼ、TALEヌクレアーゼ、及びメガヌクレアーゼが挙げられる。そのようなヌクレアーゼの使用に関するさらなる記載は、例えば、US 8795965及びUS 20140301990を参照のこと。

【0133】

化学的突然変異原または放射線を含む、主として点突然変異、ならびに短い欠失、挿入、転換、及び/または転移を作成する突然変異原を使用して、遺伝子変異を作成してもよい。突然変異原としては、これらに限定されないが、エチルメタンスルホン酸、メチルメタンスルホン酸、N-エチル-N-ニトロソ尿素(nitrosurea)、トリエチルメラミン、N-メチル-N-ニトロソ尿素、プロカルバジン、クロラムブシル、シクロホスファミド、硫酸ジエチル、アクリルアミドモノマー、メルファラン、ナイトロジェンマ

10

20

30

40

50

スタード、ピンクリスチン、ジメチルニトロソアミン、N - メチル - N ' - ニトロ - ニトロソグアニジン、ニトロソグアニジン、2 - アミノプリン、7 , 1 2ジメチル - ベンズ (a) アントラセン、エチレンオキシド、ヘキサメチルホスホラミド、ビスルファン、ジエポキシアルカン (ジエポキシオクタン、ジエポキシブタンなど)、2 - メトキシ - 6 - クロロ - 9 [3 - (エチル - 2 - クロロ - エチル) アミノプロピルアミノ] アクリジン二塩酸塩、及びホルムアルデヒドが挙げられる。

【 0 1 3 4 】

遺伝子変異の導入は、不完全なプロセスであってもよく、細菌の処理集団中の一部の細菌は、所望の突然変異を保持するが、他のものは保持していない。一部の場合では、所望の遺伝子変異を保持する細菌が富化されるように、選択圧を加えることが望ましい。伝統的には、成功する遺伝子変異体の選択は、抗生物質耐性遺伝子の挿入または非致死性化合物を致死性代謝物へと変換することが可能な代謝活性の消失の場合など、遺伝子変異により機能が付与または消失されたものを選択することまたはそれらに対して選択することを含んでいた。所望の遺伝子変異のみの導入を必要とする (例えば、選択可能なマーカーもまた必要としない) ように、ポリヌクレオチド配列自体に基づく選択圧を加えることも可能である。この場合、選択圧は、遺伝子変異を導入することが求められている基準配列に対して選択が効果的に向けられるように、標的部位に導入される遺伝子変異が欠如したゲノムを切断することを含んでもよい。典型的には、切断は、標的部位の 1 0 0 個ヌクレオチド内で生じる (例えば、標的部位から 7 5 個、5 0 個、2 5 個、1 0 個、またはそれより少数のヌクレオチド内、標的部位でのまたは標的部位内での切断を含む)。切断は、ジ

10

20

【 0 1 3 5 】

C R I S P Rヌクレアーゼを部位特異的ヌクレアーゼとして使用して、標的部位に切断を指示してもよい。突然変異微生物の選択の向上は、C a s 9 を使用して非突然変異細胞を死滅させることにより得ることができる。その後、植物に突然変異微生物を接種して共生を再確認し、進化的圧力を作成して、効率的な共生生物を選択する。その後、微生物を植物組織から再単離してもよい。非変異体に対する選択に用いられる C R I S P Rヌクレアーゼ系は、相同組換えの鑄型が提供されないこと以外は、遺伝子変異の導入に関して上述されているものと同様のエレメントを用いることができる。したがって、標的部位に指示された切断は、影響を受ける細胞の死を増強する。

30

【 0 1 3 6 】

標的部位での切断を特異的に誘導するための他の選択肢は、ジंकフィンガーヌクレアーゼ、T A L Eヌクレアーゼ (T A L E N) 系、及びメガヌクレアーゼなどが利用可能である。ジंकフィンガーヌクレアーゼ (Z F N) は、ジंकフィンガーDNA結合ドメインをDNA切断ドメインに融合させることにより生成された人工DNAエンドヌクレアーゼである。Z F Nは、所望のDNA配列を標的とするように導入操作することができ、それにより、ジंकフィンガーヌクレアーゼは、固有の標的配列を切断することが可能になる。Z F Nは、細胞内に導入される場合、二本鎖切断を誘導することにより細胞の標的DNA (例えば、細胞のゲノム) を編集するために使用することができる。転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ (T A L E N) は、T A L (転写活性化因子様) エフェクターDNA結合ドメインをDNA切断ドメインに融合させることにより生成された人工DNAエンドヌクレアーゼである。T A L E Nは、事実上任意の所望のDNA配列に結合するよう迅速に導入操作することができ、細胞内に導入される場合、T A L E Nは、二本鎖切断を誘導することにより細胞の標的DNA (例えば、細胞のゲノム) を編集するために使

40

50

用することができる。メガヌクレアーゼ（ホーミングエンドヌクレアーゼ）は、大型認識部位（12～40塩基対の二本鎖DNA配列）により特徴付けられるエンドデオキシリボヌクレアーゼである。メガヌクレアーゼを使用して、高度に標的化された様式で配列を置換、排除、または改変することができる。タンパク質導入操作によりそれらの認識配列を改変することにより、標的配列を変更することができる。メガヌクレアーゼは、細菌、植物、または動物に関わらず、あらゆるゲノムタイプの改変に使用することができ、通例では、4つのファミリー：LAGLIDADGファミリー（配列番号1）、GIY-YIGファミリー、His-Cysトボックスファミリー、及びHNHファミリーに分類される。例示的なホーミングエンドヌクレアーゼとしては、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、及びI-TevIIIが挙げられる。

10

【0137】

遺伝子変異 - 特定方法

本開示の微生物は、微生物へ導入されている1つ以上の遺伝子改変または変更により特定することができる。遺伝子改変または変更を特定することができる1つの方法は、遺伝子改変または変更を特定するのに十分な微生物のゲノム配列の部分を含む配列番号を参照することによる。

【0138】

さらに、遺伝子改変または変更がそれらのゲノムに導入されていない微生物（例えば、野生型、WT）の場合、本開示では、16S核酸配列を使用して、微生物を特定することができる。16S核酸配列は、「分子マーカー」または「遺伝子マーカー」の例であり、核酸配列の特徴の差異を視覚化するための方法に使用される指標を指す。他のそのような指標の例は、制限断片長多型（RFLP）マーカー、増幅断片長多型（AFLP）マーカー、一塩基多型（SNP）、挿入突然変異、マイクロサテライトマーカー（SSR）、配列特徴的増幅領域（SCAR）、切断増幅多型配列（CAPS）マーカー、またはアイソザイムマーカー、または特定の遺伝子及び染色体位置を規定する本明細書に記載のマーカーの組合せである。マーカーとしては、16Sまたは18S rRNAをコードするポリヌクレオチド配列、及び互いと比較して関係性または特徴の解明に特に有用であることが証明されている小サブユニットrRNA遺伝子と大サブユニットrRNA遺伝子との間に見出される配列である内部転写スペーサー（ITS）配列がさらに挙げられる。さらに、本開示は、本明細書で開示された微生物を特定するために、目的の遺伝子（例えば、nifH、D、K、L、A、glnE、amtBなど）に見出される固有配列を使用する。

20

30

【0139】

主要rRNAサブユニット16Sの一次構造は、異なる速度で進化し、ドメインなどの非常に古代の系統、及び属などのより現代的な系統の両方の分解を可能にする保存された領域、可変領域、及び超可変領域の特定の組合せを含む。16Sサブユニットの二次構造は、残基の約67%の塩基対合をもたらすおよそ50個のヘリックスを含む。こうした高度に保存された二次構造機能は、機能的に非常に重要であり、複数配列アラインメント及び系統学的分析における位置的相同性を確保するために使用することができる。これまで数十年間にわたって、16S rRNA遺伝子は、最も多く配列決定された分類学的マーカーになっており、細菌及び古細菌の現在の系統的分類の基盤である（Yarza et al. 2014. Nature Rev. Micro. 12: 635-45）。

40

【0140】

したがって、ある特定の態様では、本開示は、表23、24、30、31、及び32、におけるいずれかの配列と少なくとも約70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の配列同一性を共有する配列を提供する。

50

【 0 1 4 1 】

したがって、ある特定の態様では、本開示は、配列番号 6 2 ~ 3 0 3 に対して少なくとも約 7 0 %、7 1 %、7 2 %、7 3 %、7 4 %、7 5 %、7 6 %、7 7 %、7 8 %、7 9 %、8 0 %、8 1 %、8 2 %、8 3 %、8 4 %、8 5 %、8 6 %、8 7 %、8 8 %、8 9 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 % または 1 0 0 % の配列同一性を共有する配列を含む微生物を提供する。これらの配列及びその関連の記載は、表 3 1 及び 3 2 に見出され得る。

【 0 1 4 2 】

いくつかの態様では、本開示は、配列番号 8 5、9 6、1 1 1、1 2 1、1 2 2、1 2 3、1 2 4、1 3 6、1 4 9、1 5 7、1 6 7、2 6 1、2 6 2、2 6 9、2 7 7 ~ 2 8 3 と少なくとも約 7 0 %、7 1 %、7 2 %、7 3 %、7 4 %、7 5 %、7 6 %、7 7 %、7 8 %、7 9 %、8 0 %、8 1 %、8 2 %、8 3 %、8 4 %、8 5 %、8 6 %、8 7 %、8 8 %、8 9 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 % または 1 0 0 % の配列同一性を共有する 1 6 S 核酸配列を含む微生物を提供する。これらの配列及びその関連の記載は、表 3 2 に見出され得る。

10

【 0 1 4 3 】

いくつかの態様では、本開示は、配列番号 8 6 ~ 9 5、9 7 ~ 1 1 0、1 1 2 ~ 1 2 0、1 2 5 ~ 1 3 5、1 3 7 ~ 1 4 8、1 5 0 ~ 1 5 6、1 5 8 ~ 1 6 6、1 6 8 ~ 1 7 6、2 6 3 ~ 2 6 8、2 7 0 ~ 2 7 4、2 7 5、2 7 6、2 8 4 ~ 2 9 5 と少なくとも約 7 0 %、7 1 %、7 2 %、7 3 %、7 4 %、7 5 %、7 6 %、7 7 %、7 8 %、7 9 %、8 0 %、8 1 %、8 2 %、8 3 %、8 4 %、8 5 %、8 6 %、8 7 %、8 8 %、8 9 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 % または 1 0 0 % の配列同一性を共有する核酸配列を含む微生物を提供する。これらの配列及びその関連の記載は、表 3 2 に見出され得る。

20

【 0 1 4 4 】

ある特定の態様では、本開示は、配列番号 1 7 7 ~ 2 6 0、2 9 6 ~ 3 0 3 に対して少なくとも約 7 0 %、7 1 %、7 2 %、7 3 %、7 4 %、7 5 %、7 6 %、7 7 %、7 8 %、7 9 %、8 0 %、8 1 %、8 2 %、8 3 %、8 4 %、8 5 %、8 6 %、8 7 %、8 8 %、8 9 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 % または 1 0 0 % の配列同一性を共有する核酸配列を含む微生物を提供する。これらの配列及びその関連の記載は、表 3 2 に見出され得る。

30

【 0 1 4 5 】

いくつかの態様では、本開示は、配列番号 3 0 4 ~ 4 2 4 と少なくとも約 7 0 %、7 1 %、7 2 %、7 3 %、7 4 %、7 5 %、7 6 %、7 7 %、7 8 %、7 9 %、8 0 %、8 1 %、8 2 %、8 3 %、8 4 %、8 5 %、8 6 %、8 7 %、8 8 %、8 9 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 % または 1 0 0 % の配列同一性を共有する核酸配列を含む微生物、またはプライマー、またはプローブ、または非天然ジャンクション配列を提供する。これらの配列及びその関連の記載は、表 3 0 に見出され得る。

【 0 1 4 6 】

いくつかの態様では、本開示は、配列番号 3 7 2 ~ 4 0 5 と少なくとも約 7 0 %、7 1 %、7 2 %、7 3 %、7 4 %、7 5 %、7 6 %、7 7 %、7 8 %、7 9 %、8 0 %、8 1 %、8 2 %、8 3 %、8 4 %、8 5 %、8 6 %、8 7 %、8 8 %、8 9 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 % または 1 0 0 % の配列同一性を共有する非天然ジャンクション配列を含む微生物を提供する。これらの配列及びその関連の記載は、表 3 0 に見出され得る。

40

【 0 1 4 7 】

いくつかの態様では、本開示は、配列番号 7 7、7 8、8 1、8 2、または 8 3 と少なくとも約 7 0 %、7 1 %、7 2 %、7 3 %、7 4 %、7 5 %、7 6 %、7 7 %、7 8 %、7 9 %、8 0 %、8 1 %、8 2 %、8 3 %、8 4 %、8 5 %、8 6 %、8 7 %、8 8 %、

50

89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の配列同一性を共有するアミノ酸配列を含む微生物を提供する。これらの配列及びその関連の記載は、表31に見出され得る。

【0148】

遺伝子変異 - 検出方法：プライマー、プローブ、及びアッセイ

本開示は、本明細書で教示された微生物の検出に有用なプライマー、プローブ、及びアッセイを教示する。いくつかの態様では、本開示は、WT親株を検出するための方法を提供する。他の態様では、本開示は、WT菌株に由来する非属間の導入操作された微生物を検出するための方法を提供する。一態様では、本開示は、微生物の非属間遺伝子変更を特定するための方法を提供する。

10

【0149】

複数の態様では、本開示のゲノム導入操作法は、誘導された非属間微生物中の非天然ヌクレオチド「ジャンクション」配列の生成に結び付く。こうした天然に存在しないヌクレオチドジャンクションを、本明細書で教示された微生物における特定の遺伝子改変の存在を示す特徴的タイプとして使用することができる。

【0150】

本技法は、固有に設計されたプライマー及びプローブを含む特化した定量的PCR法を使用することにより、こうした天然に存在しないヌクレオチドジャンクションを検出することができる。いくつかの態様では、本開示のプローブは、天然に存在しないヌクレオチドジャンクション配列に結合する。いくつかの態様では、従来のPCRが使用される。他の態様では、リアルタイムPCRが使用される。いくつかの態様では、定量的PCR (qPCR) が使用される。

20

【0151】

したがって、本開示は、リアルタイムでPCR産物を検出するための2つの一般的な方法の使用を包含することができる：(1)任意の二本鎖DNAにインターカレートする非特異的蛍光色素、及び(2)プローブがその相補的配列とハイブリダイゼーションした後でのみ検出が可能になる蛍光レポーターで標識されているオリゴヌクレオチドで構成される配列特異的DNAプローブ。いくつかの態様では、天然に存在しないヌクレオチドジャンクションのみが、教示されるプライマーにより増幅されることになり、結果的に、非特異的色素または特異的ハイブリダイゼーションプローブの使用のいずれかにより検出することができる。他の態様では、本開示のプライマーは、プライマーがジャンクション配列のいずれかの側に隣接するように選択され、したがって、増幅反応が生じると、ジャンクション配列が存在する。

30

【0152】

本開示の態様は、天然に存在しないヌクレオチドジャンクション配列分子それ自体に加えて、穏やかな~ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で、天然に存在しないヌクレオチドジャンクション配列に結合することが可能な他のヌクレオチド分子を含む。いくつかの態様では、穏やかな~ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で、天然に存在しないヌクレオチドジャンクション配列に結合することが可能なヌクレオチド分子は、「ヌクレオチドプローブ」と名付けられる。

40

【0153】

一態様では、ゲノムDNAを、試料から抽出し、qPCRを使用することにより本開示の微生物の存在を定量化するために使用することができる。qPCR反応に使用されるプライマーは、野生型ゲノムの固有領域または導入操作された非属間突然変異体菌株の固有領域を増幅するように、Primer Blast (www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/)により設計されたプライマーであってもよい。qPCR反応は、SYBR GreenER qPCR SuperMix Universal (Thermo Fisher P/N11762100)キットを使用し、フォワード及びリバース増幅プライマーのみを使用して実施してもよく、あるいはKapa Probe Forceキット (Kapa Biosystems P /

50

N K K 4 3 0 1) を、増幅プライマーと、5'末端のFAM色素標識、内部ZENクエンチャー、ならびに3'末端の副溝結合剤及び蛍光クエンチャーを含むTaqManプローブ(Integrated DNA Technologies)とを用いて使用してもよい。

【0154】

ある特定のプライマー、プローブ、及び非天然ジャンクション配列は、表30に列挙されている。qPCR反応効率は、標的ゲノムに由来する既知量のgDNAから生成される標準曲線を使用して測定することができる。データは、組織重量及び抽出容積を使用して、生重量1g当たりのゲノムコピー数に正規化することができる。

【0155】

定量的ポリメラーゼ連鎖反応(qPCR)は、1つ以上の核酸配列の増幅を、リアルタイムで定量化するための方法である。PCRアッセイのリアルタイム定量化は、増幅中の目的の核酸及び校正標準としての役目を果たすことができる適切な対照核酸配列を比較することにより、PCR増幅ステップにより生成されている核酸の量の決定を可能にする。

【0156】

TaqManプローブは、標的核酸配列を定量化するために特異性を増加させることが必要なqPCRアッセイで使用されることが多い。TaqManプローブは、5'末端に付着されたフルオロフォア、及びプローブの3'末端に付着されたクエンチャーを有するオリゴヌクレオチドプローブを含む。TaqManプローブが、プローブの5'及び3'末端が依然として互いに緊密に接触したままである場合、クエンチャーは、フルオロフォアからの蛍光シグナル伝達を防止する。TaqManプローブは、特異的なプライマーセットにより増幅される核酸領域内にアニーリングするように設計されている。Taqポリメラーゼが、プライマーを伸長し、新生鎖を合成するときに、Taqポリメラーゼの5'から3'へのエキソヌクレアーゼ活性により、鋳型にアニーリングしたプローブが分解される。このプローブ分解によりフルオロフォアが放出されるため、クエンチャーへの緊密な近接が破られ、フルオロフォアの蛍光が可能になる。qPCRアッセイで検出される蛍光は、放出されるフルオロフォア及び反応中に存在するDNA鋳型の量に正比例する。

【0157】

qPCRの機能は、実施者が、従来のPCRアッセイの増幅産物の観察に一般的に必要なとされる労働集約的なゲル電気泳動調製の増幅後ステップを排除することを可能にする。従来のPCRに対するqPCRの利益は大きく、利益としては、速さの増加、使いやすさ、再現性、及び定量化能力が挙げられる。

【0158】

形質の改善

本開示の方法は、様々な望ましい形質のうちの1つまたは複数を導入または向上させるために用いることができる。導入または向上される形質の例としては、以下のものが挙げられる：根バイオマス、根長、丈、苗条長、葉数、水利用効率、全体的バイオマス、収穫高、果実サイズ、穀粒サイズ、光合成速度、干ばつ耐性、耐熱性、耐塩性、線虫ストレス耐性、真菌病原体耐性、細菌病原体耐性、ウイルス病原体耐性、代謝物のレベル、及びプロテオーム発現。丈、全体的バイオマス、根及び/または苗条バイオマス、種子発芽、実生生存、光合成効率、蒸散率、種子/果実数または質量、植物穀物または果実の収穫高、葉葉緑素含有量、光合成速度、根長、またはそれらの任意の組合せを含む望ましい形質を使用して、成長を測定することができ、同一条件下で栽培された基準農業植物(例えば、向上された形質を有していない植物)の成長速度と比較することができる。

【0159】

導入または向上される好ましい形質は、本明細書に記載されているような窒素固定である。導入または向上される第2の好ましい形質は、本明細書に記載されているようなコロニー形成能力である。一部の場合では、本明細書に記載の方法から生じる植物は、同じ土壌条件下で栽培された基準農業植物よりも少なくとも約5%超、例えば、少なくとも約5%、少なくとも約8%、少なくとも約10%、少なくとも約15%、少なくとも約20%

10

20

30

40

50

、少なくとも約 25%、少なくとも約 30%、少なくとも約 40%、少なくとも約 50%、
 少なくとも約 60%、少なくとも約 75%、少なくとも約 80%、少なくとも約 80%
 、少なくとも約 90%、または少なくとも 100%、少なくとも約 200%、少なくとも
 約 300%、少なくとも約 400%、またはそれを超える形質の差異を示す。追加の例で
 は、本明細書に記載の方法から生じる植物は、同様の土壌条件下で栽培された基準農業植
 物よりも少なくとも約 5%超、例えば、少なくとも約 5%、少なくとも約 8%、少なくと
 も約 10%、少なくとも約 15%、少なくとも約 20%、少なくとも約 25%、少なくと
 も約 30%、少なくとも約 40%、少なくとも約 50%、少なくとも約 60%、少なくと
 も約 75%、少なくとも約 80%、少なくとも約 80%、少なくとも約 90%、または少
 なくとも 100%、少なくとも約 200%、少なくとも約 300%、少なくとも約 400
 %、またはそれを超える形質の差異を示す。 10

【0160】

向上される形質は、1つ以上の生物ストレス因子または非生物ストレス因子を適用する
 ことを含む条件下で評価してもよい。ストレス因子の例としては、非生物ストレス（熱ス
 トレス、塩ストレス、干ばつストレス、寒冷ストレス、及び低栄養ストレスなど）及び生
 物ストレス（線虫ストレス、昆虫草食ストレス、真菌病原体ストレス、細菌病原体ストレ
 ス、及びウイルス病原体ストレスなど）が挙げられる。

【0161】

本開示の方法及び組成物により向上された形質は、以前は窒素固定が可能ではなかった
 植物におけるものを含む窒素固定であってもよい。一部の場合では、本明細書に記載の方
 法により単離された細菌は、植物の窒素の 1%以上（例えば、2%、3%、4%、5%、
 6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、またはそれよりも多く）を産生し、
 これは、任意の遺伝子変異を導入する前の第 1 の植物から単離された細菌と比較して、少
 なくとも 2 倍（例えば、3 倍、4 倍、5 倍、6 倍、7 倍、8 倍、9 倍、10 倍、20 倍、
 50 倍、100 倍、1000 倍、またはそれよりも多く）の窒素固定能の増加に相当し得
 る。一部の場合では、細菌は、植物の窒素の 5%以上を産生する。所望のレベルの窒素固
 定は、遺伝子変異を導入するステップ、複数の植物に曝露するステップ、及び改善された
 形質を有する植物から細菌を単離するステップを、1 回または複数回（例えば、1、2、
 3、4、5、10、15、25 回、またはそれよりも多く）繰り返した後で達成されても
 よい。一部の場合では、強化されたレベルの窒素固定は、グルタミン、アンモニア、また
 は窒素の他の化学的供給源を補充した肥料の存在下で達成される。窒素固定の程度を評価
 するための方法は既知であり、それらの例が本明細書に記載される。 20 30

【0162】

微生物品種改良は、作物マイクロバイーム内の種の役割を系統的に特定及び向上させ
 るための方法である。この方法は、以下の 3 つのステップを含む：1) 植物 - 微生物相互
 作用をマッピングし、特定の表現型に関連する調節ネットワークを予測することにより候
 補種を選択すること、2) 調節ネットワーク及び遺伝子クラスターの種内交差により、微
 生物表現型を実用的に及び予測可能に向上させること、ならびに 3) 所望の作物表現型を
 生成する新しい微生物遺伝子型をスクリーニング及び選択すること。菌株の改善を系統的
 に評価するために、微生物群落のコロニー形成動力学を主要な種による遺伝子活性に結び
 付けるモデルを作出する。このモデルを使用して、育種のための遺伝子標的を予測し、農
 学的に関連性のあるマイクロバイームコード形質の改善の選択頻度を改善する。 40

【0163】

農業的に関連性のある圃場背景で送達された窒素の測定

圃場では、送達された窒素の量は、コロニー形成に活性を乗じた関数によって決定する
 ことができる。

【数 1】

$$\text{窒素送達} = \int_{\text{時間及び空間}} \text{コロニー形成} \times \text{活性}$$

【0164】

上記の数式は、(1)植物組織1単位当たりの平均コロニー形成、及び(2)固定された窒素の量または各微生物細胞により排出されるアンモニアの量のいずれかとしての活性を必要とする。1エーカー当たりの窒素のポンドに変換するために、トウモロコシ成長生理学、例えば植物のサイズ及び付随根系を、経時的に成熟段階の全体にわたって追跡する。

10

【0165】

1エーカー - 季節当たりの作物に送達された窒素のポンドは、以下の数式により算出することができる：

【数2】

$$\text{窒素送達} = \int \text{植物組織}(t) \times \text{コロニー形成}(t) \times \text{活性}(t) dt$$

20

【0166】

植物組織(t)は、栽培時間(t)にわたるトウモロコシ植物組織の生重量である。合理的に計算を行うための値は、Roots, Growth and Nutrient Uptake (Mengel, Dept. of Agronomy Pub. #AGRY-95-08 (Rev. May-95, p. 1-8.))と題する刊行物に詳述されている。

【0167】

コロニー形成(t)は、栽培季節中の任意の特定の時間tにおける、植物組織の生重量1グラム当たりの植物組織内に見出される目的の微生物の量である。単一時点のみが利用可能である場合、単一時点は、季節全体のピークコロニー形成速度として正規化され、残りの時点のコロニー形成速度は、それに応じて調整される。

30

【0168】

活性(t)は、栽培季節中の任意の特定の時間tにおいて、Nが、目的の微生物により1単位時間当たりに固定される速度である。本明細書で開示された実施形態では、この活性速度は、5mMグルタミン存在下のARA培地での*in vitro*アセチレン還元アッセイ(ARA)、または5mMアンモニウムイオンの存在下のARA培地でのアンモニウム排出アッセイにより近似される。

【0169】

その後、上記の関数を積分することにより窒素送達量を算出する。上述の変数の値が設定された時点で個別に測定される場合、それら時点間の値は、線形補間を実施することにより近似される。

40

【0170】

窒素固定

本明細書では、植物における窒素固定を増加させる方法であって、植物を、窒素固定を調節する1つまたは複数の遺伝子に導入された1つまたは複数の遺伝子変異を含む細菌に曝露することを含み、細菌が、植物における窒素の1%以上(例えば、2%、5%、10%、またはそれよりも多く)を産生し、この産生が、細菌の不在下での植物と比較して、少なくとも2倍の窒素固定能に相当し得る、該方法が記載される。細菌は、グルタミン、尿素、硝酸塩、またはアンモニアを補充した肥料の存在下で窒素を産生し得る。遺伝子変異は、上記で提供されている例を任意の数及び任意の組合せで含む、本明細書に記載され

50

ている任意の遺伝子変異であってもよい。遺伝子変異は、*nifA*、*nifL*、*ntrB*、*ntrC*、グルタミン合成酵素、*glnA*、*glnB*、*glnK*、*draT*、*amtB*、グルタミナーゼ、*glnD*、*glnE*、*nifJ*、*nifH*、*nifD*、*nifK*、*nifY*、*nifE*、*nifN*、*nifU*、*nifS*、*nifV*、*nifW*、*nifZ*、*nifM*、*nifF*、*nifB*、及び*nifQ*からなる群より選択される遺伝子に導入されてもよい。遺伝子変異は、*nifA*もしくはグルタミナーゼの増加した発現もしくは活性；*nifL*、*ntrB*、グルタミン合成酵素、*glnB*、*glnK*、*draT*、*amtB*の減少した発現もしくは活性；*GlnE*の減少したアデニル除去活性；または*GlnD*の減少したウリジリル除去活性のうちの一つ以上をもたらず突然変異であってもよい。本明細書に開示される方法の一つ以上の細菌に導入された遺伝子変異は、ノックアウト突然変異であってもよいし、またはそれは、標的遺伝子の調節配列を消失させてもよいし、またはそれは、異種調節配列の挿入、例えば、同じ細菌種または属のゲノム内に見出される調節配列の挿入を含んでもよい。調節配列は、細菌培養物中のまたは植物組織内の遺伝子の発現レベルに基づいて選定され得る。遺伝子変異は、化学的突然変異誘発によってもたらされてもよい。ステップ(c)にて栽培された植物を、生物ストレス因子または非生物ストレス因子に曝露してもよい。

10

【0171】

いくつかの実施形態では、本開示のリモデリングされた細菌は、それぞれ、1時間当たりCFU当たり少なくとも約 2×10^{-13} mmolのN、1時間当たりCFU当たり約 2.5×10^{-13} mmolのN、1時間当たりCFU当たり約 3×10^{-13} mmolのN、1時間当たりCFU当たり約 3.5×10^{-13} mmolのN、1時間当たりCFU当たり約 4×10^{-13} mmolのN、1時間当たりCFU当たり約 4.5×10^{-13} mmolのN、1時間当たりCFU当たり約 5×10^{-13} mmolのN、1時間当たりCFU当たり約 5.5×10^{-13} mmolのN、1時間当たりCFU当たり約 6×10^{-13} mmolのN、1時間当たりCFU当たり約 6.5×10^{-13} mmolのN、1時間当たりCFU当たり約 7×10^{-13} mmolのN、1時間当たりCFU当たり約 7.5×10^{-13} mmolのN、1時間当たりCFU当たり約 8×10^{-13} mmolのN、1時間当たりCFU当たり約 8.5×10^{-13} mmolのN、1時間当たりCFU当たり約 9×10^{-13} mmolのN、1時間当たりCFU当たり約 9.5×10^{-13} mmolのN、または1時間当たりCFU当たり約 10×10^{-13} mmolのN、の固定Nを生成する。

20

30

【0172】

いくつかの実施形態では、本開示のリモデリングされた細菌は、それぞれ、1時間当たりCFU当たり少なくとも約 2×10^{-12} mmolのN、1時間当たりCFU当たり約 2.25×10^{-12} mmolのN、1時間当たりCFU当たり約 2.5×10^{-12} mmolのN、1時間当たりCFU当たり約 2.75×10^{-12} mmolのN、1時間当たりCFU当たり約 3×10^{-12} mmolのN、1時間当たりCFU当たり約 3.25×10^{-12} mmolのN、1時間当たりCFU当たり約 3.5×10^{-12} mmolのN、1時間当たりCFU当たり約 3.75×10^{-12} ミリモル、1時間当たりCFU当たり約 4×10^{-12} ミリモル、約1時間当たりCFU当たり 4.25×10^{-12} mmolのN、1時間当たりCFU当たり約 4.5×10^{-12} mmolのN、1時間当たりCFU当たり約 4.75×10^{-12} mmolのN、1時間当たりCFU当たり約 5×10^{-12} mmolのN、1時間当たりCFU当たり約 5.25×10^{-12} mmolのN、1時間当たりCFU当たりの約 5.75×10^{-12} mmolのN、1時間当たりCFU当たり約 6×10^{-12} mmolのN、1時間当たりCFU当たり約 6.25×10^{-12} mmolのN、1時間当たりCFU当たり約 6.5×10^{-12} mmolのN、1時間当たりCFU当たり約 6.75×10^{-12} mmolのN、1時間当たりCFU当たり約 7×10^{-12} mmolのN、1時間当たりCFU当たり約 7.25×10^{-12} mmolのN、1時間当たりCFU当たり約 7.5×10^{-12} mmolのN、1時間当たりCFU当たり約 $7.75 \times$

40

50

10^{-12} mmol の N、1 時間あたり CFU 当たり約 8×10^{-12} mmol の N、1 時間あたり CFU 当たり約 8.25×10^{-12} mmol の N、1 時間あたり CFU 当たり約 8.5×10^{-12} mmol の N、1 時間あたり CFU 当たり約 8.75×10^{-12} mmol の N、1 時間あたり CFU 当たり約 9×10^{-12} mmol の N、1 時間あたり CFU 当たり約 9.25×10^{-12} mmol の N、1 時間あたり CFU 当たり約 9.5×10^{-12} mmol の N、1 時間あたり CFU 当たり約 9.75×10^{-12} mmol の N、または 1 時間あたり CFU 当たり約 10×10^{-12} mmol の N、の固定 N を生成する。

【0173】

いくつかの実施形態では、本開示のリモデリングされた細菌は、それぞれ、1 時間あたり CFU 当たり少なくとも約 5.49×10^{-13} mmol の N の固定 N を生成する。いくつかの実施形態では、本開示のリモデリングされた細菌は、1 時間あたりの CFU あたり少なくとも約 4.03×10^{-13} mmol の N の固定 N を生成する。いくつかの実施形態では、本開示のリモデリングされた細菌は、1 時間あたりの CFU あたり少なくとも約 2.75×10^{-12} mmol の N の固定 N を生成する。

【0174】

いくつかの実施形態では、本開示のリモデリングされた細菌は、全体で、エーカー当たり少なくとも約 15 ポンドの固定 N、エーカー当たり少なくとも約 20 ポンドの固定 N、エーカー当たり少なくとも約 25 ポンドの固定 N、エーカー当たり少なくとも約 30 ポンドの固定 N、エーカー当たり少なくとも約 35 ポンドの固定 N、エーカー当たり少なくとも約 40 ポンドの固定 N、エーカー当たり少なくとも約 45 ポンドの固定 N、エーカー当たり少なくとも約 50 ポンドの固定 N、エーカー当たり少なくとも約 55 ポンドの固定 N、エーカー当たり少なくとも約 60 ポンドの固定 N、エーカー当たり少なくとも約 65 ポンドの固定 N、エーカー当たり少なくとも約 70 ポンドの固定 N、エーカー当たり少なくとも約 75 ポンドの固定 N、エーカー当たり少なくとも約 80 ポンドの固定 N、エーカー当たり少なくとも約 85 ポンドの固定 N、エーカー当たり少なくとも約 90 ポンドの固定 N、エーカー当たり少なくとも約 95 ポンドの固定 N、またはエーカー当たり少なくとも約 100 ポンドの固定 N。

【0175】

いくつかの実施形態では、本開示のリモデリングされた細菌は、少なくとも約 0 日 ~ 約 80 日、少なくとも約 0 日 ~ 約 70 日、少なくとも約 0 日 ~ 約 60 日、少なくとも約 1 日 ~ 約 80 日、少なくとも約 1 日 ~ 約 70 日、少なくとも約 1 日 ~ 約 60 日、少なくとも約 2 日 ~ 約 80 日、少なくとも約 2 日 ~ 約 70 日、少なくとも約 2 日 ~ 約 60 日、少なくとも約 3 日 ~ 約 80 日、少なくとも約 3 日 ~ 約 70 日、少なくとも約 3 日 ~ 約 60 日、少なくとも約 4 日 ~ 約 80 日、少なくとも約 4 日 ~ 約 70 日、少なくとも約 4 日 ~ 約 60 日、少なくとも約 5 日 ~ 約 80 日、少なくとも約 5 日 ~ 約 70 日、少なくとも約 5 日 ~ 約 60 日、少なくとも約 6 日 ~ 約 80 日、少なくとも約 6 日 ~ 約 70 日、少なくとも約 6 日 ~ 約 60 日、少なくとも約 7 日 ~ 約 80 日、少なくとも約 7 日 ~ 約 70 日、少なくとも約 7 日 ~ 約 60 日、少なくとも約 8 日 ~ 約 80 日、少なくとも約 8 日 ~ 約 70 日、少なくとも約 8 日 ~ 約 60 日、少なくとも約 9 日 ~ 約 80 日、少なくとも約 9 日 ~ 約 70 日、少なくとも約 9 日 ~ 約 60 日、少なくとも約 10 日 ~ 約 80 日、少なくとも約 10 日 ~ 約 70 日、少なくとも約 10 日 ~ 約 60 日、少なくとも約 15 日 ~ 約 80 日、少なくとも約 15 日 ~ 約 70 日、少なくとも約 15 日 ~ 約 60 日、少なくとも約 20 日 ~ 約 80 日、少なくとも約 20 日 ~ 約 70 日、または少なくとも約 20 日 ~ 約 60 日の間に、本明細書に開示される量の固定 N を産生する。

【0176】

いくつかの実施形態では、本開示のリモデリングされた細菌は、少なくとも約 80 日 ± 5 日、少なくとも約 80 日 ± 10 日、少なくとも約 80 日 ± 15 日、少なくとも約 80 日 ± 20 日、少なくとも約 75 日 ± 5 日、少なくとも約 75 日 ± 10 日、少なくとも約 75 日 ± 15 日、少なくとも約 75 日 ± 20 日、少なくとも約 70 日 ± 5 日、少なくとも約 7

0日±10日、少なくとも約70日±15日、少なくとも約70日±20日、少なくとも約60日±5日、少なくとも約60日±10日、少なくとも約60日±15日、少なくとも約60日±20日の間に、本明細書に開示される量のいずれかで固定Nを産生する。

【0177】

いくつかの実施形態では、本開示のリモデリングされた細菌は、少なくとも約10日～約80日、少なくとも約10日～約70日、または少なくとも約10日～約60日の間に、本明細書に開示されている量のいずれかで固定Nを産生する。

【0178】

いくつかの実施形態では、本開示のリモデリングされた細菌は、図30A、右パネルに示す量及び時間で固定Nを産生する。

10

【0179】

本明細書に記載の植物において発生する窒素固定の量は、いくつかの方法で、例えば、アセチレン還元(AR)アッセイによって測定することができる。アセチレン還元アッセイは、*in vitro*または*in vivo*で実施することができる。特定の細菌が植物に固定窒素を供給している証拠としては、以下のものが挙げられる：1)接種により植物の総N量が有意に増加し、好ましくは植物内のN濃度も同時に増加すること、2)接種によりN制限条件下での窒素欠乏症が緩和されること(乾物質の増加を含むべきである)、3)¹⁵Nアプローチ(同位体希釈実験、¹⁵N₂還元アッセイ、または¹⁵N天然存在アッセイであり得る)を用いてN₂固定が証明されること、4)固定Nが植物タンパク質または代謝物に取り込まれること、及び5)これら効果の全てが、未接種の植物または接種株の突然変異体を接種した植物で見られる訳ではないこと。

20

【0180】

野生型の窒素固定調節カスケードは、入力O₂及びNH₄⁺がNORゲートを通過し、その出力が、ATPに加えてANDゲートに入力されるデジタル論理回路として表すことができる。いくつかの実施形態では、本明細書に開示されている方法は、微生物が施肥圃場であっても窒素を産生できるように、この回路に対するNH₄⁺の影響を調節カスケードの複数地点で妨害する。しかしながら、本明細書に開示されている方法では、上記回路に対するATPまたはO₂の影響を変更すること、または回路を細胞の他の調節カスケードと置換すること、または窒素固定以外の遺伝子回路を変更することも起想される。異種調節系の制御下で機能性産物を生成するように遺伝子クラスターを再操作してもよい。遺伝子クラスターのコード配列の外部及び内部の天然調節エレメントを排除することにより、及びそれらを代替調節系と置換することにより、複雑な遺伝子オペロン及び他の遺伝子クラスターの機能性産物を制御することができ、及び/または天然遺伝子が由来していた種以外の異なる種の細胞を含む異種細胞に移動させることができる。合成遺伝子クラスターは、再操作されると、遺伝子回路または他の誘導可能な調節系により制御され、それにより産物の発現を所望のように制御することができる。発現カセットを、ロジックゲート、パルス発生器、発振器、スイッチ、またはメモリデバイスとして作用するように設計してもよい。制御性発現カセットは、発現カセットが、酸素、温度、接触、浸透圧ストレス、膜ストレス、または酸化還元センサなどの環境センサとして機能するように、プロモーターに連結されてもよい。

30

40

【0181】

例として、*nifL*、*nifA*、*nifT*、及び*nifX*遺伝子を、*nif*遺伝子クラスターから排除してもよい。各アミノ酸配列をコードするDNAをコドンランダム化することにより合成遺伝子を設計してもよい。コドン選択を実施して、コドン使用頻度を天然遺伝子のコドン使用頻度からできるだけ逸脱するよう特定する。提案された配列を、制限酵素認識部位、トランスポゾン認識部位、反復配列、シグマ54及びシグマ70プロモーター、潜在性リボソーム結合部位、及び*rho*非依存性ターミネーターなどの、あらゆる望ましくない機能について走査する。合成リボソーム結合部位を、遺伝子の開始コドンを取り囲む150bp(-60から+90まで)が蛍光遺伝子に融合されている蛍光レポータープラスミドを構築することなどにより、各々対応する天然リボソーム結合部位の強度

50

と一致するように選択する。このキメラを P t a c プロモーターの制御下で発現させ、フローサイトメトリーにより蛍光を測定することができる。合成リボソーム結合部位を生成するために、合成発現カセットの 150 bp (- 60 から + 90) を使用するレポータープラスミドのライブラリーを生成する。手短に言えば、合成発現カセットは、ランダム DNA スペーサー、RBS ライブラリーをコードする縮重配列、及び各合成遺伝子のコード配列からなってもよい。複数のクローンをスクリーニングして、天然リボソーム結合部位に最も良好に一致した合成リボソーム結合部位を同定する。このようにして天然オペロンと同じ遺伝子からなる合成オペロンを構築し、機能的な相補性について試験する。合成オペロンのさらなる例示的な記載は、US 20140329326 に提供されている。

【0182】

10

細菌種

本明細書で開示された方法及び組成物に有用な微生物は、任意の供給源から得ることができる。一部の場合では、微生物は、細菌、古細菌、原生動物、または真菌であってもよい。本開示の微生物は、窒素固定微生物、例えば窒素固定細菌、窒素固定古細菌、窒素固定真菌、窒素固定酵母、または窒素固定原生動物であってもよい。本明細書で開示された方法及び組成物に有用な微生物は、孢子形成微生物、例えば孢子形成細菌であってもよい。一部の場合では、本明細書で開示された方法及び組成物に有用な細菌は、グラム陽性細菌またはグラム陰性細菌であってもよい。一部の場合では、細菌は、フィルクテス門の内生孢子形成細菌であってもよい。一部の場合では、細菌は、ジアゾトロフであってもよい。一部の場合では、細菌は、ジアゾトロフでなくともよい。

20

【0183】

本開示の方法及び組成物は、例えば、*Methanothermobacter thermoautotrophicus* などの古細菌と共に使用することができる。

【0184】

一部の場合では、有用であり得る細菌には、*Agrobacterium radiobacter*、*Bacillus acidocaldarius*、*Bacillus acidoterrestris*、*Bacillus agri*、*Bacillus aizawai*、*Bacillus albolactis*、*Bacillus alcalophilus*、*Bacillus alvei*、*Bacillus aminoglucosidicus*、*Bacillus aminovorans*、*Bacillus amylolyticus* (*Paenibacillus amylolyticus* としても知られる)、*Bacillus amyloliquefaciens*、*Bacillus aneurinoliticus*、*Bacillus atrophaeus*、*Bacillus azotoformans*、*Bacillus badius*、*Bacillus cereus* (同義語：*Bacillus endorhythmos*、*Bacillus medusa*)、*Bacillus chitinosporus*、*Bacillus circulans*、*Bacillus coagulans*、*Bacillus endoparasiticus*、*Bacillus fastidiosus*、*Bacillus firmus*、*Bacillus kurstaki*、*Bacillus lacticola*、*Bacillus lactimorbus*、*Bacillus lactis*、*Bacillus laterosporus* (*Brevibacillus laterosporus* としても知られる)、*Bacillus lautus*、*Bacillus lentimorbus*、*Bacillus lentus*、*Bacillus licheniiformis*、*Bacillus maroccanus*、*Bacillus megaterium*、*Bacillus metiens*、*Bacillus mycoides*、*Bacillus natto*、*Bacillus nematocida*、*Bacillus nigrificans*、*Bacillus nigrum*、*Bacillus pantothenicus*、*Bacillus popilliae*、*Bacillus psychrosaccharolyticus*、*Bacillus pumilus*、*Bacillus siam*

30

40

50

ensis、Bacillus smithii、Bacillus sphaericus、Bacillus subtilis、Bacillus thuringiensis、Bacillus uniflagellatus、Bradyrhizobium japonicum、Brevibacillus brevis Brevibacillus laterosporus (以前はBacillus laterosporus)、Chromobacterium subtsugae、Delftia acidovorans、Lactobacillus acidophilus、Lysobacter antibioticus、Lysobacter enzymogenes、Paenibacillus alvei、Paenibacillus polymyxa、Paenibacillus popilliae (以前はBacillus popilliae)、Pantoea agglomerans、Pasteuria penetrans (以前はBacillus penetrans)、Pasteuria usgae、Pectobacterium carotovorum (以前はErwinia carotovora)、Pseudomonas aeruginosa、Pseudomonas aureofaciens、Pseudomonas cepacia (以前はBurkholderia cepaciaとして知られていた)、Pseudomonas chlororaphis、Pseudomonas fluorescens、Pseudomonas proradix、Pseudomonas putida、Pseudomonas syringae、Serratia entomophila、Serratia marcescens、Streptomyces colombiensis、Streptomyces galbus、Streptomyces goshikiensis、Streptomyces griseoviridis、Streptomyces lavendulae、Streptomyces prasinus、Streptomyces saraeticus、Streptomyces venezuelae、Xanthomonas campestris、Xenorhabdus luminescens、Xenorhabdus nematophila、Rhodococcus globerulus AQ719 (NRRL受託番号B-21663)、Bacillus種AQ175 (ATCC受託番号55608)、Bacillus種AQ177 (ATCC受託番号55609)、Bacillus種AQ178 (ATCC受託番号53522)、及びStreptomyces種菌株NRRL受託番号B-30145が含まれるが、これらに限定されない。いくつかの場合には、細菌は、Azotobacter chroococcum、Methanosarcina barkeri、Klesiella pneumoniae、Azotobacter vinelandii、Rhodobacter sphaeroides、Rhodobacter capsulatus、Rhodobacter palustris、Rhodosporillum rubrum、Rhizobium leguminosarum、またはRhizobium etliであり得る。

【0185】

いくつかの場合には、細菌は、Clostridiumの種、例えば、Clostridium pasteurianum、Clostridium beijerinckii、Clostridium perfringens、Clostridium etani、Clostridium acetobutylicumであり得る。

【0186】

一部の 경우에는、本開示の方法及び組成物と共に使用される細菌は、シアノバクテリアであってもよい。シアノバクテリア属の例としては、Anabaena (例えば、Anabaena種PCC7120)、Nostoc (例えば、Nostoc punctiforme)、またはSynechocystis (例えば、Synechocystis種PCC6803)が挙げられる。

【0187】

一部の場合では、本開示の方法及び組成物と共に使用される細菌は、クロロビウム門、例えば *Chlorobium tepidum* に属していてもよい。

【0188】

一部の場合では、本開示の方法及び組成物と共に使用される微生物は、公知の *NifH* 遺伝子と同一性である遺伝子を含んでいてもよい。公知の *NifH* 遺伝子の配列は、例えば、Zehr 研究室 *NifH* データベース (www.zehr.pmc.ucsc.edu/nifH_Database_Public/、2014年4月4日)、または Buckley 研究室 *NifH* データベース (www.css.cornell.edu/faculty/buckley/nifh.htm、ならびに Gaby、John Christian、及び Daniel H. Buckley、"A comprehensive aligned *nifH* gene database: a multipurpose tool for studies of nitrogen-fixing bacteria."、Database 2014 (2014): bau001.)。一部の場合では、本開示の方法及び組成物と共に使用される微生物は、Zehr 研究室 *NifH* データベース (www.zehr.pmc.ucsc.edu/nifH_Database_Public/、2014年4月4日) に由来する配列と少なくとも60%、70%、80%、85%、90%、95%、96%、96%、98%、99%、または99%よりも高い配列同一性を有するポリペプチドをコードする配列を含んでいてもよい。一部の場合では、本開示の方法及び組成物と共に使用される微生物は、Buckley 研究室 *NifH* データベース (Gaby、John Christian、及び Daniel H. Buckley、"A comprehensive aligned *nifH* gene database: a multipurpose tool for studies of nitrogen-fixing bacteria."、Database 2014 (2014): bau001.) に由来する配列と少なくとも60%、70%、80%、85%、90%、95%、96%、96%、98%、99%、または99%よりも高い配列同一性を有するポリペプチドをコードする配列を含んでいてもよい。

10

20

【0189】

本明細書に開示されている方法及び組成物に有用な微生物は、天然植物の表面または組織から微生物を抽出することにより；種子を粉砕して微生物を単離することにより；多様な土壌試料に種子を植栽し、組織から微生物を回収することにより；または植物に外因性微生物を接種し、どの微生物が植物組織に現れるかを決定することにより得ることができる。植物組織の非限定的な例としては、種子、実生、葉、挿穂、植物、鱗茎、塊茎、根、及び根茎が挙げられる。一部の場合では、細菌は、種子から単離される。試料を処理するためのパラメータを変化させて、根圏菌、着生菌、または内生菌などの、異なるタイプの付随微生物を単離することができる。また、細菌は、第1の植物から初期に分離する代わりに、環境菌株コレクションなどのレポジトリを供給源としてもよい。微生物は、単離された微生物のゲノムを配列決定することにより；植物内群生の組成物をプロファイリングすることにより；群生もしくは単離された微生物のトランスクリプトーム機能性を特徴付けることにより；または選択培地もしくは表現型培地（例えば、窒素固定またはリン酸可溶化表現型）を使用して微生物の機能をスクリーニングすることにより、遺伝子型及び表現型を決定することができる。選択する候補株または集団は、配列データ；表現型データ；植物データ（例えば、ゲノム、表現型、及び/または収穫高データ）；土壌データ（例えば、pH、N/P/K含有量、及び/またはバルク土壌生物群生）；またはこれらの任意の組合せにより得ることができる。

30

40

【0190】

本明細書に記載の細菌及び細菌を産生するための方法は、有害な植物防御反応を誘導せずに、葉表面、根表面、もしくは内部植物組織で効率的に自己増幅することができる細菌、または植物防御応答に耐性である細菌に適用してもよい。本明細書に記載の細菌は、窒素が添加されていない培地で植物組織抽出物または葉表面洗浄液を培養することにより単離してもよい。しかしながら、細菌は、培養可能でない場合があり、すなわち、培養可能

50

かどうか公知でないか、当技術分野で公知の標準的方法の使用では培養が困難である場合がある。本明細書に記載の細菌は、内生菌、または着生菌、または植物根圏に生息する細菌（根圏細菌）であってもよい。遺伝子変異を導入するステップ、複数の植物に曝露するステップ、及び向上された形質を有する植物から細菌を単離するステップを、1回または複数回（例えば、1、2、3、4、5、10、15、25回、またはそれよりも多く）繰り返した後で得られる細菌は、内生性、着生性、または根圏性であってもよい。内部寄生菌は、病害症状を引き起こすことなく、または共生構造の形成を誘発することなく、植物の内部に進入する生物であり、植物成長を強化し、植物の栄養を改善する（例えば、窒素固定により）ことができるため農耕学的な関心対象となっている。細菌は、種子伝染性内生菌であってもよい。種子伝染性内生菌には、成熟し乾燥した無損傷の（例えば、ひび割れ、目に見える真菌性感染、または早期発芽がない）種子に見出される種子伝染性細菌性内生菌などの、イネ科草本または植物の種子に結び付いているまたはそれに由来する細菌が含まれる。また、種子伝染性細菌性内生菌は、種子の表面に結び付いているまたはそれに由来する場合があります、代替として、またはそれに加えて、それは（例えば、表面滅菌種子の）内部種子区画に結び付いているまたはそれに由来する場合があります。一部の場合では、種子伝染性細菌性内生菌は、植物組織内で、例えば種子の内部で複製することが可能である。また、一部の場合では、種子伝染性細菌性内生菌は、乾燥を生き抜くことが可能である。

10

【0191】

本開示の方法により単離されるまたは本開示の方法もしくは組成物において使用される細菌は、複数の異なる細菌分類群を組合せて含むことができる。例として、細菌としては、プロテオバクテリア（*Pseudomonas*、*Enterobacter*、*Stenotrophomonas*、*Burkholderia*、*Rhizobium*、*Herbaspirillum*、*Pantoea*、*Serratia*、*Rahnella*、*Azospirillum*、*Azorhizobium*、*Azotobacter*、*Duganella*、*Delftia*、*Bradyrhizobium*、*Sinorhizobium*、及び*Halomonas*など）、*Firmicutes*（*Bacillus*、*Paenibacillus*、*Lactobacillus*、*Mycoplasma*、及び*Acetobacterium*など）、及び*Actinobacteria*（*Streptomyces*）、*Rhodococcus*、*Microbacterium*、及び*Curtobacterium*など）が挙げられる。本開示の方法及び組成物で使用される細菌は、2つ以上の種の窒素固定細菌コンソーシアを含んでいてもよい。一部の場合では、細菌コンソーシアの1つ以上の細菌種は、窒素を固定することが可能であってもよい。一部の場合では、細菌コンソーシアの1つ以上の種は、窒素を固定する他の細菌の能力を促進または増強することができる。窒素を固定する細菌及び窒素固定する他の細菌の能力を増強する細菌は、同じであってもよく、または異なってもよい。いくつかの例では、細菌菌株は、異なる細菌菌株と組み合わせると、またはある特定の細菌コンソーシアでは、窒素を固定することができる場合があるが、単一培養では窒素を固定することができない場合がある。窒素固定細菌コンソーシアに見出すことができる細菌属の例としては、これらに限定されないが、*Herbaspirillum*、*Azospirillum*、*Enterobacter*、及び*Bacillus*が挙げられる。

20

30

40

【0192】

本明細書に開示されている方法により産生することができる細菌としては、*Azotobacter*種、*Bradyrhizobium*種、*Klebsiella*種、及び*Sinorhizobium*種が挙げられる。いくつかの場合には、細菌は、以下のものからなる群より選択されてもよい：*Azotobacter vinelandii*、*Bradyrhizobium japonicum*、*Klebsiella pneumoniae*、及び*Sinorhizobium meliloti*。いくつかの場合には、細菌は、*Enterobacter*または*Rahnella*属のものであり得る。いくつかの場合には、細菌は、*Frankia*、または*Clostridium*属のものであり得

50

る。Clostridium属の細菌の例として、Clostridium acetobutyllicum、Clostridium pasteurianum、Clostridium beijerinckii、Clostridium perfringens、及びClostridium tetaniが挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの場合には、細菌は、Paenibacillus属のもの、例えば、Paenibacillus azotofixans、Paenibacillus borealis、Paenibacillus durus、Paenibacillus macerans、Paenibacillus polymyxa、Paenibacillus alvei、Paenibacillus amylolyticus、Paenibacillus campinasensis、Paenibacillus chibensis、Paenibacillus glucanolyticus、Paenibacillus illinoisensis、Paenibacillus larvae 亜種、Larvae、Paenibacillus larvae 亜種、Pulvificiens、Paenibacillus lautus、Paenibacillus macerans、Paenibacillus macquariensis、Paenibacillus macquariensis、Paenibacillus pabuli、Paenibacillus peoriae、またはPaenibacillus polymyxaであり得る。

10

【0193】

いくつかの例では、本開示の方法によって単離された細菌は、以下の分類群：Achromobacter、Acidithiobacillus、Acidovorax、Acidovorax、Acinetobacter、Actinoplanes、Adlercreutzia、Aerococcus、Aeromonas、Afipia、Agromyces、Ancylobacter、Arthrobacter、Atopostipes、Azospirillum、Bacillus、Bdellovibrio、Beijerinckia、Bosea、Bradyrhizobium、Brevibacillus、Brevundimonas、Burkholderia、Candidatus Haloredivivus、Caulobacter、Cellulomonas、Cellvibrio、Chryseobacterium、Citrobacter、Clostridium、Coralimargarita、Corynebacterium、Cupriavidus、Curtobacterium、Curvibacter、Deinococcus、Delftia、Desemzia、Devosia、Dokdonella、Dyella、Enhydrobacter、Enterobacter、Enterococcus、Erwinia、Escherichia、Escherichia/Shigella、Exiguobacterium、Ferroglobus、Filimonas、Finegoldia、Flavisolibacter、Flavobacterium、Frigoribacterium、Gluconacetobacter、Hafnia、Halobaculum、Halomonas、Halosimplex、Herbaspirillum、Hymenobacter、Klebsiella、Kocuria、Kosakonia、Lactobacillus、Leclercia、Lentzea、Luteibacter、Luteimonas、Massilia、Mesorhizobium、Methylobacterium、Microbacterium、Micrococcus、Microvirga、Mycobacterium、Neisseria、Nocardia、Oceanibaculum、Ochrobactrum、Okibacterium、Oligotropha、Oryzihumus、Oxalophagus、Paenibacillus、Panteoa、Pantoea、Pelomonas、Perlucidibaca、Plantibacter、Polynucleobacter、Propionibacterium、Propioniciclavus、Pseudoclavibacter、Pseudomonas、Pseudonoca

20

30

40

50

rdia, *Pseudoxanthomonas*, *Psychrobacter*, *Rahnella*, *Ralstonia*, *Rheinheimera*, *Rhizobium*, *Rhodococcus*, *Rhodopseudomonas*, *Roseateles*, *Ruminococcus*, *Sebaldella*, *Sediminibacillus*, *Sediminibacterium*, *Serratia*, *Shigella*, *Shinella*, *Sinorhizobium*, *Sinosporangium*, *Sphingobacterium*, *Sphingomonas*, *Sphingopyxis*, *Sphingosinicella*, *Staphylococcus*, 25 *Stenotrophomonas*, *Strenotrophomonas*, *Streptococcus*, *Streptomyces*, *Stygiolobus*, *Sulfurisphaera* 10
、*Tatumella*, *Tepidimonas*, *Thermomonas*, *Thiobacillus*, *Variovorax*, WPS-2 genera incertae sedis, *Xanthomonas*, 及び *Zimmermannella* のうちの1つ以上のメンバーであり得る。

【0194】

いくつかの場合には、以下の属：*Enterobacter*, *Klebsiella*, *Kosakonia*, 及び *Rahnella* のうちの少なくとも1つから選択される細菌種が利用される。いくつかの場合には、以下の属：*Enterobacter*, *Klebsiella*, *Kosakonia*, 及び *Rahnella* からの細菌種の組合せが利用される。いくつかの場合には、利用される種は、*Enterobacter sacchari*, *Klebsiella variicola*, *Kosakonia sacchari*, 及び *Rahnella aquatilis* のうちの1種以上であり得る。 20

【0195】

一部の場合では、グラム陽性微生物は、*nifH*, *nifD*, *nifK*, *nifB*, *nifE*, *nifN*, *nifX*, *hesA*, *nifV*, *nifW*, *nifU*, *nifS*, *nifI1*, 及び *nifI2* を含む、モリブデン-鉄ニトロゲナーゼ系を有していてもよい。一部の場合では、グラム陽性微生物は、*vnfDG*, *vnfK*, *vnfE*, *vnfN*, *vupC*, *vupB*, *vupA*, *vnfV*, *vnfR1*, *vnfH*, *vnfR2*, *vnfA* (転写調節因子) を含む、バナジウムニトロゲナーゼ系を有していてもよい。一部の場合では、グラム陽性微生物は、*anfK*, *anfG*, *anfD*, *anfH*, *anfA* (転写調節因子) を含む、鉄のみのニトロゲナーゼ系を有していてもよい。一部の場合では、グラム陽性微生物は、*glnB* 及び *glnK* (窒素シグナル伝達タンパク質) を含むニトロゲナーゼ系を有していてもよい。グラム陽性微生物の窒素代謝に関与する酵素の一部の例としては、*glnA* (グルタミン合成酵素)、*gdh* (グルタミン酸デヒドロゲナーゼ)、*bdh* (3-ヒドロキシ酪酸デヒドロゲナーゼ)、グルタミナーゼ、*gltAB/gltB/gltS* (グルタミン酸合成酵素)、*asnA/asnB* (アスパラギン酸-アンモニアリガーゼ/アスパラギン合成酵素)、及び *ansA/ansZ* (アスパラギナーゼ) が挙げられる。グラム陽性微生物の窒素輸送に関与するタンパク質の一部の例としては、*amtB* (アンモニウムトランスポーター)、*glnK* (アンモニウム輸送の調節因子)、*glnPHQ/glnQHMP* (ATP依存性グルタミン/グルタミン酸トランスポーター)、*glnT/alsT/yrbD/yflA* (グルタミン様プロトン共輸送トランスポーター)、及び *gltP/gltT/yhcl/nqt* (グルタミン酸様プロトン共輸送トランスポーター) が挙げられる。 30 40

【0196】

特に関心対象となり得るグラム陽性微生物の例としては、*Paenibacillus polymixa*, *Paenibacillus riograndensis*, *Paenibacillus* 種、*Frankia* 種、*Hellobacterium* 種、*Hellobacterium chlorum*, *Hellobacillus* 種、*Heliophilum* 種、*Heliorestis* 種、*Clostridium acetobutylicum*, *Clostridium* 種、*Mycobacterium flau* 50

m、Mycobacterium種、Arthrobacter種、Agromyces種、Corynebacterium autitrophicum、Corynebacterium種、Micromonospora種、Propionibacteria種、Streptomyces種、及びMicrobacterium種が挙げられる。

【0197】

グラム陽性微生物において行われ得る遺伝子改変の一部の例としては、glnRを欠失させて、環境中の窒素の存在下でのBNFの負の調節を除去すること、nifクラスターのすぐ上流に異なるプロモーターを挿入して、環境中の窒素に応答したGlnRによる調節を除去すること、glnAを突然変異させて、GS-GOGAT経路によるアンモニウム同化の速度を低減すること、amtBを欠失させて、培地からのアンモニウムの取り込みを低減すること、glnAを突然変異させ、それによりそれを構成的にフィードバック阻害(FBI-GS)状態にして、GS-GOGAT経路によるアンモニウム同化を低減することが挙げられる。

10

【0198】

一部の場合では、glnRは、Paenibacillus種におけるN代謝及び固定の主要な調節因子である。一部の場合では、Paenibacillus種のゲノムは、glnRを産生するための遺伝子を含有しない場合がある。一部の場合では、Paenibacillus種のゲノムは、glnEまたはglnDを産生するための遺伝子を含んでいなくともよい。一部の場合では、Paenibacillus種のゲノムは、glnBまたはglnKを産生するための遺伝子を含んでいてもよい。例えば、Paenibacillus種WLY78は、glnBの遺伝子、または古細菌Methanococcus maripaludisに見出されるそのホモログであるnifI1及びnifI2を含んでいない。一部の場合では、Paenibacillus種のゲノムは、様々であってもよい。例えば、Paenibacillus polymixa E681は、glnK及びgdhを欠如し、いくつかの窒素化合物トランスポーターを有するが、amtBのみが、GlnRにより制御されると考えられる。別の例では、Paenibacillus種JDR2は、glnK、gdh、及びほとんどの他の中心的な窒素代謝遺伝子を有し、はるかにより少数の窒素化合物トランスポーターを有するが、GlnRにより制御されるglnPHQを有する。Paenibacillus riograndensis SBR5は、標準glnRAオペロン、fdx遺伝子、主要nifオペロン、二次nifオペロン、及びanfオペロン(鉄のみのニトロゲナーゼをコードする)を含んでいる。推定上のglnR/tnrA部位が、こうしたオペロンの各々の上流に見出された。GlnRは、anfオペロンを除き、上記オペロンの全てを調節することができる。GlnRは、二量体として、こうした調節配列の各々に結合することができる。

20

30

40

【0199】

Paenibacillus N固定菌株は、以下の2つの部分群に分類することができる：最小限のnif遺伝子クラスターのみを含む亜群I；ならびに最小限のクラスターに加えて、nifXとhesAとの間にある特徴付けされていない遺伝子、及び多くの場合はnifH、nifHDK、nifBENなどのnif遺伝子の一部が重複している他のクラスター、またはバナジウム(vanadium)ニトロゲナーゼ(vnf)もしくは鉄のみのニトロゲナーゼ(anf)遺伝子をコードするクラスターを含む亜群II。

【0200】

一部の場合では、Paenibacillus種のゲノムは、glnBまたはglnKを産生するための遺伝子を含んでいなくともよい。一部の場合では、Paenibacillus種のゲノムは、シグマ-70プロモーターから転写される9つの遺伝子を有する最小限のnifクラスターを含んでいてもよい。一部の場合では、Paenibacillus nifクラスターは、窒素または酸素により負に調節されてもよい。一部の場合では、Paenibacillus種のゲノムは、シグマ-54を産生するための遺伝子を含んでいなくともよい。例えば、Paenibacillus種WLY78は、シグマ-54の遺伝子を含んでいない。一部の場合では、nifクラスターは、glnR及び/

50

またはTnrAにより調節されてもよい。一部の場合では、nifクラスターの活性は、glnR及び/またはTnrAの活性を改変することにより改変され得る。

【0201】

Bacilliでは、グルタミン合成酵素(GS)は、高濃度の細胞内グルタミンによりフィードバック阻害され、確認のシフト(shift in confirmation)を引き起こす(FBI-GSと呼ばれる)。Nifクラスターは、いくつかのBacilli種では、調節因子GlnR及びTnrAに対して個別の結合部位を含む。GlnRは、過剰な細胞内グルタミン及びAMPの存在下で結合し、遺伝子発現を抑制する。GlnRの役割は、高窒素利用可能条件下で、グルタミン及びアンモニウムの流入及び細胞内産生を防止することであってもよい。TnrAは、限定的な細胞内グルタミンの存在下及び/またはFBI-GSの存在下で結合し、及び/または遺伝子発現を活性化する(または抑制する)ことができる。一部の場合では、Bacilli nifクラスターの活性は、GlnRの活性を改変することにより変更することができる。

10

【0202】

フィードバック阻害されたグルタミン合成酵素(FBI-GS)は、GlnRに結合し、認識配列に対するGlnRの結合を安定化することができる。いくつかの細菌種は、nifクラスターの上流にGlnR/TnrA結合部位を有する。FBI-GS及びGlnRの結合を変更することにより、nif経路の活性を改変することができる。

【0203】

微生物の供給源

細菌(または本開示に従う任意の微生物)は、その土壌、植物、真菌、動物(無脊椎動物を含む)、ならびに湖及び川の堆積物、水、及び生物相を含む他の生物相を含む任意の一般的陸生環境;海洋環境、その生物相及び堆積物(例えば、海水、海泥、海洋植物、海洋無脊椎動物(例えば、海綿動物)、海洋脊椎動物(例えば、魚類));陸生及び海洋性地圏(表土及び岩石、例えば、粉碎された地中岩石、砂、及び粘土);氷雪圏及びその融雪氷水;大気(例えば、濾過空気粉塵、雲、及び雨滴);都市環境、工業環境、及び他の人為的環境(例えば、コンクリート、道路側溝、屋根表面、及び道路表面に蓄積された有機物及び無機物)から得ることができる。

20

【0204】

細菌(または本開示に従う任意の微生物)が得られる植物は、1つ以上の望ましい形質を有する植物、例えば、特定の環境でまたはある特定の目的の条件下で自然に成長する植物であってもよい。例として、ある特定の植物は、砂質土壌及び高塩分の砂地で、もしくは極端な温度下で、もしくは水がほとんどなくとも自然に成長することができ、または環境に存在するある特定の有害生物または疾患に耐性であってもよく、商品作物は、そのような条件下で成長することが望ましい場合があり、そのような条件が、例えば特定の地理的位置において利用可能な唯一の条件である場合は特にそうである。さらなる例としては、細菌は、そのような環境で栽培された商品作物から、またはより具体的には、任意の特定の環境で栽培された作物のうち目的の形質を最も良好に示す個々の作物:例えば、塩分制限土壌で栽培された作物のうち最も迅速に成長する植物、深刻な虫害もしくは疾患流行に曝露された作物のうち最も被害が少なかった植物、または繊維含量及び油分含量などを含む、ある特定の代謝物及び他の化合物の所望の量を有する植物、または望ましい色、味、もしくは匂いを示す植物から収集してもよい。細菌は、先に言及したような環境の真菌及び他の動物相及び植物相、土壌、水、堆積物、ならびに他の要素を含む、目的の環境に生じる目的の植物または任意の材料から収集されてもよい。

30

40

【0205】

細菌(または本開示による任意の微生物)は、植物組織から単離されてもよい。この単離は、例えば、根、茎葉、及び植物再生組織を含む、植物の任意の適切な組織から行ってもよい。例として、植物から単離するための従来の方法は、典型的には、目的の植物材料(例えば、根または茎長、葉)を滅菌切除し、適切な溶液(例えば、2%次亜塩素酸ナトリウム)で表面を滅菌し、その後、植物材料を微生物増殖用の栄養培地に配置することを

50

含む。代替として、表面を滅菌した植物材料を滅菌液（通常は水）中で粉碎し、粉碎した植物材料の小片を含む懸濁液を、選択的である場合もそうでない場合もある（例えば、リンの供給源としてフィチン酸のみを含有する）好適な固体寒天培地（複数可）の表面に播種することができる。この手法は、単離されたコロニーを形成し、個々に摘取して栄養培地のプレートから分離することができ、さらに周知の方法によって単一種に精製することができる細菌にとりわけ有用である。代替として、植物根または葉試料を表面滅菌せず、穏やかな洗浄のみを行うことにより、表面に生息する着生微生物を単離プロセスに含めてもよいし、または植物の根、茎、もしくは葉の小片を寒天培地の表面に押しつけてから離し、次いで上記のように個々のコロニーを単離することによって、着生微生物を別個に単離することができる。この手法は、例えば、細菌に特に有用である。あるいは、根に付着している少量の土を洗い流さずに、したがって植物根圏でコロニー形成する微生物を含むように、根を処理してもよい。そうでなければ、根に接着している土を取り出し、希釈し、好適な選択的及び非選択的培地の寒天上に播種して、根圏細菌の個々のコロニーを単離することができる。

10

【0206】

特許手続上の微小生物の寄託の国際的承認に関するブダペスト条約

本開示の微小生物寄託は、特許手続上の微小生物の寄託の国際的承認に関するブダペスト条約（ブダペスト条約）の規定に基づいて行われた。

【0207】

出願人は、連邦行政規則第1.808条(a)(2)に準じて、「寄託された物質の公的な入手可能性に対して寄託者により課された全ての制限は、特許付与時に変更不能に取り除かれることになる」ことを申し立てる。この声明は、この項の段落(b)(つまり、連邦行政規則第1.808条(b))に従うものとする。

20

【0208】

Enterobacter sacchari は、今では、*Kosakonia sacchari* として分類し直されており、この生物の名称は、本稿全体にわたって相互交換可能に使用される場合がある。

【0209】

図6及び図7に示されているように、本開示の多数の微生物は、2つの野生型株に由来する。菌株CI006は、以前は*Enterobacter*属（前述の*Kosakonia*への再分類を参照）に分類されていた細菌種であり、図6には、CI006に由来する突然変異体の系統が特定されている。菌株CI019は、*Rahnella*属に分類されている細菌種であり、図7には、CI019に由来する突然変異体の系統が特定されている。なお、図6及び図7に関して、名称にCMを含む菌株は、CM菌株のすぐ左側に示されている菌株の突然変異体である。CI006 *Kosakonia* 野生型(WT)及びCI019 *Rahnella* WTの寄託情報は、下記の表1に見出される。

30

【0210】

本出願に記載されている一部の微小生物は、2017年1月6日または2017年8月11日に、60 Bigelow Drive, East Boothbay, Maine 04544, USAに位置する、Bigelow National Center for Marine Algae and Microbiota (NCMA)に寄託された。前述のように、寄託は全て、特許手続上の微小生物の寄託の国際的承認に関するブダペスト条約に基づいて行われた。前述のブダペスト条約寄託に関する、Bigelow National Center for Marine Algae and Microbiota受託番号及び日付は、表1に提供されている。

40

【0211】

Kosakonia sacchari (WT)、*Rahnella aquatilis* (WT)、及び変異体/リモデリングされた*Kosakonia sacchari* 菌株の生物学的に純粋な培養物は、2017年1月6日に、60 Bigelow Drive, East Boothbay, Maine 04544, USAに位置する、B

50

Bigelow National Center for Marine Algae and Microbiota (NCMA) に寄託され、それぞれNCMA特許寄託指定番号第201701001号、第201701003号、及び第201701002号が割り当てられた。該当する寄託情報は、下記の表1に見出される。

【0212】

変異体/リモデリングされた *Kosakonia sacchari* 株の生物学的に純粋な培養物は、2017年8月11日に、60 Bigelow Drive, East Boothbay, Maine 04544, USA に位置する、Bigelow National Center for Marine Algae and Microbiota (NCMA) に寄託され、それぞれNCMA特許寄託表示番号第201708004号、第201708003号、及び第201708002号が割り当てられた。該当する寄託情報は、下記の表1に見出される。

【0213】

Klebsiella variicola (WT) の生物学的に純粋な培養物は、2017年8月11日に、60 Bigelow Drive, East Boothbay, Maine 04544, USA に位置する、Bigelow National Center for Marine Algae and Microbiota (NCMA) に寄託され、NCMA特許寄託指定番号第201708001号が割り当てられた。2つの *Klebsiella variicola* 変異体/リモデリング株の生物学的に純粋な培養物は、2017年12月20日に、60 Bigelow Drive, East Boothbay, Maine 04544, USA に位置する、Bigelow National Center for Marine Algae and Microbiota (NCMA) に寄託され、それぞれNCMA特許寄託指定番号第201712001号及び第201712002号が割り当てられた。該当する寄託情報は、下記の表1に見出される。

【0214】

2つの *Kosakonia sacchari* 変異体/リモデリング株の生物学的に純粋な培養物は、2019年12月23日に、10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 20110-2209, USA に位置する、American Type Culture Collection (ATCC) に寄託され、ATCC特許寄託番号PTA-126575及びPTA-126576が割り当てられた。4つの *Klebsiella variicola* 変異体/リモデリング株の生物学的に純粋な培養物は、2019年12月23日に、10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 20110-2209, USA に位置する、American Type Culture Collection (ATCC) に寄託され、ATCC特許寄託番号PTA-126577、PTA-126578、PTA-126579、及びPTA-126580が割り当てられた。*Paenibacillus polymyxa* (WT) 菌株の生物学的に純粋な培養物は、2019年12月23日に、10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 20110-2209, USA に位置する、American Type Culture Collection (ATCC) に寄託され、ATCC特許寄託番号PTA-126581が割り当てられた。*Paraburkholderia tropica* (WT) 菌株の生物学的に純粋な培養物は、2019年12月23日に、10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 20110-2209, USA に位置する、American Type Culture Collection (ATCC) に寄託され、ATCC特許寄託番号PTA-126582が割り当てられた。*Herbaspirillum aquaticum* (WT) 菌株の生物学的に純粋な培養物は、2019年12月23日に、10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 20110-2209, USA に位置する、American

an Type Culture Collection (ATCC) に寄託され、ATCC 特許寄託番号 PTA - 126583 が割り当てられた。4つの *Metakosakonia intestini* 変異体 / リモデリング株の生物学的に純粋な培養物は、2019年12月23日に、10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 20110 - 2209, USA に位置する、American Type Culture Collection (ATCC) に寄託され、ATCC 特許寄託番号 PTA - 126584、PTA - 126586、PTA - 126587、及び PTA - 126588 が割り当てられた。*Metakosakonia intestini* (WT) 菌株の生物学的に純粋な培養物は、2019年12月23日に、10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 20110 - 2209, USA に位置する、American Type Culture Collection (ATCC) に寄託され、ATCC 特許寄託番号 PTA - 126585 が割り当てられた。該当する寄託情報は、下記の表1に見出される。

10

20

30

40

50

【表 1】

表 1. ブダペスト条約に基づいて寄託された微生物

寄託機関	Pivot 菌株表示 (いくつかの菌株 には複数の名称 がある)	分類	受託番号	寄託日
NCMA	CI006, PBC6.1, 6	<i>Kosakonia sacchari</i> (WT)	201701001	2017年1月6日
NCMA	CI019, 19	<i>Rahnella aquatilis</i> (WT)	201701003	2017年1月6日
NCMA	CM029, 6-412	<i>Kosakonia sacchari</i>	201701002	2017年1月6日
NCMA	6-403 CM037	<i>Kosakonia sacchari</i>	201708004	2017年8月11日
NCMA	6-404, CM38, PBC6.38	<i>Kosakonia sacchari</i>	201708003	2017年8月11日
NCMA	CM094, 6-881, PBC6.94	<i>Kosakonia sacchari</i>	201708002	2017年8月11日
NCMA	CI137, 137, PB137	<i>Klebsiella variicola</i> (WT)	201708001	2017年8月11日
NCMA	137-1034	<i>Klebsiella variicola</i>	201712001	2017年12月20日
NCMA	137-1036	<i>Klebsiella variicola</i>	201712002	2017年12月20日
ATCC	6-2425	<i>Kosakonia sacchari</i>	PTA-126575	2019年12月23日
ATCC	6-2634	<i>Kosakonia sacchari</i>	PTA-126576	2019年12月23日
ATCC	137-1968	<i>Klebsiella variicola</i>	PTA-126577	2019年12月23日
ATCC	137-2219	<i>Klebsiella variicola</i>	PTA-126578	2019年12月23日
ATCC	137-2237	<i>Klebsiella variicola</i>	PTA-126579	2019年12月23日
ATCC	137-2285	<i>Klebsiella variicola</i>	PTA-126580	2019年12月23日
ATCC	41	<i>Paenibacillus polymyxa</i> (WT)	PTA-126581	2019年12月23日
ATCC	8	<i>Paraburkholderia tropica</i> (WT)	PTA-126582	2019年12月23日
ATCC	3069	<i>Herbaspirillum</i> <i>aquaticum</i> (WT)	PTA-126583	2019年12月23日
ATCC	910-3655	<i>Metakosakonia intestini</i>	PTA-126584	2019年12月23日
ATCC	910	<i>Metakosakonia intestini</i> (WT)	PTA-126585	2019年12月23日
ATCC	910-3963	<i>Metakosakonia intestini</i>	PTA-126586	2019年12月23日
ATCC	910-3961	<i>Metakosakonia intestini</i>	PTA-126587	2019年12月23日
ATCC	910-3994	<i>Metakosakonia intestini</i>	PTA-126588	2019年12月23日

10

20

30

40

【 0 2 1 5 】

単離された生物学的に純粋な微小生物

本開示は、ある特定の実施形態では、特に農業に適用を有する単離された生物学的に純粋な微小生物を提供する。開示される微小生物は、単離された生物学的に純粋な状態で使用することができ、ならびに組成物に配合することができる（例示的な組成物の説明は、下記のセクションを参照）。さらに、本開示は、開示される単離された生物学的に純粋な微小生物の少なくとも2つのメンバーを含む微生物組成物、ならびに微生物組成物を使用するための方法を提供する。さらに、本開示は、開示される単離された生物学的に純粋な微生物の使用により植物中の窒素固定を調整するための方法を提供する。

50

【 0 2 1 6 】

いくつかの態様では、本開示の単離された生物学的に純粋な微小生物は、表 1 に示されているものである。他の態様では、本開示の単離された生物学的に純粋な微小生物は、表 1 の微小生物から導出される。例えば、表 1 の微小生物の菌株、子孫、突然変異体、または誘導体が、本明細書で提供されている。本開示では、表 1 に列挙されている微生物のあらゆる考え得る組合せが企図され、組合せは微生物コンソーシアを形成することがある。表 1 の微生物は、個々にまたは任意の組合せのいずれでもよく、本開示で言及されている任意の植物、活性分子（合成、有機など）、アジュバント、担体、栄養補助剤、または生物学的製剤（biological）と組み合わせることができる。

【 0 2 1 7 】

いくつかの態様では、本開示は、表 2 ~ 8 にグループ化された種を含む微生物組成物を提供する。いくつかの態様では、様々な微生物種を含むこれらの組成物は、微生物コンソーシアまたはコンソシアムと呼ばれる。

【 0 2 1 8 】

表 2 ~ 8 に関して、文字 A から I は、以下として定義される、本開示の微生物の非限定的な選択を表す：

【 0 2 1 9 】

A = 表 1 に記載されている受託番号 2 0 1 7 0 1 0 0 1 の微生物；

【 0 2 2 0 】

B = 表 1 に記載されている受託番号 2 0 1 7 0 1 0 0 3 の微生物；

【 0 2 2 1 】

C = 表 1 に記載されている受託番号 2 0 1 7 0 1 0 0 2 の微生物；

【 0 2 2 2 】

D = 表 1 に記載されている受託番号 2 0 1 7 0 8 0 0 4 の微生物；

【 0 2 2 3 】

E = 表 1 に記載されている受託番号 2 0 1 7 0 8 0 0 3 の微生物；

【 0 2 2 4 】

F = 表 1 に記載されている受託番号 2 0 1 7 0 8 0 0 2 の微生物；

【 0 2 2 5 】

G = 表 1 に記載されている受託番号 2 0 1 7 0 8 0 0 1 の微生物；

【 0 2 2 6 】

H = 表 1 に記載されている受託番号 2 0 1 7 1 2 0 0 1 の微生物、及び

【 0 2 2 7 】

I = 表 1 に記載されている受託番号 2 0 1 7 1 2 0 0 2 の微生物。

【表 2】

表 2. 8つ及び9つの菌株組成

A,B,C,D,E,F,G,H	A,B,C,D,E,F,G,I	A,B,C,D,E,F,H,I	A,B,C,D,E,G,H,I	A,B,C,D,F,G,H,I	A,B,C,E,F,G,H,I
A,B,D,E,F,G,H,I	A,C,D,E,F,G,H,I	B,C,D,E,F,G,H,I	A,B,C,D,E,F,G,H,I		

【表 3】

表 3. 7つの菌株組成

A,B,C,D,E,F,G	A,B,C,D,E,F,H	A,B,C,D,E,F,I	A,B,C,D,E,G,H	A,B,C,D,E,G,I	A,B,C,D,E,H,I
A,B,C,D,F,G,H	A,B,C,D,F,G,I	A,B,C,D,F,H,I	A,B,C,D,G,H,I	A,B,C,E,F,G,H	A,B,C,E,F,G,I
A,B,C,E,F,H,I	A,B,C,E,G,H,I	A,B,C,F,G,H,I	A,B,D,E,F,G,H	A,B,D,E,F,G,I	A,B,D,E,F,H,I
A,B,D,E,G,H,I	A,B,D,F,G,H,I	A,B,E,F,G,H,I	A,C,D,E,F,G,H	A,C,D,E,F,G,I	A,C,D,E,F,H,I
A,C,D,E,G,H,I	A,C,D,F,G,H,I	A,C,E,F,G,H,I	A,D,E,F,G,H,I	B,C,D,E,F,G,H	B,C,D,E,F,G,I
B,C,D,E,F,H,I	B,C,D,E,G,H,I	B,C,D,F,G,H,I	B,C,E,F,G,H,I	B,D,E,F,G,H,I	C,D,E,F,G,H,I

10

20

30

40

50

【表 4】

表 4. 6つの菌株組成

A,B,C,D,E,F	A,B,C,D,E,G	A,B,C,D,E,H	A,B,C,D,E,I	A,B,C,D,F,G	A,B,C,D,F,H	A,B,C,D,F,I
A,B,C,D,G,H	A,B,C,D,G,I	A,B,C,D,H,I	A,B,C,E,F,G	A,B,C,E,F,H	A,B,C,E,F,I	A,B,C,E,G,H
A,B,C,E,G,I	A,B,C,E,H,I	A,B,C,F,G,H	A,B,C,F,G,I	A,B,C,F,H,I	A,B,C,G,H,I	A,B,D,E,F,G
A,B,D,E,F,H	A,B,D,E,F,I	A,B,D,E,G,H	A,B,D,E,G,I	A,B,D,E,H,I	A,B,D,F,G,H	A,B,D,F,G,I
D,E,F,G,H,I	C,E,F,G,H,I	A,B,D,F,H,I	A,B,D,G,H,I	A,B,E,F,G,H	A,B,E,F,G,I	A,B,E,F,H,I
A,B,E,G,H,I	A,B,F,G,H,I	A,C,D,E,F,G	A,C,D,E,F,H	A,C,D,E,F,I	A,C,D,E,G,H	A,C,D,E,G,I
A,C,D,E,H,I	A,C,D,F,G,H	A,C,D,F,G,I	A,C,D,F,H,I	A,C,D,G,H,I	A,C,E,F,G,H	A,C,E,F,G,I
A,C,E,F,H,I	A,C,E,G,H,I	A,C,F,G,H,I	A,D,E,F,G,H	A,D,E,F,G,I	A,D,E,F,H,I	A,D,E,G,H,I
A,D,F,G,H,I	A,E,F,G,H,I	B,C,D,E,F,G	B,C,D,E,F,H	B,C,D,E,F,I	B,C,D,E,G,H	B,C,D,E,G,I
B,C,D,E,H,I	B,C,D,F,G,H	B,C,D,F,G,I	B,C,D,F,H,I	B,C,D,G,H,I	B,C,E,F,G,H	B,C,E,F,G,I
B,C,E,F,H,I	B,C,E,G,H,I	B,C,F,G,H,I	B,D,E,F,G,H	B,D,E,F,G,I	B,D,E,F,H,I	B,D,E,G,H,I
B,D,F,G,H,I	B,E,F,G,H,I	C,D,E,F,G,H	C,D,E,F,G,I	C,D,E,F,H,I	C,D,E,G,H,I	C,D,F,G,H,I

10

【表 5】

表 5. 5つの菌株組成

A,B,C,D,E	A,B,C,D,F	A,B,C,D,G	A,B,C,D,H	A,B,C,D,I	A,B,C,E,F	A,B,C,E,G	A,B,C,E,H
A,B,C,F,H	A,B,C,F,G	A,B,C,F,I	A,B,C,G,H	A,B,C,G,I	A,B,C,H,I	A,B,D,E,F	A,B,D,E,G
A,B,D,E,I	A,B,D,F,G	A,B,D,F,H	A,B,D,F,I	A,B,D,G,H	A,B,D,G,I	A,B,D,H,I	A,B,E,F,G
A,B,E,F,I	A,B,E,G,H	A,B,E,G,I	A,B,E,H,I	A,B,F,G,H	A,B,F,G,I	A,B,F,H,I	A,B,G,H,I
A,C,D,E,G	A,C,D,E,H	A,C,D,E,I	A,C,D,F,G	A,C,D,F,H	A,C,D,F,I	A,C,D,G,H	A,C,D,G,I
A,C,E,F,G	A,C,E,F,H	A,C,E,F,I	A,C,E,G,H	A,C,E,G,I	A,C,E,H,I	A,C,F,G,H	A,C,F,G,I
A,C,G,H,I	A,D,E,F,G	A,D,E,F,H	A,D,E,F,I	A,D,E,G,H	A,D,E,G,I	A,D,E,H,I	A,D,F,G,H
A,D,F,H,I	A,D,G,H,I	A,E,F,G,H	A,E,F,G,I	A,E,F,H,I	A,E,G,H,I	A,F,G,H,I	B,C,D,E,F
B,C,D,E,H	B,C,D,E,I	B,C,D,F,G	B,C,D,F,H	B,C,D,F,I	B,C,D,G,H	B,C,D,G,I	B,C,D,H,I
B,C,E,F,H	B,C,E,F,I	B,C,E,G,H	B,C,E,G,I	B,C,E,H,I	B,C,F,G,H	B,C,F,G,I	B,C,F,H,I
B,D,E,F,G	B,D,E,F,H	B,D,E,F,I	B,D,E,G,H	B,D,E,G,I	B,D,E,H,I	B,D,F,G,H	B,D,F,G,I
B,D,G,H,I	B,E,F,G,H	B,E,F,G,I	B,E,F,H,I	B,E,G,H,I	B,F,G,H,I	C,D,E,F,G	C,D,E,F,H
C,D,E,G,H	C,D,E,G,I	C,D,E,H,I	C,D,F,G,H	C,D,F,G,I	C,D,F,H,I	C,D,G,H,I	C,E,F,G,H
C,E,F,H,I	C,E,G,H,I	C,F,G,H,I	D,E,F,G,H	D,E,F,G,I	D,E,F,H,I	D,E,G,H,I	D,F,G,H,I
A,B,C,E,I	A,B,D,E,H	A,B,E,F,H	A,C,D,E,F	A,C,D,H,I	A,C,F,H,I	A,D,F,G,I	B,C,D,E,G
B,C,E,F,G	B,C,G,H,I	B,D,F,H,I	C,D,E,F,I	C,E,F,G,I	E,F,G,H,I		

20

30

40

50

【表 6】

表 6. 4つの菌株組成

A,B,C,D	A,B,C,E	A,B,C,F	A,B,C,G	A,B,C,H	A,B,C,I	A,B,D,E	A,B,D,F	D,G,H,I
A,B,D,G	A,B,D,H	A,B,D,I	A,B,E,F	A,B,E,G	A,B,E,H	A,B,E,I	A,B,F,G	E,F,G,H
A,B,F,H	A,D,F,H	A,D,F,I	A,D,G,H	A,D,G,I	A,D,H,I	A,E,F,G	A,E,F,H	E,F,G,I
A,B,F,I	A,B,G,H	A,B,G,I	A,B,H,I	A,C,D,E	A,C,D,F	A,C,D,G	A,C,D,H	E,F,H,I
A,C,D,I	A,C,E,F	A,C,E,G	A,C,E,H	A,C,E,I	A,C,F,G	A,C,F,H	A,C,F,I	E,G,H,I
A,C,G,H	A,C,G,I	A,C,H,I	A,D,E,F	A,D,E,G	A,D,E,H	A,D,E,I	A,D,F,G	F,G,H,I
A,E,F,I	A,E,G,H	A,E,G,I	A,E,H,I	A,F,G,H	A,F,G,I	A,F,H,I	A,G,H,I	D,E,F,H
B,C,D,E	B,C,D,F	B,C,D,G	B,C,D,H	B,C,D,I	B,C,E,F	B,C,E,G	B,C,E,H	D,E,F,I
B,C,E,I	B,C,F,G	B,C,F,H	B,C,F,I	B,C,G,H	B,C,G,I	B,C,H,I	B,D,E,F	D,E,G,H
B,D,E,G	B,D,E,H	B,D,E,I	B,D,F,G	B,D,F,H	B,D,F,I	B,D,G,H	B,D,G,I	D,E,G,I
B,D,H,I	B,E,F,G	B,E,F,H	B,E,F,I	B,E,G,H	B,E,G,I	B,E,H,I	B,F,G,H	D,E,H,I
B,F,G,I	B,F,H,I	B,G,H,I	C,D,E,F	C,D,E,G	C,D,E,H	C,D,E,I	C,D,F,G	D,F,G,H
C,D,F,H	C,D,F,I	C,D,G,H	C,D,G,I	C,D,H,I	C,E,F,G	C,E,F,H	C,E,F,I	D,F,G,I
C,E,G,H	C,E,G,I	C,E,H,I	C,F,G,H	C,F,G,I	C,F,H,I	C,G,H,I	D,E,F,G	D,F,H,I

10

【表 7】

表 7. 3つの菌株組成

A,B,C	A,B,D	A,B,E	A,B,F	A,B,G	A,B,H	A,B,I	A,C,D	A,C,E	G,H,I	E,F,H
A,C,F	A,C,G	A,C,H	A,C,I	A,D,E	A,D,F	A,D,G	A,D,H	A,D,I	F,H,I	E,F,G
A,E,F	A,E,G	A,E,H	A,E,I	A,F,G	A,F,H	A,F,I	A,G,H	A,G,I	F,G,I	D,H,I
A,H,I	B,C,D	B,C,E	B,C,F	B,C,G	B,C,H	B,C,I	B,D,E	B,D,F	F,G,H	D,G,I
B,D,G	B,D,H	B,D,I	B,E,F	B,E,G	B,E,H	B,E,I	B,F,G	B,F,H	E,H,I	E,F,I
B,F,I	B,G,H	B,G,I	B,H,I	C,D,E	C,D,F	C,D,G	C,D,H	C,D,I	E,G,I	D,G,H
C,E,F	C,E,G	C,E,H	C,E,I	C,F,G	C,F,H	C,F,I	C,G,H	C,G,I	E,G,H	D,F,I
C,H,I	D,E,F	D,E,G	D,E,H	D,E,I	D,F,G	D,F,H				

20

30

【表 8】

表 8. 2つの菌株組成

A,B	A,C	A,D	A,E	A,F	A,G	A,H	A,I	B,C	B,D	B,E	B,F	B,G	B,H	B,I	C,D
C,E	C,F	C,G	C,H	C,I	D,E	D,F	D,G	D,H	D,I	E,F	E,G	E,H	E,I	F,G	F,H
F,I	G,H	G,I	H,I												

【 0 2 2 8 】

いくつかの実施形態では、微生物組成物は、表 2 ~ 8 の任意のメンバーグループから選択され得る。

40

【 0 2 2 9 】

農業組成物

本明細書に記載の方法により産生される細菌または細菌集団を含み、及び/または本明細書に記載のような特徴を有する組成物は、液体、泡沫、または乾燥製品の形態であってもよい。また、本明細書に記載の方法により生産される及び/または本明細書に記載されるような特性を有する細菌または細菌集団を含む組成物を使用して、植物形質を改善してもよい。いくつかの例では、細菌集団を含む組成物は、乾燥粉末、粉末及び水のスラリー、または流動性種子処理剤の形態であってもよい。細菌集団を含む組成物は、種子の表面にコーティングしてもよく、液体形態であってもよい。

【 0 2 3 0 】

50

組成物は、連続攪拌槽型反応器、回分反応器などのバイオリアクターで、及び農場で製造することができる。いくつかの例では、組成物は、ジャグなどの容器中で、またはミニバルクで保管することができる。一部の例では、組成物は、ボトル、ジャー、アンプル、パッケージ、入れ物、袋、箱、ビン、封筒、紙箱、容器、サイロ、発送容器、トラック荷台、及びケースからなる群から選択される物体内で保管されてもよい。

【0231】

また、組成物を使用して、植物形質を改善してもよい。いくつかの例では、1つ以上の組成物を、種子にコーティングしてもよい。いくつかの例では、1つ以上の組成物を、実生にコーティングしてもよい。いくつかの例では、1つ以上の組成物を、種子の表面にコーティングしてもよい。いくつかの例では、1つ以上の組成物を、種子の表面上方の層としてコーティングしてもよい。いくつかの例では、種子にコーティングされる組成物は、液体形態であってもよく、乾燥製品形態であってもよく、泡沫形態であってもよく、粉末及び水のスラリー形態であってもよく、または流動性種子処理剤であってもよい。いくつかの例では、1つ以上の組成物を種子及び/または実生に、噴霧、浸漬、コーティング、封入、及び/または散布することにより、1つ以上の組成物を種子及び/または実生に適用してもよい。いくつかの例では、複数の細菌または細菌集団を、植物の種子及び/または実生にコーティングすることができる。いくつかの例では、細菌組合せのうちの少なくとも2種、少なくとも3種、少なくとも4種、少なくとも5種、少なくとも6種、少なくとも7種、少なくとも8種、少なくとも9種、少なくとも10種、または10種より多くの細菌は、以下の属：Acidovorax、Agrobacterium、Bacillus、Burkholderia、Chryseobacterium、Curtobacterium、Enterobacter、Escherichia、Methylobacterium、Paenibacillus、Pantoea、Pseudomonas、Ralstonia、Saccharibacillus、Sphingomonas、及びStenotrophomonasのうちの1つから選択され得る。

【0232】

いくつかの例では、内生菌の組合せのうちの少なくとも2種、少なくとも3種、少なくとも4種、少なくとも5種、少なくとも6種、少なくとも7種、少なくとも8種、少なくとも9種、少なくとも10種、または10種より多くの細菌及び細菌集団は、以下の科：Bacillaceae、Burkholderiaceae、Comamonadaceae、Enterobacteriaceae、Flavobacteriaceae、Methylobacteriaceae、Microbacteriaceae、Paenibacillileae、Pseudomonadaceae、Rhizobiaceae、Sphingomonadaceae、Xanthomonadaceae、Cladosporiaceae、Gnomoniaceae、Incertae sedis、Lasiosphaeriaceae、Netriaceae、及びPleosporaceaeのうちの1つから選択される。

【0233】

いくつかの例では、内生菌の組み合わせのうちの少なくとも2種、少なくとも3種、少なくとも4種、少なくとも5種、少なくとも6種、少なくとも7種、少なくとも8種、少なくとも9種、少なくとも10種、または10種よりも多くの細菌及び細菌集団は、以下の科：Bacillaceae、Burkholderiaceae、Comamonadaceae、Enterobacteriaceae、Flavobacteriaceae、Methylobacteriaceae、Microbacteriaceae、Paenibacillileae、Pseudomonadaceae、Rhizobiaceae、Sphingomonadaceae、Xanthomonadaceae、Cladosporiaceae、Gnomoniaceae、Incertae sedis、Lasiosphaeriaceae、Netriaceae、Pleosporaceaeのうちの1つから選択される。

【0234】

10

20

30

40

50

組成物の例としては、商業的に重要な農業作物、例えば、モロコシ、キャノーラ、トマト、イチゴ、オオムギ、イネ、メイズ、及びコムギのための種子コーティングを挙げることができる。また、組成物の例としては、トウモロコシ、ダイズ、キャノーラ、モロコシ、ジャガイモ、米、野菜、穀類、及び脂肪種子のための種子コーティングを挙げることができる。本明細書に提供されるような種子は、遺伝子組換え生物（GMO）、非GMO、有機、または従来のものであってもよい。いくつかの例では、組成物は、植物の気中部分に噴霧されてもよいし、または、植物種子が植栽される畦間に挿入すること、土壤に散水すること、もしくは根を組成物の懸濁液に浸漬することによって根に施用されてもよい。いくつかの例では、組成物は、細胞生存、及び宿主植物での人為的接種及びコロニー形成の能力を維持する好適な様式で脱水してもよい。細菌種は、 $10^8 \sim 10^{10}$ CFU/mlの間の濃度で組成物中に存在してもよい。いくつかの例では、組成物は、モリブデンイオン、鉄イオン、マンガンイオン、またはこれらイオンの組合せなどの微量元素イオンを添加補充してもよい。本明細書に記載の組成物の例におけるイオンの濃度は、約0.1 mM ~ 約50 mMの間であってもよい。また、組成物のいくつかの例は、ベータ-グルカン、カルボキシルメチルセルロース（CMC）、細菌性細胞外ポリマー物質（EPS）、糖、畜乳、または他の好適な担体などの担体と共に配合されてもよい。いくつかの例では、泥炭または植栽用物質を担体として使用してもよく、または組成物がバイオポリマーに捕捉されているバイオポリマーを担体として使用してもよい。本明細書に記載の細菌集団を含む組成物は、植物成長の促進、葉中の高葉緑素含有量の維持、果実数または種子数の増加、及び果実単位重量または種子単位重量の増加など、植物形質を向上させることができる。

【0235】

本明細書に記載の細菌集団を含む組成物は、種子の表面上にコーティングしてもよい。そのため、本明細書に記載のうちの1つ以上の細菌でコーティングされた種子を含む組成物も企図される。種子コーティングは、細菌集団を、多孔性の化学的に不活性な粒状担体と混合することにより形成することができる。代替として、組成物は、種子が植栽される畝間に直接挿入されてもよいし、または植物葉に噴霧されてもよいし、または根を組成物の懸濁液に浸漬することによって施用されてもよい。有効量の組成物を使用して、植物の根に隣接する土壤下領域に生存可能な細菌増殖を定着させてもよいし、または植物の葉に生存可能な細菌増殖を定着させてもよい。一般に、有効量は、改善された形質（例えば、所望のレベルの窒素固定）を有する植物をもたらすのに十分な量である。

【0236】

本明細書に記載の細菌組成物は、農業的に許容される担体を使用して製剤化することができる。こうした実施形態に有用な配合物は、粘着付与剤、微生物安定化剤、殺真菌剤、抗細菌剤、保存剤、安定化剤、界面活性剤、抗錯体剤、除草剤、殺線虫剤、殺虫剤、植物成長調節剤、肥料、殺鼠剤、乾燥剤、殺菌剤、栄養素、及びそれらの任意の組合せからなる群より選択される少なくとも1つのメンバーを含んでいてもよい。いくつかの例では、組成物は、常温保存可能であってもよい。例えば、本明細書に記載の組成物のうちのいずれも、農業的に許容される担体（例えば、天然に存在しない肥料などの肥料、天然に存在しない接着剤などの接着剤、及び天然に存在しない農薬などの農薬のうちの一つ以上）を含むことができる。非天然付着剤は、例えば、ポリマー、コポリマー、または合成ろうであってもよい。例えば、本明細書に記載されているコーティングされた種子、実生、または植物はいずれも、種子コーティングにそのような農業的に許容される担体を含有することができる。本明細書に記載されている組成物または方法のいずれにおいても、農業的に許容される担体は、非天然化合物（例えば、非天然肥料；ポリマー、コポリマー、もしくは合成ろうなどの非天然付着剤；または非天然殺虫剤）であってもよく、または含んでもよい。農業的に許容される担体の非限定的な例は、下記に記載されている。農業的に許容される担体の追加の例は、当技術分野で公知である。

【0237】

一部の場合では、細菌は、農業的に許容される担体と混合される。担体は、固体担体ま

たは液体担体であってもよく、ミクロスフェア、粉末、及びエマルジョンなどを含む種々の形態であってもよい。担体は、安定性、湿潤性、または分散性の増加などの様々な特性を付与するいくつかの担体のいずれか1つまたは複数であってもよい。非イオン性界面活性剤であってもよく、またはイオン性界面活性剤であってもよく、またはそれらの組合せであってもよい天然または合成界面活性剤などの湿潤剤が、組成物中に含まれてもよい。また、油中水型エマルジョンを使用して、単離された細菌を含む組成物を配合することができる（例えば、米国特許第7,485,451号を参照されたい）。調製され得る好適な製剤には、水和性粉末、顆粒、ゲル、寒天片またはペレット、増粘剤など、マイクロカプセル化粒子等、流動性水溶液、水性懸濁液、油中水型エマルジョンなどの液体などが含まれ得る。配合物は、穀物もしくはマメ科植物製品、例えば、地上穀物もしくは豆、穀物もしくは豆に由来するプロスまたは粉末、デンプン、糖、または油を含んでもよい。

10

【0238】

いくつかの実施形態では、農業担体は、土壌であってもよく、または植物生育培地であってもよい。使用することができる他の農業担体としては、水、肥料、植物系の油、保湿剤、またはそれらの組合せが挙げられる。あるいは、農業担体は、顆粒、ペレット、または懸濁液を含む、ケイソウ土、ローム、シリカ、アルギン酸塩、粘土、ペントナイト、バーミキュライト、種囊、他の植物及び動物産物、または組合せなどの固形物であってもよい。これらに限定されないが、ローム、砂、または粘土などの中のペスタ (p e s t a) (粉末及びカオリン粘土)、寒天または粉末に基づくペレットなどの、前述の成分のいずれかの混合物も担体として企図される。配合物は、大麦、米、または種子などの他の生物学的材料；植物部分；サトウキビバガス；穀物処理に由来する殻または柄；建築現場廃物に由来する地上植物材料または木材；紙、繊維、または木材の再利用に由来するおがくずまたは繊維片などの、細菌の食料源を含んでもよい。

20

【0239】

例えば、肥料を使用して、成長促進の一助とするか、または種子、実生、もしくは植物に栄養素を供給してもよい。肥料の非限定的な例としては、窒素、亜リン酸 (p h o s p h o r o u s)、カリウム、カルシウム、硫黄、マグネシウム、ホウ素、塩化物、マンガン、鉄、亜鉛、銅、モリブデン、及びセレン（またはそれらの塩）が挙げられる。肥料の追加の例としては、1つ以上のアミノ酸、塩、炭水化物、ビタミン、グルコース、NaCl、酵母抽出物、 $NH_4H_2PO_4$ 、 $(NH_4)_2SO_4$ 、グリセロール、バリン、L-ロイシン、乳酸、プロピオン酸、コハク酸、リンゴ酸、クエン酸、酒石酸水素カリウム、キシロース、リキソース、及びレシチンが挙げられる。一実施形態では、製剤は、他の活性薬剤を物質（例えば、種子の表面）に結合させる一助とするために、粘着付与剤または接着性剤（接着剤と呼ばれる）を含むことができる。そのような薬剤は、他の化合物（例えば、生物製剤ではない防除剤）を含有し得る担体を細菌と組み合わせて、コーティング組成物を産出するために有用である。そのような組成物は、植物または種子の周囲にコーティングを作出して、微生物及び他の薬剤と植物または植物部位との間の接触を維持する一助となる。一実施形態では、接着剤は、以下のものからなる群より選択される：アルギン酸塩、ゴム、デンプン、レシチン、ホルモノネチン、ポリビニルアルコール、アルカリホルモノネチネート、ヘスペリチン、ポリ酢酸ビニル、ケファリン、アラビアゴム、キサントンガム、鉱油、ポリエチレングリコール (P E G)、ポリビニルピロリドン (P V P)、アラビノ-ガラクトタン、メチルセルロース、P E G 4 0 0、キトサン、ポリアクリルアミド、ポリアクリレート、ポリアクリロニトリル、グリセロール、トリエチレングリコール、酢酸ビニル、ジェランガム、ポリスチレン、ポリビニル、カルボキシメチルセルロース、ガッチゴム、及びポリオキシエチレン-ポリオキシブチレンブロックコポリマー。

30

40

【0240】

一部の実施形態では、接着剤は、例えば、カルナウバろう、みつろう、中国ろう、セラックろう、鯨ろう、カンデリラろう、キャスターろう、オーリクリーろう、及び米ぬかるうなどのろう、ポリサッカライド（例えばデンプン、デキストリン、マルトデキストリン、アルギン酸塩、及びキトサン）、脂肪、油、タンパク質（例えば、ゼラチン及びゼイン

50

)、アラビアガム、ならびにシェラックであってもよい。接着剤は、非天然化合物、例えばポリマー、コポリマー、及びろうであってもよい。例えば、接着剤として使用することができるポリマーの非限定的な例としては、以下のものが挙げられる：ポリ酢酸ビニル、ポリ酢酸ビニルコポリマー、エチレン酢酸ビニル(EVA)コポリマー、ポリビニルアルコール、ポリビニルアルコールコポリマー、セルロース(例えば、エチルセルロース、メチルセルロース、ヒドロキシメチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、及びカルボキシメチルセルロース)、ポリビニルピロリドン、塩化ビニル、塩化ビニリデンコポリマー、リグノスルホン酸カルシウム、アクリルコポリマー、ポリビニルアクリレート、ポリエチレンオキシド、アシルアミドポリマー及びコポリマー、ポリヒドロキシエチルアクリレート、メチルアクリルアミドモノマー、ならびにポリクロロプレン。

10

【0241】

いくつかの例では、付着剤、抗真菌剤、成長調節剤、及び殺虫剤(例えば、殺虫剤)のうちの一つ以上は、非天然化合物(例えば、任意の組合せの)である。農業的に許容される担体の追加の例としては、分散剤(例えば、ポリビニルピロリドン/ビニルアセテートPVPIVAS-630)、界面活性剤、結合剤、及び充填剤が挙げられる。

【0242】

また、配合物は、界面活性剤を含有してもよい。界面活性剤の非限定的な例としては、Prefer 28(Cenex)、Surf-N(US)、Enhance(Brandt)、P-28(Wilfarm)、及びPatrol(Helena)などの窒素界面活性剤配合物が挙げられる。エステル化種子油としては、Sun-It II(AmCy)、MSO(UAP)、Scoil(Agscoco)、Hasten(Wilfarm)、及びMes-100(Drexel)が挙げられ、有機シリコン界面活性剤としては、Silwet L77(UAP)、Silikin(Terra)、Dyne-Amic(Helena)、Kinetic(Helena)、Sylgard 309(Wilbur-Ellis)、及びCentury(Precision)が挙げられる。一実施形態では、界面活性剤は、0.01%v/v~10%v/vの濃度で存在する。別の実施形態では、界面活性剤は、0.1%v/v~1%v/vの濃度で存在する。

20

【0243】

ある特定の場合では、配合物は、微生物安定化剤を含む。そのような薬剤としては、乾燥剤として分類することができる任意の化合物または化合物の混合物を含み得る乾燥剤を挙げることができ、化合物(複数可)は、液体接種物に対して実際に乾燥効果を有するような濃度で使用されるか否かを問わない。そのような乾燥剤は、理想的には、使用される細菌集団と適合性を有し、微生物集団が種子へと適用されても生存し、乾燥しても生存する能力を促進すると予想される。好適な乾燥剤の例としては、トレハロース、スクロース、グリセロール、及びメチレングリコールのうちの一つ以上が挙げられる。他の好適な乾燥剤としては、これらに限定されないが、非還元糖及び糖アルコール(例えば、マンニトールまたはソルビトール)が挙げられる。配合物に導入される乾燥剤の量は、重量/容積で約5%から約50%まで、例えば、約10%~約40%の間、約15%~約35%の間、または約20%~約30%の間の範囲であってもよい。一部の場合では、配合物は、殺真菌剤、抗細菌剤、除草剤、殺線虫剤、殺虫剤、植物成長調節剤、殺鼠剤、殺菌剤または栄養素などの薬剤を含有することが有利である。一部の例では、製剤は、種子表面伝染性病原体に対する保護を提供する保護剤が含まれる場合がある。一部の例では、保護剤は、ある程度のレベルの土壌伝染性病原体の制御を提供することができる。一部の例では、保護剤は、主に種子表面で有効であり得る。

30

40

【0244】

一部の例では、殺真菌剤は、化学的かまたは生物学的かに関わらず、真菌の成長を阻害することができるか、または真菌を死滅させることができる化合物または作用剤を含んでいてもよい。一部の例では、殺真菌剤は、静真菌性であってもよくまたは殺真菌性であってもよい化合物を含んでいてもよい。一部の例では、殺真菌剤は、保護剤であってもよく、または主に種子表面で有効であり、種子表面伝染性病原体に対する保護を提供し、ある

50

程度のレベルの土壌伝染性病原体の制御を提供する作用剤であってもよい。保護剤殺真菌剤の非限定的な例としては、キャプタン、マネブ、チラム、またはフルジオキシニルが挙げられる。

【0245】

一部の例では、殺真菌剤は、出芽中の実生に吸収され、宿主植物組織内部の真菌を阻害または死滅させることができる浸透性殺真菌剤であってもよい。種子処理剤に使用される浸透性殺真菌剤としては、これらに限定されないが、以下のものが挙げられる：アゾキシストロピン、カルボキシシン、メフェノキサム、メタラキシル、チアベンダゾール、トリフロキシストロピン、ならびにジフェノコナゾール、イブコナゾール、テブコナゾール、及びトリチコナゾールを含む種々のトリアゾール殺真菌剤。メフェノキサム及びメタラキシルは、主に、水生カビ真菌 *Pythium* 及び *Phytophthora* を標的とするために使用される。病原性真菌種の感受性に微妙な差異があるため、または植物の殺真菌剤分布もしくは感受性に差異があるためのいずれかのため、植物種に応じて、ある殺真菌剤は、他の殺真菌剤よりも好ましい。一部の例では、殺真菌剤は、細菌または真菌などの生物学的制御因子であってもよい。そのような生物は、病原性真菌に寄生性であってもよく、または真菌を死滅させるかもしくはそうでなければ真菌の成長を防止することができる毒素もしくは他の物質を分泌してもよい。任意のタイプの殺真菌剤、特に植物に対して一般に使用されるものを、種子組成物中の制御因子として使用することができる。

10

【0246】

一部の例では、種子コーティング組成物は、抗細菌特性を有する制御因子を含む。一実施形態では、抗細菌特性を有する制御因子は、本明細書の他所に記載されている化合物から選択される。別の実施形態では、化合物は、ストレプトマイシン、オキシテトラサイクリン、オキシリニン酸、またはゲンタマイシンである。種子コーティング組成物の一部分として使用することができる抗細菌化合物の他の例としては、ジクロロフェン及びベンジルアルコールヘミホルマールに基づくもの（ICIの Proxel（登録商標）または Thor Chemieの Acticide（登録商標）RS、及び Rohm & Haasの Kathon（登録商標）MK25）、ならびにアルキルイソチアゾリノン及びベンゾイソチアゾリノンなどのイソチアゾリノン誘導体（Thor Chemieの Acticide（登録商標）MBS）に基づくものが挙げられる。

20

【0247】

一部の例では、成長調節剤は、アブシジン酸、アミドクロル、アンシミドール、6-ベンジルアミノプリン、ブラシノリド、ブトラリン、クロルメコート（塩化クロルメコート）、塩化コリン、シクラニリド、ダミノジド、ジケグラック、ジメチピン、2,6-ジメチルプリジン、エテホン、フルメトラリン、フルルプリミドール、フルチアセト、ホルクロルフェヌロン、ジベレリン酸、イナベンフィド、インドール-3-酢酸、マレイン酸ヒドラジド、メフルイジド、メピクアト（塩化メピクアト）、ナフタレン酢酸、N-6-ベンジルアデニン、バクロブトラゾール、プロヘキサジオンホスホトリチオエート、2,3,5-トリ-ヨード安息香酸、トリネキサパック-エチル（trinezapacetyl）、及びウニコナゾールからなる群より選択される。成長調節剤の追加の非限定的な例としては、ブラシノステロイド、サイトカイニン（例えば、キネチン及びゼアチン）、オーキシニン（例えば、インドリル酢酸及びアスパラギン酸インドリルアセチル）、フラボノイド及びイソフラボノイド（例えば、ホルモノネチン及びジオスメチン）、フィトアレキシン（phytoalexin）（例えば、グリセオリン）、及びフィトアレキシン誘導性オリゴ糖（例えば、ペクチン、キチン、キトサン、ポリガラクトuron酸（polygalacturonic acid）、及びオリゴガラクトuron酸）、ならびにジベレリン（gibberellin）が挙げられる。そのような薬剤は、理想的には、配合物が適用される農業種子または実生と適合性を有する（例えば、植物の成長または健康に有害であるべきではない）。さらに、薬剤は、理想的には、ヒト、動物、または工業使用に関して安全性の懸念を引き起こさないものである（例えば、安全性の問題がないか、または化合物は、十分に不安定であり、植物に由来する商品植物製品に含まれる化合物の量は無視

30

40

50

できる程度である)。

【0248】

線虫アンタゴニスト生物防除剤の一部の例としては、ARF18; 30 Arthrobotryis種; Chaetomium種; Cylindrocarpon種; Exophilia種; Fusarium種; Gliocladium種; Hirsutella種; Lecanicillium種; Monacrosporium種; Myrothecium種; Neocosmospora種; Paecilomyces種; Pochonia種; Stagonospora種; VA菌根菌、Burkholderia種; Pasteuria種、Brevibacillus種; Pseudomonas種; 及びRhizobacteriaが挙げられる。特に好ましい線虫アンタゴニスト生物防除剤として、ARF18、Arthrobotryis oligospora、Arthrobotryis dactyloides、Chaetomium globosum、Cylindrocarpon heteronema、Exophilia jeanselmei、Exophilia pisciphila、Fusarium aspergillus、Fusarium solani、Gliocladium catenulatum、Gliocladium roseum、Gliocladium vixens、Hirsutella rhossiliensis、Hirsutella minnesotensis、Lecanicillium lecanii、Monacrosporium drechsleri、Monacrosporium gephyropagum、Myrothecium verrucaria、Neocosmospora vasinfecta、Paecilomyces lilacinus、Pochonia chlamydosporia、Stagonospora heteroderae、Stagonospora phaseoli、VA菌根菌、Burkholderia cepacia、Pasteuria penetrans、Pasteuria thornei、Pasteuria nishizawae、Pasteuria ramosa、Pastrueia usage、Brevibacillus laterosporus菌株G4、Pseudomonas fluorescens、及びRhizobacteriaが挙げられる。

【0249】

栄養素の一部の例は、これらに限定されないが、尿素、硝酸アンモニウム、硫酸アンモニウム、無加圧窒素溶液、アンモニア水、無水アンモニア、チオ硫酸アンモニウム、硫黄被覆尿素、尿素-ホルムアルデヒド、IBDU、ポリマー被覆尿素、硝酸カルシウム、尿素ホルム、及びメチレン尿素を含む窒素肥料、リン酸二アンモニウム、リン酸一アンモニウム、ポリリン酸アンモニウム、濃縮過リン酸、及び重過リン酸などの亜リン酸肥料、ならびに塩化カリウム、硫酸カリウム、硫酸カリウムマグネシウム、硝酸カリウムなどのカリウム肥料からなる群より選択することができる。そのような組成物は、種子被膜組成物内の遊離塩またはイオンとして存在することができる。あるいは、栄養素/肥料は、経時的な持続放出を提供するように錯体化またはキレート化されていてもよい。

【0250】

殺鼠剤の一部の例としては、2-イソバレリルインダン-1, 3-ジオン、4-(キノキサリン-2-イルアミノ)ベンゼンスルホンアミド、アルファ-クロロヒドリン、リン化アルミニウム、アンツ-、酸化ヒ素、炭酸バリウム、ビスチオセミ、プロディファコウム、プロマジオロン、プロメタリン、シアン化カルシウム、クロラロース、クロロファシノン、コレカルシフェロール、クマクロル、クマフリル、クマテトラリル、クリミジン、ジフェナコウム、ジフェチアロン、ジファシノン、エルゴカルシフェロール、フロクマフェン、フルオロアセトアミド、フルプロバジン、フルプロバジン塩酸塩、シアン化水素、ヨードメタン、リンデン、リン化マグネシウム、臭化メチル、ノルボルミド、ホサセチン、ホスフィン、リン、ピンドン、亜ヒ酸カリウム、ピリヌロン、シリロシド、亜ヒ酸ナトリウム、シアン化ナトリウム、フルオロ酢酸ナトリウム、ストリキニーネ、硫酸タリウム、ワルファリン、及びリン化亜鉛からなる物質の群から選択されるものを挙げることで

きる。

【0251】

液体形態、例えば、溶液または懸濁液の場合、細菌集団は、水または水溶液に混合または懸濁されてもよい。好適な液体希釈剤または担体としては、水、水溶液、石油蒸留物、または他の液体担体が挙げられる。

【0252】

固形組成物は、泥炭、コムギ、ふすま、パーミキュライト、粘土、タルク、ベントナイト、ケイソウ土、フラー土、及び低温滅菌土などの適切に分割された固体担体内、及び固体担体上に細菌集団を分散させることにより調製することができる。そのような配合物が水和性粉末として使用される場合、非イオン性、陰イオン性、両性、または陽イオン性の分散剤及び乳化剤などの、生物学的に適合性の分散剤を使用することができる。

10

【0253】

配合時に使用される固体担体としては、例えば、カオリン粘土、パイロフィライト、ベントナイト、モンモリロナイト、ケイソウ土、酸性白土、パーミキュライト、及びパーライトなどの鉱物担体、ならびに硫酸アンモニウム、リン酸アンモニウム、硝酸アンモニウム、尿素、塩化アンモニウム、及び炭酸カルシウムなどの無機塩が挙げられる。また、小麦粉、小麦ふすま、及び米ぬかなどの有機微細粉末を使用してもよい。液体担体としては、ダイズ油及び綿実油などの植物油、グリセロール、エチレングリコール、ポリエチレングリコール、プロピレングリコール、ポリプロピレングリコールなどが挙げられる。

【0254】

20

有害生物

本明細書で教示される任意の微生物を含み得る本開示の農業組成物は、1つ以上の農薬と組み合わせられることがある。

【0255】

本開示の微生物と組み合わせられる農薬は、以下に記載される有害生物のいずれかを標的とする可能性がある。

【0256】

「有害生物」には、昆虫、真菌、細菌、線虫、ダニ、マダニなどが含まれるが、これらに限定されない。有害生物には、鞘翅目、双翅目、膜翅目、鱗翅目、ハジラミ目、同翅類、半翅目直翅目、総翅目、ハサミムシ目、等翅目、シラミ目、隠翅目、毛翅目などから選択される昆虫類、特に鱗翅目及び甲虫目が含まれる。

30

【0257】

当業者は、すべての化合物がすべての有害生物に対して等しく有効であるとは限らないことを認識するであろう。本開示の微生物と組み合わせることができる化合物は、経済的に重要な農学、森林、温室、苗床装飾品、食品及び繊維、公衆及び動物の健康、家庭及び商業構造、家庭及び貯蔵製品の有害生物を含み得る有害生物に対して活性を示す可能性がある。

【0258】

前述のように、本開示の農業組成物（本明細書で教示される任意の微生物を含み得る）は、実施形態において、1つ以上の農薬と組み合わせられる。これらの農薬は、次の有害生物のいずれかに対して有効である可能性がある：

40

【0259】

鱗翅目の幼虫には、ヤガ科 *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (ツマジロクサヨトウ); *S. exigua* Hubner (ビートアワヨトウ); *S. litura* (Fabricius) (ハスモンヨトウ (tobacco cutworm)、ハスモンヨトウ (cluster caterpillar)); *Mamestra configurata* (Walker) (バーサアワヨトウ); *M. brassicae* (Linnaeus) (コナガ); *Agrotis ipsilon* (Hufnagel) (タマナヤガ); *A. orthogonia* Morrison (セイヨウネキリムシ); *A. subterranea* (Fabricius) (グラニコレー

50

トネキリムシ); *Alabama argillacea* (Hubner) (コットンリーフワーム); *Trichoplusia ni* (Hubner) (キャベツシャクトリムシ); *Pseudoplusia includens* (Walker) (ダイズシャクトリムシ); *Anticarsia gemmatalis* (Hubner) (ベルベットビーンキャタピラー); *Hypena scabra* (Fabricius) (グリーンクローパーワーム); *Heliothis virescens* (Fabricius) (オオタバコガ); *Pseudaletia unipuncta* Haworth (アウヨトウ); *Athetis mindara* (Barnes 及び McDunnough) (ラフスキンドネキリムシ); *Euxoa messoria* (Harris) (ダークサイドドネキリムシ); *Earias insulana* Boisduval (スパイニーボールワーム); *E. vittella* (Fabricius) (スポッテドボールワーム); *Helicoverpa armigera* (Hubner) (アメリカボールワーム); *H. zea* (Boddie) (アメリカタバコガまたはオオタバコガ); *Melanchnra picta* (Harris) (ゼブラキャタピラ); *Egira (Xylomyges) curialis* (Grote) (シトラスネキリムシ); メイガ科 *Ostrinia nubilalis* (Hubner) (ヨーロッパマツマダラメイガ); *Amyelois transitella* (Walker) (ネーブルオレンジワーム); *Anagasta kuehniella* (Zeller) (スジコナマダラメイガ); *Cadra cautella* (Walker) (コナマダラメイガ); *Chilo suppressalis* (Walker) (ニカメイガ); *C. partellus*、(モロコシ穿孔虫); *Corcyra cephalonica* (Stainton) (ガイマイツヅリガ); *Crambus caliginosellus* (Clemens) (コーンルートワーム); *C. teterrellus* (Zincken) (シバツトガ); *Cnaphalocrocis medinalis* (Guenee) (イネハマキムシ); *Desmia funeralis* Hubner (グレープリーフフォルダ); *Diaphania hyalinata* (Linnaeus) (メロンワーム); *D. nitidalis* (Stoll) (ピクルワーム); *Diatraea grandiosella* (Dyar) (サウスウエスタンマツマダラメイガ)、*D. saccharalis* (Fabricius) (サトウキビボラー); *Eoreuma loftini* (Dyar) (メキシコニカメイガ); *Ephestia elutella* (Hubner) (タバコ(カカオ)ガ); *Galleria mellonella* (Linnaeus) (オオハチミツガ); *Herpetogramma licarsialis* (Walker) (ソッドウェブワーム); *Homoeosoma electellum* (Hulst) (ヒマワリガ); *Elasmopalpus lignosellus* (Zeller) (レッサーコーンストークボラー); *Achroia grisella* (Fabricius) (コハチノスツヅリガ); *Loxostege sticticalis* (Linnaeus) (ビートウェブワーム); *Orthaga thyrisalis* (Walker) (ティーツリーウェブモス); *Maruca testulalis* Geyer (マメノメイガ); *Plodia interpunctella* (Hubner) (ノシメマダラメイガ); *Scirpophaga incertulas* (Walker) (イエローステムボラー); *Udea rubigalis* (Guenee) (セロリリーフタイヤー) のボラー、ツツミノガ、ウェブワーム、マツマダラメイガ、及びスケリトナイザ; ならびにハマキガ科 *Acleris gloverana* (Walsingham) (ウエスタンブラックヘッドバッドワーム); *A. variana* (Fernald) (イースタンブラックヘッドバッドワーム); *Archips argyrospila* (Walker) (果樹ハマキムシ); *A. rosana* (Linnaeus) (ヨーロッパハマキムシ); ならびに他の *Archips* 種、*Adoxophyes orana* (Fischer von Rosslerstamm) (マサヒメサヤムシガ); *Cochylis hospes* (Walsingham) (パンデデッドサンフラワーモス); *Cydia lati*

10

20

30

40

50

ferreana (Walsingham) (フィルパートワーム); *C. pomonella* (Linnaeus) (シンクイガ); *Platynota flavedana* (Clemens) (バリアゲイテッドリーフローラー); *P. stultana* (Walsingham) (雑食性ハマキムシ); *Lobesia botrana* (Denis及びSchiffermuller) (ヨーロッパングレーブバインモス); *Spilonota ocellana* (Denis及びSchiffermuller) (アイスポテッドバッドモス); *Endopiza viteana* Clemens (グレーブベリーモス); *Eupoecilia ambiguella* (Hubner) (バインモス); *Bonagota salubricola* Meyrick (ブラジリアンアップルリーフローラー); *Grapholita molesta* Busck (ナシヒメシンクイ); *Suleima helianthana* Riley (サンフラワーバッドモス); *Argyrotaenia* 種; *Choristoneura* 種のハマキムシ、バッドワーム、シードワーム、及びフルーツワームが含まれるが、これらに限定されない。

10

【0260】

鱗翅目の選択される他の農学的有害生物には、*Alsophila pometaria* (Harris) (シャクトリムシ); *Anarsia lineatella* (Zeller) (モモキバガ); *Anisota senatoria* (J. E. Smith) (オレンジストライプドオークワーム); *Antheraea pernyi* (Guérin-Meneville) (チャイニーズオークタッサモス); *Bombyx mori* Linnaeus (カイコ); *Bucculatrix thurberiel* Busck (コットンリーフパーホレータ); *Colias eurytheme* Boisduval (アルファルフアキャタピラー); *Datana integer* rima (Grote & Robinson) (ウォールナツキャタピラー); *Dendrolimus sibiricus* (Tschetwerikov) (シベリアンシルクモス); *Ennomos subsignaria* (Hubner) (エルムスパンワーム); *Erannis tiliaria* (Harris) (リンデンルーパー); *Euproctis chrysorrhoea* (Linnaeus) (ブラウンテールモス); *Harrisina americana* (Guérin-Meneville) (グレーブリーフスケルトナイザ); *Hemileuca oliviae* Cockrell (レンジキャタピラー); *Hyphantria cunea* Drury (アメリカシロヒトリ); *Keiferia lycopersicella* (Walsingham) (トマトピンワーム); *Lambdina fiscellaria fiscellaria* (Hulst) (イースタンヘムロックルーパー); *L. fiscellaria lugubrosa* (Hulst) (ウエスタンヘムロックルーパー); *Leucoma salicis* (Linnaeus) (サテンモス); *Lymantria dispar* (Linnaeus) (マイマイガ); *Manduca quinquemaculata* (Haworth) (ファイブスポテッドホークモス、トマトスズメガ); *M. sexta* Haworth (トマトスズメガ、タバコスズメガ); *Operophtera brumata* (Linnaeus) (ウインターモス); *Paleacrita vernata* (Peck) (スプリングカンカーワーム); *Papilio cresphontes* (Cramer) (オオタスキアゲハ オレンジドッグ); *Phryganidia californica* (Packard) (カリフォルニアオークワーム); *Phyllocnistis citrella* Stainton (ミカンハモグリガ); *Phyllonorycter blancardella* Fabricius (スポテッドテンチフォームリーフマイナー); *Pieris brassicae* (Linnaeus) (オオモンシロチョウ); *P. rapae* (Linnaeus) (モンシロチョウ); *P. napi* (Linnaeus) (エゾスジグロシロチョウ); *Platyptilia carduidactyla* (Riley) (アーティチョークブルームモス); *Plutella xylostella* (Linnaeus)

20

30

40

50

s) (コナガ); *Pectinophora gossypiella* (Saunders) (ワタアカミムシガ); *Pontia protodice* (Boisduval 及び Leconte) (サザンキャベツジウム); *Sabulodes aegrotata* (Guenee) (雑食性シャクトリムシ); *Schizura concinna* (J. E. Smith) (レッドハンブドキャタピラー); *Sitotroga cerealella* (Olivier) (バクガ); *Thaumetopoea pityocampa* (Schiffermüller) (マツノギョウレツケムシ); *Tineola bisselliella* (Hummel) (ウェビングクロウズモス); *Tuta absoluta* (Meyrick) (トマトリーフマイナー); *Yponomeuta padella* (Linnaeus) (エルミンモス); *Heliothis subflexa* (Guenee); *Malacosoma* 種ならびに *Orgyia* 種; *Ostrinia nubilalis* (ヨーロッパマツマダラメイガ); タネバエ; *Agrotis ipsilon* (タマナヤガ) が含まれるが、これらに限定されない。

【0261】

ヒゲナガゾウムシ、マメゾウムシ、及びゾウムシ科のゾウムシ (*Anthonomus grandis* (Boheman) (ワタミハナゾウムシ); *Lissorhoptus oryzophilus* (Kuschel) (イネミズゾウムシ); *Sitophilus granarius* (Linnaeus) (グラナリアコクゾウムシ); *S. oryzae* (Linnaeus) (コクゾウムシ); *Hypera punctata* (Fabricius) (ツメクサタコゾウムシ); *Cylindrocopturus adpersus* (LeConte) (サンフラステムウィービル); *Smicronyx fulvus* (LeConte) (レッドサンフラステムウィービル); *S. sordidus* (LeConte) (グレーサンフラステムウィービル); *Sphenophorus maidis* (Chittenden) (メイズビルバグ) を含むがこれらに限定されない); ハムシ科のノミトビヨロイムシ、ウリハムシ、ネクイムシ、ハムシ、イモハムシ、及び潜葉性昆虫 (*Leptinotarsa decemlineata* (Say) (コロラドハムシ); *Diabrotica virgifera virgifera* (LeConte) (ウエスタンコーンルートワーム); *D. barberi* (Smith 及び Lawrence) (ノーザンコーンルートワーム); *D. undecimpunctata howardi* (Barber) (サザンコーンルートワーム); *Chaetocnema pulicaria* (Melsheimer) (トウモロコシノミトビヨロイムシ); *Phyllotreta cruciferae* (Goeze) (アブラナ科植物ノミトビヨロイムシ); *Phyllotreta striolata* (キスジノミトビヨロイムシ); *Colaspis brunnea* (Fabricius) (グレーブコラスピス); *Oulema melanopus* (Linnaeus) (シリアルリーフビートル); *Zygogramma exclamationis* (Fabricius) (サンフラステムウィービル) を含むがこれらに限定されない); テントウムシ科の甲虫 (*Epilachna varivestis* (Mulsant) (インゲンテントウ) を含むがこれらに限定されない); コガネムシ科のコガネムシ及び他の甲虫 (*Popillia japonica* (Newman) (マメコガネ); *Cyclocephala borealis* (Arrow) (ノーザンマスクドチェーファー、ホワイトグラブ); *C. immaculata* (Olivier) (サザンマスクドチェーファー、ホワイトグラブ); *Rhizotrogus majalis* (Razoumowsky) (ヨーロッパアンチェーファー); *Phyllophaga crinita* (Burmeister) (ホワイトグラブ); *Ligyris gibbosus* (De Geer) (キャロットビートル) を含むがこれらに限定されない); カツオブシムシ科のカツオブシムシ; コメツキムシ科、*Eleodes* 種、*Melanotus* 種のハリガネムシ; *Conoderus* 種; *Limonius* 種; *Agriotes* 種; *Ctenicera* 種; *Aeolus* 種; キクイムシ科のキクイムシ及びゴミムシダマシ科の甲虫; *Cerotoma trifurcate* (ビーンリーフビートル);

ならびにハリガネムシを含む、鞘翅目の幼虫及び成体。

【0262】

潜葉性昆虫 *Agromyza parvicornis* (Loew) (コーンブロッチリーフマイナー); 小虫 (*Contarinia sorghicola* (Coquillett) (ソルガムミッジ); *Mayetiola destructor* (Say) (コムギタマバエ); *Sitodiplosis mosellana* (Gehin) (ウィートミッジ); *Neolasioptera murtfeldtiana* (Felt)、(サンフラワーシードミッジ)を含むがこれらに限定されない); ショウジョウバエ (ミバエ科)、*Oscinella frit* (Linnaeus) (ショウジョウバエ); ウジ (*Delia platura* (Meigen) (シードコーンマゴット); *D. coarctata* (Fallen) (ウィートバルブフライ) 及び他の *Delia* 種、*Meromyza americana* (Fitch) (ムギキモグリバエ); *Musca domestica* (Linnaeus) (イエバエ); *Fannia canicularis* (Linnaeus)、*F. femoralis* (Stein) (ヒメイエバエ); *Stomoxys calcitrans* (Linnaeus) (サシバエ)を含むがこれらに限定されない); フェイスフライ、ノサシバエ、クロバエ、*Chrysomya* 種; *Phormia* 種、及び他のキンバエ有害生物、アブ *Tabanus* 種; ウマバエ *Gastrophilus* 種; *Oestrus* 種; ウシバエ *Hypoderma* 種; メクラアブ *Chrysops* 種; *Melophagus ovinus* Linnaeus (ヒツジシラミバエ) 及び他のハエ亜目、蚊 *Aedes* 種; *Anopheles* 種; *Culex* 種; ブユ *Prosimulium* 種; *Simulium* 種; ヌカカ、スナバエ、サイアリッド、及び他のカ亜目を含む、双翅目の成体及び幼体。

【0263】

限定されないが、カサアブラムシ科のカサアブラムシ、メクラカメムシ科のカスミカメムシ、セミ科のセミ、ヨコバイ、*Empoasca* 種、ヒシウンカ科、アオバハゴロモ科、ピワハゴロモ上科、マルウンカ科、及びウンカ科のウンカ、ツノゼミ科のツノゼミ、キジラミ科のキジラミ、コナジラミ科のコナジラミ、アブラムシ科のアブラムシ、ネアブラムシ科のネアブラムシ、コナカイガラムシ科のコナカイガラムシ、フサカイガラムシ科、カタカイガラムシ科、コチニールカイガラムシ科、マルカイガラムシ科、フクロカイガラムシ科、ハカマカイガラムシ科、ヤシカイガラムシ科、及びワタフキカイガラムシ科のカイガラムシ、ゲンバウムシ科のゲンバウムシ、カメムシ科のカメムシ、ヒメコガネナガカメムシ、*Blissus* 種; ならびに、ナガカメムシ科の他のナガカメムシ、アワフキムシ科のアワフキムシ、ヘリカメムシ科のヘリカメムシ、ならびにホシカメムシ科のツツガムシ及びコットンステイナー (*cotton stainer*) などの半翅目及び同翅亜目の成体及び若虫。

【0264】

同翅亜目の農学的に重要なメンバーには、*Acyrtosiphon pisum* (Harris) (エンドウヒゲナガアブラムシ); *Aphis craccivora* Koch (ササゲアブラムシ); *A. fabae* (Scopoli) (マメクロアブラムシ); *A. gossypii* (Glover) (ワタアブラムシ、メロンアブラムシ); *A. maidiradicis* (Forbes) (コーンルートアフィド); *A. pomi* (De Geer) (リンゴアブラムシ); *A. spiraeicola* (Patch) (スピレアアフィド); *Aulacorthum solani* (Kaltenbach) (ジャガイモヒゲナガアブラムシ); *Chaetosiphon fragaefolii* Cockerell (イチゴアブラムシ); *Diuraphis noxia* Kurdjumov / Mordvilko (ロシアコムギアブラムシ); *Dysaphis plantaginea* (Paaserini) (バラリンゴアブラムシ); *Eriosoma lanigerum* (Hausmann) (リンゴワタムシ); *Brevicoryne brassicae* (Linnaeus) (キャベツアブラムシ); *Hyalopterus pruni* (Geoffroy) (モモコフキアブラムシ); *Lipa*

phis erysimi Kaltenbach (ニセダイコンアブラムシ); *Metopolophium dirrhodum* (Walker) (穀物アブラムシ); *Macrosiphum euphorbiae* (Thomas) (ジャガイモヒゲナガアブラムシ); *Myzus persicae* (Sulzer) (モモアカアブラムシ、モモアカアブラムシ); *Nasonovia ribisnigri* (Mosley) (レタスアブラムシ); *Pemphigus* 種 (ルートアフィド及びガルアフィド); *Rhopalosiphum maidis* (Fitch) (トウモロコシアブラムシ); *R. padi* (Linnaeus) (ムギクビレアブラムシ); *Schizaphis graminum* (Rondani) (ムギミドリアブラムシ); *Siphia flava* (Forbes) (イエローシュガーケーンアフィド); *Sitobion avenae* (Fabricius) (ムギヒゲナガアブラムシ); *Therioaphis maculata* (Buckton) (マダラアルファルファアブラムシ); *Toxoptera aurantii* (Boyer de Fonscolombe) (コミカンアブラムシ及び *T. citricida* (Kirkaldy) (ミカンクロアブラムシ); *Melanaphis sacchari* (サトウキビアブラムシ); *Adelges* 種 (カサアブラムシ); *Phylloxera devastatrix* (Pergande) (ペカンネアブラムシ); *Bemisia tabaci* (Gennadius) (タバココナジラミ、ワタコナジラミ); *B. argentifolii* (Bellows 及び Perrin) (シルバーリーフコナジラミ); *Dialeurodes citri* (Ashmead) (ミカンコナジラミ); *Trialeurodes abutiloneus* (バンデッドウィングドホワイトフライ及び *T. vaporariorum* (Westwood) (オンシツコナジラミ); *Empoasca fabae* (Harris) (ジャガイモヒゲヨコバイ); *Laodelphax striatellus* (Fallen) (ヒメトビウンカ); *Macrolestes quadrilineatus* (Forbes) (フタテンヨコバイ); *Nephotettix cincticeps* (Uhler) (ツマグロヨコバイ); *N. nigropictus* (Stal) (ジツマグロヨコバイ); *Nilaparvata lugens* (Stal) (トビイロウンカ); *Peregrinus maidis* (Ashmead) (トウモロコシウンカ); *Sogatella furcifera* (Horvath) (セジロウンカ); *Sogatodes orizicola* (Muir) (イネウンカ); *Typhlocyba pomaria* (McAtee) (シロリングヨコバイ); *Erythroneura* 種 (グレーブヨコバイ); *Magicicada septendecim* (Linnaeus) (周期ゼミ); *Icerya purchasi* (Maskell) (ワタフキカイガラムシ); *Quadraspidiotus perniciosus* (Comstock) (サンホセカイガラムシ); *Planococcus citri* (Risso) (ミカンコナカイガラムシ); *Pseudococcus* 種 (他のコナカイガラムシ複合体); *Cacopsylla pyricola* (Foerster) (フタホシナシキジラミ); *Trioza diospyri* (Ashmead) (カキキジラミがさらに含まれるが、これらに限定されない。

【0265】

半翅目の種には、*Acrosternum hilare* (Say) (アオクサカメムシ); *Anasa tristis* (De Geer) (ヘリカメムシ); *Blissus leucopterus leucopterus* (Say) (ヒメコガネナガカメムシ); *Corythuca gossypii* (Fabricius) (コットンレースバグ); *Cyrtopeltis modesta* (Distant) (トマトバグ); *Dysdercus suturellus* (Herrich-Schaffer) (コットンステイナー); *Euschistus servus* (Say) (茶色カメムシ); *E. variolarius* (Palisot de Beauvais) (イッテンカメムシ); *Graptostethus* 種 (ナガカメムシの複合体); *Leptoglossus corculus* (Say) (リーフフットドパインシードバグ); L

ygus lineolaris (Palisot de Beauvais) (サビイロメクラガメ); *L. Hesperus* (Knight) (ウェスタンサビイロメクラガメ); *L. pratensis* (Linnaeus) (コモンメドウバグ); *L. rugulipennis* (Poppius) (ヨーロッパサビイロメクラガメ); *Lygocoris pabulinus* (Linnaeus) (コモングリーンカブシド); *Nezara viridula* (Linnaeus) (サザンアオクサカメムシ); *Oebalus pugnax* (Fabricius) (イネカメムシ); *Oncopeltus fasciatus* (Dallas) (ラージミルクウィードバグ); *Pseudatomoscelis seriatus* (Reuter) (ワタノミハムシ) が含まれるが、これらに限定されない。

10

【0266】

Calocoris norvegicus (Gmelin) (ストロベリーバグ); *Orthops campestris* (Linnaeus); *Plesiocoris rugicollis* (Fallen) (アップルカブシド); *Cyrtopeltis modestus* (Distant) (トマトバグ); *Cyrtopeltis notatus* (Distant) (サックフライ); *Spanagonicus albofasciatus* (Reuter) (ホワイトマートフリーホッパー); *Diaphnocoris chlorionis* (Say) (ハニーロクストプラントバグ); *Labopidicola allii* (Knight) (オニオンプラントバグ); *Pseudatomoscelis seriatus* (Reuter) (ワタノミハムシ); *Adelphocoris rapidus* (Say) (ラビッドプラントバグ); *Poecilocapsus lineatus* (Fabricius) (フォーラインドプラントバグ); *Nysius ericae* (Schilling) (偽ヒメコガネナガカメムシ); *Nysius raphanus* (Howard) (偽ヒメコガネナガカメムシ); *Nezara viridula* (Linnaeus) (サザンアオクサカメムシ); *Eurygaster* 種; *Coreidae* 種; *Pyrrhocoridae* 種; *Tinidae* 種; *Blostomatidae* 種; *Reduviidae* 種及び *Cimicidae* 種などの半翅目。

20

【0267】

Aceria tosichella (Keifer) (フシダニ); *Petrobia latens* (Muller) (ホモノハダニ); ハダニ科のハダニ及びミカンハダニ、*Panonychus ulmi* (Koch) (リンゴハダニ); *Tetranychus urticae* (Koch) (ナミハダニ); *T. mcDanieli* (McGregor) (マクダニエルダニ); *T. cinnabarinus* Boisduval (ニセナミハダニ); *T. turkestanii* (Ugarov 及び Nikol'ski) (ストロベリーハダニ); ヒメハダニ科のフラットマイト、*Brevipalpus lewisi* (McGregor) (シトラスフラットマイト); フシダニ科のサビダニ及びフシダニ、ならびに、他の食葉性ダニならびにヒト及び動物の健康に重要なダニ、すなわち、ヒョウヒダニ科のチリダニ、ニキビダニ科のニキビダニ、ニクダニ科の穀物ダニ、マダニ目。 *Ixodes scapularis* (Say) (シカダニ); *I. holocyclus* (Neumann) (オーストラリアの麻痺ダニ); *Dermacentor variabilis* (Say) (アメリカイヌダニ); *Amblyomma americanum* (Linnaeus) (ローンスターチック)、ならびにキュウセンダニ科、シラミダニ類、及びヒゼンダニ科のキュウセンダニ及びヒゼンダニなどのダニ目(ダニ)の成体及び幼虫。

30

40

【0268】

Lepisma saccharina (Linnaeus) (セイヨウシミ); *Thermobia domestica* (Packard) (マダラシミ) などのシミ目の昆虫有害生物。

【0269】

50

追加の節足動物有害生物には、*Loxosceles reclusa* (Gertsch及びMulaik) (ドクイトグモ) 及び*Latrodectus mactans* (Fabricius) (クロゴケグモ) などのクモ目のクモ、ならびに*Scutigera coleoptrata* (Linnaeus) (ゲジ) などのゲジ目のムカデが含まれる。

【0270】

カメムシ科 (*Nezara viridula*, *Halyomorpha halys*, *Piezodorus guildini*, *Euschistus servus*, *Acrosternum hilare*, *Euschistus heros*, *Euschistus tristigma*, *Acrosternum hilare*, *Dichelops furcatus*, *Dichelops melacanthus*, 及び *Bagrada hilaris* (*Bagrada Bug*))、マルカメムシ科 (*Megacopta cribraria*, すなわち、タイワンマルカメムシ) 及びツチカメムシ科 (*Scaptocoris castanea*, すなわち、ルートスティンクバグ) に属する種を含むがこれらに限定されない、カメムシ及び他の関連する昆虫の上科、ならびに、コナガ、例えば、*Helicoverpa zea* Boddie; ソイビーンルーパー、例えば、*Pseudoplusia includens* (Walker), 及びベルベットビーンキャタピラー、例えば、*Anticarsia gemmatalis* (Hubner) を含むがこれらに限定されない鱗翅目の種。

【0271】

線虫には、*Heterodera* 種、*Meloidogyne* 種、及び *Globodera* 種を含む、ネコブセンチュウ、シストセンチュウ、及び病変線虫; 特に、*Heterodera glycines* (ダイズシストセンチュウ); *Heterodera schachtii* (テンサイシストセンチュウ); *Heterodera avenae* (ムギシストセンチュウ)、及び *Globodera rostochiensis* 及び *Globodera pallida* (ジャガイモシロシストセンチュウ) を含むがこれらに限定されない、シストセンチュウのメンバーなどの寄生線虫が含まれる。病変線虫には *Pratylenchus* 属が含まれる。

【0272】

本開示の農薬及び微生物を含む殺虫剤組成物

【0273】

前述のように、本明細書で教示される任意の微生物を含み得る、本開示の農業組成物は、1つ以上の農薬と組み合わせられることがある。殺虫剤には、除草剤、殺虫剤、殺菌剤、殺線虫剤などが含まれる。

【0274】

いくつかの実施形態では、農薬/微生物の組み合わせは、組成物の形態で施用され得、他の化合物と同時にまたは連続して、処理されるべき作付面積または植物に施用され得る。これらの化合物は、肥料、除草剤、凍結防止剤、界面活性剤、洗剤、殺有害生物性石鹸、休眠油、ポリマー、及び/または製剤の単一の適用後に標的領域の長期投与を可能にする徐放性または生分解性担体制剤であり得る。それらはまた、所望であれば、さらなる農業的に許容される担体、界面活性剤、または製剤化技術分野で慣習的に用いられる施用促進アジュバントと一緒にした、選択的除草剤、化学殺虫剤、殺ウイルス剤、殺微生物剤、抗アメーバ薬、農薬、殺真菌剤、殺菌剤、殺線虫剤、軟体動物駆除剤、またはこれらの調製物のうちのいくつかの混合物であることができる。適切な担体 (すなわち、農業的に許容される担体) 及びアジュバントは、固体または液体であり得、製剤技術で通常採用される物質、例えば、天然または再生鉱物物質、溶媒、分散剤、湿潤剤、固着剤、粘着付与剤、結合剤、または肥料に対応する。同様に、製剤は、食用餌料へと調製されてもよいし、または標的有害生物による農薬製剤の摂食もしくは摂取を可能にする有害生物トラップへと形作られてもよい。

【0275】

本開示の微生物と組み合わせることができる例示的な化学成分には、以下が含まれる：

【0276】

果実/野菜の除草剤：アトラジン、プロマシル、ジウロン、グリホサート、リニューロン、メトリブジン、シマジン、トリフルラリン、フルアジホップ、グルホシネート、ハロスルフロンの Gow an、パラコート、プロピザミド、セトキシジム、ブタフェナシル、ハロスルフロンの、インダジフラム；果物/野菜類殺虫剤：アルジカルブ、*Bacillus thuringiensis*、カルパリル、カルボフラン、クロルピリホス、シベルメトリン、デルタメトリン、ダイアジノン、マラチオン、アバメクチン、シフルトリン/ベタシフルトリン、エスフェンバレレート、ラムダ-シハロトリン、アセキノシル、ピフェナザート、メトキシフェノジド、ノバルロン、クロマフェノジド、チアクロプリド、ジノテフラン、フルアクリピリム、トルフェンピラド、クロチアニジン、スピロジクロフェン、ガンマ-シハロトリン、スピロメシフェン、スピノサド、リナキシピル、シアジピル、スピノテラム、トリフルムロン、スピロテトラマット、イミダクロプリド、フルベンジアミド、チオジカルブ、メタフルミゾン、スルホキサフロル、サイフルメトフェン、シアノピラフェン、イミダクロプリド、クロチアニジン、チアメトキサム、スピノトラム、チオジカルブ、フロニカミド、メチオカルブ、エマメクチン安息香酸塩、インドキサカルブ、フォルチアゼート、フェナミホス、カドゥサホス、ピリプロキシフェン、フェンブタチンオキシド、ヘキサゾックス、メソミル、4 - [[(6 - クロロピリジン - 3 - イル) メチル] (2 , 2 - ジフルオロエチル) アミノ] フラン - 2 (5 H) - オン；果物/野菜抗真菌剤：カルベンダジム、クロロタロニル、E B D C、硫黄、チオファネートメチル、アゾキシストロピン、シモキサニル、フルアジナム、フォセチル、イプロジオン、クレソキシムメチル、メタラキシル/メフェノキサム、トリフロキシストロピン、エタボキサム、イプロバリカルブ、トリフロキシストロピン、フェンヘキサミド、フマル酸オキシポコナゾール、シアゾファミド、フェナミドン、ゾキサミド、ピコキシストロピン、ピラクロストロピン、シフルフェナミド、ボスカリド；

10

20

【0277】

穀物用除草剤：イソプロツロン、プロモキシニル、ロキシニル、フェノキシス、クロルスルフロンの、クロジナホップ、ジクロホップ、ジフルフェニカン、フェノキサプロップ、フロラスラム、フルロキシピル、メトスルフロンの、トリアスルフロンの、フルカルバゾン、ヨドスルフロンの、プロボキシカルバゾン、ピコリナフェン、メソスルフロンの、ベフルブタミド、ピノキサデン、アミドスルフロンの、ティフェンスルフロンのメチル、トリベニューロン、フルピルスルフロンの、スルホスルフロンの、ピラスルホトール、ピロクスラム、フルフェナセット、トラルコキシジム、ピロキサスルホン；穀物用抗真菌剤：カルベンダジム、クロロタロニル、アゾキシストロピン、シプロコナゾール、シプロディニル、フェンプロピモルフ、エボキシコナゾール、クレソキシムメチル、キノキシフェン、テブコナゾール、トリフロキシストロピン、シメコナゾール、ピコキシストロピン、ピラクロストロピン、ジモキシストロピン、プロチオコナゾール、フルオキサストロピン；穀物用殺虫剤：ジメトエート、ラムダ-シハロトリン、デルタメトリン、シベルメトリン、シフルスリン、ピフェントリン、イミダクロプリド、クロチアニジン、チアメトキサム、チアクロプリド、アセタミプリド、ジネットフラン、クロルフィリホス、メタミドホス、オキシデメトンメチル、ピリミカルブ、メチオカルブ；

30

40

【0278】

メイズ除草剤：アトラジン、アラクロール (Al a c h l o r)、プロモキシニル、アセトクロール、ジカンバ、クロピラリド (C l o p y r a l i d)、S - ジメテナミド、グルホシネート、グリホサート、イソキサフルトール、S - メトラクロール、メソトリオン、ニコスルフロンの、プリミスルフロンの、リムスルフロンの、スルコトリオンの、ホラムスルフロンの、トブラメゾンの、テンボトリオンの、サフルフェナシル、チエンカルバゾン、フルフェナセット、ピロキサスルホン；メイズ殺虫剤：カルボフラン、クロルピリホス、ピフェントリン、フィプロニル、イミダクロプリド、ラムダ-シハロトリン、テフルトリン、テルブホス、チアメトキサム、クロチアニジン、スピロメシフェン、フルベンジアミド、トリ

50

フルムロン、リナキシピル、デルタメトリン、チオジカルブ、
シフルトリン、シベルメトリン、ピフェントリン、ルフェヌロン、トリフルムロン、テフルトリン、テブプリム
ホス、エチプロル、シアジピル、チアクロプリド、アセタミプリド、ジノテフラン (D i n e t o f u r a n)、アベルメクチン、メチオカルブ、スピロジクロフェン、スピロテ
トラマト；メイズ抗真菌剤：フェニトロパン、チラム、プロチオコナゾール、テブコナゾ
ール、トリフロキシストロピン；

【0279】

イネ除草剤：ブタクロール、プロパニル、アジムスルフロソ、ベンスルフロソ、シハロ
ホップ、ダイムロン、フェントラザミド、イマゾスルフロソ、メフェナセツト、オキサジ
クロメホン、ピラゾスルフロソ、ピリブチカルブ、キンクロラック、チオベンカルブ、
インダノファン、フルフェナセツト、フェントラザミド、ハロスルフロソ、オキサジクロメ
ホン、ベンゾピシクロソ、ピリフタリド、ペノキススラム、ビスピリバツク、オキサジア
ルギル、エトキシスルフロソ、プレチラクロール、メソトリオン、テフリルトリオン、オ
キサジアゾン、フェノキサプロツプ、ピリミスルファン；イネ殺虫剤：ダイアジノン、フ
ェニトロチオン、フェノブカルブ、モノクロトホス、ベンフラカルブ、ブプロフェジン、
ジノテフラン、フィプロニル、イミダクロプリド、イソプロカルブ、チアクロプリド、ク
ロマフェノジド、チアクロプリド、ジノテフラン、クロチアニジン、エチプロル、フルベ
ンジアミド、リナキシピル、デルタメトリン、アセタミプリド、チアメトキサム、シアジ
ピル、スピノサド、スピノトラム、エマメクチン - ベンゾエート、シベルメトリン、クロ
ルピリホス、カルタツプ、メタミドホス、エトフェンプロックス、トリアゾホス、4 - [20
[(6 - クロロピリジン - 3 - イル) メチル] (2 , 2 - ジフルオレチル) アミノ] フラ
ン - 2 (5 H) - オン、カルボフラン、ベンフラカルブ；イネ抗真菌剤：チオファネート
- メチル、アゾキシストロピン、カルプロパミド、エジフェンホス、フェリムゾン、イブ
ロベンホス、イソプロチオラン、ペンシクロソ、プロベナゾール、ピロキロン、トリシク
ラゾール、トリフロキシストロピン、ジクロシメツト、フェノキサニル、シメコナゾール
、ティアジニル；

【0280】

ワタ除草剤：ジウロン、フルオメツロン、MSMA、オキシフルオルフェン、プロメト
リン、トリフルラリン、カルフェントラゾン、クレツジム、フルアジホップ - ブチル、グ
リホサート、ノルフルラゾン、ペンディメタリン、ピリチオバックナトリウム、トリキシ
スルフロソ、テブラロキシジム、グルホシネート、フルミオキサジン、チジアズロン；ワ
タ殺虫剤：アセフェート、アルジカルブ、クロルピリホス、シベルメトリン、デルタメト
リン、マラチオン、モノクロトホス、アバメクチン、アセタミプリド、エマメクチンベン
ゾエート、イミダクロプリド、インドキサカルブ、ラムダ - シハロトリン、スピノサド、
チオジカルブ、ガンマ - シハロトリン、スピロメシフェン、ピリダリル、フロニカミド、
フルベンジアミド、トリフルムロン、リナキシピル、ベータ - シフルトリン、スピロテ
トラマト、クロチアニジン、チアメトキサム、チアクロプリド、ジノテフラン (D i n e t o f u r a n)、フルベンジアミド、シアジピル、スピノサド、スピノトラム、ガンマシ
ハロトリン、4 - [[(6 - クロロピリジン - 3 - イル) メチル] (2 , 2 - ジフルオレ
チル) アミノ] フラン - 2 (5 H) - オン、チオジカルブ、アベルメクチン、フロニカミ
ド、ピリダリル、スピロメシフェン、スルホキサフロル、プロフェノホス、トリアゾホス
、エンドスルファン；ワタ抗真菌剤：エトリジアゾール、メタラキシル、キントゼン；

【0281】

ダイズ除草剤：アラクロール、ベツタゾン、トリフルラリン、クロリムロンエチル、ク
ロランスラム - メチル、フェノキサプロツプ、ホメサフェン、フルアジホップ、グリホサ
ート、イマザモックス、イマザキン、イマゼタピル、(S -)メトラクロル、メトリブジ
ン、ペンディメタリン、テブラロキシジム、グルホシネート；ダイズ殺虫剤：ラムダ - シ
ハロトリン、メソミル、パラチオン、チオカルブ、イミダクロプリド、クロチアニジン、
チアメトキサム、チアクロプリド、アセタミプリド、ジノテフラン、フルベンジアミド、
リナキシピル、シアジピル、スピノサド、スピノトラム、エマメクチン - ベンゾエート、

10

20

30

40

50

フィプロニル、エチプロル、デルタメトリン、
-シフルトリン、ガンマ及びラムダシハ
ロトリン、4 - [[(6 - クロロピリジン - 3 - イル) メチル] (2 , 2 - ジフルオレチ
ル) アミノ] フラン - 2 (5 H) - オン、スピロテトラマト、スピノジクロフェン、トリ
フルムロン、フロニカミド、チオジカルブ、ベータ - シフルトリン；ダイズ抗真菌剤：ア
ゾキシストロピン、シプロコナゾール、エポキシコナゾール、フルトリアホール、ピラク
ロストロピン、テブコナゾール、トリフロキシストロピン、プロチオコナゾール、テトラ
コナゾール；

【 0 2 8 2 】

テンサイ除草剤：クロリダゾン、デスメジファミン、エトフメセート、フェンメジファミン
、トリアレート、クロピラリド、フルアジホップ、レナシル、メタミトロン、キンメラッ
ク、シクロキシジム、トリフルスルフロン、テブラロキシジム、キザロホップ；テンサイ
殺虫剤：イミダクロプリド、クロチアニジン、チアメトキサム、チアクロプリド、アセタ
ミプリド、ジノテフラン、デルタメトリン、
-シフルトリン、ガンマ/ラムダシハロト
リン、4 - [[(6 - クロロピリジン - 3 - イル) メチル] (2 , 2 - ジフルオレチル)
アミノ] フラン - 2 (5 H) - オン、テフルトリン、リナキシピル、シアジピル、フィ
プロニル、カルボフラン；

10

【 0 2 8 3 】

カノーラ除草剤：クロピラリド、ジクロホップ、フルアジホップ、グルホシネート、グ
リホサート、メタザクロル、トリフルラリンエタメツルフロン、キンメラック、キザロホ
ップ、クレトジム、テブラロキシジム；カノーラ抗真菌剤：アゾキシストロピン、カルベ
ンダジム、フルジオキサニル、イプロジオン、プロクロラズ、ピンクロゾリン；カノーラ
殺虫剤：カルボフラン、有機リン剤、ピレスロイド、チアクロプリド、デルタメトリン、
イミダクロプリド、クロチアニジン、チアメトキサム、アセタミプリド、ジノテフラン、
-シフルトリン、ガンマ及びラムダシハロトリン、タウ - フルバリレート、エチプロル
、スピノサド、スピノトラム、フルベンジアミド、リナキシピル、シアジピル、4 - [[(6 - クロロピリジン - 3 - イル) メチル] (2 , 2 - ジフルオレチル) アミノ] フラン
- 2 (5 H) - オン。

20

【 0 2 8 4 】

本開示の殺虫剤及び微生物を含む殺虫性組成物

【 0 2 8 5 】

前述のように、本明細書で教示される任意の微生物を含み得る、本開示の農業組成物は
、1つ以上の殺虫剤と組み合わせられることがある。

30

【 0 2 8 6 】

いくつかの実施形態では、殺虫性組成物が、本明細書に述べられる組成物に含まれても
よく、他の化合物と同時にまたは連続して、植物（複数可）またはその部位（複数可）に
施用され得る。殺虫剤には、炭酸アンモニウム、水性ケイ酸カリウム、ホウ酸、硫酸銅、
硫黄元素、石灰硫黄、スクロースオクタノエートエステル、4 - [[(6 - クロロピリジ
ン (Chlorpyridin) - 3 - イル) メチル] (2 , 2 - ジフルオロエチル (d
ifluorethyl)) アミノ] フラン - 2 (5 H) - オン、アベルメクチン、ノテ
ノン (notenone)、フェナザキン、フェンピロキシメート、ピリダベン、ピリメ
ジフェン (pyrimedifen)、テブフェンピラド、トルフェンピラド、アセフェ
ート、エマメクチン安息香酸塩、レピメクチン、ミルベメクチン、ヒドロプレン (h d r
oprene)、キノプレン、メトプレン、フェノキシカルブ、ピリプロキシフェン、臭
化メチル及び他のハロゲン化アルキル、フッ化フルフルル (fulfuryl fluo
ride)、クロルピクリン、ホウ砂、八ホウ酸ナトリウム、ホウ酸ナトリウム、メタホ
ウ酸ナトリウム、吐酒石、ダゾメット、メタム (met am)、ピメトロジン、ピリフル
キナゾン、フロフェンテジン (fl ofentezine)、ジフロビダジン (d i f l
o v i d a z i n)、ヘキシチアゾクス、ピフェナゼート、チアメトキサム、イミダクロ
プリド、フェンピロキシメート、アザジラクチン、ベルメトリン、エスフェンバレレート
 (E s f e n v a l e r a t e)、アセタミプリド、ピフェントリン、インドキサカルブ

40

50

、アザジラクチン、ピレトリン、イミダクロブリド、ベータ - シフルトリン、スルホテップ、テブピリンホス、テムホス、テルブホス、テトラクロルピンホス、チオメトン、トリアゾホス、アラニカルブ (alany carb)、アルジカルブ、ベンジオカルブ、ベンフルラカルブ (benfluracarb)、プトカルボキシム、プトキシカルボキシム、カルバリル、カルボフラン、カルボスルファン、エチオフエンカルブ、フェノブカルブ、ホルメタネート、フラチオカルブ、イソプロカルブ、メチオカルブ、メチミル (methymyl)、メトルカルブ、オキサミル、プリミカルブ (primicarb)、プロボクスル、チオジカルブ、チオフアノックス、トリアザメート、トリメタカルブ、XMC、キシリルカルブ (xyllylcarb)、アセフェート、アザメチホス、アジンホスエチル、アジンホスメチル、カズサホス、クロルエトキシフォックス (chloroxyfox) 10、トリクロルホン、パミドチオン、クロルデン、エンドスルファン、エチプロル、フィプロニル、アクリナトリン、アレトリン、ピフェントリン、ピオアレトリン、ピオアレトリン X - シクロペンテニル、ピオレズメトリン、シクロロスリン (cyclo rothrin)、シフルトリン、シハロトリン、シベルメトリン、シフェノトリン [(1R) - トランス異性体]、デルタメトリン、エムベントリン [(EZ) - (1R) - 異性体]、エスフェンバレレート、エトフェンプロックス、フェンプロパトリン、フェンバレレート、フルシトリネート、フルメトリン、ハルフェンプロックス、カダトリン (kadathrin)、フェノトリン [(1R) - トランス異性体] プラレトリン、ピレトリン (除虫菊)、レスメトリン、シラフルオフエン、テフルトリン、テトラメトリン、テトラメトリン [(1R) - 異性体]、トラロメトリン、トランスフルトリン、アルファ - シベルメトリン、ベータ - シフルトリン、ベータ - シベルメトリン、d - シス - トランスアレトリン、d - トランスアレトリン、ガンマ - シハロトリン、ラムダ - シハロトリン、タウ - フルバリネート、シータ - シベルメトリン、ゼータ - シベルメトリン、メトキシクロル、ニコチン、スルホキサフロル、アセタミプリド、クロチアニジン、ジノテフラン、イミダクロブリド、ニテンピラム、チアクロブリド、チアメトキサソ (thiamethoxan)、テブプリムホス (tebuprimsophos)、ベータ - シフルトリン、クロチアニジン、フロニカミド、ヒドラメチルノン、アミトラズ、フルベンジアミド、プロラントラニリプロール (bloranturaniliprole)、ラムダシハロトリン、スピノサド、ガンマシハロトリン、Beauveria bassiana、トウガラシオレオレジン抽出物、ニンニク油、カルバリル、クロルピリホス、スルホキサフロル、ラムダシハロトリン、クロルフェンピンホス、クロルメホス、クロルピリホス、クロルピリホスメチル、クマホス、シアノホス、デメトン - S - メチル、ダイアジノン、ジクロルボス/DDVP、ジクロトホス、ジメトエート、ジメチルピンホス、ジスルホトン、EPN、エチオン、エトプロホス、ファミフル、フェナミホス、フェントロチオン、フェンチオン、ホスチアゼート、ヘプテノホス、イミシアホス、イソフェンホス、イソプロピルO - (メトキシアミノチオ - ホスホルル) サリチレート、イソキサチオン、マラチオン、メカルバム、メタミドホス、メチダチオン、メピンホス、モノクロトホス、ナレド、オメトエート、オキシデメトンメチル、パラチオン、パラチオンメチル、フェントエート、ホレート、ホサロン、ホスメット、ホスファミドン、ホキシム、プリミホスメチル、プロフェノホス、プロペタムホス、プロチオホス、ピラクロホス、ピリダフェンチオン、キナルホスフルアクリピリム (FluaCrypyrim)、テブフェノジド、クロラントラニリプロール、Bacillus thuringiensis 亜種 Kurstaki、テルブホス、鉱油、フェンプロパトリン、メタアルデヒド、デルタメトリン、ダイアジノン、ジメトエート、ジフルベンズロン、ピリプロキシフェン、ローズマリーオイル (reos emary oil)、ペパーミントオイル、ゲラニオール、アザジラクチン、ピペロニルプトキシド、シアントラニリプロール、アルファシベルメトリン、テフルトリン、ピメトロジン、マラチオン、Bacillus thuringiensis 亜種 israelensis、ジコホル、プロモプロピレート、ベンゾキシメート、アザジラクチン、フロニカミド、ダイズ油、Chromobacterium subtsugae 株 PRA A 4 - 1、ゼータシベルメトリン、ホスメット、メトキシフェノジド、パラフィン油、ス 40 50

プロテトラマト、メトミル、*Metarhizium anisopliae*株F52、
 エトプロップ、テトラジフォン、プロパルギット、酸化フェンブタチン、アゾシクロチ
 ン、シヘキサチン、ジアフェンチウロン、*Bacillus sphaericus*、エ
 トキサゾール、フルピラジフロン、アザジラクチン、*Beauveria bassia*
na、シフルメトフェン、アザジラクチン、キノメチオナト、アセフェート、*Isari*
a fumosorosea Apopka株97、四水素化ホウ素ナトリウム十水和物
 、エマメクチン安息香酸、氷晶石、スピネトラム、*Chenopodium ambro*
*sioides*抽出物、ノバルロン、ジノテフラン、カルバリル、アセキノシル、フルピ
 ラジフロン、リン酸鉄、カオリン、プロプロフェジン、シロマジン、クロマフェノジド、ハ
 ロフェノジド、メトキシフェノジド、テブフェノジド、ピストリフルロン、クロルフルア
 ズロン、ジフルベンズロン、フルシクロクスロン、フルフェノクスロン、ヘキサフルムロ
 ン、ルフェヌロン、ノカルロン、ノピフルムロン、テフルベンズロン、トリフルムロン、
 ベンスルタップ、カルタップ塩酸塩、チオシクラム、チオスルタップナトリウム、DNO
 C、クロルフェナピル、スルファミド、ホレート、トルフェンピラド、スルホキサフロ
 ル、ニームオイル、*Bacillus thuringiensis*亜種*tenebrio*
nis SA-10株、シロマジン、熱殺菌*Burkholderia*属、シアントラニリ
 プロール、シエノピラフェン、シフルメトフェン、シアン化ナトリウム、シアン化カリウ
 ム、シアン化カルシウム、リン化アルミニウム、リン化カルシウム、ホスフィン、リン化
 亜鉛、スプリオジクロフェン、スピロメシフェン、スピロテトラマト、メタフルミゾン
 、フルベンジアミド、ピフルブミド、オキサミル、*Bacillus thuringi*
*ensis*亜種*aizawai*、エトキサゾール、及びエスフェンバレレートが挙げられ
 る。

10

20

30

40

50

【表 9 - 1】

表 9. 本開示の微生物と組み合わせることができる、様々な作用機序に関連する例示的な殺虫剤

作用機序	化合物クラス	例示的な殺虫剤	影響を受ける生理学的機能(複数可)
アセチルコリンエステラーゼ(AChE)阻害剤	カルバメート	アラニカルブ、アルジカルブ、ベンジオカルブ、ベンフラカルブ、プトカルボキシム、プトキシカルボキシム、カルパリル、カルボフラン、カルボスルファン、エチオフェンカルブ、フェノブカルブ、ホルメタネート、フラチオカルブ、イソプロカルブ、メチオカルブ、メソミル、メトルカルブ、オキサミル、ピリミカルブ、プロボクスル、チオジカルブ、チオフアノックス、トリアザメート、トリメタカルブ、XMC、キシリルカルブ	神経及び筋肉
アセチルコリンエステラーゼ(AChE)阻害剤	有機リン酸エステル	アセフェート、アザメチホス、アジンホスエチル、アジンホスメチル、カズサホス、クロルエトキシホス、クロルフェンビンホス、クロルメホス、クロルピリホス、クロルピリホスメチル、クマホス、シアノホス、デメトン-S-メチル、ダイアジノン、ジクロルボス/DDVP、ジクロトホス、ジメトエート、ジメチルビンホス、ジスルホトン、EPN、エチオン、エトプロホス、ファミフル、フェナミホス、フェニトロチオン、フェンチオン、ホスチアゼート、ヘプテノホス、イミシアホス、イソフェンホス、イソプロピル O-(メトキシアミノチオ-ホスホリル)サリチレート、イソキサチオン、マラチオン、メカルバム、メタミドホス、メチダチオン、メビンホス、モノクロトホス、ナレド、オメトエート、オキシデメトンメチル、パラチオン、パラチオンメチル、フェントエート、ホレート、ホサロン、ホスメット、ホスファミドン、ホキシム、ピリミホスメチル、プロフェノホス、プロペタムホス、プロチオホス、ピラクロホス、ピリダフェンチオン、キナルホス、スルホテップ、テブピリンホス、テメホス、テルブホス、テトラクロルビンホス、チオメトン、トリアゾホス、トリクロルホン、バミドチオン	神経及び筋肉

10

20

30

40

50

【表 9 - 2】

作用機序	化合物クラス	例示的な殺虫剤	影響を受ける生理学的機能(複数可)
GABA 作動性塩素イオンチャンネル遮断剤	シクロジエン有機塩素	クロルデン、エンドスルファン	神経及び筋肉
GABA 作動性塩素イオンチャンネル遮断剤	フェニルピラゾール(フィプロール)	エチプロール、フィプロニル	神経及び筋肉
ナトリウムチャンネル調節剤	ピレスロイド、ピレトリン	アクリナトリン、アレトリン、ピフエントリン、ピオアレトリン、ピオアレトリンS-シクロペンテニル、ピオレズメトリン、シクロプロトリン、シフルトリン、シハロトリン、シペルメトリン、シフェノトリン [(1R)-トランス-異性体]、デルタメトリン、エムペントリン [(E Z) - (1R) -異性体]、エスフェンバレレート、エトフェンプロックス、フェンプロパトリン、フェンバレレート、フルシトリネート、フルメトリン、ハルフェンプロックス、カダトリン、フェノトリン [(1R)-トランス-異性体]、プラレトリン、ピレトリン (除虫菊)、レスメトリン、シラフルオフエン、テフルトリン、テトラメトリン、テトラメトリン [(1R)-異性体]、トラロメトリン、トランスフルトリン、アルファ-シペルメトリン、ベーターシフルトリン、ベーターシペルメトリン、d-シーストランスアレトリン、d-トランスアレトリン、ガンマーシハロトリン、ラムダーシハロトリン、タウ-フルバリネート、シーターシペルメトリン、ゼーターシペルメトリン	神経及び筋肉
ナトリウムチャンネル調節剤	DDT、メトキシクロル	DDT、メトキシクロル	神経及び筋肉
ニコチン性アセチルコリン受容体 (nAChR)競合的モジュレーター	ネオニコチノイド	アセタミプリド、クロチアニジン、ジノテフラン、イミダクロプリド、ニテンピラム、チアクロプリド、チアメトキサム	神経及び筋肉

10

20

30

40

50

【表 9 - 3】

作用機序	化合物クラス	例示的な殺虫剤	影響を受ける生理学的機能(複数可)
ニコチン性アセチルコリン受容体(nAChR)競合的モジュレーター	ニコチン	ニコチン	神経及び筋肉
ニコチン性アセチルコリン受容体(nAChR)競合的モジュレーター	スルホキシミン	スルホキサフロル	神経及び筋肉
ニコチン性アセチルコリン受容体(nAChR)競合的モジュレーター	ブテノリド	フルピラジフロル	神経及び筋肉
ニコチン性アセチルコリン受容体(nAChR)アロステリックモジュレーター	スピノシン	スピネトラム、スピノサド	神経及び筋肉
グルタミン作動性塩素イオンチャンネル(GluCl)アロステリックモジュレーター	アベルメクチン、ミルペマイン	アバメクチン、エマメクチン安息香酸塩、レピメクチン、ミルペメクチン	神経及び筋肉
幼若ホルモン模倣体	幼若ホルモン類似体	ハイドロプレレン、キノプレレン、メトプレレン	成長
幼若ホルモン模倣体	フェノキシカルブ	フェノキシカルブ	成長
幼若ホルモン模倣体	ピリプロキシフェン	ピリプロキシフェン	成長
色々な非特異的(複数部位)阻害剤	ハロゲン化アルキル	臭化メチル及び他のハロゲン化アルキル	未知または非特異的
色々な非特異的(複数部位)阻害剤	クロルピクリン	クロルピクリン	未知または非特異的
色々な非特異的(複数部位)阻害剤	フッ化物	氷晶石、フッ化スルフリル	未知または非特異的

10

20

30

40

50

【表 9 - 4】

作用機序	化合物クラス	例示的な殺虫剤	影響を受ける生理学的機能(複数可)
色々な非特異的(複数部位)阻害剤	ホウ酸塩	ホウ砂、ホウ酸、八ホウ酸二ナトリウム、ホウ酸ナトリウム、メタホウ酸ナトリウム	未知または非特異的
色々な非特異的(複数部位)阻害剤	吐酒石	吐酒石	未知または非特異的
色々な非特異的(複数部位)阻害剤	イソチオシアン酸メチル生成物質	ダゾメット、メタム	未知または非特異的
弦音器官のモジュレーター	ピリジンアゾメチン誘導体	ピメトロジン、ピリフルキナゾン	神経及び筋肉
ダニ成長阻害剤	クロフェンテジン、ジフロピダジン、ヘキシチアゾックス	クロフェンテジン、ジフロピダジン、ヘキシチアゾックス	成長
ダニ成長阻害剤	エトキサゾール	エトキサゾール	成長
微生物由来昆虫中腸内膜破壊剤	<i>Bacillus thuringiensis</i> とそれらが産生する殺虫性タンパク質	Bt var.aizawai、Bt var.israelensis、Bt var.kurstaki、Bt var.tenebrionensis	中腸
微生物由来昆虫中腸内膜破壊剤	<i>Bacillus sphaericus</i>	<i>Bacillus sphaericus</i>	中腸
ミトコンドリア ATP 合成酵素の阻害剤	ジアフェンチウロン	ジアフェンチウロン	呼吸
ミトコンドリア ATP 合成酵素の阻害剤	有機スズ系殺ダニ剤	アゾシクロチン、シヘキサチン、酸化フェンブタスズ	呼吸
ミトコンドリア ATP 合成酵素の阻害剤	プロパルギット	プロパルギット	呼吸
ミトコンドリア ATP 合成酵素の阻害剤	テトラジフォン	テトラジフォン	呼吸
プロトン勾配の破壊を介した酸化的リン酸化の脱共役剤	クロルフェナピル、DNOC、スルフラミド	クロルフェナピル、DNOC、スルフラミド	呼吸

10

20

30

40

50

【表 9 - 5】

作用機序	化合物クラス	例示的な殺虫剤	影響を受ける生理学的機能(複数可)
ニコチン性アセチルコリン受容体(nAChR)チャネル遮断剤	ネライストキシン類似体	ベンスルタップ、カルタップ塩酸塩、チオシクラム、チオスルタップナトリウム	神経及び筋肉
キチン生合成の阻害剤、タイプ0	ベンゾイル尿素	ビストリフルロン、クロロフルアズロン、ジフルベンズロン、フルシクロクスロン、フルフェノクスロン、ヘキサフルムロン、ルフェヌロン、ノバルロン、ノビフルムロン、テフルベンズロン、トリフルムロン	成長
キチン生合成の阻害剤、タイプ1	ブプロフェジン	ブプロフェジン	成長
脱皮攪乱剤、双翅目	シロマジン	シロマジン	成長
エクジソン受容体アゴニスト	ジアシルヒドラジン	クロマフェノジド、ハロフェノジド、メトキシフェノジド、テブフェノジド	成長
オクトパミン受容体アゴニスト	アミトラズ	アミトラズ	神経及び筋肉
ミトコンドリア複合体III電子伝達阻害剤	ヒドラメチルノン	ヒドラメチルノン	呼吸
ミトコンドリア複合体III電子伝達阻害剤	アセキノシル	アセキノシル	呼吸
ミトコンドリア複合体III電子伝達阻害剤	フルアクリピリム	フルアクリピリム	呼吸
ミトコンドリア複合体III電子伝達阻害剤	ビフェナゼート	ビフェナゼート	呼吸
ミトコンドリア複合体I電子伝達阻害剤	Meti ダニ駆除剤及び殺虫剤	フェナザキン、フェンピロキシメート、ピリダベン、ピリミジフェン、テブフェンピラド、トルフェンピラド	呼吸
ミトコンドリア複合体I電子伝達阻害剤	ロテノン	ロテノン	呼吸

10

20

30

40

50

【表 9 - 6】

作用機序	化合物クラス	例示的な殺虫剤	影響を受ける生理学的機能(複数可)
電位依存性ナトリウムチャネル遮断剤	オキサジアジン	インドキサカルブ	神経及び筋肉
電位依存性ナトリウムチャネル遮断剤	セミカルバゾン	メタフルミゾン	神経及び筋肉
アセチル CoA カルボキシラーゼの阻害剤	テトロン酸及びテトラミン酸誘導体	スピロジクロフェン、スピロメシフェン、スピロテトラマト	成長
ミトコンドリア複合体 IV 電子伝達阻害剤	リン化合物	リン化アルミニウム、リン化カルシウム、ホスフィン、リン化亜鉛	呼吸
ミトコンドリア複合体 IV 電子伝達阻害剤	シアン化物	シアン化カルシウム、シアン化カリウム、シアン化ナトリウム	呼吸
ミトコンドリア複合体 II 電子伝達阻害剤	ベーターケトンニトリル誘導体	シエノピラフェン、シフルメトフェン	呼吸
ミトコンドリア複合体 II 電子伝達阻害剤	カルボキサニリド	ビフルブミド	呼吸
リアノジン受容体モジュレーター	ジアミド	クロラントラニリプロール、シアントラニリプロール、フルベンジアミド	神経及び筋肉
弦音器官モジュレーター—未定義の標的的部位	フロニカミド	フロニカミド	神経及び筋肉
未知または不確定の作用機序の化合物	アザジラクチン	アザジラクチン	未知
未知または不確定の作用機序の化合物	ベンゾキシメート	ベンゾキシメート	未知
未知または不確定の作用機序の化合物	プロモプロピレート	プロモプロピレート	未知
未知または不確定の作用機序の化合物	キノメチオナト	キノメチオナト	未知
未知または不確定の作用機序の化合物	ジコホル	ジコホル	未知

10

20

30

40

50

【表 9 - 7】

作用機序	化合物クラス	例示的な殺虫剤	影響を受ける生理学的機能(複数可)
未知または不確定の作用機序の化合物	石灰硫黄	石灰硫黄	未知
未知または不確定の作用機序の化合物	ピリダリル	ピリダリル	未知
未知または不確定の作用機序の化合物	硫黄	硫黄	未知

10

【表 10 - 1】

表 10. 本開示の微生物と組み合わせることができる農薬の例示的なリスト

カテゴリー	化合物
殺虫剤	
ヒ素系殺虫剤	ヒ酸カルシウム アセト亜ヒ酸銅 ヒ酸銅 ヒ酸鉛 亜ヒ酸カリウム 亜ヒ酸ナトリウム
植物性殺虫剤	アリシン アナバシン アザジラクチン カルバクロール d-リモネン マトリン ニコチン ノルニコチン オキシマトリン ピレトリン シネリン シネリン I シネリン II ジャスモリン I ジャスモリン II ピレトリン I ピレトリン II カシア ロドジャポニン-III ロテノン リアニア サバジラ サンギナリン トリプトリド

20

30

40

50

【表 10 - 2】

カテゴリー	化合物	
カルバメート系殺虫剤	ベンジオカルブ カルバリル	
ベンゾフラニルメチルカルバメート系殺虫剤	ベンフラカルブ カルボフラン カルボスルファン デカルボフラン フラチオカルブ	
ジメチルカルバメート系殺虫剤	ジメタン ジメチラン ヒキんカルブ イソラン ピリミカルブ ピラマツト ピロラン	10
オキシムカルバメート系殺虫剤	アラニカルブ アルジカルブ アルドキシカルブ プトカルボキシム プトキシカルボキシム メソミル ニトリラカルブ オキサミル タジムカルブ チオカルボキシム チオジカルブ チオフアノックス	20
フェニルメチルカルバメート系殺虫剤	アリキシカルブ アミノカルブ プフェンカルブ プタカルブ カーバノレート クロエトカルブ CPMC ジクレシル ジメタカルブ ジオキサカルブ EMPC エチオフエンカルブ フェネタカルブ フェノブカルブ イソプロカルブ メチオカルブ メトルカルブ メキサカルベート プロマシル プロメカルブ プロポクスル トリメタカルブ XMC キシリルカルブ	30 40

【表 10 - 3】

カテゴリー	化合物
ジアミド殺虫剤	プロフラニリド クロラントラニリプロール シアントラニリプロール シクラニリプロール シハロジアミド フルベンジアミド テトラニリプロール
ジニトロフェノール殺虫剤	ジネックス ジノプロップ ジノサム DNOC
フッ素系殺虫剤	ヘキサフルオロケイ酸バリウム 氷晶石 フルルスラミド フッ化ナトリウム ヘキサフルオロケイ酸ナトリウム スルフルラミド
ホルムアミジン殺虫剤	アミトラズ クロルジメホルム ホルメタネート ホルムパラネート メジメフォルム セミアミトラズ
燻蒸剤殺虫剤	アクリロニトリル 二硫化炭素 四塩化炭素 硫化カルボニル クロロホルム クロルピクリン シアノゲン パラジクロロベンゼン 1,2-ジクロロプロパン ジチオエーテル ギ酸エチル 二臭化エチレン 二塩化エチレン 酸化エチレン シアン化水素 臭化メチル ヨウ化メチル メチルクロロホルム 塩化メチレン ナフタレン ホスフィン テトラチオ炭酸ナトリウム ブッ化スルフリル テトラクロロエタン

10

20

30

40

50

【表 10 - 4】

カテゴリー	化合物	
無機殺虫剤	ホウ砂 ホウ酸 多硫化カルシウム オレイン酸銅 ケイソウ土 塩化水銀 チオシアン酸カリウム シリカゲル チオシアン酸ナトリウム	10
昆虫成長調節剤		
キチン合成阻害剤	ブプロフェジン シロマジン	
ベンゾイルフェニル尿素キチン合成阻害剤	ビストリフルロン クロルベンズロン クロルフルアズロン ジクロルベンズロン ジフルベンズロン フルシクロクスロン フルフェノクスロン ヘキサフルムロン ルフェヌロン ノバルロン ノビフルムロン ペンフルロン テフルベンズロン トリフルムロン	20
幼若ホルモン模倣体	ダヨウトング エポフェノナン フェノキシカルブ ヒドロプレン キノプレン メトプレン ピリプロキシフェン トリプレン	30
幼若ホルモン	幼若ホルモン I 幼若ホルモン II 幼若ホルモン III	
脱皮ホルモンアゴニスト	クロマフェノジド フランテプフェノジド ハロフェノジド メトキシフェノジド テプフェノジド イシジン	
脱皮ホルモン	α -エクジソン エクジステロン	
脱皮阻害剤	ジオフェノラン	40

【表 10 - 5】

カテゴリー	化合物	
プレコセン	プレコセン I プレコセン II プレコセン III	
未分類の昆虫成長調節剤	ジシクラニル	
大環状ラクトン系殺虫剤		
アベルメクチン系殺虫剤	アバメクチン ドラメクチン エマメクチン エプリノメクチン イベルメクチン セラメクチン	10
ミルベマイシン系殺虫剤	レピメクチン ミルベメクチン ミルベマイシンオキシム モキシデクチン	
スピノシン系殺虫剤	スピネトラム スピノサド	
ネオニコチノイド系殺虫剤		
ニトログアニジンネオニコチノイド系殺虫剤	クロチアニジン ジノテフラン イミダクロプリド イミダクロチズ チアメトキサム	20
ニトロメチレンネオニコチノイド系殺虫剤	ニテンピラム ニチアジン	
ピリジルメチルアミンネオニコチノイド系殺虫剤	アセタミプリド イミダクロプリド ニテンピラム パイチオンディン (paichongding)	
ネライストキシン類似体殺虫剤	チアクロプリド	
	ベンスルタップ カルタップ ポリチアラン チオシクラム チオスルタップ	30
有機塩素系殺虫剤	プロモ DDT カンフェクロル DDT pp'-DDT エチル DDD HCH ガンマ-HCH リンダン メトキシクロル ペンタクロロフェノール TDE	40

【表 1 0 - 6】

カテゴリー	化合物	
シクロジエン系殺虫剤	アルドリ プロモシクレン クロルピシクレン クロルデン クロルデコン ディルドリン ジロル エンドスルフアン アルファーエンドスルフアン エンドリン HEOD ヘプタクロル HHDN イソベンザン イソドリ ケレバン マイレックス	10
有機リン系殺虫剤		
有機リン系殺虫剤	ブロムフェンビンホス カルビンホス クロルフェンビンホス クロトキシホス ジクロルボス ジクロトホス ジメチルビンホス ホスピレート ヘプテノホス メトクロトホス メビンホス モノクロトホス ナレド ナフトロホス ホスファミドン プロバホス TEPP テトラクロルビンホス	20 30
有機チオリン酸系殺虫剤	ジオキサベンゾホス ホスメチラン フェントエート	
脂肪族有機チオリン酸系殺虫剤	アセチオン アセトホス アミトン カズサホス クロルエトキシホス クロルメホス デメフィオン デメフィオン-O デメフィオン-S	40

【表 10 - 7】

カテゴリー	化合物	
	デメトン デメトン-O デメトン-S デメトンメチル デメトン-O-メチル デメトン-S-メチル デメトン-S-メチルスルホン ジスルホトン エチオン エトプロホス IPSP イソチオエート マラチオン メタクリホス メチルアセトホス オキシデメトンメチル オキシデプロホス オキシジスルホトン ホレート スルホテップ テルブホス チオメトン	10
脂肪族アミド有機チオリン酸系殺虫剤	アミジチオン シアントエート ジメトエート エトエート-メチル ホルモチオン メカルバム オメトエート プロトエート ソファミド バミドチオン	20
オキシム有機チオリン酸系殺虫剤	クロルホキシム ホキシム ホキシムメチル	30
複素環式有機チオリン酸系殺虫剤	アザメチホス コロホネート クマホス クミトエート ジオキサチオン エンドチオン メナゾン モルホチオン ホサロン ピラクロホス ピラゾチオン ピリダフェンチオン キノチオン	40

【表 10 - 8】

カテゴリー	化合物	
ベンゾチオピラン有機チオリン酸系殺虫剤	ジチクロホス チクロホス	
ベンゾトリアジン有機チオリン酸系殺虫剤	アジンホスエチル アジンホスメチル	
イソインドール有機チオリン酸系殺虫剤	ジアリホス ホスメット	
イソキサゾール有機チオリン酸系殺虫剤	イソキサチオン ゾラプロホス	
ピラゾロピリミジン有機チオリン酸系殺虫剤	クロルプラゾホス ピラゾホス	10
ピリジン有機チオリン酸系殺虫剤	クロルピリホス クロルピリホスメチル	
ピリミジン有機チオリン酸系殺虫剤	ブタチオホス ダイアジノン エトリムホス リリムホス ピリミオキシホス ピリミホスエチル ピリミホスメチル プリミドホス ピリミテート テブピリンホス	20
キノキサリン有機チオリン酸系殺虫剤	キナルホス キナルホスメチル	
チアジアゾール有機チオリン酸系殺虫剤	アチダチオン リチダチオン メチダチオン プロチダチオン	
トリアゾール有機チオリン酸系殺虫剤	イサゾホス トリアゾホス	
フェニル有機チオリン酸系殺虫剤	アゾトエート プロモホス プロモホスエチル カルボフェノチオン クロルチオホス シアノホス シチオエート ジカプトン ジクロフェンチオン エタホス ファムフル フェンクロルホス フェニトロチオン フェンスルホチオン フェンチオン フェンチオンエチル ヘテロホス ヨードフェンホス	30 40

【表 10 - 9】

カテゴリー	化合物
	メスルフェンホス パラチオン パラチオンメチル フェンカプトン ホスニクロル プロフェノホス プロチオホス スルプロホス デメホス トリクロルメタホス-3 トリフェノホス キシアオコングリウリン
ホスホン酸系殺虫剤	プトネート トリクロルホン
ホスホンチオ酸系殺虫剤	メカルホン
フェニルエチルホスホンチオ酸系殺虫剤	ホノホス トリクロロナト
フェニルフェニルホスホンチオ酸系殺虫剤	シアノフェンホス EPN レプトホス
ホスホロアミデート系殺虫剤	クルホメート フェナミホス ホスチエタン メホスホラン ホスホラン ホスホランメチル ピリメタホス
ホスホロアミドチオエート系殺虫剤	アセフェート クロラミンリン イソカルボホス イソフェンホス イソフェンホスメチル メタミドホス ホスグリシン プロペタムホス
ホスホロジアミド系殺虫剤	ジメホックス マジドックス ミパホックス シュラーダン
オキサジアジン系殺虫剤	インドキサカルブ
オキサジアゾロン系殺虫剤	メトキサジアゾン
フタルイミド系殺虫剤	ジアリホス ホスメット テトラメトリン
物理的殺虫剤	マルトデキストリン
乾燥剤殺虫剤	ホウ酸 ケイソウ土 シリカゲル

10

20

30

40

50

【表 10 - 10】

カテゴリー	化合物
ピラゾール系殺虫剤	クロラントラニリプロール シアントラニリプロール シクラニリプロール ジメチラン イソラン テブフェンピラド テトラニリプロール トルフェンピラド
フェニルピラゾール系殺虫剤	アセトプロール エチプロール フィプロニル フルフィプロール ピラクロホス ピラフルプロール ピリプロール ピロラン バニリプロール
ピレスロイド系殺虫剤	
ピレスロイドエステル系殺虫剤	アクリナトリン アレトリン ビオアレトリン エスデパレトリン バルトリン ビフェントリン カッパービフェントリン ビオエタノメトリン プロフェンバレレート プロフルトリネート プロメトリン プテトリン クロレンペントリン シクレトリン シクロプロトリン シフルトリン ベーターシフルトリン シハロトリン ガンマーシハロトリン ラムダーシハロトリン シベルメトリン アルファーシベルメトリン ベーターシベルメトリン シーターシベルメトリン ゼーターシベルメトリン シフェノトリン デルタメトリン ジメフルトリン ジメトリン エムペントリン

10

20

30

40

50

【表 10 - 11】

カテゴリー	化合物	
	d-ファンシルクエビンギユチ	
	クロプラレトリン	
	フェンフルトリン	
	フェンピリトリン	
	フェンプロパトリン	
	フェンバレレート	
	エスフェンバレレート	
	フルシトリネート	
	フルバリネート	10
	タウフルバリネート	
	フラメトリン	
	フレトリン	
	ヘプタフルトリン	
	イミプロトリン	
	ジャポトリン	
	カデトリン	
	メトトリン	
	メトフルトリン	
	イプシロン-メトフルトリン	
	モムフルオロトリン	
	イプシロン-モムフルオロトリン	20
	ペントメトリン	
	ペルメトリン	
	ビオペルメトリン	
	トランスペルメトリン	
	フェノトリン	
	プラレトリン	
	プロフルトリン	
	プロパルトリン	
	ピレスメトリン	
	レノフルトリン	
	メペルフルトリン	30
	レスメトリン	
	ビオレスメトリン	
	シスメトリン	
	テフルトリン	
	カップ-テフルトリン	
	テラレトリン	
	テトラメトリン	
	テトラメチルフルトリン	
	トラロシトリン	
	トラロメトリン	
	トランスフルトリン	
	バレレート	40

【表 10 - 12】

カテゴリー	化合物
ピレスロイドエーテル系殺虫剤	エトフェンプロックス フルフェンプロックス ハルフェンプロックス プロトリフェンプト シラフルオフエン
ピレスロイドオキシム系殺虫剤	スルホキシム チオフルオキシメート
ピリミジンアミン系殺虫剤	フルフェネリム ピリミジフェン
ピロール系殺虫剤	クロルフェナピル
第四級アンモニウム系殺虫剤	サンギナリン
スルホキシイミン系殺虫剤	スルホキサフロル
テトラミン酸系殺虫剤	スピロテトラマト
テトロン酸系殺虫剤	スピロメシフェン
チアゾール系殺虫剤	クロチアニジン イミダクロチズ チアメトキサム チアプロニル
チアゾリジン系殺虫剤	タジムカルブ チアクロプリド
チオ尿素系殺虫剤	ジアフェンチウロン
尿素系殺虫剤	フルコフロル スルコフロル
双性イオン系殺虫剤	ジクロロメゾチアズ トリフルメゾピリム
未分類の殺虫剤	アフィドピロペン アフォキシラネル アロサミジン クロサンテル ナフテン酸銅 クロタミトン EXD フェナザフロル フェノキサクリム フロメトキン フロニカミド フルヘキサホン フルピラジフロル フルララネル フルキサメタミド ヒドラメチルノン イソプロチオラン ジアフアンチョンゾン マロノベン メタフルミゾン ニフルリジド プリフェナート ピリダベン

10

20

30

40

50

【表 10 - 13】

カテゴリー	化合物	
	ピリダリル ピリフルキナゾン ラフオキサニド ツリンギエンシン トリアラテン トリアザメート	
殺ダニ剤		
植物性殺ダニ剤	カルバクロール サンギナリン	10
架橋ジフェニル系殺ダニ剤	アズベンゼン ベンゾキシメート 安息香酸ベンジル ブロモプロピレート クロルベンシド クロルフェネトール クロルフェンソン クロロフェンスルフィド クロロベンジレート クロロプロピレート シフルメトフェン DDT ジコホル ジフェニルスルホン ドフェナピン フェンソン フェントリファニル フルオルベンシド ゲニット ヘキサクロロフェン フェンプロキシド プロクロノール テトラジホン テトラスル	20
カーバメート系殺ダニ剤	ベノミル カーバノレート カルバリル カルボフラン メチオカルブ メトルカルブ プロマシル プロポクスル	30
オキシムカルバメート系殺ダニ剤	アルジカルブ プトカルボキシム オキサミル チオカルブオキシム チオファノックス	
カルバゼート系殺ダニ剤	ビフェナゼート	40

【表 10 - 14】

カテゴリー	化合物	
ジニトロフェノール系殺ダニ剤	ビナバクリル ジネックス ジノプトン ジノカップ ジノカップ-4 ジノカップ-6 ジノクトン ジノペントン ジノスルホン ジノテルボン DNOC	10
ホルムアミジン系殺ダニ剤	アミトラズ クロルジメホルム クロロメブホルム ホルメタネート ホルムパラナート メジメホルム セミアミトラズ	
大環状ラクトン系殺ダニ剤	テトラナクチン	
アベルメクチン系殺ダニ剤	アバメクチン ドラメクチン エプリノメクチン イベルメクチン セラメクチン	20
ミルベマイシン系殺ダニ剤	ミルベメクチン ミルベマイシンオキシム モキシデクチン	
ダニ成長調節剤	クロフェンテジン シロマジン ジフロビダジン ドフェナピン フルアズロン フルベンジミン フルシクロクスロン フルフェノクスロン ヘキシチアゾクス	30
有機塩素系殺ダニ剤	プロモシクレン カンフェクロル DDT ジエノクロル エンドスルファン リンデン	
有機リン系殺ダニ剤		
有機リン酸系殺ダニ剤	クロルフェンビンホス クロトキシホス ジクロルボス ヘプテノホス メビンホス	40

【表 10 - 15】

カテゴリー	化合物	10
	モノクロトホス ナレド TEPP テトラクロルビンホス	
有機チオリン酸系殺ダニ剤	アミジチオン アミトン アジンホスエチル アジンホスメチル アゾトエート ベノキサホス プロモホス プロモホスエチル カルボフェノチオン クロルピリホス クロルチオホス クマホス シアントアート デメトン デメトン-O デメトン-S デメトンメチル デメトン-O-メチル デメトン-S-メチル デメトン-S-メチルスルホン ジアリホス ダイアジノン ジメトエート ジオキサチオン ジスルホトン エンドチオン エチオン エトアートメチル ホルモチオン マラチオン メカルバム メタクリホス オメトエート オキシデプロホス オキシジスルホトン パラチオン フェンカプトン ホレート ホサロン ホスメット ホスチン ホキシム ピリミホスメチル プロチダチオン プロトエート	20
		30
		40

【表 10 - 16】

カテゴリー	化合物
	ピリミテート キナルホス キンチオホス ソファミド スルホテップ チオメトン トリアゾホス トリフェノホス バミドチオン
ホスホン酸系殺ダニ剤	トリクロルフォン
ホスホロアミドチオエート系殺ダニ剤	イソカルボホス メタミドホス プロベタムホス
ホスホロジアミド系殺ダニ剤	ジメホックス ミパホックス シュラーダン
有機スズ系殺ダニ剤	アゾシクロチン シヘキサチン 酸化フェンブタスズ ホスチン
フェニルスルファミド系殺ダニ剤	ジクロフルアニド
フタルイミド系殺ダニ剤	ジアリホス ホスメット
ピラゾール系殺ダニ剤	シエノピラフェン フェンピロキシメート ピフルプミド テブフェンピラド
フェニルピラゾール系殺ダニ剤	アセトプロール フィプロニル バニリプロール
ピレスロイド系殺ダニ剤	
ピレスロイドエステル系殺ダニ剤	アクリナトリン ビフェントリン プロフルトリネート シハロトリン シベルメトリン アルファーシベルメトリン フェンプロパトリン フェンバレレート フルシトリネート フルメトリン フルバリネート タウーフルバリネート ペルメトリン
ピレスロイドエーテル系殺ダニ剤	ハルフェンプロックス
ピリミジンアミン系殺ダニ剤	ピリミジフェン
ピロール系殺ダニ剤	クロルフェナピル

10

20

30

40

50

【表 10 - 17】

カテゴリー	化合物
第四級アンモニウム系殺ダニ剤	サンギナリン
キノキサリン系殺ダニ剤	キノメチオナト チノキノックス
ストロビルリン系殺ダニ剤	
メトキシアクリレートストロビルリン系殺ダニ剤	ビフジュンジ フルアクリピリム フルフェノキシストロビン ピリミノストロビン
亜硫酸エステル系殺ダニ剤	アラマイト プロパルギット
テトロン酸系殺ダニ剤	スピロジクロフェン
テトラジン系殺ダニ剤	クロフェンテジン ジフロピダジン
チアゾリジン系殺ダニ剤	フルベンジミン ヘキシチアゾクス
チオカルバメート系殺ダニ剤	フェノチオカルブ
チオ尿素系殺ダニ剤	クロロメチウロン ジアフェンチウロン
未分類の殺ダニ剤	アセキノシル アフォキソラネル アミドフルメト 亜ヒ酸 クレンピリン クロサンテル クロタミトン シクロプラート シミアゾール ジスルフィラム エトキサゾール フェナザフロル フェナザキン フルエネチル フルララネル メスルフェン MNAF ニフルリジド ニッコーマイシン ピリダベン スルフィラム スルフルラミド 硫黄 ツリンギエンシン トリアラセン
化学滅菌剤	

10

20

30

40

50

【表 10 - 18】

カテゴリー	化合物	
	アホレート ビサジル プスルファン ジフルベンズロン ジマチフ ヘメル ヘンパ メテパ メチオテパ メチルアフォレート モルジド ペンフルロン テパ チオヘンパ チオテパ トレタミン ウレデパ	10
防虫剤		
	アクレップ ブトピロノキシル カンフル d-カンフル カルボキシド フタル酸ジブチル ジエチルトルアミド ジメチルカルバート フタル酸ジメチル コハク酸ジブチル エトヘキサジオール ヘキサミド イカリジン メトキンブチル メチルネオデカナミド 2-(オクチルチオ)エタノール オキサメート クウェンチ(quwenzhi) クイグジグ(quyingding) レベミド ツェンシアオアン(zengxiaoan)	20
殺線虫剤		
アベルメクチン系殺線虫剤	アバメクチン	30
植物性殺線虫剤	カルバクロール	
カルバメート系殺線虫剤	ベノミル カルボフラン カルボスルファン クロエトカルブ	40

【表 10 - 19】

カテゴリー	化合物	
オキシムカルバメート系殺線虫剤	アラニカルブ アルジカルブ アルドキシカルブ オキサミル ティルペート(tirpate)	
燻蒸剤殺線虫剤	二硫化炭素 シアノゲン 1,2-ジクロロプロパン 1,3-ジクロロプロペン ジチオエーテル 臭化メチル ヨウ化メチル テトラチオ炭酸ナトリウム	10
有機リン系殺線虫剤		
有機リン酸系殺線虫剤	ジアミダホス フェナミホス ホスチエタン ホスファミドン	
有機チオリン酸系殺線虫剤	カズサホス クロルピリホス ジクロフェンチオン ジメトエート エトプロホス フェンスルホチオン ホスチアゼート ヘテロホス イサミドホス イサゾホス ホレート ホスホカルブ テルブホス チオナジン トリアゾホス	20
ホスホロチオ酸系殺線虫剤	イミシアホス メカルホン	30
未分類の殺線虫剤	アセトプロール ベンクロチアズ クロルピクリン ダゾメット DBCP DCIP フルアザインドリジン フルエンスルホン フルフラール メタム イソチオシアン酸メチル チオキサザフェン キシレノール	40

【0287】

殺虫剤はまた、それ自体では毒性または殺虫性とみなされないが、殺虫剤と共に使用されて殺虫剤との相乗作用を生み出すかまたは殺虫剤の活性を強化する材料である、相乗剤または活性化剤を含む。相乗剤または活性化剤は、ピペロニルブトキシドを含む。

【0288】

バイオリショナル農薬

【0289】

殺虫剤は、バイオリショナルであり得るか、または、バイオ農薬もしくは生物学的農薬としても知られ得る。バイオリショナルとは、特定の標的有害生物（複数可）、例えば、昆

虫、雑草、植物病害（線虫を含む）、及び脊椎動物有害生物に対して有害または致死的效果を有し、固有の作用機序を持ち、人間、栽培植物及び飼育動物に対して非毒性であり、野生生物及び環境に悪影響をほとんどまたは全く有しない、天然起源の任意の物質（または天然起源の物質に類似した人為的物質）を指す。

【0290】

バイオラショナル殺虫剤（またはバイオ農薬もしくは生物学的農薬）は、（１）生化学物質（ホルモン、酵素、フェロモン、及び天然作用物質、例えば、昆虫及び植物成長調節剤）、（２）微生物（ウイルス、細菌、真菌、原生動物、及び線虫）、または（３）植物導入保護剤（PIP）（主としてトランスジェニック植物、例えば、Btトウモロコシ）として群分けされ得る。

10

【0291】

バイオ農薬もしくは生物学的農薬には、生きている微生物または天然物から製造され、植物の有害生物を防除するために販売されている薬剤が広く含まれ得る。バイオ農薬は、微小生物、生化学物質、及び情報化学物質であり得る。バイオ農薬はまた、ペプチド、タンパク質、及び核酸、例えば、二本鎖DNA、一本鎖DNA、二本鎖RNA、一本鎖RNA、及びヘアピンDNAまたはRNAを含み得る。

【0292】

細菌、真菌、卵菌、ウイルス、及び原生動物は全て、昆虫有害生物の生物学的防除に使用される。最も広く使用される微生物バイオ農薬は、昆虫病原性細菌 *Bacillus thuringiensis* (Bt) であり、この細菌は、細菌胞子形成中に、感受性のある昆虫によって消費されると腸細胞の溶解を引き起こすことが可能なタンパク質結晶（Bt - エンドトキシン）を産生する。微生物Btバイオ農薬は、発酵槽中で大量生産され、噴霧可能な製品として製剤化される細菌胞子及び - エンドトキシン結晶からなる。Btは、野菜を害せず、人間、有益な生物、及び環境に対して安全である。故に、Bt噴霧剤は、それらの高レベルの選択性及び安全性が望ましいとみなされる、及び合成化学殺虫剤に対する耐性が問題である、果実及び野菜作物における有害生物管理のために成長している戦術である。Bt噴霧剤はまた、メイズ、ダイズ、及び綿などの商品作物にも使用されてきたが、植物の遺伝子組換えの出現に伴い、農業従事者は、次第にBtトランスジェニック作物品種を栽培するようになっている。

20

【0293】

他の微生物殺虫剤には、昆虫病原性のバキュロウイルスに基づく製品が含まれる。節足動物に対して病原性であるバキュロウイルスは、ウイルスファミリーに属し、ヌクレオカプシドへとパッケージされる大きな共有結合閉環状の二本鎖DNAゲノムを持つ。目鱗翅目、膜翅目、及び双翅目の昆虫から700種超のバキュロウイルスが同定されている。バキュロウイルスは通常、それらの宿主昆虫に高度に特異的であり、故に、環境、ヒト、他の植物、及び有益な生物に対して安全である。50種超のバキュロウイルス産物が、世界中の異なる昆虫有害生物を防除するために使用されてきた。米国及び欧州では、*Cydia pomonella* 顆粒ウイルス (CpGV) が、リンゴにおけるシンクイガに対する大量のバイオ農薬として使用されている。米国の最大のリンゴ生産州であるワシントン州では、リンゴ作物の13%にCpGVが使用されている。ブラジルでは、1990年代中期に最大400万ヘクタール（およそ35%）のダイズ作物に対してダイズの毛虫 *Anticarsia gemmatalis* の核多角体病ウイルスが使用された。Heliothis及びHelicoverpa種の幼虫を防除するために、Gemstar（登録商標）(Certis USA) などのウイルスが利用可能である。

30

40

【0294】

温室作物、果実及び圃場野菜ならびに商品作物における少なくとも5種の昆虫及びダニ目に対して使用するために、昆虫病原性真菌に基づく少なくとも170種の異なるバイオ農薬製品が開発されてきた。製品の大部分は、子囊菌 *Beauveria bassiana* または *Metarhizium anisopliae* に基づく。M. anisopliae はまた、アフリカ及びオーストラリアにおけるイナゴ及びバッタ有害生物の防除

50

のためにも開発されており、イナゴ管理に対して国連食糧農業機関（FAO）によって推奨される。

【0295】

米国に登録されたいくつかの微生物農薬が、Kabaluk et al. 2010 (Kabaluk, J. T. et al. (ed.). 2010. The Use and Regulation of Microbial Pesticides in Representative Jurisdictions Worldwide. IOBC Global. 99 pp.) の表16に列挙されており、また選択される国に登録された微生物農薬が、Hoeschle-Zeledon et al. 2013 (Hoeschle-Zeledon, I., P. Neuenschwander and L. Kumar. (2013). Regulatory Challenges for biological control. SP-IPM Secretariat, International Institute of Tropical Agriculture (IITA), Ibadan, Nigeria. 43 pp.) の付録4に列挙されており、これらのそれぞれは、その全体が本明細書に組み込まれる。

10

【0296】

植物は、草食動物によるそれらの摂食を阻止する多種多様な二次代謝物を産生する。これらのうちの一部をバイオ農薬として使用することができる。それらには、例えば、ピレトリンが含まれ、これは *Chrysanthemum cinerariaefolium* によって産生される速効性の殺虫性化合物である。それらは、哺乳類に対する毒性は低い、施用後に迅速に分解する。この短い持続性が合成ピレトリン（ピレスロイド）の開発を駆り立てた。最も広く使用される植物性化合物は、*Azadirachta indica* の種子から抽出される殺虫性化学物質である、ニーム油である。土壌放線菌によって合成される二次代謝物に基づく2種の高活性の農薬が利用可能であるが、それらは、あたかもそれらが合成化学農薬であるかのごとく規制当局によって評価された。スピノサドは、*Saccharopolyspora spinosa* 由来の2つのマクロライド化合物の混合物である。それは、哺乳類に対する毒性が非常に低く、残留物は、圃場で迅速に分解する。農業従事者及び栽培者は、1997年のその導入に次いで、それを広く使用していたが、ミカンキイロアザミウマなどの一部の重要な有害生物で耐性がすでに発達している。アバメクチンは、*Streptomyces avermitilis* によって産生される大環状ラクトン系化合物である。それは、幅広い有害生物種に対して活性であるが、これもまた、例えば、ハダニで耐性が発達している。

20

30

【0297】

いくつかの生物由来のペプチド及びタンパク質は、殺有害生物特性を持つことが見出されている。恐らく最も顕著なものは、クモ毒由来のペプチドである (King, G. F. and Hardy, M. C. (2013) Spider-venom peptides: structure, pharmacology, and potential for control of insect pests. Annu. Rev. Entomol. 58: 475 - 496)。クモ毒ペプチドにおけるジスルフィド結合の固有の配置が、それらをプロテアーゼに極度に耐性に行っている。結果として、これらのペプチドは、昆虫の腸及び血リンパ中で高度に安定であり、それらのうちの多くは、経口的に活性である。このペプチドは、昆虫神経系における広範囲の受容体及びイオンチャネルを標的とする。殺虫性ペプチドの他の例としては、電位開口型 Na^+ チャネルに作用するイソギンチャク毒 (Bosmans, F. and Tytgat, J. (2007) Sea anemone venom as a source of insecticidal peptides acting on voltage-gated Na^+ channels. Toxicon. 49 (4): 550 - 560)、カ、一部のアブラムシ、及び穀類ゾウムシなどのいくつかの昆虫有害生物に対して致死活性を有するマメ科植物種子由来の PA1b (エンドウマメアルブミン1、サブユニットb) ペプチド (Eyraud, V. et al. (2013) Expression and Biological

40

50

l Activity of the Cystine Knot Bioinsecticide PA1b (Pea Albumin 1 Subunit b). PLoS ONE 8 (12): e81619)、ならびに、感受性のある昆虫内で *Canavalia ensiformis* (タチナタマメ) ウレアーゼの酵素的加水分解によって生成される 10 kDa の内部ペプチド (Martinelli, A. H. S., et al. (2014) Structure-function studies on jaburetox, a recombinant insecticidal peptide derived from jack bean (*Canavalia ensiformis*) urease. *Biochimica et Biophysica Acta* 1840: 935-944) が挙げられる。市販のペプチド殺虫剤の例としては、温室内の野菜及び観賞植物におけるアザミウマの処理用の Spear (商標) - T、コロラドハムシを防除するための Spear (商標) - P、及び作物を鱗翅目の有害生物から保護するための Spear (商標) - C (Vestaron Corporation, Kalamazoo, MI) が挙げられる。副胞子結晶毒素 (PC) と呼ばれる、*Bacillus bombysepticus* 由来の新規の殺虫性タンパク質は、カイコ及び *Cry1Ac* 耐性 *Helicoverpa armigera* 株に対して経口病原性活性及び致死性を示す (Lin, P. et al. (2015) PC, a novel oral insecticidal toxin from *Bacillus bombysepticus* involved in host lethality via APN and BtR-175. *Sci. Rep.* 5: 11101)。

【0298】

情報化学物質は、同じ種または異なる種の個体において挙動変化を引き起こす、1つの生物によってもたらされる化学シグナルである。作物保護のために最も広く使用される情報化学物質は、昆虫性フェロモンであり、これらのうちの一部は、今では合成することができ、大量捕獲、おびき寄せて殺傷する (lure-and-kill) システム、及び交尾阻害による監視または有害生物防除に使用される。世界中で、交尾阻害は 660,000 ヘクタール以上で使用されており、果樹園の作物で特に有用である。

【0299】

本明細書で使用される場合、「トランスジェニック殺虫性形質」とは、1つ以上の有害生物に有害な核酸またはポリペプチドを発現するように遺伝子導入操作された植物が呈する形質を指す。一実施形態では、本開示の植物は、本開示の有害生物のうちのいずれか1つ以上による付着及び/または蔓延に耐性である。一実施形態では、形質は、*Bacillus thuringiensis* 由来の植物性殺虫性タンパク質 (VIP)、植物由来のレクチン及びプロテイナーゼ阻害剤、テルベノイド、*Streptomyces* 種由来のコレステロールオキシダーゼ、昆虫キチナーゼ及び真菌キチン分解酵素、細菌性殺虫性タンパク質、ならびに早期認識耐性遺伝子の発現を含む。別の実施形態では、形質は、有害生物に対して毒性である *Bacillus thuringiensis* タンパク質の発現を含む。一実施形態では、Bt タンパク質は、Cry タンパク質 (結晶タンパク質) である。Bt 作物には、Bt トウモロコシ、Bt 綿、及び Bt ダイズが含まれる。Bt 毒素は、Cry ファミリー由来であり得 (例えば、Crickmore et al., 1998, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62: 807-812 を参照のこと)、これは鱗翅目、鞘翅目、及び双翅目に対して特に有効である。

【0300】

Bt Cry 及び Cyt 毒素は、それらの宿主の細胞膜に入り込むために、またはそれを通して移行するために立体構造変化を経る水溶性タンパク質として分泌される、膜孔形成毒素 (PFT) として知られる細菌毒素のクラスに属する。PFT の以下の2つの主要な群、すなわち、(i) - ヘリックス領域が膜貫通孔を形成する - ヘリックス状毒素、及び (ii) 各モノマーからのシートヘアピンから構成される - パレルを形成することによって膜に入り込む - パレル毒素が存在する。Parker MW, Feil SC, "Pore-forming protein toxins: from st

structure to function," *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 2005 May; 88(1): 91-142を参照のこと。PFTの第1のクラスには、コリシン、外毒素A、ジフテリア毒素、及び3ドメインCry毒素などの毒素も含まれる。一方で、エロリジン、 α -溶血毒、炭疽防御抗原、パーフリンゴリジンOとしてのコレステロール依存性毒素、及びCyt毒素は、 β -バレル毒素に属する。(同文献より)。一般に、PFT産生細菌は、それらの毒素を分泌し、これらの毒素は、宿主細胞表面上に位置する特定の受容体と相互作用する。ほとんどの場合、PFTは、受容体結合後に宿主プロテアーゼによって活性化されて、挿入能力のあるオリゴマー構造の形成を誘導する。最後に、膜挿入は、ほとんどの場合、タンパク質のモルテングロビュール状態を誘導する、pHの減少によって誘発される(同文献より)。

10

【0301】

Bt Cryタンパク質を産生するトランスジェニック作物の開発は、環境に優しい代替物による化学殺虫剤の置換を可能にしてきた。トランスジェニック植物において、Cry毒素は、継続的に産生されるため、この毒素は分解から保護され、咀嚼性昆虫及び穿孔性昆虫に到達可能となる。植物におけるCryタンパク質産生は、植物に偏位したコドン使用頻度を用いたcry遺伝子の導入操作、プロトキシンの、推定上のスプライシングシグナル配列の除去及びカルボキシ末端領域の欠失によって改善されてきた。Schuler TH, et al., "Insect-resistant transgenic plants," *Trends Biotechnol.* 1998; 16: 168-175を参照のこと。昆虫耐性作物の使用は、これらのトランスジェニック作物が植栽される地帯において化学農薬の使用を大幅に削減してきた。Qaim M, Zilberman D, "Yield effects of genetically modified crops in developing countries," *Science*. 2003 Feb 7; 299(5608): 900-2を参照のこと。

20

【0302】

既知のCryタンパク質には、Cry1、Cry2、Cry3、Cry4、Cry5、Cry6、Cry7、Cry8、Cry9、Cry10、Cry11、Cry12、Cry13、Cry14、Cry15、Cry16、Cry17、Cry18、Cry19、Cry20、Cry21、Cry22、Cry23、Cry24、Cry25、Cry26、Cry27、Cry28、Cry29、Cry30、Cry31、Cry32、Cry33、Cry34、Cry35、Cry36、Cry37、Cry38、Cry39、Cry40、Cry41、Cry42、Cry43、Cry44、Cry45、Cry46、Cry47、Cry49、Cry51、Cry52、Cry53、Cry54、Cry55、Cry56、Cry57、Cry58、Cry59、Cry60、Cry61、Cry62、Cry63、Cry64、Cry65、Cry66、Cry67、Cry68、Cry69、Cry70、及びCry71クラスの δ -エンドトキシン遺伝子を含むがこれらに限定されない δ -エンドトキシン、ならびにB. thuringiensis細胞溶解性cyt1及びcyt2遺伝子が含まれる。

30

【0303】

これらのクラスのB. thuringiensis殺虫性タンパク質のメンバーには、Cry1Aa1(受託番号AAA22353)、Cry1Aa2(受託番号AAA22552)、Cry1Aa3(受託番号BAA00257)、Cry1Aa4(受託番号CAA31886)、Cry1Aa5(受託番号BAA04468)、Cry1Aa6(受託番号AAA86265)、Cry1Aa7(受託番号AAD46139)、Cry1Aa8(受託番号126149)、Cry1Aa9(受託番号BAA77213)、Cry1Aa10(受託番号AAD55382)、Cry1Aa11(受託番号CAA70856)、Cry1Aa12(受託番号AAP80146)、Cry1Aa13(受託番号AM44305)、Cry1Aa14(受託番号AAP40639)、Cry1Aa15(受託番号AAY66993)、Cry1Aa16(受託番号HQ439776)、Cry1Aa17(受託番号HQ439788)、Cry1Aa18(受託番号HQ43979

40

50

0)、Cry1Aa19(受託番号HQ685121)、Cry1Aa20(受託番号JF340156)、Cry1Aa21(受託番号JN651496)、Cry1Aa22(受託番号KC158223)、Cry1Ab1(受託番号AAA22330)、Cry1Ab2(受託番号AAA22613)、Cry1Ab3(受託番号AAA22561)、Cry1Ab4(受託番号BAA00071)、Cry1Ab5(受託番号CAA28405)、Cry1Ab6(受託番号AAA22420)、Cry1Ab7(受託番号CAA31620)、Cry1Ab8(受託番号AAA22551)、Cry1Ab9(受託番号CAA38701)、Cry1Ab10(受託番号A29125)、Cry1Ab11(受託番号I12419)、Cry1Ab12(受託番号AAC64003)、Cry1Ab13(受託番号AAN76494)、Cry1Ab14(受託番号AAG16877)、Cry1Ab15(受託番号AA013302)、Cry1Ab16(受託番号AAK55546)、Cry1Ab17(受託番号AAT46415)、Cry1Ab18(受託番号AAQ88259)、Cry1Ab19(受託番号AAW31761)、Cry1Ab20(受託番号ABB72460)、Cry1Ab21(受託番号ABS18384)、Cry1Ab22(受託番号ABW87320)、Cry1Ab23(受託番号HQ439777)、Cry1Ab24(受託番号HQ439778)、Cry1Ab25(受託番号HQ685122)、Cry1Ab26(受託番号HQ847729)、Cry1Ab27(受託番号JN135249)、Cry1Ab28(受託番号JN135250)、Cry1Ab29(受託番号JN135251)、Cry1Ab30(受託番号JN135252)、Cry1Ab31(受託番号JN135253)、Cry1Ab32(受託番号JN135254)、Cry1Ab33(受託番号AAS93798)、Cry1Ab34(受託番号KC156668)、Cry1Ab様(受託番号AAK14336)、Cry1Ab様(受託番号AAK14337)、Cry1Ab様(受託番号AAK14338)、Cry1Ab様(受託番号ABG88858)、Cry1Ac1(受託番号AAA22331)、Cry1Ac2(受託番号AAA22338)、Cry1Ac3(受託番号CAA38098)、Cry1Ac4(受託番号AAA73077)、Cry1Ac5(受託番号AAA22339)、Cry1Ac6(受託番号AAA86266)、Cry1Ac7(受託番号BAB46989)、Cry1Ac8(受託番号AAC44841)、Cry1Ac9(受託番号BAB49768)、Cry1Ac10(受託番号CAA05505)、Cry1Ac11(受託番号CAA10270)、Cry1Ac12(受託番号I12418)、Cry1Ac13(受託番号AAD38701)、Cry1Ac14(受託番号AAQ06607)、Cry1Ac15(受託番号AAN07788)、Cry1Ac16(受託番号AAU87037)、Cry1Ac17(受託番号AAX18704)、Cry1Ac18(受託番号AAY88347)、Cry1Ac19(受託番号ABD37053)、Cry1Ac20(受託番号ABB89046)、Cry1Ac21(受託番号AAY66992)、Cry1Ac22(受託番号ABZ01836)、Cry1Ac23(受託番号CAQ30431)、Cry1Ac24(受託番号ABL01535)、Cry1Ac25(受託番号FJ513324)、Cry1Ac26(受託番号FJ617446)、Cry1Ac27(受託番号FJ617447)、Cry1Ac28(受託番号ACM90319)、Cry1Ac29(受託番号DQ438941)、Cry1Ac30(受託番号GQ227507)、Cry1Ac31(受託番号GU446674)、Cry1Ac32(受託番号HM061081)、Cry1Ac33(受託番号GQ866913)、Cry1Ac34(受託番号HQ230364)、Cry1Ac35(受託番号JF340157)、Cry1Ac36(受託番号JN387137)、Cry1Ac37(受託番号JQ317685)、Cry1Ad1(受託番号AAA22340)、Cry1Ad2(受託番号CAA01880)、Cry1Ae1(受託番号AAA22410)、Cry1Af1(受託番号BAB82749)、Cry1Ag1(受託番号AAD46137)、Cry1Ah1(受託番号AAQ14326)、Cry1Ah2(受託番号ABB76664)、Cry1Ah3(受託番号HQ439779)、Cry1Ai1(受託番号AA039719)、Cry1Ai2(受託

10

20

30

40

50

番号HQ439780)、Cry1A様(受託番号AAK14339)、Cry1Ba1
 (受託番号CAA29898)、Cry1Ba2(受託番号CAA65003)、Cry
 1Ba3(受託番号AAK63251)、Cry1Ba4(受託番号AAK51084)
 、Cry1Ba5(受託番号AB020894)、Cry1Ba6(受託番号ABL60
 921)、Cry1Ba7(受託番号HQ439781)、Cry1Bb1(受託番号A
 AA22344)、Cry1Bb2(受託番号HQ439782)、Cry1Bc1(受
 託番号CAA86568)、Cry1Bd1(受託番号AAD10292)、Cry1B
 d2(受託番号AAM93496)、Cry1Be1(受託番号AAC32850)、C
 ry1Be2(受託番号AAQ52387)、Cry1Be3(受託番号ACV9672
 0)、Cry1Be4(受託番号HM070026)、Cry1Bf1(受託番号CAC
 50778)、Cry1Bf2(受託番号AAQ52380)、Cry1Bg1(受託番
 号AA039720)、Cry1Bh1(受託番号HQ589331)、Cry1Bi1
 (受託番号KC156700)、Cry1Ca1(受託番号CAA30396)、Cry
 1Ca2(受託番号CAA31951)、Cry1Ca3(受託番号AAA22343)
 、Cry1Ca4(受託番号CAA01886)、Cry1Ca5(受託番号CAA65
 457)、Cry1Ca6[1](受託番号AAF37224)、Cry1Ca7(受託
 番号AAG50438)、Cry1Ca8(受託番号AAM00264)、Cry1Ca
 9(受託番号AAL79362)、Cry1Ca10(受託番号AAN16462)、C
 ry1Ca11(受託番号AAX53094)、Cry1Ca12(受託番号HM070
 027)、Cry1Ca13(受託番号HQ412621)、Cry1Ca14(受託番
 号JN651493)、Cry1Cb1(受託番号M97880)、Cry1Cb2(受
 託番号AAG35409)、Cry1Cb3(受託番号ACD50894)、Cry1C
 b様(受託番号AAX63901)、Cry1Da1(受託番号CAA38099)、C
 ry1Da2(受託番号I76415)、Cry1Da3(受託番号HQ439784)
 、Cry1Db1(受託番号CAA80234)、Cry1Db2(受託番号AAK48
 937)、Cry1Dc1(受託番号ABK35074)、Cry1Ea1(受託番号C
 AA37933)、Cry1Ea2(受託番号CAA39609)、Cry1Ea3(受
 託番号AAA22345)、Cry1Ea4(受託番号AAD04732)、Cry1E
 a5(受託番号A15535)、Cry1Ea6(受託番号AAL50330)、Cry
 1Ea7(受託番号AAW72936)、Cry1Ea8(受託番号ABX11258)
 、Cry1Ea9(受託番号HQ439785)、Cry1Ea10(受託番号ADR0
 0398)、Cry1Ea11(受託番号JQ652456)、Cry1Eb1(受託番
 号AAA22346)、Cry1Fa1(受託番号AAA22348)、Cry1Fa2
 (受託番号AAA22347)、Cry1Fa3(受託番号HM070028)、Cry
 1Fa4(受託番号HM439638)、Cry1Fb1(受託番号CAA80235)
 、Cry1Fb2(受託番号BAA25298)、Cry1Fb3(受託番号AAF21
 767)、Cry1Fb4(受託番号AAC10641)、Cry1Fb5(受託番号A
 A013295)、Cry1Fb6(受託番号ACD50892)、Cry1Fb7(受
 託番号ACD50893)、Cry1Gal(受託番号CAA80233)、Cry1G
 a2(受託番号CAA70506)、Cry1Gb1(受託番号AAD10291)、C
 ry1Gb2(受託番号AA013756)、Cry1Gc1(受託番号AAQ5238
 1)、Cry1Ha1(受託番号CAA80236)、Cry1Hb1(受託番号AAA
 79694)、Cry1Hb2(受託番号HQ439786)、Cry1H様(受託番号
 AAF01213)、Cry1Ia1(受託番号CAA44633)、Cry1Ia2(受
 託番号AAA22354)、Cry1Ia3(受託番号AAC36999)、Cry1
 Ia4(受託番号AAB00958)、Cry1Ia5(受託番号CAA70124)、
 Cry1Ia6(受託番号AAC26910)、Cry1Ia7(受託番号AAM735
 16)、Cry1Ia8(受託番号AAK66742)、Cry1Ia9(受託番号AA
 Q08616)、Cry1Ia10(受託番号AAP86782)、Cry1Ia11(受
 託番号CAC85964)、Cry1Ia12(受託番号AAV53390)、Cry

10

20

30

40

50

1 I a 1 3 (受託番号 A B F 8 3 2 0 2)、C r y 1 I a 1 4 (受託番号 A C G 6 3 8 7
 1)、C r y 1 I a 1 5 (受託番号 F J 6 1 7 4 4 5)、C r y 1 I a 1 6 (受託番号 F
 J 6 1 7 4 4 8)、C r y 1 I a 1 7 (受託番号 G U 9 8 9 1 9 9)、C r y 1 I a 1 8
 (受託番号 A D K 2 3 8 0 1)、C r y 1 I a 1 9 (受託番号 H Q 4 3 9 7 8 7)、C r
 y 1 I a 2 0 (受託番号 J Q 2 2 8 4 2 6)、C r y 1 I a 2 1 (受託番号 J Q 2 2 8 4
 2 4)、C r y 1 I a 2 2 (受託番号 J Q 2 2 8 4 2 7)、C r y 1 I a 2 3 (受託番号
 J Q 2 2 8 4 2 8)、C r y 1 I a 2 4 (受託番号 J Q 2 2 8 4 2 9)、C r y 1 I a 2
 5 (受託番号 J Q 2 2 8 4 3 0)、C r y 1 I a 2 6 (受託番号 J Q 2 2 8 4 3 1)、C
 r y 1 I a 2 7 (受託番号 J Q 2 2 8 4 3 2)、C r y 1 I a 2 8 (受託番号 J Q 2 2 8
 4 3 3)、C r y 1 I a 2 9 (受託番号 J Q 2 2 8 4 3 4)、C r y 1 I a 3 0 (受託番
 号 J Q 3 1 7 6 8 6)、C r y 1 I a 3 1 (受託番号 J X 9 4 4 0 3 8)、C r y 1 I a
 3 2 (受託番号 J X 9 4 4 0 3 9)、C r y 1 I a 3 3 (受託番号 J X 9 4 4 0 4 0)、
 C r y 1 I b 1 (受託番号 A A A 8 2 1 1 4)、C r y 1 I b 2 (受託番号 A B W 8 8 0
 1 9)、C r y 1 I b 3 (受託番号 A C D 7 5 5 1 5)、C r y 1 I b 4 (受託番号 H M
 0 5 1 2 2 7)、C r y 1 I b 5 (受託番号 H M 0 7 0 0 2 8)、C r y 1 I b 6 (受託
 番号 A D K 3 8 5 7 9)、C r y 1 I b 7 (受託番号 J N 5 7 1 7 4 0)、C r y 1 I b
 8 (受託番号 J N 6 7 5 7 1 4)、C r y 1 I b 9 (受託番号 J N 6 7 5 7 1 5)、C r
 y

10

1 I b 1 0 (受託番号 J N 6 7 5 7 1 6)、C r y 1 I b 1 1 (受託番号 J Q 2 2 8 4 2
 3)、C r y 1 I c 1 (受託番号 A A C 6 2 9 3 3)、C r y 1 I c 2 (受託番号 A A E
 7 1 6 9 1)、C r y 1 I d 1 (受託番号 A A D 4 4 3 6 6)、C r y 1 I d 2 (受託番
 号 J Q 2 2 8 4 2 2)、C r y 1 I e 1 (受託番号 A A G 4 3 5 2 6)、C r y 1 I e 2
 (受託番号 H M 4 3 9 6 3 6)、C r y 1 I e 3 (受託番号 K C 1 5 6 6 4 7)、C r y
 1 I e 4 (受託番号 K C 1 5 6 6 8 1)、C r y 1 I f 1 (受託番号 A A Q 5 2 3 8 2)
 、C r y 1 I g 1 (受託番号 K C 1 5 6 7 0 1)、C r y 1 I 様 (受託番号 A A C 3 1 0
 9 4)、C r y 1 I 様 (受託番号 A B G 8 8 8 5 9)、C r y 1 J a 1 (受託番号 A A A
 2 2 3 4 1)、C r y 1 J a 2 (受託番号 H M 0 7 0 0 3 0)、C r y 1 J a 3 (受託番
 号 J Q 2 2 8 4 2 5)、C r y 1 J b 1 (受託番号 A A A 9 8 9 5 9)、C r y 1 J c 1
 (受託番号 A A C 3 1 0 9 2)、C r y 1 J c 2 (受託番号 A A Q 5 2 3 7 2)、C r y
 1 J d 1 (受託番号 C A C 5 0 7 7 9)、C r y 1 K a 1 (受託番号 A A B 0 0 3 7 6)
 、C r y 1 K a 2 (受託番号 H Q 4 3 9 7 8 3)、C r y 1 L a 1 (受託番号 A A S 6 0
 1 9 1)、C r y 1 L a 2 (受託番号 H M 0 7 0 0 3 1)、C r y 1 M a 1 (受託番号 F
 J 8 8 4 0 6 7)、C r y 1 M a 2 (受託番号 K C 1 5 6 6 5 9)、C r y 1 N a 1 (受
 託番号 K C 1 5 6 6 4 8)、C r y 1 N b 1 (受託番号 K C 1 5 6 6 7 8)、C r y 1 様
 (受託番号 A A C 3 1 0 9 1)、C r y 2 A a 1 (受託番号 A A A 2 2 3 3 5)、C r y
 2 A a 2 (受託番号 A A A 8 3 5 1 6)、C r y 2 A a 3 (受託番号 D 8 6 0 6 4)、C
 r y 2 A a 4 (受託番号 A A C 0 4 8 6 7)、C r y 2 A a 5 (受託番号 C A A 1 0 6 7
 1)、C r y 2 A a 6 (受託番号 C A A 1 0 6 7 2)、C r y 2 A a 7 (受託番号 C A A
 1 0 6 7 0)、C r y 2 A a 8 (受託番号 A A 0 1 3 7 3 4)、C r y 2 A a 9 (受託番
 号 A A 0 1 3 7 5 0)、C r y 2 A a 1 0 (受託番号 A A Q 0 4 2 6 3)、C r y 2 A a
 1 1 (受託番号 A A Q 5 2 3 8 4)、C r y 2 A a 1 2 (受託番号 A B 1 8 3 6 7 1)、
 C r y 2 A a 1 3 (受託番号 A B L 0 1 5 3 6)、C r y 2 A a 1 4 (受託番号 A C F 0
 4 9 3 9)、C r y 2 A a 1 5 (受託番号 J N 4 2 6 9 4 7)、C r y 2 A b 1 (受託番
 号 A A A 2 2 3 4 2)、C r y 2 A b 2 (受託番号 C A A 3 9 0 7 5)、C r y 2 A b 3
 (受託番号 A A G 3 6 7 6 2)、C r y 2 A b 4 (受託番号 A A 0 1 3 2 9 6)、C r y
 2 A b 5 (受託番号 A A Q 0 4 6 0 9)、C r y 2 A b 6 (受託番号 A A P 5 9 4 5 7)
 、C r y 2 A b 7 (受託番号 A A Z 6 6 3 4 7)、C r y 2 A b 8 (受託番号 A B C 9 5
 9 9 6)、C r y 2 A b 9 (受託番号 A B C 7 4 9 6 8)、C r y 2 A b 1 0 (受託番号
 E F 1 5 7 3 0 6)、C r y 2 A b 1 1 (受託番号 C A M 8 4 5 7 5)、C r y 2 A b 1

20

30

40

50

2 (受託番号 A B M 2 1 7 6 4)、C r y 2 A b 1 3 (受託番号 A C G 7 6 1 2 0)、C
r y 2 A b 1 4 (受託番号 A C G 7 6 1 2 1)、C r y 2 A b 1 5 (受託番号 H M 0 3 7
1 2 6)、C r y 2 A b 1 6 (受託番号 G Q 8 6 6 9 1 4)、C r y 2 A b 1 7 (受託番
号 H Q 4 3 9 7 8 9)、C r y 2 A b 1 8 (受託番号 J N 1 3 5 2 5 5)、C r y 2 A b
1 9 (受託番号 J N 1 3 5 2 5 6)、C r y 2 A b 2 0 (受託番号 J N 1 3 5 2 5 7)、
C r y 2 A b 2 1 (受託番号 J N 1 3 5 2 5 8)、C r y 2 A b 2 2 (受託番号 J N 1 3
5 2 5 9)、C r y 2 A b 2 3 (受託番号 J N 1 3 5 2 6 0)、C r y 2 A b 2 4 (受託
番号 J N 1 3 5 2 6 1)、C r y 2 A b 2 5 (受託番号 J N 4 1 5 4 8 5)、C r y 2 A
b 2 6 (受託番号 J N 4 2 6 9 4 6)、C r y 2 A b 2 7 (受託番号 J N 4 1 5 7 6 4)
、C r y 2 A b 2 8 (受託番号 J N 6 5 1 4 9 4)、C r y 2 A c 1 (受託番号 C A A 4 10
0 5 3 6)、C r y 2 A c 2 (受託番号 A A G 3 5 4 1 0)、C r y 2 A c 3 (受託番号
A A Q 5 2 3 8 5)、C r y 2 A c 4 (受託番号 A B C 9 5 9 9 7)、C r y 2 A c 5 (受託番号
A B C 7 4 9 6 9)、C r y 2 A c 6 (受託番号 A B C 7 4 7 9 3)、C r y 2
A c 7 (受託番号 C A L 1 8 6 9 0)、C r y 2 A c 8 (受託番号 C A M 0 9 3 2 5)、
C r y 2 A c 9 (受託番号 C A M 0 9 3 2 6)、C r y 2 A c 1 0 (受託番号 A B N 1 5
1 0 4)、C r y 2 A c 1 1 (受託番号 C A M 8 3 8 9 5)、C r y 2 A c 1 2 (受託番
号 C A M 8 3 8 9 6)、C r y 2 A d 1 (受託番号 A A F 0 9 5 8 3)、C r y 2 A d 2
(受託番号 A B C 8 6 9 2 7)、C r y 2 A d 3 (受託番号 C A K 2 9 5 0 4)、C r y
2 A d 4 (受託番号 C A M 3 2 3 3 1)、C r y 2 A d 5 (受託番号 C A 0 7 8 7 3 9)
、C r y 2 A e 1 (受託番号 A A Q 5 2 3 6 2)、C r y 2 A f 1 (受託番号 A B 0 3 0 20
5 1 9)、C r y 2 A f 2 (受託番号 G Q 8 6 6 9 1 5)、C r y 2 A g 1 (受託番号 A
C H 9 1 6 1 0)、C r y 2 A h 1 (受託番号 E U 9 3 9 4 5 3)、C r y 2 A h 2 (受
託番号 A C L 8 0 6 6 5)、C r y 2 A h 3 (受託番号 G U 0 7 3 3 8 0)、C r y 2 A
h 4 (受託番号 K C 1 5 6 7 0 2)、C r y 2 A i 1 (受託番号 F J 7 8 8 3 8 8)、C
r y 2 A j (受託番号)、C r y 2 A k 1 (受託番号 K C 1 5 6 6 6 0)、C r y 2 B a
1 (受託番号 K C 1 5 6 6 5 8)、C r y 3 A a 1 (受託番号 A A A 2 2 3 3 6)、C r
y 3 A a 2 (受託番号 A A A 2 2 5 4 1)、C r y 3 A a 3 (受託番号 C A A 6 8 4 8 2
) 、C r y 3 A a 4 (受託番号 A A A 2 2 5 4 2)、C r y 3 A a 5 (受託番号 A A A 5
0 2 5 5)、C r y 3 A a 6 (受託番号 A A C 4 3 2 6 6)、C r y 3 A a 7 (受託番号
C A B 4 1 4 1 1)、C r y 3 A a 8 (受託番号 A A S 7 9 4 8 7)、C r y 3 A a 9 (30
受託番号 A A W 0 5 6 5 9)、C r y 3 A a 1 0 (受託番号 A A U 2 9 4 1 1)、C r y
3 A a 1 1 (受託番号 A A W 8 2 8 7 2)、C r y 3 A a 1 2 (受託番号 A B Y 4 9 1 3
6)、C r y 3 B a 1 (受託番号 C A A 3 4 9 8 3)、C r y 3 B a 2 (受託番号 C A A
0 0 6 4 5)、C r y 3 B a 3 (受託番号 J Q 3 9 7 3 2 7)、C r y 3 B b 1 (受託番
号 A A A 2 2 3 3 4)、C r y 3 B b 2 (受託番号 A A A 7 4 1 9 8)、C r y 3 B b 3
(受託番号 I 1 5 4 7 5)、C r y 3 C a 1 (受託番号 C A A 4 2 4 6 9)、C r y 4 A
a 1 (受託番号 C A A 6 8 4 8 5)、C r y 4 A a 2 (受託番号 B A A O O 1 7 9)、C
r y 4 A a 3 (受託番号 C A D 3 0 1 4 8)、C r y 4 A a 4 (受託番号 A F B 1 8 3 1
7)、C r y 4 A 様 (受託番号 A A Y 9 6 3 2 1)、C r y 4 B a 1 (受託番号 C A A 3
0 3 1 2)、C r y 4 B a 2 (受託番号 C A A 3 0 1 1 4)、C r y 4 B a 3 (受託番号 40
A A A 2 2 3 3 7)、C r y 4 B a 4 (受託番号 B A A O O 1 7 8)、C r y 4 B a 5 (受託番号
C A D 3 0 0 9 5)、C r y 4 B a 様 (受託番号 A B C 4 7 6 8 6)、C r y 4
C a 1 (受託番号 E U 6 4 6 2 0 2)、C r y 4 C b 1 (受託番号 F J 4 0 3 2 0 8)、
C r y 4 C b 2 (受託番号 F J 5 9 7 6 2 2)、C r y 4 C c 1 (受託番号 F J 4 0 3 2
0 7)、C r y 5 A a 1 (受託番号 A A A 6 7 6 9 4)、C r y 5 A b 1 (受託番号 A A
A 6 7 6 9 3)、C r y 5 A c 1 (受託番号 I 3 4 5 4 3)、C r y 5 A d 1 (受託番号
A B Q 8 2 0 8 7)、C r y 5 B a 1 (受託番号 A A A 6 8 5 9 8)、C r y 5 B a 2 (受託番号
A B W 8 8 9 3 1)、C r y 5 B a 3 (受託番号 A F J 0 4 4 1 7)、C r y 5
C a 1 (受託番号 H M 4 6 1 8 6 9)、C r y 5 C a 2 (受託番号 Z P _ 0 4 1 2 3 4 2
6)、C r y 5 D a 1 (受託番号 H M 4 6 1 8 7 0)、C r y 5 D a 2 (受託番号 Z P _ 50

0 4 1 2 3 9 8 0)、C r y 5 E a 1 (受託番号 H M 4 8 5 5 8 0)、C r y 5 E a 2 (受託番号 Z P _ 0 4 1 2 4 0 3 8)、C r y 6 A a 1 (受託番号 A A A 2 2 3 5 7)、C r y 6 A a 2 (受託番号 A A M 4 6 8 4 9)、C r y 6 A a 3 (受託番号 A B H 0 3 3 7 7)、C r y 6 B a 1 (受託番号 A A A 2 2 3 5 8)、C r y 7 A a 1 (受託番号 A A A 2 2 3 5 1)、C r y 7 A b 1 (受託番号 A A A 2 1 1 2 0)、C r y 7 A b 2 (受託番号 A A A 2 1 1 2 1)、C r y 7 A b 3 (受託番号 A B X 2 4 5 2 2)、C r y 7 A b 4 (受託番号 E U 3 8 0 6 7 8)、C r y 7 A b 5 (受託番号 A B X 7 9 5 5 5)、C r y 7 A b 6 (受託番号 A C I 4 4 0 0 5)、C r y 7 A b 7 (受託番号 A D B 8 9 2 1 6)、C r y 7 A b 8 (受託番号 G U 1 4 5 2 9 9)、C r y 7 A b 9 (受託番号 A D D 9 2 5 7 2)、C r y 7 B a 1 (受託番号 A B B 7 0 8 1 7)、C r y 7 B b 1 (受託番号 K C 1 5 6 6 5 3)、C r y 7 C a 1 (受託番号 A B R 6 7 8 6 3)、C r y 7 C b 1 (受託番号 K C 1 5 6 6 9 8)、C r y 7 D a 1 (受託番号 A C Q 9 9 5 4 7)、C r y 7 D a 2 (受託番号 H M 5 7 2 2 3 6)、C r y 7 D a 3 (受託番号 K C 1 5 6 6 7 9)、C r y 7 E a 1 (受託番号 H M 0 3 5 0 8 6)、C r y 7 E a 2 (受託番号 H M 1 3 2 1 2 4)、C r y 7 E a 3 (受託番号 E E M 1 9 4 0 3)、C r y 7 F a 1 (受託番号 H M 0 3 5 0 8 8)、C r y 7 F a 2 (受託番号 E E M 1 9 0 9 0)、C r y 7 F b 1 (受託番号 H M 5 7 2 2 3 5)、C r y 7 F b 2 (受託番号 K C 1 5 6 6 8 2)、C r y 7 G a 1 (受託番号 H M 5 7 2 2 3 7)、C r y 7 G a 2 (受託番号 K C 1 5 6 6 6 9)、C r y 7 G b 1 (受託番号 K C 1 5 6 6 5 0)、C r y 7 G c 1 (受託番号 K C 1 5 6 6 5 4)、C r y 7 G d 1 (受託番号 K C 1 5 6 6 9 7)、C r y 7 H a 1 (受託番号 K C 1 5 6 6 5 1)、C r y 7 I a 1 (受託番号 K C 1 5 6 6 6 5)、C r y 7 J a 1 (受託番号 K C 1 5 6 6 7 1)、C r y 7 K a 1 (受託番号 K C 1 5 6 6 8 0)、C r y 7 K b 1 (受託番号 B A M 9 9 3 0 6)、C r y 7 L a 1 (受託番号 B A M 9 9 3 0 7)、C r y 8 A a 1 (受託番号 A A A 2 1 1 1 7)、C r y 8 A b 1 (受託番号 E U 0 4 4 8 3 0)、C r y 8 A c 1 (受託番号 K C 1 5 6 6 6 2)、C r y 8 A d 1 (受託番号 K C 1 5 6 6 8 4)、C r y 8 B a 1 (受託番号 A A A 2 1 1 1 8)、C r y 8 B b 1 (受託番号 C A D 5 7 5 4 2)、C r y 8 B c 1 (受託番号 C A D 5 7 5 4 3)、C r y 8 C a 1 (受託番号 A A A 2 1 1 1 9)、C r y 8 C a 2 (受託番号 A A R 9 8 7 8 3)、C r y 8 C a 3 (受託番号 E U 6 2 5 3 4 9)、C r y 8 C a 4 (受託番号 A D B 5 4 8 2 6)、C r y 8 D a 1 (受託番号 B A C 0 7 2 2 6)、C r y 8 D a 2 (受託番号 B D 1 3 3 5 7 4)、C r y 8 D a 3 (受託番号 B D 1 3 3 5 7 5)、C r y 8 D b 1 (受託番号 B A F 9 3 4 8 3)、C r y 8 E a 1 (受託番号 A A Q 7 3 4 7 0)、C r y 8 E a 2 (受託番号 E U 0 4 7 5 9 7)、C r y 8 E a 3 (受託番号 K C 8 5 5 2 1 6)、C r y 8 F a 1 (受託番号 A A T 4 8 6 9 0)、C r y 8 F a 2 (受託番号 H Q 1 7 4 2 0 8)、C r y 8 F a 3 (受託番号 A F H 7 8 1 0 9)、C r y 8 G a 1 (受託番号 A A T 4 6 0 7 3)、C r y 8 G a 2 (受託番号 A B C 4 2 0 4 3)、C r y 8 G a 3 (受託番号 F J 1 9 8 0 7 2)、C r y 8 H a 1 (受託番号 A A W 8 1 0 3 2)、C r y 8 I a 1 (受託番号 E U 3 8 1 0 4 4)、C r y 8 I a 2 (受託番号 G U 0 7 3 3 8 1)、C r y 8 I a 3 (受託番号 H M 0 4 4 6 6 4)、C r y 8 I a 4 (受託番号 K C 1 5 6 6 7 4)、C r y 8 I b 1 (受託番号 G U 3 2 5 7 7 2)、C r y 8 I b 2 (受託番号 K C 1 5 6 6 7 7)、C r y 8 J a 1 (受託番号 E U 6 2 5 3 4 8)、C r y 8 K a 1 (受託番号 F J 4 2 2 5 5 8)、C r y 8 K a 2 (受託番号 A C N 8 7 2 6 2)、C r y 8 K b 1 (受託番号 H M 1 2 3 7 5 8)、C r y 8 K b 2 (受託番号 K C 1 5 6 6 7 5)、C r y 8 L a 1 (受託番号 G U 3 2 5 7 7 1)、C r y 8 M a 1 (受託番号 H M 0 4 4 6 6 5)、C r y 8 M a 2 (受託番号 E E M 8 6 5 5 1)、C r y 8 M a 3 (受託番号 H M 2 1 0 5 7 4)、C r y 8 N a 1 (受託番号 H M 6 4 0 9 3 9)、C r y 8 P a 1 (受託番号 H Q 3 8 8 4 1 5)、C r y 8 Q a 1 (受託番号 H Q 4 4 1 1 6 6)、C r y 8 Q a 2 (受託番号 K C 1 5 2 4 6 8)、C r y 8 R a 1 (受託番号 A F P 8 7 5 4 8)、C r y 8 S a 1 (受託番号 J Q 7 4

10

20

30

40

50

0599)、Cry8Tal(受託番号KC156673)、Cry8様(受託番号FJ
 770571)、Cry8様(受託番号ABS53003)、Cry9Aa1(受託番号
 CAA41122)、Cry9Aa2(受託番号CAA41425)、Cry9Aa3(受託番号
 GQ249293)、Cry9Aa4(受託番号GQ249294)、Cry9
 Aa5(受託番号JX174110)、Cry9Aa様(受託番号AAQ52376)、
 Cry9Ba1(受託番号CAA52927)、Cry9Ba2(受託番号GU2995
 22)、Cry9Bb1(受託番号AAV28716)、Cry9Ca1(受託番号CA
 A85764)、Cry9Ca2(受託番号AAQ52375)、Cry9Da1(受託
 番号BAA19948)、Cry9Da2(受託番号AAB97923)、Cry9Da
 3(受託番号GQ249293)、Cry9Da4(受託番号GQ249297)、Cr
 y9Db1(受託番号AAX78439)、Cry9Dc1(受託番号KC156683
)、Cry9Ea1(受託番号BAA34908)、Cry9Ea2(受託番号AA01
 2908)、Cry9Ea3(受託番号ABM21765)、Cry9Ea4(受託番号
 ACE88267)、Cry9Ea5(受託番号ACF04743)、Cry9Ea6(受託
 番号ACG63872)、Cry9Ea7(受託番号FJ380927)、Cry9
 Ea8(受託番号GQ249292)、Cry9Ea9(受託番号JN651495)、
 Cry9Eb1(受託番号CAC50780)、Cry9Eb2(受託番号GQ2492
 98)、Cry9Eb3(受託番号KC156646)、Cry9Ec1(受託番号AA
 C63366)、Cry9Ed1(受託番号AAX78440)、Cry9Ee1(受託
 番号GQ249296)、Cry9Ee2(受託番号KC156664)、Cry9Fa
 1(受託番号KC156692)、Cry9Gal(受託番号KC156699)、Cr
 y9様(受託番号AAC63366)、Cry10Aa1(受託番号AAA22614)
 、Cry10Aa2(受託番号E00614)、Cry10Aa3(受託番号CAD30
 098)、Cry10Aa4(受託番号AFB18318)、Cry10A様(受託番号
 DQ167578)、Cry11Aa1(受託番号AAA22352)、Cry11Aa
 2(受託番号AAA22611)、Cry11Aa3(受託番号CAD30081)、C
 ry11Aa4(受託番号AFB18319)、Cry11Aa様(受託番号DQ166
 531)、Cry11Ba1(受託番号CAA60504)、Cry11Bb1(受託番
 号AAC97162)、Cry11Bb2(受託番号HM068615)、Cry12A
 a1(受託番号AAA22355)、Cry13Aa1(受託番号AAA22356)、
 Cry14Aa1(受託番号AAA21516)、Cry14Ab1(受託番号KC15
 6652)、Cry15Aa1(受託番号AAA22333)、Cry16Aa1(受託
 番号CAA63860)、Cry17Aa1(受託番号CAA67841)、Cry18
 Aa1(受託番号CAA67506)、Cry18Ba1(受託番号AAF89667)
 、Cry18Ca1(受託番号AAF89668)、Cry19Aa1(受託番号CAA
 68875)、Cry19Ba1(受託番号BAA32397)、Cry19Ca1(受
 託番号AFM37572)、Cry20Aa1(受託番号AAB93476)、Cry2
 0Ba1(受託番号ACS93601)、Cry20Ba2(受託番号KC156694
)、Cry20様(受託番号GQ144333)、Cry21Aa1(受託番号I329
 32)、Cry21Aa2(受託番号I66477)、Cry21Ba1(受託番号BA
 C06484)、Cry21Ca1(受託番号JF521577)、Cry21Ca2(受託
 番号KC156687)、Cry21Da1(受託番号JF521578)、Cry
 22Aa1(受託番号I34547)、Cry22Aa2(受託番号CAD43579)
 、Cry22Aa3(受託番号ACD93211)、Cry22Ab1(受託番号AAK
 50456)、Cry22Ab2(受託番号CAD43577)、Cry22Ba1(受託
 番号CAD43578)、Cry22Bb1(受託番号KC156672)、Cry2
 3Aa1(受託番号AAF76375)、Cry24Aa1(受託番号AAC61891
)、Cry24Ba1(受託番号BAD32657)、Cry24Ca1(受託番号CA
 J43600)、Cry25Aa1(受託番号AAC61892)、Cry26Aa1(受託
 番号AAD25075)、Cry27Aa1(受託番号BAA82796)、Cry

10

20

30

40

50

28Aa1 (受託番号AAD24189)、Cry28Aa2 (受託番号AAG00235)、Cry29Aa1 (受託番号CAC80985)、Cry30Aa1 (受託番号CAC80986)、Cry30Ba1 (受託番号BAD00052)、Cry30Ca1 (受託番号BAD67157)、Cry30Ca2 (受託番号ACU24781)、Cry30Da1 (受託番号EF095955)、Cry30Db1 (受託番号BAE80088)、Cry30Ea1 (受託番号ACC95445)、Cry30Ea2 (受託番号FJ499389)、Cry30Fa1 (受託番号ACI22625)、Cry30Ga1 (受託番号ACG60020)、Cry30Ga2 (受託番号HQ638217)、Cry31Aa1 (受託番号BAB11757)、Cry31Aa2 (受託番号AAL87458)、Cry31Aa3 (受託番号BAE79808)、Cry31Aa4 (受託番号BAF32571)、Cry31Aa5 (受託番号BAF32572)、Cry31Aa6 (受託番号BA144026)、Cry31Ab1 (受託番号BAE79809)、Cry31Ab2 (受託番号BAF32570)、Cry31Ac1 (受託番号BAF34368)、Cry31Ac2 (受託番号AB731600)、Cry31Ad1 (受託番号BA144022)、Cry32Aa1 (受託番号AAG36711)、Cry32Aa2 (受託番号GU063849)、Cry32Ab1 (受託番号GU063850)、Cry32Ba1 (受託番号BAB78601)、Cry32Ca1 (受託番号BAB78602)、Cry32Cb1 (受託番号KC156708)、Cry32Da1 (受託番号BAB78603)、Cry32Ea1 (受託番号GU324274)、Cry32Ea2 (受託番号KC156686)、Cry32Eb1 (受託番号KC156663)、Cry32Fa1 (受託番号KC156656)、Cry32Ga1 (受託番号KC156657)、Cry32Ha1 (受託番号KC156661)、Cry32Hb1 (受託番号KC156666)、Cry32Ia1 (受託番号KC156667)、Cry32Ja1 (受託番号KC156685)、Cry32Ka1 (受託番号KC156688)、Cry32La1 (受託番号KC156689)、Cry32Ma1 (受託番号KC156690)、Cry32Mb1 (受託番号KC156704)、Cry32Na1 (受託番号KC156691)、Cry32Oa1 (受託番号KC156703)、Cry32Pa1 (受託番号KC156705)、Cry32Qa1 (受託番号KC156706)、Cry32Ra1 (受託番号KC156707)、Cry32Sa1 (受託番号KC156709)、Cry32Ta1 (受託番号KC156710)、Cry32Ua1 (受託番号KC156655)、Cry33Aa1 (受託番号AAL26871)、Cry34Aa1 (受託番号AAG50341)、Cry34Aa2 (受託番号AAK64560)、Cry34Aa3 (受託番号AAT29032)、Cry34Aa4 (受託番号AAT29030)、Cry34Ab1 (受託番号AAG41671)、Cry34Ac1 (受託番号AAG50118)、Cry34Ac2 (受託番号AAK64562)、Cry34Ac3 (受託番号AAT29029)、Cry34Ba1 (受託番号AAK64565)、Cry34Ba2 (受託番号AAT29033)、Cry34Ba3 (受託番号AAT29031)、Cry35Aa1 (受託番号AAG50342)、Cry35Aa2 (受託番号AAK64561)、Cry35Aa3 (受託番号AAT29028)、Cry35Aa4 (受託番号AAT29025)、Cry35Ab1 (受託番号AAG41672)、Cry35Ab2 (受託番号AAK64563)、Cry35Ab3 (受託番号AY536891)、Cry35Ac1 (受託番号AAG50117)、Cry35Ba1 (受託番号AAK64566)、Cry35Ba2 (受託番号AAT29027)、Cry35Ba3 (受託番号AAT29026)、Cry36Aa1 (受託番号AAK64558)、Cry37Aa1 (受託番号AAF76376)、Cry38Aa1 (受託番号AAK64559)、Cry39Aa1 (受託番号BAB72016)、Cry40Aa1 (受託番号BAB72018)、Cry40Ba1 (受託番号BAC77648)、Cry40Ca1 (受託番号EU381045)、Cry40Da1 (受託番号ACF15199)、Cry41Aa1 (受託番号BAD35157)、Cry41Ab1 (受託番号BAD35163)、Cry41Ba1 (受託番号HM461871)、Cry

10

20

30

40

50

y 4 1 B a 2 (受託番号 Z P _ _ 0 4 0 9 9 6 5 2)、C r y 4 2 A a 1 (受託番号 B A D 3 5 1 6 6)、C r y 4 3 A a 1 (受託番号 B A D 1 5 3 0 1)、C r y 4 3 A a 2 (受託番号 B A D 9 5 4 7 4)、C r y 4 3 B a 1 (受託番号 B A D 1 5 3 0 3)、C r y 4 3 C a 1 (受託番号 K C 1 5 6 6 7 6)、C r y 4 3 C b 1 (受託番号 K C 1 5 6 6 9 5)、C r y 4 3 C c 1 (受託番号 K C 1 5 6 6 9 6)、C r y 4 3 様 (受託番号 B A D 1 5 3 0 5)、C r y 4 4 A a (受託番号 B A D 0 8 5 3 2)、C r y 4 5 A a (受託番号 B A D 2 2 5 7 7)、C r y 4 6 A a (受託番号 B A C 7 9 0 1 0)、C r y 4 6 A a 2 (受託番号 B A G 6 8 9 0 6)、C r y 4 6 A b (受託番号 B A D 3 5 1 7 0)、C r y 4 7 A a (受託番号 A A Y 2 4 6 9 5)、C r y 4 8 A a (受託番号 C A J 1 8 3 5 1)、C r y 4 8 A a 2 (受託番号 C A J 8 6 5 4 5)、C r y 4 8 A a 3 (受託番号 C A J 8 6 5 4 6)、C r y 4 8 A b (受託番号 C A J 8 6 5 4 8)、C r y 4 8 A b 2 (受託番号 C A J 8 6 5 4 9)、C r y 4 9 A a (受託番号 C A H 5 6 5 4 1)、C r y 4 9 A a 2 (受託番号 C A J 8 6 5 4 1)、C r y 4 9 A a 3 (受託番号 C A J 8 6 5 4 3)、C r y 4 9 A a 4 (受託番号 C A J 8 6 5 4 4)、C r y 4 9 A b 1 (受託番号 C A J 8 6 5 4 2)、C r y 5 0 A a 1 (受託番号 B A E 8 6 9 9 9)、C r y 5 0 B a 1 (受託番号 G U 4 4 6 6 7 5)、C r y 5 0 B a 2 (受託番号 G U 4 4 6 6 7 6)、C r y 5 1 A a 1 (受託番号 A B 1 1 4 4 4 4)、C r y 5 1 A a 2 (受託番号 G U 5 7 0 6 9 7)、C r y 5 2 A a 1 (受託番号 E F 6 1 3 4 8 9)、C r y 5 2 B a 1 (受託番号 F J 3 6 1 7 6 0)、C r y 5 3 A a 1 (受託番号 E F 6 3 3 4 7 6)、C r y 5 3 A b 1 (受託番号 F J 3 6 1 7 5 9)、C r y 5 4 A a 1 (受託番号 A C A 5 2 1 9 4)、C r y 5 4 A a 2 (受託番号 G Q 1 4 0 3 4 9)、C r y 5 4 B a 1 (受託番号 G U 4 4 6 6 7 7)、C r y 5 5 A a 1 (受託番号 A B W 8 8 9 3 2)、C r y 5 4 A b 1 (受託番号 J Q 9 1 6 9 0 8)、C r y 5 5 A a 2 (受託番号 A A E 3 3 5 2 6)、C r y 5 6 A a 1 (受託番号 A C U 5 7 4 9 9)、C r y 5 6 A a 2 (受託番号 G Q 4 8 3 5 1 2)、C r y 5 6 A a 3 (受託番号 J X 0 2 5 5 6 7)、C r y 5 7 A a 1 (受託番号 A N C 8 7 2 6 1)、C r y 5 8 A a 1 (受託番号 A N C 8 7 2 6 0)、C r y 5 9 B a 1 (受託番号 J N 7 9 0 6 4 7)、C r y 5 9 A a 1 (受託番号 A C R 4 3 7 5 8)、C r y 6 0 A a 1 (

受託番号 A C U 2 4 7 8 2)、C r y 6 0 A a 2 (受託番号 E A 0 5 7 2 5 4)、C r y 6 0 A a 3 (受託番号 E E M 9 9 2 7 8)、C r y 6 0 B a 1 (受託番号 G U 8 1 0 8 1 8)、C r y 6 0 B a 2 (受託番号 E A 0 5 7 2 5 3)、C r y 6 0 B a 3 (受託番号 E E M 9 9 2 7 9)、C r y 6 1 A a 1 (受託番号 H M 0 3 5 0 8 7)、C r y 6 1 A a 2 (受託番号 H M 1 3 2 1 2 5)、C r y 6 1 A a 3 (受託番号 E E M 1 9 3 0 8)、C r y 6 2 A a 1 (受託番号 H M 0 5 4 5 0 9)、C r y 6 3 A a 1 (受託番号 B A 1 4 4 0 2 8)、C r y 6 4 A a 1 (受託番号 B A J 0 5 3 9 7)、C r y 6 5 A a 1 (受託番号 H M 4 6 1 8 6 8)、C r y 6 5 A a 2 (受託番号 Z P _ _ 0 4 1 2 3 8 3 8)、C r y 6 6 A a 1 (受託番号 H M 4 8 5 5 8 1)、C r y 6 6 A a 2 (受託番号 Z P _ _ 0 4 0 9 9 9 4 5)、C r y 6 7 A a 1 (受託番号 H M 4 8 5 5 8 2)、C r y 6 7 A a 2 (受託番号 Z P _ _ 0 4 1 4 8 8 8 2)、C r y 6 8 A a 1 (受託番号 H Q 1 1 3 1 1 4)、C r y 6 9 A a 1 (受託番号 H Q 4 0 1 0 0 6)、C r y 6 9 A a 2 (受託番号 J Q 8 2 1 3 8 8)、C r y 6 9 A b 1 (受託番号 J N 2 0 9 9 5 7)、C r y 7 0 A a 1 (受託番号 J N 6 4 6 7 8 1)、C r y 7 0 B a 1 (受託番号 A D 0 5 1 0 7 0)、C r y 7 0 B b 1 (受託番号 E E L 6 7 2 7 6)、C r y 7 1 A a 1 (受託番号 J X 0 2 5 5 6 8)、C r y 7 2 A a 1 (受託番号 J X 0 2 5 5 6 9)、C y t 1 A a (G e n B a n k 受託番号 X 0 3 1 8 2)、C y t 1 A b (G e n B a n k 受託番号 X 9 8 7 9 3)、C y t 1 B (G e n B a n k 受託番号 U 3 7 1 9 6)、C y t 2 A (G e n B a n k 受託番号 Z 1 4 1 4 7)、及び C y t 2 B (G e n B a n k 受託番号 U 5 2 0 4 3) が含まれるが、これらに限定されない。

【 0 3 0 4 】

- エンドトキシンの例としてはまた、米国特許第 5, 880, 275 号、同第 7, 858, 849 号、同第 8, 530, 411 号、同第 8, 575, 433 号、及び同第 8, 686, 233 号の Cry 1 A タンパク質；米国特許第 8, 304, 604 号、同第 8, 304, 605 号、及び同第 8, 476, 226 号の DIG-3 または DIG-11 毒素（Cry 1 A、Cry 3 A などの cry タンパク質の a-ヘリックス 1 及び / または a-ヘリックス 2 の N 末端欠失変異体）；米国特許出願第 10/525, 318 号の Cry 1 B；米国特許第 6, 033, 874 号の Cry 1 C；米国特許第 5, 188, 960 号及び同第 6, 218, 188 号の Cry 1 F；米国特許第 7, 070, 982 号、同第 6, 962, 705 号、及び同第 6, 713, 063 号）の Cry 1 A / F キメラ；米国特許第 7, 064, 249 号）の Cry 2 A b タンパク質などの Cry 2 タンパク質；可変領域の固有の組み合わせ及び少なくとも 2 つの異なる Cry タンパク質の保存されたブロックを融合することによって作出される、操作されたハイブリッド殺虫性タンパク質（eHIP）を含むがこれらに限定されない Cry 3 A タンパク質（米国特許公開第 2010/0017914 号）；Cry 4 タンパク質；Cry 5 タンパク質；Cry 6 タンパク質；米国特許第 7, 329, 736 号、同第 7, 449, 552 号、同第 7, 803, 943 号、同第 7, 476, 781 号、同第 7, 105, 332 号、同第 7, 378, 499 号、及び同第 7, 462, 760 号の Cry 8 タンパク質；米国特許第 8, 802, 933 号の Cry 9 D タンパク質及び米国特許第 8, 802, 934 号の Cry 9 B タンパク質を含むがこれらに限定されない、Cry 9 A、Cry 9 B、Cry 9 C、Cry 9 D、Cry 9 E、及び Cry 9 F ファミリーのメンバーなどの Cry 9 タンパク質；Naimov, et al., (2008), "Applied and Environmental Microbiology," 74: 7145 - 7151 の Cry 15 タンパク質；米国特許第 6, 127, 180 号、同第 6, 624, 145 号、及び同第 6, 340, 593 号の Cry 22、Cry 34 A b 1 タンパク質；米国特許第 6, 248, 535 号、同第 6, 326, 351 号、同第 6, 399, 330 号、同第 6, 949, 626 号、同第 7, 385, 107 号、及び同第 7, 504, 229 号の Cry ET 33 及び cry ET 34 タンパク質；米国特許公開第 2006/0191034 号、同第 2012/0278954 号、及び PCT 公開第 WO 2012/139004 号の Cry ET 33 及び Cry ET 34 ホモログ；米国特許第 6, 083, 499 号、同第 6, 548, 291 号、及び同第 6, 340, 593 号の Cry 35 A b 1 タンパク質；Cry 46 タンパク質、Cry 51 タンパク質、Cry 二成分毒素；TIC 901 または関連する毒素；米国特許出願公開第 2008/0295207 号の TIC 807；PCT US 2006/033867 の ET 29、ET 37、TIC 809、TIC 810、TIC 812、TIC 127、TIC 128；米国特許第 8, 513, 494 号の TIC 853 毒素、米国特許第 8, 236, 757 号の AXMI-027、AXMI-036、及び AXMI-038；米国特許第 7, 923, 602 号の AXMI-031、AXMI-039、AXMI-040、AXMI-049；WO 2006/083891 の AXMI-018、AXMI-020、及び AXMI-021；WO 2005/038032 の AXMI-010；WO 2005/021585 の AXMI-003；米国特許出願公開第 2004/0250311 号の AXMI-008；米国特許出願公開第 2004/0216186 号の AXMI-006；米国特許出願公開第 2004/0210965 号の AXMI-007；米国特許出願第 2004/0210964 号の AXMI-009；米国特許出願公開第 2004/0197917 号の AXMI-014；米国特許出願公開第 2004/0197916 号の AXMI-004；WO 2006/119457 号の AXMI-028 及び AXMI-029；WO 2004/074462 号の AXMI-007、AXMI-008、AXMI-0080rf2、AXMI-009、AXMI-014、及び AXMI-004；米国特許第 8, 084, 416 号の AXMI-150；米国特許出願公開第 2011/0023184 号の AXMI-205；米国特許出願公開第 2011/0263488 号の AXMI-011、AXMI-012、AXMI-013、AXMI-015、AXMI-019、AXMI-044、AXMI-037、AXMI-043、AXMI-033

10

20

30

40

50

、AXMI-034、AXMI-022、AXMI-023、AXMI-041、AXMI-063、及びAXMI-064；米国特許出願公開第2010/0197592号のAXMI-R1及び関連するタンパク質；WO2011/103248号のAXMI221Z、AXMI222z、AXMI223z、AXMI224z、及びAXMI225z；WO2011/103247及び米国特許第8,759,619号のAXMI218、AXMI219、AXMI220、AXMI226、AXMI227、AXMI228、AXMI229、AXMI230、及びAXMI231；米国特許第8,334,431号のAXMI-115、AXMI-113、AXMI-005、AXMI-163、及びAXMI-184；米国特許出願公開第2010/0298211号のAXMI-001、AXMI-002、AXMI-030、AXMI-035、及びAXMI-045；米国特許出願公開第2009/0144852号のAXMI-066及びAXMI-076；米国特許第8,318,900号のAXMI128、AXMI130、AXMI131、AXMI133、AXMI140、AXMI141、AXMI142、AXMI143、AXMI144、AXMI146、AXMI148、AXMI149、AXMI152、AXMI153、AXMI154、AXMI155、AXMI156、AXMI157、AXMI158、AXMI162、AXMI165、AXMI166、AXMI167、AXMI168、AXMI169、AXMI170、AXMI171、AXMI172、AXMI173、AXMI174、AXMI175、AXMI176、AXMI177、AXMI178、AXMI179、AXMI180、AXMI181、AXMI182、AXMI185、AXMI186、AXMI187、AXMI188、AXMI189；米国特許出願公開第2010/0005543号のAXMI079、AXMI080、AXMI081、AXMI082、AXMI091、AXMI092、AXMI096、AXMI097、AXMI098、AXMI099、AXMI100、AXMI101、AXMI102、AXMI103、AXMI104、AXMI107、AXMI108、AXMI109、AXMI110、AXMI111、AXMI112、AXMI114、AXMI116、AXMI117、AXMI118、AXMI119、AXMI120、AXMI121、AXMI122、AXMI123、AXMI124、AXMI1257、AXMI1268、AXMI127、AXMI129、AXMI164、AXMI151、AXMI161、AXMI183、AXMI132、AXMI138、AXMI137、米国特許出願公開第US20140223598号のAXMI270、米国特許出願公開第US20140223599号のAXMI279、米国特許第8,319,019号の修飾されたタンパク質分解部位を有するCry1A及びCry3Aなどのcryタンパク質；米国特許出願公開第2011/0064710号のBacillus thuringiensis 菌株VBTS 2528由来のCry1Ac、Cry2Aa、及びCry1Ca毒素タンパク質が挙げられるが、これらに限定されない。他のCryタンパク質は、当業者に周知である。N. Crickmore, et al., "Revision of the Nomenclature for the Bacillus thuringiensis Pesticidal Crystal Proteins," Microbiology and Molecular Biology Reviews, (1998) Vol 62: 807-813を参照のこと。また、www.btnomenclature.info/にて、N. Crickmore, et al., "Bacillus thuringiensis toxin nomenclature" (2016)も参照のこと。

【0305】

トランスジェニック植物形質としてのCryタンパク質の使用は、当業者に周知であり、Cry1Ac、Cry1Ac+Cry2Ab、Cry1Ab、Cry1A.105、Cry1F、Cry1Fa2、Cry1F+Cry1Ac、Cry2Ab、Cry3A、mCry3A、Cry3Bb1、Cry34Ab1、Cry35Ab1、Vip3A、mCry3A、Cry9c、及びCBI-Btを発現する植物を含むがこれらに限定されないCryトランスジェニック植物が、規制当局の承認を受けている。Sanahuja e

t al., "Bacillus thuringiensis: a century of research, development and commercial applications," (2011) Plant Biotech Journal, April 9 (3): 283-300、及び cera-gmc.org/index.php?action=gm_crop_databaseにて、the CERA (2010) GM Crop Database Center for Environmental Risk Assessment (CERA), ILSI Research Foundation, Washington D.C. (これは「www」のプレフィックスを使用してワールドワイドウェブでアクセスすることができる)を参照のこと。また、Vip3Ab及びCry1Fa (US 2012/0317682)、Cry1B E及びCry1F (US 2012/0311746)、Cry1CA及びCry1AB (US 2012/0311745)、Cry1F及びCryCa (US 2012/0317681)、Cry1DA及びCry1BE (US 2012/0331590)、Cry1DA及びCry1Fa (US 2012/0331589)、Cry1AB及びCry1BE (US 2012/0324606)、Cry1Fa及びCry2AaならびにCry1I及びCry1E (US 2012/0324605)、Cry34Ab/35Ab及びCry6Aa (US 20130167269)、Cry34Ab/VCry35Ab及びCry3Aa (US 20130167268)、Cry1Ab及びCry1F (US 20140182018)、ならびにCry3A及びCry1AbまたはVip3Aa (US 20130116170)などの、当業者に周知の1つよりも多くの殺有害生物性タンパク質を植物において発現させることができる。殺有害生物性タンパク質にはまた、米国特許第7,491,869号の脂質アシルヒドロラーゼを含む殺虫性リパーゼ、及びStreptomyces由来のものなどのコレステロールオキシダーゼ (Purcell et al. (1993) Biochem Biophys Res Commun 15:1406-1413)が含まれる。

【0306】

殺有害生物性タンパク質にはまた、VIP (植物性殺虫性タンパク質) 毒素も含まれる。昆虫病原性細菌は、封入体または副胞子結晶に蓄積する殺虫性タンパク質 (前述のCry及びCytタンパク質など)、ならびに培地中に分泌される殺虫性タンパク質を産生する。後者の中には、Vipタンパク質があり、これは、それらのアミノ酸同一性に従って4つのファミリーに類別される。Vip1及びVip2タンパク質は、二成分毒素として作用し、鞘翅目及び半翅目の一部のメンバーに対して毒性である。Vip1構成成分は、昆虫中腸の膜における受容体に結合すると考えられ、Vip2構成成分は細胞に進入し、細胞内でアクチンに対してそのADP-リボシルトランスフェラーゼ活性を示すことにより、微小線維形成を阻止する。Vip3は、Vip1またはVip2との配列類似性を何ら有せず、鱗翅目の多種多様なメンバーに対して毒性である。その作用機序は、タンパク質分解活性化、中腸上皮膜への結合、及び孔形成の点でCryタンパク質のそれに類似することが示されているが、Vip3Aタンパク質は、Cryタンパク質と結合部位を共有しない。後者の特性により、それらは、トランスジェニック植物 (Bacillus thuringiensis 処理作物 [Bt作物]) においてCryタンパク質と組み合わせて、昆虫耐性を阻止または遅延させると共に殺虫スペクトルを広げるための良好な候補となっている。Cryタンパク質と組み合わせてVip3Aaタンパク質を発現する、商業的に栽培されるBt綿及びBtメイズの品種が存在する。ごく最近報告されたVip4ファミリーについては、標的昆虫は未だ見出されていない。Chakroun et al., "Bacterial Vegetative Insecticidal Proteins (Vip) from Entomopathogenic Bacteria," Microbiol Mol Biol Rev. 2016 Mar 2; 80 (2): 329-50を参照のこと。VIPについては、米国特許第5,877,012号、同第6,107,279号、同第6,137,033号、同第7,244,820号、同第7,615,686号、及び同第8,237,020号などに見出すことができる。

他のVIPタンパク質は、当業者に周知である (lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/vip.htmlを参照されたく、これは「www」のプレフィックスを使用してワールドワイドウェブでアクセスすることができる)。

【0307】

殺有害生物性タンパク質にはまた、*Xenorhabdus*、*Photorhabdus*、及び*Paenibacillus*などの生物から得ることが可能な毒素複合体(TC)タンパク質も含まれる(米国特許第7,491,698号及び同第8,084,418号を参照のこと)。「独立型の」殺虫性活性を有するTCタンパク質もあれば、同じ所与の生物によって産生される独立型の毒素の活性を強化するTCタンパク質もある。「独立型の」TCタンパク質(例えば、*Photorhabdus*、*Xenorhabdus*または*Paenibacillus*由来)の毒性は、異なる属の供給源生物に由来する1つ以上のTCタンパク質「増強物質」によって強化され得る。3つの主要なタイプのTCタンパク質が存在する。本明細書で言及される場合、クラスAタンパク質(「タンパク質A」)は、独立型の毒素である。クラスBタンパク質(「タンパク質B」)及びクラスCタンパク質(「タンパク質C」)は、クラスAタンパク質の毒性を強化する。クラスAタンパク質の例は、TcbA、TcdA、XptA1、及びXptA2である。クラスBタンパク質の例は、TcaC、TcdB、XptB1Xb、及びXptC1Wiである。クラスCタンパク質の例は、TccC、XptC1Xb、及びXptB1Wiである。殺有害生物性タンパク質にはまた、クモ、ヘビ、及びサソリ毒タンパク質も含まれる。クモ毒ペプチドの例としては、リコトキシン-1ペプチド及びその突然変異体(米国特許第8,334,366号)が挙げられるが、これらに限定されない。

10

20

【0308】

一部の現在登録済みのPIPが、表11に列挙される。トランスジェニック植物はまた、昆虫遺伝子に指向されるdsRNAを発現するように導入操作されている(Baum, J. A. et al. (2007) Control of coleopteran insect pests through RNA interference. *Nature Biotechnology* 25:1322-1326、Mao, Y. B. et al. (2007) Silencing a cotton bollworm P450 monooxygenase gene by plant-mediated RNAi impairs larval tolerance of gossypol. *Nature Biotechnology* 25:1307-1313)。有害生物がトランスジェニック植物を摂食することによって、有害生物においてRNA干渉を誘発することができる。故に、有害生物の摂食は、その有害生物の損傷または死を引き起こす。

30

40

50

【表 1 1 - 1】

表 1 1. 本開示の微生物と組み合わせることができる例示的な植物導入保護剤のリスト

植物導入保護剤(PIP)	企業名及び商標名	農薬登録番号
ジャガイモ	ジャガイモ	
Cry3A ジャガイモ PC コード 006432	Naturemark New Leaf Monsanto	524-474
Cry3A 及び PLRV ジャガイモ PC コード 006432、006469	Monsanto New Leaf Plus	524-498
トウモロコシ		
Cry1Ab トウモロコシ イベント 176 PC コード 006458	Mycogen Seeds/Dow Agro Syngenta Seeds	68467-1 66736-1
Cry1Ab トウモロコシ イベント Bt11 EPA PC コ ード 006444 OECD 固有識別子 SYN- BTØ11-1、	Agrisure CB(Yieldgard と共 に) AttributeInsect Protected Sweet Corn Syngenta Seeds	67979-1 65268-1
Cry1Ab トウモロコシ イベント MON 801	Monsanto	524-492
Cry1Ab トウモロコシ イベント MON 810 PC コ ード 006430 OECD 固有識別子 MON-ØØ81Ø-6	Monsanto	524-489
Cry1Ac トウモロコシ PC コード 006463	Dekalb Genetics c/o Monsanto BT-XTRA	69575-2
Cry1F トウモロコシ イベント TC1507 PC コード 006481 OECD 固有識別子 DAS-Ø15Ø7-1	Mycogen Seeds/Dow Agro Pioneer Hi- Bred/Dupont	68467-2 29964-3

10

20

30

40

50

【表 1 1 - 2】

植物導入保護剤(PIP)	企業名及び商標名	農薬登録番号
moCry1F トウモロコシ イベント DAS-06275-8 PC コード 006491 OECD 固有識別子 DAS- 06275-8	Mycogen Seeds/Dow Agro	68467-4
Cry9C トウモロコシ	Aventis StarLink	264-669
Cry3Bb1 トウモロコシ イベント MON863 PC コ ード 006484 OECD 固有識別子 MON-00863-5	Monsanto YieldGard RW	524-528
Cry3Bb1 トウモロコシ イベント MON 88017 PC コード 006498 OECD 固有識別子 MON-88017-3	Monsanto YieldGard VT Rootworm	524-551
Cry34Ab1/Cry35Ab1 トウモロコシ イベント DAS-591227-7 PC コード 006490 OECD 固有識別子 DAS-59122-7	Mycogen Seeds/Dow Agro Pioneer Hi- Bred/Dupont Herculex Rootworm	68467-5 29964-4
Cry34Ab1/Cry35Ab1 及び Cry1F トウモロコシ イベント 4114 PC コード 006555、006556	Pioneer Hi- Bred/Dupont	29964-17
mCry3A トウモロコシ イベント MIR 604 PC コード 006509 OECD 固有識別子 SYN- IR604-8	Syngenta Seeds Agrisure RW	67979-5
Cry1A.105 及び Cry2Ab2 トウモロコシ イベント MON 89034 PC コード 006515 及び 006514	Monsanto Genuity VT Double Pro	524-575
Vip3Aa20 トウモロコシ イベント MIR 162 PC コード 006599 OECD 固有識別子 SYN- IR162-4	Syngenta Seeds Agrisure Viptera	67979-14
イベント 5307 の eCry3.1Ab トウモロコシ PC コ ード 016483 OECD 固有識別子 SYN- 厩 53 厩 7-1 スタックドイベント及び種子ブレンドトウモロ コシ	Syngenta	67979-22
Cry3Bb1+Cry1Ab を有する MON863×MON810	Monsanto YieldGard Plus	524-545
Cry34Ab1/Cry35Ab1+Cry1F を有する DAS- 59122-7×TC1507	Mycogen Seeds/Dow Agro Pioneer Hi- Bred/Dupont Herculex Xtra	68467-6 29964-5
Cry1AB+Cry3Bb を有する MON 88017×MON 810	Monsanto YieldGard VT Triple YieldGard VT Plus	524-552
mCry3A+Cry1Ab を有する MIR 604×Bt11	Syngenta Agrisure CB/RW Agrisure 3000GT	67979-8

10

20

30

40

50

【表 1 1 - 3】

植物導入保護剤(PIP)	企業名及び商標名	農薬登録番号	
Cry1A.105+Cry2Ab2+Cry3Bb1 を有する Mon 89034×Mon 88017	Monsanto Genuity VT Triple PRO	524-576	
Cry1Ab+Vip3Aa 20 を有する Bt11×MIR 162	Syngenta Seeds Agrisure 2100	67979-12	
Cry1Ab+Vip3Aa20+mCry3A を有する Bt11×MIR 162×MIR 604	Syngenta Seeds Agrisure 3100	67979-13	
Cry1A.105+Cry2Ab2+Cry1F+Cry3Bb1+Cry34Ab1/Cry35Ab1 を有する MON 89034×TC1507×MON 88017×DAS-59122-7	Monsanto Company Mycogen Seeds/Dow Agro Genuity SmartStax SmartStax	524-581 68467-7	10
MON 89034×TC1507×MON 88017×DAS-59122-7 種子ブレンド	Monsanto Company Mycogen Seeds/Dow Agro Genuity SmartStax RIB Complete SmartStax Refuge Advanced ; Refuge Advanced Powered by SmartStax	524-595 68467-16	20
Herculex Xtra+Herculex I の種子ブレンド	Pioneer Hi- Bred/Dupont Optimum AcreMax1 Insect Protection	29964-6	20
Herculex RW+非 Bt トウモロコシの種子ブレンド	Pioneer Hi- Bred/Dupont Optimum AcreMax RW	29964-10	
(Cry1F×Cry34/35×Cry1Ab)-種子ブレンド	Pioneer Hi- Bred/Dupont Optimum AcreMax Xtra	29964-11	
(Cry1F×Cry1Ab)-種子ブレンド	Pioneer Hi- Bred/Dupont Optimum AcreMax Insect Protection	29964-12	30
(Cry1F×mCry3A)	Pioneer Hi- Bred/Dupont Optimum Trisect	29964-13	
(Cry1F×Cry34/35×Cry1Ab×mCry3A)	Pioneer Hi- Bred/Dupont Optimum Intrasect Xtreme	29964-14	
59122×MON 810×MIR 604(Cry34/35×Cry1Ab×mCry3A)	Pioneer Hi- Bred/Dupont	29964-15	40

【表 1 1 - 4】

植物導入保護剤(PIP)	企業名及び商標名	農薬登録番号
Optimum AcreMax Xtreme (Cry1F×Cry34/35×Cry1Ab×mCry3A)-種子ブレン ド	Pioneer Hi- Bred/Dupont Optimum AcreMax Xtreme (種子ブレン ド)	29964-16
MON 810×MIR 604(Cry1Ab×mCry3A)	Pioneer Hi- Bred/Dupont	29964-18
1507×MON810×MIR 162(Cry1F×Cry1Ab×Vip 3Aa20)	Pioneer Hi- Bred/Dupont Optimum Intrasect Leptra	29964-19
1507×MIR 162(Cry1F×Vip30Aa20)	Pioneer Hi- Bred/Dupont	29964-20
4114×MON 810×MIR 604(Cry34/35×Cry1F×Cry1Ab×mCry3A)-種子ブ レンド	Pioneer Hi- Bred/Dupont	29964-21
4114×MON 810×MIR 604(Cry34/35×Cry1F×Cry1Ab×mCry3A)	Pioneer Hi- Bred/Dupont	29964-22
1507×MON810×MIR 604(Cry1F×Cry1Ab×mCry3A)-種子ブレン ド	Pioneer Hi- Bred/Dupont Optimum AcreMax Trisect	29964-23
1507×MON810×MIR 604(Cry1F×Cry1Ab×mCry3A)	Pioneer Hi- Bred/Dupont Optimum Intrasect Trisect	29964-24
4114×MON 810(Cry34/35×Cry1F×Cry1Ab)	Pioneer Hi- Bred/Dupont	29964-25
1507×MON810×MIR 162(Cry1F×Cry1Ab×Vip 3Aa20)-種子ブレン ド	Pioneer Hi- Bred/Dupont Optimum AcreMax Leptra	29964-26
SmartStax Intermediates(8 製品)	Monsanto	524-583、 524-584、 524-586、 524-587、 524-588、 524-589、 524-590
MON 89034×1507(Cry1A.105×Cry2Ab2×Cry1F)	Monsanto Genuity PowerCore	524-585
MON 89034(Cry1A.105×Cry2Ab2)-種子ブレン ド	Monsanto Genuity VT Double PRO RIB Complete	524-597
MON 89034×88017 RIB Complete (Cry1A.105×Cry2Ab2×Cry3Bb1)-種子ブレン ド	Monsanto Genuity VT Triple PRO RIB Complete	524-606

10

20

30

40

50

【表 1 1 - 5】

植物導入保護剤(PIP)	企業名及び商標名	農薬登録番号
MON 89034×1507(Cry1A.105×Cry2Ab2×Cry1F)- 種子ブレンド	Monsanto Genuity PowerCore RIB Complete	524-612
Bt11×MIR162×1507(Cry1Ab×Vip3Aa20×Cry1F)	Syngenta Seeds Agrisure Viptera 3220 Refuge Renew	67979-15
Bt11×59122-7×MIR 604×1507(Cry1Ab×Cry34/35×mCry3A×Cry1F)	Syngenta Seeds Agrisure 3122	67979-17
Bt11×MIR162×TC1507(Cry1Ab×Vip3Aa20×Cry1 F)-種子ブレンド	Syngenta Seeds Agrisure Viptera 3220(E-Z Refuge)(Refuge Advanced)	67979-19
Bt11×DAS 59122- 7×MIR604×TC1507(Cry1Ab×Cry34/35×mCry3A ×Cry1F)-種子ブレンド	Syngenta Seeds Agrisure Viptera 3122(E-Z Refuge)(Refuge Advanced)	67979-20
Bt11×MIR 162×MIR 604×TC1507×5307(Cry1Ab×Vip3Aa20×mCry3A ×Cry1F×eCry3.1Ab)	Syngenta Seeds Agrisure Duracade(Refuge Renew)5222	67979-23
Bt11×MIR 604×TC1507×5307(Cry1Ab×mCry3A×Cry1F×eCr y3.1Ab)	Syngenta Seeds Agrisure Duracade(Refuge Renew)5122	67979-24
Bt11×MIR 604×TC1507×5307(Cry1Ab×mCry3A×Cry1F×eCr y3.1Ab)-種子ブレンド	Syngenta Seeds Agrisure Duracade 5122 EZ Refuge	67979-25
Bt11×MIR 162×MIR 604×TC1507×5307(Cry1Ab×Vip3Aa20×mCry3A ×Cry1F×eCry3.1Ab)-種子ブレンド	Syngenta Seeds Agrisure Duracade 5222 E-Z Refuge	67979-26
Bt11×MIR 162×MIR 604×TC1507×5307(Cry1Ab×Vip3Aa20×mCry3A ×Cry1F×eCry3.1Ab)	Syngenta Seeds Agrisure Duracade(Refuge Renew)5022	67979-27
MIR604×DAS-59122- 7×TC1507(mCry3A×Cry34/35×Cry1F)	Syngenta Seeds	67979-29
SmartStax Intermediates(8 製品)	Mycogen Seeds/Dow Agro	68467-8、 68467-9、 68467-10、 68467-11、 68467-13、 68467-14、 68467-15

10

20

30

40

50

【表 1 1 - 6】

植物導入保護剤(PIP)	企業名及び商標名	農薬登録番号
MON 89034×1507(Cry1A.105×Cry2Ab2×Cry1F)	Mycogen Seeds/Dow Agro PowerCore;PowerC ore Enlist	68467-12
MON 89034×1507(Cry1A.105×Cry2Ab2×Cry1F)- 種子ブレンド	Mycogen Seeds/Dow Agro PowerCore Refuge Advanced;Refuge Advanced Powered by PowerCore	68467-21
1507×MON 810	Pioneer Hi- Bred/Dupont Optimum Intrasect	29964-7
59122×1507×MON 810	Pioneer Hi- Bred/Dupont	29964-8
59122×MON 810	Pioneer Hi- Bred/Dupont	29964-9
綿		
Cry1Ac 綿	Monsanto BollGard	524-478
イベント 15985 における Cry1Ac 及び Cry2Ab2 綿 PC コード 006445、006487	Monsanto BollGard II	524-522
Cry1Ac を有する Bt 綿 イベント MON531(育種圃 場使用のみ)	Monsanto	524-555
Cry2Ab2 を有する Bt 綿 イベント MON15947(育 種圃場使用のみ)	Monsanto	524-556
COT102 x MON 15985 (Vip3Aa19 x Cry1Ac x Cry2Ab2)	Monsanto Bollgard III	524-613
Cry1F 及び Cry1Ac(イベント DAS-21023- 5×DAS-24236-5) 綿 PC コード 006512、006513	Mycogen Seeds/Dow Agro Widestrike	68467-3
イベント 3006-210-23(Cry1Ac)	Mycogen Seeds/Dow Agro	68467-17
イベント 281-24-236(Cry1F)	Mycogen Seeds/Dow Agro	68467-18
WideStrike×COT102(Cry1F×Cry1Ac×Vip3Aa19)	Mycogen Seeds/Dow Agro WideStrike 3	68467-19
Vip3Aa19 及び FLCry1Ab(イベント Cot102×Cot67B) 綿 PC コード 016484、016486 OECD 固有識別子 SYN-IR102-7×SYN-IR67B-1	Syngenta Seeds (正式には VipCot)	67979-9
COT102(Vip3Aa19)	Syngenta Seeds	67979-18
COT67B(FLCry1Ab)	Syngenta Seeds	67979-21
T304-40(Cry1Ab)	Bayer CropScience	264-1094
GHB119(Cry2Ae)	Bayer CropScience	264-1095

10

20

30

40

50

【表 1 1 - 7】

植物導入保護剤(PIP)	企業名及び商標名	農薬登録番号
T304-40×GHB119(Cry1Ab×Cry2Ae) OECD 固有識別子: BCS-GH004-7×BCS-GH005-8	Bayer CropScience TwinLink	264-1096
ダイズ		
イベント 87701 における Cry1Ac ダイズ PC コード 006532 OECD 固有識別子	Monsanto Inacta	524-594
イベント 87751 における Cry1A.105 及び Cry2Ab2 ダイズ PC コード 006614、006615 OECD 固有識別子 MON-87751-7	Monsanto	524-619
イベント DAS 81419 における Cry1Ac×Cry1F ダイズ PC コード 006527、006528 OECD 固有識別子 DAS 81419(Cry1Ac×Cry1F)	Mycogen Seeds/Dow Agro	68467-20

10

【0309】

いくつかの実施形態では、本明細書に述べられる農薬のうちのいずれか1つ以上が、本開示の微生物のうちのいずれか1つ以上と共に利用されてもよく、種子を含めた植物またはその部位に施用され得る。

20

【0310】

除草剤

前述のように、本明細書で教示される任意の微生物を含み得る、本開示の農業組成物は、1つ以上の除草剤と組み合わせられることがある。

【0311】

本明細書に記載の方法により生産される及び/または本明細書に記載されるような特性を有する細菌または細菌集団を含む組成物は、1つ以上の除草剤をさらに含んでもよい。いくつかの実施形態では、除草組成物が、植物及び/または植物部位に施用される。いくつかの実施形態では、除草組成物が、本明細書に述べられる組成物に含まれてもよく、他の化合物と同時にまたは連続して、植物(複数可)またはその部位(複数可)に施用され得る。

30

【0312】

除草剤には、2, 4-D、2, 4-DB、アセトクロール、アシフルオルフェン、アラクロール、アメトリン、アトラジン、アミノピラリド、ベネフィン、ペンシルフロン、ペンシド、ペンタゾン、ビシクロピロン、プロマシル、プロモキシニル、ブチラート、カルフェントラゾン、クロリムロン、クロルスルフロン、クレトジム、クロマゾン、クロピラリド、クロランスラム、シクロエート、DCPA、デスメディファム、ジカンバ、ジクロベニル、ジクロホップ、ジクロスラム、ジフルフェンゾピル、ジメテナミド、ジクワット、ジウロン、DSMA、エンドタール、EPTC、エタルフルラリン、エトフメサート、フェノキサプロップ、フルアジホップ-P、フルカルバゾン、フルフェナセット、フルメツラム、フルミクロラック、フルミオキサジン、フルオメツロン、フルロキシピル、ホメサフェン、ホラムスルフロン、グルホシネート、グリホサート、ハロスルフロン、ヘキサジノン、イマザメタベンズ、イマザモックス、イマザピック、イマザキン、イマゼタピル、イソキサフルトール、ラクトフェン、リニユロン、MCPA、MCPB、メソトリオン、メトラクロール-s、メトリブジン、インダジフラム、メトスルフロン、モリネート、MSMA、ナプロパミド、ナプタラム、ニコスルフロン、ノルフルラゾン、オリザリン、オキサジアゾン、オキシフルオルフェン、パラコート、ペラルゴン酸、ペンディメタリン、フェンメジファム、ピクロラム、プリミスルフロン、プロジアミン、プロメトリン、プロナミド、プロパニル、プロスルフロン、ピラゾン、ピリチオバック(pyri-thio

40

50

a c)、キンクロラック、キザロホップ、リムスルフロン、S - メトラクロル、セトキシジム、シデュロン、シマジン、スルフェントラゾン、スルホメツロン、スルホスルフロン、テブチウロン、テンボトリオン、ターバシル、チアゾピル、チフェンスルフロン、チオベンカルブ、トブラメゾン、トラルコキシジム、トリアレート、トリアスルフロン、トリベヌロン、トリクロピル、トリフルラリン、及びトリフルスルフロンが含まれる。

【0313】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の除草剤のいずれか1つ以上を、本明細書に記載の植物またはその一部のいずれか1つ以上とともに利用することができる。

【0314】

除草製品には、CORVUS、BALANCE FLEXX、CAPRENO、DIFLEXX、LIBERTY、LAUDIS、AUTUMN SUPER、及びDIFLEXX DUOが含まれてもよい。

10

【0315】

いくつかの実施形態では、下記の表12に述べられる除草剤のうちのいずれか1つ以上が、本明細書で教示される微生物のうちのいずれか1つ以上と共に利用されてもよく、本明細書に述べられる植物またはその部位のうちのいずれか1つ以上に施用され得る。

【表12 - 1】

表12. 本開示の微生物と組み合わせることができる例示的な除草剤のリスト

作用部位	除草剤群 番号	化学物質ファミリー	除草剤
ACCase 阻害剤	1	シクロヘキサジオン	セトキシジム(Poast、Poast Plus)クレトジム(Select、Select Max、Arrow)
		アリーールオキシフェノキシプロピオネート	フルアジホップ(Fusilade DX、Fusionの構成成分)フェノキサプロップ(Puma、Fusionの構成成分)キザロホップ(Assure II、Targa)
		フェニルピラゾリン	ピノキサデン(Axial XL)

20

30

40

50

【表 1 2 - 2】

作用部位	除草剤群 番号	化学物質ファミリー	除草剤		
ALS 阻害剤	2	イミダゾリノン	イマゼタピル(Pursuit) イマザモックス (Raptor)	10	
		スルホニル尿素	クロリムロン(Classic) ハロスルフロン (Permit、Sanda)ヨー ドスルフロン(Autumn Super の構成成分)メソ スルフロン(Osprey)ニ コスルフロン(Accent Q)プリミスルフロン (Beacon)プロスルフロ ン(Peak)リムスルフロ ン(Matrix、Resolve)チ フェンスルフロン (Harmony)トリベスロ ン(Express)トリフルス ルフロン(UpBeet)		20
		トリアゾロピリミジン	フルメツラム(Python) クロランスラムメチル (FirstRate)ピロキシス ラム(PowerFlex HL)フ ロラスラム(Quelex の 構成成分)		30
		スルホニルアミノカルボニル トリアゾリノン	プロボキシカルバゾン (Olympus)チエンカル バゾンメチル(Capreno の構成成分)		
微小管阻害剤 (根阻害剤)	3	ジニトロアニリン	トリフルラリン(多くの 名称)エタルフルラリン (Sonalan)ペンディメタ リン(Prowl/Prowl H ₂ O)	40	
		ベンズアミド	プロナミド(Kerb)		
合成オーキシシ	4	アリアルピコリネート	ハラウキシフェン (Elevore、Quelex の構 成成分)	40	

【表 1 2 - 3】

作用部位	除草剤群 番号	化学物質ファミリー	除草剤	
		フェノキシ酢酸	2,4-D(Enlist One、その他)2,4-DB(Butyrac 200、Butoxone 200)MCPA	
		安息香酸	ジカンバ(Banvel、Clarity、DiFlexx、Engenia、XtendiMax ; Status の構成成分)	10
		ピリジン	クロピラリド(Stinger)フルロキシピル (Starane Ultra)	
光化学系 II 阻害 剤	5	トリアジン	アトラジンシマジン (Princep、Sim-Trol)	
		トリアジノン	メトリブジン(メトリブジン、その他)ヘキサジノン(Velpar)	20
		フェニルカルバメート	デスメディファム (Betenex)フェンメディファム(Betamix の構成成分)	
	6	ウラシル ベンゾチアジアゾール	ターバシル(Sinbar)ベンタゾン(Basagran、その他)	
		ニトリル	プロモキシニル (Buctril、Moxy、その他)	30
	7	フェニル尿素	リニュロン(Lorox、Linex)	
脂質合成阻害剤	8	チオカルバメート	EPTC(Eptam)	
EPSPS 阻害剤	9	有機リン系	グリホサート	
グルタミン合成 酵素阻害剤	10	有機リン系	グルホシネート (Liberty、Rely)	
ジテルペン生合 成阻害剤(白化)	13	イソオキサゾリジノン	クロマゾン(Command)	40

【表 1 2 - 4】

作用部位	除草剤群 番号	化学物質ファミリー	除草剤	
プロトポルフィ リノーゲンオキ シダーゼ阻害剤 (PPO)	14	ジフェニルエーテル	アシフルオルフェン (Ultra Blazer)ホメサフ エン(Flexstar、Reflex) ラクトフェン(Cobra、 Phoenix)	
		N-フェニルフタルイミド	フルミクロラック (Resource)フルミオキ サジン(Valor、Valor EZ、Rowel)	10
		アリールトリアゾリノン	スルフェントラゾン (Authority、Spartan)カ ルフェントラゾン (Aim)フルチアセット メチル(Cadet)	
		ピラゾール	ピラフルフェンエチル (Vida)	
		ピリミジンジオン	サフルフェナシル (Sharpen)	20
長鎖脂肪酸阻害 剤	15	アセトアミド	アセトクロール (Harness、Surpass NXT、Breakfree NXT、Warrant)ジメテ ナミド-P(Outlook)メト ラクロール(Parallel)ピ ロキサスルホン (Zidua、Zidua SC)s-メ トラクロール(Dual Magnum、Dual II Magnum、Cinch)フル フェナセット(Define)	30
特定部位 未知	16	ベンゾフラン	エトフメサート (Nortron)	
オーキシシン伝達 阻害剤	19	セミカルバゾン	ジフルフェンゾピル (Statusの構成成分)	
光化学系 I 阻害 剤	22	ビピリジリウム	パラコート (Gramoxone、 Parazone)ジクワット (Reglone)	40

【表 1 2 - 5】

作用部位	除草剤群 番号	化学物質ファミリー	除草剤
4-HPPD 阻害剤 (白化)	27	イソキサゾール ピラゾール ピラズロン トリケトン	イソキサフルトール (Balance Flexx)ピラス ルホトール(Huskieの 構成成分)トプラメゾン (Armezon/Impact)ビシ クロピロン(Acuronの 構成成分)メソトリオン (Callisto)テンボトリオ ン(Laudis)

10

【0316】

殺真菌剤

前述のように、本明細書で教示される任意の微生物を含み得る、本開示の農業組成物は、1つ以上の殺真菌剤と組み合わせられることがある。

【0317】

本明細書に記載の方法により生産される及び/または本明細書に記載されるような特性を有する細菌または細菌集団を含む組成物は、1つ以上の殺真菌剤をさらに含んでもよい。いくつかの実施形態では、殺真菌性組成物が、本明細書に述べられる組成物に含まれてもよく、他の化合物と同時にまたは連続して、植物(複数可)またはその部位(複数可)に施用され得る。殺真菌剤には、アゾキシストロピン、キャプタン、カルボキシシン、エタボキサム、フルジオキシソニル、メフェノキサム、フルジオキシソニル、チアベンダゾール、チアベンダズ(thiabendaz)、イブコナゾール、マンコゼブ、シアゾファミド、ゾキサミド、メタラキシル、PCNB、メタコナゾール(metaconazole)、ピラクロストロピン、Bacillus subtilis 菌株QST 713、セダキサン、チアメトキサム、フルジオキシソニル、チラム、トルクロホスメチル、トリフロキシストロピン、Bacillus subtilis 菌株MBI 600、ピラクロストロピン、フルオキサストロピン、Bacillus pumilus 菌株QST 2808、クロロタロニル、銅、フルトリアホール、フルキサピロキサド、マンコゼブ、グルジオキシニル(gludioxonil)、ペンチオピラド、トリアゾール、プロピコナゾール、プロチオコナゾール、テブコナゾール、フルオキサストロピン、ピラクロストロピン、ピコキシストロピン、qol、テトラコナゾール、トリフロキシストロピン、シプロコナゾール、フルトリアホール、SDHI、EBDC、セダキサン、MAXIM QUATRO(グルジオキシソニル(gludioxonil)、メフェノキサム、アゾキシストロピン、及びチアベンダズ(thiabendaz))、RAXIL(テブコナゾール、プロチオコナゾール、メタラキシル、及びエトキシル化タローアルキルアミン)、及びベンゾピンジフルピルが含まれる。

20

30

40

【0318】

いくつかの実施形態では、本明細書に述べられる殺真菌剤のうちのいずれか1つ以上が、本明細書に述べられる植物またはその部位のうちのいずれか1つ以上と共に利用されてもよい。

【0319】

殺線虫剤

前述のように、本明細書で教示される任意の微生物を含み得る、本開示の農業組成物は、1つ以上の殺線虫剤と組み合わせられることがある。

【0320】

本明細書に記載の方法により生産される及び/または本明細書に記載されるような特性

50

を有する細菌または細菌集団を含む組成物は、1つ以上の殺線虫剤をさらに含んでもよい。いくつかの実施形態では、殺線虫性組成物が、本明細書に述べられる組成物に含まれてもよく、他の化合物と同時にまたは連続して、植物（複数可）またはその部位（複数可）に施用され得る。殺線虫剤は、D - D、1, 3 - ジクロロプロペン、二臭化エチレン、1, 2 - ジブromo - 3 - クロロプロパン、臭化メチル、クロルピクリン、メタムナトリウム、ダゾメット、メチルイソチオシアネート、テトラチオ炭酸ナトリウム、アルジカルブ、アルドキシカルブ、カルボフラン、オキサミル、エトプロブ、フェナミホス、カズサホス、ホスチアゼート、テルブホス、フェンスルホチオン、ホレート、DiTera、克蘭ドサン、シンコシン、ヨウ化メチル、臭化プロパルギル、2, 5 - ジヒドロキシメチル - 3, 4 - ジヒドロキシピロリジン (DMDP)、アベルメクチンのうちのいずれか1つ以上、アジ化ナトリウム、フルフラール、Bacillus firmus、アバメクトリン、チアメトキサム、フルジオキソニル、クロチアニジン、サリチル酸、及びベンゾ - (1, 2, 3) - チアジアゾール - 7 - カルボチオ酸 S - メチルエステルから選択されてもよい。

10

【0321】

いくつかの実施形態では、本明細書に述べられる殺線虫剤のうちのいずれか1つ以上が、本明細書に述べられる植物またはその部位のうちのいずれか1つ以上と共に利用されてもよい。

【0322】

いくつかの実施形態では、本明細書に述べられる殺線虫剤、殺真菌剤、除草剤、殺虫剤、及び/または農薬のうちのいずれか1つ以上が、本明細書に述べられる植物またはその部位のうちのいずれか1つ以上と共に利用されてもよい。

20

【0323】

肥料、窒素安定剤、及びウレアーゼ阻害剤

前述のように、本明細書で教示される任意の微生物を含み得る、本開示の農業組成物は、肥料、窒素安定剤、またはウレアーゼ阻害剤のうちの1つ以上と組み合わせられることがある。

【0324】

いくつかの実施形態では、肥料は、本開示の方法及び細菌と組み合わせて使用される。肥料には、数ある中でも、無水アンモニア、尿素、硝酸アンモニウム、及び尿素硝安 (UAN) 組成物が含まれる。いくつかの実施形態では、ポップアップ施肥及び/またはスターター施肥が、本開示の方法及び細菌と組み合わせて使用される。

30

【0325】

いくつかの実施形態では、窒素安定剤が、本開示の方法及び細菌と組み合わせて使用される。窒素安定剤には、ニトラピリン、2 - クロロ - 6 - (トリクロロメチル) ピリジン、N - SERVE 24、INSTINCT、ジシアンジアミド (DCD) が含まれる。

【0326】

いくつかの実施形態では、ウレアーゼ阻害剤が、本開示の方法及び細菌と組み合わせて使用される。ウレアーゼ阻害剤には、N - (n - ブチル) - チオリン酸トリアミド (NBPT)、AGROTAIN、AGROTAIN PLUS、及びAGROTAIN PLUS SCが含まれる。さらに、本開示では、AGROTAIN ADVANCED 1.0、AGROTAIN DRI - MAXX、及びAGROTAIN ULTRAの利用が企図される。

40

【0327】

さらに、安定化された形態の肥料を使用することができる。例えば、安定化された形態の肥料は、安定化された尿素に基づく顆粒中に46%の窒素を含有するSUPER Uであり、SUPER Uは、脱窒、浸出、及び揮発から保護するためのウレアーゼ及び硝化阻害剤を含有する。NITAMINなどの安定化及び標的化された葉面肥料もまた、本明細書で使用され得る。

【0328】

50

ポップアップ肥料が、トウモロコシ圃場で一般的に使用される。ポップアップ施肥は、植栽時に種子に数ポンドの栄養素を施用することを含む。ポップアップ施肥は、苗の活力を高めるために使用される。

【0329】

本明細書で使用され得る緩徐放出または制御放出肥料は、施用後に植物による取り込み及び使用のためのその利用可能性を遅延させる形態で植物栄養素を含有する肥料、または植物へのその利用可能性を、硝酸アンモニウムもしくは尿素、リン酸アンモニウム、または塩化カリウムなどの参照の「迅速に利用可能な栄養素肥料」よりも顕著に長く延長する肥料を含意する。そのような最初の利用可能性の遅延または継続する利用可能性の延長時間は、様々な機構によって生じ得る。これらには、半透性コーティング、遮閉、タンパク質材料、もしくは他の化学形態による、水溶性低分子量化合物の緩徐な加水分解による、または他の未知の手段による材料の水溶解度の制御が含まれる。

10

【0330】

本明細書で使用され得る安定化された窒素肥料は、窒素安定剤が添加された肥料を含意する。窒素安定剤は、肥料の窒素成分が尿素 - Nまたはアンモニア性 - N形態で土壤に留まる時間を延長する、肥料に添加される物質である。

【0331】

本明細書で使用され得る硝化阻害剤は、アンモニア性 - Nの硝酸性 - Nへの生物学的酸化を阻害する物質を含意する。一部の例としては、(1) 2 - クロロ - 6 - (トリクロロメチル - ピリジン)、一般名 Nitrapyrin、製造元 Dow Chemical、(2) 4 - アミノ - 1, 2, 4 - 6 - トリアゾール - HCl、一般名 ATC、製造元 Ishihara Industries、(3) 2, 4 - ジアミノ - 6 - トリクロロ - メチルトリアジン、一般名 CI - 1580、製造元 American Cyanamid、(4) ジシアンジアミド、一般名 DCD、製造元 Showa Denko、(5) チオ尿素、一般名 TU、製造元 Nitto Ryuso、(6) 1 - メルカプト - 1, 2, 4 - トリアゾール、一般名 MT、製造元 Nippon、(7) 2 - アミノ - 4 - クロロ - 6 - メチル - ピラジン、一般名 AM、製造元 Mitsui Toatsu、(8) 3, 4 - ジメチルピラゾールホスフェート (DMPP)、BAS Fより、(9) 1 - アミド - 2 - チオ尿素 (ASU)、Nitto Chemical Ind. より、(10) チオ硫酸アンモニウム (ATS)、(11) 1H - 1, 2, 4 - トリアゾール (HPLC)、(12) 5 - エチレンオキシド - 3 - トリクロロ - メチル 1, 2, 4 - チオジアゾール (Terrazole)、Olin Mathiesonより、(13) 3 - メチルピラゾール (3-MP)、(14) 1 - カルバモイル - 3 - メチル - ピラゾール (CMP)、(15) ニーム、及び (16) DMPPが挙げられる。

20

30

【0332】

本明細書で使用され得るウレアーゼ阻害剤は、酵素ウレアーゼによる尿素に対する加水分解作用を阻害する物質を含意する。何千もの化学物質が土壤ウレアーゼ阻害剤として評価されてきた (Kiss and Simihaiian, 2002)。しかしながら、試験された多くの化合物のうちの少数のみが、非毒性であり、低濃度で有効であり、安定であり、尿素 (固体及び溶液) と適合性であり、土壤中で分解可能であり、かつ安価である、という必要な要件を満たす。それらは、それらの構造及び酵素ウレアーゼとのそれらの想定される相互作用に従って分類することができる (Watson, 2000, 2005)。4つの主要なクラスのウレアーゼ阻害剤、すなわち、(a) スルフヒドリル (sulfhydryl) 基と相互作用する試薬 (スルフヒドリル試薬)、(b) ヒドロキサメート、(c) 農業作物保護化学物質、ならびに (d) 尿素の構造類似体及び関連する化合物が提案されている。N - (n - ブチル) チオリン酸トリアミド (NBPT)、フェニルホスホロジアミデート (PPD / PPDA)、及びヒドロキノンが恐らく最も徹底的に研究されているウレアーゼ阻害剤である (Kiss and Simihaiian, 2002)。研究及び実用試験がまた、N - (2 - ニトロフェニル) リン酸トリアミド (2-NPT) 及びチオ硫酸アンモニウム (ATS) で実施されている。有機リン化合物は、尿素の

40

50

構造類似体であり、ウレアーゼ酵素の活性部位を遮断する、ウレアーゼ活性の最も有効な阻害剤のうちの一部である (Watson, 2005)。

【0333】

トウモロコシのための殺虫性種子処理剤 (IST)

トウモロコシ種子処理剤は通常、3つの有害生物スペクトル、すなわち、線虫、真菌性実生病害、及び昆虫を標的とする。

【0334】

殺虫剤種子処理剤は通常、種子処理パッケージの主要な構成成分である。現在利用可能なほとんどのトウモロコシ種子は、殺真菌剤及び殺虫剤を含む基本パッケージを備える。いくつかの態様では、種子処理剤の殺虫剤選択肢には、PONCHO (クロチアニジン)、CRUISER / CRUISER EXTREME (チアメトキサム)、及びGAUCHO (イミダクロプリド)が含まれる。これらの製品の3つ全ては、ネオニコチノイド系化学物質である。250 (0.25 mg AI / 種子)の量でのCRUISER及びPONCHOが、トウモロコシに利用可能な最も一般的な基本選択肢のうちの一部である。いくつかの態様では、処理剤の殺虫剤選択肢には、CRUISER 250チアメトキサム、CRUISER 250 (チアメトキサム)とLUMIVIA (クロラントラニリプロール)、CRUISER 500 (チアメトキサム)、及びPONCHO VOTIVO 1250 (クロチアニジン及びBacillus firmus I-1582)が含まれる。

10

【0335】

Pioneerの基本殺虫剤種子処理パッケージは、同じく利用可能なPONCHO / VOTIVO 1250とのCRUISER 250からなる。VOTIVOは、線虫に対して保護する生物学的薬剤である。

20

【0336】

トウモロコシ、ダイズ、及び綿を含むMonsantoの製品は、ACCELERON処理剤の包括に該当する。Dekalbトウモロコシ種子は、PONCHO 250を標準で備える。生産業者はまた、PONCHO / VOTIVOにアップグレードする選択肢を有し、このうちPONCHOは500の量で施用される。

【0337】

Agrisure、Golden Harvest、及びGarstは、殺真菌剤及びCRUISER 250を含む基本パッケージを有する。AVICTA Complete Cornもまた利用可能であり、これは、CRUISER 500、殺真菌剤、及び線虫保護を含む。CRUISER EXTREMEは、種子処理パッケージとして利用可能な別の選択肢であるが、CRUISERの量は、従来のCRUISER種子処理剤と同じ、すなわち、250、500、または1250である。

30

【0338】

別の選択肢は、利用可能な最低限の殺虫剤処理剤を購入し、販売業者に川下で種子を処理させることである。

【0339】

トウモロコシのための市販のISTが、下記の表13に列挙され、1つ以上の本明細書で教示される微生物と組み合わせることができる。

40

【表 1 3 - 1】

表 1 3 . 本開示の微生物と組み合わせることができるISTを含む例示的な種子処理剤のリスト

処理の種類	活性成分(複数可)	製品商標名	作物
F	アゾキシストロビン	DYNASTY PROTEGEFL	トウモロコシ、ダイズ トウモロコシ
F	Bacillus pumilus	YIELD SHIELD	トウモロコシ、ダイズ
F	Bacillus subtilis	HISTICK N/T VAULT HP	ダイズ トウモロコシ、ダイズ
F	Captan	CAPTAN 400 CAPTAN 400-C	トウモロコシ、ダイズ トウモロコシ (Corny)、ダイズ
F	フルジオキサニル	MAXIM 4FS	トウモロコシ、ダイズ
F	過酸化水素	OXIDATE STOROX	ダイズ ダイズ
F	イプロナゾール	ACCELERON DC-509 RANCONA 3.8 FS VORTEX	トウモロコシ トウモロコシ、ダイズ トウモロコシ

10

20

30

40

50

【表 1 3 - 2】

処理の種類	活性成分(複数可)	製品商標名	作物
F	マンコゼブ	亜鉛濃縮物を含む BONIDE MANCOZEB DITHANE 75DF RAINSIELD DITHANE DF RAINSIELD DITHANE F45 RAINSIELD DITHANE M45 LESCO 4 FLOWABLE MANCOZEB PENNCOZEB 4FL FLOWABLE PENNCOZEB 75DF DRY FLOWABLE PENNCOZEB 80WP	トウモロコシ トウモロコシ トウモロコシ トウモロコシ トウモロコシ トウモロコシ トウモロコシ トウモロコシ トウモロコシ トウモロコシ
F	メフェノキサム	APRON XL	トウモロコシ、ダイズ
F	メタラキシル	ACCELERON DC-309 ACCELERON DX-309 ACQUIRE AGRI STAR METALAXYL 265 ST ALLEGIANCE DRY ALLEGIANCE FL BELMONT 2.7 FS DYNA-SHIELD METALAXYL SEBRING 2.65 ST SEBRING 318 FS SEBRING 480 FS VIREO MEC	トウモロコシ トウモロコシ、ダイズ トウモロコシ、ダイズ トウモロコシ、ダイズ トウモロコシ、ダイズ トウモロコシ、ダイズ トウモロコシ、ダイズ トウモロコシ、ダイズ トウモロコシ、ダイズ トウモロコシ、ダイズ トウモロコシ、ダイズ ダイズ
F	ピラクロストロピ ン	ACCELERON DX-109 STAMINA	ダイズ トウモロコシ
F	<i>Streptomyces griseoviridis</i>	MYCOSTOP	トウモロコシ、ダイズ
F	<i>Streptomyces lydicus</i>	ACTINOGROW ST	トウモロコシ、ダイズ
F	テブコナゾール	AMTIDE TEBU 3.6F SATIVA 309 FS SATIVA 318 FS TEBUSHA 3.6FL TEBUZOL 3.6F	トウモロコシ トウモロコシ トウモロコシ トウモロコシ トウモロコシ
F	チアベンダゾール	MERTECT 340-F	ダイズ
F	チラム	42-STHIRAM FLOWSAN SIGNET 480 FS	トウモロコシ、ダイズ トウモロコシ、ダイズ トウモロコシ、ダイズ
F	<i>Trichoderma harzianum</i> Rifai	T-22 HC	トウモロコシ、ダイズ

10

20

30

40

50

【表 1 3 - 3】

処理の種類	活性成分(複数可)	製品商標名	作物
F	トリフロキシストロビン	ACCELERON DX-709 TRILEX FLOWABLE	トウモロコシ トウモロコシ、ダイズ
I	クロルピリホス	水溶性パッケージに入った LORSBAN 50W	トウモロコシ
I	クロチアニジン	ACCELERON IC-609 NIPSIT INSIDE PONCHO 600	トウモロコシ トウモロコシ、ダイズ トウモロコシ
I	イミダクロプリド	ACCELERON IX-409 AGRI STAR MACHO 600 ST AGRSOLUTIONS NITRO SHIELD ATTENDANT 600 AXCESS COURAZE 2F DYNA-SHIELD IMIDACLOPRID 5 GAUCHO 480 FLOWABLE GAUCHO 600 FLOWABLE GAUCHO SB FLOWABLE NUPRID 4.6F PRO SENATOR 600 FS	トウモロコシ トウモロコシ、ダイズ トウモロコシ、ダイズ トウモロコシ、ダイズ トウモロコシ、ダイズ ダイズ トウモロコシ、ダイズ トウモロコシ、ダイズ トウモロコシ、ダイズ トウモロコシ、ダイズ ダイズ トウモロコシ、ダイズ
I	チアメトキサム	CRUISER 5FS	トウモロコシ、ダイズ
N	アバメクチン	AVICTA 500 FS	トウモロコシ、ダイズ
N	<i>Bacillus firmus</i>	VOTIVO FS	ダイズ
P	サイトカイニン	SOIL X-CYTO X-Cyte	ダイズ ダイズ
P	ヘアピンアルファ ベータタンパク質	ACCELERON HX-209 N-HIBIT GOLD CST N-HIBIT HX-209	トウモロコシ、ダイズ トウモロコシ、ダイズ トウモロコシ、ダイズ
P	インドール酪酸	KICKSTAND PGR	トウモロコシ、ダイズ
I、N	チアメトキサム、 アバメクチン	AVICTA DUO CORN AVICTA DUO 250	トウモロコシ
I、F	クロチアニジン、 <i>Bacillus firmus</i>	PONCHO VOTIVO	トウモロコシ、ダイズ
F、F	カルボキシシン、キ ャプタン	ENHANCE	ダイズ
I、F	ペルメトリン、カ ルボキシシン	KERNEL GUARD SUPREME	トウモロコシ、ダイズ
F、F	カルボキシシン、チ ラム	VITAFLO 280	トウモロコシ、ダイズ

10

20

30

40

50

【表 1 3 - 4】

処理の種類	活性成分(複数可)	製品商標名	作物
F、F	メフェノキサム、フルジオキサニル	MAXIM XL WARDEN RTA APRON MAXX RFC APRON MAXX RTA + MOLY APRON MAXX RTA	トウモロコシ、ダイズ ダイズ
I、F	イミダクロプリド、メタラキシル	AGRISOLUTIONS CONCUR	トウモロコシ
F、F	メタラキシル、イブコナゾール	RANCONA SUMMIT RANCONA XXTRA	ダイズ
F、F	チラム、メタラキシル	PROTECTOR-L- ALLEGIANCE	ダイズ
F、F	トリフロキシストロビン、メタラキシル	TRILEX AL TRILEX 2000	ダイズ
P、P、P	サイトカイニン、ジベレリン酸、インドール酪酸	STIMULATE YIELD ENHANCER ASCEND	トウモロコシ、ダイズ
F、F、I	メフェノキサム、フルジオキサニル、チアメトキサム	CRUISERMAXX PLUS	ダイズ
F、F、F	キャプタン、カルボキシニル、メタラキシル	BEAN GUARD/ ALLEGIANCE	ダイズ
F、F、I	キャプタン、カルボキシニル、イミダクロプリド	ENHANCE AW	ダイズ
F、F、I	カルボキシニル、メタラキシル、イミダクロプリド	LATITUDE	トウモロコシ、ダイズ
F、F、F	メタラキシル、ピラクロストロビン、トリチコナゾール	STAMINA F3 HL	トウモロコシ
F、F、F、I	アゾキシストロビン、フルジオキサニル、メフェノキサム、チアメトキサム	CRUISER EXTREME	トウモロコシ
F、F、F、F、F	アゾキシストロビン、フルジオキサニル、メフェノキサム、チアベンダゾール	MAXIM QUATTRO	トウモロコシ
I	クロラントラニプリド	LUMIVIA	トウモロコシ

10

20

30

40

F=殺真菌剤;I=殺虫剤;N=殺線虫剤;P=植物成長調節剤

50

【0340】

作物への細菌集団の施用

本明細書に記載の細菌または細菌集団の組成物は、畦間で、タルク中で、または種子処理剤として施用することができる。組成物は、バルク、ミニバルクで、袋中で、またはタルク中で種子パッケージに施用することができる。

【0341】

プランターは、処理された種子を植栽し、従来の方式に従って2条で、または耕うんを必要としない方式で作物を栽培することができる。種子は、コントロールホッパーまたは個別のホッパーを使用して散布することができる。また、種子は、加圧空気を使用してま

たは手作業で散布することができる。種子配置は、可変作業技術 (variable rate technology) を使用して実施することができる。加えて、本明細書に記載の細菌または細菌集団の施用は、可変作業技術を使用して施用されてもよい。一部の例では、細菌は、トウモロコシ、ダイズ、キャノーラ、モロコシ、ジャガイモ、イネ、野菜、穀類、擬似穀類の種子、及び油糧種子に施用することができる。穀類の例としては、オオムギ、フォニオ、オートムギ、パルマーグラス (palmer's grass)、ライムギ、トウジンビエ、モロコシ、スペルトコムギ、テフ、ライコムギ、及びコムギが挙げられ得る。擬似穀類の例としては、ブレッドナッツ、ソバ、ガマ、チア、亜麻、アマランサス子実、ハンザ、キノア、及びゴマが挙げられ得る。いくつかの例では、種子は、遺伝子組換え生物 (GMO)、非GMO、有機、または従来のものであり得る。

10

【0342】

マイクロ肥料、PGR、除草剤、殺虫剤、及び殺真菌剤などの添加剤を追加で使用して、作物を処理することができる。添加剤の例としては、殺虫剤、殺線虫剤、殺真菌剤などの作物保護剤、着色剤、ポリマー、ペレット化剤、プライミング剤、及び消毒剤などの強化剤、ならびに接種剤、PGR、軟化剤、及び微量栄養素などの他の薬剤が挙げられる。PGRは、根成長、開花、または茎伸長に影響を及ぼす天然または合成の植物ホルモンであり得る。PGRには、オーキシン、ジベレリン、サイトカイニン、エチレン、及びアブシジン酸 (ABA) が含まれ得る。

【0343】

組成物は、液体肥料と組み合わせて畦間で施用することができる。一部の例では、液体肥料は、槽に保持されてもよい。NPK肥料は、ナトリウム、亜リン酸、及びカリウムという多量栄養素を含有する。

20

【0344】

組成物は、植物成長の促進、葉中の高葉緑素含量の維持、果実数または種子数の増加、及び果実単位重量または種子単位重量の増加など、植物形質を改善し得る。本開示の方法は、様々な望ましい形質のうちの一つまたは複数を導入または改善するために用いられてもよい。導入または改善され得る形質の例としては、根バイオマス、根長、植物丈、苗条長、葉数、水利用効率、全体的バイオマス、収穫高、果実サイズ、穀粒サイズ、光合成速度、干ばつ耐性、耐熱性、耐塩性、低窒素ストレス耐性、窒素使用効率、線虫ストレス耐性、真菌病原体耐性、細菌病原体耐性、ウイルス病原体耐性、代謝物のレベル、代謝物のレベルの調整、プロテオーム発現が挙げられる。植物丈、全体的バイオマス、根及び/または苗条バイオマス、種子発芽、実生生存、光合成効率、蒸散率、種子/果実数もしくは質量、植物穀物もしくは果実の収穫高、葉の葉緑素含量、光合成速度、根長、またはそれらの任意の組み合わせを含めた、望ましい形質を使用して、成長を測定することができ、同一条件下で栽培された参照農業植物 (例えば、導入及び/または改善された形質を有しない植物) の成長速度と比較することができる。一部の例では、植物丈、全体的バイオマス、根及び/または苗条バイオマス、種子発芽、実生生存、光合成効率、蒸散率、種子/果実数もしくは質量、植物穀物もしくは果実の収穫高、葉の葉緑素含量、光合成速度、根長、またはそれらの任意の組み合わせを含めた、望ましい形質を使用して、成長を測定することができ、類似の条件下で栽培された参照農業植物 (例えば、導入及び/または改善された形質を有しない植物) の成長速度と比較することができる。

30

40

【0345】

宿主植物に対する農学的形質には、以下のもの、すなわち、該種子処理剤製剤を用いずに種子から成長させた同系統植物と比較した、油含量の改変、タンパク質含量の改変、種子炭水化物組成の改変、種子油組成の改変、及び種子タンパク質組成の改変、化学物質耐性、耐寒性、老化遅延、病害耐性、干ばつ耐性、穂重、成長改善、健康増進、耐熱性、除草剤耐性、草食動物耐性、窒素固定の改善、窒素利用の改善、根アーキテクチャの改善、水使用効率の改善、バイオマスの増加、根長の増加、種子重量の増加、苗条長さの増加、収穫高の増加、水制限条件下での収穫高の増加、穀粒質量、穀粒水分含量、金属耐性、穂数、1穂当たりの穀粒数、さや数、栄養強化、病原体耐性、有害生物耐性、光合成能力の

50

改善、塩分耐性、緑維持、活力改善、成熟種子の乾燥重量の増加、成熟種子の生重量の増加、1植物当たりの成熟種子数の増加、葉緑素含量の増加、1植物当たりのさや数の増加、1植物当たりのさや長の増加、1植物当たりのしおれた葉の数の減少、1植物当たりの重度にしおれた葉の数の減少、及び1植物当たりのしおれていない葉の数の増加、代謝物レベルの検出可能な調節、転写物レベルの検出可能な調節、及びプロテオームの検出可能な調節が含まれ得るが、これらに限定されない。

【0346】

一部の場合では、植物には、接種される植物の植物要素と同じ植物種から単離された細菌または細菌集団が接種される。例えば、*Zea mays* (トウモロコシ)の1つの品種に通常見出される細菌または細菌集団が、その天然の状態では該細菌及び細菌集団を欠如する *Zea mays* の別の品種の植物の植物要素に結び付けられる。一実施形態では、細菌及び細菌集団は、接種される植物の植物要素と関連する植物種に属する植物に由来する。例えば、*Zea diploperennis* *Ilitis* など (*diploperennial teosinte*) に通常見出される細菌及び細菌集団が、*Zea mays* (トウモロコシ) に施用されるか、またはその逆である。一部の場合では、植物には、接種される植物の植物要素に対して異種である細菌及び細菌集団が接種される。一実施形態では、細菌及び細菌集団は、別の種の植物に由来する。例えば、通常は双子葉植物に見出される細菌及び細菌集団が、単子葉植物に施用されるか (例えば、ダイズ由来細菌及び細菌集団をトウモロコシに接種する)、またはその逆である。他の場合では、植物に接種されるべき細菌及び細菌集団は、接種されている植物の関連種に由来する。一実施形態では、細菌及び細菌集団は、関連分類群、例えば関連種に由来する。別の種の植物は、農業植物であり得る。別の実施形態では、細菌及び細菌集団は、任意の宿主植物要素に接種される設計された組成物の一部である。

【0347】

一部の例では、細菌または細菌集団は、外因性であり、細菌及び細菌集団が、接種される植物とは異なる植物から単離される。例えば、一実施形態では、細菌または細菌集団は、接種される植物と同じ種の異なる植物から単離することができる。一部の場合では、細菌または細菌集団は、接種される植物に関連する種から単離することができる。

【0348】

一部の例では、本明細書に記載の細菌及び細菌集団は、1つの組織タイプから別の組織タイプへと移動することが可能である。例えば、種子の外側にコーティングした後の植物の成熟組織内での細菌及び細菌集団の本開示の検出及び単離により、種子外側から成熟中の植物の栄養組織内へと移動するそれらの能力が実証される。したがって、一実施形態では、細菌の集団及び細菌集団は、種子外側から植物の栄養組織内へと移動することが可能である。一実施形態では、植物の種子にコーティングされた細菌及び細菌集団は、種子が植物状態へと発芽すると、植物の異なる組織に局在化することが可能である。例えば、細菌及び細菌集団は、根、不定根、種子根、根毛、苗条、葉、花、芽、房、分裂組織、花粉、雌しべ、子房、雄しべ、果実、走根、根茎、根粒、塊茎、突起様構造、孔辺細胞、排水組織、花卉、がく片、穎、軸、維管束形成層、師部、及び木部を含む、植物の組織のうちのいずれか1つに局在化することが可能であり得る。一実施形態では、細菌及び細菌集団は、植物の根及び/または根毛に局在化することが可能である。別の実施形態では、細菌及び細菌集団は、植物の根及び/または根毛に局在化することが可能である。別の実施形態では、細菌及び細菌集団は、植物の生殖組織 (花、花粉、雌しべ、子房、雄しべ、果実) に局在化することが可能である。別の実施形態では、細菌及び細菌集団は、植物の根、苗条、葉、及び生殖組織に局在化することが可能である。さらに別の実施形態では、細菌及び細菌集団は、植物の果実または種子組織でコロニー形成する。さらに別の実施形態では、細菌及び細菌集団は、それが植物の表面に存在する (すなわち、その存在が、植物外側、または植物のエピスフィア (*episphere*) に検出可能に存在する) ように、植物でコロニー形成することが可能である。さらに他の実施形

10

20

30

40

50

態では、細菌及び細菌集団は、植物の実質的に全てまたは全ての組織に局在化することが可能である。ある特定の形態では、細菌及び細菌集団は、植物の根には局在化しない。他の場合では、細菌及び細菌集団は、植物の光合成組織には局在化しない。

【0349】

また、組成物の有効性は、作物の相対的成熟度または作物熱単位（CHU）を測定することによって評価することができる。例えば、細菌集団をトウモロコシに施用することができ、トウモロコシ成長を、トウモロコシ穀粒の相対的成熟度、またはトウモロコシ穀粒が最大重量になる時間に従って評価することができる。また、作物熱単位（CHU）を使用して、トウモロコシ作物の成熟度を予測することができる。CHUは、作物が成長する際の一日の最高温を測定することによって熱蓄積量を決定する。

10

【0350】

複数の例では、細菌は、根、不定根、種子根、根毛、苗条、葉、花、芽、房、分裂組織、花粉、雌しべ、子房、雄しべ、果実、走根、根茎、根粒、塊茎、突起様構造、孔辺細胞、排水組織、花卉、がく片、穎、軸、維管束形成層、師部、及び木部を含む、植物の組織のうちのいずれか1つに局在化し得る。別の形態では、細菌または細菌集団は、光合成組織、例えば、植物の葉及び苗条に局在化することが可能である。他の場合では、細菌及び細菌集団は、植物の維管束組織、例えば、木部及び師部に局在化する。別の形態では、細菌または細菌集団は、植物の生殖組織（花、花粉、雌しべ、子房、雄しべ、または果実）に局在化することが可能である。別の形態では、細菌及び細菌集団は、植物の根、苗条、葉、及び生殖組織に局在化することが可能である。別の形態では、細菌または細菌集団は、植物の果実または種子組織でコロニー形成する。さらに別の形態では、細菌または細菌集団は、植物の表面に存在するように植物にコロニーを形成することができる。別の形態では、細菌または細菌集団は、植物の実質的に全てまたは全ての組織に局在化することが可能である。特定の形態では、細菌または細菌集団は、植物の根には局在化しない。他の場合では、細菌及び細菌集団は、植物の光合成組織には局在化しない。

20

【0351】

作物に施用される細菌組成物の有効性は、植栽率、播種活力、根の強度、干ばつ耐性、植物丈、ドライダウン（dry down）、及び検査重量を含むがこれらに限定されない、作物成長の種々の機能を測定することによって評価することができる。

30

【0352】

植物種 本明細書に記載の方法及び細菌は、Hordeum属、Oryza属、Zea属、及びTriticaceae属の植物などの、様々な植物のうちのいずれにも好適である。好適な植物の他の非限定的な例としては、コケ類、地衣類、及び藻類が挙げられる。一部の例では、植物は、食用作物、繊維作物、油糧作物、林業または紙パルプ産業の植物、バイオ燃料生産用の供給原料、及び/または観賞植物など、経済的、社会的、及び/または環境的な価値を有する。一部の例では、植物は、穀物、小麦粉、デンプン、シロップ、粗挽き粉、油、フィルム、パッケージング、栄養補給製品、パルプ、動物飼料、魚飼料、工業化学物質用のバルク材料、穀類製品、加工ヒト用食品、糖、アルコール、及び/またはタンパク質などの、経済的に価値のある製品を生産するために使用されてもよい。作物の非限定的な例としては、メイズ、イネ、コムギ、オオムギ、モロコシ、キビ、オートムギ、ライコムギ、ソバ、スイートコーン、サトウキビ、タマネギ、トマト、イチゴ、及びアスパラガスが挙げられる。いくつかの形態では、本明細書に記載の方法及び細菌は、様々なトランスジェニック植物、非トランスジェニック植物、及びその雑種植物のうちのいずれにも好適である。

40

【0353】

いくつかの例では、本明細書に開示される方法及び組成物を使用して得てもよいまたは改善されてもよい植物には、農業、園芸、バイオ燃料分子及び他の化学物質を生産するためのバイオマス、及び/または林業にとって重要であるかまたは関心対象となる植物が含まれ得る。これらの植物のいくつかの例としては、パイナップル、バナナ、ココナッツ、

50

コリ、グラスピー、及びイネ化植物；ならびに、例えば、エンドウマメ、アルファルファ、オオブドウホオズキ、メロン、ヒヨコマメ、チコリー、クローバ、ケール、レンズマメ、ダイズ、タバコ、ジャガイモ、サツマイモ、ダイコン、キャベツ、アブラナ、リンゴの木、ブドウ、綿、ヒマワリ、シロイヌナズナ、キャノーラ、柑橘類（オレンジ、マンダリン、キンカン、レモン、ライム、グレープフルーツ、タンジェリン、タンジェロ、シトロン、及びザボンを含む）、コショウ、マメ、レタス、*Panicum virgatum*（スイッチグラス）、*Sorghum bicolor*（モロコシ、スーダン）、*Miscanthus giganteus*（ススキ）、*Saccharum*種（エナジーケーン）、*Populus balsamifera*（ポプラ）、*Zea mays*（トウモロコシ）、*Glycine max*（ダイズ）、*Brassica napus*（キャノーラ）、*Triticum aestivum*（コムギ）、*Gossypium hirsutum*（綿）、*Oryza sativa*（イネ）、*Helianthus annuus*（ヒマワリ）、*Medicago sativa*（アルファルファ）、*Beta vulgaris*（テンサイ）、*Pennisetum glaucum*（トウジンビエ）、*Panicum*種 *Sorghum*種、*Miscanthus*種、*Saccharum*種、*Erianthus*種、*Populus*種、*Secale cereale*（ライムギ）、*Salix*種（ヤナギ）、*Eucalyptus*種（ユーカリ）、*Triticosecale*種（*triticum* - 25コムギ×ライムギ）、タケ、*Carthamus tinctorius*（ベニバナ）、*Jatropha curcas*（ジャトロファ）、*Ricinus communis*（キャストアー）、*Elaeis guineensis*（アブラヤシ）、*Phoenix dactylifera*（ナツメヤシ）、*Archontophoenix cunninghamiana*（ユスラヤシ）、*Syagrus romanzoffiana*（ジョウオウヤシ）、*Linum usitatissimum*（アマ）、*Brassica juncea*、*Manihot esculenta*（キャッサバ（*cassaya*））、*Lycopersicon esculentum*（トマト）、*Lactuca saliva*（レタス）、*Musa paradisiaca*（バナナ）、*Solanum tuberosum*（ジャガイモ）、*Brassica oleracea*（ブロッコリー、カリフラワー、メキャベツ）、*Camellia sinensis*（茶）、*Fragaria ananassa*（イチゴ）、*Theobroma cacao*（ココア）、*Coffea arabica*（コーヒー）、*Vitis vinifera*（ブドウ）、*Ananas comosus*（パイナップル）、*Capsicum annum*（トウガラシ及びアマトウガラシ）、*Allium cepa*（タマネギ）、*Cucumis melo*（メロン）、*Cucumis sativus*（キュウリ）、*Cucurbita maxima*（カボチャ）、*Cucurbita moschata*（カボチャ）、*Spinacea oleracea*（ホウレンソウ）、*Citrullus lanatus*（スイカ）、*Abelmoschus esculentus*（オクラ）、*Solanum melongena*（ナス）、*Papaver somniferum*（ケシ）、*Papaver orientale*、*Taxus baccata*、*Taxus brevifolia*、*Artemisia annua*、*Cannabis saliva*、*Camptotheca acuminata*、*Catharanthus roseus*、*Vinca rosea*、*Cinchona officinalis*、*Coichicum autumnale*、*Veratrum californica*、*Digitalis lanata*、*Digitalis purpurea*、*Dioscorea* 5種、*Andrographis paniculata*、*Atropa belladonna*、*Datura stramonium*、*Berberis*種、*Cephalotaxus*種、*Ephedra sinica*、*Ephedra*種、*Erythroxylum coca*、*Galanthus wornorii*、*Scopolia*種、*Lycopodium serratum*（*Huperzia serrata*）、*Lycopodium*種、*Rauwolfia serpentina*、*Rauwolfia*種、*Sanguinaria ca*

10

20

30

40

50

nadensis、Hyoscyamus種、Calendula officinalis、Chrysanthemum parthenium、Coleus forskohlii、Tanacetum parthenium、Parthenium argentatum (グアジュール)、Hevea種 (ゴム)、Mentha spicata (ミント)、Mentha piperita (ミント)、Bixa orellana、Alstroemeria種、Rosa種 (バラ)、Dianthus caryophyllus (カーネーション)、Petunia種 (ペチュニア)、Poinsettia pulcherrima (ポインセチア)、Nicotiana tabacum (タバコ)、Lupinus albus (ルピナス)、Uniola paniculata (オートムギ)、Hordeum vulgare (オオムギ)、及びLolium種 (ライムギ) などの双子葉植物が挙げられ得る。 10

【0354】

いくつかの例では、単子葉植物が使用されてもよい。単子葉植物は、Alismatales、Arales、Arecales、Bromeliales、Commelinales、Cyclanthales、Cyperales、Eriocaulales、Hydrocharitales、Juncales、Lilliales、Najadales、Orchidales、Pandanales、Poales、Restionales、Triuridales、Typhales、及びZingiberalesの目に属する。Gymnospermaeの綱に属する植物は、Cycadales、Ginkgoales、Gnetales、及びPinalesである。いくつかの例では、単子葉植物は、メイズ、イネ、コムギ、オオムギ、及びサトウキビからなる群から選択することができる。 20

【0355】

いくつかの例では、Aristochiales、Asterales、Batales、Campanulales、Capparales、Caryophyllales、Casuarinales、Celastrales、Cornales、Diapensales、Dilleniales、Dipsacales、Ebenales、Ericales、Eucomiales、Euphorbiales、Fabales、Fagales、Gentianales、Geraniales、Haloragales、Hamamelidales、Middles、Juglandales、Lamiales、Laurales、Lecythidales、Leitneriales、Magniolales、Malvales、Myricales、Myrtales、Nymphaeales、Papeverales、Piperales、Plantaginiales、Plumbaginiales、Podostemales、Polemoniales、Polygalales、Polygonales、Primulales、Proteales、Rafflesiales、Ranunculales、Rhamnales、Rosales、Rubiales、Salicales、Santales、Sapindales、Sarraceniaceae、Scrophulariales、Theales、Trochodendrales、Umbellales、Urticales、及びViolatesの目に属する双子葉植物を含む、双子葉植物が使用され得る。いくつかの例では、単子葉植物は、綿、ダイズ、コショウ、及びトマトからなる群から選択することができる。 30 40

【0356】

一部の場合では、改善されることになる植物は、実験条件に容易に適合しない。例えば、作物は、改善された形質を複数回の反復にわたって連続して実際的に評価するのに十分に成長するまでに時間が長くかかり過ぎる場合がある。したがって、細菌が最初に単離される第1の植物及び/または遺伝子操作された細菌が施用される複数の植物は、所望の条件下での評価に、より適合する植物などのモデル植物であり得る。モデル植物の非限定的な例としては、Setaria、Brachypodium、及びArabidopsisが挙げられる。次いで、モデル植物を使用して本開示の方法により単離された細菌の能 50

力を、別のタイプの植物（例えば、作物）に施用して、改善された形質の付与を確認してもよい。

【0357】

本明細書に開示される方法によって改善され得る形質は、例えば、成長速度、高さ、重量、色、味、匂い、植物による1つ以上の化合物の生成の変化を含む、植物の観察可能な特徴を含む（例えば、代謝物、タンパク質、薬物、炭水化物、油、及びその他の化合物を含む）。遺伝子型情報に基づいて植物を選択することもまた想定される（例えば、細菌に応答した植物遺伝子発現のパターンを含めること、または窒素固定の増加に関連する遺伝子マーカーなどの遺伝子マーカーの存在を特定すること）。また、植物は、ある特定の機能または形質（望ましい機能または形質など）の存在ではなく、ある特定の機能または形質（望ましくない機能または形質など）の不在、抑制、または阻害に基づいて選択されてもよい。

10

【0358】

遺伝子組み換えされていないメイズ

本明細書に記載の方法及び細菌は、遺伝子組み換えされていない様々なトウモロコシ植物またはその一部のいずれかに適している。またいくつかの態様では、トウモロコシは、有機である。さらに、本明細書に記載の方法及び細菌は、以下の非遺伝子改変雑種、品種、系統などのいずれにも適している。いくつかの実施形態では、トウモロコシ品種は一般に、スイートコーン、フリントコーン、ポップコーン、デントコーン、ポッドコーン、及びフラワーコーンの6つのカテゴリーに該当する。

20

【0359】

スイートコーン

イエローsu品種には、Earlivee、Early Sunglow、Sundance、Early Golden Bantam、Iochief、Merit、Jubilee、及びGolden Cross Bantamが含まれる。ホワイトsu品種には、True Platinum、Country Gentleman、Silver Queen、及びStowell's Evergreenが含まれる。バイカラーsu品種には、Sugar & Gold、Quickie、Double Standard、Butter & Sugar、Sugar Dots、Honey & Creamが含まれる。マルチカラーsu品種には、Hookers、Triple Play、Painted Hill、Black Mexican/Aztecが含まれる。

30

【0360】

イエローse品種には、Buttergold、Precocious、Spring Treat、Sugar Buns、Colorow、Kandy King、Bodacious R/M、Tuxedo、Incredible、Merlin、Miracle、及びKandy Korn EHが含まれる。ホワイトse品種には、Spring Snow、Sugar Pearl、Whiteout、Cloud Nine、Alpine、Silver King、及びArgentが含まれる。バイカラーse品種には、Sugar Baby、Fleet、Bon Jour、Trinity、Bi-Licious、Temptation、Luscious、Ambrosia、Accord、Brocade、Lancelot、Precious Gem、Peaches And Cream Mid EH、及びDelectable R/Mが含まれる。マルチカラーse品種には、Ruby Queenが含まれる。

40

【0361】

イエローsh2品種には、Extra Early Super Sweet、Takeoff、Early Xtra Sweet、Raveline、Summer Sweet Yellow、Krispy King、Garrison、Illini Gold、Challenger、Passion、Excel、Jubilee Super Sweet、Illini Xtra Sweet、及びCrisp 'N Sweetが含まれる。ホワイトsh2品種には、Summer Sweet White、Tah

50

oe、Aspen、Treasure、How Sweet It Is、及びCamelotが含まれる。バイカラーsh2品種には、Summer Sweet Bicolor、Radiance、Honey 'N Pearl、Aloha、Dazzle、Hudson、及びPhenomenalが含まれる。

【0362】

イエローsy品種には、Applause、Inferno、Honeytreat、及びHoney Selectが含まれる。ホワイトsy品種には、Silver Duchess、Cinderella、Mattapoissett、Avalon、及びCaptivateが含まれる。バイカラーsy品種には、Pay Dirt、Revelation、Renaissance、Charisma、Synergy、Montauk、Kristine、Serendipity/Providence、及びCamelooが含まれる。

【0363】

イエロー増強スーパースイート品種には、Xtra-Tender 1dda、Xtra-Tender 11dd、Mirai 131Y、Mirai 130Y、Vision、及びMirai 002が含まれる。ホワイト増強スーパースイート品種には、Xtra-Tender 3dda、Xtra-Tender 31dd、Mirai 421W、XTH 3673、及びDevotionが含まれる。バイカラー増強スーパースイート品種には、Xtra-Tender 2dda、Xtra-Tender 21dd、Kickoff XR、Mirai 308BC、Anthem XR、Mirai 336BC、Fantastic XR、Triumph、Mirai 301BC、Stellar、American Dream、Mirai 350BC、及びObsessionが含まれる。

【0364】

フリントコーン

フリントコーン品種には、Bronze-Orange、Candy Red Flint、Floriani Red Flint、Glass Gem、Indian Ornamental (Rainbow)、Mandan Red Flour、Painted Mountain、Petmecky、Cherokee White Flourが含まれる。

【0365】

ポップコーン

ポップコーン品種には、Monarch Butterfly、Yellow Butterfly、Midnight Blue、Ruby Red、Mixed Baby Rice、Queen Mauve、Mushroom Flake、Japanese Hull-less、Strawberry、Blue Shaman、Miniature Colored、Miniature Pink、Pennsylvania Dutch Butter Flavor、及びRed Strawberryが含まれる。

【0366】

デントコーン

デントコーン品種には、Bloody Butcher、Blue Clarage、Ohio Blue Clarage、Cherokee White Eagle、Hickory Cane、Hickory King、Jellicorse Twin、Kentucky Rainbow、Daymon Morgan's Knt. Butcher、Leaming、Leaming's Yellow、McCormack's Blue Giant、Neal Paymaster、Pungo Creek Butcher、Reid's Yellow Dent、Rotten Clarage、及びTennessee Red Cobが含まれる。

【0367】

いくつかの実施形態では、トウモロコシ品種には、P 1 6 1 8 W、P 1 3 0 6 W、P 1 3 4 5、P 1 1 5 1、P 1 1 9 7、P 0 5 7 4、P 0 5 8 9、及びP 0 1 5 7が含まれる。W = ホワイトコーン。

【0368】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法及び細菌は、本明細書に述べられるメイズ品種のいずれの雑種にも好適である。

【0369】

遺伝子組換えメイズ

本明細書に記載の方法及び細菌は、遺伝子組換えメイズ植物またはその部位の雑種、品種、系統などのうちのいずれにも好適である。

【0370】

さらに、本明細書に記載の方法及び細菌は、1つ以上の国で承認された、以下の遺伝子組換えメイズイベントのうちのいずれにも好適である：3 2 1 3 8 (3 2 1 3 8 S P T M a i n t a i n e r)、3 2 7 2 (E N O G E N)、3 2 7 2 x B t 1 1、3 2 7 2 x b t 1 1 x G A 2 1、3 2 7 2 x B t 1 1 x M I R 6 0 4、3 2 7 2 x B t 1 1 x M I R 6 0 4 x G A 2 1、3 2 7 2 x B t 1 1 x M I R 6 0 4 x T C 1 5 0 7 x 5 3 0 7 x G A 2 1、3 2 7 2 x G A 2 1、3 2 7 2 x M I R 6 0 4、3 2 7 2 x M I R 6 0 4 x G A 2 1、4 1 1 4、5 3 0 7 (A G R I S U R E D u r a c a d e)、5 3 0 7 x G A 2 1、5 3 0 7 x M I R 6 0 4 x B t 1 1 x T C 1 5 0 7 x G A 2 1 (A G R I S U R E D u r a c a d e 5 1 2 2)、5 3 0 7 x M I R 6 0 4 x B t 1 1 x T C 1 5 0 7 x G A 2 1 x M I R 1 6 2 (A G R I S U R E D u r a c a d e 5 2 2 2)、5 9 1 2 2 (H E R C U L E X R W)、5 9 1 2 2 x D A S 4 0 2 7 8、5 9 1 2 2 x G A 2 1、5 9 1 2 2 x M I R 6 0 4、5 9 1 2 2 x M I R 6 0 4 x G A 2 1、5 9 1 2 2 x M I R 6 0 4 x T C 1 5 0 7、5 9 1 2 2 x M I R 6 0 4 x T C 1 5 0 7 x G A 2 1、5 9 1 2 2 x M O N 8 1 0、5 9 1 2 2 x M O N 8 1 0 x M I R 6 0 4、5 9 1 2 2 x M O N 8 1 0 x N K 6 0 3、5 9 1 2 2 x M O N 8 1 0 x N K 6 0 3 x M I R 6 0 4、5 9 1 2 2 x M O N 8 8 0 1 7、5 9 1 2 2 x M O N 8 8 0 1 7 x D A S 4 0 2 7 8、5 9 1 2 2 x N K 6 0 3 (H e r c u l e x R W R O U N D U P R E A D Y 2)、5 9 1 2 2 x N K 6 0 3 x M I R 6 0 4、5 9 1 2 2 x T C 1 5 0 7 x G A 2 1、6 7 6、6 7 8、6 8 0、3 7 5 1 I R、9 8 1 4 0、9 8 1 4 0 x 5 9 1 2 2、9 8 1 4 0 x T C 1 5 0 7、9 8 1 4 0 x T C 1 5 0 7 x 5 9 1 2 2、B t 1 0 (B t 1 0)、B t 1 1 [X 4 3 3 4 C B R、X 4 7 3 4 C B R] (A G R I S U R E C B / L L)、B t 1 1 x 5 3 0 7、B t 1 1 x 5 3 0 7 x G A 2 1、B t 1 1 x 5 9 1 2 2 x M I R 6 0 4、B r 1 1 x 5 9 1 2 2 x M I R 6 0 4 x G A 2 1、B t 1 1 x 5 9 1 2 2 x M I R 6 0 4 x T C 1 5 0 7、M 5 3、M 5 6、D A S - 5 9 1 2 2 - 7、B t 1 1 x 5 9 1 2 2 x M I R 6 0 4 x T C 1 5 0 7 x G A 2 1、B t 1 1 x 5 9 1 2 2 x T C 1 5 0 7、T C 1 5 0 7 x D A S - 5 9 1 2 2 - 7、B t 1 1 x 5 9 1 2 2 x T C 1 5 0 7 x G A 2 1、B t 1 1 x G A 2 1 (A G R I S U R E G T / C B / L L)、B t 1 1 x M I R 1 6 2 (A G R I S U R E V i p t e r a 2 1 0 0)、B T 1 1 x M I R 1 6 2 x 5 3 0 7、B t 1 1 x M I R 1 6 2 x 5 3 0 7 x G A 2 1、B t 1 1 x M I R 1 6 2 x G A 2 1 (A G R I S U R E V i p t e r a 3 1 1 0)、B t 1 1 x M I R 1 6 2 x M I R 6 0 4 (A G R I S U R E V i p t e r a 3 1 0 0)、B t 1 1 x M I R 1 6 2 x M I R 6 0 4 x 5 3 0 7、B t 1 1 x M I R 1 6 2 x M I R 6 0 4 x 5 3 0 7 x G A 2 1、B t 1 1 x M I R 1 6 2 x M I R 6 0 4 x G A 2 1 (A G R I S U R E V i p t e r a 3 1 1 1 / A G R I S U R E V i p t e r a 4)、B t 1 1、M I R 1 6 2 x M I R 6 0 4 x M O N 8 9 0 3 4 x 5 3 0 7 x G A 2 1、B t 1 1 x M I R 1 6 2 x M I R 6 0 4 x T C 1 5 0 7、B t 1 1 x M I R 1 6 2 x M I R 6 0 4 x T C 1 5 0 7 x 5 3 0 7、B t 1 1 x M I R 1 6 2 x M I R 6 0 4 x T C 1 5 0 7 x G A 2 1、B t 1 1 x M I R 1 6 2 x M O N 8 9 0 3 4、B t 1 1 x M I R 1 6 2 x M O N 8 9 0 3 4 x G A 2 1、B t 1 1 x M I R 1 6 2 x T C 1 5 0 7、B t 1 1 x M I R 1 6 2 x T C 1 5 0 7 x 5 3 0 7、B t 1 1 x M I

10

20

30

40

50

R 1 6 2 x T C 1 5 0 7 x 5 3 0 7 x G A 2 1、 B t 1 1 x M R 1 6 2 x T C 1 5 0 7 x
G A 2 1 (A G R I S U R E V i p t e r a 3 2 2 0)、 B T 1 1 x M I R 6 0 4 (
A g r i s u r e B C / L L / R W)、 B t 1 1 x M I R 6 0 4 x 5 3 0 7、 B t 1 1
x M I R 6 0 4 x 5 3 0 7 x G A 2 1、 B t 1 1 x M I R 6 0 4 x G A 2 1、 B t 1 1 x
M I R 6 0 4 x T C 1 5 0 7、 B t 1 1 x M I R 6 0 4 x T C 1 5 0 7 x 5 3 0 7、 B t
1 1 x M I R 6 0 4 x T C 1 5 0 7 x G A 2 1、 B t 1 1 x M O N 8 9 0 3 4 x G A 2 1
、 B t 1 1 x T C 1 5 0 7、 B t 1 1 x T C 1 5 0 7 x 5 3 0 7、 B t 1 1 x T C 1 5 0
7 x G A 2 1、 B t 1 7 6 [1 7 6] (N a t u r G a r d K n o c k O u t / M a x
i m i z e r)、 B V L A 4 3 0 1 0 1、 C B H - 3 5 1 (S T A R L I N K M a i z e)、 D A S 4 0 2 7 8 (E N L I S T M a i z e)、 D A S 4 0 2 7 8 x N K 6 0 3 10
、 D B T 4 1 8 (B t X t r a M a i z e)、 D L L 2 5 [B 1 6]、 G A 2 1 (R
O U N D U P R E A D Y M a i z e / A G R I S U R E G T)、 G A 2 1 x M O N
8 1 0 (R O U N D U P R E A D Y Y i e l d g a r d M a i z e)、 G A 2 1 x
T 2 5、 H C E M 4 8 5、 L Y 0 3 8 (M A V E R A M a i z e)、 L Y 0 3 8 x M O
N 8 1 0 (M A V E R A Y i e l d g a r d M a i z e)、 M I R 1 6 2 (A G R I
S U R E V i p t e r a)、 M I R 1 6 2 x 5 3 0 7、 M I R 1 6 2 x 5 3 0 7 x G A
2 1、 M I R 1 6 2 x G A 2 1、 M I R 1 6 2 x M I R 6 0 4、 M I R 1 6 2 x M I R 6
0 4 x 5 3 0 7、 M I R 1 6 2 x M I R 6 0 4 x 5 3 0 7 x G A 2 1、 M I R 1 6 2 x M
I R 6 0 4 x G A 2 1、 M I R 1 6 2 x M I R 6 0 4 x T C 1 5 0 7 x 5 3 0 7、 M I R
1 6 2 x M I R 6 0 4 x T C 1 5 0 7 x 5 3 0 7 x G A 2 1、 M I R 1 6 2 x M I R 6 0 20
4 x T C 1 5 0 7 x G A 2 1、 M I R 1 6 2 x M O N 8 9 0 3 4、 M I R 1 6 2 x N K 6
0 3、 M I R 1 6 2 x T C 1 5 0 7、 M I R 1 6 2 x T C 1 5 0 7 x 5 3 0 7、 M I R 1
6 2 x T C 1 5 0 7 x 5 3 0 7 x G A 2 1、 M I R 1 6 2 x T C 1 5 0 7 x G A 2 1、 M
I R 6 0 4 (A G R I S U R E R W)、 M I R 6 0 4 x 5 3 0 7、 M I R 6 0 4 x 5 3
0 7 x G A 2 1、 M I R 6 0 4 x G A 2 1 (A G R I S U R E G T / R W)、 M I R 6
0 4 x N K 6 0 3、 M I R 6 0 4 x T C 1 5 0 7、 M I R 6 0 4 x T C 1 5 0 7 x 5 3 0
7、 M I R 6 0 4 x T C 1 5 0 7 x 5 3 0 7 x G A 2 1、 M I R 6 0 4 x T C 1 5 0 7 x
G A 2 1、 M O N 8 0 1 [M O N 8 0 1 0 0]、 M O N 8 0 2、 M O N 8 0 9、 M O N 8
1 0 (Y I E L D G A R D、 M A I Z E G A R D)、 M O N 8 1 0 x M I R 1 6 2、 M O
N 8 1 0 x M I R 1 6 2 x N K 6 0 3、 M O N 8 1 0 x M I R 6 0 4、 M O N 8 1 0 x M 30
O N 8 8 0 1 7 (Y I E L D G A R D V T T r i p l e)、 M O N 8 1 0 x N K 6 0
3 x M I R 6 0 4、 M O N 8 3 2 (R O U N D U P R E A D Y M a i z e)、 M O N
8 6 3 (Y I E L D G A R D R o o t w o r m R W、 M A X G A R D)、 M O N 8 6
3 x M O N 8 1 0 (Y I E L D G A R D P l u s)、 M O N 8 6 3 x M O N 8 1 0 x N
K 6 0 3 (Y I E L D G A R D P l u s 及び
R R)、 M O N 8 6 3 x N K 6 0 3 (Y I E L D G A R D R W + R R)、 M O N 8 7 4
0 3、 M O N 8 7 4 1 1、 M O N 8 7 4 1 9、 M O N 8 7 4 2 7 (R O U N D U P R E
A D Y M a i z e)、 M O N 8 7 4 2 7 x 5 9 1 2 2、 M O N 8 7 4 2 7 x M O N 8 8
0 1 7、 M O N 8 7 4 2 7 x M O N 8 8 0 1 7 x 5 9 1 2 2、 M O N 8 7 4 2 7 x M O N
8 9 0 3 4、 M O N 8 7 4 2 7 x M O N 8 9 0 3 4 x 5 9 1 2 2、 M O N 8 7 4 2 7 x M 40
O N 8 9 0 3 4 x M I R 1 6 2 x M O N 8 7 4 1 1、 M O N 8 7 4 2 7 x M O N 8 9 0 3
4 x M O N 8 8 0 1 7、 M O N 8 7 4 2 7 x M O N 8 9 0 3 4 x M O N 8 8 0 1 7 x 5 9
1 2 2、 M O N 8 7 4 2 7 x M O N 8 9 0 3 4 x N K 6 0 3、 M O N 8 7 4 2 7 x M O N
8 9 0 3 4 x T C 1 5 0 7、 M O N 8 7 4 2 7 x M O N 8 9 0 3 4 x T C 1 5 0 7 x 5 9
1 2 2、 M O N 8 7 4 2 7 x M O N 8 9 0 3 4 x T C 1 5 0 7 x M O N 8 7 4 1 1 x 5 9
1 2 2、 M O N 8 7 4 2 7 x M O N 8 9 0 3 4 x T C 1 5 0 7 x M O N 8 7 4 1 1 x 5 9
1 2 2 x D A S 4 0 2 7 8、 M O N 8 7 4 2 7 x M O N 8 9 0 3 4 x T C 1 5 0 7 x M O
N 8 8 0 1 7、 M O N 8 7 4 2 7 x M O N 8 9 0 3 4 x M I R 1 6 2 x N K 6 0 3、 M O
N 8 7 4 2 7 x M O N 8 9 0 3 4 x T C 1 5 0 7 x M O N 8 8 0 1 7 x 5 9 1 2 2、 M O
N 8 7 4 2 7 x T C 1 5 0 7、 M O N 8 7 4 2 7 x T C 1 5 0 7 x 5 9 1 2 2、 M O N 8 50

7 4 2 7 x T C 1 5 0 7 x M O N 8 8 0 1 7、 M O N 8 7 4 2 7 x T C 1 5 0 7 x M O N
 8 8 0 1 7 x 5 9 1 2 2、 M O N 8 7 4 6 0 (G E N U I T Y D R O U G H T G A R D
)、 M O N 8 7 4 6 0 x M O N 8 8 0 1 7、 M O N 8 7 4 6 0 x M O N 8 9 0 3 4 x M O
 N 8 8 0 1 7、 M O N 8 7 4 6 0 x M O N 8 9 0 3 4 x N K 6 0 3、 M O N 8 7 4 6 0 x
 N K 6 0 3、 M O N 8 8 0 1 7、 M O N 8 8 0 1 7 x D A S 4 0 2 7 8、 M O N 8 9 0 3
 4、 M O N 8 9 0 3 4 x 5 9 1 2 2、 M O N 8 9 0 3 4 x 5 9 1 2 2 x D A S 4 0 2 7 8
 、 M O N 8 9 0 3 4 x 5 9 1 2 2 x M O N 8 8 0 1 7、 M O N 8 9 0 3 4 x 5 9 1 2 2 x
 M O N 8 8 0 1 7 x D A S 4 0 2 7 8、 M O N 8 9 0 3 4 x D A S 4 0 2 7 8、 M O N 8
 9 0 3 4 x M O N 8 7 4 6 0、 M O N 8 9 0 3 4 x M O N 8 8 0 1 7 (G E N U I T Y
 V T T r i p l e P r o)、 M O N 8 9 0 3 4 x M O N 8 8 0 1 7 x D A S 4 0 2 7 8、 M O N 8 9 0 3 4 x N K 6 0 3 (G E N U I T Y V T D o u b l e P r o)、
 M O N 8 9 0 3 4 x N K 6 0 3 x D A S 4 0 2 7 8、 M O N 8 9 0 3 4 x T C 1 5 0 7、
 M O N 8 9 0 3 4 x T C 1 5 0 7 x 5 9 1 2 2、 M O N 8 9 0 3 4 x T C 1 5 0 7 x 5 9
 1 2 2 x D A S 4 0 2 7 8、 M O N 8 9 0 3 4 x T C 1 5 0 7 x D A S 4 0 2 7 8、 M O
 N 8 9 0 3 4 x T C 1 5 0 7 x M O N 8 8 0 1 7、 M O N 8 9 0 3 4 x T C 1 5 0 7 x M
 O N 8 8 0 1 7 x 5 9 1 2 2 (G E N U I T Y S M A R T S T A X)、 M O N 8 9 0 3
 4 x T C 1 5 0 7 x M O N 8 8 0 1 7 x 5 9 1 2 2 x D A S 4 0 2 7 8、 M O N 8 9 0 3
 4 x T C 1 5 0 7 x M O N 8 8 0 1 7 x D A S 4 0 2 7 8、 M O N 8 9 0 3 4 x T C 1 5
 0 7 x N K 6 0 3 (P O W E R C O R E)、 M O N 8 9 0 3 4 x T C 1 5 0 7 x N K 6
 0 3 x D A S 4 0 2 7 8、 M O N 8 9 0 3 4 x T C 1 5 0 7 x N K 6 0 3 x M I R 1 6 2
 、 M O N 8 9 0 3 4 x T C 1 5 0 7 x N K 6 0 3 x M I R 1 6 2 x D A S 4 0 2 7 8、 M
 O N 8 9 0 3 4 x G A 2 1、 M S 3 (I N V I G O R M a i z e)、 M S 6 (I N V I
 G O R M a i z e)、 M Z H G 0 J G、 M Z I R 0 9 8、 N K 6 0 3 (R O U N D U P
 R E A D Y 2 M a i z e)、 N K 6 0 3 x M O N 8 1 0 x 4 1 1 4 x M I R 6 0 4
 、 N K 6 0 3 x M O N 8 1 0 (Y I E L D G A R D C B + R R)、 N K 6 0 3 x T 2 5
 (R O U N D U P R E A D Y L I B E R T Y L I N K M a i z e)、 T 1 4 (L
 I B E R T Y L I N K M a i z e)、 T 2 5 (L I B E R T Y L I N K M a i z
 e)、 T 2 5 x M O N 8 1 0 (L I B E R T Y L I N K Y I E L D G A R D M a i
 z e)、 T C 1 5 0 7 (H E R C U L E X I、 H E R C U L E X C B)、 T C 1 5 0
 7 x 5 9 1 2 2 x M O N 8 1 0 x M I R 6 0 4 x N K 6 0 3 (O P T I M U M I N T R
 A S E C T X T R E M E)、 T C 1 5 0 7 x M O N 8 1 0 x M I R 6 0 4 x N K 6 0 3
 、 T C 1 5 0 7 x 5 3 0 7、 T C 1 5 0 7 x 5 3 0 7 x G A 2 1、 T C 1 5 0 7 x 5 9 1
 2 2 (H E R C U L E X X T R A)、 T C 1 5 0 7 x 5 9 1 2 2 x D A S 4 0 2 7 8、
 T C 1 5 0 7 x 5 9 1 2 2 x M O N 8 1 0、 T C 1 5 0 7 x 5 9 1 2 2 x M O N 8 1 0 x
 M I R 6 0 4、 T C 1 5 0 7 x 5 9 1 2 2 x M O N 8 1 0 x N K 6 0 3 (O P T I M U M
 I N T R A S E C T X T R A)、 T C 1 5 0 7 x 5 9 1 2 2 x M O N 8 8 0 1 7、 T
 C 1 5 0 7 x 5 9 1 2 2 x M O N 8 8 0 1 7 x D A S 4 0 2 7 8、 T C 1 5 0 7 x 5 9 1
 2 2 x N K 6 0 3 (H E R C U L E X X T R A R R)、 T C 1 5 0 7 x 5 9 1 2 2 x
 N K 6 0 3 x M I R 6 0 4、 T C 1 5 0 7 x D A S 4 0 2 7 8、 T C 1 5 0 7 x G A 2 1
 、 T C 1 5 0 7 x M I R 1 6 2 x N K 6 0 3、 T C 1 5 0 7 x M I R 6 0 4 x N K 6 0 3
 (O P T I M U M T R I S E C T)、 T C 1 5 0 7 x M O N 8 1 0、 T C 1 5 0 7 x M
 O N 8 1 0 x M I R 1 6 2、 T C 1 5 0 7 x M O N 8 1 0 x M I R 1 6 2 x N K 6 0 3、
 T C 1 5 0 7 x M O N 8 1 0 x M I R 6 0 4、 T C 1 5 0 7 x M O N 8 1 0 x N K 6 0 3
 (O P T I M U M I N T R A S E C T)、 T C 1 5 0 7 x M O N 8 1 0 x N K 6 0 3 x
 M I R 6 0 4、 T C 1 5 0 7 x M O N 8 8 0 1 7、 T C 1 5 0 7 x M O N 8 8 0 1 7 x D
 A S 4 0 2 7 8、 T C 1 5 0 7 x N K 6 0 3 (H E R C U L E X I R R)、 T C 1 5
 0 7 x N K 6 0 3 x D A S 4 0 2 7 8、 T C 6 2 7 5、 及び V C O - 0 1 9 8 1 - 5。

【 0 3 7 1 】

追加の遺伝子組換え植物

本明細書に記載の方法及び細菌は、様々な遺伝子組換え植物またはその部位のうちの一 50

ずれにも好適である。

【 0 3 7 2 】

さらに、本明細書に記載の方法及び細菌は、1つ以上の国で承認された、以下の遺伝子組換え植物イベントのうちのいずれにも好適である。

【表 1 4】

表 1 4. 本開示の微生物と組み合わせることができるイネ形質

Oryza sativa(イネ)		
イベント	企業	説明
CL121, CL141, CFX51	BASF Inc.	メタンスルホン酸エチル(EMS)を使用したアセト乳酸合成酵素(ALS)の酵素の化学的突然変異誘発によって誘導されるイミダゾリノン除草剤イマゼタピルへの耐性。
IMINTA-1, IMINTA-4	BASF Inc.	アジ化ナトリウムを使用したアセト乳酸合成酵素(ALS)の酵素の化学的突然変異誘発によって誘導されるイミダゾリノン除草剤への耐性。
LLRICE06, LLRICE62	Aventis CropScience	土壌細菌 <i>Streptomyces hygroscopicus</i> 由来の修飾されたホスフィノトリシンアセチルトランスフェラーゼ(PAT)コード遺伝子を挿入することによって生産されるグルホシネートアンモニウム除草剤耐性イネ。
LLRICE601	Bayer CropScience (Aventis CropScience(AgrEvo))	土壌細菌 <i>Streptomyces hygroscopicus</i> 由来の修飾されたホスフィノトリシンアセチルトランスフェラーゼ(PAT)コード遺伝子を挿入することによって生産されるグルホシネートアンモニウム除草剤耐性イネ。
PWC16	BASF Inc.	メタンスルホン酸エチル(EMS)を使用したアセト乳酸合成酵素(ALS)の酵素の化学的突然変異誘発によって誘導されるイミダゾリノン除草剤イマゼタピルへの耐性。

10

20

30

【表 1 5】

表 1 5. 本開示の微生物と組み合わせることができるアルファルファ形質

Medicago sativa(アルファルファ)		
イベント	企業	説明
J101、J163	Monsanto Company 及び Forage Genetics International	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> の CP4 菌株由来の酵素 5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素(EPSPS)コード遺伝子を挿入することにより生産されたグリホサート除草剤耐性アルファルファ(ルーサン)。

40

50

【表 16】

表 16. 本開示の微生物と組み合わせることができるコムギ形質

Triticum aestivum(コムギ)		
イベント	企業	説明
AP205CL	BASF Inc.	酵素アセトヒドロキシ酸合成酵素(AHAS)、別名、アセト乳酸合成酵素(ALS)またはアセト乳酸ピルビン酸リアーゼの突然変異誘発バージョンの選択。
AP602CL	BASF Inc.	酵素アセトヒドロキシ酸合成酵素(AHAS)、別名、アセト乳酸合成酵素(ALS)またはアセト乳酸ピルビン酸リアーゼの突然変異誘発バージョンの選択。
BW255-2、BW238-3	BASF Inc.	酵素アセトヒドロキシ酸合成酵素(AHAS)、別名、アセト乳酸合成酵素(ALS)またはアセト乳酸ピルビン酸リアーゼの突然変異誘発バージョンの選択。
BW7	BASF Inc.	アジ化ナトリウムを使用したアセトヒドロキシ酸合成酵素(AHAS)遺伝子の化学的突然変異誘発によって誘導されるイミダゾリノン除草剤への耐性。
MON71800	Monsanto Company	土壌細菌 Agrobacterium tumefaciens, CP4 菌株由来の修飾された 5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素(EPSPS)コード遺伝子を挿入することによって生産されるグリホサート耐性コムギ品種。
SWP965001	Cyanamid Crop Protection	酵素アセトヒドロキシ酸合成酵素(AHAS)、別名、アセト乳酸合成酵素(ALS)またはアセト乳酸ピルビン酸リアーゼの突然変異誘発バージョンの選択。
Teal 11A	BASF Inc.	酵素アセトヒドロキシ酸合成酵素(AHAS)、別名、アセト乳酸合成酵素(ALS)またはアセト乳酸ピルビン酸リアーゼの突然変異誘発バージョンの選択。

10

20

30

【表 17】

表 17. 本開示の微生物と組み合わせることができるヒマワリ形質

Helianthus annuus(ヒマワリ)		
イベント	企業	説明
X81359	BASF Inc.	天然に存在する突然変異体の選択によるイミダゾリノン除草剤への耐性。

40

50

【表 18 - 1】

表 18. 本開示の微生物と組み合わせることができるダイズ形質

Glycine max L. (ダイズ)		
イベント	企業	説明
A2704-12、A2704-21、A5547-35	Bayer CropScience (Aventis CropScience (AgrEvo))	土壌細菌 <i>Streptomyces viridochromogenes</i> 由来の修飾されたホスフィノトリシンアセチルトランスフェラーゼ(PAT)コード遺伝子を挿入することによって生産されるグルホシネートアンモニウム除草剤耐性ダイズ。
A5547-127	Bayer CropScience (Aventis CropScience (AgrEvo))	土壌細菌 <i>Streptomyces viridochromogenes</i> 由来の修飾されたホスフィノトリシンアセチルトランスフェラーゼ(PAT)コード遺伝子を挿入することによって生産されるグルホシネートアンモニウム除草剤耐性ダイズ。
BPS-CV127-9	BASF Inc.	<i>Arabidopsis thaliana</i> 由来の導入 <i>csrl-2</i> 遺伝子は、653 位のセリン残基がアスパラギンで置換される(S653N)単一のアミノ酸置換をもたらす点突然変異に起因して、イミダゾリノン除草剤への耐性を与えるアセトヒドロキシ酸合成酵素タンパク質をコードする。
DP-305423	Pioneer Hi-Bred International Inc.	オメガ 6 デサチュラーゼコード遺伝子 <i>gm-fad2-1</i> の一部分の追加のコピーを挿入して、内因性オメガ-6 デサチュラーゼ遺伝子(FAD2-1)のサイレンシングをもたらすことによって生産される高オレイン酸ダイズ。
DP356043	Pioneer Hi-Bred International Inc.	グリホサートを解毒するグリホサート N-アセチルトランスフェラーゼ、及び ALS 阻害型除草剤に耐性である修飾されたアセト乳酸合成酵素(ALS)遺伝子の 2 つの除草剤耐性遺伝子を有するダイズイベント。

10

20

30

40

50

【表 18 - 2】

G94-1、G94-19、G168	DuPont Canada Agricultural Products	ダイズ由来の脂肪酸デサチュラーゼ(Gm Fad2-1)コード遺伝子の第2のコピーを挿入し、これにより内因性宿主遺伝子の「サイレンシング」をもたらすことによって生産される高オレイン酸ダイズ。	
GTS 40-3-2	Monsanto Company	土壌細菌 <i>Agrobacterium tumefaciens</i> 由来の修飾された 5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素(EPSPS)コード遺伝子を挿入することによって生産されるグリホサート耐性ダイズ品種。	10
GU262	Bayer CropScience (Aventis CropScience(AgrEvo))	土壌細菌 <i>Streptomyces viridochromogenes</i> 由来の修飾されたホスフィノトリシンアセチルトランスフェラーゼ(PAT)コード遺伝子を挿入することによって生産されるグルホシネートアンモニウム除草剤耐性ダイズ。	
MON87701	Monsanto Company	ベルベットビーンキャタピラー (<i>Anticarsia gemmatalis</i>)及びダイズルーパー(<i>Pseudoplusia includens</i>)を含むダイズの鱗翅目有害生物への耐性。	20
MON87701×MON89788	Monsanto Company	<i>A. tumefaciens</i> , CP4 菌株由来の EPSPS をコードする遺伝子の発現によるグリホサート除草剤耐性、及び <i>B. thuringiensis</i> 由来の Cry1Ac コード遺伝子の発現によるベルベットビーンキャタピラー (<i>Anticarsia gemmatalis</i>)及びダイズルーパー(<i>Pseudoplusia includens</i>)を含むダイズの鱗翅目有害生物への耐性。	20
MON89788	Monsanto Company	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> CP4 由来の修飾された 5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素(EPSPS)コード aroA(epsps)遺伝子を挿入することによって生産されるグリホサート耐性ダイズ。	30
OT96-15	Agriculture & Agri-Food Canada	低リノレン酸のために選択された天然に存在する fan1 遺伝子変異体由来の新たな形質を組み込むために従来の変配によって生産された低リノレン酸ダイズ。	
W62, W98	Bayer CropScience (Aventis CropScience(AgrEvo))	土壌細菌 <i>Streptomyces hygroscopicus</i> 由来の修飾されたホスフィノトリシンアセチルトランスフェラーゼ(PAT)コード遺伝子を挿入することによって生産されるグルホシネートアンモニウム除草剤耐性ダイズ。	40

【表 19 - 1】

表 19. 本開示の微生物と組み合わせることができるトウモロコシ形質

Zea mays L.(トウモロコシ)		
イベント	企業	説明
176	Syngenta Seeds, Inc.	Bacillus thuringiensis 亜種 kurstaki 由来の Cry1Ab 遺伝子を挿入することによって生産される昆虫耐性メイズ。この遺伝子組換えは、ヨーロッパアワノメイガ (ECB)による攻撃への耐性をもたらす。
3751 IR 676, 678, 680	Pioneer Hi-Bred International Inc. Pioneer Hi-Bred International Inc.	イミダゾリノン含有培地上での胚の培養によるソマクロン変異体の選択。それぞれ Escherichia coli 及び Streptomyces viridochromogenes 由来の DNA アデニンメチラーゼ及びホスフィノトリシンアセチルトランスフェラーゼ(PAT)をコードする遺伝子を挿入することによって生産される雄性不稔及びグルホシネートアンモニウム除草剤耐性メイズ。
B16 (DLL25)	Dekalb Genetics Corporation	Streptomyces hygroscopicus 由来のホスフィノトリシンアセチルトランスフェラーゼ (PAT)をコードする遺伝子を挿入することによって生産されるグルホシネートアンモニウム除草剤耐性メイズ。
BT11 (X4334CBR, X4734CBR)	Syngenta Seeds, Inc.	Bacillus thuringiensis 亜種 kurstaki 由来の Cry1Ab 遺伝子、及び S.viridochromogenes 由来のホスフィノトリシン N-アセチルトランスフェラーゼ(PAT)コード遺伝子を挿入することによって生産される昆虫耐性及び除草剤耐性メイズ。
BT11 x GA21	Syngenta Seeds, Inc.	親系統 BT11 (OECD 固有の識別子: SYN-BTO11-1) と GA21 (OECD 固有の識別子: MON-00021-9) の従来 of 交雑育種によって生産されたスタックド耐虫性及び除草剤耐性トウモロコシ。
BT11xMIR162xMIR604xGA21	Syngenta Seeds, Inc.	鞘翅目の有害生物、特にコーンルートワーム有害生物(Diabrotica 種)、ならびにヨーロッパアワノメイガ(ECB、Ostrinia nubilalis)、アメリカタバコガ(CEW、Helicoverpa zea)、ツマジロクサヨトウ (FAW、Spodoptera frugiperda)、及びタマナヤガ(BCW、Agrotis ipsilon)を含むトウモロコシのいくつかの鱗翅目の有害生物への耐性；グリホサート及びグルホシネートアンモニウム含有除草剤への耐性。

10

20

30

40

50

【表 19 - 2】

BT11×MIR162	Syngenta Seeds, Inc.	親系統 BT11(OECD 固有識別子:SYN-BTO11-1)及び MIR162(OECD 固有識別子:SYN-IR162-4)の従来の交雑育種によって生産されるスタックド昆虫耐性及び除草剤耐性メイズ。ヨーロッパアワノメイガへの耐性及び除草剤グルホシネートアンモニウム(Liberty)への耐性は、 <i>Bacillus thuringiensis</i> 亜種 <i>kurstaki</i> 由来の Cry1Ab 遺伝子、及び <i>S.viridochromogenes</i> 由来のホスフィノトリシン N-アセチルトランスフェラーゼ(PAT)コード遺伝子を含有する BT11 に由来する。H. zea、S. frugiperda、A. ipsilon、及び S. albicosta を含む他の鱗翅目の有害生物への耐性は、 <i>Bacillus thuringiensis</i> 菌株 AB88 から vip3Aa 遺伝子を含有する MIR162 から誘導される。	10
BT11×MIR162×MIR604	Syngenta Seeds, Inc.	イベント Bt11 トウモロコシ(OECD 固有識別子:SYNBTO11-1)における <i>Bacillus thuringiensis</i> Cry1Ab デルタ-エンドトキシンタンパク質及びその産生に必要な遺伝物質(ベクターpZO1502 の要素を介して)×イベント MIR162 メイズ(OECD 固有識別子:SYN-IR162-4)における <i>Bacillus thuringiensis</i> Vip3Aa20 殺虫性タンパク質及びその産生に必要な遺伝物質(ベクターpNOV1300 の要素を介して)×イベント MIR604 トウモロコシ(OECD 固有識別子:SYN-IR604-5)における修飾された Cry3A タンパク質及びその産生に必要な遺伝物質(ベクターpZM26 の要素を介して)。	20
CBH-351	Aventis CropScience	<i>Bacillus thuringiensis</i> 亜種 <i>tolworthi</i> 由来の Cry9C タンパク質及び <i>Streptomyces hygroscopicus</i> 由来のホスフィノトリシンアセチルトランスフェラーゼ(PAT)をコードする遺伝子を挿入することによって開発された昆虫耐性及びグルホシネートアンモニウム除草剤耐性メイズ。	30
DAS-06275-8	DOW AgroSciences LLC	<i>Bacillus thuringiensis</i> 変種 <i>aizawai</i> 由来の Cry1F 遺伝子及び <i>Streptomyces hygroscopicus</i> 由来のホスフィノトリシンアセチルトランスフェラーゼ(PAT)を挿入することによって生産される鱗翅目の昆虫耐性及びグルホシネートアンモニウム除草剤耐性メイズ品種。	40

【表 19 - 3】

BT11×MIR604	Syngenta Seeds, Inc.	親系統 BT11(OECD 固有識別子:SYN-BTO11-1)及び MIR604(OECD 固有識別子:SYN-1R6O5-5)の従来 of 交雑育種によって生産されるスタックド昆虫耐性及び除草剤耐性メイズ。ヨーロッパアワノメイガへの耐性及び除草剤グルホシネートアンモニウム(Liberty)への耐性は、 <i>Bacillus thuringiensis</i> 亜種 <i>kurstaki</i> 由来の Cry1Ab 遺伝子、及び <i>S.viridochromogenes</i> 由来のホスフィノトリシン N-アセチルトランスフェラーゼ(PAT)コード遺伝子を含有する BT11 に由来する。コーンルートワーム耐性は、 <i>Bacillus thuringiensis</i> 由来の mCry3A 遺伝子を含有する MIR604 に由来する。	10
BT11×MIR604×GA21	Syngenta Seeds, Inc.	親系統 BT11(OECD 固有識別子:SYN-BTO11-1)、MIR604(OECD 固有識別子:SYN-1R6O5-5)、及び GA21(OECD 固有識別子:MON-00021-9)の従来 of 交雑育種によって生産されるスタックド昆虫耐性及び除草剤耐性メイズ。ヨーロッパアワノメイガへの耐性及び除草剤グルホシネートアンモニウム(Liberty)への耐性は、 <i>Bacillus thuringiensis</i> 亜種 <i>kurstaki</i> 由来の Cry1Ab 遺伝子、及び <i>S.viridochromogenes</i> 由来のホスフィノトリシン N-アセチルトランスフェラーゼ(PAT)コード遺伝子を含有する BT11 に由来する。コーンルートワーム耐性は、 <i>Bacillus thuringiensis</i> 由来の mCry3A 遺伝子を含有する MIR604 に由来する。グリホサート除草剤への耐性は、メイズ由来の修飾された EPSPS 遺伝子を含有する GA21 に由来する。	20
DAS-59122-7	DOW AgroSciences LLC 及び Pioneer Hi-Bred International Inc.	<i>Bacillus thuringiensis</i> 菌株 PS149B1 由来の Cry34Ab1 及び Cry35Ab1 遺伝子を挿入することによって生産されるコーンルートワーム耐性メイズ。 <i>Streptomyces viridochromogenes</i> 由来の PAT コード遺伝子は、選択可能マーカーとして導入された。	30
			40

【表 19 - 4】

DAS-59122-7×TC1507×NK603	DOW AgroSciences LLC 及び Pioneer Hi-Bred International Inc.	親系統 DAS-59122-7(OECD 固有識別子:DAS-59122-7)及び TC1507(OECD 固有識別子:DAS-01507-1)と NK603(OECD 固有識別子:MON-00603-6)の従来 of 交雑育種によって生産されるスタックド昆虫耐性及び除草剤耐性メイズ。コーンルートワーム耐性は、 <i>Bacillus thuringiensis</i> 菌株 P5149B1 由来の Cry34Ab1 及び Cry35Ab1 遺伝子を含有する DAS-59122-7 に由来する。鱗翅目耐性及びグルホシネートアンモニウム除草剤への耐性は、TC1507 に由来する。グリホサート除草剤への耐性は、NK603 に由来する。	10
DBT418	Dekalb Genetics Corporation	<i>Bacillus thuringiensis</i> 亜種 <i>kurstaki</i> 由来の Cry1AC タンパク質及び <i>Streptomyces hygroscopicus</i> 由来のホスフィノトリシンアセチルトランスフェラーゼ(PAT)をコードする遺伝子を挿入することによって開発された昆虫耐性及びグルホシネートアンモニウム除草剤耐性メイズ。	
MIR604×GA21	Syngenta Seeds, Inc.	親系統 MIR604(OECD 固有識別子:SYN-1R605-5)及び GA21(OECD 固有識別子:MON-00021-9)の従来 of 交雑育種によって生産されるスタックド昆虫耐性及び除草剤耐性メイズ。コーンルートワーム耐性は、 <i>Bacillus thuringiensis</i> 由来の mCry3A 遺伝子を含有する MIR604 に由来する。グリホサート除草剤への耐性は、GA21 に由来する。	20
MON80100	Monsanto Company	<i>Bacillus thuringiensis</i> 亜種 <i>kurstaki</i> 由来の Cry1Ab 遺伝子を挿入することによって生産される昆虫耐性メイズ。この遺伝子組換えは、ヨーロッパアワノメイガ(ECB)による攻撃への耐性をもたらす。	30
MON802	Monsanto Company	<i>Bacillus thuringiensis</i> 由来の Cry1Ab タンパク質及び <i>A.tumefaciens</i> , CP4 菌株由来の 5-エノールピルピルシキミ酸-3-リン酸シターゼ(EPSPS)をコードする遺伝子を挿入することにより生産された昆虫耐性及びグリホサート除草剤耐性メイズ。	
MON809	Pioneer Hi-Bred International Inc.	合成 Cry1Ab 遺伝子の導入によるヨーロッパアワノメイガ(<i>Ostrinia nubilalis</i>)への耐性。植物酵素 5-エノールピルピルシキミ酸-3-リン酸合成酵素(EPSPS)の細菌バージョンの導入を介したグリホサート耐性。	40

【表 19 - 5】

MON810	Monsanto Company	Bacillus thuringiensis 亜種 kurstaki HD-1 由来の短縮型の Cry1Ab 遺伝子を挿入することによって生産される昆虫耐性メイズ。この遺伝子組換えは、ヨーロッパアワノメイガ(ECB)による攻撃への耐性をもたらす。	
MON810×LY038	Monsanto Company	親系統 MON810(OECD 識別子:MON-00810-6)及び LY038(OECD 識別子:REN-00038-3)の従来の交雑育種に由来するスタックド昆虫耐性及びリジン含量強化メイズ。	10
MON810×MON88017	Monsanto Company	親系統 MON810(OECD 識別子:MON-00810-6)及び MON88017(OECD 識別子:MON-88017-3)の従来の交雑育種に由来するスタックド昆虫耐性及びグリホサート耐性メイズ。ヨーロッパアワノメイガ(ECB)耐性は、MON810 中に存在する Bacillus thuringiensis 亜種 kurstaki HD-1 由来の短縮型の Cry1Ab 遺伝子に由来する。コーンルートワーム耐性は、MON88017 に存在する Bacillus thuringiensis 亜種 kumamotoensis 菌株 EG4691 由来の Cry3Bb1 遺伝子に由来する。グリホサート耐性は、MON88017 に存在する Agrobacterium tumefaciens, CP4 菌株由来の 5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素(EPSPS)コード遺伝子に由来する。	20
MON832	Monsanto Company	グリホサートオキシダーゼ(GOX)及び芳香族アミノ酸の産生のためのシキミ酸生化学経路に関与する酵素である修飾された 5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素(EPSPS)の粒子ボンバードメントによる導入。	
MON863	Monsanto Company	Bacillus thuringiensis 亜種 kumamotoensis 由来の Cry3Bb1 遺伝子を挿入することによって生産されるコーンルートワーム耐性メイズ。	30
MON863×MON810	Monsanto Company	親系統 MON863(OECD 識別子:MON-00863-5)及び MON810(OECD 識別子:MON-00810-6)の従来の交雑育種に由来するスタックド昆虫耐性トウモロコシ雑種	
MON863×MON810×Monsanto NK603	Monsanto Company	スタックド雑種 MON-00863-5×MON-00810-6 及び NK603(OECD 識別子:MON-00603-6)の従来の交雑育種に由来するスタックド昆虫耐性及び除草剤耐性トウモロコシ雑種。	40

【表 19 - 6】

MON863×NK603	Monsanto Company	親系統 MON863(OECD 識別子:MON-00863-5)及び NK603(OECD 識別子:MON-00603-6)の従来 of 交雑育種に由来するスタックド昆虫耐性及び除草剤耐性トウモロコシ雑種。	
MON87460	Monsanto Company	MON 87460 は、従来のメイズと比較して水制限条件下で収穫高損失の低減を提供するように開発された。MON 87460 における有効性は、挿入された <i>Bacillus subtilis</i> 低温ショックタンパク質 B(CspB)の発現によって誘導される。	10
MON88017	Monsanto Company	<i>Bacillus thuringiensis</i> 亜種 <i>kumamotoensis</i> 菌株 EG4691 由来の Cry3Bb1 遺伝子を挿入することによって生産されるコーンルートワーム耐性メイズ。 <i>Agrobacterium tumefaciens</i> , CP4 菌株由来の 5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素 (EPSPS) コード遺伝子を挿入することによって誘導されるグリホサート耐性。	
MON89034	Monsanto Company	いくつかの鱗翅目の有害生物への耐性を提供する <i>Bacillus thuringiensis</i> 由来の 2 つの異なる殺虫性タンパク質を発現するメイズイベント。	20
MON89034×MON88017	Monsanto Company	親系統 MON89034(OECD 識別子:MON-89034-3)及び MON88017(OECD 識別子:MON-88017-3)の従来 of 交雑育種に由来するスタックド昆虫耐性及びグリホサート耐性メイズ。鱗翅目の昆虫への耐性は、MON89043 中に存在する 2 つの Cry 遺伝子に由来する。コーンルートワーム耐性は、単一の Cry 遺伝子に由来し、グリホサート耐性は、MON88017 中に存在する <i>Agrobacterium tumefaciens</i> 由来の 5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素 (EPSPS) コード遺伝子に由来する。	30
MON89034×NK603	Monsanto Company	親系統 MON89034(OECD 識別子:MON-89034-3)と NK603(OECD 固有識別子:MON-00603-6)の従来 of 交雑育種によって生産されるスタックド昆虫耐性及び除草剤耐性メイズ。鱗翅目の昆虫への耐性は、MON89043 中に存在する 2 つの Cry 遺伝子に由来する。グリホサート除草剤への耐性は、NK603 に由来する。	40

【表 19 - 7】

NK603×MON810	Monsanto Company	親系統 NK603(OECD 識別子:MON-00603-6) 及び MON810(OECD 識別子:MON-00810-6) の従来 of 交雑育種に由来するスタックド昆虫耐性及び除草剤耐性トウモロコシ雑種。	
MON89034×TC1507×MON88017×DAS-59122-7	Monsanto Company 及び Dow AgroSciences LLC 下の Mycogen Seeds	親系統:MON89034、TC1507、MON88017、及び DAS-59 122 の従来 of 交雑育種によって生産されるスタックド昆虫耐性及び除草剤耐性メイズ。地上及び地下昆虫有害生物への耐性ならびにグリホサート及びグルホシネートアンモニウム含有除草剤への耐性。	10
M53	Bayer CropScience (Aventis CropScience(AgrEvo))	Bacillus amyloliquefaciens 由来のバルナーゼリボヌクレアーゼ遺伝子の発現によって引き起こされる雄性不稔性；PPT 耐性は、PPT-アセチルトランスフェラーゼ(PAT)を介するものであった。	
M56	Bayer CropScience (Aventis CropScience(AgrEvo))	Bacillus amyloliquefaciens 由来のバルナーゼリボヌクレアーゼ遺伝子の発現によって引き起こされる雄性不稔性；PPT 耐性は、PPT-アセチルトランスフェラーゼ(PAT)を介するものであった。	
NK603	Monsanto Company	芳香族アミノ酸の産生のためのシキミ酸生化学経路に関与する酵素である修飾された 5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素(EPSPS)の粒子ボンバードメントによる導入。	20
NK603×T25	Monsanto Company	親系統 NK603(OECD 識別子:MON-00603-6) 及び T25(OECD 識別子:ACS-ZM003-2)の従来 of 交雑育種に由来するスタックドグルホシネートアンモニウム及びグリホサート除草剤耐性メイズ雑種。	
T25×MON810	Bayer CropScience (Aventis CropScience(AgrEvo))	親系統 T25(OECD 識別子:ACS-ZM003-2)及び MON810(OECD 識別子:MON-00810-6) の従来 of 交雑育種に由来するスタックド昆虫耐性及び除草剤耐性トウモロコシ雑種。	30
TC1507	Mycogen(Dow AgroSciences 下) ; Pioneer(DuPont 下)	Bacillus thuringiensis 変種 aizawai 由来の Cry1F 遺伝子、及び Streptomyces viridochromogenes 由来のホスフィノトリシン N-アセチルトランスフェラーゼをコードする遺伝子を挿入することによって生産される昆虫耐性及びグルホシネートアンモニウム除草剤耐性メイズ。	
TC1507×NK603	DOW AgroSciences LLC	親系統 1507(OECD 識別子:DAS-O1507-1)及び NK603(OECD 識別子:MON-00603-6)の従来 of 交雑育種に由来するスタックド昆虫耐性及び除草剤耐性トウモロコシ雑種。	40

【表 19 - 8】

TC1507 x DAS-59122-7	DOW AgroSciences LLC 及び Pioneer Hi-Bred International Inc.	親系統 TC1507(OECD 固有識別子:DAS-O1507-1)と DAS-59122-7(OECD 固有識別子:DAS-59122-7)の従来 of 交雑育種によって生産されるスタックド昆虫耐性及び除草剤耐性メイズ。鱗翅目の昆虫への耐性は、 <i>Bacillus thuringiensis</i> 変種 aizawai 由来の Cry1F 遺伝子の存在による TC1507 に由来する。コーンルートワーム耐性は、 <i>Bacillus thuringiensis</i> P5149B1 菌株由来の Cry34Ab1 及び Cry35Ab1 遺伝子を含む DAS-59122-7 に由来する。グルホシネートアンモニウム除草剤への耐性は、 <i>Streptomyces viridochromogenes</i> 由来のホスフィノトリシン N-アセチルトランスフェラーゼコード遺伝子由来の TC1507 に由来する。	
イベント	企業	説明	雑種ファミリー
P0157	Dupont Pioneer		P0157
P0157AM	Dupont Pioneer	AM LL RR2	P0157
P0157AMXT	Dupont Pioneer	AMXT LL RR2	P0157
P0157R	Dupont Pioneer	RR2	P0157
P0339AM	Dupont Pioneer	AM LL RR2	P0339
P0339AMXT	Dupont Pioneer	AMXT LL RR2	P0339
P0306AM	Dupont Pioneer	AM LL RR2	P0306
P0589	Dupont Pioneer		P0589
P0589AM	Dupont Pioneer	AM LL RR2	P0589
P0589AMXT	Dupont Pioneer	AMXT LL RR2	P0589
P0589R	Dupont Pioneer	RR2	P0589
P0574	Dupont Pioneer		P0574
P0574AM	Dupont Pioneer	AM LL RR2	P0574
P0574AMXT	Dupont Pioneer	AMXT LL RR2	P0574
P0533EXR	Dupont Pioneer	HXX LL RR2	P0533
P0506AM	Dupont Pioneer	AM LL RR2	P0566
P0760AMXT	Dupont Pioneer	AMXT LL RR2	P0760
P0707AM	Dupont Pioneer	AM LL RR2	P0707
P0707AMXT	Dupont Pioneer	AMXT LL RR2	P0707
P0825AM	Dupont Pioneer	AM LL RR2	P0825
P0825AMXT	Dupont Pioneer	AMXT LL RR2	P0825
P0969AM	Dupont Pioneer	AM LL RR2	P0969
P0969AMXT	Dupont Pioneer	AMXT LL RR2	P0969
P0937AM	Dupont Pioneer	AM LL RR2	P0937
P0919AM	Dupont Pioneer	AM LL RR2	P0919
P0905EXR	Dupont Pioneer	HXX LL RR2	P0905
P1197	Dupont Pioneer		P1197
P1197AM	Dupont Pioneer	AM LL RR2	P1197
P1197AMXT	Dupont Pioneer	AMXT LL RR2	P1197
P1197R	Dupont Pioneer	RR2	P1197
P1151	Dupont Pioneer		P1151

10

20

30

40

50

【表 19 - 9】

P1151AM	Dupont Pioneer	AM LL RR2	P1151
P1151R	Dupont Pioneer	RR2	P1151
P1138AM	Dupont Pioneer	AM LL RR2	P1138
P1366AM	Dupont Pioneer	AM LL RR2	P1366
P1366AMXT	Dupont Pioneer	AMXT LL RR2	P1366
P1365AMX	Dupont Pioneer	AMX LL RR2	P1365
P1353AM	Dupont Pioneer	AM LL RR2	P1353
P1345	Dupont Pioneer		P1345
P1311AMXT	Dupont Pioneer	AMXT LL RR2	P1311
P1498EHR	Dupont Pioneer	HX1 LL RR2	P1498
P1498R	Dupont Pioneer	RR2	P1498
P1443AM	Dupont Pioneer	AM LL RR2	P1443
P1555CHR	Dupont Pioneer	RW HX1 LL RR2	P1555
P1751AMT	Dupont Pioneer	AMT LL RR2	P1751
P2089AM	Dupont Pioneer	AM LL RR2	P2089
QROME	Dupont Pioneer	Q LL RR2	

10

【0373】

以下は、表19に見出される簡略表記の定義である。AM - YGCB、HX1、LL、RR2を備えるOPTIMUM ACREMAX Insect Protectionシステム。AMT - RW、YGCB、HX1、LL、RR2を備えるOPTIMUM ACREMAX TRISECT Insect Protectionシステム。AMXT - (OPTIMUM ACREMAX XTreme)。HXX - HERCULEX XTRAは、Herculex I及びHerculex RW遺伝子を含む。HX1 - ヨーロッパアワノメイガ、サウスウェスタンアワノメイガ、タマナヤガ、ツマジロクサヨトウ、ウエスタンピンカットワーム、モロコシマダラメイガ、サザンコーンストークボラー、及びサトウキビボラー (sugarcane borer) に対する保護を提供し、アメリカタバコガを抑制するHERCULEX I Insect Protection遺伝子を含む。LL - LIBERTY除草剤への耐性のためのLIBERTYLINK遺伝子を含む。RR2 - ラベルの指示に従って施用されたときにラベル表示されるグリホサート除草剤の出芽後 (over-the-top) 施用に対する安全性を作物に提供するROUNDUP READY Corn 2形質を含む。YGCB - ヨーロッパアワノメイガ、サウスウェスタンアワノメイガ、及びサザンコーンストークボラーへの高レベルの耐性、アメリカタバコガ及びコモンスタークボラーへの中程度の耐性、ならびにツマジロクサヨトウへの平均を上回る耐性を提供するYIELDGARDアワノメイガ遺伝子を含む。RW - AGRISUREルートワーム耐性形質を含む。Q - 感受性のあるヨーロッパアワノメイガ、サウスウェスタンアワノメイガ、タマナヤガ、ツマジロクサヨトウ、モロコシマダラメイガ、サザンコーンストークボラー、ストークボラー、サトウキビボラー、及びアメリカタバコガに対する保護または抑制を提供し、また、感受性のあるウエスタンコーンルートワーム、ノーザンコーンルートワーム、及びメキシカンコーンルートワームによって引き起こされる幼虫による損傷からの保護を提供し、(1) Cry1F及びCry34ab1及びCry35ab1タンパク質をもたらすHERCULEX XTRA Insect Protection遺伝子、(2) mCry3Aタンパク質をもたらす遺伝子を含むAGRISURE RW形質、ならびに(3) Cry1Abタンパク質をもたらすYIELDGARDアワノメイガ遺伝子を含む。

20

30

40

【0374】

農業組成物の施用濃度及び施用量

前述のように、教示される微生物を含む、本開示の農業組成物は、複数の方式で植物に

50

施用することができる。2つの特定の態様では、本開示では、畦間処理剤または種子処理剤が企図される。

【0375】

種子処理剤の実施形態では、本開示の微生物は、様々な濃度で種子上に存在することができる。例えば、微生物は、1種子当たり 1×10^1 、 1×10^2 、 1×10^3 、 1×10^4 、 1×10^5 、 1×10^6 、 1×10^7 、 1×10^8 、 1×10^9 、 1×10^{10} 、またはそれよりも高いcfu濃度で種子処理剤中に見出すことができる。特定の態様では、種子処理剤組成物は、1種子当たり約 1×10^4 ~ 約 1×10^8 cfuを含む。他の特定の態様では、種子処理剤組成物は、1種子当たり約 1×10^5 ~ 約 1×10^7 cfuを含む。他の態様では、種子処理剤組成物は、1種子当たり約 1×10^6 cfuを含む。

10

【0376】

米国では、トウモロコシ作付面積の約10%は、1エーカー当たり約36,000種子を超える種子密度で植栽され、トウモロコシ作付面積の1/3は、1エーカー当たり約33,000 ~ 36,000種子の種子密度で植栽され、トウモロコシ作付面積の1/3は、1エーカー当たり約30,000 ~ 33,000種子の種子密度で植栽され、残りの作付面積は様々である。www.pioneer.com/home/site/us/agronomy/library/corn-seeding-rate-considerations/にて入手可能な、Steve Butzen著、「Corn Seeding Rate Considerations」を参照のこと。

20

【0377】

下記の表20では、企図される種子処理剤の実施形態における1種子当たりの種々のcfu濃度(行)及び種々の種子作付け植栽密度(第1の欄: 15K ~ 41K)を利用して、種々の農業シナリオで利用されよう1エーカー当たりのcfuの総計量が算出されている(すなわち、1種子当たりの種子処理剤濃度 x 1エーカー当たりの植栽種子密度)。故に、1種子当たり 1×10^6 cfuで種子処理剤を利用し、1エーカー当たり30,000種子を植栽したとすると、1エーカー当たりの総cfu含量は、 3×10^{10} (すなわち、 $30K * 1 \times 10^6$)になる。

【表20 - 1】

表20. 種子処理剤の実施形態についての1エーカー当たりの総CFUの算出

トウモロコシ 集団(すなわち、 1エーカー当 たりの種子)	1.00E+02	1.00E+03	1.00E+04	1.00E+05	1.00E+06	1.00E+07	1.00E+08	1.00E+09
15,000	1.50E+06	1.50E+07	1.50E+08	1.50E+09	1.50E+10	1.50E+11	1.50E+12	1.50E+13
16,000	1.60E+06	1.60E+07	1.60E+08	1.60E+09	1.60E+10	1.60E+11	1.60E+12	1.60E+13

30

40

50

【表 20 - 2】

トウモロコシ 集団(すなわち、 1エーカー当た りの種子)	1.00E+02	1.00E+03	1.00E+04	1.00E+05	1.00E+06	1.00E+07	1.00E+08	1.00E+09
17,000	1.70E+06	1.70E+07	1.70E+08	1.70E+09	1.70E+10	1.70E+11	1.70E+12	1.70E+13
18,000	1.80E+06	1.80E+07	1.80E+08	1.80E+09	1.80E+10	1.80E+11	1.80E+12	1.80E+13
19,000	1.90E+06	1.90E+07	1.90E+08	1.90E+09	1.90E+10	1.90E+11	1.90E+12	1.90E+13
20,000	2.00E+06	2.00E+07	2.00E+08	2.00E+09	2.00E+10	2.00E+11	2.00E+12	2.00E+13
21,000	2.10E+06	2.10E+07	2.10E+08	2.10E+09	2.10E+10	2.10E+11	2.10E+12	2.10E+13
22,000	2.20E+06	2.20E+07	2.20E+08	2.20E+09	2.20E+10	2.20E+11	2.20E+12	2.20E+13
23,000	2.30E+06	2.30E+07	2.30E+08	2.30E+09	2.30E+10	2.30E+11	2.30E+12	2.30E+13
24,000	2.40E+06	2.40E+07	2.40E+08	2.40E+09	2.40E+10	2.40E+11	2.40E+12	2.40E+13
25,000	2.50E+06	2.50E+07	2.50E+08	2.50E+09	2.50E+10	2.50E+11	2.50E+12	2.50E+13
26,000	2.60E+06	2.60E+07	2.60E+08	2.60E+09	2.60E+10	2.60E+11	2.60E+12	2.60E+13
27,000	2.70E+06	2.70E+07	2.70E+08	2.70E+09	2.70E+10	2.70E+11	2.70E+12	2.70E+13
28,000	2.80E+06	2.80E+07	2.80E+08	2.80E+09	2.80E+10	2.80E+11	2.80E+12	2.80E+13
29,000	2.90E+06	2.90E+07	2.90E+08	2.90E+09	2.90E+10	2.90E+11	2.90E+12	2.90E+13
30,000	3.00E+06	3.00E+07	3.00E+08	3.00E+09	3.00E+10	3.00E+11	3.00E+12	3.00E+13
31,000	3.10E+06	3.10E+07	3.10E+08	3.10E+09	3.10E+10	3.10E+11	3.10E+12	3.10E+13
32,000	3.20E+06	3.20E+07	3.20E+08	3.20E+09	3.20E+10	3.20E+11	3.20E+12	3.20E+13
33,000	3.30E+06	3.30E+07	3.30E+08	3.30E+09	3.30E+10	3.30E+11	3.30E+12	3.30E+13
34,000	3.40E+06	3.40E+07	3.40E+08	3.40E+09	3.40E+10	3.40E+11	3.40E+12	3.40E+13
35,000	3.50E+06	3.50E+07	3.50E+08	3.50E+09	3.50E+10	3.50E+11	3.50E+12	3.50E+13
36,000	3.60E+06	3.60E+07	3.60E+08	3.60E+09	3.60E+10	3.60E+11	3.60E+12	3.60E+13
37,000	3.70E+06	3.70E+07	3.70E+08	3.70E+09	3.70E+10	3.70E+11	3.70E+12	3.70E+13
38,000	3.80E+06	3.80E+07	3.80E+08	3.80E+09	3.80E+10	3.80E+11	3.80E+12	3.80E+13
39,000	3.90E+06	3.90E+07	3.90E+08	3.90E+09	3.90E+10	3.90E+11	3.90E+12	3.90E+13
40,000	4.00E+06	4.00E+07	4.00E+08	4.00E+09	4.00E+10	4.00E+11	4.00E+12	4.00E+13
41,000	4.10E+06	4.10E+07	4.10E+08	4.10E+09	4.10E+10	4.10E+11	4.10E+12	4.10E+13

10

20

30

40

【0378】

畦間の実施形態の場合、本開示の微生物は、1エーカー当たり 1×10^6 、 3.20×10^{10} 、 1.60×10^{11} 、 3.20×10^{11} 、 8.0×10^{11} 、 1.6×10^{12} 、 3.20×10^{12} 、またはそれよりも高い cfu 濃度で施用することができる。したがって、複数の態様では、液体畦間組成物は、1エーカー当たり約 1×10^6 ~ 約 3×10^{12} cfu の濃度で施用することができる。

【0379】

いくつかの態様では、畦間組成物は、液体製剤に含まれる。液体畦間の実施形態では、微生物は、 1×10^1 、 1×10^2 、 1×10^3 、 1×10^4 、 1×10^5 、 1×10^6 、

50

1×10^7 、 1×10^8 、 1×10^9 、 1×10^{10} 、 1×10^{11} 、 1×10^{12} 、 1×10^{13} 、またはそれよりも高い1ミリリットル当たりのcfu濃度で存在することができる。特定の態様では、液体畦間組成物は、1ミリリットル当たり約 1×10^6 ～約 1×10^{11} cfuの濃度で微生物を含む。他の態様では、液体畦間組成物は、1ミリリットル当たり約 1×10^7 ～約 1×10^{10} cfuの濃度で微生物を含む。他の態様では、液体畦間組成物は、1ミリリットル当たり約 1×10^8 ～約 1×10^9 cfuの濃度で微生物を含む。他の態様では、液体畦間組成物は、1ミリリットル当たり最大約 1×10^{13} cfuの濃度で微生物を含む。

【0380】

候補微生物のトランスクリプトームプロファイリング

本発明者らによる以前の研究は、環境窒素の存在下で活性であるプロモーターを同定するために、C I 0 1 0 菌株のトランスクリプトミクスプロファイリングを必要とした。C I 0 1 0 菌株は、10 mM グルタミンを添加補充した規定された窒素不含培地で培養した。これらの培養物から全RNAを抽出し(Q I A G E N R N e a s y キット)、I l l u m i n a H i S e q (S e q M a t i c , F r e m o n t C A) によるRNAseq配列決定に供した。配列決定リードを、Geneiousを使用してC I 0 1 0 ゲノムデータにマッピングし、近位転写プロモーターの制御下で高度に発現された遺伝子を特定した。

【0381】

表21～23には、全RNAのRNAseq配列決定により測定された、遺伝子及びそれらの相対的発現レベルが列挙される。nif経路、窒素利用関連経路、または所望の発現レベルを有する他の遺伝子の突然変異誘発に使用するための近位プロモーターの配列が記録された。

【表21】

名称	最小	最大	長さ	方向
ムレインリポタンパク質 CDS	2,929,898	2,930,134	237	フォワード
膜タンパク質 CDS	5,217,517	5,217,843	327	フォワード
亜鉛/カドミウム結合タンパク質 CDS	3,479,979	3,480,626	648	フォワード
アシル担体タンパク質 CDS	4,563,344	4,563,580	237	リバーズ
ompX CDS	4,251,002	4,251,514	513	フォワード
DNA 結合タンパク質 HU-betaCDS	375,156	375,428	273	フォワード
sspA CDS	629,998	630,636	639	リバーズ
tatE CDS	3,199,435	3,199,638	204	リバーズ
LexA リプレッサーCDS	1,850,457	1,851,065	609	フォワード
hisS CDS	<3999979	4,001,223	>1245	フォワード

10

20

30

40

50

【表 2 2】

名称	差次的発 現絶対信 頼度	差次的 発現比	RNASeq_ nifL-生リ ード数	RNASeq_ nifL-生転 写物数	RNASeq_ _WT-生 リード数	RNASeq_ _WT-生 転写物数
ムレインリポタン パク質 CDS	1000	-1.8	12950.5	10078.9	5151.5	4106.8
膜タンパク質 CDS	1000	-1.3	9522.5	5371.3	5400	3120
亜鉛/カドミウム結 合タンパク質 CDS	3.3	1.1	6461	1839.1	5318	1550.6
アシル担体タンパ ク質 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 結合タンパク 質 HU-ベータ CDS	6.9	-1.3	1305	881.7	725	501.8
sspA CDS	0.2	1	654	188.8	504.5	149.2
tatE CDS	1.4	1.3	131	118.4	125	115.8
LexA リプレッサー CDS	0.1	-1.1	248	75.1	164	50.9
hisS CDS	0	-1.1	467	69.2	325	49.3

10

20

【表 2 3】

名称	Prm (フォワード方向で は、-250~+10 領域) 配列番号	発現配列 配列番号	近隣配列 配列番号
ムレインリポタンパク質 CDS	配列番号 3	配列番号 13	配列番号 23
膜タンパク質 CDS	配列番号 4	配列番号 14	配列番号 24
亜鉛/カドミウム結合タンパク 質 CDS	配列番号 5	配列番号 15	配列番号 25
アシル担体タンパク質 CDS	配列番号 6	配列番号 16	配列番号 26
ompX CDS	配列番号 7	配列番号 17	配列番号 27
DNA 結合タンパク質 HU-ベータ CDS	配列番号 8	配列番号 18	配列番号 28
sspA CDS	配列番号 9	配列番号 19	配列番号 29
tatE CDS	配列番号 10	配列番号 20	配列番号 30
LexA リプレッサーCDS	配列番号 11	配列番号 21	配列番号 31
hisS CDS	配列番号 12	配列番号 22	配列番号 32

30

40

50

【表 2 4 - 1】

表 2 4. 菌株の表

名称	系統	変異原性 DNA の説明	遺伝子型	遺伝子 1 突然変異	遺伝子 2 突然変異
CI006	Enterobacter (現在は Kosakonia) 属由来の単離された菌株	なし	WT		
CI008	Burkholderia 属由来の単離された菌株	なし	WT		
CI010	Klebsiella 属由来の単離された菌株	なし	WT		
CI019	Rahnella 属由来の単離された菌株	なし	WT		
CI028	Enterobacter 属由来の単離された菌株	なし	WT		
CI050	Klebsiella 属由来の単離された菌株	なし	WT		
CM002	CI050 の突然変異体	nifL 遺伝子の破壊と、アミノグリコシド O-ホスホトランスフェラーゼ遺伝子 aph1 をコードするカナマイシン耐性発現カセット (KanR) の挿入。	Δ nifL::KanR	配列番号 33	
CM011	CI019 の突然変異体	nifL 遺伝子の破壊と、ストレプトマイシン 3"-O-アデニリトランスフェラーゼ遺伝子 aadA をコードするスペクチノマイシン耐性発現カセット (SpecR) の挿入。	Δ nifL::SpecR	配列番号 34	
CM013	CI006 の突然変異体	nifL 遺伝子の破壊と、アミノグリコシド O-ホスホトランスフェラーゼ遺伝子 aph1 をコードするカナマイシン耐性発現カセット (KanR) の挿入。	Δ nifL::KanR	配列番号 35	
CM004	CI010 の突然変異体	amtB 遺伝子の破壊と、アミノグリコシド O-ホスホトランスフェラーゼ遺伝子 aph1 をコードするカナマイシン耐性発現カセット (KanR) の挿入。	Δ amtB::KanR	配列番号 36	

10

20

30

40

50

【表 2 4 - 2】

CM005	CI010 の突然変異体	nifL 遺伝子の破壊と、アミノグリコシド O-ホスホトランスフェラーゼ遺伝子 aph1 をコードするカナマイシン耐性発現カセット (KanR) の挿入。	Δ nifL::KanR	配列番号 37	
CM015	CI006 の突然変異体	nifL 遺伝子の破壊と、ompX 遺伝子上流領域の断片の挿入 (Prm5)。	Δ nifL::Prm5	配列番号 38	
CM021	CI006 の突然変異体	nifL 遺伝子の破壊と、未注釈遺伝子上流領域の断片及びその遺伝子の最初の 73bp の挿入 (Prm2)。	Δ nifL::Prm2	配列番号 39	
CM023	CI006 の突然変異体	nifL 遺伝子の破壊と、acpP 遺伝子上流領域の断片及び acpP 遺伝子の最初の 121bp の挿入 (Prm4)。	Δ nifL::Prm4	配列番号 40	
CM014	CI006 の突然変異体	nifL 遺伝子の破壊と、lpp 遺伝子上流領域の断片及び lpp 遺伝子の最初の 29bp の挿入 (Prm1)。	Δ nifL::Prm1	配列番号 41	
CM016	CI006 の突然変異体	nifL 遺伝子の破壊と、lexA 3 遺伝子上流領域の断片及び lexA 3 遺伝子の最初の 21bp の挿入 (Prm9)。	Δ nifL::Prm9	配列番号 42	
CM022	CI006 の突然変異体	nifL 遺伝子の破壊と、mntP 1 遺伝子上流領域の断片及び mntP 1 遺伝子の最初の 53bp の挿入 (Prm3)。	Δ nifL::Prm3	配列番号 43	
CM024	CI006 の突然変異体	nifL 遺伝子の破壊と、sspA 遺伝子上流領域の断片の挿入 (Prm7)。	Δ nifL::Prm7	配列番号 44	

10

20

30

40

50

【表 2 4 - 3】

CM025	CI006 の突然変異体	nifL 遺伝子の破壊と、hisS 遺伝子の上流領域の断片及び hisS 遺伝子の最初の 52bp の挿入(Prm10)。	Δ nifL::Prm10	配列番号 45	
CM006	CI010 の突然変異体	glnB 遺伝子の破壊と、アミノグリコシド O-ホスホトランスフェラーゼ遺伝子 aph1 をコードするカナマイシン耐性発現カセット (KanR) の挿入。	Δ glnB::KanR	配列番号 46	
CM017	CI028 の突然変異体	nifL 遺伝子の破壊と、アミノグリコシド O-ホスホトランスフェラーゼ遺伝子 aph1 をコードするカナマイシン耐性発現カセット (KanR) の挿入。	Δ nifL::KanR	配列番号 47	
CM011	CI019 の突然変異体	nifL 遺伝子の破壊と、ストレプトマイシン 3"-O-アデニリルトランスフェラーゼ遺伝子 aadA をコードするスペクチノマイシン耐性発現カセット (SpecR) の挿入。	Δ nifL::SpecR	配列番号 48	
CM013	CI006 の突然変異体	nifL 遺伝子の破壊と、アミノグリコシド O-ホスホトランスフェラーゼ遺伝子 aph1 をコードするカナマイシン耐性発現カセット (KanR) の挿入。	Δ nifL::KanR	配列番号 49	
CM005	CI010 の突然変異体	nifL 遺伝子の破壊と、アミノグリコシド O-ホスホトランスフェラーゼ遺伝子 aph1 をコードするカナマイシン耐性発現カセット (KanR) の挿入。	Δ nifL::KanR	配列番号 50	

10

20

30

40

50

【表 2 4 - 4】

CM014	CI006 の突然変異体	nifL 遺伝子の破壊と、lpp 遺伝子の上流領域の断片及び lpp 遺伝子の最初の 29bp の挿入(Prm1)。	Δ nifL::Prm1	配列番号 51	
CM015	CI006 の突然変異体	nifL 遺伝子の破壊と、ompX 遺伝子上流領域の断片の挿入(Prm5)。	Δ nifL::Prm5	配列番号 52	
CM023	CI006 の突然変異体	nifL 遺伝子の破壊と、acpP 遺伝子上流領域の断片及び acpP 遺伝子の最初の 121bp の挿入(Prm4)。	Δ nifL::Prm4	配列番号 53	
CM029	CI006 の突然変異体	nifL 遺伝子の破壊と、ompX 遺伝子上流領域の断片の挿入(Prm5)、及びグルタミン酸アンモニアリガーゼアデニリルトランスフェラーゼのアデニリル除去ドメインを含有する glnE 遺伝子の開始コドンの後の 1287bp の欠失(Δ glnE-AR_KO1)。	Δ nifL::Prm5 Δ glnE-AR_KO1	配列番号 54	配列番号 61
CM014	CI006 の突然変異体	nifL 遺伝子の破壊と、lpp 遺伝子上流領域の断片及び lpp 遺伝子の最初の 29bp の挿入(Prm1)。	Δ nifL::Prm1	配列番号 55	
CM011	CI019 の突然変異体	nifL 遺伝子の破壊と、ストレプトマイシン 3"-O-アデニリルトランスフェラーゼ遺伝子 aadA をコードするスペクチノマイシン耐性発現カセット(SpecR)の挿入。	Δ nifL::SpecR	配列番号 56	
CM011	CI019 の突然変異体	nifL 遺伝子の破壊と、ストレプトマイシン 3"-O-アデニリルトランスフェラーゼ遺伝子 aadA をコードするスペクチノマイシン耐性発現カセット(SpecR)の挿入。	Δ nifL::SpecR	配列番号 57	

10

20

30

40

50

【表 2 4 - 5】

CM013	CI006 の突然変異体	nifL 遺伝子の破壊と、アミノグリコシド O-ホスホトランスフェラーゼ遺伝子 aphI をコードするカナマイシン耐性発現カセット (KanR) の挿入。	Δ nifL::KanR	配列番号 58	
CM011	CI019 の突然変異体	nifL 遺伝子の破壊と、ストレプトマイシン 3"-O-アデニリルトランスフェラーゼ遺伝子 aadA をコードするスペクチノマイシン耐性発現カセット (SpecR) の挿入。	Δ nifL::SpecR	配列番号 59	10
CM011	CI019 の突然変異体	nifL 遺伝子の破壊と、ストレプトマイシン 3"-O-アデニリルトランスフェラーゼ遺伝子 aadA をコードするスペクチノマイシン耐性発現カセット (SpecR) の挿入。	Δ nifL::SpecR	配列番号 60	20

【 0 3 8 2 】

商品及び保険取引

図 5 0 は、いくつかの実施形態による、金融商品及び保険商品の取引のためのシステム図である。図 5 0 に示すように、システム 5 0 0 0 は、第 1 の計算装置 5 0 0 2、第 3 の (例えば、遠隔) 計算装置 5 0 0 4、オプションで購入者計算装置 5 0 0 6、及びオプションで保険提供者計算装置 5 0 0 8 を含む。第 1 の計算装置 5 0 0 2、第 3 の計算装置 5 0 0 4、購入者計算装置 5 0 0 6、及び保険提供者計算装置 5 0 0 8 のそれぞれは、例えば、電気通信ネットワーク (「ネットワーク N」として図 5 0 に示される) を介して、他のものと有線または無線通信することができる。第 1 の計算装置 5 0 0 2 は、メモリ 5 0 0 5 及び通信インターフェース (例えば、無線アンテナ) 5 0 0 3 に動作可能に結合されたプロセッサ 5 0 0 1 を含む。メモリ 5 0 0 5 は、例えば、本明細書に示され、説明されているように、ならびに図 5 1 ~ 5 3 を参照して、アクションを実行するための命令を含むデータ及び/またはプロセッサ実行可能コードを格納することができる。図 5 0 に示すように、第 1 の計算装置 5 0 0 2 のメモリ 5 0 0 5 は、収穫高値 5 0 0 5 A、標準偏差 5 0 0 5 B、価格計算機 5 0 0 5 C、先物取引データ 5 0 0 5 D、金融商品データ 5 0 0 5 E、オーダー 5 0 0 5 F、オファー 5 0 0 5 G、保険商品データ 5 0 0 5 H、価格データ 5 0 0 5 J、及び取引データ 5 0 0 5 K のうちの 1 つ以上を含むことができる。メモリ 5 0 0 5 に格納されたデータのいずれか (例えば、収穫高値 5 0 0 5 A、標準偏差 5 0 0 5 B、先物取引データ 5 0 0 5 D、金融商品データ 5 0 0 5 E、オーダー 5 0 0 5 F、オファー 5 0 0 5 G、保険商品データ 5 0 0 5 H、価格データ 5 0 0 5 J、及び取引データ 5 0 0 5 K) は、現地で (すなわち、第 1 の計算装置 5 0 0 2 において及び/またはプロセッサ 5 0 0 1 を使用して) 生成することができる、及び/または第 1 の計算装置 5 0 0 2 で (及びその通信インターフェース 5 0 0 3 を使用して) 1 つ以上の遠隔計算装置から受信することができる。例えば、図 5 0 に示すように、保険商品データ 5 0 0 5 G 及び/ま

30

40

50

たは収穫高値 5 0 0 5 A は、ネットワーク N を介して、第 3 の計算装置 5 0 0 4 から受信することができる。そのようなデータは、オプションで、そのようなデータを取得する要求、またはそのようなデータのクエリに回答して、第 1 の計算装置 5 0 0 2 で受信され、第 1 の計算装置 5 0 0 2 からリモート（例えば、第 3 の）計算装置に送信される。いくつかの実装では、オーダー 5 0 0 5 F は、（ネットワーク N を介して、通信インターフェース 5 0 0 3 を使用して）第 1 の計算装置 5 0 0 2 で、購入者計算装置 5 0 0 6 で受信でき、オーダー 5 0 0 5 F の受信及び承認に回答して、1 つ以上の先物契約 5 0 0 5 D を、第 1 の計算装置 5 0 0 2 から、ネットワーク N を介して、購入者計算装置 5 0 0 6 に送信することができる。あるいは、またはさらに、いくつかの実装では、オファー 5 0 0 5 G は、第 1 の計算装置 5 0 0 2 から（ネットワーク N を介して、及び通信インターフェース 5 0 0 3 を使用して）保険提供者計算装置 5 0 0 6 に送信され得、オファー 5 0 0 5 G の受信及び承認に回答して、オファーの受諾を表す信号 5 0 0 9 を、保険提供者計算装置 5 0 0 6 から第 1 の計算装置 5 0 0 2 に、ネットワーク N を介して送ることができる。

10

【 0 3 8 3 】

図 5 1 は、いくつかの実施形態による、細菌コロニー形成植物（例えば、トウモロコシ植物）の収穫高値に基づいて販売する作物の量を決定するための方法を示す流れ図である。図 5 1 の方法は、例えば、図 5 0 のシステム 5 0 0 0 を使用して実施することができる。図 5 1 に示されるように、方法 5 1 0 0 は、5 1 0 2 において、プロセッサを介して、及びプロセッサに動作可能に結合されたデータベース（例えば、トウモロコシ収穫高データを含む）から、細菌コロニー形成植物の収穫高値を取得することを含む。収穫高値には、細菌がコロニー形成していない植物の収穫高値の標準偏差よりも低い、関連する標準偏差を有する。収穫高値に関連する標準偏差は、例えば、1 エーカー当たりのブッシェル（例えば、1 エーカー当たり 1 9 ブッシェル未満）で測定することができる。細菌コロニー形成植物の収穫高値は、細菌がコロニー形成していない対応するまたは類似の植物の収穫高値の 1 ~ 1 0 % 以内であり得る。プロセッサは、5 1 0 4 で、プロセッサに動作可能に結合されたデータベースから、ある量の細菌コロニー形成植物の現在及び将来の販売に関連する価格を取得する。5 1 0 6 で、プロセッサは、細菌コロニー形成植物の収穫高値と現在及び将来の販売価格に基づいて、細菌コロニー形成植物の物理的送達量を計算する。細菌コロニー形成植物の物理的送達量は、細菌コロニー形成植物の予測物理的送達量であり得るか、またはそれを含み得る（例えば、細菌がコロニーを形成していない植物のより低い収穫高をこれまで生成してきた土地で成長した細菌コロニー形成植物の予測量）。

20

30

【 0 3 8 4 】

方法 5 1 0 0 はまた、5 1 0 8 で、細菌コロニー形成植物の計算された物理的送達量に基づいて市場ベース商品を識別することと、5 1 1 0 で、識別された市場ベース商品を取引するための命令を表す信号をプロセッサを介して送信することを含む（例えば、流通市場内）。市場ベース商品は、例えば、先渡取引、先物取引、オプション取引、及び/または商品スワップ取引であり得るか、またはそれを含み得る。識別された市場ベース商品を取引するための命令には、取引シンボルを含めることができる。5 1 1 2 で、プロセッサは、識別された市場ベース商品を取引するための命令を送信することに対応して、識別された市場ベース商品の取引の確認を表す信号を受信する。識別された市場ベース商品の取引の確認を表す信号が、アプリケーションプログラミングインターフェース（API）を介してプロセッサで受信することができる。

40

【 0 3 8 5 】

方法 5 1 0 0 のいくつかの実装では、物理的送達量の計算は、細菌コロニー形成植物に関連する成長期の前に実行される。あるいは、またはそれに加えて、識別された市場ベース商品の取引は、細菌コロニー形成植物に関連する成長期の前に実行される。方法 5 1 0 0 は、任意選択で、細菌コロニー形成植物の物理的送達量を生成することも含む。

【 0 3 8 6 】

いくつかの実施形態では、方法 5 1 0 0 の細菌コロニー形成植物を生産することは、（1）場所に、それぞれ、1 時間当たり C F U 当たり N の少なくとも約 5.49×10^{-1}

50

3 mmol の固定Nを生成する、複数の非属間リモデリング細菌を提供することと、(2)該場所にコロニー形成前植物を提供することと、を含む。

【0387】

いくつかの実施形態では、細菌コロニー形成植物は、生物学的窒素固定、及び/または導入操作されたN固定微生物を使用して生産される。

【0388】

いくつかの実施形態では、細菌コロニー形成植物は、関連する作物のために大気中の窒素を固定することができる微生物を使用して生産される。

【0389】

図52は、いくつかの実施形態による、細菌コロニー形成植物(例えば、トウモロコシ植物)の収穫高値に基づいて、保険商品の価格設定及び取引を行うための方法を示す流れ図である。図51の方法は、例えば、図50のシステム5000を使用して実施することができる。図52に示されるように、方法5200は、5202において、提案された保険商品に関する情報をプロセッサを介して受信することを含む。5204において、プロセッサは、細菌コロニー形成植物の収穫高値に基づいて、提案された保険商品の価格を計算する。細菌コロニー形成植物の収穫高値には、細菌がコロニー形成していない植物の収穫高値の標準偏差よりも低い、関連する標準偏差を有する。任意選択で、方法5200はまた、5206において、販売者の計算装置から、保険を販売するオファーを表す信号を送信するプロセッサを含む。保険を販売するオファーには、提案された保険商品の計算価格が含まれている。保険を販売するオファーを表す信号は、アプリケーションプログラミングインターフェイス(API)を介して送信することができる。保険を販売するオファーを表す信号には、オプションで、細菌コロニー形成植物の収穫高値も含まれる。方法5200はまた、任意選択で、提案された保険商品の計算された価格を送信することに対応して、プロセッサ(5208)で、保険を販売するオファーの受諾を表す信号を受信することを含むことができる。保険を販売するオファーの受諾を表すシグナルは、APIを介して受信することができる。

【0390】

いくつかの実施形態では、提案された保険商品の価格の計算は、細菌コロニー形成植物に関連する成長期の前に実行される。あるいは、またはそれに加えて、保険を販売するオファーを表す信号の送信は、細菌コロニー形成植物に関連する成長期の前に実行される。

【0391】

いくつかの実施形態では、収穫高値は、(1)場所に、それぞれ、1時間当たりCFU当たりNの少なくとも約 $5.49 \times 10^{-13} \text{ mmol}$ の固定Nを生成する、複数の非属間リモデリング細菌を提供することと、(2)該場所にコロニー形成前植物を提供することと、を含む、プロセスによる細菌コロニー形成植物の生産に基づく。

【0392】

いくつかの実施形態では、方法5200はまた、コロニー形成前植物を使用して、(1)場所に、それぞれ、1時間当たりCFU当たりNの少なくとも約 $5.49 \times 10^{-13} \text{ mmol}$ の固定Nを生成する、複数の非属間リモデリング細菌を提供することと、(2)該場所にコロニー形成前植物を提供することと、によって細菌コロニー形成植物を生産することを含む。

【0393】

いくつかの実施形態では、収穫高値は、導入操作されたN固定微生物を使用することを含むプロセスによる細菌コロニー形成植物の生産、生物学的窒素固定を使用することを含むプロセスによる細菌コロニー形成植物の生産、または関連する作物のために大気中の窒素を固定することができる微生物を使用することを含むプロセスによる細菌コロニー形成植物の生産のうちの1つ以上に基づく。

【0394】

いくつかの実施形態では、商品(例えば、トウモロコシなどの作物)の価値を高める方法は、栄養素供給微小生物の存在下で商品を栽培することによって商品の収穫高のばらつ

10

20

30

40

50

きを減らすことを含む。この方法は、任意選択で、商品を販売することができる複数の市場のそれぞれについて、商品の販売のための複数の異なる価格を決定することも含む。商品の収穫高のばらつきは、例えば、農業従事者の圃場全体の商品の収穫高のばらつきを含むことができる。あるいは、またはさらに、商品の収穫高のばらつきは、気象条件に応じたばらつきに実質的に起因する可能性がある。商品の収穫高のばらつきを減少させることにより、商品の販売者は、商品のより高い価格の市場への商品の販売を増やすことができ、または商品の販売者は、商品のより低い価格の市場への商品の販売を減らすことができる。

【0395】

いくつかの実施形態では、商品の価格がより高い市場は、商品の生産シーズンの前に発生する市場を含む。 10

【0396】

いくつかの実施形態では、商品の価格がより低い市場は、商品の生産シーズンの後に発生する市場を含む。

【0397】

いくつかの実施形態では、栄養素供給微小生物の存在下で作物を成長させることは、作物への提供された1つ以上の栄養素の利用可能性を改善する。1つ以上の栄養素は、例えば、窒素を含むことができ、微小生物は、窒素固定細菌であり得る。

【0398】

いくつかの実施形態では、商品（例えば、トウモロコシなどの作物）の保険費用を低減する方法は、栄養素供給微小生物の存在下で商品を栽培することによって商品の収穫高のばらつきを減らすことを含む。商品の収穫高のばらつきは、例えば、農業従事者の圃場全体の商品の収穫高のばらつきを含むことができる。あるいは、またはさらに、商品の収穫高のばらつきは、気象条件に応じたばらつきに実質的に起因する可能性がある。栄養素供給微小生物の存在下で作物を成長させることは、作物への提供された1つ以上の栄養素の利用可能性を改善することができる。1つ以上の栄養素は、例えば、窒素を含むことができ、微小生物は、窒素固定細菌であり得る。 20

【0399】

「自動的に」という用語は、本明細書では、ユーザーなどの外部ソースによる直接入力またはプロンプトなしで発生するアクションを変更するために使用される。自動的に発生するアクションは、定期的、散発的に、検出されたイベント（例えば、ユーザーのログイン）に回答して、または所定のスケジュールに従って発生する可能性がある。 30

【0400】

「判断すること」という用語には、様々なアクションが含まれており、したがって、計算すること、算出すること、処理すること、抽出すること、調査すること、調べること（例えばテーブル、データベースまたは別のデータ構造内を調べる）、確認することなどを含んでもよい。また「判断すること」は、受信すること（例えば、情報を受信すること）、アクセスすること（例えば、メモリ内のデータにアクセスすること）などを含んでもよい。また「判断すること」は、解決すること、選択すること、選出すること、確立することなどを含んでもよい。 40

【0401】

「に基づく」という表現は、特に明記されていない限り、「のみに基づく」という意味ではない。言い換えれば、「に基づく」という句は、「のみに基づく」及び「少なくとも~に基づく」の両方を表す。

【0402】

「プロセッサ」という用語は、汎用プロセッサ、中央処理装置（CPU）、マイクロプロセッサ、デジタルシグナルプロセッサ（DSP）、コントローラ、マイクロコントローラ、ステートマシンなどを含むように広く解釈されるべきである。状況によっては、「プロセッサ」は、特定用途向け集積回路（ASIC）、プログラマブルロジックデバイス（PLD）、フィールドプログラマブルゲートアレイ（FPGA）などを指す場合がある。 50

「プロセッサ」という用語は、処理デバイスの組み合わせ、例えば、DSPとマイクロプロセッサの組み合わせ、複数のマイクロプロセッサ、DSPコアもしくは他のそのような構成と組み合わせた1つ以上のマイクロプロセッサ、を指す場合がある。

【0403】

「メモリ」という用語は、電子情報を格納できる任意の電子コンポーネントを含むように広く解釈されるべきである。メモリという用語は、ランダムアクセスメモリ(RAM)、読み取り専用メモリ(ROM)、不揮発性ランダムアクセスメモリ(NVRAM)、プログラム可能な読み取り専用メモリ(PROM)、消去可能なプログラム可能な読み取り専用メモリ(EPROM)、電氣的に消去可能なPROM(EEPROM)、フラッシュメモリ、磁気または光データストレージ、レジスタなどを指す場合がある。メモリは、プロセッサがメモリから情報を読み出したり、及び/またはメモリに情報を書き込んだりできる場合、プロセッサと電子的に通信していると言われる。プロセッサと一体化したメモリは、プロセッサと電子的に通信している。

10

【0404】

「命令」及び「コード」という用語は、あらゆるタイプのコンピュータ可読ステートメント(複数可)を含むように広く解釈されるべきである。例えば、「命令」及び「コード」という用語は、1つ以上のプログラム、ルーチン、サブルーチン、関数、プロシージャなどを指す場合がある。「命令」及び「コード」は、単一のコンピュータ可読ステートメントまたは多数のコンピュータ可読ステートメントを含む場合がある。

【0405】

本明細書に記載のいくつかの実施形態は、様々なコンピュータ実装操作を実行するための命令またはコンピュータコードをその上に有する非一時的コンピュータ可読媒体(非一時的プロセッサ可読媒体とも呼ばれる)を備えたコンピュータ記憶製品に関する。コンピュータ可読媒体(またはプロセッサ可読媒体)は、それ自体が一時的な伝播信号(例えば、空間またはケーブルなどの伝達媒体上で情報を運ぶ伝播電磁波)を含まないという意味で非一時的である。メディア及びコンピュータコード(コードとも呼ばれる)は、特定の目的(複数可)のために設計及び構築されたものである場合がある。非一時的コンピュータ可読記憶媒体の例は、例えばハードディスク、フロッピー(登録商標)ディスク、及び磁気テープなどの磁気記録媒体、例えばコンパクトディスク/デジタルビデオディスク(CD/DVD)、コンパクトディスク-読み取り専用メモリ(CD-ROM)などの光記録媒体、及びホログラム・デバイス、光ディスクなどの光磁気記録媒体、搬送波信号処理モジュール、及び特定用途向け集積回路(ASIC)、プログラマブルロジックデバイス(PLD)、読み取り専用メモリ(ROM)、ランダム・アクセス・メモリ(RAM)デバイスなど、プログラムコードを格納及び実行するために特別に構成されたハードウェアデバイスが挙げられるが、これらに限定されない。本明細書に記載される他の実施形態は、例えば、本明細書に記載される命令及び/またはコンピュータコードを含むことができるコンピュータプログラム製品に関する。

20

30

【0406】

いくつかの実施形態及び/または本明細書に記載の方法は、ソフトウェア(ハードウェア上で実行される)、ハードウェア、またはそれらの組み合わせによって実行することができる。ハードウェアモジュールには、例えば、汎用プロセッサ、フィールドプログラマブルゲートアレイ(FPGA)、及び/または特定用途向け集積回路(ASIC)が挙げられる。ソフトウェアモジュール(ハードウェア上で実行)は、C、C++、Java(登録商標)、Ruby、Visual Basic(商標)、及び/または他のオブジェクト指向、手続き型、または他のプログラミング言語及び開発ツールを含むさまざまなソフトウェア言語(例えば、コンピュータコード)で表現できる。コンピュータコードの例としては、マイクロコードまたはマイクロ命令、例えばコンパイラによって生成される機械命令、ウェブサービスを作成するためのコード、インタプリタを使用してコンピュータが実行する高レベルの命令を含むファイルなどが挙げられるが、これらに限定されるものではない。例えば、実施形態は、必須のプログラミング言語(例えば、C、Fortran

40

50

など)、関数型プログラミング言語 (Haskell、Erlang など)、論理プログラミング言語 (例えば、プロログ)、オブジェクト指向プログラミング言語 (例えば、Java、C++ など)、または他の適切なプログラミング言語、及び/または開発ツールを使用して実施され得る。コンピュータコードの追加の例は、制御信号、暗号化コード、及び圧縮コードが挙げられるが、これらに限定されるものではない。

【0407】

様々な概念を1つ以上の方法として具体化することができ、その少なくとも1つの例が提供されている。方法の一部として実行される行為は、任意の適切な方法でオーダーすることができる。したがって、例示的な実施形態において連続的な行為として示されているとしても、行為が図示とは異なる順序で実施される実施形態を構築することができ、これは、いくつかの行為を同時に実施することを含み得る。言い換えると、このような機能は必ずしも特定の実行順序に限定されるものではなく、本開示と一致する方法で連続に、非同期に、並行に、並列に、同時に、同期に、などで実行することができる任意の数のスレッド、プロセス、サービス、サーバーなどであってもよいことを理解されたい。したがって、これらの機能のいくつかは、単一の実施形態に同時に存在することができないという点で、相互に矛盾している可能性がある。同様に、一部の機能はイノベーションの1つの側面に適用でき、他の側面には適用できない。

10

【0408】

本明細書で使用される場合、特定の実施形態では、数値の前にあるときの「約」または「ほぼ」という用語は、値をプラスまたはマイナス10%の範囲で設定する。値の範囲が提供される場合、文脈が別途明確に指示しない限り、下限値の単位の10分の1までの、その範囲の上限値から下限値の間の各介在値、ならびにその表示範囲の任意の他の表示値または介在値が、本発明に包含されることが理解される。これらのより小さい範囲の上限値及び下限値は、より小さい範囲内に独立して含まれてもよく、また、表示範囲内の任意の具体的な除外限度に従って、本開示にも包含される。表示範囲が1つまたは両方の限界値を含む場合、それらの含まれる限定値の片方または両方を除外する範囲もまた、本発明に含まれる。

20

【0409】

本明細書及び実施形態において本明細書で使用される不定冠詞「a」及び「an」は、反対に明確に示されない限り、「少なくとも1つ」を意味すると理解されるべきである。

30

【0410】

本明細書及び実施形態において本明細書で使用される「及び/または」という表現は、そのように結合された要素の「いずれかまたは両方」を意味すると理解すべきであり、すなわち、ある場合には結合的に存在し、他の場合には分離的に存在する要素を意味する。「及び/または」で記載されている複数の要素は、同じ方法で、すなわち、そのように結合された要素の「1つ以上」と解釈されるべきである。「及び/または」節によって具体的に識別される要素以外の他の要素は、具体的に識別される要素に関連するかどうかにかかわらず、任意選択で存在し得る。したがって、非限定的な例として、「A及び/またはB」という表現は、「含む」などのオープンエンドな表現と組み合わせて使用すると、ある実施形態では、Aのみ(任意にB以外の要素を含む)、別の実施形態では、Bのみ(任意にA以外の要素を含む)、さらに別の実施形態では、A及びBの両方(任意に他の要素を含む)などを指すことができる。

40

【0411】

本明細書及び実施形態において本明細書で使用される「または」は、上述した「及び/または」と同じ意味を有すると解釈されるものとする。例えば、リスト内の項目を分ける場合、「または」または「及び/または」は、包括的である、つまり、少なくとも1つを含むだけでなく、多数もしくはリストの要素の1つ以上も含んでおり、且つ、任意的にリスト外の項目も追加的に含んでいる、と解釈されるものとする。「1つのみ(only one of)」または「1つのみ(exactly one of)」など、反対に明確に記載された用語のみ、多数もしくはリストの要素の1要素のみを含むことを意味して

50

もよい。一般に、本明細書内で使用する語句「または」は、「いずれか」、「～のうちの1つ」、「～のうちの1つのみ (only one of)」、または「～のうち1つのみ (exactly one of)」のような排他的な用語が前にある場合、排他的代替物（つまり、一方または他方であり、両方ではない）を示していると解釈される。実施形態で使用される場合、「～から本質的になる」は、特許法の分野で使用される通常の意味を有するものとする。

【0412】

本明細書及び実施形態において本明細書で使用される場合、1つ以上の要素のリストを参照して「少なくとも1つ」という語句は、要素のリスト内の任意の1つ以上の要素から選択される少なくとも1つの要素を意味すると理解されるべきであり、必ずしも要素のリスト内に具体的に列挙された各要素の少なくとも1つを含む必要はなく、要素のリスト内の要素の任意の組み合わせを排除するものではない。この定義はまた、具体的に識別された要素に関連しているかどうかにかかわらず、「少なくとも1つ」という語句が指す要素のリスト内で具体的に識別される要素以外の要素が任意に存在することを可能にする。したがって、非限定的な例として、「A及びBの少なくとも1つ」（または同等に「AまたはBの少なくとも1つ」、または同等に「A及び/またはBの少なくとも1つ」）は、一実施形態では、少なくとも1つ、任意に2つ以上のAを指すことができ、Bは含まない（さらに任意にB以外の要素を含む）。別の実施形態では、少なくとも1つ、任意に2つ以上のBを指すことができ、Aは含まない（さらに任意にA以外の要素を含む）。さらに別の実施形態では、少なくとも1つ、任意に2つ以上のAを指すことができ、及び、少なくとも1つ、任意に2つ以上のBを指すことができる（さらに任意に他の要素を含む）。

10

20

【0413】

上記の明細書と同様に実施形態において、「含む (comprising)」、「含む (including)」、「担持する」、「有する」、「含む (containing)」、「含む (involving)」、「保持する」、「構成する」などの全ての移行句は、オープンエンドである、すなわち、それを含むがそれに限定されることはないということの意味する、と理解されるべきである。「～からなる」及び「本質的に～からなる」という移行句のみが、米国特許商標庁の特許審査便覧第2111.03項に記載されているように、それぞれクローズドまたはセミクローズドな移行句であるものとする。

【0414】

商品及び保険価格

出願人は、半共生的微生物を使用して作物に栄養素を供給すると、圃場条件の不均一性（例えば、土壌タイプの違いまたは気象条件に起因する違い）に起因する可能性のある作物収穫高の不均一性を予期せず減少させる可能性があることを発見した。例えば、本開示のリモデリングされた微生物を含む窒素固定微生物を介した窒素の供給は、農業従事者が所与の一連の作付面積から生じる収穫高をより正確に予測することを可能にする。リモデリングされた微生物により、収穫高の分布が著しく小さくなり、すなわち、標準偏差が小さくなるため、農業従事者は自分の土地で期待される収穫高をより正確に予測することができる。これは、所与の成長期に農業従事者が直面する可能性のある土壌タイプまたは気象条件に関係なく当てはまり、これは、リモデリングされた微生物生成物が植物にとどまり、悪天候または問題のある土壌でも、季節を通じて植物にNを提供するためである。農業従事者の作付面積における収穫結果の予測可能性/信頼性が向上することで、農業従事者は所与の契約日に需要を満たすことができると確信できるため、シーズン初めに購入オプションをより積極的に取り入れることができる。この結果、農業従事者はシーズン中に自分の製品を持って「現物市場」に出向く必要がなくなる、というのも教示の微生物生成物を使用して作物に窒素を供給することで、農業従事者が緊密な収穫高の分布を得ることができ、つまり収穫高の予測可能性が高まり、圃場全体の収穫高の不均一性が少なくなるという知識/データに基づいて、シーズン前に自信を持って作物を販売することができたからである。次に、本明細書に開示されるリモデリングされた窒素固定微生物の使用など、作物栄養素の提供に半共生的微生物を使用することにより、農業従事者は、伝統的に施

30

40

50

用される栄養素、例えば、収穫高のばらつきがより大きい伝統的な窒素肥料の施用、を使用して生産される作物よりも、収穫された作物からより大きな価値を得ることが期待される。

【0415】

教示された微生物などの半共生的微生物を利用することで、収穫高の予測可能性が高まる（収穫高のばらつきが減る）ことによる別の結果は、生産履歴に基づく収穫高保険（APH）保険契約の価格が下がることである。これらの保険は、自然原因（例えば、天災、干ばつ、過湿、雹、風、霜、虫、病気など）による生産者の収穫高損失を保証するものである。生産者は、保証する平均収穫高の量を選択する（例えば、50～75%またはおそらく最大85%）。生産者はまた、RMAによって毎年確立される作物価格の55～100パーセントの間で、保証する予測価格のパーセントを選択する。収穫されたものと評価された生産物が保証された収穫高より少ない場合、生産者はその差額に基づいて補償金を支払われる。補償金は、この差額に、作物保険加入時に選択された価格のうち保険対象となった割合と保険対象のシェアを掛けて計算される。本開示のリモデリングされた微生物は収穫高の予測可能性を向上させるため、保険会社は、収穫された収穫高と成長期の開始時に保証された収穫高との間にデルタがないことを、より正確かつ自信を持って予測することができる。

10

【実施例】

【0416】

以下の実施例は、本開示の様々な実施形態を説明する目的で与えられており、いかなる方法でも本開示を限定することを意図するものではない。特許請求の範囲によって定義されるような、本開示の趣旨内に包含される本実施例の変更及び他の使用が、当業者には認識されよう。

20

【0417】

実施例1：誘導型微生物リモデリング - 農業用微生物種の合理的な改善のためのプラットフォーム

誘導型微生物リモデリング（GMR）プラットフォームの実施形態の例となる概要は、図1Aの概略図に要約することができる。

【0418】

図1Aは、微小生物の組成が最初に特徴付けされ得、目的の種が特定される（例えば、適切なコロニー形成特性を有する微生物を見出すために）ことを例示する。

30

【0419】

目的の種の代謝をマッピングし、遺伝的特質に関連付けることができる。例えば、微生物の窒素固定経路を特徴付けることができる。特徴付けされている経路は、幅広い環境条件下で検査することができる。例えば、その環境中の種々のレベルの外因性窒素の存在下で大気中の窒素を固定する微生物の能力を検査することができる。窒素の代謝は、AmtBトランスポーターを介した根圏から細菌のサイトゾルへのアンモニア（ NH_4^+ ）の進入を伴い得る。アンモニア及びL-グルタミン酸（L-Glu）が、グルタミン合成酵素及びATPによって触媒されてグルタミンとなる。グルタミンは、細菌バイオマスの形成につながり得、またそれはnifオペロンの発現を阻害し得る、すなわち、それは微生物に大気中の窒素を固定させ、アンモニアを排出させることを望む場合、それは競合する力であり得る。窒素固定経路は、本明細書の前の節でより詳細に特徴付けされている。

40

【0420】

その後、コンジュゲーション及び組換え、化学的突然変異誘発、適応進化、及び遺伝子編集を含むがこれらに限定されない方法を使用して、標的化された非属間ゲノム改変を微生物のゲノムに導入することができる。標的化された非属間ゲノム改変には、ゲノムの挿入、破壊、欠失、改変、挿入、修飾などが含まれ得る。

【0421】

次いで、基盤となる遺伝子型のリモデリングからもたらされる所望の表現型を含む、リモデリングされた誘導体微生物を作物の接種に使用する。

50

【 0 4 2 2 】

本開示は、特定の実施形態では、大気中の窒素を固定して、そのような窒素を植物に供給することができる、リモデリングされた非属間微生物を提供する。複数の態様では、これらのリモデリングされた非属間微生物は、外因性窒素が存在する場合であっても大気中の窒素を固定することができる。

【 0 4 2 3 】

図 1 B は、マイクロバイオームステップの測定 of 拡大図を示す。いくつかの実施形態では、本開示は、所望のコロニー形成特性を有する微生物種を発見し、次いで、それらの種をその後のリモデリングプロセスにおいて利用する。

【 0 4 2 4 】

これより、前述の誘導型微生物リモデリング (G M R) プラットフォームをより具体的に記載する。

【 0 4 2 5 】

複数の態様では、 G M R プラットフォームは、以下のステップを含む。

【 0 4 2 6 】

A . 単離 - 目的の作物の土壌、根圏、表面などから微生物を得る。

【 0 4 2 7 】

B . 特徴付け - 目的の遺伝子型 / 表現型 (例えば、ゲノム配列、コロニー形成能力、窒素固定活性、 P 可溶化能力、目的の代謝物の排出、植物促進化合物の排出など) に関して、単離された微生物を特徴付けすることを伴う。

【 0 4 2 8 】

C . 順化 - 微生物の非属間遺伝子改変のための分子プロトコルの開発。

【 0 4 2 9 】

D . 非属間操作計画及び最適化 - 主要な経路 (例えば、コロニー形成関連遺伝子、窒素固定 / 同化遺伝子、 P 可溶化遺伝子) に遺伝子組換えを有する誘導体非属間微生物菌株の生成。

【 0 4 3 0 】

E . 分析 - *in vitro* (例えば、 A R A アッセイ) 及び植物内 (例えば、コロニー形成アッセイ) の両方での目的の表現型に関する誘導された非属間菌株の評価。

【 0 4 3 1 】

F . 操作計画 / アナリティクスの反復 - 微生物菌株のさらなる改善のためのステップ D 及び E の反復

【 0 4 3 2 】

これより、 G M R プラットフォームプロセスステップの各々を下記で詳述する。

【 0 4 3 3 】

A . 微生物の単離

【 0 4 3 4 】

1 . 土壌試料を得る

【 0 4 3 5 】

微生物を植物の土壌及び / または根から単離する。一例では、植物を研究室または温室において小さな鉢で栽培する。種々の農業地帯から土壌試料を得る。例えば、ローム (例えば、泥炭質粘土ローム、砂質ローム)、粘土質土壌 (例えば、重粘土、シルト質粘土)、砂質土壌、シルト質土壌、泥炭質土壌、白亜質土壌などを含めた、多様なテクスチャ特性を有する土壌を収集することができる。

【 0 4 3 6 】

2 . 餌植物の栽培

【 0 4 3 7 】

餌植物 (目的の植物) の種子 (例えば、トウモロコシ、コムギ、イネ、モロコシ、キビ、ダイズ、野菜、果物など) が各土壌タイプに植栽される。一例では、異なる品種の餌植物を種々の土壌タイプに植栽する。例えば、目的の植物がトウモロコシである場合、圃場

10

20

30

40

50

トウモロコシ、スイートコーン、ヘリテージコーン (heritage corn) などといった異なる品種のトウモロコシの種子を、上述の種々の土壌タイプに植栽する。

【0438】

3. 土壌及び/または根試料を収穫し、適切な培地にプレートする

【0439】

数週間 (例えば、2~4週間) の成長後、植物を根ごと引き抜くことによって収穫する。植物を研究室/温室で栽培する代わりに、目的の植物の土壌及び/または根を、異なる土壌タイプを有する圃場から直接収集することができる。

【0440】

根圏微生物及び着生菌を単離するためには、根の損傷を回避するように土壌を蒸留水で浸すかまたは土壌を手で穏やかにほぐすことによって、植物を穏やかに取り出す。より大きな土壌粒子が存在する場合、静置された蒸留水のプールに根を浸漬することによって及び/または根を穏やかに振り動かすことによって、これらの粒子を除去する。根を切断し、根を少量の蒸留水と共にプレートまたは管に入れ、プレート/管をシェーカーで穏やかに振とうするかまたは管を低速で遠心分離することによって根に固着している土壌のスラリーを調製する。このスラリーを下記に記載されるように処理する。

10

【0441】

内生菌を単離するためには、根表面上の余分の土壌を脱イオン水で除去する。土壌の除去後、植物を表面滅菌し、滅菌水で激しくすすぐ。清浄化した根の1cm薄片を植物から切除し、3mmのスチールピースを含有するリン酸緩衝生理食塩水液に入れる。Q i a g e n T i s s u e L y s e r I I を含む溶液を激しく振とうすることによってスラリーを生成する。

20

【0442】

土壌及び/または根のスラリーは、単離されるべき微生物の植物に有益な所望の形質に応じて種々の方式で処理することができる。例えば、土壌及び根のスラリーを希釈し、種々のタイプのスクリーニング培地に接種して、根圏性、内生性、着生性、及び他の植物付随性微生物を単離することができる。例えば、所望の植物に有益な形質が窒素固定である場合、土壌/根のスラリーを無窒素培地 (例えば、N f b 寒天培地) にプレートして、窒素固定微生物を単離する。同様に、リン酸可溶性細菌 (P S B) を単離するためには、リンの唯一の供給源としてリン酸カルシウムを含有する培地を使用することができる。P S B は、リン酸カルシウムを可溶化し、より高い量でリンを同化及び放出することができる。この反応は、プレート上のハローゾーンまたはクリアゾーンとして顕在化し、これを P S B の単離のための最初のステップとして使用することができる。

30

【0443】

4. コロニーを採集し、培養物を精製し、目的の遺伝子の存在に関してスクリーニングする

【0444】

ステップA3で得られた微生物の集団を画線培養して、単一のコロニー (純粋な培養物) を得る。純粋な培養物の一部を好適な培地 (例えば、R 2 A 及びグリセロールの混合物) 中に再懸濁し、P C R 分析に供して、1つ以上の目的の遺伝子の存在に関してスクリーニングする。例えば、窒素固定細菌 (ジアゾトロフ) を特定するためには、単離された微生物の精製培養物を P C R 分析に供して、大気中の窒素を生存生物に利用可能な形態の窒素へと固定することに関与する酵素をコードする n i f 遺伝子の存在を検出することができる。

40

【0445】

5. 精製培養物を貯蔵する

【0446】

今後の参照及び分析のために、単離された菌株の精製培養物を、例えば - 8 0 で保管する。

【0447】

50

B. 単離された微生物の特徴付け

【0448】

1. 系統学的特徴付け及び全ゲノム配列決定

【0449】

単離された微生物を系統学的特徴付けに関して分析し（属及び種の割り当て）、微生物の全ゲノムを配列決定する。

【0450】

系統学的特徴付けのために、縮重16S rDNAプライマーを使用して、単離された微生物の16S rDNAを配列決定して、系統学的同一性を生成する。16S rDNAシーケンスリードはデータベースにマッピングされ、分離された微生物の属、種、及び菌株名が最初に割り当てられる。全ゲノム配列決定法を最終ステップとして使用して、系統学的属/種を微生物に割り当てる。

【0451】

単離された微生物の全ゲノムを配列決定して、主要な経路を特定する。全ゲノム配列決定のために、ゲノムDNA単離キット（例えば、QIAGENからのQIAmp DNA Mini Kit）を使用してゲノムDNAを単離し、当該技術分野で既知の方法を使用して全DNAライブラリーを調製する。当該技術分野で既知のハイスループット配列決定（次世代配列決定法とも呼ばれる）法を使用して全ゲノムを配列決定する。例えば、Illumina, Inc., Roche、及びPacific Biosciencesにより、全DNAライブラリーを調製し、全ゲノム配列決定を実施するために使用され得る全ゲノム配列決定ツールが提供される。

【0452】

単離された各菌株の全ゲノム配列を構築し、目的の遺伝子を特定し、注釈を行い、リモデリングのための潜在的な標的として記載する。全ゲノム配列をデータベースに保管する。

【0453】

2. 温室における宿主植物でのコロニー形成に関して微生物をアッセイする

【0454】

温室における宿主植物のコロニー形成に関して単離された微生物を特徴付けする。このために、所望の宿主植物（例えば、トウモロコシ、コムギ、イネ、モロコシ、ダイズ）の種子に、単離された微生物の培養物を個々にまたは組み合わせて接種し、土壌に植栽する。代替として、根の上から直接土壌に接種することによって、単離された微生物の培養物を個々にまたは組み合わせて、宿主植物の根に施用することができる。例えば、下記により詳細に記載される定量的PCR（qPCR）法を使用して、微生物のコロニー形成ポテンシャルをアッセイする。

【0455】

3. 小規模圃場試験において宿主植物でのコロニー形成に関して微生物をアッセイし、コロニー形成された根試料からRNAを単離する（CAT試験）

【0456】

小規模圃場試験において所望の宿主植物でのコロニー形成に関して単離された微生物を評価する。さらに、RNAはコロニー形成された根試料から単離され、圃場環境での菌株のトランスクリプトームデータを取得する。これらの小規模圃場試験は、圃場環境での菌株のコロニー形成及び転写データを提供するため、本明細書ではCAT（コロニー形成及び転写）試験と呼ばれる。

【0457】

これらの試験のために、宿主植物（例えば、トウモロコシ、コムギ、イネ、モロコシ、ダイズ）の種子に、単離された微生物の培養物を、個々にまたは組み合わせて使用して接種し、土壌に植栽する。代替として、根の上から直接土壌に接種することによって、単離された微生物の培養物を個々にまたは組み合わせて、宿主植物の根に施用することができる。CAT試験を様々な土壌で及び/または種々の温度及び/または水分条件下で実施し

て、コロニー形成ポテンシャルを評価し、種々の土壌タイプ及び環境条件での微生物のトランスクリプトームプロファイルを得ることができる。

【0458】

例えば、下記に記載されるようなqPCR法を使用して、接種された微生物（複数可）による宿主植物の根でのコロニー形成を評価する。

【0459】

1つのプロトコルでは、単離された微生物のコロニー形成ポテンシャルを以下のように評価した。トウモロコシ種子の植栽から1日後、1mlの微生物の一晚培養物（SOB培地）を、ちょうど種子が位置する箇所で灌注した。1mlのこの一晚培養物は、どの菌株が使用されているかに応じて互いに3倍以内で変動しつつ、大まかに約 10^9 cfuと同等であった。各実生を、2.5mMまたは0.25mMのいずれかの硝酸アンモニウムを添加補充した50mlの改変ホーグランド溶液で週3回施肥した。植栽から4週間後、DNA抽出のために根試料を収集した。加圧水噴霧を使用して土壌残屑を洗い流した。次いで、QIAGEN TissueLyzrを使用してこれらの組織試料をホモジナイズし、推奨されるプロトコルに従ってQIAmp DNA Mini Kit（QIAGEN）を使用してDNAを抽出した。Stratagene Mx3005P RT-PCRを使用して、微生物のゲノムの各々における遺伝子座に特異的であるように（NCBIのプライマーBLASTを使用して）設計されたプライマーを使用して、これらのDNA抽出物に対してqPCRアッセイを実施した。

【0460】

微生物のコロニー形成ポテンシャルを反映する、微生物のゲノムコピーの存在を定量した。PCR増幅産物を配列決定することによって微生物種の同一性を確認した。

【0461】

加えて、コロニー形成された根及び/または土壌試料からRNAを単離し、配列決定した。

【0462】

DNAプロファイルとは異なり、RNAプロファイルは、環境条件に応じて様々である。したがって、コロニー形成された根及び/または土壌から単離されたRNAの配列決定は、根圏における植物内での遺伝子の転写活性を反映することになる。

【0463】

RNAを、異なる時点で、コロニー形成された根及び/または土壌試料から単離して、これらの時点でのコロニー形成された微生物のRNAプロファイルの変化を分析することができる。

【0464】

例えば、RNAを、圃場の施肥直後及び圃場の施肥から数週間後に、コロニー形成された根及び/または土壌試料から単離し、配列決定して、対応する転写プロファイルを生成することができる。

【0465】

同様に、RNA配列決定を高リン酸及び低リン酸条件下で実施して、これらの条件下での遺伝子が、転写活性があるかまたは転写抑制されているかを理解することができる。

【0466】

トランスクリプトーム/RNA配列決定のための方法は、当該技術分野で既知である。簡潔に述べると、単離された微生物の精製培養物から全RNAを単離し、逆転写酵素を使用してcDNAを調製し、上述のハイスループット配列決定ツールを使用してcDNAを配列決定する。

【0467】

トランスクリプトーム分析からの配列決定リードをゲノム配列にマッピングすることができ、目的の遺伝子の転写プロモーターを特定することができる。

【0468】

4. 単離された微生物の植物に有益な活性をアッセイする

10

20

30

40

50

【0469】

単離された微生物の植物に有益な活性を評価する。

【0470】

例えば、アセチレン還元アッセイ (ARA) を使用して窒素固定活性に関して窒素固定微生物をアッセイするか、またはリン酸可溶化に関してリン酸可溶化微生物をアッセイする。目的の任意のパラメータを利用することができ、そのようなものに適切なアッセイを開発することができる。例えば、アッセイは、コロニー形成測定基準に関する成長曲線、及び植物ホルモン様インドール酢酸 (IAA) またはジベレリンの産生に関するアッセイを含むことが可能である。関心対象となる任意の植物に有益な活性に関するアッセイを開発することができる。

10

【0471】

このステップにより目的の表現型が確認され、任意の偽陽性が排除される。

【0472】

5. 単離された微生物からの潜在的候補の選択

【0473】

上記のステップで生成されたデータを使用して、微生物をさらなる開発のために選択する。例えば、コロニー形成ポテンシャル、植物に有益な活性、及び/または関連性のあるDNA及びRNAプロファイルの所望の組み合わせを示す微生物が、順化及びリモデリングのために選択されよう。

【0474】

C. 選択された微生物の順化

20

【0475】

選択された微生物を順化させる、すなわち、微生物を遺伝学的に扱いやすく、特定可能な形態に変換する。

【0476】

1. 抗生物質感受性に関して試験する

【0477】

微生物を順化させるための1つの方式は、抗生物質耐性をそれらに導入操作することである。このために、野生型微生物菌株は、さまざまな抗生物質に対する感受性について試験する。菌株が抗生物質に感受性がある場合、抗生物質は菌株をリモデリングするための遺伝子ツール/ベクターで使用するのに適した候補となり得る。

30

【0478】

2. ベクターを設計し、組み立てる

【0479】

それらの複製に条件のあるベクター (例えば、自殺プラスミド) を構築して、選択された微生物 (宿主微生物) を順化させる。例えば、適切な抗生物質耐性マーカー、対抗選択可能マーカー、ドナー微生物 (例えば、E. coli) における維持のための複製起点、蛍光による挿入に関してスクリーニングするための蛍光タンパク質 (GFP、RFP、YFP、CFPなど) をコードする遺伝子、宿主微生物中へのコンジュゲーションのための移行起点、及び所望の遺伝子変異を有する宿主ゲノムに対する相同アームを含むポリヌクレオチド配列を含有する、自殺プラスミドを構築する。ベクターは、SceI部位及び他の追加の要素を含んでもよい。

40

【0480】

例示的な抗生物質耐性マーカーには、アンピシリン耐性マーカー、カナマイシン耐性マーカー、テトラサイクリン耐性マーカー、クロラムフェニコール耐性マーカー、エリスロマイシン耐性マーカー、ストレプトマイシン耐性マーカー、スペクチノマイシン耐性マーカーなどが含まれる。例示的な対抗選択可能マーカーには、sacB、rpsL、tetAR、pheS、thyA、lacY、gata-1、ccdBなどが含まれる。

【0481】

3. ドナー微生物の生成

50

【0482】

1つのプロトコルでは、適切な抗生物質耐性マーカー、対抗選択可能マーカー、pir複製開始遺伝子を含むE. coli ST18における維持のためのpir複製起点、蛍光による挿入に関してスクリーニングするための緑色蛍光タンパク質(GFP)をコードする遺伝子、宿主微生物中へのコンジュゲーションのための移行起点、及び所望の遺伝子変異(例えば、異種位置に挿入するための微生物の独自のゲノム内からのプロモーター)を有する宿主ゲノムに対する相同アームを含むポリヌクレオチド配列を含む、自殺プラスミドを、E. coli ST18(アミノレブリン酸、ALAの栄養要求株)の中へ形質転換させて、ドナー微生物を生成する。

【0483】

4. ドナー微生物を宿主微生物と混合する

【0484】

ドナー微生物を宿主微生物(ステップB5からの選択された候補微生物)と混合して、宿主ゲノムへのプラスミドの接合性組み込みを可能にする。ドナー及び宿主微生物の混合物を、抗生物質を含有し、かつALAを含有しない培地にプレートする。自殺プラスミドは、ドナー微生物(E. coli ST18)において複製することができるが、宿主においては複製することができない。したがって、ドナー及び宿主微生物を含有する混合物を、抗生物質を含有し、かつALAを含有しない培地にプレートしたとき、そのゲノムにプラスミドを組み込んだ宿主細胞のみが培地上で増殖し、コロニーを形成することが可能となる。ドナー微生物は、ALAの不在に起因して増殖しない。

【0485】

5. ベクターの組み込みを確認する

【0486】

宿主微生物の意図される遺伝子座に蛍光タンパク質マーカー、抗生物質耐性マーカー、対抗選択可能マーカーなどを含有する、自殺プラスミドの適正な組み込みを、プレート上でのコロニーの蛍光により、コロニーPCRを使用して確認する。

【0487】

6. 確認された組み込みコロニーを画線培養する

【0488】

宿主微生物における第2ラウンドの相同組換えにより、プラスミド骨格をループアウト(除去)して、ある特定のパーセンテージの宿主微生物の宿主ゲノムに組み込まれた所望の遺伝子変異(例えば、異種位置に挿入するための微生物の独自のゲノム内からのプロモーター)を残すと同時に、ある特定のパーセンテージを野生型に復帰させる。

【0489】

プラスミド骨格をループアウトした(したがって、対抗選択可能マーカーをループアウトした)宿主微生物のコロニーを、適切な培地上で増殖させることによって選択することができる。

【0490】

例えば、sacBを対抗選択可能マーカーとして使用する場合、スクロースを含有する培地上でコロニーを増殖させることによって(sacBは、スクロースに対する感受性を与える)、プラスミド骨格の喪失に起因するこのマーカーの喪失を試験する。この培地上で増殖するコロニーは、sacBマーカー及びプラスミド骨格を喪失したものであり、所望の遺伝子変異を含有するか、または野生型に復帰しているかのいずれかであろう。また、これらのコロニーは、蛍光タンパク質マーカーの喪失に起因してプレート上で蛍光を発しないことになる。

【0491】

一部の単離株では、sacBまたは他の対抗選択可能マーカーは、スクロースまたは他の対抗選択機構に対する完全な感受性を与えないため、多数のコロニーをスクリーニングして、成功裏のループアウトコロニーを単離することが必要となる。そのような場合、宿主細胞において独立して複製し、組み込まれた自殺プラスミド骨格内の部位を認識する制

10

20

30

40

50

限エンドヌクレアーゼ（例えば、SceI）を発現する「ヘルパープラスミド」の使用によって、ループアウトを補助してもよい。自殺プラスミドが組み込まれた菌株は、抗生物質耐性マーカー、宿主菌株と互換性のある複製起点、及び構成型または誘導型プロモーターによって制御される制限エンドヌクレアーゼをコードする遺伝子を含むヘルパープラスミドで形質転換される。組み込まれたプラスミド骨格において誘導される、制限エンドヌクレアーゼによる二本鎖切断により、相同組換えを促進して、自殺プラスミドをループアウトする。これは、対抗選択プレート上でループアウト済みのコロニーの数を増加させると共に、所望の突然変異を含有するコロニーを見出すためにスクリーニングする必要があるコロニーの数を減少させる。次に、ヘルパープラスミドは、プラスミドの抗生物質選択がない状態で、培養及び連続継代によって菌株から除去される。継代された培養物を画線培養して単一のコロニーを得、コロニーを摘取し、ヘルパープラスミドの選択に使用される抗生物質に対する感受性、ならびにコロニーPCRによって確認されるプラスミドの不在に関してスクリーニングする。最後に、ゲノムを配列決定し、ヘルパープラスミドDNAの不在をD6に記載されるように確認する。

10

【0492】

7. コロニーPCRにより遺伝子変異の組み込みを確認する

【0493】

スクロース含有培地（または使用される対抗選択可能マーカーに応じて他の適切な培地）上でより良好に増殖したコロニーを摘取し、意図される遺伝子座における遺伝子変異の存在を、コロニーPCRを使用してコロニーをスクリーニングすることによって確認する。

20

【0494】

この実施例では、微生物を順化させ、微生物に遺伝子変異を導入するための1つのプロトコルについて記載しているが、当業者であれば、ポリメラーゼ連鎖反応突然変異誘発、オリゴヌクレオチド指向性突然変異誘発、飽和突然変異誘発、断片シャフリング突然変異誘発、相同組換え、ZFN、TALENs、CRISPR系（Cas9、Cpf1など）、化学的突然変異誘発、及びそれらの組み合わせなどの当該技術分野で既知の様々な他の技法を使用して、選択された微生物に遺伝子変異を導入することができることが理解されよう。

【0495】

8. ステップC2～C7を反復する

【0496】

ステップC2～C7のうちのいずれかが意図される成果を提供し損なう場合、これらのステップを繰り返して、宿主微生物への所望の遺伝子変異及びマーカーの組み込みを容易にするための異なる要素を含み得る代替のベクターを設計する。

【0497】

9. 標準業務手順書（SOP）を開発する

【0498】

ステップC2～C7を所与の菌株に対して一貫して再現できるようになったら、そのステップを使用して、その菌株及びベクターの標準操作手順（SOP）を開発する。このSOPを使用して、微生物の植物に有益な他の形質を改善することができる。

40

【0499】

D. 非属間導入操作計画及び最適化

【0500】

1. 最適化のための遺伝子標的を特定する

【0501】

選択された微生物を、植物に有益な活性の性能を改善するように導入操作/リモデリングする。このために、植物に有益な活性を改善するための遺伝子標的を特定する。

【0502】

遺伝子標的は、種々の方式で特定することができる。例えば、単離された微生物の全ゲ

50

ノム配列決定からの遺伝子に注釈をしながら、目的の遺伝子を特定することができる。それらは、文献検索により特定することができる。例えば、窒素固定に関与する遺伝子は、文献で既知である。これらの既知の遺伝子を、遺伝子変異を導入するための標的として使用することができる。遺伝子標的はまた、ステップ B 3 (コロニー形成に関する小規模圃場試験) で得られた RNA 配列決定データに基づいて、または下記のステップに記載される RNA 配列決定を実施することによっても特定することができる。

【0503】

2. プロモーター交換のためのプロモーターを選択する

【0504】

植物に有益な活性を改善するための所望の遺伝子変異は、プロモーター交換を含み得、プロモーター交換では、標的遺伝子の天然プロモーターが、微生物のゲノム内からの (天然プロモーターと比較したときに) より強力なプロモーターもしくはより弱いプロモーター、または異なって調節されるプロモーター (例えば、N 非依存性) と置換される。標的遺伝子の発現が、植物に有益な活性を増加させる場合 (例えば、発現が微生物における窒素固定を強化する *nifA*)、プロモーター交換のための所望のプロモーターは、天然プロモーターと比較して標的遺伝子の発現レベルをさらに増加させるであろう、(標的遺伝子の天然プロモーターと比較して) より強力なプロモーターである。標的遺伝子の発現が、植物に有益な活性を減少させる場合 (例えば、窒素固定を下方制御する *nifL*)、プロモーター交換のための所望のプロモーターは、天然プロモーターと比較して標的遺伝子の発現レベルを実質的に減少させるであろう、(標的遺伝子の天然プロモーターと比較して) 弱いプロモーターである。プロモーターを遺伝子に挿入して、遺伝子の発現を「ノックアウト」しつつ、同時に下流遺伝子の発現を上方制御することができる。

【0505】

プロモーター交換のためのプロモーターは、RNA 配列決定データに基づいて選択することができる。例えば、RNA 配列決定データを使用して、強力なプロモーター及び弱いプロモーター、または誘導型プロモーターとは対照的に構成型の活性なプロモーターを特定することができる。

【0506】

例えば、窒素固定経路において、強力なプロモーター及び弱いプロモーター、または誘導型プロモーターとは対照的に構成型の活性なプロモーターを特定するためには、選択された微生物を窒素枯渇条件及び窒素充満条件下で *in vitro* で培養し、微生物の RNA をこれらの培養物から単離し、配列決定する。

【0507】

1つのプロトコルでは、窒素枯渇条件及び窒素充満条件下での微生物の RNA プロファイルと比較し、所望の転写レベルを有する活性プロモーターを特定する。これらのプロモーターは、弱いプロモーターを交換するように選択することができる。

【0508】

プロモーターはまた、宿主植物根圏における植物内での微生物の RNA プロファイルを反映する、ステップ B 3 で得られた RNA 配列決定データを使用して選択することもできる。

【0509】

種々の条件下での RNA 配列決定は、a) 施肥された圃場条件で宿主植物の成長周期中に根圏で活性である、かつ b) 関連性のある *in vitro* 条件下でも活性であるため迅速にスクリーニングされ得る、プロモーターの選択を可能にする。

【0510】

例示的なプロトコルでは、コロニー形成アッセイ (例えば、ステップ B 3) からの植物内 RNA 配列決定データを使用して、単離された微生物における遺伝子の発現レベルを測定する。一実施形態では、遺伝子発現のレベルは、マッピングされたリード数 100 万当たりキロベース当たりのリード (RPKM) として算出される。種々の遺伝子の発現レベルを標的遺伝子の発現レベルと比較し、種々の遺伝子に関連する、標的遺伝子と比較して

10

20

30

40

50

最も高いまたは最も低いレベルの発現を示す少なくとも上位10、20、30、40、50、60、または70個のプロモーターを、プロモーター交換のための考えられる候補として選択する。故に、標的遺伝子と比べた種々の遺伝子の発現レベルを検査し、次いで、標的（または標準）遺伝子と比べて増加した発現を示す遺伝子を選択し、次いで、該遺伝子に関連するプロモーターを見出す。

【0511】

例えば、標的遺伝子が *nifA* の上方制御である場合、*nifA* と比較して最も高いレベルの発現を示す遺伝子の最初の10、20、30、40、50、または60個のプロモーターを、プロモーター交換のための考えられる候補として選択する。

【0512】

これらの候補を *in vitro* のRNA配列決定データに基づいてさらに絞り込むことができる。例えば、標的遺伝子としての *nifA* の場合、植物内RNA配列決定データに基づいて選択された考えられるプロモーター候補を、*in vitro* の窒素枯渇条件対窒素充満条件下で *nifA* と比較して類似のまたは増加した遺伝子発現レベルを有するプロモーターを選定することによってさらに選択する。

【0513】

このステップで選択されるプロモーターのセットを使用して、標的遺伝子（例えば、*nifA*）の天然プロモーターを交換する。交換されたプロモーターを有するリモデリングされた菌株を *in vitro* アッセイで試験し、予想よりも低い活性を有する菌株を排除し、予想されたまたは予想よりも高い活性を有する菌株を圃場で試験する。プロモーター選択のサイクルをリモデリングされた菌株に対して繰り返して、それらの植物に有益な活性をさらに改善してもよい。

【0514】

ここでは、窒素固定形質を改善するために *Klebsiella variicola* 株 CI137 からの植物内及び *in vitro* のRNA配列決定データに基づいて実施した例示的なプロモーター交換実験が記載される。CI137をARAアッセイにおいて0mM及び5mMグルタミン濃度でアッセイし、RNAをこれらのARA試料から抽出した。NextSeqを介してRNAを配列決定し、1つの試料からのリードのサブセットをCI137ゲノムにマッピングした（*in vitro* のRNA配列決定データ）。CI137についてのコロニー形成及び活性アッセイ（例えば、ステップB3）においてRNAをV5期のトウモロコシ植物の根から抽出した。6つの植物からの試料をプールし、NextSeqを使用してプールした試料からのRNAを配列決定し、リードをCI137ゲノムにマッピングした（植物内RNA配列決定データ）。 2×10^8 個の総リードのうち、 7×10^4 個のリードをCI137にマッピングした。植物内RNA配列決定データを使用して、遺伝子を植物内発現レベルの順に順位付けし、発現レベルを天然 *nifA* 発現レベルと比較した。天然 *nifA* 発現レベルと比較して最も高い発現レベル（遺伝子発現に基づいて）を示した最初の40個のプロモーターを選択した。これらの40個のプロモーターを *in vitro* のRNA配列決定データに基づいてさらに絞り込み、*nifA* と比較して増加したまたは類似の *in vitro* の発現レベルを有するプロモーターを選択した。プロモーターの最終リストは、17個のプロモーターを含み、ほとんどのプロモーターの2つのバージョンを使用して、プロモーター交換突然変異体を生成し、故に、総計30個のプロモーターを試験した。*nifL* を部分的または完全に欠失させ、30個のプロモーターを挿入した（*nifL* : : Prm）、一揃いのCI137突然変異体の生成を試みた。30個の突然変異体のうち28個が成功裏に生成された。*nifL* : : Prm突然変異体をARAアッセイにおいて0mM及び5mMグルタミン濃度で分析し、RNAをこれらのARA試料から抽出した。いくつかの突然変異体は、予想よりも低いかまたはWT CI137株と比較して減少したARA活性を示した。少数の突然変異体は、予想よりも高いARA活性を示した。

【0515】

当業者であれば、上記の実施例から、植物内及び/または *in vitro* のRNA配

10

20

30

40

50

列決定データを使用して、プロモーター交換のためのプロモーターを選択することができるが、プロモーター選択のステップが大いに予測不能であり、多くの難題を伴うことを理解しよう。

【0516】

例えば、植物内RNA配列決定は主として、高発現している遺伝子を明らかにする。しかしながら、遺伝子発現の微妙な差異及び/または発現レベルの低い遺伝子を検出することは困難である。例えば、一部の植物内RNA配列決定実験では、微生物ゲノムからの約5000個の遺伝子のうち約40個のみが検出された。故に、植物内RNA配列決定技法は、豊富に発現している遺伝子及びそれらの対応するプロモーターを特定するために有用である。しかしながら、この技法により、低発現遺伝子及び対応するプロモーターならびに遺伝子発現の間の小さな差異を特定するのは困難である。

10

【0517】

さらに、植物内RNAプロファイルは、微生物が単離された時点での遺伝子のステータスを反映する。しかしながら、圃場条件のわずかな変化が、根圏性/着生性/内生性微生物のRNAプロファイルを実質的に変化させる場合がある。したがって、リモデリングされた菌株を*in vitro*及び圃場で試験する際に、1つの圃場試験のRNA配列決定データに基づいて選択されたプロモーターが、標的遺伝子の望ましい発現レベルを提供するかどうかを前もって予測することは困難である。

【0518】

加えて、植物内評価は、時間及び資源を消費するものであるため、植物内実験は、頻繁に行う及び/または迅速にもしくは容易に繰り返すことができない。一方で、*in vitro*のRNA配列決定は、比較的迅速かつ容易に行うことができるが、*in vitro*条件は、圃場条件を模倣するものではなく、*in vitro*で高い活性を示し得るプロモーターは、植物内で同等の活性を示さない場合がある。

20

【0519】

その上、プロモーターは、多くの場合、新たな背景で予測通りに動かない。したがって、植物内及び*in vitro*のRNA配列決定データは、よくてもプロモーター選択のステップにおける開始点としての役目を果たすことができるにすぎない。しかしながら、圃場で標的遺伝子の望ましい発現レベルを提供するであろう任意の特定のプロモーターに到達することは、一部の事例では、予測不能である。

30

【0520】

プロモーター選択のステップにおける別の制限は、利用可能なプロモーターの数である。本発明の目標のうちの1つは、非トランスジェニック微生物を提供することであるため、プロモーター交換のためのプロモーターは、微生物のゲノム、または属内から選択される必要がある。故に、トランスジェニック手法とは異なり、本プロセスは、単に文献を深く探り、異なる宿主生物からの特性がよく特徴付けされているトランスジェニックプロモーターを見出す/使用することができるものではない。

【0521】

別の制約は、プロモーターが所望の成長相中に植物内で活性でなければならないということである。例えば、植物において窒素の必要量が最も高いのは一般に、成長期の後期、例えば、後期栄養相及び初期生殖相である。例えば、トウモロコシにおいて、窒素取り込みは、V6(6枚葉)期からR1(生殖期1)期中に最も高い。したがって、トウモロコシのV6期からR1期中に窒素の利用可能性を増加させるためには、リモデリングされた微生物は、トウモロコシ生活環のこれらの相中に最も高い窒素固定活性を示さなければならない。したがって、トウモロコシの後期栄養相及び初期生殖相中に植物内で活性であるプロモーターを選択する必要がある。この制約は、プロモーター交換において試験され得るプロモーターの数を低下させるだけでなく、プロモーター選択のステップを予測不能にもする。上記で考察したように、予測不能性は、部分的には、小規模圃場試験(例えば、ステップB3)からのRNA配列決定データを使用して、所望の成長相中に植物内で活性であるプロモーターを特定し得るものの、RNAデータが、試料収集時点での圃場条件(

40

50

例えば、土壌のタイプ、土壌中の水のレベル、利用可能な窒素のレベル等)に基づいていることにより生じる。当業者であれば理解しようが、圃場条件は、同じ圃場内で一定期間にわたって変化し得、また、種々の圃場にわたって実質的に変化し得る。故に、1つの圃場条件下で選択されるプロモーターは、他の圃場条件下では予想通りに動かない場合がある。同様に、選択されたプロモーターは、交換後に予想通りに動かない場合がある。したがって、選択されたプロモーターが目的の植物の所望の成長相中に植物内で活性であるかどうかを前もって予期することは困難である。

【0522】

3. 非属間遺伝子変異を設計する

【0523】

ステップD1(遺伝子標的の特定)及びD2(プロモーター交換のためのプロモーターの特定)に基づいて、非属間遺伝子変異を設計する。

【0524】

「非属間性」という用語は、宿主に導入されるべき遺伝子変異が、宿主属の外部からの核酸配列を含有しない(すなわち、トランスジェニックDNAでない)ことを示す。ベクター及び/または他の遺伝的ツールを使用して、宿主微生物に遺伝子変異が導入されるものの、本開示の方法は、宿主微生物に導入された骨格ベクター配列または他の遺伝的ツールをループアウト(除去)して、宿主ゲノムへの所望の遺伝子変異のみを残すステップを含む。故に、結果として得られる微生物は、非トランスジェニックである。

【0525】

例示的な非属間遺伝子変異には、目的の遺伝子における、その遺伝子によってコードされるタンパク質の機能を改善し得る突然変異;目的の遺伝子の内因性プロモーターを置換してその遺伝子の発現を増加させ得る、構成的に活性化プロモーター;目的の遺伝子を不活性化する突然変異;異種位置への宿主のゲノム内からのプロモーターの挿入、例えば、該遺伝子の不活性化及び下流遺伝子の上方制御をもたらす遺伝子へのプロモーターの挿入などが含まれる。突然変異は、点突然変異、挿入、及び/または欠失(遺伝子の完全または部分的な欠失)であり得る。例えば、1つのプロトコルでは、宿主微生物の窒素固定活性を改善するために、所望の遺伝子変異は、*nifL* 遺伝子(窒素固定経路の負の調節因子)の突然変異を不活性化することを含んでもよく、及び/または *nifH* 遺伝子(大気中の窒素を固定する主反応を触媒するニトロゲナーゼ鉄タンパク質)の内因性プロモーターを、*nifH* 遺伝子の発現を構成的に促進する構成的に活性化プロモーターと置換することを含んでもよい。

【0526】

4. 非属間誘導体菌株を生成する

【0527】

非属間遺伝子変異を設計した後、ステップC2~C7を実施して、非属間誘導体菌株(すなわち、リモデリングされた微生物)を生成する。

【0528】

5. リモデリングされた微生物の精製培養物を貯蔵する

【0529】

下記に記載される全ゲノム配列決定のためにgDNAを抽出することができるように、リモデリングされた微生物の精製培養物をバンクに保存する。

【0530】

6. 所望の遺伝子変異の存在を確認する

【0531】

リモデリングされた微生物のゲノムDNAを抽出し、以前に記載された方法を使用してゲノムDNAに対して全ゲノム配列決定を実施する。結果として得られるリードを、LIMSに以前に保管されたリードにマッピングして、a)所望の遺伝子変異の存在、及びb)リモデリングされた微生物を生成するために使用したベクター配列(例えば、プラスミド骨格またはヘルパープラスミド配列)にマッピングするリードの完全な不在を確認する

10

20

30

40

50

。

【0532】

このステップにより、ベクター骨格（例えば、自殺プラスミド）法でルーブアウトした後、菌株内に残る可能性のある非宿主属DNA（トランスジェニックDNA）を高感度に検出することができ、遺伝子変異の偶発的なオフターゲット挿入などのコントロールが可能となる。

【0533】

E. リモデリングされた微生物に対するアナリティクス

【0534】

1. 植物に有益な活性の分析

リモデリングされた微生物の植物に有益な活性及び増殖動態を *in vitro* で評価する。

10

【0535】

例えば、窒素固定機能を改善するためにリモデリングされた菌株を、アセチレン還元アッセイ、アンモニウム排出アッセイ等により窒素固定活性及び適性に関して評価する。

【0536】

改善されたリン酸可溶化のためにリモデリングされた菌株を、リン酸可溶化活性に関して評価する。

【0537】

このステップは、目的の表現型についてのリモデリングされた菌株の迅速なメディアムスルーブットからハイスルーブットのスクリーニングを可能にする。

20

【0538】

2. コロニー形成及び改変遺伝子の転写の分析

【0539】

B3に記載されるステップを使用して、リモデリングされた菌株を、温室または圃場のいずれかで宿主植物でのコロニー形成に関して評価する。加えて、コロニー形成された根及び/または土壌試料からRNAを単離し、配列決定して、標的遺伝子の転写活性を分析する。標的遺伝子は、導入された遺伝子変異を含有する遺伝子を含み、また、微生物の植物に有益な形質において役割を果たす他の遺伝子も含み得る。

【0540】

例えば、遺伝子のクラスターである *nif* 遺伝子は、微生物の窒素固定活性を制御する。上述のプロトコルを使用して、遺伝子変異を *nif* 遺伝子のうちの1つに導入してもよいが（例えば、プロモーター挿入）、一方で、*nif* クラスターにおけるその他の遺伝子は、それらの内因性形態である（すなわち、それらの遺伝子配列及び/またはプロモーター領域は、改変されていない）。RNA配列決定データを、遺伝子変異を含有する *nif* 遺伝子の転写活性に関して分析し、また、挿入された遺伝的变化によって直接改変されてはいないが、それでもなお導入された遺伝的变化によって影響を受け得る、他の *nif* 遺伝子に関して分析してもよい。

30

【0541】

このステップは、根圏において上位の *in vitro* で性能を有する菌株の適性の決定を可能にし、植物内での改変遺伝子の転写活性の測定を可能にする。

40

【0542】

F. 導入操作計画 / アナリティクスを反復する

【0543】

in vitro 及び植物内アナリティクス（ステップE1及びE2）からのデータを使用して、有益な突然変異を反復的に積み上げる。

【0544】

さらに、上述のステップA～Eを繰り返して、微生物の植物に有益な形質を微調整してもよい。例えば、第1ラウンドでリモデリングされた微生物菌株を使用して植物に接種し、数週間の成長後に収穫し、植物の土壌及び/または根からの微生物を単離する。植物に

50

有益な活性及びコロニー形成ポテンシャルが改善された微生物を選択するために、単離された微生物の機能的活性（植物に有益な形質及びコロニー形成ポテンシャル）ならびにDNA及びRNAプロファイルの特徴付けする。選択された微生物を、植物に有益な活性をさらに改善するようにリモデリングする。リモデリングされた微生物を、*in vitro*及び植物内での機能的活性（植物に有益な形質及びコロニー形成ポテンシャル）及びRNAプロファイルに関してスクリーニングし、上位の性能を有する菌株を選択する。所望であれば、ステップA～Eを繰り返して、第2ラウンドからのリモデリングされた微生物の植物に有益な活性をさらに改善することができる。このプロセスを、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10ラウンド、またはそれよりも多く繰り返すことができる。

【0545】

10

上述の例示的なステップが、下記の表Aに要約される。

【表A - 1】

表A. 誘導型微生物リモデリングプラットフォームの実施形態の概要

	ステップ	寄与	代替形態
A	単離		
1	土壌試料を得る	単離されるべきWT土壌微生物を用意する	
2	土壌試料中でトウモロコシ「餌植物」を栽培する	根圏による植物に有益な微生物の選択を可能にする	コムギ、モロコシ、イネ、キビ、ダイズなど
3	根試料を収穫、清浄化、及び抽出し、無窒素(具体的にはNfB)培地にプレートする	土壌微生物を、a)根でコロニー形成し、かつb)大気中の窒素を固定するものに絞込み	他の無窒素培地、他の選択培地またはスクリーニング培地(例えば、リン酸可溶化に関して)
4	コロニーを摘取し、培養物を精製し、縮重プライマーを使用してnifHの存在に関してスクリーニングする	微生物を、nifH遺伝子を含むものに絞込み(培地スクリーニングからの偽陽性を排除する)	目的の他の遺伝子、例えば、ipdC(植物ホルモン生合成)に対する縮重プライマー

20

30

40

50

【表 A - 2】

	ステップ	寄与	代替形態
5	菌株の精製培養物を貯蔵する		
B 特性評価			
1	Illumina 及び／または PacBio プラットフォームを使用して菌株のゲノムを配列決定及び組み立てる	主要な経路に関してゲノムを特性評価する	
2	温室におけるトウモロコシ根でのコロニー形成に関して微生物をアッセイする(qPCR に基づく方法)	植物でよくコロニー形成する微生物に絞り込む	コムギ、ソルガム、イネ、キビ、ダイズなど、コロニー形成をアッセイするための他の方法(例えば、プレーティング)
3	小規模圃場試験においてトウモロコシ根のコロニー形成に関して微生物をアッセイし(qPCR に基づく方法)、コロニー形成された根試料から RNA を単離する	内部的には「CAT」試験として知られており、これらは圃場環境での菌株のコロニー形成及び転写データを提供する	より大きな圃場試験、他の作物、コロニー形成をアッセイするための他の方法(例えば、プレーティング)
4	アセチレン還元アッセイ(ARA)において窒素固定活性に関して微生物をアッセイする	菌株の N 固定表現型を確認する	
5	上記のデータを使用して、さらなる順化及び最適化のための候補微生物を選択する	最も有望な候補の選択を可能にする	
C 順化			
1	種々の抗生物質に対する感受性に関して微生物を試験する	遺伝的ツールの形質転換のためにどの抗生物質選択マーカーが使用され得るかを決定する	
2	適切な抗生物質耐性マーカー、 sacB 対抗選択可能マーカー、 E. coli における維持のための複製起点、蛍光により挿入に関してスクリーニングするための GFP 、宿主中へのコンジュゲーションのための移行起点、宿主ゲノムに対する相同アーム、及び所望の突然変異を含有する、自殺プラスミドを設計し、組み立てる。	これらは、プラスミドを維持し、宿主ゲノムのコンジュゲーション、挿入、及び「ループアウト」を実施するために必要な「部品」である	プラスミドは、 SceI 部位または他の対抗選択可能マーカー、代替の蛍光レポーター、追加の要素を含有することが可能である

10

20

30

40

50

【表 A - 3】

	ステップ	寄与	代替形態
3	自殺プラスミドを <i>E.coli</i> ST18(アミノレブリン酸、ALA の栄養要求株)の中へ形質転換させて、ドナー細胞を生成する	宿主中へのコンジュゲーション；プラスミド維持のための調製物	<i>E.coli</i> の異なるドナー菌株または他の微生物；異なる栄養要求性マーカーを使用することが可能である
4	ドナー細胞をレシピエント宿主細胞と混合してコンジュゲートさせ、抗生物質耐性マーカーに選択的であり、かつ ALA を含有しない培地にプレートする	自殺プラスミドは、 <i>E.coli</i> において複製することができるが、宿主においては複製することができない。したがって、そのようなプレートへの混合物のプレティングは、プラスミドを受け入れ、染色体へのプラスミド組み込みを経た宿主細胞のみが増殖し、コロニーを形成することが可能であることを意味する。 <i>E. coli</i> ST18 は、ALA の不在に起因して増殖することができない。	<i>E.coli</i> の異なるドナー菌株または他の微生物；異なる栄養要求性マーカーを使用することが可能である
5	GFP 蛍光によりプラスミドの組み込み、及びコロニー PCR により意図される遺伝子座での組み込みを確認する	GFP、抗生物質耐性カセット、 <i>sacB</i> マーカーなどを含有する自殺プラスミド骨格の適正な組み込みを確認する	
6	スクロースを含有するプレート上で確認された組み込みコロニーを画線培養し、非蛍光コロニーに関してスクリーニングする	<i>sacB</i> マーカーは、スクロースに対する感受性を与えるため、第 2 ラウンドの相同組換えを経て、プラスミドを「ループアウトした」コロニーは、より良好に増殖し、プレート上で蛍光を発しない。	異なる対抗選択可能マーカー、 <i>SceI</i> 媒介性ループアウトなど

10

20

30

40

50

【表 A - 4】

	ステップ	寄与	代替形態
7	コロニーPCRを使用して、意図される突然変異に関してループアウト済みのコロニーをスクリーニングする	第2の相同組換えイベントの後には、ループアウト済みのコロニーの50%のみが突然変異を含有するはずであり、他方の50%はWTであろう	
8	ステップ2~7のうちいずれかが奏功しない場合、ステップ2に戻り、代替のプラスミド部品で再設計する	自殺プラスミドの反復的なトラブルシューティングにより、実際に役立つプロトコルの開発を可能にする	
9	ひとたびステップ2~7が確実に実施できるようになると、最適化に使用されるべきその菌株/プラスミドについてのSOPを開発する		
D	非属間導入操作計画及び最適化		
1	文献検索により経路を最適化するための遺伝子標的、例えば、nif遺伝子を特定する		
2	N枯渇条件及びN充満条件での <i>in vitro</i> で、ならびに(ステップB3で収集された)トウモロコシ根圏からの <i>in planta</i> の両方で収集されたRNAseqデータを使用して、プロモーター交換のためのプロモーターを選択する	a)施肥された圃場条件でトウモロコシの成長周期中に根圏で活性である、b) <i>in vitro</i> のN充満条件でも活性であるため迅速にスクリーニングされ得る、プロモーターの選択を可能にする。	代替の作物；代替のRNAseqデータ条件(温室、圃場、 <i>in vitro</i> 、標的とする表現型に関連性のあるあらゆるもの)
3	主要な遺伝子において非属間突然変異、すなわち、欠失(完全または部分的な遺伝子)、プロモーター交換、または単一塩基対の変化を設計する；これらの設計をLIMSに保管する	宿主染色体の外部からのDNAは何ら加えられず、したがって、結果として得られる微生物は、非トランスジェニックである	調節配列(例えば、RBS)、非コードRNAなどを改変する

10

20

30

40

50

【表 A - 5】

	ステップ	寄与	代替形態
4	確立されたプロトコルを使用して、ステップ C2~7 を実施して、誘導体非属間菌株(突然変異体)を生成する	本発明者らは、これを順化ステップよりもハイスループット、すなわち、一人当たり一度に最大 20 種程度の菌株で実施する。	
5	菌株の精製培養物を貯蔵し、gDNA を抽出し、Illumina を介して WGS を実施する		
6	結果として得られるリードを、LIMS に保管された設計にマッピングして a) 所望の突然変異の存在、及び b) 菌株を生成するために使用したあらゆる自殺プラスミドまたは他のプラスミド配列にマッピングするリードの完全な不在を確認する	自殺プラスミド法後に菌株に残っている可能性のある非属間 DNA を非常に高感度に検出することができ、トランスジェニック DNA の不在、自殺プラスミドの偶発的なオフターゲット挿入などのコントロールを確認する	自殺プラスミド除去はかなり確実であるが、代替法における他の安定プラスミドの使用は、先で形質転換を行ったトランスジェニック DNA が菌株に何ら残っていないことを完全な信頼をもって確実にするために、この余分のステップを必要とする。
E	アナリティクス		
1	ARA、アンモニウム排出アッセイ、及び成長曲線により <i>in vitro</i> の窒素固定活性及び適性に関して菌株を分析する	目的の表現型についての突然変異体の迅速なメディアムスループットからハイスループットのスクリーニングを可能にする	任意の他の <i>in vitro</i> アッセイ、例えば、リン酸可溶化、特異的遺伝子の転写に関する qPCR など
2	植物(温室または圃場)におけるコロニー形成(qPCR)ならびに標的及びプロモーター交換された遺伝子の転写(Nanostring)に関して菌株を分析する	根圏において上位の <i>in vitro</i> の性能を有する菌株の適性を測定する； <i>in planta</i> でのプロモーター交換された遺伝子の転写を測定する	
F	導入操作計画／アナリティクスを反復する		
1	<i>in vitro</i> 及び <i>in planta</i> のアナリティクスからのデータを使用して、有益な突然変異を反復的に積み上げる。		

10

20

30

40

【0546】

農業用の生物学的製剤を作出するための慣習的な手法は、それらの方法論に固有の欠点に悩まされる

【0547】

野生型(WT)微生物の純粋なバイオプロスペクティングまたはトランスジェニック手法とは異なり、GMRは、WT微生物よりも植物に有益な表現型を改善する、微生物内の主要な調節ネットワークの非属間遺伝的最適化を可能にするが、トランスジェニック手法に関連するリスク(例えば、予測不能な遺伝子機能、社会的懸念)を有しない。教示されるGMRプラットフォームと比較していくつかの欠点を有する、問題を含む「従来のバイ

50

オブロスペクティング」手法の図示について、図 1 C を参照のこと。

【 0 5 4 8 】

農業用の微生物を開発するための他の方法は、圃場規模では奏功しない場合が多い研究室での大規模な開発、または基盤となる機構 / 植物 - 微生物間相互作用の理解を伴わない大規模な温室もしくは「圃場ファーストの」試験のいずれかに注力している。教示される G M R プラットフォームと比較していくつかの欠点を有する、問題を含む「バイオブロスペクティングに向けた圃場ファーストアプローチ」システムの図示について、図 1 D を参照のこと。

【 0 5 4 9 】

G M R プラットフォームは、これらの問題を多数の方式で解決する

10

【 0 5 5 0 】

G M R プラットフォームの 1 つの強みは、標的作物にとって生理学的に重要な主要時期に活性であり、かつ特定の農業的に関連性のある環境条件下でも活性である、活性プロモーターの特定である。

【 0 5 5 1 】

説明したように、窒素固定の背景内で、G M R プラットフォームは、外因性窒素が上昇した環境条件下で活性である微生物プロモーター配列を特定することができ、それによって、現代的な農業の条播作物条件下で、かつ植物が固定窒素を最も必要とする時期に、リモデリングされた微生物が大気中の窒素を固定すると共に、それを標的作物に送達することを可能にする。植物によって窒素が最も必要とされる、トウモロコシ成長周期における時間枠の図示について、図 1 E を参照のこと。教示される G M R プラットフォームは、窒素が必要とされる時間枠でトウモロコシ植物に窒素を供給し、また土壌環境に外因性窒素が存在する場合であってもそのような窒素を送達する、リモデリングされた微生物を作ることができる。

20

【 0 5 5 2 】

これらのプロモーターは、根圏 R N A を配列決定し、リードを微生物のゲノム配列にマッピングすることによって特定することができ、植物の成長周期の主要な段階中に主要な経路をオンまたはオフにするよう「再プログラム」することができる。加えて、最適化された微生物の全ゲノム配列決定及び先で形質転換を行った配列へのマッピングにより、この方法は、プラスミド D N A のオフターゲット挿入、P C R または抗生物質耐性により検出されないプラスミドの低レベルの滞留などによりトランスジェニック配列が圃場に偶発的に何ら放出されていないことを確実にする能力を有する。

30

【 0 5 5 3 】

G M R プラットフォームは、微生物を研究室及び植物環境で反復的に評価することによってこれらの手法を組み合わせ、研究室条件だけでなく温室及び圃場条件で頑強である微生物をもたらす。

【 0 5 5 4 】

教示される G M R プラットフォームの種々の態様及び実施形態は、図 1 F ~ 1 I に見出すことができる。G M R プラットフォームは結果的に、植物に有益な特性（例えば窒素固定）を持つ、リモデリングされた微生物の誘導 / 作出 / 生産に達する。

40

【 0 5 5 5 】

従来のバイオブロスペクティング法では、前述の特性を有する微生物を生産することはできない。

【 0 5 5 6 】

窒素固定に向けてリモデリングされた微生物の特性

【 0 5 5 7 】

窒素固定に向けてリモデリングされた微生物の背景において、リモデリングされた微生物が持つ可能性があるいくつかの特性が存在する。例えば、図 1 J は、本開示のリモデリングされた微生物が持つことができる 5 つの特性を図示する。

【 0 5 5 8 】

50

さらに、実施例 2 に記載のように、本発明者らは、GMR プラットフォームを利用して、外因性窒素が環境中に存在する条件下であっても大気中の窒素を固定すると共に、該窒素をトウモロコシ植物に送達することができる、リモデリングされた非属間細菌（すなわち、*Kosakonia sacchari*）を生産した。リモデリングプロセスが成功裏に、(1) *nifA* 発現を内因性窒素調節から切り離れた、かつ(2) 固定窒素の同化及び排出を改善したことを例示する、図 1 K ~ M を参照されたい。

【0559】

これらのリモデリングされた微生物は最終的に、トウモロコシ作物に施用されたときにトウモロコシ収穫高の改善をもたらす。図 1 N を参照のこと。

【0560】

GMR プラットフォームは、差し迫った環境上の懸念を解決する窒素固定及び送達に向けた手法を提供する

【0561】

先で説明したように、工業的ハーバーボッシュ法によって生産される窒素肥料は、標的作物によって十分に利用されない。雨、流出、熱、揮発、及び土壌マイクロバイオーマが、施用された化学肥料を劣化させる。これでは、お金を無駄にするだけでなく、収穫高が増えるどころか、公害を増やすことにもなる。このために、国際連合は、80% 近い肥料が、作物がそれを利用することができる前に失われると算出している。結果として、現代的な農業用肥料の生産及び送達は、環境に有害だけでなく、極めて非効率的でもある。施肥不足の圃場、過剰施肥された圃場、及び環境的に有害な窒素流出をもたらす、現行の窒素送達システムの非効率性を例示する、図 1 O を参照のこと。

【0562】

現行の GMR プラットフォーム、及び結果として得られるリモデリングされた微生物は、窒素固定及び植物への窒素送達に向けたより良好な手法を提供する。下記の実施例で見られるように、本開示のリモデリングされた非属間微生物は、外因性窒素が存在する場合であってもトウモロコシ植物の根でコロニー形成すると共に、該トウモロコシ植物を固定大気中の窒素で養うことができる。教示される GMR プラットフォームによって可能となる、この窒素固定及び送達システムは、現代的な農業をより環境的に持続可能なシステムに変革する一助となる。

【0563】

実施例 2：誘導型微生物リモデリング - 窒素固定の合理的な改善のための例示的な実施形態

【0564】

農業土壌を含む天然には、多様な窒素固定細菌が見られる。しかしながら、肥料の使用を減らすために作物に十分な窒素を提供する微生物の可能性は、施肥土壌におけるニトロゲナーゼ遺伝子の抑制、及び作物の根と密接に関連する存在量の少なさによって制限される可能性がある。主要な商品作物と密接に関連する微生物を同定、単離、繁殖することで、窒素感知と窒素固定を結び付ける調節ネットワークを破壊及び改善し、作物関連微生物による大きな窒素貢献を引き出し得る。この目的のために、トウモロコシの根系に関連してコロニーを形成する窒素固定微生物が同定された。このステップは、図 1 A 及び図 1 B に描かれている「マイクロバイオーマ組成の測定」に対応する。

【0565】

農学的に関連する土壌で栽培されたトウモロコシ植物の根試料を収集し、根圏及び内圏から微生物集団を抽出した。こうした試料からゲノム DNA を抽出し、その後 16S アンプリコンを配列決定して、共同体組成をプロファイリングした。

【0566】

Kosakonia sacchari 微生物（菌株 PBC 6.1）を単離し、16S rRNA 及び全ゲノム配列決定により分類した。これは、根付随微生物叢のほぼ 21% の存在量までコロニー形成することができる特に興味深い窒素固定菌である（図 2）。外因性窒素に対する菌株感受性を評価するため、純粋培養での窒素固定割合を、古典的アセ

10

20

30

40

50

チレン還元アッセイ (ARA) で、グルタミン添加補充レベルを変えて測定した。この種は、無窒素培地にて高レベルの窒素固定活性を示したが、外因性固定窒素は、*nif* 遺伝子発現及びニトロゲナーゼ活性を抑制した (菌株 PBC6.1、図3C、3D)。加えて、窒素固定条件で増殖した PBC6.1 の上清に放出されたアンモニアを測定したところ、非常に少量の固定窒素放出しか検出することができなかつた (図3E)。

【0567】

本発明者らは、PBC6.1 が、固定窒素の存在下で最適なニトロゲナーゼ発現及びアンモニア放出を可能にするように窒素代謝を制御する調節ネットワークをリモデリングすれば、施肥圃場において固定窒素の重要な寄与体になり得ると仮定した。

【0568】

導入遺伝子または合成調節エレメントを挿入せずに (非属間的に基盤となる遺伝子構築のリモデリングの結果として) 幅広い表現型リモデリングを可能にするためには、十分な遺伝的多様性が、PBC6.1 ゲノム内に存在しなければならない。単離された菌株は、少なくとも 5.4 Mbp のゲノム及び標準的窒素固定遺伝子クラスターを有する。PBC6.1 の関連窒素代謝経路は、窒素固定のモデル生物、*Klebsiella oxytoca* m5a1 の窒素代謝経路に類似している。

【0569】

特に、高い外因性固定窒素濃度において、窒素固定及びその後の宿主植物への移入を増大させることができるいくつかの遺伝子調節ネットワーク連結点を特定した (図3A)。*nifL* オペロンは、*NifA* による転写活性化ならびに *NifL* による *NifA* の窒素及び酸素依存性抑制を介して *nif* クラスターの残りを直接的に調節する。*nifL* の破壊は、酸素及び外因性固定窒素の両方の存在下で *NifA* の阻害を消失させ、*nif* 発現を向上させることができる。さらに、窒素非依存性プロモーターの制御下での *nifA* の発現は、ニトロゲナーゼ合成を、*NtrB* / *NtrC* 窒素感知複合体による調節から切り離すことができる。

【0570】

微生物により固定窒素を同化して、グルタミン合成酵素 (GS) によりグルタミンに変換することは、GS のアデニル化及び脱アデニル化を介して 2 ドメインアデニルトランスフェラーゼ (Atase) 酵素 *GlnE* により可逆的に調節され、活性をそれぞれ減弱及び回復させる。*GlnE* タンパク質を短縮して、そのアデニル除去 (AR) ドメインを欠失させると、グルタミン合成酵素の構成的アデニル化に結び付き、微生物によるアンモニア同化を制限し、細胞内及び細胞外アンモニアを増加させることができる。

【0571】

最後に、アンモニア取込みに関与するトランスポーターである *AmtB* の発現低減は、より多くの細胞外アンモニアに結びつく場合がある。

【0572】

導入遺伝子を使用せずに合理的に設計された微生物表現型を生成するために、以下の2つの手法を用いて微生物の根底にある遺伝子構造をリモデリングした：(1) タンパク質ドメインをコードするゲノム配列または全ゲノムのマーカー無し欠失を生成する手法；及び(2) ゲノム内プロモーター再編成により調節ネットワークを書き換える手法。

【0573】

反復的なりモデリングプロセスにより、PBC6.1 のいくつかの非トランスジェニック誘導体菌株を生成した (表25)。

10

20

30

40

50

【表 2 5】

表 2 5. この作業で使用された単離及び誘導体 *K. sacchari* 菌株のリスト。Prm、PBC6.1 ゲノムに由来するプロモーター配列； $\Delta glnE_{AR1}$ 及び $\Delta glnE_{AR2}$ アデニル酸除去ドメイン配列を除去する *glnE* 遺伝子の異なる短縮バージョン。

菌株 ID	遺伝子型
PBC6.1	WT
PBC6.14	$\Delta nifL::Prm1$
PBC6.15	$\Delta nifL::Prm5$
PBC6.22	$\Delta nifL::Prm3$
PBC6.37	$\Delta nifL::Prm1 \Delta glnE_{AR2}$
PBC6.38	$\Delta nifL::Prm1 \Delta glnE_{AR1}$
PBC6.93	$\Delta nifL::Prm1 \Delta glnE_{AR2} \Delta amtB$
PBC6.94	$\Delta nifL::Prm1 \Delta glnE_{AR1} \Delta amtB$

10

【0574】

いくつかの *in vitro* アッセイを実施して、誘導体菌株の特定の表現型を特徴付けた。ARA を使用して、外因性窒素に対する菌株感受性を評価した。PBC6.1 は、高グルタミン濃度でニトロゲナーゼ活性の抑制を示した (図 3 D)。対照的に、ほとんどの誘導体菌株は、抑制解除された表現型を示し、高グルタミン濃度で観察されたアセチレン還元レベルは様々であった。qPCR により分析した試料中の *nifA* 転写速度は、アセチレン還元速度と良好に相関し (図 4)、*nifL* 破壊及び *nifA* を促進する窒素非依存性プロモーターの挿入が、*nif* クラスター抑制解除に結び付き得るといふ仮説が支持された。

20

【0575】

変更された *GlnE* または *AmtB* 活性を有する菌株は、野生型またはこうした突然変異を有していない誘導体菌株と比較して、顕著に増加したアンモニウム排出速度を示し (図 3 E)、アンモニア同化及び再取込みに対するこれらの遺伝子型の効果が示された。

30

【0576】

2 つの実験を実施して、PBC6.1 誘導体とトウモロコシ植物との相互作用を研究し、植物組織内への固定窒素の組込みを定量化した。まず、微生物窒素固定の割合を、温室研究にて同位体トレーサーを使用して定量化した。手短に言えば、植物を 15 N 標識肥料を用いて栽培し、植物組織における 15 N の希釈濃度は、微生物からの固定窒素の寄与を示す。トウモロコシ実生に、選択された微生物菌株を接種し、植物を V6 成長段階まで栽培した。その後、植物を解体して、微生物コロニー形成及び遺伝子発現の測定、ならびに同位体比質量分析法 (IRMS) による植物組織中の 15 N / 14 N 比の測定を可能にした。地上部分組織の分析は、植物窒素レベルに対する PBC6.38 の寄与が少なく有意ではなく、PBC6.94 の寄与は有意であった ($p = 0.011$) ことを示した。地上トウモロコシ葉に見出された窒素のほぼ 20% が、PBC6.94 により産生され、残りは種子、ポッティングミックス、または他の土壌伝播性微生物による「バックグラウンド」固定に由来していた (図 5 C)。これは、本発明者らの微生物育種リモデリングパイプラインが、窒素肥料の存在下で植物に対して著しい窒素寄与を行うことが可能なりモデリング菌株を生成することができることを示す。植物組織内での微生物転写を測定し、*nif* 遺伝子クラスターの発現は、誘導体リモデリング菌株では観察されたが、野生型菌株では観察されず (図 5 B)、BNF が施肥条件で作物に寄与するためには、*nif* 抑制解除が重要であることが示された。qPCR により測定された根コロニー形成は、コロニー形成密度が、試験した菌株の各々で異なることを実証した (図 5 A)。PBC6.38 と PBC6.94 との間には、コロニー形成に 50 倍の差があることが観察された。この差異は、PBC6.94 が、高レベルの固定及び排出の結果として、PBC6.38 よりも根

40

50

圈での適応度が低減されたことを示すものであり得る。

【0577】

方法

培地

最少培地は、25 gの Na_2HPO_4 、0.1 gの $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、3 gの KH_2PO_4 、0.25 gの $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、1 gの NaCl 、2.9 mgの FeCl_3 、0.25 mgの $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、及び20 gのスクロースを含む（1リットル当たり）。増殖培地は、1リットル当たり50 mlの200 mMグルタミンを添加補充した最少培地であると規定される。

【0578】

ジアゾトロフの単離

トウモロコシ実生を、22（夜間）から26（日中）までに制御された温室環境で種子（DKC66-40、DeKalb、IL）から2週間成長させ、San Joaquin County、CAから収集された土壤中で16時間光サイクルに曝露した。根を収穫し、無菌脱イオン水で洗浄して、バルク土壌を除去した。根組織を、tissue lyser（Tissue Lyser II、Qiagen P/N85300）で2 mmステンレス鋼ビーズを用いて、設定30で3分間ホモジナイズし、試料を13,000 rpmで1分間遠心分離して、組織を根付随細菌から分離した。上清を、2つの画分に分割し、1つを16 S rRNAアンプリコン配列決定によるマイクロバイオームの特徴評価に使用し、残りの画分を希釈し、1.5%寒天を添加補充した無窒素ブロス（NfB）培地にプレートした。プレートを、30で5~7日間にわたってインキュベートした。出現したコロニーを、nifH遺伝子の存在に関して、プライマーUeda19f及びUeda406rを用いたコロニーPCRにより試験した。nifHコロニーPCRが陽性である菌株からゲノムDNAを単離し（QIAamp DNAミニキット、カタログ番号51306、QIAGEN、Germany）、配列決定した（Illumina MiSeq v3、SeqMatic、Fremont、CA）。配列を組み立て、注釈を付けた後、窒素固定遺伝子クラスターを含む単離株を、ダウンストリーム研究に使用した。

【0579】

単離実生のマイクロバイオームプロファイリング

ゲノムDNAを、ZR-96 Genomic DNA Iキット（Zymo Research、P/N D3011）を使用して根付随細菌から単離し、799f及び1114rを標的とするnexteraバーコード付きプライマーを使用して、16 S rRNAアンプリコンを生成した。アンプリコンライブラリーを精製し、Illumina MiSeq v3プラットフォーム（SeqMatic、Fremont、CA）で配列決定した。リードは、Krakenを使用し、minikrakenデータベースを使用して、分類学的に分類した（図2）。

【0580】

アセチレン還元アッセイ（ARA）

アセチレン還元アッセイの改変バージョンを使用して、純粋培養条件におけるニトロゲナーゼ活性を測定した。菌株を、SOB（RPI、P/N S25040-1000）中で24時間30にて200 RPMで振盪して単一のコロニーから増殖させ、その後1:25で増殖培地にて継代培養し、24時間にわたって好氣的に増殖させた（30、200 RPM）。その後、1 mlの最少培地培養物を、気密性Hungateチューブ中の0~10 mMグルタミンを添加補充した4 mlの最少培地に添加し、4時間にわたって嫌氣的に増殖させた（30、200 RPM）。10%ヘッドスペースを取り出し、その後注射により等容積のアセチレンと入れ替え、1時間にわたってインキュベーションを継続した。続いて、2 mlのヘッドスペースをガス密注射器で取り出し、水素炎イオン化検出器（FID）を装備したAgilent 6850ガスクロマトグラフを使用して、エチレン産生を定量化した。

10

20

30

40

50

【0581】

アンモニウム排出アッセイ

アンモニア形態の固定窒素の排出を、嫌気性バイオリクターでのバッチ発酵を使用して測定した。菌株を、96ウェルDeepWellプレートの1ml/ウェルSOBで単一コロニーから増殖させた。プレートを、30℃にて24時間200RPMで振盪してインキュベートし、その後1ml/ウェルの増殖培地を含む新たなプレートに1:25希釈した。細胞を、24時間(30℃、200RPM)でインキュベートし、その後、最少培地を含む新たなプレートに1:10希釈した。プレートを、>98.5%窒素、1.2~1.5%水素、及び<30ppM酸素の混合気体を有する嫌気性チャンパーに移し、室温で66~70時間にわたって1350RPMでインキュベートした。初期培養バイオマスを、590nmの光学濃度を測定することにより最終バイオマスと比較した。その後、細胞を遠心分離により分離し、リアクターブロスの上清を、Megazyme Ammonia Assayキット(P/N K-AM1AR)を使用して、遊離アンモニアについてアッセイし、各時点でバイオマスに対して正規化した。

10

【0582】

根付随マイクロバイオームの抽出

根を穏やかに振って、固着していない粒子を除去し、根系を分離し、RNA安定化溶液(Thermo Fisher P/N AM7021)に30分間浸漬した。その後、根を、無菌脱イオン水で手短にすすいだ。試料を、tissue lyser(Tissue Lyser II、Qiagen P/N 85300)で1/2インチステンレス鋼ボールベアリングを用いたビーズベティングを使用して2mlの溶解緩衝液(Qiagen P/N 79216)中でホモジナイズした。ZR-96 Quick-gDNAキット(Zymo Research P/N D3010)を用いてゲノムDNA抽出を実施し、RNeasyキット(Qiagen P/N 74104)を使用してRNA抽出を実施した。

20

【0583】

根コロニー形成アッセイ

植栽4日後に、1mlの細菌一晚培養物(およそ 10^9 cfu)を、植栽した種子の上方の土壌に適用した。実生に、0.5mM硝酸アンモニウムで添加補充された25mlの改変Hoagland溶液を週3回施肥した。植栽4週間後に、根試料を収集し、全ゲノムDNA(gDNA)を抽出した。根コロニー形成を、野生型または誘導体菌株ゲノムのいずれかの固有領域を増幅するように設計されたプライマーによるqPCRを使用して定量化した。qPCR反応効率を、標的ゲノムに由来する既知量のgDNAから生成された標準曲線を使用して測定した。データは、組織重量及び抽出容量を使用して生重量1g当たりのゲノムコピー数に対して正規化した。各実験で、コロニー形成数を未処理対照実生と比較した。

30

【0584】

植物内トランスクリプトミクス

根付随微生物の転写プロファイリングを、成長させた実生で測定し、Root Colonizationアッセイに記載されているように処理した。精製RNAを、Illumina NextSeqプラットフォーム(SeqMatic、Fremont、CA)を使用して配列決定した。リードを、「- - very - sensitive - local」パラメータ及び最小アラインメントスコア30を使用したbowtie2を使用して、接種した菌株のゲノムにマッピングした。ゲノムにわたるカバレッジを、samtoolsを使用して算出した。カバレッジの差異を、ハウスキーピング遺伝子発現に対して正規化し、Circosを使用してゲノムにわたって、及びDNAplotlibを使用してnif遺伝子クラスターにわたって視覚化した。加えて、植物内転写プロファイルを、標的化Nanostrip分析により定量化した。精製RNAを、nCounter Sprint(Core Diagnostics、Hayward、CA)で処理した。

40

【0585】

50

15 N 希釈温室研究

15 N 肥料希釈実験を実施して、最適化菌株活性を植物内で評価した。最小限のバックグラウンドNを含む植栽媒体を、パーミキュライト及び水洗砂 (DI H₂Oで5回すすいだ) の混合物を使用して調製した。砂混合物を、122 で1時間オートクレープし、ほぼ600gを40立方インチ (656 mL) の鉢に量り取り、それを無菌DI H₂Oで飽和させ、植栽前に24時間排水させた。トウモロコシ種子 (DKC66-40) を、0.625%次亜塩素酸ナトリウム中で10分間表面滅菌し、その後、滅菌蒸留水で5回すすぎ、1cmの深さに植栽した。植物を、平均して22 (夜間) ~ 26 (日中) の室温にて16時間日長で4週間にわたって蛍光灯下で維持した。

【0586】

植栽5日後、1mlの細胞懸濁物を出現しつつある子葉鞘に直接灌水して、実生に接種した。接種物は、SOBでの5ml一晚培養物から調製した。一晚培養物を遠沈し、5mlのPBSに2回再懸濁して、残留SOBを除去してから、最終的に1.0のODに希釈した (およそ10⁹ CFU/ml)。対照植物を、無菌PBSで処理し、各処理を10個の複製植物に適用した。

【0587】

植栽の5、9、14、及び19日後に2% 15 N富化2mM KNO₃を含む25ml肥料溶液を植物に施肥し、植栽の7、12、16、及び18日後にKNO₃を含まない同じ溶液で施肥した。肥料溶液は、3mmol CaCl₂、0.5mmol KH₂PO₄、2mmol MgSO₄、17.9µmol FeSO₄、2.86mgのH₃BO₃、1.81mgのMnCl₂・4H₂O、0.22mgのZnSO₄・7H₂O、51µg CuSO₄・5H₂O、0.12mgのNa₂MoO₄・2H₂O、及び0.14nmol NiCl₂を含んでいた (1リットル当たり)。鉢は全て、必要に応じて無菌DI H₂Oを注水して、流出のない一貫した土壤水分を維持した。

【0588】

4週時に、植物を収穫し、最も低い節で分離して、根gDNA及びRNA抽出ならびにIRMS用地上部分組織の試料とした。地上部分組織を、必要に応じて拭いて砂を除去し、全体を紙袋に入れ、60 で少なくとも72時間乾燥させた。完全に乾燥したら、全地上部分組織をビーズベティングでホモジナイズし、MBL Stable Isotope Laboratory (The Ecosystems Center, Woods Hole, MA) が、5~7mgの試料を、15Nの同位体比質量分析法 (IRMS) で分析した。NDF Aパーセントは下記式を使用して算出した: %NDF A = (UTCの15Nの平均 - 試料の15N) / (UTCの15Nの平均) × 100。

【0589】

実施例3: 本開示のリモデリングされた微生物による圃場試験 - 2016年夏

様々な窒素管理体制下におけるトウモロコシ成長及び生産性に対する本開示のリモデリングされた菌株の有効性を評価するため、圃場試験を実施した。

【0590】

試験は、(1) 6つの菌株と対照の7つのサブプロット処理を実施した - 4つのメインプロットは、現地検証による対窒素最大収益 (MRTN) の0、15、85、及び100%で構成されていた。対照 (UTCのみ) は、10 100% MRTNと、5、10、または15ポンドで実施した。処理は4つの複製物に行った。

【0591】

トウモロコシのプロット (最小) は、長さ30フィートの4条であり、1栽培地当たり124プロットであった。観察は全てプロットの中央2条から行われ、破壊的試料採取は全て、外側の条から行われた。種子試料は、使用前の1.5~2時間まで冷蔵した。

【0592】

現地農業慣行: 種子は、従来の殺真菌剤及び殺虫剤処理剤を含まない市販のトウモロコシであった。全ての種子処理は、均一性を確保するために1人の種子処理専門家によって実施した。植栽日、播種率、雑草/昆虫管理などは、現地農業慣行に任せた。殺真菌剤適

10

20

30

40

50

用を除き、標準的管理慣行に従った。

【0593】

土壌の特徴付け：土質及び土壌肥沃度を評価した。土壌試料は、50 lbs / Ac未満の残留硝酸塩レベルを保証するために、各複製に対して事前に植栽した。土壌コアは0 cm ~ 30 cmまで採取した。土壌は、pH、CEC、総K及びPについてさらに特徴付けられた。

【0594】

評価：植栽後14日目(DAP) / エーカーの初期植物群を評価し、さらに以下の点を評価した：(1) 活力(1~10のスケール、W/10 = 優秀) 14 DAP及びV10；(2) プロットで症状が明らかになった場合、病害評価を記録する(3) プロットで倒伏が発生した場合、倒伏の違いを記録する(4) 標準水分率に調整した収穫高(Bu / エーカー)(5) 試験体重(6) 穀物水分率。

10

【0595】

試料採取要件：3つの時点(試験開始前、V10~VT、収穫1週後)で土壌を試料採取した。6つの栽培地全て及びプロット全てを、1試料当たり10グラムで試料採取した(124プロット×3時点×6栽培地)。

【0596】

コロニー形成試料採取：コロニー形成試料を、5つの栽培地では2つの時点(V10及びVT)で、及び6つの時点(V4、V8、V10、VT、R5、及び収穫後)で収集した。試料は、以下のように収集した：(1) 0%~100% MRTNは、1栽培地当たり60プロット；(2) 外側の条から無作為に選択された1プロット当たり4つの植物；(3) 5グラムの根、8インチの茎、及び上部3枚の葉 - 袋詰めし、各々に個別に識別子を割り当て、1プロット当たり12 / 袋；(4) 5つの栽培地(60プロット×2時点×12袋 / プロット)；及び1つの栽培地(60プロット×6時点×12袋 / プロット)。

20

【0597】

正規化差植生指数(NDVI)決定を、2つの時点(V4~V6及びVT)にて、Greenseeker機器を使用して行った。6つの栽培地全てで各プロットを評価した(124プロット×2時点×6栽培地)。

【0598】

最も良好に処理差異を示した1つの栽培地の根分析を、Win Rhizoを用いて実施した。1プロット当たり10個の植物を、無作為に試料採取し(各外側条の隣接する5個；V3~V4段階の植物が好ましかった)、穏やかに洗浄して、できるだけ合理的に土を除去した。10個の根をビニール袋に入れ、ラベルを付けた。Win Rhizo Root Analysisで分析した。

30

【0599】

6箇所の栽培地全てにおいてR2~R5の茎特徴を測定した。1プロット当たり10個の植物の6インチの高さの茎直径を記録し、6インチマークよりも上方の最初の節間の高さも記録した。10個の植物をモニターした；2つの内側条の中央から連続5個の植物。6箇所の栽培地を評価した(124プロット×2測定×6栽培地)。

【0600】

組織硝酸塩を、全てのプロット及び全ての栽培地で分析した。トウモロコシが黒色層を形成した1~3週後に、土壌の上方6インチから始まる茎の8インチ区画；葉鞘を取り出した。全ての栽培地及びプロットを評価した(6栽培地×124プロット)。

40

【0601】

以下の天候データを、植栽から収穫までの全ての栽培地で記録した：1日の最高及び最低温度；播種時の土壌温度；1日の降雨量+灌水(該当する場合)；ならびに過度の雨、風、低温、または高温などのあらゆる異常な気象事象。

【0602】

6箇所の栽培地全体にわたる収穫高データは表26に示されている。窒素割合は、収穫高に顕著な影響を示したが、菌株はどの窒素割合でも影響を示さなかった。しかしながら

50

、最低の窒素割合では、菌株 C I 0 0 6、C M 0 2 9、及び C I 0 1 9 は、U T C よりも数的に 4 ~ 6 b u / エーカーだけ収穫高が高かった。また、菌株 C M 0 2 9、C I 0 1 9、及び C M 0 8 1 による収穫高は、15% MRTN では、2 ~ 4 b u / エーカーだけ数的に増加した。

【表 2 6 - 1】

表 2 6 : 6 箇所の栽培地全体にわたる収穫高データ

MRTN%	YLD (bu)	活力 _E	活力 _L	茎直径 (mm)	節間長 (インチ)	NDVI _Veg	NDVI _Rep
0	143.9	7.0	5.7	18.87	7.18	64.0	70.6
15	165.9	7.2	6.3	19.27	7.28	65.8	72.5
85	196.6	7.1	7.1	20.00	7.31	67.1	74.3

10

20

30

40

50

【表 2 6 - 2】

MRTN%	YLD (bu)	活力 _E	活力 _L	茎直径 (mm)	節間長 (インチ)	NDVI _Veg	NDVI _Rep
100	197.3	7.2	7.2	20.23	7.37	66.3	72.4
菌株	YLD (bu)	活力 _E	活力 _L	茎直径 (mm)	節間長 (インチ)	NDVI _Veg	NDVI _Rep
CI006 (1)	176.6	7.2	6.6	19.56	18.78	66.1	72.3
CM029 (2)	176.5	7.1	6.5	19.54	18.61	65.4	71.9
CM038 (3)	175.5	7.2	6.5	19.58	18.69	65.7	72.8
CI019 (4)	176.0	7.1	6.6	19.51	18.69	65.5	72.9
CM081 (5)	176.2	7.1	6.6	19.57	18.69	65.8	73.1
CM029/CM081 (6)	174.3	7.1	6.6	19.83	18.79	66.2	72.5
UTC (7)	176.4	7.1	6.6	19.54	18.71	65.9	71.7
MRTN / 菌株	YLD (bu)	活力 _E	活力 _L	茎直径 (mm)	節間長 (インチ)	NDVI _Veg	NDVI _Rep
0 1	145.6	7.0	5.6	19.07	7.12	63.5	70.3
0 2	147.0	7.0	5.5	18.74	7.16	64.4	70.4
0 3	143.9	7.0	5.5	18.83	7.37	64.6	70.5
0 4	146.0	6.9	5.7	18.86	7.15	63.4	70.7
0 5	141.7	7.0	5.8	18.82	7.05	63.6	70.9
0 6	142.2	7.2	5.8	19.12	7.09	64.7	69.9
0 7	141.2	7.0	5.8	18.64	7.32	64.0	71.4
15 1	164.2	7.3	6.1	19.09	7.21	66.1	71.5
15 2	167.3	7.2	6.3	19.32	7.29	65.5	72.7
15 3	165.6	7.3	6.3	19.36	7.23	64.8	72.5
15 4	167.9	7.3	6.4	19.31	7.51	66.1	72.3
15 5	169.3	7.2	6.2	19.05	7.32	66.0	72.8
15 6	161.9	7.1	6.3	19.45	7.20	66.2	72.2
15 7	165.1	7.3	6.4	19.30	7.18	66.0	73.3

10

20

30

40

50

【表 2 6 - 3】

MRTN%	YLD (bu)	活力 _E	活力 _L	茎直径 (mm)	節間長 (インチ)	NDVI _Veg	NDVI _Rep
85 1	199.4	7.3	7.2	19.70	7.32	67.2	74.0
85 2	195.1	7.1	7.2	19.99	7.09	66.5	74.4
85 3	195.0	7.0	7.0	20.05	7.26	67.3	74.6
85 4	195.6	7.2	7.1	20.04	7.29	66.4	74.4
85 5	196.4	7.2	7.0	19.87	7.39	67.3	74.5
85 6	195.1	7.0	6.9	20.35	7.34	67.4	74.4
85 7	199.5	6.9	7.2	19.97	7.48	67.4	74.1
100 1	197.1	7.2	7.3	20.38	7.68	67.5	73.4
100 2	196.5	7.0	7.1	20.11	7.21	65.3	70.2
100 3	197.6	7.5	7.3	20.08	7.42	66.3	73.4
100 4	194.6	7.1	7.1	19.83	7.40	66.1	74.1
100 5	197.4	7.2	7.3	20.53	7.36	66.2	74.3
100 6	198.1	7.2	7.4	20.40	7.16	66.6	73.6
100 7	199.9	7.2	7.2	20.26	7.32	66.2	68.1

10

20

【0603】

別の分析手法は、表 2 7 に示されている。この表には、窒素に対する応答が最も大きかった 4 箇所の栽培地が含まれており、そのことは、利用可能な残留窒素が最も低かったことを示唆する。この手法は、窒素割合が収穫高に顕著な影響を及ぼし、菌株は全ての窒素割合にわたって平均すると影響を及ぼさなかったという評価を変更しない。しかしながら、全ての菌株では、N 割合が最も低い場合に数値的収穫高がより顕著に有利であり、特に C I 0 0 6、C M 0 2 9、及び C M 0 2 9 / C M 0 8 1 では、収穫高が 8 から 1 0 b u / エーカーまで増加した。15% MRTN では、菌株 C M 0 8 1 は、収穫高が U T C よりも 5 b u だけ多かった。

30

【表 2 7 - 1】

表 2 7 : 4 箇所の栽培地全体にわたる収穫高データ
4 箇所の栽培地平均 - SGS, AgIdea, Bennett, RFR

MRTN%	YLD (bu)	活力 _E	活力 _L	茎直径 (mm)	節間長 (インチ)
0	137.8	7.3	5.84	18.10	5.36
15	162.1	7.5	6.63	18.75	5.40
85	199.2	7.4	7.93	19.58	5.62
100	203.5	7.5	8.14	19.83	5.65

40

50

【表 2 7 - 2】

菌株	YLD (bu)	活力 _E	活力 _L	茎直径 (mm)	節間長 (インチ)
CI006 (1)	175.4	7.5	7.08	19.03	5.59
CM029 (2)	176.1	7.4	7.08	19.09	5.39
CM038 (3)	175.3	7.5	7.05	19.01	5.59
CI019 (4)	174.8	7.5	7.16	19.02	5.45
CM081 (5)	176.7	7.4	7.16	19.00	5.53
CM029/CM081 (6)	175.1	7.4	7.17	19.33	5.46
UTC (7)	176.0	7.3	7.27	18.98	5.55
MRTN / 菌株	YLD (bu)	活力 _E	活力 _L	茎直径 (mm)	節間長 (インチ)
0 1	140.0	7.3	5.69	18.32	5.28
0 2	140.7	7.4	5.69	18.19	5.23
0 3	135.5	7.3	5.63	17.95	5.50
0 4	138.8	7.3	5.81	17.99	5.36
0 5	136.3	7.3	6.06	18.05	5.34
0 6	141.4	7.5	6.00	18.43	5.30
0 7	131.9	7.3	6.00	17.75	5.48
15 1	158.0	7.6	6.44	18.53	5.34
15 2	164.1	7.5	6.56	19.13	5.42
15 3	164.3	7.6	6.63	18.68	5.51
15 4	163.5	7.6	6.81	18.84	5.34
15 5	166.8	7.5	6.63	18.60	5.39
15 6	156.6	7.4	6.56	18.86	5.41
15 7	161.3	7.5	6.81	18.62	5.42

10

20

30

40

50

【表 27 - 3】

85	1	199.4	7.6	8.00	19.15	5.63
85	2	199.0	7.4	8.09	19.49	5.46
85	3	198.2	7.4	7.75	19.88	5.69
85	4	196.8	7.4	8.00	19.65	5.60
85	5	199.5	7.4	7.75	19.26	5.70
85	6	198.7	7.3	7.81	19.99	5.61
85	7	202.8	7.2	8.13	19.66	5.65
100	1	204.3	7.4	8.19	20.11	6.10
100	2	200.6	7.3	8.00	19.53	5.46
100	3	203.3	7.7	8.19	19.55	5.67
100	4	200.2	7.6	8.00	19.59	5.49
100	5	203.9	7.4	8.19	20.08	5.68
100	6	203.8	7.5	8.31	20.05	5.52
100	7	208.1	7.4	8.13	19.90	5.63

10

20

【0604】

また、圃場試験の結果が、図9～15に示されている。結果は、本開示の微生物が、植物収穫高を増加させることができることを示しており、これは、教示される微生物が、重要な農業作物、つまりトウモロコシ中で窒素固定を増加させることができることを指している。

【0605】

圃場に基づく結果は、選択された微生物菌株のゲノムを非属間的に改変して、導入操作された菌株を作物に適用した場合に圃場状況にて農業的に関連する結果をもたらすための開示される方法が有効であることをさらに確認するものである。

30

【0606】

図6は、菌株CI006 (WT *Kosakonia sacchari*) に由来する改変リモデリング菌株の系統を示す。圃場データは、CI006 WT菌株の導入操作された誘導体、つまりCM029が、圃場状況にて数的に関連する結果をもたらすことができることを実証している。例えば、表26は、CM029が、0% MRTNでは、141.2 bu / エーカーの未処理対照と比較して、147.0 bu / エーカーの収穫高であったことを示す(5.8 bu / エーカーの増加)。また、表26は、CM029が、15% MRTNでは、165.1 bu / エーカーの未処理対照と比較して、167.3 bu / エーカーの収穫高であったことを示す(2.2 bu / エーカーの増加)。表27は、これらの結果を支持し、CM029が、0% MRTNでは、131.9 bu / エーカーの未処理対照と比較して、140.7 bu / エーカーの収穫高であったことを示す(8.8 bu / エーカーの増加)。また、表27は、CM029が、15% MRTNでは、161.3 bu / エーカーの未処理対照と比較して、164.1 bu / エーカーの収穫高であったことを示す(2.8 bu / エーカーの増加)。

40

【0607】

図7は、菌株CI019 (WT *Rahnella aquatilis*) に由来する改変リモデリング菌株の系統を示す。圃場データは、CI019 WT菌株の導入操作された誘導体、つまりCM081が、圃場状況にて数的に関連する結果をもたらすことがで

50

きることを実証している。例えば、表 26 は、C M 0 8 1 が、15% M R T N では、165.1 bu / エーカーの未処理対照と比較して、169.3 bu / エーカーの収穫高であったことを示す(4.2 bu / エーカーの増加)。表 27 は、これらの結果を支持し、C M 0 8 1 が、0% M R T N では、131.9 bu / エーカーの未処理対照と比較して、136.3 bu / エーカーの収穫高であったことを示す(4.4 bu / エーカーの増加)。また、表 27 は、C M 0 8 1 が、15% M R T N では、161.3 bu / エーカーの未処理対照と比較して、166.8 bu / エーカーの収穫高であったことを示す(5.5 bu / エーカーの増加)。

【0608】

さらに、表 27 では、C M 0 2 9 / C M 0 8 1 の組合せが、0% M R T N にて、131.9 bu / エーカーの未処理対照と比較して、141.4 bu / エーカーの収穫高であったこと(9.5 bu / エーカーの増加)を理解することができる。

【0609】

実施例 4 : 本開示のリモデリングされた微生物による圃場試験 - 2017年夏

様々な窒素管理体制下におけるトウモロコシ成長及び生産性に対する本開示のリモデリングされた菌株の有効性を評価するため、圃場試験を実施した。下記の圃場データは、本開示の非属間微生物が、大気中の窒素を固定し、窒素を植物に送達し、窒素制限環境ならびに非窒素制限環境の両方で収穫高の増加をもたらすことができることを実証している。

【0610】

試験は、アメリカ合衆国の7箇所の栽培地で実施し、6箇所は、地理的に多様な米国中西部の栽培地であった。肥料処理には5つの窒素管理体制を使用した：サイト/地域の標準農業実施の100%、100%マイナス25ポンド、100%マイナス50ポンド、100%マイナス75ポンド、及び0%；全て1エーカー当たり。100%管理体制の1エーカー当たりの窒素のポンド数は、サイト/地域の標準農業慣行に依存した。前述の窒素管理体制は、1エーカー当たり約153ポンドから1エーカー当たり約180ポンドまでの範囲であり、平均で1エーカー当たり約164ポンドの窒素であった。

【0611】

各肥料管理体制内には、14の処理が存在した。各管理体制は、6つの複製物を有し、分割プロット設計を使用した。14の処理が含まれていた：12個の異なる微生物、主プロットと同じ肥料割合の1つのU T C、及び100%の窒素を有する1つのU T C。100%窒素管理体制では、第2のU T Cは、100+25ポンドである。

【0612】

トウモロコシのプロットは、最小で、長さ30フィートの4条であり(条間は30インチ)、1栽培地当たり420プロットであった。観察は全て、別様の記載がない限り、植物の中央2条から行われ、破壊的試料採取は全て、外側の条から行われた。種子試料は、使用前の1.5~2時間まで冷蔵した。

【0613】

現地農業慣行：種子は、市販の種子処理剤が適用された市販のトウモロコシであり、生物学的な同時適用を受けていなかった。播種割合、植栽日時、雑草/昆虫管理、収穫時期、及び他の標準的管理慣行は、殺真菌剤適用(必要な場合)を除き、その地域の現地農業慣行の基準に従った。

【0614】

微生物適用：微生物を、通常の化学処理を既に受けた種子への種子処理において、種子に適用した。微生物を含む発酵ブロスで種子をコーティングした。

【0615】

土壌の特徴付け：土質及び土壌肥沃度を評価した。標準的土壌試料採取手順を使用し、試料は、0~30cm及び30~60cmの深さの土壌コアを含んでいた。標準的土壌試料採取は、硝酸性窒素、アンモニウム窒素、総窒素、有機物、及びC E Cの決定を含んでいた。標準的土壌試料採取は、pH、総カリウム量、及び総亜リン酸量の決定をさらに含んでいた。窒素肥料レベルを決定するため、0~12インチ、可能であれば12インチ~

24 インチの土壌領域が硝酸性窒素用に確実に採取されるように、各栽培地の植栽前土壌試料を採取した。

【0616】

植栽及び施肥前に、2 ml の土壌試料を、0 から 6 ~ 12 インチまで UTC から収集した。1 窒素領域当たり 1 複製物当たり 1 つの試料を、条の中間を使用して収集した。(5 つの肥料管理体制 × 6 複製物 = 30 個の土壌試料)。

【0617】

植栽後 (V4 ~ V6)、2 ml 土壌試料を、0 から 6 ~ 12 インチまで UTC から収集した。1 窒素領域当たり 1 複製物当たり 1 つの試料を、条の中間を使用して収集した。(5 つの肥料管理体制 × 6 複製物 = 30 個の土壌試料)。

10

【0618】

植栽後 (V4 ~ V6)、2 ml 土壌試料を、0 から 6 ~ 12 インチまで UTC から収集した。1 窒素領域当たり 1 複製物当たり 1 つの試料を、条の中間を使用して収集した。追加の収穫後土壌試料を、UTC の 0 ~ 12 インチから、及び潜在的に UTC の 12 ~ 24 インチから収集した (5 つの肥料管理体制 × 6 複製物 = 30 個の土壌試料)。

【0619】

全ての肥料管理体制で 0 ~ 12 インチ及び 12 ~ 24 インチの V6 ~ V10 土壌試料を各肥料管理体制から得た (100% 及び 100% + 25 lb の処理を除く [100% ブロックにおいて])。 (5 つの肥料管理体制 × 2 つの深さ = 1 栽培地当たり 10 個の試料)

20

【0620】

全ての肥料管理体制で 0 ~ 12 インチ及び 12 ~ 24 インチの収穫後土壌試料を、各肥料管理体制から得た (100% 及び 100% + 25 lb の処理を除く [100% ブロックにおいて])。 (5 つの肥料管理体制 × 2 つの深さ = 1 栽培地当たり 10 個の試料)。

【0621】

評価：初期植物集団を、約 50% UTC で評価し、最終植物集団を、収穫前に評価した。評価は、(1) 可能であれば温度 (温度プローブ)；(2) V4 及び V8 ~ V10 での活力 (1 ~ 10 のスケール、10 = 優秀)；(3) V8 ~ V10 及び V14 での植物丈；(4) 標準水分パーセンテージに調整された収穫高 (プッシュェル / エーカー)；(5) 試験重量；(6) 穀物水分パーセンテージ；(7) 黒色層での茎硝酸塩試験 (420 プロット × 7 栽培地)；(8) V4 ~ V6 における 0% 及び 100% 肥料のジップロック (登録商標) 袋中の 1 プロット当たり 1 植物のコロニー形成 (1 植物 × 14 処理 × 6 複製物 × 2 肥料管理体制 = 168 植物)；(9) V4 ~ V6 における 0% 及び 100% 肥料のジップロック (登録商標) 袋中の 1 プロット当たり 1 植物のトランスクリプトミクス (1 植物 × 14 処理 × 6 複製物 × 2 肥料管理体制 = 168 植物)；(10) Greenseeker 機器を使用して 2 時点 (V4 ~ V6 及び VT) で 7 箇所の栽培地全ての各プロットを評価するための正規化差植生指数 (NDVI) または正規化差レッドエッジ (NDRE) の決定 (420 プロット × 2 時点 × 7 栽培地 = 5,880 データポイント)；(11) 10 植物 / プロットの 6 インチの高さの茎直径を記録し、6 インチマークよりも上方の最初の節間の長さを記録し、10 植物 (2 つの内側条の中央からの連続 5 つの植物) をモニターすることにより、R2 ~ R5 の 7 箇所の栽培地全てにて測定した茎特徴 (420 プロット × 10 植物 × 7 栽培地 = 29,400 データポイント) を含んでいた。

30

40

【0622】

モニタリングスケジュール：V3 ~ V4 の段階で実施者が全ての試験地を訪れて、処理に対する初期季節応答を評価し、生殖成長段階中に成熟度をモニターした。現地協力者が、継続的に研究試験地を訪れた。

【0623】

天候情報：植栽から収穫までにわたって天候データを収集した。天候データは、1 日の最低及び最高温度；播種時の土壌温度；1 日の降雨量 + 灌水 (該当する場合)；ならびに過度の風、雨、低温、高温などの異常な気象事象で構成されていた。

50

【0624】

データ報告：上記に示されているデータを含めて、圃場試験は、土質；条間隔；プロットサイズ；灌水；耕うん；以前の作物；播種割合；植物集団；供給源、割合、タイミング、及び配置を含む季節肥料投入；収穫面積寸法、手作業または機械によるなどの収穫方法、ならびに使用される測定ツール（秤、収穫高モニターなど）を含むデータポイントを生成した。

【0625】

結果：前述の圃場試験の選択された結果は、図16及び図17に報告されている。

【0626】

図16では、本開示のリモデリングされた微生物（つまり、6-403）が、野生型菌株（WT）よりも高い収穫高をもたらし、未処理対照（UTC）よりも高い収穫高をもたらしたことを理解することができる。「-251b N」処理では、その地域の標準的農業慣行よりも1エーカー当たり251b少ないNが使用される。「100% N」UTC処理は、その地域の標準的農業慣行を示すことが意図されており、Nの標準的使用の100%が、農業従事者により配置される。微生物「6-403」は、NCMA201708004として寄託され、表1に見出すことができる。これは、突然変異体*Kosakonia sacchari*（CM037とも呼ばれる）であり、CI006 WTに由来する後代突然変異体菌株である。

10

【0627】

図17では、得られた収穫高の結果が、本開示のリモデリングされた微生物が、栽培地全体にわたって一貫して性能を発揮することを実証する。さらに、収穫高の結果は、本開示の微生物が、窒素ストレス環境（つまり、窒素制限環境）ならびに十分な窒素供給を有する環境（つまり、非窒素制限条件）の両方で良好な性能を発揮することを実証している。微生物「6-881」（CM094、PBC6.94としても知られている）は、CI006 WTに由来する後代突然変異体*Kosakonia sacchari*菌株であり、NCMA201708002として寄託され、表1に見出すことができる。微生物「137-1034」は、CI137 WTに由来する後代突然変異体*Klebsiella variicola*菌株であり、NCMA201712001として寄託され、表1に見出すことができる。微生物「137-1036」は、CI137 WTに由来する後代突然変異体*Klebsiella variicola*菌株であり、NCMA201712002として寄託され、表1に見出すことができる。微生物「6-404」（CM38、PBC6.38としても知られている）は、CI006 WTに由来する後代突然変異体*Kosakonia sacchari*菌株であり、NCMA201708003として寄託され、表1に見出すことができる。

20

30

【0628】

実施例5 農業系に有益な非属間リモデリング微生物の属

本開示のリモデリング微生物を、一季節にわたって1エーカーで産生された窒素の生産について、互いに対して評価及び比較した。図8、図24、及び図25を参照されたい。

【0629】

本発明者らは、導入操作された非属間微生物の集団が現代的条植え作物農業系に有益であるためには、微生物の集団は、1季節当たり1エーカー当たり少なくとも1ポンドまたはそれよりも多くの窒素を産生する必要があるという仮説を立てる。

40

【0630】

そのため、本発明者らは、驚くべきことに、特に、非マメ科作物の収穫高の増加；及び/または外因性窒素適用に対する農業従事者の依存性の低減；及び/または非窒素制限環境下でさえも、1季節当たり1エーカー当たり少なくとも1ポンドの窒素を産生する能力に寄与することができる微生物の機能性属を発見した。その属は、コロニー形成能力×1時間当たり1微生物当たりの産生されたNのmmolの積により規定される（つまり、図8、24、及び25の分割線）。

【0631】

50

図 8、24、及び 25 に関して、本開示の微生物を使用したある特定のデータを、本開示の微生物により 1 エーカー - 季節当たりの送達された窒素のポンドのヒートマップを示すために集計し、それらは、窒素 / 微生物 - 時間の mmol により、生重量 1 g 当たりの微生物の関数として記録されている。より大きな画像を横切る細線の下方は、1 エーカー - 季節当たり 1 ポンド未満の窒素を送達する微生物であり、この線の上方は、1 エーカー - 季節当たり 1 ポンドよりも多くの窒素を送達する微生物である。

【0632】

圃場データ及び野生型コロニー形成ヒートマップ：図 8 のヒートマップに使用されている微生物を、トウモロコシでの N 産生についてアッセイした。WT 菌株 CI006 及び CI019 の場合、トウモロコシ根コロニー形成データを、単一の圃場サイトから得た。残りの菌株の場合、コロニー形成は、WT 圃場レベルと同じであると仮定した。N 固定活性を、5 mM グルタミンでの *in vitro* の ARA アッセイを使用して決定した。図 8 のヒートマップの下にある表は、ヒートマップに示されている各微生物の生重量 1 グラム当たりの正確な CFU ($\text{CFU} / \text{g fw}$) と共に、1 時間当たり 1 微生物当たりの産生された mmol N の正確な値 ($\text{mmol N} / \text{微生物 時間}$) を示している。

10

【0633】

圃場データヒートマップ：図 24 のヒートマップに使用されているデータは、圃場条件におけるトウモロコシでの N 産生をアッセイした微生物菌株に由来する。各点は、単一の圃場サイトからのトウモロコシ根コロニー形成データを使用した、微生物により産生された $\text{lb N} / \text{エーカー}$ を表わす。N 固定活性を、グルタミンまたはリン酸アンモニウムの形態の 5 mM N での *in vitro* の ARA アッセイを使用して決定した。下記の表 28 は、図 24 のヒートマップに示されている各微生物の生重量 1 グラム当たりの正確な CFU ($\text{CFU} / \text{g fw}$) と共に、1 時間当たり 1 微生物当たりの産生された mmol N の正確な値 ($\text{mmol N} / \text{微生物 時間}$) を示している。

20

【0634】

温室及び実験室データヒートマップ：図 25 のヒートマップに使用されているデータは、実験室及び温室条件におけるトウモロコシでの N 産生をアッセイした微生物菌株に由来する。各点は、単一の菌株により産生された $\text{lb N} / \text{エーカー}$ を表わす。白色点は、トウモロコシ根コロニー形成データが温室条件で収集された菌株を表わす。黒色点は、トウモロコシ根コロニー形成レベルが、野生型親菌株の平均圃場トウモロコシ根コロニー形成レベルから導き出されている突然変異体菌株を表わす。斜線付き点は、平均圃場トウモロコシ根コロニー形成レベルの野生型親菌株を表わす。全ての場合で、N 固定活性は、グルタミンまたはリン酸アンモニウムの形態の 5 mM N での *in vitro* の ARA アッセイによって決定した。下記の表 29 は、図 25 のヒートマップに示されている各微生物の生重量 1 グラム当たりの正確な CFU ($\text{CFU} / \text{g fw}$) と共に、1 時間当たり 1 微生物当たりの産生された mmol N の正確な値 ($\text{mmol N} / \text{微生物 時間}$) を示している。

30

40

50

【表 2 8】

表 2 8. 図 2 4 - 圃場データヒートマップ

菌株名	活性 (mmol N / 微生物 時間)	ピークコロニ ー形成 (CFU / g fw)	產生されたN/ エーカー季節	分類学的呼称
CI006	3.88E-16	1.50E+07	0.24	<i>Kosakonia sacchari</i>
6-404	1.61E-13	3.50E+05	2.28	<i>Kosakonia sacchari</i>
6-848	1.80E-13	2.70E+05	1.97	<i>Kosakonia sacchari</i>
6-881	1.58E-13	5.00E+05	3.20	<i>Kosakonia sacchari</i>
6-412	4.80E-14	1.30E+06	2.53	<i>Kosakonia sacchari</i>
6-403	1.90E-13	1.30E+06	10.00	<i>Kosakonia sacchari</i>
CI019	5.33E-17	2.40E+06	0.01	<i>Rahnella aquatilis</i>
19-806	6.65E-14	2.90E+06	7.80	<i>Rahnella aquatilis</i>
19-750	8.90E-14	2.60E+05	0.94	<i>Rahnella aquatilis</i>
19-804	1.72E-14	4.10E+05	0.29	<i>Rahnella aquatilis</i>
CI137	3.24E-15	6.50E+06	0.85	<i>Klebsiella variicola</i>
137-1034	1.16E-14	6.30E+06	2.96	<i>Klebsiella variicola</i>
137-1036	3.47E-13	1.30E+07	182.56	<i>Klebsiella variicola</i>
137-1314	1.70E-13	1.99E+04	0.14	<i>Klebsiella variicola</i>
137-1329	1.65E-13	7.25E+04	0.48	<i>Klebsiella variicola</i>
63	3.60E-17	3.11E+05	0.00	<i>Rahnella aquatilis</i>
63-1146	1.90E-14	5.10E+05	0.39	<i>Rahnella aquatilis</i>
1021	1.77E-14	2.69E+07	19.25	<i>Kosakonia pseudosacchari</i>
728	5.56E-14	1445240.09	3.25	<i>Klebsiella variicola</i>

10

20

30

40

50

【表 2 9】

表 2 9. 図 2 5 - 温室及び実験室データヒートマップ

菌株名	活性 (mmol N / 微生物時間)	ピークコロニ ー形成 (CFU / g fw)	産生されたN/ エーカー季節	分類学的呼称
CI006	3.88E-16	1.50E+07	0.24	<i>Kosakonia sacchari</i>
6-400	2.72E-13	1.79E+05	1.97	<i>Kosakonia sacchari</i>
6-397	1.14E-14	1.79E+05	0.08	<i>Kosakonia sacchari</i>
CI137	3.24E-15	6.50E+06	0.85	<i>Klebsiella variicola</i>
137-1586	1.10E-13	1.82E+06	8.10	<i>Klebsiella variicola</i>
137-1382	4.81E-12	1.82E+06	354.60	<i>Klebsiella variicola</i>
1021	1.77E-14	2.69E+07	19.25	<i>Kosakonia pseudosacchari</i>
1021-1615	1.20E-13	2.69E+07	130.75	<i>Kosakonia pseudosacchari</i>
1021-1619	3.93E-14	2.69E+07	42.86	<i>Kosakonia pseudosacchari</i>
1021-1612	1.20E-13	2.69E+07	130.75	<i>Kosakonia pseudosacchari</i>
1021-1623	4.73E-17	2.69E+07	0.05	<i>Kosakonia pseudosacchari</i>
1293	5.44E-17	8.70E+08	1.92	<i>Azospirillum lipoferum</i>
1116	1.05E-14	1.37E+07	5.79	<i>Enterobacter</i> 種
1113	8.05E-15	4.13E+07	13.45	<i>Enterobacter</i> 種
910	1.19E-13	1.34E+06	6.46	<i>Kluyvera intermedia</i>
910-1246	2.16E-13	1.34E+06	11.69	<i>Kluyvera intermedia</i>
850	7.2301E-16	1.17E+06	0.03	<i>Achromobacter spiritinus</i>
852	5.96E-16	1.07E+06	0.03	<i>Achromobacter marplatensis</i>
853	6.42E-16	2.55E+06	0.07	<i>Microbacterium murale</i>

10

20

30

【 0 6 3 5 】

結論：図 8、2 4、2 5 ならびに表 2 8 及び 2 9 のデータは、記載されている属の数十よりも多くの代表的なメンバーを示す（つまり図中の線の右側の微生物）。さらに、これら多数の代表的なメンバーは、多様な一連の分類学的属に由来し、それらは、上記の表 2 8 及び 2 9 に見出すことができる。またさらに、本発明者らは、微生物の多くに見出される構造 / 機能関連性を示す多数の遺伝子属性を発見した。これらの遺伝子関連性は、本発明者らにより導入された遺伝子改変（窒素固定または同化遺伝子調節ネットワークの少なくとも 1 つの遺伝子または非コードポリヌクレオチドに少なくとも 1 つの遺伝子変異を導入することが挙げられる）を示す本開示の多数の表に見出すことができる。

40

【 0 6 3 6 】

結果的に、新たに発見された属は、（ 1 ）堅牢なデータセット、（ 2 ）数十よりも多くの代表的なメンバー、（ 3 ）多様な分類学的属に由来するメンバー、及び（ 4 ）属メンバーの基盤となる遺伝子アーキテクチャーにて構造 / 機能関連性を規定する遺伝子改変の種類により支持される。

【 0 6 3 7 】

実施例 6：非属間のリモデリングされた微生物を検出するための方法及びアッセイ

本開示は、種々の前述の実施例で使用された微生物の検出に有用なプライマー、プロ

50

ブ、及びアッセイを教示する。アッセイは、由来の / 突然変異体の非属間リモデリング微生物の非天然ヌクレオチド「ジャンクション」配列を検出することができる。これらの天然に存在しないヌクレオチドジャンクションを、微生物における特定の遺伝子変更の存在を示す特徴のタイプとして使用することができる。

【0638】

本技法は、固有に設計されたプライマー及びプローブを含む特化した定量的PCR法を使用することにより、これらの天然に存在しないヌクレオチドジャンクションを検出することができる。プローブは、天然に存在しないヌクレオチドジャンクション配列に結合し得る。すなわち、プローブがその相補的配列とハイブリダイゼーションした後でのみ検出が可能である蛍光レポーターで標識されているオリゴヌクレオチドで構成される配列特異的DNAプローブを使用することができる。この定量的な方法では、天然に存在しないヌクレオチドジャンクションのみが、教示されるプライマーにより増幅されることになり、結果的に、非特異的色素または特異的ハイブリダイゼーションプローブの使用のいずれかにより検出することができることが保証され得る。この方法の別の態様は、プライマーがジャンクション配列のいずれかの側に隣接するようにプライマーを選択することであり、したがって、増幅反応が生じる場合、そのジャンクション配列が存在する。

【0639】

結果的に、ゲノムDNAを試料から抽出し、qPCRの使用により本開示の微生物の存在を定量化するために使用することができる。qPCR反応に使用されるプライマーは、野生型ゲノムの固有領域または導入操作された非属間突然変異体株の固有領域を増幅するように、Primer Blast (www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/) により設計されたプライマーであってもよい。qPCR反応は、SYBR GreenER qPCR SuperMix Universal (Thermo Fisher P/N 11762100) キットを使用し、フォワード及びリバース増幅プライマーのみを使用して実施してもよく、あるいは、Kapa Probe Forceキット (Kapa Biosystems P/N KK4301) を、増幅プライマー、ならびに5'末端のFAM色素標識、内部ZENクエンチャー、ならびに3'末端のマイナーグループバインダー及び蛍光クエンチャーを含むTaqManプローブ (Integrated DNA Technologies) を用いて使用してもよい。

【0640】

qPCR法で使用することができる、特定のプライマー、プローブ、及び非天然ジャンクション配列は、下記の表30に列挙されている。具体的には、非天然ジャンクション配列は、配列番号372~405及び425~457に見出すことができる。

10

20

30

40

50

【表 3 0 - 1】

表 3 0 . 微生物検出

塩基 CI	ジャンク クシヨ ン名	上流/ 下流ジ ヤクシ ヨシヨ ン	配列 番号	ジャンクシヨンの 上流100bp	配列 番号	ジャンクシヨンの 下流100bp	配列 番号	ジャンクシヨンの配列 *mはジャンクシヨ ンを示す	ジャンク シヨンの 説明	Fプラ イマー 配列	Rプラ イマー 配列	プロ ブ配列
1021	ds1131	上流	304	TGGTGTCGGGC GAACGTCGCCAG GTGGCACAAAAT GTCAGAACTACG ACACGACTAACC GACCCGAGGAGT GTGCGATGACCC TGAATATGATGA TGGG	338	TTC TTGGTTC TCT GGAGCGCTTAT CGGCATCCTGAC TGAAGAAATTTGC AGGCTTCTTCCCA ACCTGGCTTGCA CCCGTCAGGTA GTTGTGATGAAC AT	372	5'- TGGTGTCGGGC GAACGTCGCCAG GTGGCACAAAAT GTCAGAACTACG ACACGACTAACC GACCCGAGGAGT GTGCGATGACCC TGAATATGATGA TGGG / TTC TTGGTTC TCT GGAGCGCTTAT CGGCATCCTGAC TGAAGAAATTTGC AGGCTTCTTCCCA ACCTGGCTTGCA CCCGTCAGGTA GTTGTGATGAAC AT-3'	破壊され たmiL 遺伝子 /PinfC	N/A	N/A	N/A

10

20

30

40

50

【表 3 0 - 2】

塩基 CI	ジャンク クシヨ ン名	上流/ 下流ジ ヤクシ ヨシ ン	配列 番号	ジャンクシヨ ン上流 100bp	ジャンクシヨ ン下流 100bp	配列 番号	ジャンクシヨ ン配列 wはジャンク シヨンを示す	ジャンク シヨンの 説明	Fプラ イマー 配列	Rプラ イマー 配列	プロロー ブ配列
1021	ds1131	下流	305	CGGAAAACGAGT TCAAAACGGCGG TCCCAATCGTATT AATGGCGAGATT CGGCCACGGAA GTTGCTTAACAG GTCCTGGAAAGCG AGCAGCTTGGTA TT	GCGATAGAACTC ACTTACGCCCC GAAGGGGAAAGC TGCTGACCCCTAC GATCCCGCTATT TCATTCACTGACC GGAGGTTCAAAA TGACCCAGCGAA C	373	5'- CGGAAAACGAGT TCAAAACGGCGG TCCCAATCGTATT AATGGCGAGATT CGGCCACGGAA GTTGCTTAACA GGTCTGGAAAGC GAGCAGCTTGGT ATT/ GCGATAGAACTC ACTTACGCCCC GAAGGGGAAAGC TGCTGACCCCTA CGATTCCCGCTAT TTCATTCACTGAC CGGAGGTTCAAA ATGACCCAGCGA AC-3'	PinfC/ 破壊され たniLL 遺伝子	N/A	N/A	N/A

10

20

30

40

50

【表 3 0 - 3】

塩基 Cl	1021	ジャンク クシヨ ン名	ds1133	上流/ 下流ジ ヤクシ ョン	N/A	配列 番号	306	ジャンクシヨンの 上流100bp	CGCCAGAGAGATT GAAATCGAACAT TTCCGTAATACCG CCATTACCCAGG AGCCGTTCTGGTT GCACAGCGGAAA ACGTTAACGAAA GGATATTTCGCAT G	配列 番号	340	ジャンクシヨンの 下流100bp	TCCCTGTGCGCGG CGTCGCCGATGG TGGCCAGCCAAC TGGCGCGTACC CGATCCTGCTCG ATGAACTGCTCG ACCCGAAACACGC TCTATCAACCGA CGG	配列 番号	374	ジャンクシヨンの配列 はジャンクシヨ ンを示す	5'- CGCCAGAGAGATT GAAATCGAACAT TTCCGTAATACC GCCATTACCCAG GAGCCGTTCTGG TTGCACAGCGGA AAACGTTAACGA AAGGATATTTCG CATG / TCCCTGTGCGCC CGTCGCCGATG GTGGCCAGCCAA CTGGCGCGCTAC CCGATCCTGCTC GATGAACTGCTC GACCCGAAACCG CTCTATCAACCG ACGG-3'	ジャンク シヨンの 説明	5' UTR 及5'ATG/ 短縮型 glnE 遺伝子	Fプラ イマー 配列	N/A	Rプラ イマー 配列	N/A	プロ テ イ ン 配 列	N/A
----------	------	-------------------	--------	-------------------------	-----	----------	-----	---------------------	---	----------	-----	---------------------	--	----------	-----	-------------------------------	--	--------------------	---	------------------	-----	------------------	-----	-----------------------------	-----

10

20

30

40

50

【表 3 0 - 4】

塩基 CI	1021	ジャン クシヨ ン名	ds1145	上流/ 下流ジ ヤンク ション	上流	配列 番号	307	ジャンクシヨンの 上流100bp	CGGGCGAACGTC GCCAGGTGGCAC AAATTGTCAGAA CTACGACACGAC TAACCGACCGCA GGAGTGTGCGAT GACCCCTGAATAT GATGATGGATGC CAGC	配列 番号	341	ジャンクシヨンの 下流100bp	CGTTCTGTAATAA TAACCGGACAAT TCGGACTGATTA AAAAAGCGCCCT CGCGGCGCTTTTT TTATATTCGAC TCCATTTAAAATA AAAAATCCAATC	配列 番号	375	ジャンクシヨンの配列 はジャンクシヨ ンを示す	5'- CGGGCGAACGTC GCCAGGTGGCAC AAATTGTCAGAA CTACGACACGAC TAACCGACCGCA GGAGTGTGCGAT GACCCCTGAATAT GATGATGGATGC CAGC / CGTTCTGTAATA ATAACCGGACAA TTCGGACTGATT AAAAAAGCGCCC TCGCGGCGCTTTT TTTATATTCGCA CTCCATTTAAAAT AAAAAATCCAAT C-3'	ジャンク ションの 説明	破壊され たnifL 遺伝子 /PmtI	Fプラ イマー 配列	N/A	Rプラ イマー 配列	N/A	プロ ー 配列	N/A
----------	------	------------------	--------	--------------------------	----	----------	-----	---------------------	---	----------	-----	---------------------	--	----------	-----	-------------------------------	--	--------------------	-------------------------------	------------------	-----	------------------	-----	---------------	-----

10

20

30

40

50

【表 30 - 5】

塩基 CI	I021	ジャンク クシヨ ン名	ds1145	上流/ 下流ジ ヤクシ ョン	下流	配列 番号	308	ジャンクシヨンの 上流100bp	TCAACCTAAAAA AGTTTGTGTAATA CTTGTAAACGTAC ATGGAGATTAAAC TCAATCTAGAGG GTATTAAATAATG AATCGTACTAAA CTGGTACTGGGC GC	配列 番号	342	ジャンクシヨンの 下流100bp	AACTCACTTCAC GCCCCGAAAGGGG GAAGCTGCCTGA CCCTACGATTCCG GCTATTTCAITCA CTGACCGGAGGT TCAAAATGACCC AGCGAACCGAGT CG	配列 番号	376	ジャンクシヨンの配列 * ^m はジャンクシヨ ンを示す	5'- TCAACCTAAAAA AGTTTGTGTAAT ACTTGTAAACGCT ACATGGAGATTA ACTCAATCTAGA GGGTATTAATAA TGAATCGTACTA AACTGGTACTGG GCGC / AACTCACTTCAC GCCCCGAAAGGGG GAAGCTGCCTGA CCCTACGATTCCG GCTATTTCAITCA CTGACCGGAGGT TCAAAATGACCC AGCGAACCGAGT CG-3'	ジャンク シヨンの 説明	Ptm1 / 破壊され た mifL 遺伝子	Fプラ イマー 配列	N/A	Rプラ イマー 配列	N/A	プロロー ブ配列	N/A
----------	------	-------------------	--------	-------------------------	----	----------	-----	---------------------	--	----------	-----	---------------------	---	----------	-----	--	--	--------------------	---------------------------------	------------------	-----	------------------	-----	-------------	-----

10

20

30

40

50

【表 30 - 6】

塩基 CI	1021	ジャンク シヨ ン名	ds1148	上流/ 下流ジ ヤクシ ヨシ ン	上流	配列 番号	309	ジャンクシヨンの 上流100bp	CGGGCGAACCGTC GCCAGGTGGCAC AAATTGTCAGAA CTACGACACGAC TAACCGACCGCA GGAGTGGCGAT GACCCCTGAATAT GATGATGGATGC CAGC	配列 番号	343	ジャンクシヨンの 下流100bp	CGCGTCAGGTTG AACGTAAAAAAG TCGGTCTGGCA AAGCACGTCGTC GTCCGCAGTTCTC CAAACGTTAATT GGTTCTGCTTCG GCAGAACGATTG GC	配列 番号	377	ジャンクシヨンの配列 番号はジャンクシヨ ンを示す	5'- CGGGCGAACCGTC GCCAGGTGGCAC AAATTGTCAGAA CTACGACACGAC TAACCGACCGCA GGAGTGGCGAT GACCCCTGAATAT GATGATGGATGC CAGC / CGCGTCAGGTTG AACGTAAAAAAG TCGGTCTGGCA AAGCACGTCGTC GTCCGCAGTTCTC CAAACGTTAATT GGTTCTGCTTCG GCAGAACGATTG GC-3'	ジャンク シヨンの 説明	破壊され たnifL 遺伝子 /Ptm7	Rプラ イマー 配列	N/A	Rプラ イマー 配列	N/A	プロロー ブ配列	N/A
----------	------	------------------	--------	------------------------------	----	----------	-----	---------------------	---	----------	-----	---------------------	--	----------	-----	---------------------------------	---	--------------------	-------------------------------	------------------	-----	------------------	-----	-------------	-----

10

20

30

40

50

【表 30 - 7】

塩基 CI	1021	ジャンク クシヨ ン名	ds1148	上流/ 下流ジ ヤク クシヨ ン	下流	配列 番号	310	ジャンクシヨンの 上流100bp	AAATTTCTGCCCA AATGGCTGGGAT TGTTCAATTTTTG TTTGCCTTACAAC GAGAGTGACAGT ACGCGCGGGTAG TTAACTCAACATC TGACCCGGTCGAT	配列 番号	344	ジャンクシヨンの 下流100bp	AACTCACCTCAC GCCCGGAAGGGG GAAGCTGCCTGA CCCTACGATTCCC GCTAATTTCAITCA CTGACCCGGAGGT TCAAAATGACCC AGCGAAACCGAGT CG	配列 番号	378	ジャンクシヨンの配列 番号はジャンクシヨ ンを示す	5'- AAATTTCTGCCCA AATGGCTGGGAT TGTTCAATTTTTG TTTGCCTTACAAC GAGAGTGACAGT ACGCGCGGGTAG TTAACTCAACAT CTGACCCGGTCGA T / AACTCCTCAC GCCCGGAAGGGG GAAGCTGCCTGA CCCTACGATTCCC GCTAATTTCAITCA CTGACCCGGAGGT TCAAAATGACCC AGCGAAACCGAGT CG-3'	ジャンク シヨンの 説明	Ptm4/ 破壊され た mIL 遺伝子	Fプラ イマー 配列	N/A	Rプラ イマー 配列	N/A	プロ ー ブ配列	N/A
----------	------	-------------------	--------	------------------------------	----	----------	-----	---------------------	---	----------	-----	---------------------	---	----------	-----	---------------------------------	--	--------------------	-------------------------------	------------------	-----	------------------	-----	----------------	-----

10

20

30

40

50

【表 30 - 8】

塩基 CI	C1006	ジャンク クシヨ ン名	ds126	上流/ 下流ジ ヤクシ ヨシヨ ン	N/A	配列 番号	311	ジャンクシヨ ン上流 100bp	GTAACCAATAAA GGCCACCACGCC AGACCACACGAT AGTGATGGCAAC ACTTCCAGCTGC ACCAGCACCTGA TGGCCCATGGTC ACACCTCAGCG AAA	配列 番号	345	ジャンクシヨ ン下流 100bp	CCGATCCCCATC ACTGTGTGCTTIG TATTACAGTGCC GCTTCGTGCGGCTT CGCCGGTACGAA TACGAATGACGC GTTGCAGCTCAG CAACGAAAATTT TG	配列 番号	379	ジャンクシヨ ン配列 シヨ ンを示す	5'- GTAACCAATAAA GGCCACCACGCC AGACCACACGAT AGTGATGGCAAC ACTTCCAGCTGC ACCAGCACCTGA TGGCCCATGGTC ACACCTCAGCG AAA / CCGATCCCCATC ACTGTGTGCTTIG TATTACAGTGCC GCTTCGTGCGGCTT CGCCGGTACGAA TACGAATGACGC GTTGCAGCTCAG CAACGAAAATTT TG-3'	ジャンク シヨ ンの 説明	amIB 遺伝子の 5' UTR から ATG-4bp まで/破壊 された amIB 遺伝子	Fプラ イマー 配列	N/A	Rプラ イマー 配列	N/A	プロロー ブ配列	N/A
----------	-------	-------------------	-------	-------------------------------	-----	----------	-----	------------------------	--	----------	-----	------------------------	---	----------	-----	-----------------------------	---	------------------------	---	------------------	-----	------------------	-----	-------------	-----

10

20

30

40

50

【表 30 - 9】

塩基 CI	C1019	ジャンク クシヨ ン名	ds172	上流/ 下流ジ ヤクシ ヨシ	下流	配列 番号	312	ジャンクシヨンの 上流100bp	TGGTATTGTCAGT CTGAATGAAGCT CTTGAAAAGCT GAGGAAGCGGC GTCGATTAGTAG AAATCAGTCCGA ATGCCGAGCCGC CAGTTGTCGAAT C	配列 番号	346	ジャンクシヨンの 下流100bp	CCGTCCTGAAG CTCTCGGTGAAC ATTGTTGCGAGG CAGGATGCGAGC TGGTTGTTTTTG ACATTACCGATA ATGTGCCGCGTG AACGGTGCCTT ATG	配列 番号	380	ジャンクシヨンの配列 wはジャンクシヨ nを示す	5'- TGGTATTGTCAGT CTGAATGAAGCT CTTGAAAAGCT GAGGAAGCGGC GTCGATTAGTAG GAAATCAGTCCG AATGCCGAGCCG CCAGTTGTCGA ATC / CCGTCCTGAAG CTCTCGGTGAAC ATTGTTGCGAGG CAGGATGCGAGC TGGTTGTTTTTG ACATTACCGATA ATGTGCCGCGTG AACGGTGCCTT ATG-3'	ジャンクシヨンの 説明	Pmi1.2 / 破壊さ れたmiL 遺伝子	Fプラ イマー 配列	配列 番号 406 CAAG AAGT TCGC CTCA CAGG	Rプラ イマー 配列	配列 番号 407 TGCC TCGC AACA ATGT TCAC	プロ ロー ブ配列	N/A
----------	-------	-------------------	-------	-------------------------	----	----------	-----	---------------------	--	----------	-----	---------------------	---	----------	-----	--------------------------------	--	----------------	---------------------------------	------------------	---	------------------	---	-----------------	-----

10

20

30

40

50

【表 3 0 - 1 0】

塩基 CI	C1019	ジャン クシヨ ン名	ds172	上流/ 下流ジ ヤクシ ヨシヨ ン	上流	配列 番号	313	ジャンクシヨンの 上流100bp	ACCGATCCGCAG GCGGCAITITGTT ATGCCAATCCGG CAITTCGCCCCA GACGGITITTC ACTTGAGACACTT TTGGGGGAGAAC CACCGTCTGCTGG	配列 番号	347	ジャンクシヨンの 下流100bp	TGAACATCACTG ATGCACAAGCTA CCTATGTCGAAG AATTAACATAAAA AACTGCAAGATG CAGGCAITTCGCG TTAAAAGCCGACT TGAGAAATGAGA AGAT	配列 番号	381	ジャンクシヨンの配列 番号はジャンクシヨ ンを示す	5'- ACCGATCCGCAG GCGGCAITITGTT ATGCCAATCCGG CAITTCGCCGCC AGACGGGTTTTC CACTTGAGACAC TTTTGGGCGAGA ACCACCGTCTGC TGG / TGAACATCACTG ATGCACAAGCTA CCTATGTCGAAG AATTAACATAAAA AACTGCAAGATG CAGGCAITTCGCG TTAAAAGCCGACT TGAGAAATGAGA AGAT-3'	ジャンク シヨンの 説明	破壊され たnifL 遺伝子 /Prrn1.2	Fプラ イマー 配列	N/A	Rプラ イマー 配列	N/A	プロー ブ配列	N/A
----------	-------	------------------	-------	-------------------------------	----	----------	-----	---------------------	--	----------	-----	---------------------	---	----------	-----	---------------------------------	---	--------------------	----------------------------------	------------------	-----	------------------	-----	------------	-----

10

20

30

40

50

【表 3 0 - 1 1】

塩基 CI	ジャンクシヨンの名	上流/下流ジャンクシヨンの位置	配列番号	ジャンクシヨンの上流100bp	ジャンクシヨンの下流100bp	配列番号	ジャンクシヨンの説明	Fプライマー配列	Rプライマー配列	プロローブ配列
C1019	ds175	下流	314	CGGGAACCGGTG TTATAATGCCGG CCCTCATATTGTG GGGATTTCTTAAT GACCTATCCTGG GTCCTAAAGTTGT AGTTGACATTAG CGGAGCACTAAC	CCGTCTCTGAAG CTCTCGGTGAAC ATTGTTGCGAGG CAGGATGCGAGC TGGTTGTGTTTG ACATTACCGATA ATGTGCCGGGTG AACGGGTGCGTT ATG	382	Prm31 / 破壊された miL 遺伝子	CGGGAACCGGTG TTATAATGCCCGC GCCCTCATATTGT GGGGATTTCCTA ATGACCTATCCT GGGTCTAAAAGT TGTAGTTGACATT AGCGGAGCACTA AC / CCGTCTCTGAAG CTCTCGGTGAAC ATTGTTGCGAGG CAGGATGCGAGC TGGTTGTGTTTG ACATTACCGATA ATGTGCCGGGTG AACGGGTGCGTT ATG-3'	409 GGCA TAAC GCAC CCGT TCA	410 /56- FAM/ TA ACC CGT C/ZE N/T CTG AAG CTC TCG GT/3I ABkF Q/

10

20

30

40

50

【表 3 0 - 1 2】

塩基 CI	ジャンク クシヨ ン名	上流/ 下流ジ ヤクシ ヨシ	配列 番号	ジャンクシヨンの 上流100bp	ジャンクシヨンの 下流100bp	配列 番号	ジャンクシヨンの 説明	Fプラ イマー 配列	Rプラ イマー 配列	プロ ー 配列
C1019	ds175	上流	315	ACCGATCCGCAG GCGCGCATTTGTT ATGCCAATCCGG CAATCTGCCGCCA GACGGGTTTTC ACTTGAGACACTT TTGGCGGAGAAC CACCGTCTGCTGG	TACAGTAGCGCC TCTCAAAAATAG ATAAACGGCTCA TGTACGTGGGCC GTTTATTTTTTCT ACCCATAATCGG GAACCGGTGTA TAATGCCGGGCC CTC	383	破壊され たnifL 遺伝子 /Prrn3.1	N/A	N/A	N/A
C1006	ds20	下流	316	TCAACCTAAAAA AGTTTGTGTAATA CTTGTAAACGCTAC ATGGAGATTAAC	AACCTCACTCAC ACCCCGAAGGGG GAAAGTTGCCTGA CCCTACGATTCCC	384	Prrn1/ 破壊され たnifL 遺伝子	配列 番号 411	配列 番号 412	配列 番号 413

10

20

30

40

50

【表 3 0 - 1 3】

塩基 CI	ジャンク クシヨ ン名	上流/ 下流ジ ヤクシ ヨン	配列 番号	ジャンクシヨンの 上流 100bp	配列 番号	ジャンクシヨンの 下流 100bp	配列 番号	ジャンクシヨンの配列 番号はジャンクシヨ ンを示す	ジャンク シヨンの 説明	Fプラ イマー 配列	Rプラ イマー 配列	プロー ブ配列
C1006	ds20	上流	317	TCAAATCTAGAGG GTATTAATAATG AATCGTACTAAA CTGGTACTGGGC GC	351	GCTATTTTCATTCA CTGACCGGAGGT TCAAAAATGACCC AGCGAAACCGAGT CG	385	ACATGGAGATTATA ACTCAATCTAGA GGGTATTAATAA TGAATCGTACTA AACTGGTACTGG GGGC / AACTCACTTCAC ACCCCGAAGGG GAAATTGCCTGA CCCTACGATTCCC GCTATTTTCATTCA CTGACCGGAGGT TCAAAAATGACCC AGCGAAACCGAGT CG-3'	破壊され た mHL 遺伝子 / Pml1	TAAA CTGG TACT GGGC GCAA CT	CAAAA TCGA AGCG CCAG ACGG TAT	/56- FAM/ AAG TTGC CT/Z EN/G ACC CTAC GATT CCC/ 3IAB kFQ/
				CGTCTGTAATA ATAAACCGGACAA TTCGGACTGATTA AAAAAGCGCCCT TGTGGGCTTTTT TTATATCCCGCC TCCATTTAAAAATA AAAAATCCAATC		5'- GGGCGACAAAACG GCCTGGTGGCAC AAATTGTCAGAA CTACGACACGAC TAACTGACCGCA GGAGTGGCGAT GACCCCTGAATAT				N/A	N/A	N/A

10

20

30

40

50

【表 3 0 - 1 4】

塩基 CI	ジャンク シヨ ン名	上流/ 下流ジ ヤク シヨ ン	配列 番号	ジャンクシヨンの 上流100bp	配列 番号	ジャンクシヨンの 下流100bp	配列 番号	ジャンクシヨンの配列 w/mはジャンクシヨ ンを示す	ジャンク シヨンの 説明	Fプラ イマー 配列	Rプラ イマー 配列	ブロー ブ配列
C1006	ds24	上流	318	GATGATGGATGC CGGC	352	GGACATCATCGC GACAAACAATAT TAATACCGCAA CCACACCGCAA TTTACGAGACTG CGCAGGCATCCT TTCCTCCGTCAAAT TTCGTCAAATAA AG	386	GATGATGGATGC CGGC/ CGTCTGTAATA ATAACCGGACAA TTCGGACTGATT AAAAAAAGGCC TTGTGGCGCTTT TTTATATCCCGC CTCCAITTTAAAAT AAAAAATCCAAT C-3'	破壊され たmL 遺伝子 /Prm5	配列 番号 414 GGTG CACT CTTT GCAT GGTT	配列 番号 415 GCGC AGTC TCGT AAAT TGCC	配列 番号 416 /56- FAM/ CA GGA GTG T/ZE N/G CGA

10

20

30

40

50

【表 30 - 15】

塩基 CI	ジャンク クシヨ ン名	上流/ 下流ジ ヤンク ヤンク シヨ ン	配列 番号	ジャンクシヨ ンの 上流100bp	配列 番号	ジャンクシヨ ンの 下流100bp	配列 番号	ジャンクシヨ ン配列 シヨ ン はジャンクシヨ ンを示す	ジャンク シヨ ンの 説明	Fプラ イマー 配列	Rプラ イマー 配列	プロロー ブ配列
C1006	ds24	下流	319	TAAGAAATTATCTG GATGAATGTGCC ATTAATGCGCA GCATAATGGTGC GTTGTGCGGAA AACTGCTTTTTT TGAAAGGGTTGG TCAGTAGCGAA AC	353	AACTCACTTCAC ACCCGAAAGGGG GAAGTTGCCTGA CCCTACGATTCCC GCTATTTCATTCA CTGACCGGAGGT TCAAAAATGACCC AGCGAACCGAGT CG	387	5'- TAAGAAATTAATCT GGATGAATGTGC CATTAATGCGC AGCATAATGGTG CGTGTGCGGGA AAACTGCTTTTTT TTGAAAGGGTTG GTCAGTAGCGGA AAC/ AACTCACTTCAC ACCCGAAAGGGG GAAAGTTGCCTGA CCCTACGATTCCC GCTATTTCATTCA	Pms5 / 破壊され たmiL 遺伝子	N/A	N/A	N/A
								TAATACCCGGCAA CCACACCCGGCAA TTTACGAGACTG CGCAGGCATCCT TTCCTCCCGTCAAT TTCTGTCAAAATA AAG-3'				TGA CCC TGA AT/3I ABkF Q

10

20

30

40

50

【表 30 - 16】

塩基 CI	ジャンク シヨ ン名	上流/ 下流ジ ヤク シヨ ン	配列 番号	ジャンクシヨンの 上流100bp	配列 番号	ジャンクシヨンの 下流100bp	配列 番号	ジャンクシヨンの配列 はジャンクシヨ ンを示す	ジャンク シヨンの 説明	Fプラ イマー 配列	Rプラ イマー 配列	プロロー ブ配列
CI006	ds30	N/A	320	CGCCAGAGAGATC GAAATCGAACAT TTCCGTAATACCG CGAITACCCAGG AGCCGTTCTGGTT GCACAGCGGAAA ACGTTAACGAAA GGATATTTCGCAT G	354	TTTAAACGATCTGA TTGGCGATGATG AAACGGATTCGC CGGAAAGATCGC TTTCTGAGAGCTG GC CGGAATTGTG GCAGGATCGT GCAGGAGGAGGA TT	388	5'- CGCCAGAGAGATC GAAATCGAACAT TTCCGTAATACCG GC GATTACCCAG GAGCCGTTCTGG TTGCACAGCGGA AAACGTTAACGA AAGGATATTTCG CATG / TTTAAACGATCTG ATTGGCGATGAT GAAACGGATTTCG CCGGAAGATGCG CITTCTGAGAGCT	5' UTR/ 及UATG/ 短縮型 glnE 遺伝子	N/A	N/A	N/A

10

20

30

40

50

【表 3 0 - 1 7】

塩基 CI	ジャン クシヨ ン名	上流/ 下流ジ ヤンク シヨ ン	配列 番号	ジャンクシヨンの 上流100bp	配列 番号	ジャンクシヨンの 下流100bp	ジャンクシヨンの 配列 番号	ジャンクシヨンの配列 はジャンクシヨ ンを示す	ジャンク シヨンの 説明	Fプラ イマー 配列	Rプラ イマー 配列	プロ ブ配列
C1006	ds31	N/A	321	CGCCAGAGAGTC GAAATCGAACAT TTCCGTAATACCG CGATTACCCAGG AGCCGTTCTGGTT GCACAGCGGAAA ACGTTAACGAAA GGATATTTCCGAT G	355	GCACGTGAAACAC CTCATTTCCCTGT GTGCCGCGTCGC CGATGGTTGCCA GTCAGCTGGCGC GCTACCCGATCCT GCTTGATGAATT GCTCGACCCGAA TA	389	5'- CGCCAGAGAGTC GAAATCGAACAT TTCCGTAATACC GCGATTACCCAG GAGCCGTTCTGG TTGCACAGCGGA AAACGTTAACGA AAGGATATTTCCG CATG / GCACGTGAAACAC CTCATTTCCCTGT GTGCCGCGTCGC CGATGGTTGCCA GTCAGCTGGCGC	5' UTR 及びATG/ 短縮型 glnE 遺伝子	N/A	N/A	N/A

10

20

30

40

50

【表 3 0 - 1 8】

塩基 CI	ジャンク クシヨ ン名	上流/ 下流ジ ヤンク シヨ ン	配列 番号	ジャンクシヨンの 上流 100bp	配列 番号	ジャンクシヨンの 下流 100bp	配列 番号	ジャンクシヨンの配列 w ^m はジャンクシヨ ンを示す	ジャンク シヨンの 説明	Fプラ イマー 配列	Rプラ イマー 配列	プロ ロー ブ配列
C1019	ds34	N/A	322	GATGATGGATGC TTTCTGGTTAAAC GGGCAACCTCGT TAACTGACTGACT AGCCTGGGCAAA CTGCCCGGGCTTT TTTTTGCAAGGAA TCTGATTTCATG	356	GCGCTCAAACAG TTAATCCGTCTGT GTGCCGCCCTCGC CGATGGTCGCGA CACAACTTGCAC GTCATCCITTAAT GCTCGATGAAC GCTCGACCCCGG CA	390	5'- GATGATGGATGC TTTCTGGTTAAAC GGGCAACCTCGT TAACTGACTGAC TAGCCITGGGCAA ACTGCCCGGGCT TTTTTTGCAAGG AATCTGATTTCAT G/ GCGCTCAAACAG TTAATCCGTCTGT GTGCCCGCCCTCGC CGATGGTCGCGA CACAACTTGCAC	5' UTR 及びAATG/ 短縮型 glnE 遺伝子	N/A	N/A	N/A

10

20

30

40

50

【表 30 - 19】

塩基 CI	ジャンク シヨ ン名	上流/ 下流ジ ヤク シヨ ン	配列 番号	ジャンクシヨンの 上流100bp	配列 番号	ジャンクシヨンの 下流100bp	ジャンクシヨンの 配列 番号	ジャンクシヨンの配列 wpm はジャンクシヨ ンを示す	ジャンク シヨンの 説明	Fプラ イマー 配列	Rプラ イマー 配列	プロロー ブ配列
CI019	ds70	上流	323	ACCGATCCGCAG GCGCGCATTTGTT ATGCCAATCCGG CAITCTGCCGCCA GACGGGTTTTC ACTTGAGACACTT TTGGCGGAGAAC CACCGTCTGCTGG	357	AGTCTGAACTCA TCCTGCGGCAGT CGGTGAGACGTA TTTTTGACCAAAG AGTGATCTACAT CACGGAATTTTGT GGTTGTTGCTGCT TAAAAAGGCAAA T	391	5'- ACCGATCCGCAG GCGCGCATTTGTT ATGCCAATCCGG CAITCTGCCGCC AGACGGGTTTIG CACTTGAGACAC TTTTGGCGGAGA ACCACCGTCTGC TGG / AGTCTGAACTCA TCCTGCGGCAGT CGGTGAGACGTA TTTTTGACCAAA GAGTGATCTACA	破壊され たnifL 遺伝子 /Prm4	N/A	N/A	N/A

10

20

30

40

50

【表 30 - 20】

塩基 CI	ジャンク クシヨ ン名	上流/ 下流ジ ヤクシ ヨシ	配列 番号	ジャンクシヨンの 上流 100bp	配列 番号	ジャンクシヨンの 下流 100bp	配列 番号	ジャンクシヨンの配列 * ^{up} はジャンクシヨ ンを示す	ジャンク シヨンの 説明	Fプラ イマー 配列	Rプラ イマー 配列	プロロー ブ配列
CI019	ds70	下流	324	CATCGGACACCA CCAGCTTACAAA TTGCCCTGATTGCG GCCCCGATGGCC GGTATCACTGAC CGACCATTTGCTG CCTTATGTCATGC GATGGGGGCTGG G	358	CCGCTCTGAAG CTCTCGGTGAAC ATTGTTGCGAGG CAGGATGCGAGC TGGTTGTGTTTTG ACATTACCGATA ATGTGCCCGGTG AACGGGTGCGTT ATG	392	5'- CATCGGACACCA CCAGCTTACAAA TTGCCCTGATTGCG GCCCCGATGGCC GGTATCACTGAC CGACCATTTGCTG GCCTTATGTCATG CGATGGGGGCTG GG/ CCGCTCTGAAG CTCTCGGTGAAC ATTGTTGCGAGG CAGGATGCGAGC TGGTTGTGTTTTG	Ptm4 / 破壊さ れ/hiL 遺伝子	N/A	N/A	N/A

10

20

30

40

50

【表 30 - 21】

塩基 CI	ジャンク クシヨ ン名	上流/ 下流ジ ヤク シヨ ン	配列 番号	ジャンクシヨ ン上流 100bp	配列 番号	ジャンクシヨ ン下流 100bp	配列 番号	ジャンクシヨ ン配列 はジャンクシヨ ンを示す	ジャンク シヨ ンの 説明	Fプラ イマー 配列	Rプラ イマー 配列	プロ ー ブ配列
137	ds799	下流	325	TCTTCAACA ACTG GAGGAATA AAGGT ATTAAGG CGGA AAACGAG ITCAA ACGGCAC GTCG AATCGT ATCAAT GGCGAG ATTCG GCCCTG GGAAGT CGC	359	GCCATTG AGCTG GCTTCCC GACCG CAGGGCG GCACC TGCCCTG ACCCTGC GTTTCCC CGCTG TAAACCC CTGAC CGGAGGT GAAAGC ATGATCC CTGAA TC	393	5'- TCTTCAACA AACT GGAGGAAT AAGG TATTAAAG GGCGG AAAAACG AGITCA AACGGCAC GCTCC GAATCGT ATCAA TGCGGAG AATCG CGCCCTG GGAAGT TCGC / GCCATTG AGCTG GCTTCCC GACCG CAGGGCG GCACC TGCCTG AGCCCTG CGTTTCCC CGCTGT	PimfC / 破壊され たmiR 遺伝子	配列 番号 417 CTCG GCAG CATG GACG TAA	配列 番号 418 AGGG TGTT AAAC AGCG GGAA A	配列 番号 419 /56- FAM/ AA CGG CAC G/ZE NT CCG AAT CGT ATC

10

20

30

40

50

【表 3 0 - 2 2】

塩基 CI	ジャン クシヨ ン名	上流/ 下流ジ ヤンク ション	配列 番号	ジャンクシヨンの 上流100bp	配列 番号	ジャンクシヨンの 下流100bp	配列 番号	ジャンクシヨンの配列 はジャンクシヨ ンを示す	ジャンク ションの 説明	Fプラ イマー 配列	Rプラ イマー 配列	プロロー ブ配列 AA/3I ABkF Q/
137	ds799	上流	326	TCCGGGTTCCGGCT TACCCCGCGCGGT TTTGGCACGGTG TCGGACAATTGT CATAACTGGAC ACAGGAGTTTGC GATGACCCGTGAA TATGATGCTCGA	360	AGCGTCAGGTAC CGGTCATGATTC ACCGTGCATTCT CGGTTCCCTGGA GGCTTCAATTGGC ATCCTGACCGAA GAGTTGGCTGGC TTCTTCCCAACCT G	394	5'- TCCGGGTTCCGGC TTACCCCGCGCGC GTTTTGGCCACG GTGTCGGACAAAT TTGTCATAAATGTC GACACAGGAGTT TGGGATGACCCCT GAATATGATGCT CGA / AGCGTCAGGTAC CGGTCATGATTC ACCGTGCAGGATTC TCGGTTCCCTGG AGCGCTTCAATTG	破壊され たmiL 遺伝子 /PintC	N/A	N/A	N/A

10

20

30

40

50

【表 3 0 - 2 3】

塩基 CI	ジャンク クシヨ ン名	上流/ 下流ジ ヤンク シヨ ン	配列 番号	ジャンクシヨ ンの 上流100bp	配列 番号	ジャンクシヨ ンの 下流100bp	配列 番号	ジャンクシヨ ン配列 w/mはジャンクシヨ ンを示す	ジャンク シヨ ンの 説明	Fプラ イマー 配列	Rプラ イマー 配列	プロ ー 配列
137	ds809	N/A	327	ATCGCAGCGTCTT TGAATATTTCCGT CGCCAGGCGCTG GCTGCCGAGCCG TTCTGGCTGCATA GTGGA AACGAT AATTCAGGCCA GGGAGCCCTTAT G	361	GCGCTGAAGCAC CTGATCACGCTCT GCGCGGCGTCCG CGATGGTCGCCA GCCAGCTGGCGC GCCACCCGCTGC TGCTGGATGAGC TGCTGGATCCCA ACA	395	5'- ATCGCAGCGTCT TTGAATATTTCCG TCGCCAGGCGCT GGCTGCCGAGCC GTTCCTGGCTGCAT AGTGGAAACGA TAATTCAGGCC AGGGAGCCCTTA TG/ GCGCTGAAGCAC CTGATCACGCTCT GCGCGGCGTCCG CGATGGTCGCCA GCCAGCTGGCGC	5' UTR 及UATG/ 短縮型 glnE 遺伝子	配列 番号 420 GAGC CGTT CTGG CTGC ATAG	配列 番号 421 GCCG TCGG CTGA TAGA GG	配列 番号 422 /56- FAM/ TTAT GGC GC/Z ENT GAA GCA CCTG ATC A/3/A

10

20

30

40

50

【表 3 0 - 2 4】

塩基 CI	ジャン クシヨ ン名	上流/ 下流ジ ヤンク ション	配列 番号	ジャンクシヨンの 上流100bp	配列 番号	ジャンクシヨンの 下流100bp	ジャンクシヨンの 配列 番号	ジャンクシヨンの配列 w/m はジャンクシヨ ンを示す	ジャンク ションの 説明	Fプラ イマー 配列	Rプラ イマー 配列	プロ ー 配列
137	ds843	上流	328	TCCGGGTTCCGGCT TACCCCGCCGCGT TTTCCGCACGGTG TCGGACAATTTGT CATAACTGCGAC ACAGGAGTTTGC GATGACCCGAA TATGATGCTCGA	362	GCCCGCTGACCG ACCAGAACTTCC ACCTTGGACTCG GCTATACCCTTGG CGTGACGGCGG CGATAACTGGGA CTACATCCCCATT CCGGTGATCTTAC C	396	5'- TCCGGGTTCCGGC TTACCCCGCGC GTTTTGCGCACG GTGTCGGACAAT TTGTCATAACTGC GACACAGGAGTT TGGGATGACCCCT GAATATGATGCT CGA / GCCCGCTGACCG ACCAGAACTCC ACCTTGGACTCG GCTATACCCCTTG GCGTGACGGCGC	破壊され たnifL 遺伝子 / Ptm1.2	N/A	N/A	N/A

10

20

30

40

50

【表 30 - 25】

塩基 CI	ジャンク クシヨ ン名	上流/ 下流ジ ヤク シヨ ン	配列 番号	ジャンクシヨンの 上流100bp	配列 番号	ジャンクシヨンの 下流100bp	ジャンクシヨンの wph はジャンクシヨ ンを示す	ジャンク シヨンの 説明	Fプラ イマー 配列	Rプラ イマー 配列	プロロー ブ配列	
137	ds843	下流	329	TCACTTTTTAGCA AAGTTGCACTGG ACAAAAGGTACC ACAAITGGTGTA CTGATACTCGAC ACAGCATTAGTG TCGATTTTTTCATA TAAAGGTAATTT G	363	GCCATTGAGCTG GCTTCCCAGCCG CAGGGCGGCACC TGCCTGACCCCTGC GTTTCCCCTGTT TAAACCCCTGAC CGGAGGTGAAGC ATGATCCCCTGAA TC	397	5'- TCACTTTTTAGCA AAGTTGCACTGG ACAAAAGGTACC ACAAITGGTGTA CTGATACTCGAC ACAGCATTAGTG TCGATTTTTTCATA TAAAGGTAATTT TG/ GCCATTGAGCTG GCTTCCCAGCCG CAGGGCGGCACC TGCCTGACCCCTG CGTTTTCCCCTGTT	Pml.2 / 破壊され たnifL 遺伝子	N/A	N/A	N/A

10

20

30

40

50

【表 3 0 - 2 6】

塩基 CI	ジャン クシヨ ン名	上流/ 下流ジ ヤク シヨ ン	配列 番号	ジャンクシヨンの 上流100bp	配列 番号	ジャンクシヨンの 下流100bp	配列 番号	ジャンクシヨンの配列 番号はジャンクシヨ ンを示す	ジャンク シヨンの 説明	Fプラ イマー 配列	Rプラ イマー 配列	プロ ー ブ配列
137	ds853	上流	330	TCCGGGTTCCGGCT TACCCCGCCGCGT TTTGCGCACGGTG TCGGACAAITTTGT CATAACTGCGAC ACAGGAGTTTGC GATGACCCTGAA TATGATGCTCGA	364	GCTAAAGTTCTC GGCTAATCGCTG ATAACATTTGAC GCAATGCCAAT AAAAAGGCATCA TTTGATGCCCTTT TTGCACGCTTTCA TACCAGAACCTG GC	398	5'- TCCGGGTTCCGGC TTACCCCGCCGCGC GTTTTGCCGACG GTGTCGGACAAT TTGTCATAACTGC GACACAGGAGTT TGCGATGACCCCT GAATATGATGCT CGA / GCTAAAAGTTCTC GGCTAATCGCTG ATAACATTTGAC GCAATGCCAAT AAAAAGGCATCA	破壊され たmiL 遺伝子 / Prim6.2	N/A	N/A	N/A

10

20

30

40

50

【表 30 - 27】

塩基 CI	ジャン クシヨ ン名	上流/ 下流ジ ヤンク ション	配列 番号	ジャンクシヨンの 上流100bp	配列 番号	ジャンクシヨンの 下流100bp	配列 番号	ジャンクシヨンの配列 wはジャンクシヨ ンを示す	ジャンク ションの 説明	Fプラ イマー 配列	Rプラ イマー 配列	プロ ロー ブ配列
137	ds853	下流	331	GTTCTCCTTTGCA ATAGCAGGGAAG AGGGCCAGAAC CGCCAGCGTTGA AGCAGTTTGAAC GCGTTCAGTGTAT AATCCGAAACTT AATTCGGTTTGG A	365	GCCATTGAGCTG GCTTCCCGACCG CAGGGCGCACCC TGCTGACCCCTGC GTTTCCCGCTGTT TAACACCCCTGAC CGGAGGTGAAGC ATGATCCCTGAA TC	399	5'- GTTCTCCTTTGCA ATAGCAGGGAAG AGGGCCAGAAC CGCCAGCGTTGA AGCAGTTTGAAC GCGTTCAGTGT TAATCCGAAACT TAATTCGGTTG GA / GCCATTGAGCTG GCTTCCCGACCG CAGGGCGCACCC TGCTGACCCCTG CGTTTCCCGCTGT	Prim6.2 / 破壊さ れたnifL 遺伝子	N/A	N/A	N/A

10

20

30

40

50

【表 30 - 28】

塩基 CI	ジャン クシヨ ン名	上流/ 下流ジ ヤンク ション	配列 番号	ジャンクションの 上流100bp	配列 番号	ジャンクションの 下流100bp	配列 番号	ジャンクション配列 はジャンクショ ンを示す	ジャンク ションの 説明	Fプラ イマー 配列	Rプラ イマー 配列	プロロー ブ配列
137	ds857	上流	332	TCCGGGTTCCGGCT TACCCCGCCGCGT TTTGGCGCACGGTG TCGGACAATTGT CATAACTGCGAC ACAGGAGTTTGC GATGACCCTGAA TATGATGCTCGA	366	CGCCGTCCTCGC AGTACCAATTGCA ACCGACTTTACA GCAAGAAGTGAT TCTGGCACGGCAT GGAACAAATTCT TGCCAGTCGGGC TTTATCCGATGAC GAA	400	5'- TCCGGGTTCCGGC TTACCCCGCCGC GTTTTGGCCACG GTGTGGACAAT TTGTCATAACTGC GACACAGGAGTT TGCGATGACCCCT GAATATGATGCT CGA / CGCCGTCCTCGC AGTACCAATTGCA ACCGACTTTACA GCAAGAAGTGAT TCTGGCACGGCAT	破壊さ れたmiR 遺伝子 / Ptm8.2	N/A	N/A	N/A

10

20

30

40

50

【表 30 - 29】

塩基 CI	ジャンク クシヨ ン名	上流/ 下流ジ ヤクシ ヨン	配列 番号	ジャンクシヨンの 上流100bp	配列 番号	ジャンクシヨンの 下流100bp	配列 番号	ジャンクシヨンの配列 w/mはジャンクシヨ ンを示す	ジャンク シヨンの 説明	Fプラ イマー 配列	Rプラ イマー 配列	プロ ロー ブ配列
137	ds857	下流	333	GATATGCCCTGAA GTATTCAATTACT TAGGCATTTACTT AACGCAGGCAGG CAATTTTGATGCT GCCTATGAAAGCG TTTGATTTCTGTAC TTGAGCTTGATC	367	GCCATTGAGCTG GCTTCCCAGCCG CAGGGCGGCACC TGCCCTGACCCCTGC GTTTCCCAGCTGTT TAAACACCCTGAC CGGAGGTGAAGC ATGATCCCCTGAA TC	401	5'- GATATGCCCTGAA GTATTCAATTACT TAGGCATTTACTT AACGCAGGCAGG CAATTTTGATGCT GCCTATGAAAGCG TTTGATTTCTGTAC TTGAGCTTGATC/ GCCATTGAGCTG GCTTCCCAGCCG CAGGGCGGCACC TGCCCTGACCCCTG CGTTTCCCAGCTGT TTAACACCCTGA	Ptm8.2/ 破壊さ れたnifL 遺伝子	N/A	N/A	N/A

10

20

30

40

50

【表 30 - 30】

塩基 CI	ジャンク シヨ ン名	上流/ 下流ジ ヤクシ ヨ ン	配列 番号	ジャンクシヨ ンの 下流100bp	配列 番号	ジャンクシヨ ンの配列 はジャンクシ ヨ ンを示す	ジャンク シヨ ンの 説明	Fプラ イマー 配列	Rプラ イマー 配列	プロ ブ配列	
63	ds908	下流	334	TGGTATTGTCAGT CTGAAATGAAAGCT CTTGAAAAAGCT GAGGAAGCGGGC GTCGATTTAGTAG AAATCAGTCCGA ATGCCGAGCCGC CAGTTTGTGGAAT C	368	TGGTATTGTCAGT CTGAAATGAAAGCT CTTGAAAAAGCT GAGGAAGCGGGC GTCGATTTAGTAG AAATCAGTCCGA ATGCCGAGCCGC CAGTTTGTGGAAT C	5- TGGTATTGTCAGT CTGAAATGAAAGCT CTTGAAAAAGCT GAGGAAGCGGGC GTCGATTTAGTAG GAAATCAGTCCG AATGCCGAGCCG CCAGTTTGTGGA ATC/ TCTTTAGATCTCT CGGTCCGCCCTG ATGGCGGCACCT TGCTGACGTTAC GCCTGCCGGTAC	PinfC/ 破壊され た miL 遺伝子	配列 番号 423 GGAA AACG AGTT CAAC CGGC	配列 番号 424 GGGC GGAC CGAG AGAT CTAA	N/A

10

20

30

40

50

【表 3 0 - 3 1】

塩基 CI	ジャンク クシヨ ン名	上流/ 下流ジ ヤンク シヨ ン	配列 番号	ジャンクシヨンの 上流100bp	配列 番号	ジャンクシヨンの 下流100bp	配列 番号	ジャンクシヨンの配列 はジャンクシヨ ンを示す	ジャンク シヨンの 説明	Fプラ イマー 配列	Rプラ イマー 配列	プロ ー ブ配列
63	ds908	上流	335	TGCAAAATTGCAC GGTTATTCCGGGT GAGTATATGTGT GATTTGGGTCCG GCATTGCCAAT AAAGGGGAGAAA GACATGAGCATC ACGGCGTTATCA GC	369	TGAATATCACTG ACTCACAAAGCTA CCTATGTCGAAG AATTAACATAAAA AACTGCAAGATG CAGGCATTCCGG TTAAAGCCGACT TGAGAAATGAGA AGAT	403	5'- TGCAAAATTGCAC GGTTATTCCGGG TGAGTATATGTG TGATTTGGGTCC GGCATTGCACAA TAAAGGGGAGAA AGACATGAGCAT CACGGCGTTATC AGC / TGAATATCACTG ACTCACAAAGCTA CCTATGTCGAAG AATTAACATAAAA AACTGCAAGATG	破壊さ れたmiR 遺伝子 / PufC	N/A	N/A	N/A

10

20

30

40

50

【表 3 0 - 3 2】

塩基 CI	ジャン クシヨ ン名	上流/ 下流ジ ヤンク ヤシヨ ン	配列 番号	ジャンクシヨンの 上流100bp	配列 番号	ジャンクシヨンの 下流100bp	配列 番号	ジャンクシヨンの配列 wはジャンクシヨ ンを示す	ジャンク シヨンの 説明	Fプラ イマー 配列	Rプラ イマー 配列	プロ ブ配列
910	ds960	上流	336	TCAGGGCTGCGG ATGTCGGCGGTT CACAAACAAAA TGTTGTAATGCG ACACAGCCGGC CTGAAACCAGGA GCGTGTGATGAC CTTTAATATGATG C	370	CTGGGGTCACTG GAGCGTTTATC GGCATCCTGACC GAAGAAATTTGCC GGTTTCTTCCCGA CCTGGCTGGCCC CTGTTCAAGTTGT GGTGATGAATAT CA	404	5'- TCAGGGCTGCGG ATGTCGGCGGTT TCACAACAAAA ATGTTGTAATG CGACACAGCCGG GCCTGAAACCAG GAGCGTGTGATG ACCTTTAATATG ATGC / CTGGGGTCACTG GAGCGTTTATC GGCATCCTGACC GAAGAAATTTGCC GGTTTCTTCCCGA	破壊され たmFL 遺伝子 / PinfC	N/A	N/A	N/A

10

20

30

40

50

【表 30 - 33】

塩基 CI	ジャンク クシヨ ン名	上流/ 下流ジ ヤク シヨ ン	配列 番号	ジャンクシヨンの 上流100bp	配列 番号	ジャンクシヨンの 下流100bp	配列 番号	ジャンクシヨンの配列 番号はジャンクシヨ ンを示す	ジャンク シヨンの 説明	Fプラ イマー 配列	Rプラ イマー 配列	プロ ー ブ配列
910	ds960	下流	337	CGGAAAACGAGT TCAAAACGGCACG TCCGAAATCGTATC AATGGCGAGATT CGCGCCAGGAA GTTTCGCTTAACTG GTCTGGAAGGTG AGCAGCTGGGTA TT	371	GCAATAGAATA ACTACCCGCCCT GAAGCGGTACC TGCCTGACCCCTGC GATTCCTGTTATT TCATTCCTGACC GGAGGCCACGA TGACCCAGCGAC C	405	5'- CGGAAAACGAGT TCAAAACGGCACG TCCGAAATCGTAT CAATGGCGAGAT TCGCGCCACGGA AGTTCGCTTAACT GGTCTGGAAGGT GAGCAGCTGGGT ATT/ GCAATAGAATA ACTACCCGCCCT GAAAGCGGTACC TGCCTGACCCCTG CGATTCCCGTTAT	PimC/ 破壊さ れたnifL 遺伝子	N/A	N/A	N/A

10

20

30

40

50

【表 3 0 - 3 4】

塩基 CL	ジャン クシヨ ン名	上流/ 下流ジ ヤンク ヤンシ ョン	配列 番号	ジャンクシヨンの 上流100bp	配列 番号	ジャンクシヨンの 下流100bp	ジャンクシヨンの配列 番号はジャンクシヨ ンを示す	ジャンクシヨンの 説明	Fプラ イマー 配列	Rプラ イマー 配列	プロ ブ配列
137	ds843	上流	425	TCCGGGTTCCGGCT TACCCCGCCGGT TTTGGCCACGGTG TCGGACAATTGT CATAACTGCGAC ACAGGAGTTTC GATGACCCCTGAA TATGATGCTCGA	436	GCCCGCTGACCG ACCAGAACTTC ACCTTGGACTCG GCTATAACCCCTTGG CGTGACGGCGG CGATAACTGGGA CTACATCCCCAATT CCGGTGATCTTAC C	TTCATTCACCTGAC CGGAGGCCACG ATGACCCAGCGA CC-3'	nifLの 5' 上流 領域 /Pm1.2	N/A	N/A	N/A
					447		TCCGGGTTCCGGC TTACCCCGCCGC GHTTTCGGCAGG GTGTCGGACAAT TTGTCATAACTGC GACACAGGAGTT TGCATGACCCCT GAATATGATGCT CGA / GCCCGCTGACCG ACCAGAACTTC ACCTTGGACTCG GCTATAACCCCTG GCGTGACGGCGC GCGATAACTGGG ACTACATCCCCA TTCCGGTGATCTT ACC				

10

20

30

40

50

【表 3 0 - 3 5】

塩基 CI	ジャンク クシヨ ン名	上流/ 下流ジ ヤンク シヨ ン	配列 番号	ジャンクシヨ ンの 上流100bp	配列 番号	ジャンクシヨ ンの 下流100bp	ジャンクシヨ ン配列 wはジャンクシヨ ンを示す	ジャンク シヨ ンの 説明	Fプラ イマー 配列	Rプラ イマー 配列	プロー ブ配列	
137	ds843	下流	426	TCACITTTTAGCA AAGTTGCACTGG ACAAAAGGTACC ACAAITGGTGTA CTGATACTCGAC ACAGCAITTAGTG TCGATTTTTCATA TAAAGGTAATTT G	437	GCCATTGAGCTG GCTTCCCAGCCG CAGGGCGGCACC TGCTTGACCCCTGC GTTTCCCCTGTTT TAAACACCCCTGAC CGGAGGTGAAGC ATGATCCCCTGAA TC	448	TCACITTTTAGCA AAGTTGCACTGG ACAAAAGGTACC ACAAITGGTGTA CTGATACTCGAC ACAGCAITTAGTG TCGATTTTTCATA TAAAGGTAATTT TG/ GCCAITTGAGCTG GCTTCCCAGCCG CAGGGCGGCACC TGCTTGACCCCTG CGTTTCCCCTGTT TAAACACCCCTGA CCGGAGGTGAAG CATGATCCCCTGA ATC	Pm1.2/nif A	N/A	N/A	N/A
137	ds809	上流	427	ATCGCAGCGTCTT TGAATATTTCCGT CGCCAGGCGCTG GCTGCCGAGCCG TTCTGGCTGCATA	438	GCGCTGAAGCAC CTGATCACGCTCT GCGCGCGCTCGC CGATGGTCCGCA GCCAGCTGGCGC	449	ATCGCAGCGTCT TTGAATATTTCCG TCGCCAGGCGCT GGCTGCCGAGCC GTTCTGGCTGCAT	開始コード の後の glnE N 末端の 1647bp 欠失。	N/A	N/A	N/A

10

20

30

40

50

【表 30 - 36】

塩基 CI	ジャンク クシヨ ン名	上流/ 下流ジ ヤクシ ヨシヨ ン	配列 番号	ジャンクシヨンの 上流100bp	配列 番号	ジャンクシヨンの 下流100bp	配列 番号	ジャンクシヨンの配列 wはジャンクシヨ ンを示す	ジャンク シヨンの 説明	Fプラ イマー 配列	Rプラ イマー 配列	プロ ロー ブ配列
137	ds2974	上流	428	GTGGAAAACGGAT AATTCAGGCCA GGGAGCCCTTAT G	439	GCCACCCGGCTGC TGCTGGATGAGC TGCTGGATCCCA ACA	450	AGTGGAAAACCGA TAATTCAGGCC AGGGAGCCCTTA TG/ GCGCTGAAGCAC CTGATCACGCTCT GCGGGCGTGC CGATGGTCGCCA GCCAGCTGGCG GCCACCCGCTGC TGCTGGATGAGC TGCTGGATCCCA ACA	D54A (GAT→ GCT)の 上流の NrCの 5'領域	N/A	N/A	N/A

10

20

30

40

50

【表 3 0 - 3 7】

塩基 CI	ジャンク クシヨ ン名	上流/ 下流ジ ヤンク シヨ ン	配列 番号	ジャンクシヨンの 上流100bp	配列 番号	ジャンクシヨンの 下流100bp	配列 番号	ジャンクシヨンの配列 wはジャンクシヨ ンを示す	ジャンク シヨンの 説明	Fプラ イマー 配列	Rプラ イマー 配列	プロ ブ配列
137	ds2974	下流	429	CGCGTCAACCGG AGCCGGCTTGAG CTGCACAAACGTT GAAAGCGGCAAT GAGGTGCTAGAT GCCCTCACCACC AAAACCCCGGAT GTACTGCTGTCAG CT	440	ATCCGTATGCCG GGAATGGATGGT CTGGCGCTGCTC AAACAGATTAAG CAGCGTCATCCA ATGCTCCGGTCA TCATAATGACCCG CACATCCGATCT GG	451	CCGGGAATGGAT GGTCTGGCGCTG CTCAAAACAGATT AAGCAGCGTCAT CCAATGCTTCCG GTATCAATAATG ACCGCACATTCC GATC CGCGTCAACCGG AGCCGGCTTGAG CTGCACAAACGTT CGAAAGCGGCAA TGAGGTGCTAGA TGCCCTCACCAC CAAAACCCCGGA TGTAATGCTGTC GCT / ATCCGTATGCCG GGAATGGATGGT CTGGCGCTGCTC AAACAGATTAAG CAGCGTCATCCA ATGCTCCGGTCT	D54A (GAT-> GCT)突然 変異の 下流の NtrC配列	N/A	N/A	N/A

10

20

30

40

50

【表 30 - 38】

塩基 CI	ジャン クシヨ ン名	上流/ 下流ジ ヤンク ション	配列 番号	ジャンクシヨンの 上流100bp	配列 番号	ジャンクシヨンの 下流100bp	配列 番号	ジャンクシヨンの配列 番号を示す	ジャンク ションの 説明	Fプラ イマー 配列	Rプラ イマー 配列	プロ ブ配列
137	799	上流	430	TCCGGGTTCCGGCT TACCCCGCCGGT TTTGGCACGGTG TCGGACAATTGT CATAACTGGAC ACAGGAGTTTGC GATGACCCGTGAA TATGATGCTCGA	441	AGCGTCAGGTAC CGGTCATGATTC ACCGTCCGATTCT CGGTTCCCTGGA GCGTTCAATTGGC ATCCTGACCCGAA GAGTTCGCTGGC TTCTTCCCAACCT G	452	ATCATAAATGACC GCACATTCGGAT CTGG TCCGGGTTCCGGC TTACCCCGCCGC GTTTGGCGCACG GTGTCGGACAAT TTGTCATAACTGC GACACAGGAGTT TGGGATGACCCCT GAATATGATGCT CGA / AGCGTCAGGTAC CGGTCATGATTC ACCGTCCGATTCT TCGGTTCCTGG AGCGTTCAATTG GCATCTTGACCG AAGAGTTCGCTG GCTTCTCCCAAC CTG	mifLの 5'上流 領域 /Pinf C	N/A	N/A	N/A
137	799	下流	431	TCTTCAACAACCTG GAGGAATAAGGT	442	GCCATTGAGCTG GCTTCCCGACCG	453	TCTTCAACAACCT GGAGGAATAAGG	PinfC/mif A	N/A	N/A	N/A

10

20

30

40

50

【表 30 - 39】

塩基 CI	ジャンク クシヨ ン名	上流/ 下流ジ ヤンク シヨ ン	配列 番号	ジャンクシヨンの 上流100bp	配列 番号	ジャンクシヨンの 下流100bp	配列 番号	ジャンクシヨンの配列 はジャンクシヨ ンを示す	ジャンク シヨンの 説明	Fプラ イマー 配列	Rプラ イマー 配列	プロー ブ配列
137	ds2538	上流	432	ATTAAGGCGGA AAACGAGTTCAA ACGGCACGTCGG AATCGTATCAAT GGGAGATTCCG GCCCTGGAAAGTT CGC	443	CAGGGCGGCACC TGCCCTGACCCTGC GTTTCCCGCTGTT TAACACCCCTGAC CGGAGGTGAAGC ATGATCCCTGAA TC	454	TATTAAGGCGG AAAAACGAGTTCA AACGGCACGTC GAATCGTATCAA TGGCGAGATTCC CGCCCTGGAAAGT TCGC / GCCATTGAGCTG GCTTCCCGACCG CAGGGCGGCACC TGCCTGACCCTG CGTTCCCGCTGT TTAACACCCCTGA CCGGAGGTGAAG CATGATCCCTGA ATC	glnD- Ubase 不活性化 突然 変異の 5'上流 領域。	N/A	N/A	N/A

10

20

30

40

50

【表 30 - 40】

塩基 CI	ジャンク クシヨ ン名	上流/ 下流ジ ヤンク シヨ ン	配列 番号	ジャンクシヨンの 上流100bp	配列 番号	ジャンクシヨンの 下流100bp	配列 番号	ジャンクシヨンの配列 はジャンクシヨ ンを示す	ジャンク シヨンの 説明	Fプラ イマー 配列	Rプラ イマー 配列	プロ ー ブ配列
137	ds2538	下流	433	CGCTGGTGGCGG T	444	CGCAAAAAGGTCG GC	455	GGCGTGGTGGC CGT/ CCTTGATTATGGC CGCGGGGAGCTG CACCCGCTCTCTG ACGTGCACTGC TGATCCTCAGCC GCAAAAAACTGC CTGACGACCAAG CGCAAAAAGGTCG GC	gInD- Utlase 不活性化 突然 変異の 3'下流 領域。	N/A	N/A	N/A
			433	GTTGTGGATCGCC TACGGTTTGAAT CCGTCTCGGATCT GGCGTGGTGGC CGTCTTGATTAT GGCCGGGGGAG CTGCACCCGCTCT CTGACGTCGCA	444	CTGCTGATCCTCA GCCGCAAAAAAC TGCTGACGACC AGCGCAAAAAGG TCGGCGAACTGC TGACGCTACTGT GGGACGTC AAGC TGGAGGTGGGCC ACA	455	GTTGTGGATCGC CTACGGTTTGA ATCCGCTGCGA TCTGGCGCTGGT GGCCGTCTTGA TTATGGCCGCGG CGAGCTGCACC GCTCTCTGACGTC GCA/ CTGCTGATCCTCA GCCGCAAAAAAC TGCCTGACGACC				

10

20

30

40

50

【表 3 0 - 4 1】

塩基 CI	ジャンク クシヨ ン名	上流/ 下流ジ ヤクシ ヤクシ ヨン	配列 番号	ジャンクシヨンの 上流100bp	配列 番号	ジャンクシヨンの 下流100bp	ジャンクシヨンの wpmはジャンクシヨ ンを示す	ジャンク シヨンの 説明	Fプラ イマー 配列	Rプラ イマー 配列	プロ ロー ブ配列
137	ds2969	上流	434	ACGGCAGGGTTT TGTGTTTTTGAAA ACAAAATGCCTGA AATCGGCTATAA AGTGTGATCTGC ATCAAAAATGCCA TGGGCCAAAATT AAGGAATATTAA GGA	445	GCCCCTGACCG ACCAGAACTTCC ACCTTGGACTCG GCTATACCCTTGG CGTGACGGCGCG CGATAACTGGGA CTACATCCCCATT CCGGTGATCTTAC C	ACGGCAGGGTTT TGTGTTTTTGAAA ACAAAATGCCTGA AATCGGCTATAA AGTGTGATCTGC ATCAAAAATGCCA TGGGCCAAAATT AAGGAATATTAA GGA / GCCCGGTGACCG ACCAGAACTTCC ACCTTGGACTCG GCTATACCCTTG GCGTGACGGCGC GCGATAACTGGG ACTACATCCCCA	2つの仮想 コード 配列間で Klebsiella ゲノムの 非コード 部位に 挿入され たPml1.2 _mifa 遺伝子の 余分のコ ピーの 5'上流。	N/A	N/A	N/A

10

20

30

40

50

【表 3 0 - 4 2】

塩基 CI	ジャンク クシヨ ン名	上流/ 下流ジ ャクシ ャクシ ャクシ ャクシ	配列 番号	ジャンクシヨンの 上流 100bp	配列 番号	ジャンクシヨンの 下流 100bp	ジャンクシヨンの 配列 番号	ジャンクシヨンの配列 はジャンクシヨ ンを示す	ジャンク シヨンの 説明	Fプラ イマー 配列	Rプラ イマー 配列	プロロー ブ配列
137	ds2969	下流	435	GGAACGGCACAA TGTTGTGCCGCAG GGATGCGGGATA ATGCTTATTTTT CAGCCAGATAAA AAAITTCGTCACG GTACGTCGTTTGC AGCAGGAAGGTA	446	GCGTAAAAAGAT ATTTTTGTGCGTA CCGAACCTCGCA GACGGCATTATG GCGTTGCATTGTT TATCGGGCTTATT TCTGGGGTTGTTT CAGCATTTGTTA	457	TTCGGTGATCTT ACC GGAACGGCACAA TGTTGTGCCGC GGATGCGGGAT AATGCTTATTTTT TCAGCCAGATAA AAAITTCGTCAC TGGTACGTCGTTT GCAGCAGGAAGG TA/ GCGTAAAAAGAT ATTTTTGTGCGTA CCGAACCTCGCA GACGGCATTATG GCGTTGCATTGTT TATCGGGCTTATT TCTGGGGTTGTTT CAGCATTTGTTA	2つの仮想 コード 配列間で Klebsiella ゲノムの 非コード 部位に 挿入され たPml1.2 _mfa 遺伝子の 余分のコ ピーの3' 下流。	N/A	N/A	N/A

10

20

30

40

50

【表 3 1】

表 3 1. WT 及びリモデリングされた非属間微生物

菌株名	遺伝子型	配列番号
CI006	16S rDNA - contig 5	62
CI006	16S rDNA-contig 8	63
CI019	16S rDNA	64
CI006	nifH	65
CI006	nifD	66
CI006	nifK	67
CI006	nifL	68
CI006	nifA	69
CI019	nifH	70
CI019	nifD	71
CI019	nifK	72
CI019	nifL	73
CI019	nifA	74
CI006	500bp の隣接領域を持つ Prm5	75
CI006	nifLA オペロン-上流遺伝子間領域と nifL 及び nifA CDS	76
CI006	nifL(アミノ酸)	77
CI006	nifA(アミノ酸)	78
CI006	glnE	79
CI006	glnE_KO1	80
CI006	glnE(アミノ酸)	81
CI006	glnE_KO1(アミノ酸)	82
CI006	GlnE ATase ドメイン(アミノ酸)	83
CM029	nifL 領域に挿入された Prm5	84

10

20

30

【表 3 2 - 1】

表 3 2. リモデリングされた非属間微生物

菌株	菌株 ID	配列番号	遺伝子型	説明	該当する場合、関連する新規ジャンクション
CI63 ; CI063	63	配列番号 85	16S	N/A	N/A
CI63 ; CI063	63	配列番号 86	nifH	N/A	N/A
CI63 ; CI063	63	配列番号 87	nifD1	63 ゲノムにおける nifD として注釈される 2 つの固有の遺伝子のうちの 1 つ目	N/A
CI63 ; CI063	63	配列番号 88	nifD2	63 ゲノムにおける nifD として注釈される 2 つの固有の遺伝子のうちの 2 つ目	N/A

40

50

【表 3 2 - 2】

菌株	菌株 ID	配列番号	遺伝子型	説明	該当する場合、関連する新規ジャンクション
CI63 ; CI063	63	配列番号 89	nifK1	63 ゲノムにおける nifK として注釈される 2 つの固有の遺伝子のうちの 1 つ目	N/A
CI63 ; CI063	63	配列番号 90	nifK2	63 ゲノムにおける nifK として注釈される 2 つの固有の遺伝子のうちの 2 つ目	N/A
CI63 ; CI063	63	配列番号 91	nifL	N/A	N/A
CI63 ; CI063	63	配列番号 92	nifA	N/A	N/A
CI63 ; CI063	63	配列番号 93	glnE	N/A	N/A
CI63 ; CI063	63	配列番号 94	amtB	N/A	N/A
CI63 ; CI063	63	配列番号 95	PinfC	infC 遺伝子の ATG 開始コドンのすぐ上流 500bp	N/A
CI137	137	配列番号 96	16S	N/A	N/A
CI137	137	配列番号 97	nifH1	137 ゲノムにおける nifH として注釈される 2 つの固有の遺伝子のうちの 1 つ目	N/A
CI137	137	配列番号 98	nifH2	137 ゲノムにおける nifH として注釈される 2 つの固有の遺伝子のうちの 2 つ目	N/A
CI137	137	配列番号 99	nifD1	137 ゲノムにおける nifD として注釈される 2 つの固有の遺伝子のうちの 1 つ目	N/A
CI137	137	配列番号 100	nifD2	137 ゲノムにおける nifD として注釈される 2 つの固有の遺伝子のうちの 2 つ目	N/A
CI137	137	配列番号 101	nifK1	137 ゲノムにおける nifK として注釈される 2 つの固有の遺伝子のうちの 1 つ目	N/A
CI137	137	配列番号 102	nifK2	137 ゲノムにおける nifK として注釈される 2 つの固有の遺伝子のうちの 2 つ目	N/A
CI137	137	配列番号 103	nifL	N/A	N/A
CI137	137	配列番号 104	nifA	N/A	N/A
CI137	137	配列番号 105	glnE	N/A	N/A
CI137	137	配列番号 106	PinfC	infC の TTG 開始コドンのすぐ上流の 500bp	N/A
CI137	137	配列番号 107	amtB	N/A	N/A

10

20

30

40

50

【表 3 2 - 3】

菌株	菌株 ID	配列番号	遺伝子型	説明	該当する場合、関連する新規ジャンクション
CI137	137	配列番号 108	Prm8.2	nlpI 遺伝子に位置する内部プロモーター;nlpI 遺伝子の ATG の A の 81bp 後から開始する 299bp	N/A
CI137	137	配列番号 109	Prm6.2	secE の ATG の A の 57bp 上流から開始する secE 遺伝子の 上流の 300bp	N/A
CI137	137	配列番号 110	Prm1.2	cspE 遺伝子の ATG のすぐ上流の 400bp	N/A
無	728	配列番号 111	16S	N/A	N/A
無	728	配列番号 112	nifH	N/A	N/A
無	728	配列番号 113	nifD1	728 ゲノムにおける nifD として注釈される 2 つの固有の遺伝子のうちの 1 つ目	N/A
無	728	配列番号 114	nifD2	728 ゲノムにおける nifD として注釈される 2 つの固有の遺伝子のうちの 2 つ目	N/A
無	728	配列番号 115	nifK1	728 ゲノムにおける nifK として注釈される 2 つの固有の遺伝子のうちの 1 つ目	N/A
無	728	配列番号 116	nifK2	728 ゲノムにおける nifK として注釈される 2 つの固有の遺伝子のうちの 2 つ目	N/A
無	728	配列番号 117	nifL	N/A	N/A
無	728	配列番号 118	nifA	N/A	N/A
無	728	配列番号 119	glnE	N/A	N/A
無	728	配列番号 120	amtB	N/A	N/A
無	850	配列番号 121	16S	N/A	N/A
無	852	配列番号 122	16S	N/A	N/A
無	853	配列番号 123	16S	N/A	N/A
無	910	配列番号 124	16S	N/A	N/A
無	910	配列番号 125	nifH	N/A	N/A
無	910	配列番号 126	ジニトロゲナーゼ鉄-モリブデン補因子 CDS	N/A	N/A
無	910	配列番号 127	nifD1	N/A	N/A
無	910	配列番号 128	nifD2	N/A	N/A
無	910	配列番号 129	nifK1	N/A	N/A
無	910	配列番号 130	nifK2	N/A	N/A

10

20

30

40

50

【表 3 2 - 4】

菌株	菌株 ID	配列番号	遺伝子型	説明	該当する場合、関連する新規ジャンクション
無	910	配列番号 131	nifL	N/A	N/A
無	910	配列番号 132	nifA	N/A	N/A
無	910	配列番号 133	glnE	N/A	N/A
無	910	配列番号 134	amtB	N/A	N/A
無	910	配列番号 135	PinfC	infC 遺伝子の ATG のすぐ上流の 498bp	N/A
無	1021	配列番号 136	16S	N/A	N/A
無	1021	配列番号 137	nifH	N/A	N/A
無	1021	配列番号 138	nifD1	910 ゲノムにおける nifD として注釈される 2 つの固有の遺伝子のうちの 1 つ目	N/A
無	1021	配列番号 139	nifD2	910 ゲノムにおける nifD として注釈される 2 つの固有の遺伝子のうちの 2 つ目	N/A
無	1021	配列番号 140	nifK1	910 ゲノムにおける nifK として注釈される 2 つの固有の遺伝子のうちの 1 つ目	N/A
無	1021	配列番号 141	nifK2	910 ゲノムにおける nifK として注釈される 2 つの固有の遺伝子のうちの 2 つ目	N/A
無	1021	配列番号 142	nifL	N/A	N/A
無	1021	配列番号 143	nifA	N/A	N/A
無	1021	配列番号 144	glnE	N/A	N/A
無	1021	配列番号 145	amtB	N/A	N/A
無	1021	配列番号 146	PinfC	infC 遺伝子の ATG 開始コドンのすぐ上流 500bp	N/A
無	1021	配列番号 147	Prm1	348bp は、lpp 遺伝子の ATG 開始コドンのすぐ上流の 319bp 及び lpp 遺伝子の最初の 29bp を含む	N/A
無	1021	配列番号 148	Prm7	sspA 遺伝子の ATG の 46bp 上流で終わる、sspA 遺伝子の 上流の 339bp	N/A
無	1113	配列番号 149	16S	N/A	N/A
無	1113	配列番号 150	nifH	N/A	N/A
無	1113	配列番号 151	nifD1	1113 ゲノムにおける nifD として注釈される 2 つの固有の遺伝子のうちの 1 つ目	N/A
無	1113	配列番号 152	nifD2	1113 ゲノムにおける nifD として注釈される 2 つの固有の遺伝子のうちの 2 つ目	N/A

10

20

30

40

50

【表 3 2 - 5】

菌株	菌株 ID	配列番号	遺伝子型	説明	該当する場合、関連する新規ジャンクション
無	1113	配列番号 153	nifK	N/A	N/A
無	1113	配列番号 154	nifL	N/A	N/A
無	1113	配列番号 155	nifA 部分 遺伝子	配列アセンブリのギャップに起因して、1113 ゲノムからの部分的遺伝子のみが特定可能である	N/A
無	1113	配列番号 156	glnE	N/A	N/A
無	1116	配列番号 157	l6S		N/A
無	1116	配列番号 158	nifH		N/A
無	1116	配列番号 159	nifD1	1116 ゲノムにおける nifD として注釈される 2 つの固有の遺伝子のうちの 1 つ目	N/A
無	1116	配列番号 160	nifD2	1116 ゲノムにおける nifD として注釈される 2 つの固有の遺伝子のうちの 2 つ目	N/A
無	1116	配列番号 161	nifK1	1116 ゲノムにおける nifK として注釈される 2 つの固有の遺伝子のうちの 1 つ目	N/A
無	1116	配列番号 162	nifK2	1116 ゲノムにおける nifK として注釈される 2 つの固有の遺伝子のうちの 2 つ目	N/A
無	1116	配列番号 163	nifL	N/A	N/A
無	1116	配列番号 164	nifA	N/A	N/A
無	1116	配列番号 165	glnE	N/A	N/A
無	1116	配列番号 166	amtB	N/A	N/A
無	1293	配列番号 167	l6S	N/A	N/A
無	1293	配列番号 168	nifH	N/A	N/A
無	1293	配列番号 169	nifD1	1293 ゲノムにおける nifD として注釈される 2 つの固有の遺伝子のうちの 1 つ目	N/A
無	1293	配列番号 170	nifD2	1293 ゲノムにおける nifD として注釈される 2 つの固有の遺伝子のうちの 2 つ目	N/A
無	1293	配列番号 171	nifK	1293 ゲノムにおける nifK として注釈される 2 つの固有の遺伝子のうちの 1 つ目	N/A
無	1293	配列番号 172	nifK1	1293 ゲノムにおける nifK として注釈される 2 つの固有の遺伝子のうちの 2 つ目	N/A
無	1293	配列番号 173	nifA	N/A	N/A
無	1293	配列番号 174	glnE	N/A	N/A

10

20

30

40

50

【表 3 2 - 6】

菌株	菌株 ID	配列番号	遺伝子型	説明	該当する場合、関連する新規ジャンクション
無	1293	配列番号 175	amtB1	1293 ゲノムにおける amtB として注釈される 2 つの固有の遺伝子のうちの 1 つ目	N/A
無	1293	配列番号 176	amtB2	1293 ゲノムにおける amtB として注釈される 2 つの固有の遺伝子のうちの 2 つ目	N/A
無	1021-1612	配列番号 177	Δ nifL::PinfC	ATG 開始コドンの A の 24bp 後から開始して、nifL の 1375bp が欠失し、1021 PinfC プロモーター配列と置換されている	ds1131
無	1021-1612	配列番号 178	隣接 500bp を含む Δ nifL::PinfC	ATG 開始コドンの A の 24bp 後から開始して、nifL の 1375bp が欠失し、1021 PinfC プロモーター配列と置換されている;nifL 遺伝子に上流及び下流で隣接する 500bp が含まれる	ds1131
無	1021-1612	配列番号 179	glnE Δ AR-2	ATG 開始コドンのすぐ下流の 1673bp が欠失していることにより、アデニル除去 (AR) ドメインが欠如した短縮型 glnE タンパク質をもたらす glnE 遺伝子	ds1133
無	1021-1612	配列番号 180	隣接 500bp を含む glnE Δ AR-2	ATG 開始コドンのすぐ下流の 1673bp が欠失していることにより、アデニル除去 (AR) ドメインが欠如した短縮型 glnE タンパク質をもたらす glnE 遺伝子;glnE 遺伝子に上流及び下流で隣接する 500bp が含まれる	ds1133
無	1021-1615	配列番号 181	Δ nifL::Prm1	ATG 開始コドンの A の 24bp 後から開始して、nifL の 1375bp が欠失し、1021 Prm1 プロモーター配列と置換されている	ds1145

10

20

30

40

50

【表 3 2 - 7】

菌株	菌株 ID	配列番号	遺伝子型	説明	該当する場合、関連する新規ジャンクション
無	1021-1615	配列番号 182	隣接 500bp を含む $\Delta nifL::Prm1$	ATG 開始コドンの A の 24bp 後から開始して、nifL の 1375bp が欠失し、1021 rm1 プロモーター配列と置換されている;nifL 遺伝子に上流及び下流で隣接する 500bp が含まれる	ds1145
無	1021-1615	配列番号 183	$glnE\Delta AR-2$	ATG 開始コドンのすぐ下流の 1673bp が欠失していることにより、アデニル除去 (AR) ドメインが欠如した短縮型 glnE タンパク質をもたらす glnE 遺伝子	ds1133
無	1021-1615	配列番号 184	隣接 500bp を含む $glnE\Delta AR-2$	ATG 開始コドンのすぐ下流の 1673bp が欠失していることにより、アデニル除去 (AR) ドメインが欠如した短縮型 glnE タンパク質をもたらす glnE 遺伝子;glnE 遺伝子に上流及び下流で隣接する 500bp が含まれる	ds1133
無	1021-1619	配列番号 185	$\Delta nifL::Prm1$	ATG 開始コドンの A の 24bp 後から開始して、nifL の 1375bp が欠失し、1021 Prm1 プロモーター配列と置換されている	ds1145
無	1021-1619	配列番号 186	隣接 500bp を含む $\Delta nifL::Prm1$	ATG 開始コドンの A の 24bp 後から開始して、nifL の 1375bp が欠失し、1021 rm1 プロモーター配列と置換されている;nifL 遺伝子に上流及び下流で隣接する 500bp が含まれる	ds1145
無	1021-1623	配列番号 187	$glnE\Delta AR-2$	ATG 開始コドンのすぐ下流の 1673bp が欠失していることにより、アデニル除去 (AR) ドメインが欠如した短縮型 glnE タンパク質をもたらす glnE 遺伝子	ds1133

10

20

30

40

50

【表 3 2 - 8】

菌株	菌株 ID	配列番号	遺伝子型	説明	該当する場合、関連する新規ジャンクション
無	1021-1623	配列番号 188	隣接 500bp を含む glnEΔAR-2	ATG 開始コドンのすぐ下流の 1673bp が欠失していることにより、アデニル除去 (AR) ドメインが欠如した短縮型 glnE タンパク質をもたらす glnE 遺伝子;glnE 遺伝子に上流及び下流で隣接する 500bp が含まれる	ds1133
無	1021-1623	配列番号 189	ΔnifL::Prm7	ATG 開始コドンの A の 24bp 後から開始して、nifL の 1375bp が欠失し、1021 Prm7 プロモーター配列と置換されている	ds1148
無	1021-1623	配列番号 190	隣接 500bp を含む ΔnifL::Prm7	ATG 開始コドンの A の 24bp 後から開始して、nifL の 1375bp が欠失し、1021 rm7 プロモーター配列と置換されている;nifL 遺伝子に上流及び下流で隣接する 500bp が含まれる	ds1148
無	137-1034	配列番号 191	glnEΔAR-2	ATG 開始コドンのすぐ下流の 1290bp が欠失していることにより、アデニル除去 (AR) ドメインが欠如した短縮型 glnE タンパク質をもたらす glnE 遺伝子	ds809
無	137-1034	配列番号 192	隣接 500bp を含む glnEΔAR-2	ATG 開始コドンのすぐ下流の 1290bp が欠失していることにより、アデニル除去 (AR) ドメインが欠如した短縮型 glnE タンパク質をもたらす glnE 遺伝子;glnE 遺伝子に上流及び下流で隣接する 500bp が含まれる	ds809
無	137-1036	配列番号 193	ΔnifL::PinfC	ATG 開始コドンの A の 24bp 後から開始して、nifL の 1372bp が欠失し、137 PinfC プロモーター配列と置換されている	ds799

10

20

30

40

50

【表 3 2 - 9】

菌株	菌株 ID	配列番号	遺伝子型	説明	該当する場合、関連する新規ジャンクション
無	137-1036	配列番号 194	隣接 500bp を含む $\Delta nifL::PinfC$	ATG 開始コドンの A の 24bp 後から開始して、nifL の 1372bp が欠失し、137 PinfC プロモーター配列と置換されている;nifL 遺伝子に上流及び下流で隣接する 500bp が含まれる	ds799
無	137-1314	配列番号 195	$glnE\Delta AR$ -2 36bp 欠失	ATG 開始コドンのすぐ下流の 1290bp が欠失し、かつ開始コドンの 1472bp 下流から開始する 36bp が欠失していることにより、アデニル除去(AR)ドメインが欠如した短縮型 glnE タンパク質をもたらす glnE 遺伝子	無
無	137-1314	配列番号 196	$glnE\Delta AR$ -2 36bp 欠失	ATG 開始コドンのすぐ下流の 1290bp が欠失し、かつ開始コドンの 1472bp 下流から開始する 36bp が欠失していることにより、アデニル除去(AR)ドメインが欠如した短縮型 glnE タンパク質をもたらす glnE 遺伝子;nifL 遺伝子に上流及び下流で隣接する 500bp が含まれる	無
無	137-1314	配列番号 197	$\Delta nifL::Prm8.2$	ATG 開始コドンの A の 24bp 後から開始して、nifL の 1372bp が欠失し、137 Prm8.2 プロモーター配列と置換されている	ds857
無	137-1314	配列番号 198	隣接 500bp を含む $\Delta nifL::Prm8.2$	ATG 開始コドンの A の 24bp 後から開始して、nifL の 1372bp が欠失し、137 Prm8.2 プロモーター配列と置換されている;nifL 遺伝子に上流及び下流で隣接する 500bp が含まれる	ds857

10

20

30

40

50

【表 3 2 - 1 0】

菌株	菌株 ID	配列番号	遺伝子型	説明	該当する場合、関連する新規ジャンクション
無	137-1329	配列番号 199	<i>glnE</i> ΔAR-2 36bp 欠失	ATG 開始コドンのすぐ下流の 1290bp が欠失し、かつ開始コドンの 1472bp 下流から開始する 36bp が欠失していることにより、アデニル除去(AR)ドメインが欠如した短縮型 <i>glnE</i> タンパク質をもたらす <i>glnE</i> 遺伝子	無
無	137-1329	配列番号 200	<i>glnE</i> ΔAR-2 36bp 欠失	ATG 開始コドンのすぐ下流の 1290bp が欠失し、かつ開始コドンの 1472bp 下流から開始する 36bp が欠失していることにより、アデニル除去(AR)ドメインが欠如した短縮型 <i>glnE</i> タンパク質をもたらす <i>glnE</i> 遺伝子; <i>nifL</i> 遺伝子に上流及び下流で隣接する 500bp が含まれる	無
無	137-1329	配列番号 201	Δ <i>nifL</i> ::Prm6.2	ATG 開始コドンの A の 24bp 後から開始して、 <i>nifL</i> の 1372bp が欠失し、137 Prm6.2 プロモーター配列と置換されている	ds853
無	137-1329	配列番号 202	隣接 500bp を含む Δ <i>nifL</i> ::Prm6.2	ATG 開始コドンの A の 24bp 後から開始して、 <i>nifL</i> の 1372bp が欠失し、137 Prm6.2 プロモーター配列と置換されている; <i>nifL</i> 遺伝子に上流及び下流で隣接する 500bp が含まれる	ds853
無	137-1382	配列番号 203	Δ <i>nifL</i> ::Prm1.2	ATG 開始コドンの A の 24bp 後から開始して、 <i>nifL</i> の 1372bp が欠失し、137 Prm1.2 プロモーター配列と置換されている	ds843
無	137-1382	配列番号 204	隣接 500bp を含む Δ <i>nifL</i> ::Prm1.2	ATG 開始コドンの A の 24bp 後から開始して、 <i>nifL</i> の 1372bp が欠失し、137 Prm1.2 プロモーター配列と置換されている; <i>nifL</i> 遺伝子に上流及び下流で隣接する 500bp が含まれる	ds843

10

20

30

40

50

【表 3 2 - 1 1】

菌株	菌株 ID	配列番号	遺伝子型	説明	該当する場合、関連する新規ジャンクション
無	137-1382	配列番号 205	<i>glnE</i> ΔAR-2 36bp 欠失	ATG 開始コドンのすぐ下流の 1290bp が欠失し、かつ開始コドンの 1472bp 下流から開始する 36bp が欠失していることにより、アデニル除去(AR)ドメインが欠如した短縮型 <i>glnE</i> タンパク質をもたらす <i>glnE</i> 遺伝子	無
無	137-1382	配列番号 206	<i>glnE</i> ΔAR-2 36bp 欠失	ATG 開始コドンのすぐ下流の 1290bp が欠失し、かつ開始コドンの 1472bp 下流から開始する 36bp が欠失していることにより、アデニル除去(AR)ドメインが欠如した短縮型 <i>glnE</i> タンパク質をもたらす <i>glnE</i> 遺伝子; <i>nifL</i> 遺伝子に上流及び下流で隣接する 500bp が含まれる	無
無	137-1586	配列番号 207	Δ <i>nifL</i> :: <i>P_{nifC}</i>	ATG 開始コドンの A の 24bp 後から開始して、 <i>nifL</i> の 1372bp が欠失し、137 <i>P_{nifC}</i> プロモーター配列と置換されている	ds799
無	137-1586	配列番号 208	隣接 500bp を含む Δ <i>nifL</i> :: <i>P_{nifC}</i>	ATG 開始コドンの A の 24bp 後から開始して、 <i>nifL</i> の 1372bp が欠失し、137 <i>P_{nifC}</i> プロモーター配列と置換されている; <i>nifL</i> 遺伝子に上流及び下流で隣接する 500bp が含まれる	ds799
無	137-1586	配列番号 209	<i>glnE</i> ΔAR-2	ATG 開始コドンのすぐ下流の 1290bp が欠失していることにより、アデニル除去(AR)ドメインが欠如した短縮型 <i>glnE</i> タンパク質をもたらす <i>glnE</i> 遺伝子	ds809

10

20

30

40

50

【表 3 2 - 1 2】

菌株	菌株 ID	配列番号	遺伝子型	説明	該当する場合、関連する新規ジャンクション
無	137-1586	配列番号 210	隣接 500bp を含む glnEΔAR-2	ATG 開始コドンのすぐ下流の 1290bp が欠失していることにより、アデニル除去 (AR) ドメインが欠如した短縮型 glnE タンパク質をもたらす glnE 遺伝子;glnE 遺伝子に上流及び下流で隣接する 500bp が含まれる	ds809
無	19-594	配列番号 211	glnEΔAR-2	ATG 開始コドンのすぐ下流の 1650bp が欠失していることにより、アデニル除去 (AR) ドメインが欠如した短縮型 glnE タンパク質をもたらす glnE 遺伝子	ds34
無	19-594	配列番号 212	隣接 500bp を含む glnEΔAR-2	ATG 開始コドンのすぐ下流の 1650bp が欠失していることにより、アデニル除去 (AR) ドメインが欠如した短縮型 glnE タンパク質をもたらす glnE 遺伝子;glnE 遺伝子に上流及び下流で隣接する 500bp が含まれる	ds34
無	19-594	配列番号 213	ΔnifL::Prm6.1	ATG 開始コドンの A の 221bp 後から開始して、nifL の 845bp が欠失し、CI019 Prm6.1 プロモーター配列と置換されている	ds180
無	19-594	配列番号 214	隣接 500bp を含む ΔnifL::Prm6.1	ATG 開始コドンの A の 221bp 後から開始して、nifL の 845bp が欠失し、CI019 Prm6.1 プロモーター配列と置換されている ; nifL 遺伝子に上流及び下流で隣接する 500bp が含まれる	ds180
無	19-714	配列番号 215	ΔnifL::Prm6.1	ATG 開始コドンの A の 221bp 後から開始して、nifL の 845bp が欠失し、CI019 Prm6.1 プロモーター配列と置換されている	ds180

10

20

30

40

50

【表 3 2 - 1 3】

菌株	菌株 ID	配列番号	遺伝子型	説明	該当する場合、関連する新規ジャンクション
無	19-714	配列番号 216	隣接 500bp を含む $\Delta nifL::Prm6.1$	ATG 開始コドンの A の 221bp 後から開始して、nifL の 845bp が欠失し、CI019 Prm6.1 プロモーター配列と置換されている；nifL 遺伝子に上流及び下流で隣接する 500bp が含まれる	ds180
無	19-715	配列番号 217	$\Delta nifL::Prm7.1$	ATG 開始コドンの A の 221bp 後から開始して、nifL の 845bp が欠失し、CI019 Prm7.1 プロモーター配列と置換されている	ds181
無	19-715	配列番号 218	隣接 500bp を含む $\Delta nifL::Prm7.1$	ATG 開始コドンの A の 221bp 後から開始して、nifL の 845bp が欠失し、CI019 Prm7.1 プロモーター配列と置換されている；nifL 遺伝子に上流及び下流で隣接する 500bp が含まれる	ds181
19-713	19-750	配列番号 219	$\Delta nifL::Prm1.2$	ATG 開始コドンの A の 221bp 後から開始して、nifL の 845bp が欠失し、CI019 Prm1.2 プロモーター配列と置換されている	ds172
19-713	19-750	配列番号 220	隣接 500bp を含む $\Delta nifL::Prm1.2$	ATG 開始コドンの A の 221bp 後から開始して、nifL の 845bp が欠失し、CI019 Prm1.2 プロモーター配列と置換されている；nifL 遺伝子に上流及び下流で隣接する 500bp が含まれる	ds172
17-724	19-804	配列番号 221	$\Delta nifL::Prm1.2$	ATG 開始コドンの A の 221bp 後から開始して、nifL の 845bp が欠失し、CI019 Prm1.2 プロモーター配列と置換されている	ds172

10

20

30

40

50

【表 3 2 - 1 4】

菌株	菌株 ID	配列番号	遺伝子型	説明	該当する場合、関連する新規ジャンクション
17-724	19-804	配列番号 222	隣接 500bp を含む $\Delta nifL::Prm1.2$	ATG 開始コドンの A の 221bp 後から開始して、nifL の 845bp が欠失し、CI019 Prm1.2 プロモーター配列と置換されている nifL 遺伝子に上流及び下流で隣接する 500bp が含まれる	ds172
17-724	19-804	配列番号 223	$glnE\Delta AR-2$	ATG 開始コドンのすぐ下流の 1650bp が欠失していることにより、アデニル除去 (AR) ドメインが欠如した短縮型 glnE タンパク質をもたらす glnE 遺伝子	ds34
17-724	19-804	配列番号 224	隣接 500bp を含む $glnE\Delta AR-2$	ATG 開始コドンのすぐ下流の 1650bp が欠失していることにより、アデニル除去 (AR) ドメインが欠如した短縮型 glnE タンパク質をもたらす glnE 遺伝子;glnE 遺伝子に上流及び下流で隣接する 500bp が含まれる	ds34
19-590	19-806	配列番号 225	$\Delta nifL::Prm3.1$	ATG 開始コドンの A の 221bp 後から開始して、nifL の 845bp が欠失し、CI019 Prm3.1 プロモーター配列と置換されている	ds175
19-590	19-806	配列番号 226	隣接 500bp を含む $\Delta nifL::Prm3.1$	ATG 開始コドンの A の 221bp 後から開始して、nifL の 845bp が欠失し、CI019 Prm3.1 プロモーター配列と置換されている;nifL 遺伝子に上流及び下流で隣接する 500bp が含まれる	ds175
19-590	19-806	配列番号 227	$glnE\Delta AR-2$	ATG 開始コドンのすぐ下流の 1650bp が欠失していることにより、アデニル除去 (AR) ドメインが欠如した短縮型 glnE タンパク質をもたらす glnE 遺伝子	ds34

10

20

30

40

50

【表 3 2 - 1 5】

菌株	菌株 ID	配列番号	遺伝子型	説明	該当する場合、関連する新規ジャンクション
19-590	19-806	配列番号 228	隣接 500bp を含む <i>glnE</i> ΔAR-2	ATG 開始コドンのすぐ下流の 1650bp が欠失していることにより、アデニル除去 (AR) ドメインが欠如した短縮型 <i>glnE</i> タンパク質をもたらす <i>glnE</i> 遺伝子; <i>glnE</i> 遺伝子に上流及び下流で隣接する 500bp が含まれる	ds34
無	63-1146	配列番号 229	Δ <i>nifL</i> :: <i>P_{nifC}</i>	ATG 開始コドンの A の 24bp 後から開始して、 <i>nifL</i> の 1375bp が欠失し、63 <i>P_{nifC}</i> プロモーター配列と置換されている	ds908
無	63-1146	配列番号 230	隣接 500bp を含む Δ <i>nifL</i> :: <i>P_{nifC}</i>	ATG 開始コドンの A の 24bp 後から開始して、 <i>nifL</i> の 1375bp が欠失し、63 <i>P_{nifC}</i> プロモーター配列と置換されている; <i>nifL</i> 遺伝子に上流及び下流で隣接する 500bp が含まれる	ds908
CM015 ; PBC6.15	6-397	配列番号 231	Δ <i>nifL</i> :: <i>P_{rm5}</i>	ATG 開始コドンの A の 31bp 後から開始して、 <i>nifL</i> の 1375bp が欠失し、CI006 <i>P_{rm5}</i> プロモーター配列と置換されている	ds24
CM015 ; PBC6.15	6-397	配列番号 232	隣接 500bp を含む Δ <i>nifL</i> :: <i>P_{rm5}</i>	ATG 開始コドンの A の 31bp 後から開始して、 <i>nifL</i> の 1375bp が欠失し、CI006 <i>P_{rm5}</i> プロモーター配列と置換されている ; <i>nifL</i> 遺伝子に上流及び下流で隣接する 500bp が含まれる	ds24
CM014	6-400	配列番号 233	Δ <i>nifL</i> :: <i>P_{rm1}</i>	ATG 開始コドンの A の 31bp 後から開始して、 <i>nifL</i> の 1375bp が欠失し、CI006 <i>P_{rm1}</i> プロモーター配列と置換されている	ds20

10

20

30

40

50

【表 3 2 - 1 6】

菌株	菌株 ID	配列番号	遺伝子型	説明	該当する場合、関連する新規ジャンクション
CM014	6-400	配列番号 234	隣接 500bp を含む $\Delta nifL::Prm1$	ATG 開始コドンの A の 31bp 後から開始して、nifL の 1375bp が欠失し、CI006 Prm1 プロモーター配列と置換されている；nifL 遺伝子に上流及び下流で隣接する 500bp が含まれる	ds20
CM037 ; PBC6.37	6-403	配列番号 235	$\Delta nifL::Prm1$	ATG 開始コドンの A の 31bp 後から開始して、nifL の 1375bp が欠失し、CI006 Prm1 プロモーター配列と置換されている	ds20
CM037 ; PBC6.38	6-403	配列番号 236	隣接 500bp を含む $\Delta nifL::Prm1$	ATG 開始コドンの A の 31bp 後から開始して、nifL の 1375bp が欠失し、CI006 Prm1 プロモーター配列と置換されている；nifL 遺伝子に上流及び下流で隣接する 500bp が含まれる	ds20
CM037 ; PBC6.39	6-403	配列番号 237	$glnE\Delta AR-2$	ATG 開始コドンのすぐ下流の 1644bp が欠失していることにより、アデニル除去 (AR) ドメインが欠如した短縮型 glnE タンパク質をもたらす glnE 遺伝子	ds31
CM037 ; PBC6.40	6-403	配列番号 238	隣接 500bp を含む $glnE\Delta AR-2$	ATG 開始コドンのすぐ下流の 1644bp が欠失していることにより、アデニル除去 (AR) ドメインが欠如した短縮型 glnE タンパク質をもたらす glnE 遺伝子；glnE 遺伝子に上流及び下流で隣接する 500bp が含まれる	ds31
CM038 ; PBC6.38	6-404	配列番号 239	$glnE\Delta AR-1$	ATG 開始コドンのすぐ下流の 1287bp が欠失していることにより、アデニル除去 (AR) ドメインが欠如した短縮型 glnE タンパク質をもたらす glnE 遺伝子	ds30

10

20

30

40

50

【表 3 2 - 1 7】

菌株	菌株 ID	配列番号	遺伝子型	説明	該当する場合、関連する新規ジャンクション
CM038 ; PBC6.38	6-404	配列番号 240	Δ nifL::Prm1	ATG 開始コドンの A の 31bp 後から開始して、nifL の 1375bp が欠失し、CI006 Prm1 プロモーター配列と置換されている	ds20
CM038 ; PBC6.38	6-404	配列番号 241	隣接 500bp を含む Δ nifL::Prm1	ATG 開始コドンの A の 31bp 後から開始して、nifL の 1375bp が欠失し、CI006 Prm1 プロモーター配列と置換されている; nifL 遺伝子に上流及び下流で隣接する 500bp が含まれる	ds20
CM038 ; PBC6.38	6-404	配列番号 242	隣接 500bp を含む glnE Δ AR-1	ATG 開始コドンのすぐ下流の 1287bp が欠失していることにより、アデニル除去 (AR) ドメインが欠如した短縮型 glnE タンパク質をもたらす glnE 遺伝子; glnE 遺伝子に上流及び下流で隣接する 500bp が含まれる	ds30
CM029 ; PBC6.29	6-412	配列番号 243	glnE Δ AR-1	ATG 開始コドンのすぐ下流の 1287bp が欠失していることにより、アデニル除去 (AR) ドメインが欠如した短縮型 glnE タンパク質をもたらす glnE 遺伝子	ds30
CM029 ; PBC6.29	6-412	配列番号 244	隣接 500bp を含む glnE Δ AR-1	ATG 開始コドンのすぐ下流の 1287bp が欠失していることにより、アデニル除去 (AR) ドメインが欠如した短縮型 glnE タンパク質をもたらす glnE 遺伝子; glnE 遺伝子に上流及び下流で隣接する 500bp が含まれる	ds30
CM029 ; PBC6.29	6-412	配列番号 245	Δ nifL::Prm5	ATG 開始コドンの A の 31bp 後から開始して、nifL の 1375bp が欠失し、CI006 Prm5 プロモーター配列と置換されている	ds24

10

20

30

40

50

【表 3 2 - 1 8】

菌株	菌株 ID	配列番号	遺伝子型	説明	該当する場合、関連する新規ジャンクション
CM029 ; PBC6.29	6-412	配列番号 246	隣接 500bp を 含む $\Delta nifL::Prm5$	ATG 開始コドンの A の 31bp 後から開始して、nifL の 1375bp が欠失し、CI006 Prm5 プロモーター配列と置換されている; nifL 遺伝子に上流及び下流で隣接する 500bp が含まれる	ds24
CM093 ; PBC6.93	6-848	配列番号 247	$\Delta nifL::Prm1$	ATG 開始コドンの A の 31bp 後から開始して、nifL の 1375bp が欠失し、CI006 Prm1 プロモーター配列と置換されている	ds20
CM093 ; PBC6.93	6-848	配列番号 248	隣接 500bp を 含む $\Delta nifL::Prm1$	ATG 開始コドンの A の 31bp 後から開始して、nifL の 1375bp が欠失し、CI006 Prm1 プロモーター配列と置換されている; nifL 遺伝子に上流及び下流で隣接する 500bp が含まれる	ds20
CM093 ; PBC6.93	6-848	配列番号 249	$glnE\Delta AR-2$	ATG 開始コドンのすぐ下流の 1644bp が欠失していることにより、アデニリル除去 (AR) ドメインが欠如した短縮型 glnE タンパク質をもたらす glnE 遺伝子	ds31
CM093 ; PBC6.93	6-848	配列番号 250	隣接 500bp を 含む $glnE\Delta AR-2$	ATG 開始コドンのすぐ下流の 1644bp が欠失していることにより、アデニリル除去 (AR) ドメインが欠如した短縮型 glnE タンパク質をもたらす glnE 遺伝子; glnE 遺伝子に上流及び下流で隣接する 500bp が含まれる	ds31
CM093 ; PBC6.93	6-848	配列番号 251	$\Delta amtB$	amtB 遺伝子の最初の 1088bp 及び開始コドンの上流 4bp が欠失している; 遺伝子の残りの 199bp は、開始コドンが欠如している; amtB タンパク質は翻訳されない	ds126

10

20

30

40

50

【表 3 2 - 1 9】

菌株	菌株 ID	配列番号	遺伝子型	説明	該当する場合、関連する新規ジャンクション
CM093 ; PBC6.93	6-848	配列番号 252	隣接 500bp を 含む Δ amtB	amtB 遺伝子の最初の 1088bp 及び開始コドンの上流 4bp が 欠失している;遺伝子の残りの 199bp は、開始コドンが 欠如している;amtB タンパク 質は翻訳されない	ds126
CM094 ; PBC6.94	6-881	配列番号 253	$glnE\Delta AR$ -1	ATG 開始コドンのすぐ下流 の 1287bp が欠失していること により、アデニル除去 (AR)ドメインが欠如した短 縮型 $glnE$ タンパク質をもた らす $glnE$ 遺伝子	ds30
CM094 ; PBC6.94	6-881	配列番号 254	隣接 500bp を 含む $glnE\Delta AR$ -1	ATG 開始コドンのすぐ下流 の 1287bp が欠失していること により、アデニル除去 (AR)ドメインが欠如した短 縮型 $glnE$ タンパク質をもた らす $glnE$ 遺伝子; $glnE$ 遺伝 子に上流及び下流で隣接する 500bp が含まれる	ds30
CM094 ; PBC6.94	6-881	配列番号 255	$\Delta nifL::Pr$ $m1$	ATG 開始コドンの A の 31bp 後から開始して、 $nifL$ の 1375bp が欠失し、CI006 $Prm1$ プロモーター配列と置 換されている	ds20
CM094 ; PBC6.94	6-881	配列番号 256	隣接 500bp を 含む $\Delta nifL::Pr$ $m1$	ATG 開始コドンの A の 31bp 後から開始して、 $nifL$ の 1375bp が欠失し、CI006 $Prm1$ プロモーター配列と置 換されている; $nifL$ 遺伝子に 上流及び下流で隣接する 500bp が含まれる	ds20
CM094 ; PBC6.94	6-881	配列番号 257	Δ amtB	amtB 遺伝子の最初の 1088bp 及び開始コドンの上流 4bp が 欠失している;遺伝子の残りの 199bp は、開始コドンが 欠如している;amtB タンパク 質は翻訳されない	ds126

10

20

30

40

50

【表 3 2 - 2 0】

菌株	菌株 ID	配列番号	遺伝子型	説明	該当する場合、関連する新規ジャンクション
CM094 ; PBC6.94	6-881	配列番号 258	隣接 500bp を含む ΔamtB	amtB 遺伝子の最初の 1088bp 及び開始コドンの上流 4bp が欠失している;遺伝子の残りの 199bp は、開始コドンが欠如している;amtB タンパク質は翻訳されない	ds126
無	910-1246	配列番号 259	ΔnifL::PinfC	ATG 開始コドンの A の 20bp 後から開始して、nifL の 1379bp が欠失し、910 PinfC プロモーター配列と置換されている	ds960
無	910-1246	配列番号 260	隣接 500bp を含む ΔnifL::PinfC	ATG 開始コドンの A の 20bp 後から開始して、nifL の 1379bp が欠失し、910 PinfC プロモーター配列と置換されている;nifL 遺伝子に上流及び下流で隣接する 500bp が含まれる	ds960
PBC6.1, 6, CI6	CI006	配列番号 261	16S-1	CI006 ゲノムにおける 3 つの固有の 16S rDNA 遺伝子のうちの 1 つ目	N/A
PBC6.1, 6, CI6	CI006	配列番号 262	16S-2	CI006 ゲノムにおける 3 つの固有の 16S rDNA 遺伝子のうちの 2 つ目	N/A
PBC6.1, 6, CI6	CI006	配列番号 263	nifH	N/A	N/A
PBC6.1, 6, CI6	CI006	配列番号 264	nifD2	CI006 ゲノムにおける nifD として注釈される 2 つの固有の遺伝子のうちの 2 つ目	N/A
PBC6.1, 6, CI6	CI006	配列番号 265	nifK2	CI006 ゲノムにおける nifK として注釈される 2 つの固有の遺伝子のうちの 2 つ目	N/A
PBC6.1, 6, CI6	CI006	配列番号 266	nifL	N/A	N/A
PBC6.1, 6, CI6	CI006	配列番号 267	nifA	N/A	N/A
PBC6.1, 6, CI6	CI006	配列番号 268	glnE	N/A	N/A
PBC6.1, 6, CI6	CI006	配列番号 269	16S-3	CI006 ゲノムにおける 3 つの固有の 16S rDNA 遺伝子のうちの 3 つ目	N/A

10

20

30

40

50

【表 3 2 - 2 1】

菌株	菌株 ID	配列番号	遺伝子型	説明	該当する場合、関連する新規ジャンクション
PBC6.1, 6, CI6	CI006	配列番号 270	nifD1	CI006 ゲノムにおける nifD として注釈される 2 つの固有の遺伝子のうちの 1 つ目	N/A
PBC6.1, 6, CI6	CI006	配列番号 271	nifK1	CI006 ゲノムにおける nifK として注釈される 2 つの固有の遺伝子のうちの 1 つ目	N/A
PBC6.1, 6, CI6	CI006	配列番号 272	amtB	N/A	N/A
PBC6.1, 6, CI6	CI006	配列番号 273	Prm1	348bp は、lpp 遺伝子の ATG 開始コドンのすぐ上流の 319bp 及び lpp 遺伝子の最初の 29bp を含む	N/A
PBC6.1, 6, CI6	CI006	配列番号 274	Prm5	ompX 遺伝子の ATG 開始コドンの 432bp 上流で始まり、ompX 遺伝子の ATG 開始コドンの 119bp 上流で終わる 313bp	N/A
19, CI19	CI019	配列番号 275	nifL	N/A	N/A
19, CI19	CI019	配列番号 276	nifA	N/A	N/A
19, CI19	CI019	配列番号 277	16S-1	CI019 ゲノムにおける 7 つの固有の 16S rDNA 遺伝子のうちの 1 つ目	N/A
19, CI19	CI019	配列番号 278	16S-2	CI019 ゲノムにおける 7 つの固有の 16S rDNA 遺伝子のうちの 2 つ目	N/A
19, CI19	CI019	配列番号 279	16S-3	CI019 ゲノムにおける 7 つの固有の 16S rDNA 遺伝子のうちの 3 つ目	N/A
19, CI19	CI019	配列番号 280	16S-4	CI019 ゲノムにおける 7 つの固有の 16S rDNA 遺伝子のうちの 4 つ目	N/A
19, CI19	CI019	配列番号 281	16S-5	CI019 ゲノムにおける 7 つの固有の 16S rDNA 遺伝子のうちの 5 つ目	N/A
19, CI19	CI019	配列番号 282	16S-6	CI019 ゲノムにおける 7 つの固有の 16S rDNA 遺伝子のうちの 6 つ目	N/A
19, CI19	CI019	配列番号 283	16S-7	CI019 ゲノムにおける 7 つの固有の 16S rDNA 遺伝子のうちの 7 つ目	N/A

10

20

30

40

50

【表 3 2 - 2 2】

菌株	菌株 ID	配列番号	遺伝子型	説明	該当する場合、関連する新規ジャンクション
19, CI19	CI019	配列番号 284	nifH1	CI019 ゲノムにおける nifH として注釈される 2 つの固有の遺伝子のうちの 1 つ目	N/A
19, CI19	CI019	配列番号 285	nifH2	CI019 ゲノムにおける nifH として注釈される 2 つの固有の遺伝子のうちの 2 つ目	N/A
19, CI19	CI019	配列番号 286	nifD1	CI019 ゲノムにおける nifD として注釈される 2 つの固有の遺伝子のうちの 1 つ目	N/A
19, CI19	CI019	配列番号 287	nifD2	CI019 ゲノムにおける nifD として注釈される 2 つの固有の遺伝子のうちの 2 つ目	N/A
19, CI19	CI019	配列番号 288	nifK1	CI019 ゲノムにおける nifK として注釈される 2 つの固有の遺伝子のうちの 1 つ目	N/A
19, CI19	CI019	配列番号 289	nifK2	CI019 ゲノムにおける nifK として注釈される 2 つの固有の遺伝子のうちの 2 つ目	N/A
19, CI19	CI019	配列番号 290	glnE	N/A	N/A
19, CI19	CI019	配列番号 291	Prm4	dscC2 遺伝子の ATG のすぐ上流にある 449bp	N/A
19, CI19	CI019	配列番号 292	Prm1.2	infC 遺伝子の TTG 開始コードンのすぐ上流の 500bp	N/A
19, CI19	CI019	配列番号 293	Prm3.1	rplN 遺伝子の ATG 開始コードンのすぐ上流の 170bp	N/A
19, CI20	CI020	配列番号 294	Prm6.1	高発現している仮想タンパク質(CI019 アセンブリ 82 において PROKKA_00662 として注釈される)の ATG のすぐ上流の 142bp	N/A
19, CI21	CI021	配列番号 295	Prm7.1	lpp 遺伝子の ATG のすぐ上流にある 293bp	N/A
19-375, 19-417, CM067	CM67	配列番号 296	glnEΔAR-2	ATG 開始コードンのすぐ下流の 1650bp が欠失していることにより、アデニル除去 (AR) ドメインが欠如した短縮型 glnE タンパク質をもたらす glnE 遺伝子	ds34

10

20

30

40

50

【表 3 2 - 2 3】

菌株	菌株 ID	配列番号	遺伝子型	説明	該当する場合、関連する新規ジャンクション
19-375, 19-417, CM067	CM67	配列番号 297	隣接 500bp を 含む glnEΔAR -2	ATG 開始コドンのすぐ下流の 1650bp が欠失していることにより、アデニル除去 (AR) ドメインが欠如した短縮型 glnE タンパク質をもたらす glnE 遺伝子;glnE 遺伝子に上流及び下流で隣接する 500bp が含まれる	ds34
19-375, 19-417, CM067	CM67	配列番号 298	ΔnifL::nu ll-v1	ATG 開始コドンの A の 221bp 後から開始して、nifL の 845bp が欠失し、31bp 配列 「GGAGTCTGAACTCATCC TGCGATGGGGGCTG」と置換されている	無
19-375, 19-417, CM067	CM67	配列番号 299	隣接 500bp を 含む ΔnifL::nu ll-v1	ATG 開始コドンの A の 221bp 後から開始して、nifL の 845bp が欠失し、31bp 配列 「GGAGTCTGAACTCATCC TGCGATGGGGGCTG」と置換されている;nifL 遺伝子に上流及び下流で隣接する 500bp が含まれる	無
19-377, CM069	CM69	配列番号 300	ΔnifL::nu ll-v2	ATG 開始コドンの A の 221bp 後から開始して、nifL の 845bp が欠失し、5bp 配列 「TTAAA」と置換されている	無
19-377, CM069	CM69	配列番号 301	隣接 500bp を 含む ΔnifL::nu ll-v2	ATG 開始コドンの A の 221bp 後から開始して、nifL の 845bp が欠失し、5bp 配列 「TTAAA」と置換されている;nifL 遺伝子に上流及び下流で隣接する 500bp が含まれる	無
19-389, 19-418, CM081	CM81	配列番号 302	ΔnifL::Pr m4	ATG 開始コドンの A の 221bp 後から開始して、nifL の 845bp が欠失し、CI19 Prm4 配列と置換されている	ds70

10

20

30

40

50

【表 3 2 - 2 4】

菌株	菌株 ID	配列番号	遺伝子型	説明	該当する場合、関連する新規ジャンクション
19-389, 19-418, CM081	CM81	配列番号 303	隣接 500bp を 含む Δ nifL::Pr m4	ATG 開始コドンの A の 221bp 後から開始して、nifL の 845bp が欠失し、CI19 Prm4 配列と置換されてい る;nifL 遺伝子に上流及び下 流で隣接する 500bp が含ま れる	ds70
無	137- 3890	配列番号 458	Δ nifL- Prm1.2	ATG 開始コドンの A の 24bp 後から開始して、nifL の 1372bp が欠失し、137 Prm1.2 プロモーター配列と 置換されている	ds843
無	137- 3890	配列番号 459	隣接 500bp を 含む Δ nifL- Prm1.2	ATG 開始コドンの A の 24bp 後から開始して、nifL の 1372bp が欠失し、137 Prm1.2 プロモーター配列と 置換されている;nifL 遺伝子 に上流及び下流で隣接する 500bp が含まれる	ds843
無	137- 3890	配列番号 460	glnE_KO 2	ATG 開始コドンのすぐ下流 の 1290bp が欠失しているこ とにより、アデニル除去 (AR)ドメインが欠如した短 縮型 glnE タンパク質をもた らず glnE 遺伝子	ds809
無	137- 3890	配列番号 461	隣接 500bp を 含む glnE_KO 2	ATG 開始コドンのすぐ下流 の 1290bp が欠失しているこ とにより、アデニル除去 (AR)ドメインが欠如した短 縮型 glnE タンパク質をもた らず glnE 遺伝子;glnE 遺伝 子に上流及び下流で隣接する 500bp が含まれる	ds809
無	137- 3890	配列番号 462	NtrC_D5 4A	GAT コドンを GCT に変化さ せることによって 54 番目の アミノ酸をアスパラギン酸か らアラニンに交換すること による(D から A)、DNA 結合 転写調節因子 NtrC のリン酸 化部位の不活性化。NtrC が リン酸化される能力を無効化 する。	ds2974

10

20

30

40

50

【表 3 2 - 2 5】

菌株	菌株 ID	配列番号	遺伝子型	説明	該当する場合、関連する新規ジャンクション
無	137-3890	配列番号 463	隣接配列を含む NtrC_D54A	GAT コドンを GCT に変化させることによって 54 番目のアミノ酸をアスパラギン酸からアラニンに交換することによる(D から A)、DNA 結合転写調節因子 NtrC のリン酸化部位の不活性化。NtrC がリン酸化される能力を無効化する。NtrCD54A 突然変異に隣接する上流 693bp 及び下流 549bp の NtrC 配列が含まれる。	ds2974
無	137-3896	配列番号 464	Δ nifL::PinfC	nifL 遺伝子の ATG(開始)の 20bp 後から TGA(終止)の 87bp 前までの当該遺伝子の欠失。infC 遺伝子の上流領域からの 500bp の断片(PinfC)を nifA の上流に挿入して、欠失した部分を置換した。	ds799
無	137-3896	配列番号 465	隣接配列を含む Δ nifL::PinfC	nifL 遺伝子の ATG(開始)の 20bp 後から TGA(終止)の 87bp 前までの当該遺伝子の欠失。infC 遺伝子の上流領域からの 500bp の断片(PinfC)を nifA の上流に挿入して、欠失した部分を置換した;nifL 遺伝子に隣接する上流 332bp 及び下流 324bp が含まれる。	ds799
無	137-3896	配列番号 466	glnD_UTase_不活性化	アミノ酸残基 90 及び 91 を GG から DV に、ならびに残基 104 を D から A に突然変異させることによる、二機能性ウリジリルトランスフェラーゼ/ウリジリル除去酵素 glnD のウリジリルトランスフェラーゼ(UT)ドメインの不活性化。	ds2538

10

20

30

40

50

【表 3 2 - 2 6】

菌株	菌株 ID	配列番号	遺伝子型	説明	該当する場合、関連する新規ジャンクション	
無	137-3896	配列番号 467	隣接配列を含む glnD_UTase_不活性化	アミノ酸残基 90 及び 91 を GG から DV に、ならびに残基 104 を D から A に突然変異させることによる、二機能性ウリジリルトランスフェラーゼ/ウリジリル除去酵素 glnD のウリジリルトランスフェラーゼ(UT)ドメインの不活性化;突然変異部位に上流及び下流で隣接する 450bp が含まれる。	ds2538	10
無	137-3896	配列番号 468	NC-nifA_コピー::Prm1.2	137 の非コード領域への nifA 遺伝子のコピーの挿入。このコピーは、cspE 遺伝子上流領域に由来する 400bp プロモーター(Prm1.2)によって駆動されている。	ds2969	20
無	137-3896	配列番号 469	隣接配列を含む NC-nifA_コピー::Prm1.2	137 の非コード領域への nifA 遺伝子のコピーの挿入。このコピーは、cspE 遺伝子上流領域に由来する 400bp プロモーター(Prm1.2)によって駆動されている;挿入部位に上流及び下流で隣接する 2000bp が含まれる。	ds2969	30

【0641】

実施例 7：生態学的側方施肥及び耐候性窒素

トウモロコシ、コムギ、及びイネなどの穀物を持続可能に生産するには、何らかの窒素源を使用する必要がある。栽培者は、植物がさまざまな形態で使用できる窒素を適用する。家畜の生産が集中する地域では、家畜の厩肥はトウモロコシ作物の窒素需要のかなりの部分を満たすことができる。有機形態の窒素が得られない場合、市販の窒素肥料は、圧力をかけて気体にして液体にしたもの(NH₃)、硝酸アンモニウムまたは尿素などの乾燥製剤、または尿素と硝酸アンモニウムの組み合わせ(UAN)などの液体製剤がある。

40

【0642】

窒素がトウモロコシに適用される時点は、いくつかの要因に依存する。その第一は、地方または州の規制であり得る。栽培者が窒素の適用を選択するときの影響を与える可能性のある他の要因としては、作付計画、春の天候、及び植栽条件、及び操作のサイズに関する不確実性による、秋(多くの地域では依然として一般的な施用時期)の圃場作業の状況が挙げられる。

【0643】

前の作物が取り除かれた後、栽培者は秋に窒素を施用し得る。この施用タイミングは一般的であるが、秋に適用できるポンド数または秋の施用を完全に制限しようとしている規制当局により批判されている。秋の施用が行われない場合、栽培者は通常、トウモロコシ

50

作物を植栽する前、作物の出現後、またはその2つの組み合わせで窒素を施用し、これは分割施用と呼ぶ。

【0644】

前述の窒素送達管理体制のいずれにおいても、通常V4～V6段階で発生する窒素の2回目の施用は、側方施肥と呼ばれる。窒素の側方施肥は、多くの場合、条の間に施用される。

【0645】

窒素分子が土壌に入ると不安定になるため、トウモロコシ作物が窒素を必要とする時期に近い時期に栽培者が窒素を適用できれば、作物だけでなく環境にも大きなメリットがあることが研究によって示されている。窒素使用効率が向上することは、1ブッシェルを生産するのに必要な窒素のポンド数が少なくなる。

10

【0646】

側方施肥にはリスクがないわけではない。栽培者の全てのエーカーをタイムリーに通過する能力は保証されていない。これらのリスクは、作業の規模が大きくなるにつれて、そして気候の潜在的な変化によりフィールドワークに適した日数が予測しにくくなるにつれて大きくなる。

【0647】

マメ科植物（主にダイズ）に市販の肥料を使用する代わりに、自然界に存在する生物学的窒素固定（BNF）システムがある。これらのシステムは3つのタイプのいずれかに分類され、基質の使用及び効率が異なる。図26を参照のこと。

20

【0648】

作物の窒素需要の大部分が植物との共生関係を通じて満たされる例は、ダイズまたはアルファルファがある。それらは、作物の窒素需要を満たすのにほぼ十分な分子窒素（ N_2 ）を変換することができる。ダイズの場合、多くの農業従事者が植栽時に *Rhizobium* を使用するが、一部の *Rhizobium* は、ほとんどの土壌に遍在しており、その集団は毎年土壌中で生存することができる。

【0649】

トウモロコシ、イネ、またはコムギなどの穀類において、根の結合によって N_2 を NH_3 に変換することができる微生物を産生する能力は、大豆のBNFに相当する画期的なものとなる。どちらの慣行でも、季節に応じて成長中の植物に適時に窒素を供給することができるため、側方施肥の代わりにもなり得る。穀物用のBNFにより、栽培者は側方施肥に関連するリスクを減らすこともできる。これらのリスクには、時を誤った施用による収穫高の減少、窒素の季節中コストのばらつき、施用コスト、及び環境条件が脱窒または浸出による損失を助長する年における可給態窒素の一貫性が含まれる。穀物用のBNFは、使い勝手がよく、かつ特定の窒素用途の圃場での通過を減らすことで価値を生み出す。

30

【0650】

以下の表Bから分かるように、秋と春の窒素施用戦略では常に側方施肥を使用する。分割施用は、側方施肥も特徴とする。技術的には、側方施肥はエネルギーを多消費する機械的なプロセスであり、土壌を圧縮するトラクターによって施用される。多くの場合、V4～V6段階では、側方施肥として追加の窒素が施用される。

40

【0651】

開示されたりモデリングされた窒素固定細菌は、これらの細菌が植物の根系と密接に関連して生存し、植物に窒素を「スプーンフィード」するので、側方施肥の慣行を無くすことができる。

【表 B】

表 B. 現在の窒素施用タイミング慣行と提案された微生物導入慣行の比較

窒素施用タイミング慣行	提案された微生物導入慣行	以前の窒素施用タイミングに対する提案された微生物導入の利点
秋の施用－作物ニーズの 100%	植栽時に、種子処理または畝間施用のいずれかで	秋に施用されるレートを引き下げる可能性 春の気象条件が窒素の損失を助長する場合、作物に補助的な施用をする必要はない 窒素損失の条件が圃場の他の部分よりも高い土壌タイプで補助窒素が利用できるため、地理的に一貫した収穫高が得られる
早春の施用－作物ニーズの 100%	植栽時に、種子処理として、または畝間施用のいずれかで	気象条件が施用後の窒素の損失を助長する場合、作物に補助的な施用をする必要はない 窒素損失の条件が圃場の他の部分よりも高い土壌タイプで補助窒素が利用できるため、地理的に一貫した収穫高が得られる
計画された分割施用 150 ポンド、続いて 30 ポンド	植栽時に、種子処理として、または畝間施用のいずれかで	2 回目の施用の必要性を低減 分割施用が全てのエーカーに適用されることを保証 収穫高の減少を防ぐためにタイムリーに施用することを保証 根の剪定による作物への損傷を防ぐためにタイムリーに施用することを保証 窒素損失の条件が圃場の他の部分よりも高い土壌タイプで補助窒素が利用できるため、地理的に一貫した収穫高が得られる

10

20

【0652】

したがって、表 B に見られるように、本開示では、大気中の窒素を固定し、トウモロコシの成長サイクルを通じてトウモロコシ植物に窒素を供給することができる、非属間リモデリング細菌で構成される「生態学的側方施肥」を農業従事者が利用できるようにすることによって、従来の合成肥料による側方施肥に代わる手段を提供する。

30

【0653】

実施例 8：時間的及び空間的に標的化された動的窒素送達のためのリモデリング微生物システム

本開示の微生物は、トウモロコシのライフサイクルの生理学的に適切な期間に、トウモロコシにコロニー形成し、固定窒素をトウモロコシに供給することができる非属間リモデリング微生物を開発するために、以下の機能の 1 つ以上で導入操作される。

【0654】

これらの遺伝子改変は、いくつかの態様において、とりわけ、実施例 2～6 において以前に議論されてきた。それについては、ここで、後述する誘導型微生物リモデリング (GMR) キャンペーンの構成要素を提供するために、再度説明する。

40

【0655】

機能：ニトロゲナーゼ発現 - *nifA* の上流での *nifL* 欠失とプロモーター挿入。

【0656】

NifA は、微生物が利用できる固定窒素が不十分な場合に、*nif* 遺伝子複合体を活性化し、窒素固定を促進する。微生物が利用できる十分な固定 N がある場合、*NifL* は *NifA* を阻害する。*nifL* 及び *nifA* 遺伝子はオペロンに存在し、*nifL* の上流にある同じプロモーターによって促進され、このプロモーターは、窒素不足の状態では活性

50

化され、窒素十分の状態では抑制される（図1、Dixon and Kahn 2004）。この機能において、*nifL*コード配列のほとんどを削除し、それを窒素豊富条件下で高度に発現することが観察された野生型株のゲノムの他の場所に自然に存在する構成的プロモーターで置き換えた。これにより、*NifA*は、施肥圃場などの窒素豊富条件下で発現し、活性化することができる。

【0657】

機能：ニトロゲナーゼ発現 - シグマ因子 σ^{54} の可用性を高めるための *rpoN* 遺伝子のプロモーター交換

【0658】

シグマ因子は原核生物遺伝子の転写の開始に必要であり、特定のシグマ因子が共通の調節ネットワーク内の一連の遺伝子の転写を開始する場合がある。遺伝子 *rpoN* によってコードされるシグマ σ^{54} (σ^{54}) は、*nif* クラスター及び窒素同化遺伝子など、窒素代謝に関与する多くの遺伝子の転写を担う (Klipp et al. 2005, *Genetics and Regulation of Nitrogen Fixation in Free-Living Bacteria*, Kluwer Academic Publishers (Vol. 2). doi.org/10.1007/1-4020-2179-8)。*nifA* が窒素充足条件下で活性化する強力なプロモーターによって制御されている菌株では、*nif* 遺伝子の転写を開始するための σ^{54} の利用が制限される可能性がある。この機能では、*rpoN* 遺伝子のプロモーターは、遺伝子のすぐ上流の遺伝子間配列を欠失することによって破壊されている。欠失した配列は、野生型菌株のゲノムの他の場所に自然に存在する別のプロモーターによって置き換えられ、これは、窒素豊富条件下で高度に発現していることが観察されている。これにより、 σ^{54} の発現が増加し、*nifA* を高度に発現する菌株での転写開始の制限が緩和される。

【0659】

機能：窒素同化 - *GlnE* のアデニリル除去ドメインの欠失

【0660】

固定窒素は、主にグルタミンシンターゼ/グルタミンオキシグルタレートアミノトランスフェラーゼ (*GS-GOGAT*) 経路によって微生物によって同化される。結果として生じる細胞内のグルタミン及びグルタミン酸プールは窒素代謝を制御し、グルタミン酸は生合成の主要な窒素プールとして機能し、グルタミンは窒素状態のシグナル伝達分子として機能する。*GlnE* 遺伝子は、グルタミンの細胞内レベルにตอบสนองして、グルタミンシンターゼ (*GS*) の活性を調節する、グルタミンシンターゼアデニリルトランスフェラーゼまたはグルタミン-アンモニア-リガーゼアデニリルトランスフェラーゼとして知られる酵素をコードする。*GlnE* タンパク質は、独立した別個の酵素活性を持つ2つのドメインで構成される：アデニリルトランスフェラーゼ (*ATase*) ドメインは、*GS* タンパク質をアデニリル基で共有結合的に修飾し、*GS* 活性を低下させ；アデニリル除去 (*AR*) ドメインは、*GS* からアデニリル基を除去し、その活性を高める。Clancy et al. (2007) は、*AR* ドメインを除去するための *Escherichia coli* K12 *GlnE* タンパク質の切断が、*ATase* 活性を保持するタンパク質の発現につながることを示した。この機能では、*GlnE* のN末端 *AR* ドメインを欠失し、その結果、*AR* 活性を欠く菌株になったが、*ATase* ドメインを機能的に発現する。これにより、活性が弱められた構成的にアデニル化された *GS* が生じ、アンモニアの同化の抑制及び細胞外へのアンモニアの排出が生じる。

【0661】

機能：窒素同化 - *GS* をコードする遺伝子の転写及び/または翻訳速度の低下

【0662】

GS 酵素をコードする *GlnA* 遺伝子は、窒素枯渇下で活性化され、窒素充満条件下で抑制されるプロモーターによって制御される (Van Heeswijk et al. 2013)。この機能では、細胞内の *GS* 酵素の量が2つの方法の少なくとも1つ（または次の2つの方法を1つの細胞に組み合わせて）において減少した。まず、グルタミンシ

ンテターゼ (GS) をコードする *glnA* 遺伝子の ATG 開始コドンの「A」を「G」に変更した。残りの *glnA* 遺伝子と GS タンパク質配列は変更されないままである。結果として生じる GTG 開始コドンは、*glnA* 転写物の翻訳開始速度の低下をもたらし、GS の細胞内レベルの低下をもたらすと仮定されている。第二に、*glnA* 遺伝子の上流のプロモーターは、遺伝子のすぐ上流の遺伝子間配列を欠失することによって破壊されている。欠失配列は、*glnD*、*glnE*、または *glnB* 遺伝子のプロモーターに置き換えられ、これらは、窒素の状態に関係なく、非常に低いレベルで構成的に発現される (Van Heeswijk et al 2013)。これにより、*glnA* 転写レベルが低下し、細胞内の GS レベルが低下する。前述のように、前の 2 つのシナリオ (開始コドンの変更とプロモーターの破壊) を組み合わせて宿主に入れることができる。細胞内の GS 活性の低下は、窒素固定によって生成されたアンモニウムの細菌同化の低下につながり、細菌細胞外へのアンモニウムの排出をもたらし、窒素を植物の取り込みに利用しやすくする (Ortiz-Marquez, J. C. F., Do Nascimento, M., & Curatti, L. (2014) "Metabolic engineering of ammonium release for nitrogen-fixing multispecies microbial cell-factories," *Metabolic Engineering*, 23, 1-11. doi.org/10.1016/j.ymben.2014.03.002)。

【0663】

機能：窒素同化 - グルタミナーゼ活性を増加させるための *glsA2* 遺伝子のプロモーター交換 20

【0664】

グルタミナーゼ酵素は、グルタミンからのアンモニウムの放出を触媒し、細胞内グルタミンプールの制御に重要な役割を果たす可能性がある (Van Heeswijk et al. 2012)。この機能では、グルタミナーゼをコードする *glsA2* 遺伝子は、該遺伝子のすぐ上流の配列を欠失し、それを窒素充満条件下で高度に発現するゲノムの他の場所に自然に存在する別のプロモーターと置き換えることでアップレギュレートされる。これにより、細胞内でのグルタミナーゼ酵素の発現が増加し、グルタミンプールからのアンモニウムの放出が起こり、細胞からのアンモニウムの排出が増加する。

【0665】

機能：アンモニウム排出 - *amtB* 欠失 30

【0666】

amtB 遺伝子は、細胞外空間から細胞内部にアンモニウムを取り込むように機能する輸送タンパク質をコードする。窒素固定細菌では、*AmtB* タンパク質が機能して、窒素固定中に細胞外に受動的に流出するアンモニウムが細胞内に戻されるようにし、固定窒素の損失を防ぐようにする機能を持つ (Zhang et al. 2012)。この機能では、*amtB* コード配列が欠失されているため、細胞外へのアンモニウムの正味の流出をもたらし、したがってアンモニウム排出が増加する (Barney et al. 2015)。*amtB* プロモーターは無傷のまま残されている。

【0667】

機能：堅牢性とコロニー形成 - バクテリアセルロース生産を増加させるための *bcsI* I 及び *bcsI* II I オペロンのプロモーター交換 40

【0668】

細菌性セルロースの生合成は、根への付着と根表面でのバイオフィーム形成の両方にとって重要な要素である (Rodriguez-Navarro et al. 2007)。*bcsI* II 及び *bcsI* III オペロンは、それぞれ、細菌性セルロース生合成に関与する一連の遺伝子をコードする (Jiet al. 2016)。この機能では、*bcsI* II オペロンのネイティブプロモーターは、オペロンの最初の遺伝子上流にある遺伝子間領域を欠失し、それを窒素充満条件下で高度に発現することが観察されている野生型菌株のゲノムの他の場所に自然に存在する別のプロモーターと置き換えることで破壊した。これ 50

により、施肥圃場環境での *bcsII* オペロンの発現が増加し、細菌性セルロースの生産が増加し、トウモロコシの根に付着する。

【0669】

機能：ポリガラクトウロナーゼ産生を増加させるための *pehA* オペロンのプロモーター交換

【0670】

ポリガラクトウロナーゼは、根粒形成性のない細菌による植物の根のコロニー形成の重要な要因として関係している (Compant, S., Clement, C., & Sessitsch, A. (2010), "Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: Their role, colonization, mechanism involved and prospects for utilization," *Soil Biology and Biochemistry*, 42(5), 669-678. doi.org/10.1016/j.soilbio.2009.11.024.)

10

【0671】

pehA 遺伝子は、2つの特徴のないタンパク質コード領域を持つオペロンのポリガラクトウロナーゼをコードし、*pehA* はオペロンの下流端にある。この機能では、*pehA* オペロンのプロモーターは、オペロンの第1の遺伝子のすぐ上流の配列を欠失することによって破壊されている。欠失した配列は、野生型菌株のゲノムの他の場所に自然に存在する別のプロモーターによって置き換えられ、これは、窒素豊富条件で高度に発現していることが観察されている。これにより、施肥圃場環境での *PeH A* ポリガラクトウロナーゼタンパク質の発現が増加し、微生物によるトウモロコシの根のコロニー形成が促進される。

20

【0672】

機能：堅牢性とコロニー形成 - アドヘシンの発現を増加させるための *fhaB* 遺伝子のプロモーター交換

【0673】

凝集素などの細菌表面アドヘシンは、植物の根での付着、コロニー、及びバイオフィーム形成に関係している (Danhorn, T., & Fuqua, C. (2007), "Biofilm formation by plant-associated bacteria. *Annual Review of Microbiology*, 61, 401-422. doi.org/10.1146/annurev.micro.61.080706.093316)。

30

【0674】

fhaB 遺伝子は糸状赤血球凝集素タンパク質をコードする。この機能では、*fhaB* 遺伝子のプロモーターは、遺伝子のすぐ上流の遺伝子間配列を欠失することによって破壊されている。欠失した配列は、野生型株のゲノムの他の場所に自然に存在する別のプロモーターによって置き換えられ、これは、窒素豊富条件で高度に発現していることが観察されている。これにより、ヘマグルチニンタンパク質の発現が増加し、根の付着とコロニー形成が増加する。

40

【0675】

機能：堅牢性とコロニー形成 - 有機酸トランスポーターの発現を増加させるための *dctA* 遺伝子のプロモーター交換

【0676】

根圏のコロニー形成を成功させるためには、細菌は有機酸などの根の浸出液に含まれる炭素源を利用する能力を備えている必要がある。遺伝子 *dctA* は、根圏細菌の効果的なコロニー形成に必要であり、外因性窒素に応答して抑制されることが示されている有機酸トランスポーターをコードする (Nam, H. S., Anderson, A. J., Yang, K. Y., Cho, B. H., & Kim, Y. C. (2006), "The *dct*

50

t A gene of *Pseudomonas chlororaphis* O6 is under RpoN control and is required for effective root colonization and induction of systemic resistance, "FEMS Microbiology Letters, 256 (1), 98-104. doi.org/10.1111/j.1574-6968.2006.00092.x)。この機能では、dctA 遺伝子のプロモーターは、遺伝子のすぐ上流の遺伝子間配列を欠失することによって破壊されている。欠失した配列は、野生型菌株のゲノムの他の場所に自然に存在する別のプロモーターによって置き換えられ、これは、窒素豊富条件で根圏において高度に発現していることが観察されている。これにより、DctA トランスポーターの発現が増加し、根の浸出炭素の利用が促進され、施肥圃場条件での堅牢性が向上する。 10

【0677】

機能：堅牢性とコロニー形成 - バイオフィーム形成を促進するための PhoB 遺伝子のプロモーター交換

【0678】

根圏細菌では、PhoR - PhoB 2成分系がリン制限への応答を仲介し、植物の根でのコロニー及びバイオフィーム形成に関連している (Danhorn and Fuqua 2007)。この機能では、phoB 1 遺伝子のプロモーターは、遺伝子のすぐ上流の遺伝子間配列を欠失することによって破壊されている。欠失した配列は、野生型菌株のゲノムの他の場所に自然に存在する別のプロモーターによって置き換えられ、これは、窒素豊富条件で根圏において高度に発現していることが観察されている。これにより、PhoR - PhoB システムの PhoB コンポーネントの発現が増加し、根でのコロニー及びバイオフィーム形成が促進される。 20

【0679】

機能：相関する代謝及び調節ネットワーク - ストレス応答に影響を与えるように窒素シグナル伝達を変更する

【0680】

GlnD は、細胞内の中心的な窒素感知酵素である。GlnD タンパク質は、ウリジリルトランスフェラーゼ (UTase) ドメイン、及び (UR) ウリジリル除去ドメイン、及びグルタミン結合 ACT ドメインの 3つのドメインで構成される。窒素過剰状態では、細胞内グルタミンが GlnD の ACT ドメインに結合し、UTase ドメインが PII タンパク質 GlnB 及び GlnK をウリジル化して、窒素固定及び同化に関する遺伝子をアップレギュレートする調節カスケードを引き起こす。窒素飢餓状態では、グルタミンは GlnD の ACT ドメインに結合するために利用できず、これにより、UR ドメインは GlnK 及び GlnB を脱ウリジル化し、窒素同化及び抑制に関する遺伝子の抑制を引き起こす。これらの PII 調節カスケードは、窒素飢餓ストレス応答、窒素同化、及びジアゾトロフにおける窒素固定など、いくつかの経路を調節する (Dixon and Kahn 2004; van Heeswijk et al., 2013)。この機能では、ストレス応答を引き起こす窒素飢餓シグナルの伝達を変更するために、UTase ドメイン、UR ドメイン、ACT ドメイン、または GlnD タンパク質をコードする遺伝子全体のいずれかが変更される。 30 40

【0681】

機能：相関する代謝及び調節ネットワーク - glgA グリコーゲンシンターゼ遺伝子の欠失

【0682】

窒素固定は非常にエネルギー多消費プロセスであるため、細胞内の ATP の利用可能性によって制限されると考えられる。したがって、炭素をエネルギー貯蔵経路から酸化リン酸化に向けることで、ジアゾトロフの窒素固定を強化できるとの仮説が立てられている (Glick 2012)。ある研究では、グリコーゲンシンターゼをコードする glgA 遺伝子の欠失が、マメ科植物と根粒菌の共生における窒素固定の強化につながることが示 50

唆された (Marroqui et al. 2001)。この機能では、グリコーゲン合成を廃止するために、glgA遺伝子全体が欠失されている。glgA遺伝子の欠失は、窒素飢餓状態と窒素充満状態の両方における窒素固定のレベルの増加につながる。

【0683】

遺伝的機能を利用したGMRキャンペーン

【0684】

本開示の微生物は、前述の機能の1つ以上を含むように導入操作されている。GMRキャンペーンの全体的な目標は、成長期全体を通してトウモロコシ植物に必要な全ての窒素を供給することができる微生物を開発することである。図27では、本発明者らは、窒素固定微生物が、トウモロコシ植物に成長期全体にわたる窒素必要量をすべて供給し、合成肥料に完全に取って代わるためには、微生物は(全体で)1エーカー当たり約200ポンドの窒素を生成する必要があると算出した。また、図27は、菌株PBC 137-1036(すなわち、リモデリングされた*Klebsiella variicola*)が1エーカー当たり約20ポンドの窒素を供給することを示す。

10

【0685】

本出願では、仮出願の図28が更新されている。具体的には、本出願の図28Aは、仮出願の図28と同一であり、本出願の図28Bは、*Klebsiella variicola*の、さらにリモデリングされた菌株であるPBC 137-3890によって生成された窒素を示す新しいものである。図28Aは、肥料が本開示のリモデリングされた微生物によって置き換えられ得るシナリオを提供する。図27で前述したように、大きな破線はトウモロコシが必要とする窒素(1エーカー当たり約200ポンド)である。実線は、すでに説明したように、リモデリングされた137-1036菌株によって供給できる現在の窒素量である(1エーカー当たり約20ポンド)。図28Aの灰色の網掛けの楕円形の「A」シナリオでは、本発明者らは、137-1036菌株の活性を5倍に高めることを期待している(そのようなことを達成するためのGMRキャンペーン戦略については、図29を参照)。図28Aの灰色の網掛けの楕円形の「B」シナリオにおいて、本発明者らは、137-1036菌株のものと相補的であり、成長サイクルの後の段階で植物に窒素を供給する特定のコロニー形成プロファイルを有するリモデリングされた微生物を利用することを期待する。仮出願の提出以来、発明者らは、GMRキャンペーンを通じて137-1036菌株の窒素産生活性を改善することに成功している。具体的には、図28Bは、出願に記載されたGMRキャンペーンを使用することによって得られた137-1036のさらにリモデリングされた菌株である、菌株137-3890による窒素産生を示す。図28Bに示されるように、137-3890の窒素産生活性は、137-1036と比較して実質的に改善される。

20

30

【0686】

本出願では、仮出願の図29が更新されている。具体的には、本出願の図29Aは、仮出願の図29と同一であり、本出願の図29Bは、仮出願の提出以来に機能F2及びF3がPBC137(*Klebsiella variicola*)に組み込まれた後の生成された予測されたNを示す新しいものである。

【0687】

図29Aの左パネルでは、議論された機能(すなわち、非属間遺伝子改変)が、実施例2でも議論されたPBC6.1(*Kosakonia sacchari*)の従来のGMRキャンペーンに関して示されている。図29Aの左パネルに見られるように、生成された予測されたN(1エーカーあたりのNのポンド)は、微生物菌株に導入操作された追加の機能ごとに増加した。

40

【0688】

図29Aの左パネルに示したPBC6.1の従来のGMRキャンペーンに加えて、図29Aの右パネルのPBC137(*Klebsiella variicola*)に対してもGMRキャンペーンが実施されていることがわかる。仮出願が提出された時点で、ニトロゲナーゼ発現機能(F1)が宿主菌株に導入操作され、機能2~6が実行された。生成

50

されたN（エーカーあたりのNのポンド）に対するこれらの機能のそれぞれの予想される寄与は、仮出願の図29（右パネル）、ここでは図29Aの破線の棒グラフによって仮出願において示された。これらの予想は、仮出願の図29の左側のパネルに示されるPBC6.1の従来のGMRキャンペーンからのデータによって知らされた。図28Aの灰色の網掛けの楕円形の「A」に見られるように、PBC137でGMRキャンペーンが完了すると、非属間リモデリング菌株（全体として、1エーカー内の全ての微生物/コロニー形成植物を考慮する）は、植物の初期成長サイクルを通じて、トウモロコシ植物に必要な窒素のほぼすべてを供給できると予想される。さらに、仮出願の図30、ここでは図30Aは、同じ期待を示し、仮出願が提出された時点で窒素生産の期待される利益を該当する機能セットにマッピングした。仮出願の提出以来、本発明者らは、宿主菌株への機能F2～F6の導入操作に取り組んできた。本出願を提出する時点で、機能F2（窒素同化）及びF3（アンモニウム排出）は、PBC137宿主菌株に導入操作されている。図29Bの右パネルは、機能F1～F3の組み込み時にリモデリングされた菌株によって生成されたNを示す。図29Bの右側パネルからわかるように、生成されたN（1エーカーあたりのNのポンド）は、微生物菌株に導入操作された追加の機能ごとに増加した。図30Bは、F1（ニトロゲナーゼ発現）、F2（窒素同化）、及びF3（アンモニウム排出）の機能を組み込んだ場合の、PBC137のリモデリング菌株による1時間当たりのN生成量をmmolのN/CFUとして表したものである。

10

【0689】

機能F1～F3を組み込むためにPBC137 WT菌株に加えられた突然変異は、以下の表33に要約されている。

20

30

40

50

【表 3 3】

表 3 3. 単離及び誘導体 P B C 1 3 7 菌株のリスト

菌株 ID	遺伝子型	突然変異	突然変異の説明
137	WT	WT	野生型 <i>Klebsiella variicola</i> 菌株
137-1036	$\Delta nifL::PinfC$	$\Delta nifL::PinfC$	nifL 遺伝子の ATG(開始)の 20bp 後から TGA(終止)の 87bp 前までの当該遺伝子の欠失。infC 遺伝子のプロモーターを含む infC 遺伝子の上流領域の 500bp の断片を nifA の上流に挿入し(PinfC)、欠失部分を置き換えた。
137-3896	$\Delta nifL::PinfC$, $\Delta glnD_UTase_$ 不活性化、 NC_nifA_copy: :Prm1.2	$\Delta nifL::PinfC$	nifL 遺伝子の ATG(開始)の 20bp 後から TGA(終止)の 87bp 前までの当該遺伝子の欠失。infC 遺伝子のプロモーターを含む infC 遺伝子の上流領域の 500bp の断片を nifA の上流に挿入し(PinfC)、欠失部分を置き換えた。
		$\Delta glnD_UTase_$ Deactivation	アミノ酸残基 90 及び 91 を GG から DV に、ならびに残基 104 を D から A に突然変異させることによる、二機能性ウリジリルトランスフェラーゼ/ウリジリル除去酵素 glnD のウリジリルトランスフェラーゼ(UT)ドメインの不活性化。
		NC-nifA_copy::Prm1.2	137 の非コード領域への nifA 遺伝子のコピーの挿入。このコピーは、cspE 遺伝子の上流領域に由来する 400bp プロモーター(Prm1.2)によって促進されている。
137-3890	$\Delta nifL::Prm1.2$, $\Delta glnE_{AR-KO2}$, NtrC_D54A	$\Delta nifL::Prm1.2$	nifL 遺伝子の ATG(開始)の 20bp 後から TGA(終止)の 87bp 前までの当該遺伝子の欠失。cspE 遺伝子のプロモーターを含む cspE 遺伝子の上流領域の 400bp の断片を nifA の上流に挿入し(Prm1.2)、欠失部分を置き換えた。
		$\Delta glnE_{AR-KO2}$	glnE 遺伝子の開始コドン後の 1647bp の欠失。
		NtrC_D54A	54 番目のアミノ酸をアスパラギン酸からアラニンに交換することによる(D から A)、DNA 結合転写調節因子 NtrC のリン酸化部位の不活性化。NtrC がリン酸化される能力を無効化する。

10

20

30

40

【0690】

ケース I : 137 - 1036 菌株から 17 ポンドの N を提供する現在の Gen 1 微生物

【0691】

図 3 1 は、すでに説明済である、137 - 1036 の非属間リモデリング微生物の、コロニー形成日数 1 ~ 130 日目及び 1 エーカー当たりの総 CFU を表したものである。前述のように、この微生物は、1 エーカー当たり約 20 ポンドの窒素(全体で)を生成する(17 ポンド)。リモデリングされた 137 - 1036 微生物は以下の活性を有する: 1 時間当たり $5.49E - 13$ mmol の N / CFU または 1 日当たり $4.07E - 16$ ポンドの N / CFU。

50

【0692】

ケースII：活性が5倍に改善された後の現在のGen1微生物菌株137-1036は、N必要量の最初の半分を提供する

【0693】

図32は、提案された非属間リモデリング微生物(137-1036の子孫、提案された遺伝子改変の機能については図29及び図30を参照)の、コロニー形成日数1~130日及び1エーカー当たりの総CFUを表したものである。前述のように、この微生物は、1エーカー当たり約100ポンドの窒素(全体で)を生成すると予想される(シナリオ「A」)。リモデリングされた137-1036子孫微生物は以下の活性を有することを目指す：1時間当たり 2.75×10^{-12} mmolのN/CFUまたは1日当たり 2.03×10^{-15} ポンドのN/CFU。上記のように、仮出願の提出以来、機能F2及びF3が組み込まれており、機能F1-F3を備えたリモデリング菌株137-3890の活性は1時間当たり 4.03×10^{-13} mmolのN/CFUである。

【0694】

ケースIII：5倍の活性が改善された後期コロニー形成を伴う微生物

【0695】

図33は、137-1036微生物に対して相補的なコロニー形成プロファイルを有する提案された非属間リモデリング微生物の、コロニー形成日数1~130日及び1エーカー当たりの総CFUを表したものである。前述のように、この微生物は、1エーカー当たり約100ポンドの窒素(全体で)を生成すると予想され(図28のシナリオ「B」)、137-1036微生物が減少し始めるのとほぼ同時にコロニー形成を開始する必要がある。微生物は以下の活性を有することを目指す：1時間当たり 2.75×10^{-12} mmolのN/CFUまたは1日当たり 2.03×10^{-15} ポンドのN/CFU。

【0696】

図34は、上部パネルに137-1036のコロニー形成プロファイルを提供し、下部パネルに後期/相補的コロニー形成ダイナミックを伴う微生物のコロニー形成プロファイルを提供する。

【0697】

ケースIV：ケースIIとIIIの微生物を組み合わせるコンソーシアにするか、描写されたコロニー形成プロファイルと、記載された活性を有する単一の微生物を見つけてリモデリングする。

【0698】

図35は、2つのシナリオを示している：(1)上記のケースII及びケースIIIに示されたコロニー形成プロファイルを有する非属間リモデリング微生物の提案されたコンソーシアの、コロニー形成日数1~130日及び1エーカー当たりの総CFU、または(2)示されたコロニー形成プロファイルを有する、提案された単一の非属間リモデリング微生物の、コロニー形成日数1~130日及び1エーカー当たりの総CFU。微生物(コンソーシア内の2つの微生物または単一の微生物)は以下の活性を有することを目指す：1時間当たり 2.75×10^{-12} mmolのN/CFUまたは1日当たり 2.03×10^{-15} ポンドのN/CFU。

【0699】

実施例9：トウモロコシの根域で異なる空間コロニー形成パターンを持つ微生物を利用したGMRキャンペーン

実施例8で述べたように、本開示は、従来の合成肥料送達の完全な代替物を農業従事者に提供しようとするGMRキャンペーンを提供する。上記の実施例7で説明した「生態学的側方施肥」は、農業従事者が季節内の窒素施用を供給する必要をなくし、穀類作物にBNF製品を供給するという究極の目標に向けた一歩である。

【0700】

微生物を穀類作物のBNF製品として成功させるためにリモデリングするには、微生物がトウモロコシの成長サイクルの生理学的に適切な期間にトウモロコシ植物にコロニーを

形成し、トウモロコシ植物に十分な程度までコロニー形成することが最も重要である。

【0701】

本発明者らは、驚くべきことに、望ましい空間コロニー形成パターンを有する微生物の機能的属を発見し、これにより、このグループの微生物は、GMRキャンペーンに特に有用となる。

【0702】

図36は、本研究で利用された一般的な実験計画を示しており、これは、10週間にわたってトウモロコシからコロニー形成及び転写物試料を収集することを必要とした。これらの試料は、微生物のコロニー形成能力、及び微生物の活性の計算を可能にした。図37及び図38は、実験で利用されるサンプリングスキームの態様の視覚的表現を提供し、これにより、「標準」の種子・節根試料と、より「周辺」の根試料との間のコロニー形成パターンの区別が可能になる。

10

【0703】

図39に見られるように、WT 137 (*Klebsiella variicola*)、019 (*Rahnella aquatilis*)、及び006 (*Kosakonia sacchari*)のいずれも、同様のコロニー形成パターンを有しており、これは、後の週にかけてコロニー形成が減少していることを示す。このパターンは、図形の右側に描かれている各菌株のリモデリング形態に反映される

【0704】

図40は、トウモロコシの根をサンプリングするために利用された実験スキームを示す。プロット：各正方形は時点、Y軸は距離、X軸はノードである。標準試料は、常に成長の最先端部とともに収集した。周辺試料と中間体試料を週ごとに変更したが、一貫性を保つための試みは実施した。

20

【0705】

図41は、図40のサンプリングスキームで取得された全てのデータを利用及び平均化した、実験の全体的な結果を示す。図41から分かるように、菌株137は菌株6または菌株19よりも末梢根で高いコロニー形成を維持する。「標準試料」は、他の根の栽培地の試料と比較した場合、この菌株の最も代表的なものであった。

【0706】

実施例10：リモデリングされた微生物によって可能になる、より高いトウモロコシ植栽密度

30

トウモロコシの収穫高は、主に遺伝的改良と作物管理の改善により、1930年代以降大幅に増加している。穀物収穫高は、エーカー当たりの植物数、植物当たりの穀粒、及び穀粒当たりの重量の積である。穀物の収穫高を構成する3つの要素のうち、エーカー当たりの植物数は、農業従事者が最も直接管理できる要素である。穀粒数と穀粒重量は、適切な肥沃度、雑草、有害生物、及び病気の管理を通じて間接的に管理し、植物の健全性を最適化することができ、また、天候も大きな役割を果たす。現在、米国の平均的なトウモロコシの植栽密度はエーカー当たり32,000植物弱であり、1960年代以降、エーカー当たり年間400植物増加している。

【0707】

しかし、植栽密度が増え続けると、養分を獲得するために利用できる根系が小さくなり、広がりが少なくなる。正しい供給源と速度を使用して適切なタイミングで直接根域に栄養素を配置すると、根がそれらの栄養素を吸収して利用する可能性が高まる。

40

【0708】

播種速度、条間隔、及び生産物配置に関するこの理解を、適切な供給源、適切な速度、適切なタイミング、及び適切な場所を栄養管理に適用するなどの高度な肥沃度管理慣行と統合することは、より高い植栽密度で穀物収穫高と投入効率を最大化するために重要である。

【0709】

本開示の微生物は、微生物が植物（すなわち、根の表面）と密接に関連して生き、植物

50

に容易に使用可能な大気中の固定窒素の一定の供給源を提供するので、より密に植栽されたトウモロコシ作物を可能にする。

【0710】

穀類作物用のBNF源に関する本開示の教示は、圃場の全ての植物が成長期を通して根系に送達される窒素源を備えているため、より密な作付面積を可能にするツールを農業従事者に提供する。このタイプの窒素供給は、季節中の窒素の「側方施肥」適用の必要性を排除するだけでなく、エーカー当たりの植栽密度の増加により、農業従事者がエーカー当たりより高い収穫高を実現することを可能にする。

【0711】

実施例11：リモデリングされた微生物によって可能になったトウモロコシ作物の圃場内のばらつきの減少

本発明者らはさらに、本開示の微生物が、窒素のより一貫した均一な送達を通じて、収穫高の安定性及び予測可能性を改善することができることを決定した。本開示の微生物は、該微生物に曝露されたトウモロコシ作物の圃場内ばらつきを低減することを可能にし、これは、農業従事者の収穫高安定性及び予測可能性の改善への橋渡しとなる。

【0712】

NDVI圃場試験の実験プロトコル

【0713】

NDVI測定は、正規化植生指数の測定を監視するために、トウモロコシの植栽から約1.5ヶ月後に衛星画像で行われた。NDVIは、植生によって反射された可視光と近赤外光から計算される。リモデリングされた微生物137-1036は、トウモロコシ、すなわち、NCMA201712002として寄託され、とりわけ表1に見出され得るリモデリングされた*Klebsiella variicola*を処理するために適用した。

【0714】

圃場実験の結果を示す図42を見ると、健全な植生がそれに当たる可視光の大部分を吸収し、近赤外光の大部分を反射している。健全でないまたはまばらな植生は、より多くの可視光とより少ない近赤外光を反射する。

【0715】

図42に示される2つのプロットにおいて、本開示の微生物(137-1036)は、「ピン」(左パネル)及び「クロスマーカー」右パネルで区切られたフィールドエリアプロットに適用された。処理された領域も正方形の境界線で示されている。両方の場合(図42の左及び右のパネル)、137-1036微生物で処理されていない領域と比較して、処理された領域全体にわたってより一貫したNDVI測定が観察された。

【0716】

未処理の圃場と比較して、本開示のリモデリングされた菌株(137-1036菌株)で処理された圃場の圃場内ばらつきの減少を示す圃場試験のトウモロコシの平均収穫高に関するデータを以下の表36に示す。

【表34】

側方施肥の減少の平均 lbs N/ac	PBM平均 収穫高の 平均	チェックの平均 収穫高(bpa)の 平均	PBM収穫高標 sdの平均	チェック収穫高 (bpa)sdの 平均
35	227.8	228.4	16.5	19.9

【0717】

表34のデータは、未処理圃場(チェック)とProven(137-1036菌株)処理圃場(PBM)を比較した5つの異なる栽培地の平均である。未処理/チェック圃場は、本開示の微生物で処理されておらず、外因性Nが適用された。PBM圃場は、本開示の微生物で処理されたが、側方施肥は適用されなかった。表34に示すように、PBM圃

10

20

30

40

50

場に必要側方施肥は35ポンド少なくなり(最初の列);同時に、PBM圃場と未処理圃場の平均収穫高は類似していた。PBM圃場から得られた平均収穫高の標準偏差は、チェックの標準偏差よりもかなり小さくなっている(16.5対19.9ブッシェル/エーカー(bpa))。PBM処理圃場の標準偏差が小さいことは、図42に示すNDVIデータと一致する対照圃場と比較して、植生がより均一で不均一性が低いことを示す。

【0718】

実施例12: トウモロコシ圃場の困難な土壌タイプにわたる持続可能な窒素生産微生物による窒素送達

本発明者らは、現在開示されている窒素生成微生物の性能を様々な土壌タイプ及び条件にわたって評価する過程で、微生物は一貫してトウモロコシの根にコロニーを形成し、従来のN肥料があまり効果的ではない困難な土壌タイプにおいてさえ、トウモロコシ植物にNを供給したと決定した。本研究では、米国の13州のさまざまな気象条件で47の異なる土壌タイプを評価し、これにより、評価された全ての土壌タイプ及び気象条件で微生物が繁殖していることが明らかとなった。この研究では、砂含有量の多い土壌は、この種のコイルでは栽培者がすぐに窒素を失い得るため、「困難な」または「問題のある」土壌タイプと考えられる一方、砂含有量の少ない土壌は、「典型的」または「問題のない」土壌タイプと考えられた。評価した47種類の土壌の砂含有量(%)を測定し、それらのうちの5つは非常に高い砂含有量を持っていたことが観察された。具体的には、評価された47の土壌タイプのうち5つは、平均砂含有量が約50.90%であり、「困難な」または「問題のある」土壌タイプと見なされ、残りの平均砂含有量が約26.64%の土壌タイプは「典型的」または「問題のない」土壌タイプと考えられた。5つの困難な土壌タイプの個々の砂含有量を表35に示す。

【0719】

栽培者は、通常、大雨、及び/または困難な土壌タイプで窒素を失う。微生物は、大雨にさらされた土壌だけでなく、さまざまな困難な土壌タイプでも強力な性能を示した。

【0720】

リモデリングされた微生物で処理されていない同じ土壌タイプと比較して、本開示のリモデリングされた微生物で処理された困難な土壌タイプのトウモロコシ収穫高の改善を示す圃場試験のデータは、以下の表35に要約される。表35の「ピボット収穫高」の列は、本開示のリモデリングされた菌株で処理された困難な土壌タイプの圃場からの収穫高を示す。困難な土壌タイプでは、化学的窒素肥料のみを使用した同条件の圃場と比較して、リモデリングされた微生物は1エーカーあたり平均約17ブッシェルの優位性をもたらした。困難な土壌タイプと大雨にさらされた土壌での収穫高のこの優れた改善は驚くべきことであり、予想外である、なぜなら、典型的な土壌と気象条件下で、微生物の適用は、微生物なしの圃場に比べて、1エーカーあたり約7.7ブッシェルの優位性があった。

【0721】

現在の微生物を利用することで、化学肥料の必要性が減り、微生物を使用する栽培者に投資収益率がもたらされると同時に、化学肥料の使用に通常伴う複雑さ及びリスクが軽減される。

【0722】

NDVIによって測定された圃場内ばらつきに関連する実施例11に示されているように、実施例12の現在のデータは、広範囲の土壌タイプにわたって改善された性能を示しており、さらに、本明細書で教示される微生物は、収穫高の予測を可能にし、農業従事者の圃場における収穫高の不均一性を低減することができることを示す。

【0723】

通常は低収穫高になりがちなエーカーであっても、農業従事者が栽培面積全体で比較的均一な収穫高増加を実現できる能力は、この技術における飛躍的な第1歩である。今後、農業従事者は、より確実に収穫高を予測し、従来は低収穫高であったエーカーの価値を実感することができるようになる。

10

20

30

40

50

【表 3 5】

圃場id	土壌タイプ名	テクスチャクラス	有機物	陽イオン交換係数	pH	砂(%)	シルト(%)	粘土(%)	飽和水力係数	侵食係数	排水クラス	貯水	Pivot收穫高(bu/acre)	未処理の收穫高(bu/acre)	收穫高の違い
18PB12J1	Kandota 砂質ローム、2~6パーセントの勾配	砂壤土	0.486576	8.91133	6.582414	57.75961	17.0822 7	15.15613	10.00563	0.214759	水はけが良い	24.21	184.6102	171.8642	12.74599
18PB12K1	Nicollet ローム、1~3パーセントの勾配	ローム	1.332813	14.82493	7.404525	43.412	37.5132 5	19.07475	9.077925	0.342763	水はけがやや悪い	28.04	219.4818	207.4651	12.01668
18PB1A1	Hamerly-Tonka-Parnell 複合体、0~3パーセントの勾配	ローム	1.832989	21.28688	7.626457	31.62567	39.3981 3	28.9762	6.175194	0.301595	水はけがやや悪い	24.64	257.7206	229.7333	27.98731
18PB12H1	Fielton-Canisteo ローム	ローム	2.730757	13.67336	7.11	53.23678	21.0803 3	15.68289	28.68618	0.202906	水はけが悪い	21.26	214.953	195.3212	19.63179
18PB1E1	Tracy 砂質ローム、0~2パーセントの勾配	砂質ローム	0.701942	6.156816	5.358657	68.46489	19.4701 2	12.06499	42.98403	0.1522	水はけが良い	21.03	195.4602	180.0739	15.38628

10

20

30

40

【0724】

実施例13：微生物菌株の活性の改善

この実施例では、実施例1に記載のステップA~Fを使用して、*Klebsiella variicola* 野生型(WT)菌株、CI137のいくつかの非トランスジェニック誘導体菌株を生成した。最初に、WT菌株CI137を根圏から単離し、特徴付けし、実施例1のステップA~Cで説明したアプローチを使用して順化させた。

【0725】

次に、実施例1のステップD~Fに記載されたアプローチを使用して、CI137の窒素固定形質は、導入遺伝子を使用せずに合理的に改善された。WT菌株の窒素固定形質を

50

改善できるかどうかを試験するために、本出願全体を通じて説明されている窒素固定に關与する様々な遺伝子を、非属間突然変異を導入操作することを目的とし、導入操作/リモデリングされた微生物は窒素固定について分析され、導入操作及び分析のステップが繰り返されて、窒素固定能力をさらに改善できるかどうかを試験された。この繰り返しアプローチを使用して、有益な突然変異を積み重ねて、窒素固定能力を高めた。

【0726】

窒素固定の改善を示したリモデリングされたC I 137菌株を生成するために、この繰り返しのリモデリングプロセスを通じて行われた非属間突然変異は、以下の表36に要約される。リモデリングされた菌株の窒素固定形質の段階的な改善が図43に示される。

【表36 - 1】

表36. 137菌株と突然変異の説明

菌株	菌株 ID	配列番号	遺伝子型	突然変異	突然変異の説明	該当する場合、関連する新規ジャンクション
	137-1036		$\Delta nifL::PinfC$	$\Delta nifL::PinfC$	nifL 遺伝子の ATG(開始)の 20bp 後から TGA(終止)の 87bp 前までの当該遺伝子の欠失。infC 遺伝子の上流領域の 500bp の断片を nifA の上流に挿入して(PinfC)、欠失した部分を置換した。	
	137-1034		$\Delta glnE_{AR-KO2}$	$\Delta glnE_{AR-KO2}$	glnE 遺伝子の開始コドン後の 1647bp の欠失。	
	137-2249		$\Delta nifL::PinfC$	$\Delta nifL::PinfC$	nifL 遺伝子の ATG(開始)の 20bp 後から TGA(終止)の 87bp 前までの当該遺伝子の欠失。infC 遺伝子の上流領域の 500bp の断片を nifA の上流に挿入して(PinfC)、欠失した部分を置換した。	
			$glnE_{AR-DxD}$	$glnE_{AR-DxD}$	glnE の開始コドンの後 513bp のところにある「GAT」を「GCG」コドンに変更。	

10

20

30

40

50

【表 3 6 - 2】

菌株	菌株 ID	配列番号	遺伝子型	突然変異	突然変異の説明	該当する場合、関連する新規ジャンクション
	137-1968		$\Delta nifL::Pr_{m8.2}$	$\Delta nifL::Pr_{m8.2}$	nifL 遺伝子の ATG(開始)の 20bp 後から TGA(終止)の 87bp 前までの当該遺伝子の欠失。nifA の上流に、nlpI の開始コドンから 77bp 後から nlpI の開始コドンの後 376bp までの 299bp の断片 (Prom8.2) を挿入し、欠失された部分を置き換えた。	10
			$\Delta glnE_{AR-KO2}$	$\Delta glnE_{AR-KO2}$	glnE 遺伝子の開始コドン後の 1647bp の欠失。	
	137-1586		$\Delta nifL::PinfC$	$\Delta nifL::PinfC$	nifL 遺伝子の ATG(開始)の 20bp 後から TGA(終止)の 87bp 前までの当該遺伝子の欠失。infC 遺伝子の上流領域の 500bp の断片 (PinfC) を nifA の上流に挿入して、欠失した部分を置換した。	20
			$\Delta glnE_{AR-KO2}$	$\Delta glnE_{AR-KO2}$	glnE 遺伝子の開始コドン後の 1647bp の欠失。	
	137-2084		$\Delta nifL::Pr_{m1.2}$	$\Delta nifL::Pr_{m1.2}$	nifL 遺伝子の ATG(開始)の 20bp 後から TGA(終止)の 87bp 前までの当該遺伝子の欠失。cspE 遺伝子の上流領域からの 400bp の断片 (Prm1.2) を nifA の上流に挿入して、欠失した部分を置換した。	30
			$\Delta glnE_{AR-KO2}$	$\Delta glnE_{AR-KO2}$	glnE 遺伝子の開始コドン後の 1647bp の欠失。	
	137-2251		$\Delta nifL::Pr_{m1.2}$	$\Delta nifL::Pr_{m1.2}$	nifL 遺伝子の ATG(開始)の 20bp 後から TGA(終止)の 87bp 前までの当該遺伝子の欠失。cspE 遺伝子の上流領域からの 400bp の断片 (Prm1.2) を nifA の上流に挿入して、欠失した部分を置換した。	40
			$\Delta glnE_{AR-KO2}$	$\Delta glnE_{AR-KO2}$	glnE 遺伝子の開始コドン後の 1647bp の欠失。	

【表 3 6 - 3】

菌株	菌株 ID	配列番号	遺伝子型	突然変異	突然変異の説明	該当する場合、関連する新規ジャンクション
			rpoN-Prm8.2	rpoN-Prm8.2	nlpI の開始コドンの後 77bp から nlpI の開始コドンの後 376bp までのところにある、ibtB2 と rpoN の間の 47bp の欠失と断片(Prm8.2)の挿入は、rpoN のすぐ上流であった。	10
	137-2219		Δ nifL::Prm1.2	Δ nifL::Prm1.2	nifL 遺伝子の ATG(開始)の 20bp 後から TGA(終止)の 87bp 前までの当該遺伝子の欠失。cspE 遺伝子の上流領域からの 400bp の断片(Prm1.2)を nifA の上流に挿入して、欠失した部分を置換した。	20
			Δ glnE _{AR} -KO2	Δ glnE _{AR} -KO2	glnE 遺伝子の開始コドン後の 1647bp の欠失。	
			Δ glnD _{ACT} 1/2	Δ glnD _{ACT} 1/2	glnD 遺伝子の終止コドンの前の 546bp の欠失。	

【0727】

表 3 7 に示される機能セットは図 2 9 の機能リストに対応し、F 0、F 1、F 2、F 3、F 4、F 5、及び F 6 を引用する。これらの機能は、圃場での外因性窒素の使用の減少、または圃場での外因性窒素の使用の完全な置換を促進するために、菌株の目標とした改善をすることになる。表 3 7 に列挙した菌株によって示される窒素固定の改善は図 4 3 に示されている。

【表 3 7】

表 3 7. 改変細胞におけるアンモニウム排出

菌株 ID	遺伝子型	機能セット
137-1036	Δ nifL::PinfC	F1
137-2249	Δ nifL::PinfC, glnE _{AR} -DxD	F1, F2
137-1034	Δ glnE _{AR} -KO2	F2
137-1586	Δ nifL::PinfC, glnE _{AR} -KO2	F1, F2
137-2084	Δ nifL::Prm1.2, Δ glnE _{AR} -KO2	F1, F2
137-1968	Δ nifL::Prm8.2, Δ glnE _{AR} -KO2	F1, F2
137-2251	Δ nifL::Prm1.2, rpoN-Prm8.2	F1, F4
137-2219	Δ nifL::Prm1.2, Δ glnE _{AR} -KO2, Δ glnD _{ACT} 1/2	F1, F2, F3

【0728】

実施例 1 4 : 生物学的窒素固定による作物収穫高の一貫性の向上

実施例 1 1 「リモデリングされた微生物によって可能になったトウモロコシ作物の圃場

内ばらつきの低減」と同様に、本実施例は、さまざまな研究サイトと圃場条件にわたって広範なデータを提供し、トウモロコシ収穫高の一貫性の向上と農業従事者のエーカー全体の圃場内ばらつきの低減を示す。

【0729】

窒素は穀類作物の重要な栄養素である。窒素は、通常、作物が植栽されている圃場全体に施用される肥料の形で提供される。施肥した肥料は環境中に失われることがあるため（例えば、天候の影響などで）、作物の収穫高にばらつきが出ることがある。現在の実施例では、本開示のリモデリングされた微生物が、多様な環境条件にわたって生物学的窒素固定を介して宿主植物に窒素を供給することで、作物の収穫高の一貫性を高める能力を示す。本開示の微生物は、困難な土壌及び気象条件に直面しても、農業従事者が作物の収穫高を確実に予測することを可能にする。したがって、作物収穫高の一貫性の向上は、外部の圃場の条件（例えば、天候または土壌など）に関係なく、圃場からより確実に収穫高を得ることができる農業従事者に大きな利益をもたらすことが期待される。

10

【0730】

圃場試験手順

本開示のリモデリングされた微生物、すなわち137-1036の性能は、2019年に複数の農業従事者の圃場で評価された。栽培者の標準的な窒素施肥慣行によるトウモロコシの収穫高を、植栽時の畝間散布としてシステムに137-1036を追加したトウモロコシの収穫高と比較した。農業従事者は、圃場の片側に137-1036処理区域を、反対側に栽培者標準規範（GSP）を配置して、圃場を半分に分割するように指示された。試験参加者は、2つの処理ゾーンを特定するデジタルの植栽時（プランターモニター）及び収穫（コンバイン収穫高モニター）マップを提供した。ArcGISソフトウェアを使用して、データを分析し、ゾーン間の収穫高の違いを比較した。

20

【0731】

データ分析

均一な作物の発達は、収穫高を最大化する上で重要な要素であり、圃場内の収穫高のばらつきの重要な推進力である。トウモロコシは他の栄養素よりも窒素に敏感である。その結果、圃場内の窒素の利用可能性の違いは、収穫高のばらつきに大きく貢献する。リモデリングされた微生物137-1036を含む製品は、従来の合成窒素源と比較して、より一貫性のある信頼性の高い方法で、浸出せず、トウモロコシ植物に窒素を送達するベースライン窒素源として機能する。

30

【0732】

2019年の収穫期に収集された34の農場の収穫コンバインモニターからの収穫高データを使用して、137-1036で処理された圃場領域と未処理の対照領域の間の収穫高ばらつきの変化を、ばらつきの収穫高均一性及び標準偏差を分析することによって調べた。

【0733】

結合データは、共通の形式に標準化された最初のQCチェックにかけられた。34の農場のうち、3つのサイトのデータは、圃場状態、農場管理、またはデータ収集に重大な欠陥があったため、137-1036と未処理の対照との比較が代表的なものではないと判断され、破棄された。

40

【0734】

追加のQA/QC手順を適用してデータを組み合わせ、137-1036と未処理の圃場領域の両方の代表的な比較を保証した。通常は収穫高が低く、損傷を受けやすく、入射太陽放射プロファイルが変化するヘッダー行は、フィールドデータセットから削除された。これは図44に見ることができ、フィールドの周囲は白である。さらに、コンバイン収穫モニターからの最も信頼できるデータは、コンバインが一定の速度で移動している地域で発生する。したがって、データポイントは、コンバインが加速している場合、またはコンバインがフィールドドレインまたはテラスなどの障害物を通過するために減速する必要がある場合に、自動フィルターを使用して削除した。

50

【 0 7 3 5 】

図 4 4 は、例示的な圃場から分析されたデータポイントを示す。3 1 の農場の残りの 3 7 0 万のデータポイントは、本明細書に示されている分析に使用した。表 3 8 は、この大規模なデータセットの特性をまとめたものである。

【 表 3 8 】

表 3 8 . 処理領域ごとに分析されたデータの要約

	未処理の対照	137-1036 処理	合計
総収穫高データポイント	1,873,663	1,842,127	3,715,790
総面積(エーカー)	2,152	1,631	3,783
総収穫高(ブッシェル)	428,573	341,949	770,522
平均データポイント/農場	60,441	59,423	119,864
平均ブッシェル/エーカー	199.1	209.7	203.7
平均エーカー/農場	69.4	52.6	122.0

10

【 0 7 3 6 】

個々の農場で、1 3 7 - 1 0 3 6 処置済みと未処置対照間の収穫高 (ブッシェル/エーカー) の標準偏差の違いを計算した。図 4 5 ~ 4 9 は、単一の農場の収穫高データの分布の例を示す。例えば、図 4 5 では、1 3 7 - 1 0 3 6 処理された分布の幅は、未処理の分布よりも目に見えて小さく、標準偏差は未処理対照よりも 1 5 . 1 ブッシェル/エーカー小さくなっている。

20

【 0 7 3 7 】

6 4 % の農場で収穫高ばらつきの減少 (一貫性の改善) が見られた。中央値の減少量は 1 . 6 5 ブッシェル/エーカーであり、平均減少量は 2 . 2 2 ブッシェル/エーカーであった。

【 0 7 3 8 】

3 1 の農場全体で、2 0 は未処置の対照と比較して、処置された 1 3 6 7 - 1 0 3 6 の収穫高の標準偏差の低下を示し、成功率は 6 4 % であった。図 4 9 は、農場ごとのこれらの違いを要約して、収穫高の対照標準偏差から 1 3 7 - 1 0 3 6 処理された収穫高の標準偏差を引いたものを示す。農場の 8 7 % で、未処理領域と比較した 1 3 7 - 1 0 3 6 で処理された圃場領域の収穫高ばらつきの違いは有意であった。図 4 9 のバーのうちの 4 つだけが灰色で表示され、有意ではなかった 1 3 7 - 1 0 3 6 処理と未処理の収穫高ばらつきの違いを示す (* で示される)。有意性は、9 5 % の有意水準で L e v e n e の等分散性検定を適用することによって決定された。

30

40

50

【表 3 9 - 1】

表 3 9. 本開示の菌株の詳細な説明

菌株 ID	系統	変異原性 DNA の説明	遺伝子型	受託番号
CI006	CI006	野生型の親 <i>Kosakonia saccari</i>	WT	201701001
CI137	CI137	野生型の親 <i>Klebsiella variicola</i>	WT	201708001
CI910	CI910	野生型の親 <i>Metakosakonia intestini</i>	WT	PTA-126585
CI8	CI8	野生型の親 <i>Paraburkholderia tropica</i>	WT	PTA-126582
CI41	CI41	野生型の親 <i>Paenibacillus polymyxa</i>	WT	PTA-126581
CI3069	CI3069	野生型の親 <i>Herbaspirillum aquaticum</i>	WT	PTA-126583
6-403	CI006 の突然 変異体	nifL 遺伝子の破壊と、nifA の上流の lpp 遺伝子上流領域の断片 (Prm1) の挿入。グルタミン酸-アンモニア-リガーゼ アデニリルトランスフェラーゼのアデニリル除去ドメインを含む glnE 遺伝子の開始コドン後の 1647bp の欠失 (Δ glnE-AR_KO2)。	Δ nifL::Prm1, Δ glnE- AR_KO2	201708004
6-2425	CI006 の突然 変異体	nifL 遺伝子の破壊と、nifA の上流の lpp 遺伝子上流領域の断片 (Prm1) の挿入。二機能性ウリジリルトランスフェラーゼ/ウリジリル除去酵素のウリジリルトランスフェラーゼ (UT) ドメインを含む glnD 遺伝子の開始コドン後の 987bp の欠失 (Δ glnD-UT_truncation)	Δ nifL::Prm1, Δ glnD_UT_tru ncation	PTA-126575
6-2634	CI006 の突然 変異体	nifL 遺伝子の破壊と、nifA の上流の lpp 遺伝子上流領域の断片 (Prm1) の挿入。アミノ酸残基 90 及び 91 を GG から DV に、ならびに残基 104 を D から A に突然変異させることによる、二機能性ウリジリルトランスフェラーゼ/ウリジリル除去酵素 glnD のウリジリルトランスフェラーゼ (UT) ドメインの不活性化。	Δ nifL::Prm1, Δ glnD_UT_de activation	PTA-126576

10

20

30

40

50

【表 3 9 - 2】

菌株 ID	系統	変異原性 DNA の説明	遺伝子型	受託番号
137-1034	CI137 の変異 体	グルタミン酸-アンモニア-リガーゼ アデニリルトランスフェラーゼのアデニリル除去ドメインを含む glnE 遺伝子の開始コドン後の 1647bp の欠失 (Δ glnE-AR_KO2)。	Δ glnE-AR_KO2	201712001
137-2084	CI137 の突然 変異体	nifL 遺伝子の破壊と、nifA の上流の cspE 遺伝子の上流領域の断片 (Prm1.2) の挿入。グルタミン酸-アンモニア-リガーゼ アデニリルトランスフェラーゼのアデニリル除去ドメインを含む glnE 遺伝子の開始コドン後の 1647bp の欠失 (Δ glnE-AR_KO2)。	Δ nifL::Prm1.2 Δ glnE-AR_KO2	
137-1968		nlpI の開始コドンの後 77bp から nlpI の開始コドンの後 376bp までのところにある、ネイティブ dctA1 プロモーターの欠失と断片 (Prm8.2) の挿入は、dctA1 のすぐ上流であった。グルタミン酸-アンモニア-リガーゼ アデニリルトランスフェラーゼのアデニリル除去ドメインを含む glnE 遺伝子の開始コドン後の 1647bp の欠失 (Δ glnE-AR_KO2)。	Δ nifL::P8.2, Δ glnE-AR_KO2	PTA-126577
137-2219	CI137 の突然 変異体	nifL 遺伝子の破壊と、nifA の上流の cspE 遺伝子の上流領域の断片 (Prm1.2) の挿入。グルタミン酸-アンモニア-リガーゼ アデニリルトランスフェラーゼのアデニリル除去ドメインを含む glnE 遺伝子の開始コドン後の 1647bp の欠失 (Δ glnE-AR_KO2)。二機能性ウリジリルトランスフェラーゼ/ウリジリル除去酵素の ACT1/2 ドメインを含む glnD 遺伝子の終止コドン前の 987bp の欠失 (Δ glnD-UT_truncation)	Δ nifL::Prm1.2 Δ glnE-AR_KO2, Δ glnD_ACT12_truncation	PTA-126578

10

20

30

40

50

【表 3 9 - 3】

菌株 ID	系統	変異原性 DNA の説明	遺伝子型	受託番号
137-2237	CI137 の突然 変異体	nifL 遺伝子の破壊と、nifA の上流の cspE 遺伝子の上流領域の断片 (Prm1.2) の挿入。グルタミン酸-アンモニア-リガーゼ アデニリルトランスフェラーゼのアデニリル除去ドメインを含む glnE 遺伝子の開始コドン後の 1647bp の欠失 (Δ glnE-AR_KO2)。ネイティブ glsA2 プロモーターの欠失と glsA2 CDS のすぐ上流の断片 (Prm1.2) の挿入。	Δ nifL::Prm1.2, Δ glnE- AR_KO2, glsA2::Prm1.2	PTA-126579
137-2285	CI137 の突然 変異体	nifL 遺伝子の破壊と、nifA の上流の cspE 遺伝子の上流領域の断片 (Prm1.2) の挿入。グルタミン酸-アンモニア-リガーゼ アデニリルトランスフェラーゼのアデニリル除去ドメインを含む glnE 遺伝子の開始コドン後の 1647bp の欠失 (Δ glnE-AR_KO2)。ネイティブ rpoN プロモーターの欠失と rpoN CDS のすぐ上流の断片 (Prm1.2) の挿入。	Δ nifL::Prm1.2, Δ glnE- AR_KO2, rpoN::Prm1.2	PTA-126580
910-3994	CI910 の突然 変異体	nifL 遺伝子の破壊と、nifA の上流の rmF 遺伝子の上流領域の断片 (Prm2.1) の挿入。グルタミン酸-アンモニア-リガーゼ アデニリルトランスフェラーゼのアデニリル除去ドメインを含む glnE 遺伝子の開始コドン後の 1647bp の欠失 (Δ glnE-AR_KO2)。ネイティブ glsA2 プロモーターの欠失と、glsA2 CDS のすぐ上流の csrA 遺伝子の上流の断片 (Prm1.1) の挿入。	Δ nifL::Prm2.1, Δ glnE- AR_KO2, glsA2::Prm1.1	PTA-126588

10

20

30

40

50

【表 3 9 - 4】

菌株 ID	系統	変異原性 DNA の説明	遺伝子型	受託番号
910-3963	CI910 の突然 変異体	nifL 遺伝子の破壊と、nifA の上流の rmF 遺伝子の上流領域の断片 (Prm2.1) の挿入。グルタミン酸-アンモニア-リガーゼ アデニリルトランスフェラーゼのアデニリル除去ドメインを含む glnE 遺伝子の開始コドン後の 1647bp の欠失 (Δ glnE-AR_KO2)。二機能性ウリジリルトランスフェラーゼ/ウリジリル除去酵素のウリジリルトランスフェラーゼ(UT)ドメインを含む glnD 遺伝子の開始コドン後の 987bp の欠失 (Δ glnD-UT_truncation)	Δ nifL::Prm2.1, Δ glnE-AR_KO2, Δ glnD_UT_truncation	PTA-126586
910-3655	CI910 の突然 変異体	nifL 遺伝子の破壊と、nifA の上流の rmF 遺伝子の上流領域の断片 (Prm2.1) の挿入。グルタミン酸-アンモニア-リガーゼ アデニリルトランスフェラーゼのアデニリル除去ドメインを含む glnE 遺伝子の開始コドン後の 1647bp の欠失 (Δ glnE-AR_KO2)。	Δ nifL::Prm2.1, Δ glnE-AR_KO2	PTA-126584
910-3961	CI910 の突然 変異体	nifL 遺伝子の破壊と、nifA の上流の rmF 遺伝子の上流領域の断片 (Prm2.1) の挿入。二機能性ウリジリルトランスフェラーゼ/ウリジリル除去酵素のウリジリルトランスフェラーゼ(UT)ドメインを含む glnD 遺伝子の開始コドン後の 987bp の欠失 (Δ glnD-UT_truncation)	Δ nifL::Prm2.1, Δ glnD_UT_truncation	PTA-126587

10

20

30

40

50

【 0 7 3 9 】

本開示の番号付けされた実施形態

添付の特許請求の範囲にかかわらず、本開示は、以下の番号付けされた実施形態を記載する。

1. 複数の作物の収穫高の一貫性を改善するための方法であって、前記方法は、場所に、複数の作物と、前記複数の作物の根圏にコロニーを形成し、前記植物に固定 N を供給する複数のリモデリングされた窒素固定微生物を提供することを含み、前記場所全体で測定された平均収穫高の標準偏差が、1 エーカー当たりのブッシュで、前記場所に対照の複数の作物が提供される場合、前記対照の複数の作物と比較して、前記窒素固定微生物によってコロニー形成された前記複数の作物についてより低くなる、前記

方法。

【0740】

2. 前記作物が穀類である、実施形態1に記載の方法。

【0741】

3. 前記作物がトウモロコシ、イネ、コムギ、オオムギ、モロコシ、キビ、オーツムギ、ライムギ、またはライコムギである、上記の実施形態のいずれか1つに記載の方法。

【0742】

4. 前記リモデリングされた窒素固定微生物によってコロニー形成された前記複数の作物の平均収穫高の標準偏差が、前記対照の複数の作物の標準偏差よりも少なくとも約15ブッシュェル/エーカー小さく、前記対照の複数の作物は、窒素固定微生物によってコロニー形成されていない、上記実施形態のいずれか1つに記載の方法。 10

【0743】

5. 前記リモデリングされた窒素固定微生物によってコロニー形成された前記複数の作物間の平均収穫高が、前記対照の複数の作物の平均収穫高の1~10%以内であり、前記対照の複数の作物が、前記窒素固定微生物によってコロニー形成されていない、上記実施形態のいずれか1つに記載の方法。

【0744】

6. 前記場所が農業的に困難な土壌を含む、上記実施形態のいずれか1つに記載の方法。

【0745】

7. 前記場所が、対照土壌における作物の平均収穫高と比較して、高い砂含有量、高い水分含有量、不利なpH、水はけの悪さ、及び不採算土壌における作物の平均収穫高によって測定される不採算性、の1つ以上の原因のより農業的に困難である土壌を含む、上記実施形態のいずれか1つに記載の方法。 20

【0746】

8. 前記場所が、少なくとも約30%、少なくとも約40%、または少なくとも約50%の砂を含む農業的に困難な土壌を含む、上記実施形態のいずれか1つに記載の方法。

【0747】

9. 前記場所が、約30%未満のシルトを含む農業的に困難な土壌を含む、上記実施形態のいずれか1つに記載の方法。

【0748】

10. 前記場所が、約20%未満の粘土を含む農業的に困難な土壌を含む、上記実施形態のいずれか1つに記載の方法。 30

【0749】

11. 前記場所が、約5~約8のpHを含む農業的に困難な土壌を含む、上記実施形態のいずれか1つに記載の方法。

【0750】

12. 前記場所が、約6.8のpHを含む農業的に困難な土壌を含む、上記実施形態のいずれか1つに記載の方法。

【0751】

13. 前記場所が、約0.40~約2.8の有機物含有量を含む農業的に困難な土壌を含む、上記実施形態のいずれか1つに記載の方法。 40

【0752】

14. 前記場所が、砂質ロームまたはローム土壌である農業的に困難な土壌を含む、上記実施形態のいずれか1つに記載の方法。

【0753】

15. 前記場所全体で測定された平均収穫高が、1エーカー当たりのブッシュェルで、前記場所に対照の複数の作物が提供される場合、前記対照の複数の作物と比較して、前記窒素固定微生物によってコロニー形成された前記複数の作物についてより高くなる、上記実施形態のいずれか1つに記載の方法。

【0754】

16．前記リモデリングされた窒素固定微生物が、少なくとも約10日～約60日の間に、1エーカー当たり少なくとも約15ポンドの固定Nを全体で生成する、上記実施形態のいずれか1つに記載の方法。

【0755】

17．外因性窒素が前記作物への側方施肥として適用されない、上記実施形態のいずれか1つに記載の方法。

【0756】

18．前記リモデリングされた窒素固定微生物が、それぞれ、1時間当たりCFU当たりNの少なくとも約 2.75×10^{-12} mmolのNの固定Nを生成する、上記実施形態のいずれか1つに記載の方法。

10

【0757】

19．前記リモデリングされた窒素固定微生物が、それぞれ、1時間当たりCFU当たりNの少なくとも約 4.03×10^{-13} mmolのNの固定Nを生成する、上記実施形態のいずれか1つに記載の方法。

【0758】

20．前記リモデリングされた窒素固定微生物が、少なくとも約20日、30日、または60日間、エーカー当たりの合計CFU濃度が約 5×10^{13} で、前記複数の作物の根の表面にコロニーを形成する、上記実施形態のいずれか1つに記載の方法。

【0759】

21．前記リモデリングされた窒素固定微生物が、それに曝露された前記複数の個々の植物において1%以上の前記固定窒素を生成する、上記実施形態のいずれか1つに記載の方法。

20

【0760】

22．前記リモデリングされた窒素固定微生物が、外因性窒素の存在下で大気中の窒素を固定することができる、上記実施形態のいずれか1つに記載の方法。

【0761】

23．前記複数のリモデリングされた窒素固定微生物の各メンバーが、前記窒素固定または同化遺伝子調節ネットワークの少なくとも1つの遺伝子または非コードポリヌクレオチドに導入された少なくとも1つの遺伝子変異を含む、上記実施形態のいずれか1つに記載の方法。

30

【0762】

24．前記複数のリモデリングされた窒素固定微生物の各メンバーが、前記窒素固定または同化遺伝子調節ネットワークの少なくとも1つの遺伝子に作動可能に連結された導入された制御配列を含む、上記実施形態のいずれか1つに記載の方法。

【0763】

25．前記複数のリモデリングされた窒素固定微生物の各メンバーが、前記窒素固定または同化遺伝子調節ネットワークの少なくとも1つの遺伝子に作動可能に連結された異種プロモーターを含む、上記実施形態のいずれか1つに記載の方法。

【0764】

26．前記複数のリモデリングされた窒素固定微生物の各メンバーが、*nifA*、*nifL*、*ntrB*、*ntrC*、グルタミンシンターゼをコードするポリヌクレオチド、*glnA*、*glnB*、*glnK*、*drat*、*amtB*、グルタミンナーゼをコードするポリヌクレオチド、*glnD*、*glnE*、*nifJ*、*nifH*、*nifD*、*nifK*、*nifY*、*nifE*、*nifN*、*nifU*、*nifS*、*nifV*、*nifW*、*nifZ*、*nifM*、*nifF*、*nifB*、*nifQ*、ニトロゲナーゼ酵素の生合成に関連する遺伝子、及びそれらの組み合わせからなる群から選択されるメンバーに導入された少なくとも1つの遺伝子変異を含む、上記の実施形態のいずれか1つに記載の方法。

40

【0765】

27．前記複数のリモデリングされた窒素固定微生物の各メンバーが、前記窒素固定または同化遺伝子調節ネットワークの、少なくとも1つの遺伝子もしくは非コードポリヌクレ

50

オチドに導入された少なくとも1つの遺伝子変異を含み、その結果、以下：NifAもしくはグルタミナーゼの発現もしくは活性の増加、NifL、NtrB、グルタミンシンターゼ、GlnB、GlnK、DraT、AmtBの発現もしくは活性の低下、GlnEのアデニル除去活性の低下、またはGlnDのウリジリル除去活性の低下のうちの1つ以上が発生する、上記の実施形態のいずれか1つに記載の方法。

【0766】

28．前記複数のリモデリングされた窒素固定微生物の各メンバーが、前記nifL遺伝子に異種プロモーターを含む突然変異nifL遺伝子を含む、上記の実施形態のいずれか1つに記載の方法。

【0767】

29．前記複数のリモデリングされた窒素固定微生物の各メンバーが、アデニル除去(Ar)ドメインを欠く短縮型GlnEタンパク質をもたらす突然変異型glnE遺伝子を含む、上記の実施形態のいずれか1つに記載の方法。

【0768】

30．前記複数のリモデリングされた窒素固定微生物の各メンバーが、amtB遺伝子の発現の欠如をもたらす突然変異型amtB遺伝子を含む、上記の実施形態のいずれか1つに記載の方法。

【0769】

31．前記複数のリモデリングされた窒素固定微生物の各メンバーが、exopolysaccharide産生、endopolygalacturonase産生、トレハロース産生、及びグルタミン変換からなる群から選択される経路に關与する遺伝子に導入される少なくとも1つの遺伝子変異を含む、上記の実施形態のいずれか1つに記載の方法。

【0770】

32．前記複数のリモデリングされた窒素固定微生物の各メンバーが、bcsII、bcsIII、yjbE、fhaB、pehA、otsB、treZ、glsA2、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される遺伝子に導入された少なくとも1つの遺伝子変異を含む、上記の実施形態のいずれか1つに記載の方法。

【0771】

33．前記複数のリモデリングされた窒素固定微生物が、少なくとも2つの異なる種の細菌を含む、上記の実施形態のいずれか1つに記載の方法。

【0772】

34．前記複数のリモデリングされた窒素固定微生物が、同じ種の細菌の少なくとも2つの異なる菌株を含む、上記の実施形態のいずれか1つに記載の方法。

【0773】

35．前記複数のリモデリングされた窒素固定微生物が、Paenibacillus polymyxa、Paraburkholderia tropica、Herbaspirillum aquaticum、Metakosakonia intestini、Rahnella aquatilis、Klebsiella variicola、Achromobacter spiritinus、Achromobacter marplatensis、Microbacterium murale、Kluverella intermedia、Kosakonia pseudosacchari、Enterobacter種、Azospirillum lipoferum、Kosakonia sacchari、及びそれらの組み合わせから選択される、上記の実施形態のいずれか1つに記載の方法。

【0774】

36．前記複数のリモデリングされた窒素固定微生物が、着生植物または根圏である、上記の実施形態のいずれか1つに記載の方法。

【0775】

37．前記複数のリモデリングされた窒素固定微生物が、以下：ATCC PTA-126575として寄託された細菌、ATCC PTA-126576として寄託された細菌

10

20

30

40

50

- 、 A T C C P T A - 1 2 6 5 7 7として寄託された細菌、 A T C C P T A - 1 2 6 5 7 8として寄託された細菌、 A T C C P T A - 1 2 6 5 7 9として寄託された細菌、 A T C C P T A - 1 2 6 5 8 0として寄託された細菌、 A T C C P T A - 1 2 6 5 8 4として寄託された細菌、 A T C C P T A - 1 2 6 5 8 6として寄託された細菌、 A T C C P T A - 1 2 6 5 8 7として寄託された細菌、 A T C C P T A - 1 2 6 5 8 8として寄託された細菌、 N C M A 2 0 1 7 0 1 0 0 2として寄託された細菌、 N C M A 2 0 1 7 0 8 0 0 4として寄託された細菌、 N C M A 2 0 1 7 0 8 0 0 3として寄託された細菌、 N C M A 2 0 1 7 0 8 0 0 2として寄託された細菌、 N C M A 2 0 1 7 1 2 0 0 1として寄託された細菌、 N C M A 2 0 1 7 1 2 0 0 2として寄託された細菌、 及びこれらの組み合わせから選択される、上記の実施形態のいずれか1つに記載の方法。 10
- 【 0 7 7 6 】
- 3 8 . 前記複数のリモデリングされた窒素固定微生物が、配列番号177～260、296～303、及び458～469から選択される核酸配列に対して少なくとも約90%、95%、97%、または99%の配列同一性を共有する核酸配列を含む細菌を含む、上記の実施形態のいずれか1つに記載の方法。
- 【 0 7 7 7 】
- 3 9 . 前記複数のリモデリングされた窒素固定微生物が、配列番号177～260、296～303、及び458～469から選択される核酸配列を含む細菌を含む、上記の実施形態のいずれか1つに記載の方法。
- 【 0 7 7 8 】 20
- 4 0 . 前記複数のリモデリングされた窒素固定微生物からのリモデリングされた窒素固定微生物が、トランスジェニック及び非属間のいずれかである、上記の実施形態のいずれか1つに記載の方法。
- 【 0 7 7 9 】
- 4 1 . 作物の対照セットと比較して農業場所において、収穫高の一貫性が改善された複数の作物であって、複数のリモデリングされた窒素固定微生物と関連した複数の作物を含み、それにより、前記複数の作物が、それらの植物内固定Nの少なくとも1%を前記リモデリングされた微生物から受け取り、前記場所全体で測定された平均収穫高の標準偏差が、1エーカー当たりのブッシェルで、前記場所に対照の複数の作物が提供される場合、前記対照の複数の作物と比較して、前記窒素固定微生物と関連する前記複数の作物についてより低くなる、前記作物。 30
- 【 0 7 8 0 】
- 4 2 . 作物が穀類植物である、実施形態41に記載の複数の作物。
- 【 0 7 8 1 】
- 4 3 . 前記作物が、トウモロコシ、イネ、コムギ、オオムギ、モロコシ、キビ、オーツムギ、ライムギ、またはライコムギ植物である、上記の実施形態のいずれか1つに記載の複数の作物。
- 【 0 7 8 2 】
- 4 4 . 前記リモデリングされた窒素固定微生物に関連する前記複数の作物の平均収穫高の標準偏差は、前記対照の複数の作物の標準偏差よりもエーカー当たり少なくとも約15ブッシェル低く、前記対照の複数の作物は、窒素固定微生物と関連していない、上記の実施形態のいずれか1つに記載の複数の作物。 40
- 【 0 7 8 3 】
- 4 5 . 前記リモデリングされた窒素固定微生物に関連する前記複数の作物間の平均収穫高が、前記対照の複数の作物の平均収穫高の1～10%以内であり、前記対照の複数の作物が、前記窒素固定微生物と関連していない、上記の実施形態のいずれか1つに記載の複数の作物。
- 【 0 7 8 4 】
- 4 6 . 前記場所が農業的に困難な土壌を含む、上記実施形態のいずれか1つに記載の複数の 50

の作物。

【0785】

47．前記場所が、対照土壌における作物の平均収穫高と比較して、高い砂含有量、高い水分含有量、不利なpH、水はけの悪さ、及び不採算土壌における作物の平均収穫高によって測定される不採算性、の1つ以上の原因のより農業的に困難である土壌を含む、上記の実施形態のいずれか1つに記載の複数の作物。

【0786】

48．前記場所が、少なくとも約30%、少なくとも約40%、または少なくとも約50%の砂を含む農業的に困難な土壌を含む、上記実施形態のいずれか1つに記載の複数の作物。

10

【0787】

49．前記場所が、約30%未満のシルトを含む農業的に困難な土壌を含む、上記実施形態のいずれか1つに記載の複数の作物。

【0788】

50．前記場所が、約20%未満の粘土を含む農業的に困難な土壌を含む、上記実施形態のいずれか1つに記載の複数の作物。

【0789】

51．前記場所が、約5～約8のpHを含む農業的に困難な土壌を含む、上記実施形態のいずれか1つに記載の複数の作物。

【0790】

52．前記場所が、約6.8のpHを含む農業的に困難な土壌を含む、上記実施形態のいずれか1つに記載の複数の作物。

20

【0791】

53．前記場所が、約0.40～約2.8の有機物含有量を含む農業的に困難な土壌を含む、上記実施形態のいずれか1つに記載の複数の作物。

【0792】

54．前記場所が、砂質ロームまたはローム土壌である農業的に困難な土壌を含む、上記実施形態のいずれか1つに記載の複数の作物。

【0793】

55．前記場所全体で測定された平均収穫高が、1エーカー当たりのブッシェルで、前記場所に対照の複数の作物が提供される場合、前記対照の複数の作物と比較して、前記窒素固定微生物と関連する前記複数の作物についてより高くなる、上記実施形態のいずれか1つに記載の複数の作物。

30

【0794】

56．前記リモデリングされた窒素固定微生物が、少なくとも約10日～約60日の間に、1エーカー当たり少なくとも約15ポンドの固定Nを全体で生成する、上記実施形態のいずれか1つに記載の複数の作物。

【0795】

57．外因性窒素が前記作物への側方施肥として適用されない、上記実施形態のいずれか1つに記載の複数の作物。

40

【0796】

58．前記リモデリングされた窒素固定微生物が、それぞれ、1時間当たりCFU当たりNの少なくとも約 2.75×10^{-12} mmolの固定Nを生成する、上記実施形態のいずれか1つに記載の複数の作物。

【0797】

59．前記リモデリングされた窒素固定微生物が、それぞれ、1時間当たりCFU当たりNの少なくとも約 4.03×10^{-13} mmolの固定Nを生成する、上記実施形態のいずれか1つに記載の複数の作物。

【0798】

60．前記リモデリングされた窒素固定微生物が、少なくとも約20日、30日、または

50

60日間、エーカー当たりの合計CFU濃度が約 5×10^{13} で、複数の作物の根の表面にコロニーを形成する、上記実施形態のいずれか1つに記載の複数の作物。

【0799】

61．前記リモデリングされた窒素固定微生物が、外因性窒素の存在下で大気中の窒素を固定することができる、上記実施形態のいずれか1つに記載の複数の作物。

【0800】

62．前記複数のリモデリングされた窒素固定微生物の各メンバーが、前記窒素固定または同化遺伝子調節ネットワークの少なくとも1つの遺伝子または非コードポリヌクレオチドに導入された少なくとも1つの遺伝子変異を含む、上記実施形態のいずれか1つに記載の複数の作物。

10

【0801】

63．前記複数のリモデリングされた窒素固定微生物の各メンバーが、前記窒素固定または同化遺伝子調節ネットワークの少なくとも1つの遺伝子に作動可能に連結された導入された制御配列を含む、上記実施形態のいずれか1つに記載の複数の作物。

【0802】

64．前記複数のリモデリングされた窒素固定微生物の各メンバーが、前記窒素固定または同化遺伝子調節ネットワークの少なくとも1つの遺伝子に作動可能に連結された異種プロモーターを含む、上記実施形態のいずれか1つに記載の複数の作物。

【0803】

65．前記複数のリモデリングされた窒素固定微生物の各メンバーが、*nifA*、*nifL*、*ntrB*、*ntrC*、グルタミンシンターゼをコードするポリヌクレオチド、*glnA*、*glnB*、*glnK*、*draT*、*amtB*、グルタミナーゼをコードするポリヌクレオチド、*glnD*、*glnE*、*nifJ*、*nifH*、*nifD*、*nifK*、*nifY*、*nifE*、*nifN*、*nifU*、*nifS*、*nifV*、*nifW*、*nifZ*、*nifM*、*nifF*、*nifB*、*nifQ*、ニトロゲナーゼ酵素の生合成に関連する遺伝子、及びそれらの組み合わせからなる群から選択されるメンバーに導入された少なくとも1つの遺伝子変異を含む、上記実施形態のいずれか1つに記載の複数の作物。

20

【0804】

66．前記複数のリモデリングされた窒素固定微生物の各メンバーが、前記窒素固定または同化遺伝子調節ネットワークの、少なくとも1つの遺伝子もしくは非コードポリヌクレオチドに導入された少なくとも1つの遺伝子変異を含み、その結果、以下：*NifA*もしくはグルタミナーゼの発現もしくは活性の増加、*NifL*、*NtrB*、グルタミンシンターゼ、*GlnB*、*GlnK*、*DraT*、*AmtB*の発現もしくは活性の低下、*GlnE*のアデニル除去活性の低下、または*GlnD*のウリジリル除去活性の低下のうちの1つ以上が発生する、上記実施形態のいずれか1つに記載の複数の作物。

30

【0805】

67．前記複数のリモデリングされた窒素固定微生物の各メンバーが、前記*nifL*遺伝子に異種プロモーターを含む突然変異型*nifL*遺伝子を含む、上記実施形態のいずれか1つに記載の複数の作物。

【0806】

68．前記複数のリモデリングされた窒素固定微生物の各メンバーが、アデニル除去(AR)ドメインを欠く短縮型*GlnE*タンパク質をもたらす突然変異型*glnE*遺伝子を含む、上記実施形態のいずれか1つに記載の複数の作物。

40

【0807】

69．前記複数のリモデリングされた窒素固定微生物の各メンバーが、前記*amtB*遺伝子の発現の欠如をもたらす突然変異型*amtB*遺伝子を含む、上記実施形態のいずれか1つに記載の複数の作物。

【0808】

70．前記複数のリモデリングされた窒素固定微生物の各メンバーが、*exopolysaccharide*産生、*endopolysaccharide*産生、トレハロース

50

ス産生、及びグルタミン変換からなる群から選択される経路に関与する遺伝子に導入される少なくとも1つの遺伝子変異を含む、上記実施形態のいずれか1つに記載の複数の作物。

【0809】

71. 前記複数のリモデリングされた窒素固定微生物の各メンバーが、*b c s i i*、*b c s i i i*、*y j b E*、*f h a B*、*p e h A*、*o t s B*、*t r e z*、*g l s A 2*、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される遺伝子に導入された少なくとも1つの遺伝子変異を含む、上記実施形態のいずれか1つに記載の複数の作物。

【0810】

72. 前記複数のリモデリングされた窒素固定微生物が、少なくとも2つの異なる種の細菌を含む、上記実施形態のいずれか1つに記載の複数の作物。 10

【0811】

73. 前記複数のリモデリングされた窒素固定微生物が、同じ種の細菌の少なくとも2つの異なる菌株を含む、上記の実施形態のいずれか1つに記載の複数の作物。

【0812】

74. 前記複数のリモデリングされた窒素固定微生物が、*P a e n i b a c i l l u s p o l y m y x a*、*P a r a b u r k h o l d e r i a t r o p i c a*、*H e r b a s p i r i l l u m a q u a t i c u m*、*M e t a k o s a k o n i a i n t e s t i n i*、*R a h n e l l a a q u a t i l i s*、*K l e b s i e l l a v a r i i c o l a*、*A c h r o m o b a c t e r s p i r i t i n u s*、*A c h r o m o b a c t e r m a r p l a t e n s i s*、*M i c r o b a c t e r i u m m u r a l e*、*K l u y v e r a i n t e r m e d i a*、*K o s a k o n i a p s e u d o s a c c h a r i*、*E n t e r o b a c t e r*種、*A z o s p i r i l l u m l i p o f e r u m*、*K o s a k o n i a s a c c h a r i*、及びこれらの組み合わせから選択される、上記の実施形態のいずれか1つに記載の複数の作物。 20

【0813】

75. 前記複数のリモデリングされた窒素固定微生物が、着生植物または根圏である、上記の実施形態のいずれか1つに記載の複数の作物。

【0814】

76. 前記複数のリモデリングされた窒素固定微生物が、以下：*A T C C P T A - 1 2 6 5 7 5*として寄託された細菌、*A T C C P T A - 1 2 6 5 7 6*として寄託された細菌、*A T C C P T A - 1 2 6 5 7 7*として寄託された細菌、*A T C C P T A - 1 2 6 5 7 8*として寄託された細菌、*A T C C P T A - 1 2 6 5 7 9*として寄託された細菌、*A T C C P T A - 1 2 6 5 8 0*として寄託された細菌、*A T C C P T A - 1 2 6 5 8 4*として寄託された細菌、*A T C C P T A - 1 2 6 5 8 6*として寄託された細菌、*A T C C P T A - 1 2 6 5 8 7*として寄託された細菌、*A T C C P T A - 1 2 6 5 8 8*として寄託された細菌、*N C M A 2 0 1 7 0 1 0 0 2*として寄託された細菌、*N C M A 2 0 1 7 0 8 0 0 4*として寄託された細菌、*N C M A 2 0 1 7 0 8 0 0 3*として寄託された細菌、*N C M A 2 0 1 7 0 8 0 0 2*として寄託された細菌、*N C M A 2 0 1 7 1 2 0 0 1*として寄託された細菌、*N C M A 2 0 1 7 1 2 0 0 2*として寄託された細菌、及びこれらの組み合わせから選択される、上記の実施形態のいずれか1つに記載の複数の作物。 30 40

【0815】

77. 前記複数のリモデリングされた窒素固定微生物が、配列番号177~260、296~303、及び458~469から選択される核酸配列に対して少なくとも約90%、95%、97%、または99%の配列同一性を共有する核酸配列を含む細菌を含む、上記の実施形態のいずれか1つに記載の複数の作物。

【0816】

78. 前記複数のリモデリングされた窒素固定微生物が、配列番号177~260、296~303、及び458~469から選択される核酸配列を含む細菌を含む、上記の実施 50

形態のいずれか 1 つに記載の複数の作物。

【 0 8 1 7 】

79. 細菌コロニー形成植物の収穫高値に基づいて販売する作物の量を決定するためのプロセス実装方法であって、前記方法は、
 プロセッサを介して、及び前記プロセッサに動作可能に結合されたデータベースから、細菌コロニー形成植物の収穫高値を取得することであって、前記収穫高値が、細菌がコロニーを形成していない植物の収穫高値の標準偏差よりも低い関連標準偏差を有することと、
 プロセッサを介して、及び該プロセッサに動作可能に結合されたデータベースから、ある量の前記作物の現在及び将来の販売に関連する価格を取得することと、
 前記プロセッサを介して、前記細菌コロニー形成植物の収穫高値ならびに現在及び将来の販売価格に基づいて、前記細菌コロニー形成植物の物理的送達量を計算することと、
 前記細菌コロニー形成植物の前記計算された物理的送達量に基づいて市場ベース商品を特定することと、
 前記プロセッサを介して、識別された市場ベース商品を取引するための命令を表す信号を送信することと、
 前記プロセッサで、前記識別された市場ベース商品を取引するための命令を送信することに応答して、前記識別された市場ベース商品の取引の確認を表す信号を受信することと、
 を含む、前記プロセッサ実装方法。

【 0 8 1 8 】

80. 前記物理的送達量の計算が、前記細菌コロニー形成植物に関連する成長期の前に実行される、実施形態 79 に記載のプロセッサ実装方法。

【 0 8 1 9 】

81. 前記識別された市場ベース商品の取引が、前記細菌コロニー形成植物に関連する成長期の前に実行される、上記の実施形態のいずれか 1 つに記載のプロセッサ実装方法。

【 0 8 2 0 】

82. 前記市場ベース商品が先渡取引である、上記の実施形態のいずれか 1 つに記載のプロセッサ実装方法。

【 0 8 2 1 】

83. 前記市場ベース商品が先物取引である、上記の実施形態のいずれか 1 つに記載のプロセッサ実装方法。

【 0 8 2 2 】

84. 前記市場ベース商品がオプション取引である、上記の実施形態のいずれか 1 つに記載のプロセッサ実装方法。

【 0 8 2 3 】

85. 前記市場ベース商品が商品スワップ取引である、上記の実施形態のいずれか 1 つに記載のプロセッサ実装方法。

【 0 8 2 4 】

86. 前記識別された市場ベース商品を取引するための前記命令が取引記号を含む、上記の実施形態のいずれか 1 つに記載のプロセッサ実装方法。

【 0 8 2 5 】

87. 前記識別された市場ベース商品の取引が二次市場内に発生する、上記の実施形態のいずれか 1 つに記載のプロセッサ実装方法。

【 0 8 2 6 】

88. 前記細菌コロニー形成植物の前記物理的送達量を生成することをさらに含む、上記の実施形態のいずれか 1 つに記載のプロセッサ実装方法。

【 0 8 2 7 】

89. 前記細菌コロニー形成植物を生成することが、
 a. 場所に、それぞれ、1 時間当たり CFU 当たり N の少なくとも約 5.49×10^{-13} mmol の固定 N を生成する、複数の非属間リモデリング細菌を提供することと、
 b. 前記場所に、コロニー形成前植物を提供することと、を含む、実施形態 88 に記載の

プロセッサ実装方法。

【0828】

90．前記細菌コロニー形成植物がトウモロコシ植物である、上記の実施形態のいずれか1つに記載のプロセッサ実施方法。

【0829】

91．前記細菌コロニー形成植物が導入操作されたN固定微生物を使用して生成される、上記の実施形態のいずれか1つに記載のプロセッサ実施方法。

【0830】

92．前記細菌コロニー形成植物が生物学的窒素固定を使用して生成される、上記の実施形態のいずれか1つに記載のプロセッサ実施方法。

10

【0831】

93．前記細菌コロニー形成植物が、関連する作物のために大気中の窒素を固定することができる微生物を使用して生成される、上記の実施形態のいずれか1つに記載のプロセッサ実施方法。

【0832】

94．前記識別された市場ベース商品の取引の確認を表す信号が、アプリケーションプログラミングインターフェース(API)を介して前記プロセッサで受信される、上記の実施形態のいずれか1つに記載のプロセッサ実施方法。

【0833】

95．前記データベースがトウモロコシ収穫高データを含む、上記の実施形態のいずれか1つに記載のプロセッサ実施方法。

20

【0834】

96．前記収穫高値に関連する標準偏差がエーカー当たりのブッシェルで測定される、上記の実施形態のいずれか1つに記載のプロセッサ実装方法。

【0835】

97．前記収穫高値に関連する標準偏差がエーカー当たり19ブッシェル未満である、上記の実施形態のいずれか1つに記載のプロセッサ実装方法。

【0836】

98．前記細菌コロニー形成植物の前記収穫高値が、細菌がコロニーを形成していない植物の前記収穫高値の1~10%以内である、上記の実施形態のいずれか1つに記載のプロセッサ実装方法。

30

【0837】

99．前記細菌コロニー形成植物の前記物理的送達量が、前記細菌コロニー形成植物の予測された物理的送達量である、上記の実施形態のいずれか1つに記載のプロセッサ実装方法。

【0838】

100．前記細菌コロニー形成植物の前記予測された物理的送達量が、細菌がコロニーを形成していない植物のより低い収穫高をこれまで生成してきた土地で成長した予測量の細菌コロニー形成植物を含む、請求項179に記載のプロセッサ実施方法。

【0839】

101．保険商品の価格設定及び取引のためのプロセッサ実装方法であって、前記方法は、提案された保険商品に関する情報をプロセッサを介して受信することと、前記プロセッサを介して、細菌コロニー形成植物の収穫高値に基づいて前記提案された保険商品の価格を計算することとであって、前記収穫高値が、細菌がコロニーを形成していない植物の収穫高値の標準偏差よりも低い、計算することと、を含む、前記方法。

40

【0840】

102．前記プロセッサを介して、販売者の計算装置から、保険を販売するオファーを表す信号を、前記提案された保険商品の前記計算価格を含む保険を販売するオファーを送信することと、

50

前記プロセッサで、前記提案された保険商品の価格を送信することに対応して、保険販売のオファアの受諾を表す信号を受信することと、をさらに含む、実施形態 101 に記載のプロセッサ実装方法。

【0841】

103 . 前記提案された保険商品の前記価格計算が、前記細菌コロニー形成植物に関連する成長期の前に実行される、上記実施形態のいずれか 1 つに記載のプロセッサ実装方法。

【0842】

104 . 保険を販売するオファアを表す信号を送信することは、前記細菌コロニー形成植物に関連する成長期の前に実行される、上記実施形態のいずれか 1 つに記載のプロセッサ実装方法。

【0843】

105 . 前記収穫高値が、

a . 場所に、それぞれ、1 時間当たり CFU 当たり N の少なくとも約 5.49×10^{-13} mmol の固定 N を生成する、複数の非属間リモデリング細菌を提供することと、

b . 前記場所に、コロニー形成前植物を提供することと、を含むプロセスによる前記細菌コロニー形成植物の生成に基づく、上記実施形態のいずれか 1 つに記載のプロセッサ実装方法。

【0844】

106 . a . 場所に、それぞれ、1 時間当たり CFU 当たり N の少なくとも約 5.49×10^{-13} mmol の固定 N を生成する、複数の非属間リモデリング細菌を提供することと、

b . 前記場所に、前記コロニー形成前植物を提供することと、によって、コロニー形成前植物を使用して、前記細菌コロニー形成植物を生成することをさらに含む、上記実施形態のいずれか 1 つに記載のプロセッサ実装方法。

【0845】

107 . 前記細菌コロニー形成植物がトウモロコシ植物である、上記の実施形態のいずれか 1 つに記載のプロセッサ実施方法。

【0846】

108 . 前記収穫高値が、導入操作された N 固定微生物を使用することを含むプロセスによる前記細菌コロニー形成植物の生成に基づく、上記の実施形態のいずれか 1 つに記載のプロセッサ実施方法。

【0847】

109 . 前記収穫高値が、生物学的窒素固定を使用することを含むプロセスによる前記細菌コロニー形成植物の生成に基づく、上記の実施形態のいずれか 1 つに記載のプロセッサ実施方法。

【0848】

110 . 前記収穫高値が、関連する作物のために大気中の窒素を固定することができる微生物を使用することを含むプロセスによる前記細菌コロニー形成植物の生成に基づく、上記の実施形態のいずれか 1 つに記載のプロセッサ実施方法。

【0849】

111 . 保険を販売する前記オファアを表す前記信号が、アプリケーションプログラミングインターフェース (API) を介して送信される、上記の実施形態のいずれか 1 つに記載のプロセッサ実施方法。

【0850】

112 . 保険を販売する前記オファアを受諾したことを示す前記信号が API を介して受信される、上記の実施形態のいずれか 1 つに記載のプロセッサ実装方法。

【0851】

113 . 保険を販売する前記オファアを表す信号が、前記細菌コロニー形成植物の前記収穫高値をさらに含む、上記の実施形態のいずれか 1 つに記載のプロセッサ実施方法。

【0852】

10

20

30

40

50

1 1 4 . 商品の価値を高める方法であって、前記方法は、栄養素供給微小生物の存在下で前記商品を栽培することにより、前記商品の収穫高のばらつきを低減させることを含む、前記方法。

【 0 8 5 3 】

1 1 5 . 前記商品を販売することができる複数の市場のそれぞれについて、前記商品の販売のため複数の異なる価格を決定することをさらに含む、実施形態 1 1 4 に記載の方法。

【 0 8 5 4 】

1 1 6 . 前記商品の収穫高の前記ばらつきを減少させることにより、前記商品の販売者が、前記商品の価格が高い市場への前記商品の販売を増加させることができ、または、前記商品の前記販売者が、前記商品の価格が低い市場への前記商品の販売を減少させることができる、上記実施形態のいずれか 1 つに記載の方法。

10

【 0 8 5 5 】

1 1 7 . 前記商品の価格がより高い前記市場が、前記商品の生産シーズンの前に発生する市場を含む、上記実施形態のいずれか 1 つに記載の方法。

【 0 8 5 6 】

1 1 8 . 前記商品の価格がより低い前記市場が、前記商品の生産シーズンの後に発生する市場を含む、上記実施形態のいずれか 1 つに記載の方法。

【 0 8 5 7 】

1 1 9 . 前記商品が作物である、上記実施形態のいずれか 1 つに記載の方法。

【 0 8 5 8 】

1 2 0 . 栄養素供給微小生物の存在下で前記作物を栽培することが、前記作物への提供された栄養素の利用可能性を改善する、上記実施形態のいずれか 1 つに記載の方法。

20

【 0 8 5 9 】

1 2 1 . 前記作物がトウモロコシである、上記実施形態のいずれか 1 つに記載の方法。

【 0 8 6 0 】

1 2 2 . 前記 1 つ以上栄養素が窒素を含み、前記微小生物が窒素固定細菌である、上記実施形態のいずれか 1 つに記載の方法。

【 0 8 6 1 】

1 2 3 . 前記商品の収穫高の前記ばらつきが、農業従事者の圃場全体の前記商品の収穫高のばらつきを含む、上記実施形態のいずれか 1 つに記載の方法。

30

【 0 8 6 2 】

1 2 4 . 前記商品の収穫高の前記ばらつきが、実質的に気象条件に応じたばらつきに起因する、上記実施形態のいずれか 1 つに記載の方法。

【 0 8 6 3 】

1 2 5 . 商品の保険費用を低減する方法であって、前記方法が、栄養素供給微小生物の存在下で前記商品を栽培することにより、前記商品の収穫高のばらつきを低減させることを含む、前記方法。

【 0 8 6 4 】

1 2 6 . 前記商品が作物である、上記実施形態のいずれか 1 つに記載の方法。

【 0 8 6 5 】

1 2 7 . 前記栄養素供給微小生物の存在下で前記作物を栽培することが、前記作物への提供された栄養素の利用可能性を改善する、上記実施形態のいずれか 1 つに記載の方法。

40

【 0 8 6 6 】

1 2 8 . 前記作物がトウモロコシである、上記実施形態のいずれか 1 つに記載の方法。

【 0 8 6 7 】

1 2 9 . 前記 1 つ以上の栄養素が窒素を含み、前記微小生物が窒素固定細菌である、上記実施形態のいずれか 1 つに記載の方法。

【 0 8 6 8 】

1 3 0 . 前記商品の収穫高の前記ばらつきが、農業従事者の圃場全体の前記商品の収穫高のばらつきを含む、上記実施形態のいずれか 1 つに記載の方法。

50

【 0 8 6 9 】

1 3 1 . 前記商品の収穫高の前記ばらつきが、実質的に気象条件に応じたばらつきに起因する、上記実施形態のいずれか1つに記載の方法。

【 0 8 7 0 】

本開示の好ましい実施形態を示し、本明細書に記載しているが、そのような実施形態が、例示として提供されるにすぎないことは当業者に明らかである。当業者は、多数の変形、変更、及び置換を本開示から逸脱することなく想定するであろう。本明細書に記載される本開示の実施形態に対する種々の代替手段が、本開示の実施において採用され得ることを理解されたい。以下の特許請求の範囲が本開示の範囲を定義し、これらの特許請求の範囲に含まれる方法及び構造、ならびにそれらの等価物が、それにより包含されることが意図される。

10

【 0 8 7 1 】

参照による組み込み

本明細書に引用される全ての参考文献、記事、刊行物、特許、特許公報、及び特許出願は、参照によりそれらの全体があらゆる目的で援用される。しかしながら、本明細書で引用される任意の参考文献、記事、刊行物、特許、特許公報、及び特許出願の言及は、世界のいずれの国でもそれらが有効な先行技術を構成するかまたは共通一般知識の一部を形成することを認めるものでも、または任意の形式で示唆するものでもなく、かつそのように解釈されるべきではない。さらに、2018年5月22日に発行された、Methods and Compositions for Improving Plant Traitsと題される米国特許第9,975,817号が、参照により本明細書に援用される。さらに、2018年1月12日に出願され、2018年7月19日にWO2018/132774A1として公開された、Methods and Compositions for Improving Plant Traitsと題されるPCT/US2018/013671が、参照により本明細書に援用される。さらに、2019年7月1日に出願された、Temporally and Spatially Targeted Dynamic Nitrogen Delivery by Remodeled Microbesと題されるPCT/US2019/041429が、参照により本明細書に援用される。

20

本発明は、例えば、以下の項目を提供する。

30

(項目1)

複数の作物の収穫高の一貫性を改善するための方法であって、前記方法は、場所に、複数の作物と、前記複数の作物の根圏にコロニーを形成し、前記植物に固定Nを供給する複数のリモデリングされた窒素固定微生物を提供することを含み、前記場所全体で測定された平均収穫高の標準偏差は、1エーカー当たりのブッシェルで、対照の複数の作物が前記場所に提供される場合、前記対照の複数の作物と比較して、前記窒素固定微生物によってコロニー形成された前記複数の作物についてより低くなる、前記方法。

(項目2)

前記作物が穀類である、項目1に記載の方法。

40

(項目3)

前記作物がトウモロコシ、イネ、コムギ、オオムギ、モロコシ、キビ、オーツムギ、ライムギ、またはライコムギである、項目1に記載の方法。

(項目4)

前記リモデリングされた窒素固定微生物によってコロニー形成された前記複数の作物の平均収穫高の標準偏差が、前記対照の複数の作物の標準偏差よりも少なくとも約15ブッシェル/エーカー小さく、前記対照の複数の作物は、前記窒素固定微生物によってコロニー形成されていない、項目1に記載の方法。

(項目5)

前記リモデリングされた窒素固定微生物によってコロニー形成された複数の作物間の平

50

均収穫高が、前記対照の複数の作物の前記平均収穫高の1～10%以内であり、前記対照の複数の作物は、前記窒素固定微生物によってコロニー形成されていない、項目1に記載の方法。

(項目6)

前記場所が農業的に困難な土壌を含む、項目1に記載の方法。

(項目7)

前記場所が、対照土壌における作物の平均収穫高と比較して、高い砂含有量、高い水分含有量、不利なpH、水はけの悪さ、及び不採算土壌における作物の平均収穫高によって測定される不採算性、の1つ以上の原因のより農業的に困難である土壌を含む、項目1に記載の方法。

10

(項目8)

前記場所が、少なくとも約30%、少なくとも約40%、または少なくとも約50%の砂を含む農業的に困難な土壌を含む、項目1に記載の方法。

(項目9)

前記場所が、約30%未満のシルトを含む農業的に困難な土壌を含む、項目1に記載の方法。

(項目10)

前記場所が、約20%未満の粘土を含む農業的に困難な土壌を含む、項目1に記載の方法。

(項目11)

前記場所が、約5～約8のpHを含む農業的に困難な土壌を含む、項目1に記載の方法。

20

(項目12)

前記場所が、約6～8のpHを含む農業的に困難な土壌を含む、項目1に記載の方法。

(項目13)

前記場所が、約0.40～約2.8の有機物含有量を含む農業的に困難な土壌を含む、項目1に記載の方法。

(項目14)

前記場所が、砂質ロームまたはローム土壌である農業的に困難な土壌を含む、項目1に記載の方法。

30

(項目15)

前記場所全体で測定された平均収穫高が、1エーカー当たりのブッシュェルで、対照の複数の作物が前記場所に提供される場合、前記対照の複数の作物と比較して、前記窒素固定微生物によってコロニー形成された前記複数の作物についてより高い、項目1に記載の方法。

(項目16)

前記リモデリングされた窒素固定微生物が、少なくとも約10日～約60日の間に、1エーカー当たり少なくとも約15ポンドの固定Nを全体で生成する、項目1に記載の方法。

(項目17)

前記作物への側方施肥として外因性窒素が適用されない、項目1に記載の方法。

40

(項目18)

前記リモデリングされた窒素固定微生物が、それぞれ、1時間当たりCFU当たりNの少なくとも約 2.75×10^{-12} mmolの固定Nを生成する、項目1に記載の方法。

(項目19)

前記リモデリングされた窒素固定微生物が、それぞれ、1時間当たりCFU当たりNの少なくとも約 4.03×10^{-13} mmolの固定Nを生成する、項目1に記載の方法。

(項目20)

前記リモデリングされた窒素固定微生物が、少なくとも約20日、30日、または60日間、エーカー当たりの合計CFU濃度が約 5×10^{13} で、前記複数の作物の前記根の

50

表面にコロニーを形成する、項目 1 に記載の方法。

(項目 2 1)

前記リモデリングされた窒素固定微生物が、それに曝露された前記複数の個々の植物において 1 % 以上の前記固定窒素を生成する、項目 1 に記載の方法。

(項目 2 2)

前記リモデリングされた窒素固定微生物が、外因性窒素の存在下で大気中の窒素を固定することができる、項目 1 に記載の方法。

(項目 2 3)

前記複数のリモデリングされた窒素固定微生物の各メンバーが、窒素固定または同化遺伝子調節ネットワークの少なくとも 1 つの遺伝子または非コードポリヌクレオチドに導入された少なくとも 1 つの遺伝子変異を含む、項目 1 に記載の方法。

10

(項目 2 4)

前記複数のリモデリングされた窒素固定微生物の各メンバーが、前記窒素固定または同化遺伝子調節ネットワークの少なくとも 1 つの遺伝子に作動可能に連結された導入された制御配列を含む、項目 1 に記載の方法。

(項目 2 5)

前記複数のリモデリングされた窒素固定微生物の各メンバーが、前記窒素固定または同化遺伝子調節ネットワークの少なくとも 1 つの遺伝子に作動可能に連結された異種プロモーターを含む、項目 1 に記載の方法。

(項目 2 6)

前記複数のリモデリングされた窒素固定微生物の各メンバーが、以下：*nifA*、*nifL*、*ntrB*、*ntrC*、グルタミンシンターゼをコードするポリヌクレオチド、*glnA*、*glnB*、*glnK*、*draT*、*amtB*、グルタミナーゼをコードするポリヌクレオチド、*glnD*、*glnE*、*nifJ*、*nifH*、*nifD*、*nifK*、*nifY*、*nifE*、*nifN*、*nifU*、*nifS*、*nifV*、*nifW*、*nifZ*、*nifM*、*nifF*、*nifB*、*nifQ*、ニトロゲナーゼ酵素の生合成に関連する遺伝子、及びそれらの組み合わせ、からなる群から選択されるメンバーに導入された少なくとも 1 つの遺伝子変異を含む、項目 1 に記載の方法。

20

(項目 2 7)

前記複数のリモデリングされた窒素固定微生物の各メンバーが、前記窒素固定または同化遺伝子調節ネットワークの、少なくとも 1 つの遺伝子または非コードポリヌクレオチドに導入された少なくとも 1 つの遺伝子変異を含み、その結果、以下：*NifA* またはグルタミナーゼの発現または活性の増加、*NifL*、*NtrB*、グルタミンシンターゼ、*GlnB*、*GlnK*、*DraT*、*AmtB* の発現または活性の低下、*GlnE* のアデニル除去活性の低下、及び *GlnD* のウリジリル除去活性の低下のうち 1 つ以上が発生する、項目 1 に記載の方法。

30

(項目 2 8)

前記複数のリモデリングされた窒素固定微生物の各メンバーが、前記 *nifL* 遺伝子に異種プロモーターを含む突然変異型 *nifL* 遺伝子を含む、項目 1 に記載の方法。

(項目 2 9)

前記複数のリモデリングされた窒素固定微生物の各メンバーが、アデニル除去 (AR) ドメインを欠く短縮型 *GlnE* タンパク質をもたらす突然変異型 *glnE* 遺伝子を含む、項目 1 に記載の方法。

40

(項目 3 0)

前記複数のリモデリングされた窒素固定微生物の各メンバーが、前記 *amtB* 遺伝子の発現の欠如をもたらす突然変異型 *amtB* 遺伝子を含む、項目 1 に記載の方法。

(項目 3 1)

前記複数のリモデリングされた窒素固定微生物の各メンバーが、*exopolysaccharide* 産生、*endopolygalacturonase* 産生、トレハロース産生、及びグルタミン変換からなる群から選択される経路に関与する遺伝子に導入される少

50

なくとも1つの遺伝子変異を含む、項目1に記載の方法。

(項目32)

前記複数のリモデリングされた窒素固定微生物の各メンバーが、*bcsii*、*bcsiii*、*yjbE*、*fhaB*、*pehA*、*otsB*、*treZ*、*glsA2*、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される遺伝子に導入された少なくとも1つの遺伝子変異を含む、項目1に記載の方法。

(項目33)

前記複数のリモデリングされた窒素固定微生物が、少なくとも2つの異なる種の細菌を含む、項目1に記載の方法。

(項目34)

前記複数のリモデリングされた窒素固定微生物が、同じ種の細菌の少なくとも2つの異なる菌株を含む、項目1に記載の方法。

(項目35)

前記複数のリモデリングされた窒素固定微生物が、*Paenibacillus polymyxa*、*Paraburkholderia tropica*、*Herbaspirillum aquaticum*、*Metakosakonia intestini*、*Rahnella aquatilis*、*Klebsiella variicola*、*Achromobacter spiritinus*、*Achromobacter marplatensis*、*Microbacterium murale*、*Kluyvera intermedia*、*Kosakonia pseudosacchari*、*Enterobacter*種、*Azospirillum lipoferum*、*Kosakonia sacchari*、及びそれらの組み合わせから選択される細菌を含む、項目1に記載の方法。

(項目36)

前記複数のリモデリングされた窒素固定微生物が、着生植物または根圏である、項目1に記載の方法。

(項目37)

前記複数のリモデリングされた窒素固定微生物が、以下：*ATCC PTA-126575*として寄託された細菌、*ATCC PTA-126576*として寄託された細菌、*ATCC PTA-126577*として寄託された細菌、*ATCC PTA-126578*として寄託された細菌、*ATCC PTA-126579*として寄託された細菌、*ATCC PTA-126580*として寄託された細菌、*ATCC PTA-126584*として寄託された細菌、*ATCC PTA-126586*として寄託された細菌、*ATCC PTA-126587*として寄託された細菌、*ATCC PTA-126588*として寄託された細菌、*NCMA 201701002*として寄託された細菌、*NCMA 201708004*として寄託された細菌、*NCMA 201708003*として寄託された細菌、*NCMA 201708002*として寄託された細菌、*NCMA 201712001*として寄託された細菌、*NCMA 201712002*として寄託された細菌、及びこれらの組み合わせから選択される、項目1に記載の方法。

(項目38)

前記複数のリモデリングされた窒素固定微生物が、配列番号177~260、296~303、及び458~469から選択される核酸配列に対して少なくとも約90%、95%、97%、または99%の配列同一性を共有する核酸配列を含む細菌を含む、項目1に記載の方法。

(項目39)

前記複数のリモデリングされた窒素固定微生物が、配列番号177~260、296~303、及び458~469から選択される核酸配列を含む細菌を含む、項目1に記載の方法。

(項目40)

前記複数のリモデリングされた窒素固定微生物からの前記リモデリングされた窒素固定

10

20

30

40

50

微生物が、トランスジェニック及び非属間の 1 つである、項目 1 に記載の方法。

(項目 4 1)

作物の対照セットと比較して農業場所において、収穫高の一貫性が改善された複数の作物であって、

複数のリモデリングされた窒素固定微生物と関連した複数の作物を含み、それにより、前記複数の作物が、それらの植物内固定 N の少なくとも 1 % を前記リモデリングされた微生物から受け取り、

前記場所全体で測定された平均収穫高の前記標準偏差が、1 エーカー当たりのブッシュェルで、対照の複数の作物が前記場所に提供される場合、前記対照の複数の作物と比較して、前記窒素固定微生物と関連する前記複数の作物についてより低くなる、前記作物。

10

(項目 4 2)

前記作物が穀類植物である、項目 4 1 に記載の複数の作物。

(項目 4 3)

前記作物が、トウモロコシ、イネ、コムギ、オオムギ、モロコシ、キビ、オーツムギ、ライムギ、またはライコムギである、項目 4 1 に記載の複数の作物。

(項目 4 4)

前記リモデリングされた窒素固定微生物と関連する前記複数の作物の平均収穫高の前記標準偏差は、前記対照の複数の作物の前記標準偏差よりもエーカー当たり少なくとも約 15 ブッシュェル低く、前記対照の複数の作物は、前記窒素固定微生物と関連していない、項目 4 1 に記載の複数の作物。

20

(項目 4 5)

前記リモデリングされた窒素固定微生物と関連する前記複数の作物間の前記平均収穫高が、前記対照の複数の作物の前記平均収穫高の 1 ~ 10 % 以内であり、前記対照の複数の作物が、前記窒素固定微生物と関連していない、項目 4 1 に記載の複数の作物。

(項目 4 6)

前記場所が農業的に困難な土壌を含む、項目 4 1 に記載の複数の作物。

(項目 4 7)

前記場所が、対照土壌における作物の平均収穫高と比較して、対照土壌に対する高い砂含有量、高い水分含有量、不利な pH、水はけの悪さ、及び不採算土壌における作物の平均収穫高によって測定される不採算性、の 1 つ以上の原因のより農業的に困難である土壌を含む、項目 4 1 に記載の複数の作物。

30

(項目 4 8)

前記場所が、少なくとも約 30 %、少なくとも約 40 %、または少なくとも約 50 % の砂を含む農業的に困難な土壌を含む、項目 4 1 に記載の複数の作物。

(項目 4 9)

前記場所が、約 30 % 未満のシルトを含む農業的に困難な土壌を含む、項目 4 1 に記載の複数の作物。

(項目 5 0)

前記場所が、約 20 % 未満の粘土を含む農業的に困難な土壌を含む、項目 4 1 に記載の複数の作物。

40

(項目 5 1)

前記場所が、約 5 ~ 約 8 の pH を含む農業的に困難な土壌を含む、項目 4 1 に記載の複数の作物。

(項目 5 2)

前記場所が、約 6 . 8 の pH を含む農業的に困難な土壌を含む、項目 4 1 に記載の複数の作物。

(項目 5 3)

前記場所が、約 0 . 40 ~ 約 2 . 8 の有機物含有量を含む農業的に困難な土壌を含む、項目 4 1 に記載の複数の作物。

(項目 5 4)

50

前記場所が、砂質ロームまたはローム土壌である農業的に困難な土壌を含む、項目 4 1 に記載の複数の作物。

(項目 5 5)

前記場所全体で測定された平均収穫高が、1 エーカー当たりのブッシュェルで、対照の複数の作物が前記場所に提供される場合、前記対照の複数の作物と比較して、前記窒素固定微生物と関連する前記複数の作物についてより高くなる、項目 4 1 に記載の複数の作物。

(項目 5 6)

前記リモデリングされた窒素固定微生物が、少なくとも約 10 日～約 60 日の間に、1 エーカー当たり少なくとも約 15 ポンドの固定 N を全体で生成する、項目 4 1 に記載の複数の作物。

(項目 5 7)

外因性窒素が前記作物への側方施肥として適用されない、項目 4 1 に記載の複数の作物。

(項目 5 8)

前記リモデリングされた窒素固定微生物が、それぞれ、1 時間当たり CFU 当たり N の少なくとも約 2.75×10^{-12} mmol の固定 N を生成する、項目 4 1 に記載の複数の作物。

(項目 5 9)

前記リモデリングされた窒素固定微生物が、それぞれ、1 時間当たり CFU 当たり N の少なくとも約 4.03×10^{-13} mmol の固定 N を生成する、項目 4 1 に記載の複数の作物。

(項目 6 0)

前記リモデリングされた窒素固定微生物が、少なくとも約 20 日、30 日、または 60 日間、エーカー当たりの合計 CFU 濃度が約 5×10^{13} で、前記複数の作物の前記根の表面にコロニーを形成する、項目 4 1 に記載の複数の作物。

(項目 6 1)

前記リモデリングされた窒素固定微生物が、外因性窒素の存在下で大気中の窒素を固定することができる、項目 4 1 に記載の複数の作物。

(項目 6 2)

前記複数のリモデリングされた窒素固定微生物の各メンバーが、前記窒素固定または同化遺伝子調節ネットワークの少なくとも 1 つの遺伝子または非コードポリヌクレオチドに導入された少なくとも 1 つの遺伝子変異を含む、項目 4 1 に記載の複数の作物。

(項目 6 3)

前記複数のリモデリングされた窒素固定微生物の各メンバーが、前記窒素固定または同化遺伝子調節ネットワークの少なくとも 1 つの遺伝子に作動可能に連結された導入された制御配列を含む、項目 4 1 に記載の複数の作物。

(項目 6 4)

前記複数のリモデリングされた窒素固定微生物の各メンバーが、前記窒素固定または同化遺伝子調節ネットワークの少なくとも 1 つの遺伝子に作動可能に連結された異種プロモーターを含む、項目 4 1 に記載の複数の作物。

(項目 6 5)

前記複数のリモデリングされた窒素固定微生物の各メンバーが、以下：nifA、nifL、ntrB、ntrC、グルタミンシンターゼをコードするポリヌクレオチド、glnA、glnB、glnK、drat、amtB、グルタミナーゼをコードするポリヌクレオチド、glnD、glnE、nifJ、nifH、nifD、nifK、nifY、nifE、nifN、nifU、nifS、nifV、nifW、nifZ、nifM、nifF、nifB、nifQ、ニトロゲナーゼ酵素の生合成に関連する遺伝子、及びそれらの組み合わせ、からなる群から選択されるメンバーに導入された少なくとも 1 つの遺伝子変異を含む、項目 4 1 に記載の複数の作物。

(項目 6 6)

10

20

30

40

50

前記複数のリモデリングされた窒素固定微生物の各メンバーが、前記窒素固定または同化遺伝子調節ネットワークの、少なくとも1つの遺伝子または非コードポリヌクレオチドに導入された少なくとも1つの遺伝子変異を含み、その結果、以下：NifAまたはグルタミナーゼの発現または活性の増加、NifL、NtrB、グルタミンシンターゼ、GlnB、GlnK、DraT、AmtBの発現または活性の低下、GlnEのアデニル除去活性の低下、GlnDのウリジリル除去活性の低下のうち1つ以上が発生する、項目41に記載の複数の作物。

(項目67)

前記複数のリモデリングされた窒素固定微生物の各メンバーが、前記nifL遺伝子に異種プロモーターを含む突然変異型nifL遺伝子を含む、項目41に記載の複数の作物

10

(項目68)

前記複数のリモデリングされた窒素固定微生物の各メンバーが、アデニル除去(AR)ドメインを欠く短縮型GlnEタンパク質をもたらす突然変異型glnE遺伝子を含む、項目41に記載の複数の作物。

(項目69)

前記複数のリモデリングされた窒素固定微生物の各メンバーが、前記amtB遺伝子の発現の欠如をもたらす突然変異型amtB遺伝子を含む、項目41に記載の複数の作物。

(項目70)

前記複数のリモデリングされた窒素固定微生物の各メンバーが、exopolysaccharide産生、endopolygalacturonase産生、トレハロース産生、及びグルタミン変換からなる群から選択される経路に関与する遺伝子に導入される少なくとも1つの遺伝子変異を含む、項目41に記載の複数の作物。

20

(項目71)

前記複数のリモデリングされた窒素固定微生物の各メンバーが、bcsl、bcsl、yjbE、fhaB、pehA、otsB、treZ、glsA2、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される遺伝子に導入された少なくとも1つの遺伝子変異を含む、項目41に記載の複数の作物。

(項目72)

前記複数のリモデリングされた窒素固定微生物が、少なくとも2つの異なる種の細菌を含む、項目41に記載の複数の作物。

30

(項目73)

前記複数のリモデリングされた窒素固定微生物が、同じ種の細菌の少なくとも2つの異なる菌株を含む、項目41に記載の複数の作物。

(項目74)

前記複数のリモデリングされた窒素固定微生物が、Paenibacillus polymyxa、Paraburkholderia tropica、Herbaspirillum aquaticum、Metakosakonia intestini、Rahnella aquatilis、Klebsiella variicola、Achromobacter spiritinus、Achromobacter marplatensis、Microbacterium murale、Kluyvera intermedia、Kosakonia pseudosacchari、Enterobacter種、Azospirillum lipoferum、Kosakonia sacchari、及びそれらの組み合わせから選択される細菌を含む、項目41に記載の複数の作物。

40

(項目75)

前記複数のリモデリングされた窒素固定微生物が、着生植物または根圏である、項目41に記載の複数の作物。

(項目76)

前記複数のリモデリングされた窒素固定微生物が、以下：ATCC PTA-1265

50

75として寄託された細菌、ATCC PTA-126576として寄託された細菌、ATCC PTA-126577として寄託された細菌、ATCC PTA-126578として寄託された細菌、ATCC PTA-126579として寄託された細菌、ATCC PTA-126580として寄託された細菌、ATCC PTA-126584として寄託された細菌、ATCC PTA-126586として寄託された細菌、ATCC PTA-126587として寄託された細菌、ATCC PTA-126588として寄託された細菌、NCMA 201701002として寄託された細菌、NCMA 201708004として寄託された細菌、NCMA 201708003として寄託された細菌、NCMA 201708002として寄託された細菌、NCMA 201712001として寄託された細菌、NCMA 201712002として寄託された細菌、及びこれらの組み合わせから選択される、項目41に記載の複数の作物。

(項目77)

前記複数のリモデリングされた窒素固定微生物が、配列番号177~260、296~303、及び458~469から選択される核酸配列に対して少なくとも約90%、95%、97%、または99%の配列同一性を共有する核酸配列を含む細菌を含む、項目41に記載の複数の作物。

(項目78)

前記複数のリモデリングされた窒素固定微生物が、配列番号177~260、296~303、及び458~469から選択される核酸配列を含む細菌を含む、項目41に記載の複数の作物。

(項目79)

細菌コロニー形成植物の収穫高値に基づいて販売する作物の量を決定するためのプロセッサ実装方法であって、前記方法は、
 プロセッサを介して、及び前記プロセッサに動作可能に結合されたデータベースから、細菌コロニー形成植物の収穫高値を取得することであって、前記収穫高値が、細菌がコロニーを形成していない植物の収穫高値の標準偏差よりも低い関連標準偏差を有する、ことと、
 前記プロセッサを介して、及び前記プロセッサに動作可能に結合されたデータベースから、ある量の細菌コロニー形成植物の現在及び将来の販売に関連する価格を取得することと、
 前記プロセッサを介して、前記細菌コロニー形成植物の収穫高値ならびに現在及び将来の販売価格に基づいて、前記細菌コロニー形成植物の物理的送達量を計算することと、
 前記細菌コロニー形成植物の前記計算された物理的送達量に基づいて市場ベース商品を特定することと、
 前記プロセッサを介して、前記識別された市場ベース商品を取引するための命令を表す信号を送信することと、
 前記プロセッサで、前記識別された市場ベース商品を取引するための前記命令を送信することに応答して、前記識別された市場ベース商品の取引の確認を表す信号を受信することと、を含む前記プロセッサ実装方法。

(項目80)

前記物理的送達量の計算が、前記細菌コロニー形成植物に関連する成長期の前に実行される、項目79に記載のプロセッサ実装方法。

(項目81)

前記識別された市場ベース商品の前記取引が、前記細菌コロニー形成植物に関連する成長期の前に実行される、項目79に記載のプロセッサ実装方法。

(項目82)

前記市場ベース商品が先渡取引である、項目79に記載のプロセッサ実装方法。

(項目83)

前記市場ベース商品が先物取引である、項目79に記載のプロセッサ実装方法。

(項目84)

10

20

30

40

50

前記市場ベース商品がオプション取引である、項目 79 に記載のプロセッサ実装方法。
(項目 85)

前記市場ベース商品が商品スワップ取引である、項目 79 に記載のプロセッサ実装方法。
(項目 86)

前記識別された市場ベース商品を取引するための前記命令が取引記号を含む、項目 79 に記載のプロセッサ実装方法。
(項目 87)

前記識別された市場ベース商品の取引が二次市場内に発生する、項目 79 に記載のプロセッサ実装方法。
(項目 88)

前記細菌コロニー形成植物の前記物理的送達量を生成することをさらに含む、項目 79 に記載のプロセッサ実装方法。
(項目 89)

前記細菌コロニー形成植物を生成することが、
a . 場所に、それぞれ、1 時間当たり C F U 当たり N の少なくとも約 $5 . 4 9 \times 1 0^{-13}$ m m o l の固定 N を生成する、複数の非属間リモデリング細菌を提供することと、
b . 前記場所に前記コロニー形成前植物を提供することと、を含む項目 88 に記載のプロセッサ実施方法。
(項目 90)

前記細菌コロニー形成植物がトウモロコシ植物である、項目 79 に記載のプロセッサ実施方法。
(項目 91)

前記細菌コロニー形成植物が、導入操作された N 固定微生物を使用して生成される、項目 88 に記載のプロセッサ実装方法。
(項目 92)

前記細菌コロニー形成植物が、生物学的窒素固定を使用して生成される、項目 88 に記載のプロセッサ実装方法。
(項目 93)

前記細菌コロニー形成植物が、関連する作物のために大気中の窒素を固定することができる微小生物を使用して生成される、項目 88 に記載のプロセッサ実装方法。
(項目 94)

前記識別された市場ベース商品の取引の確認を表す前記信号が、アプリケーションプログラミングインターフェース (A P I) を介して前記プロセッサで受信される、項目 79 に記載のプロセッサ実装方法。
(項目 95)

前記データベースがトウモロコシ収穫高データを含む、項目 79 に記載のプロセッサ実装方法。
(項目 96)

前記収穫高値に関連する前記標準偏差がエーカー当たりのブッシェルで測定される、項目 79 に記載のプロセッサ実装方法。
(項目 97)

前記収穫高値に関連する前記標準偏差がエーカー当たり 19 ブッシェルよりも低い、項目 79 に記載のプロセッサ実装方法。
(項目 98)

前記細菌コロニー形成植物の前記収穫高値が、細菌がコロニーを形成していない植物の前記収穫高値の 1 ~ 10 % 以内である、項目 79 に記載のプロセッサ実施方法。
(項目 99)

前記細菌コロニー形成植物の前記物理的送達量が、前記細菌コロニー形成植物の予測された物理的送達量である、項目 79 に記載のプロセッサ実装方法。

10

20

30

40

50

(項目 1 0 0)

前記細菌コロニー形成植物の前記予測される物理的送達量が、前記細菌がコロニー形成されていない植物のより低い収穫高をこれまで生成してきた土地で成長した細菌コロニー形成植物の予測量を含む、項目 9 9 に記載のプロセッサ実施方法。

(項目 1 0 1)

保険商品の価格設定及び取引のためのプロセッサ実装方法であって、前記方法は、提案された保険商品に関する情報をプロセッサを介して受信することと、前記プロセッサを介して、細菌コロニー形成植物の収穫高値に基づいて前記提案された保険商品の価格を計算することとであって、前記収穫高値が、細菌がコロニーを形成していない植物の収穫高値の標準偏差よりも低い関連標準偏差を有する、計算することと、を含む、前記方法。

10

(項目 1 0 2)

前記プロセッサを介して、販売者の計算機から、保険を販売するオファーを表す信号を送信することとであって、保険を販売する前記オファーが、前記提案された保険商品の計算された価格を含む、送信することと、前記プロセッサで、前記提案された保険商品の前記価格を送信することに応答して、保険販売の前記オファーの受諾を表す信号を受信することと、をさらに含む、項目 1 0 1 に記載のプロセッサ実装方法。

(項目 1 0 3)

前記提案された保険商品の前記価格計算が、前記細菌コロニー形成植物に関連する成長期の前に実行される、項目 1 0 1 に記載のプロセッサ実装方法。

20

(項目 1 0 4)

保険を販売する前記オファーを表す前記信号を送信することは、前記細菌コロニー形成植物に関連する成長期の前に実行される、項目 1 0 1 に記載のプロセッサ実装方法。

(項目 1 0 5)

前記収穫高値が、
 a . 場所に、それぞれ、1 時間あたり C F U 当たり N の少なくとも約 $5 . 4 9 \times 1 0^{-13}$ m m o l の固定 N を生成する、複数の非属間リモデリング細菌を提供することと、
 b . 前記場所にコロニー形成前植物を提供することと、を含むプロセスによる前記細菌コロニー形成植物の生成に基づく、項目 1 0 1 に記載のプロセッサ実装方法。

30

(項目 1 0 6)

a . 場所に、それぞれ、1 時間あたり C F U 当たり N の少なくとも約 $5 . 4 9 \times 1 0^{-13}$ m m o l の固定 N を生成する、複数の非属間リモデリング細菌を提供することと、
 b . 前記場所にコロニー形成前植物を提供することと、によって、前記コロニー形成前植物を使用して、前記細菌コロニー形成植物を生成することをさらに含む、項目 1 0 1 に記載のプロセッサ実装方法。

(項目 1 0 7)

前記細菌コロニー形成植物がトウモロコシ植物である、項目 1 0 1 に記載のプロセッサ実施方法。

(項目 1 0 8)

前記収穫高値が、導入操作された N 固定微生物を使用することを含むプロセスによる、細菌コロニー形成植物の生成に基づいている、項目 1 0 1 に記載のプロセッサ実施方法。

40

(項目 1 0 9)

前記収穫高値が、前記細菌コロニー形成植物の生成に基づき、生物学的窒素固定を使用することを含むプロセスによる、項目 1 0 1 に記載のプロセッサ実施方法。

(項目 1 1 0)

前記収穫高値が、前記細菌コロニー形成植物の生成に基づき、関連する作物のために大気中の窒素を固定することができる微小生物を使用することを含むプロセスによる、項目 1 0 1 に記載のプロセッサ実装方法。

(項目 1 1 1)

50

保険を販売する前記オファーを表す前記信号が、アプリケーションプログラミングインターフェース（API）を介して送信される、項目101に記載のプロセッサ実装方法。

(項目112)

保険を販売する前記オファーの受諾を表す前記信号がAPIを介して受信される、項目101に記載のプロセッサ実装方法。

(項目113)

保険を販売する前記オファーを表す前記信号が、前記細菌コロニー形成植物の前記収穫高値をさらに含む、項目101に記載のプロセッサ実装方法。

(項目114)

商品の価値を高める方法であって、前記方法が、
栄養素供給微小生物の存在下で前記商品を栽培することにより、前記商品の収穫高のばらつきを低減させることを含む、前記方法。

(項目115)

前記商品を販売することができる複数の市場のそれぞれについて、前記商品の販売のため複数の異なる価格を決定することをさらに含む、項目114に記載の方法。

(項目116)

前記商品の収穫高の前記ばらつきを減少させることにより、前記商品の販売者が、前記商品の価格が高い市場への前記商品の販売を増加させることができ、または、前記商品の前記販売者が、前記商品の価格が低い市場への前記商品の販売を減少させることができる、項目115に記載の方法。

(項目117)

前記商品の価格がより高い前記市場が、前記商品の生産シーズンの前に発生する市場を含む、項目116に記載の方法。

(項目118)

前記商品の価格がより低い前記市場が、前記商品の生産シーズンの後に発生する市場を含む、項目116または117に記載の方法。

(項目119)

前記商品が作物である、項目114～118のいずれか一項に記載の方法。

(項目120)

前記栄養素供給微小生物の存在下で前記作物を成長させることが、前記作物への前記提供された栄養素の利用可能性を改善する、項目119に記載の方法。

(項目121)

前記作物がトウモロコシである、項目120に記載の方法。

(項目122)

前記1つ以上の栄養素が窒素を含み、前記微小生物が窒素固定細菌である、項目120に記載の方法。

(項目123)

前記商品の収穫高の前記ばらつきが、農業従事者の圃場全体の前記商品の収穫高のばらつきを含む、項目114～122のいずれか一項に記載の方法。

(項目124)

前記商品の収穫高の前記ばらつきが、実質的に気象条件に応じたばらつきに起因する、項目114～122のいずれか一項に記載の方法。

(項目125)

商品の保険費用を低減する方法であって、前記方法が、
栄養素供給微小生物の存在下で前記商品を栽培することにより、前記商品の収穫高のばらつきを低減させることを含む、前記方法。

(項目126)

前記商品が作物である、項目125に記載の方法。

(項目127)

前記栄養素供給微小生物の存在下で前記作物を栽培することが、前記作物への前記提供

10

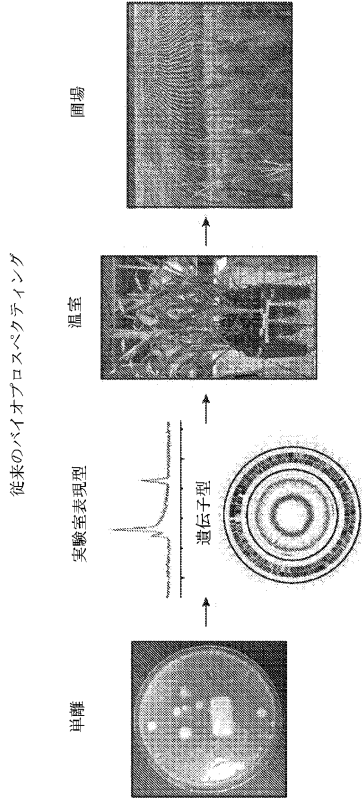
20

30

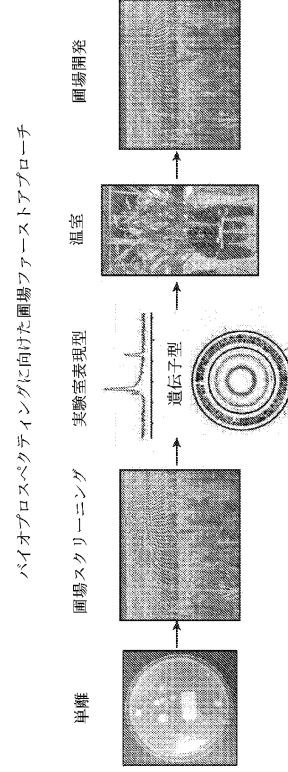
40

50

【 図 1 C 】



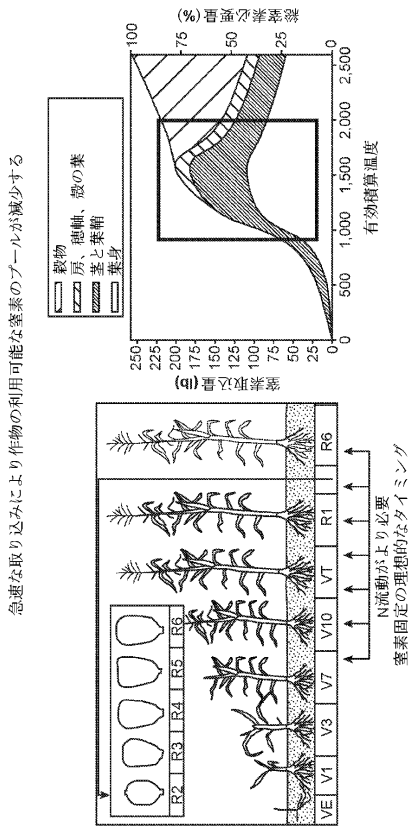
【 図 1 D 】



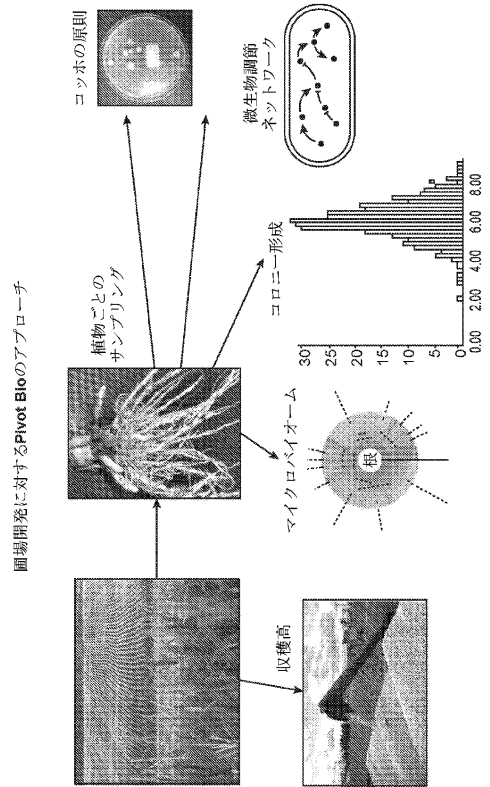
10

20

【 図 1 E 】



【 図 1 F 】

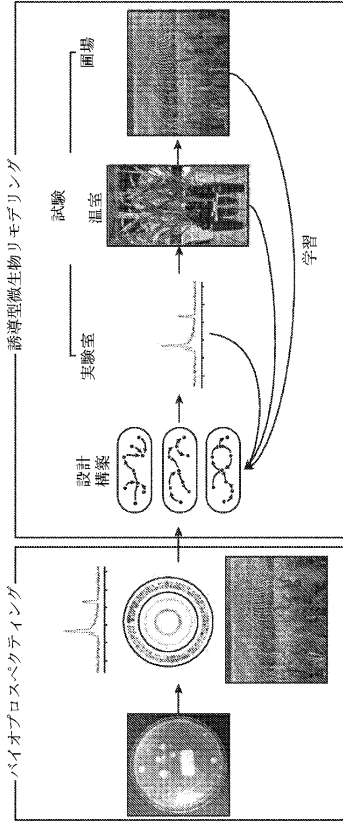


30

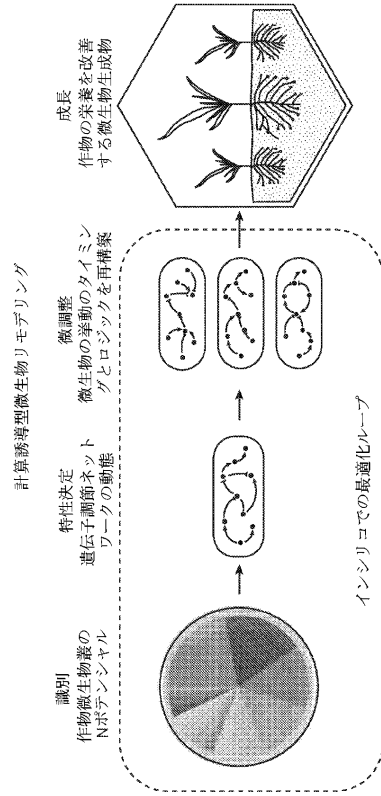
40

50

【 図 1 G 】



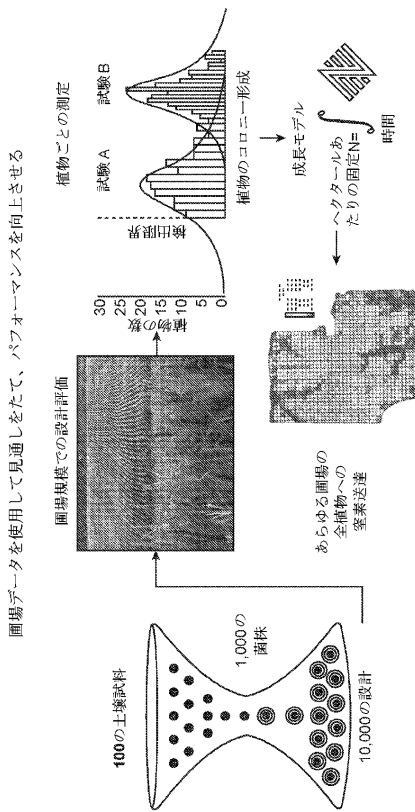
【 図 1 H 】



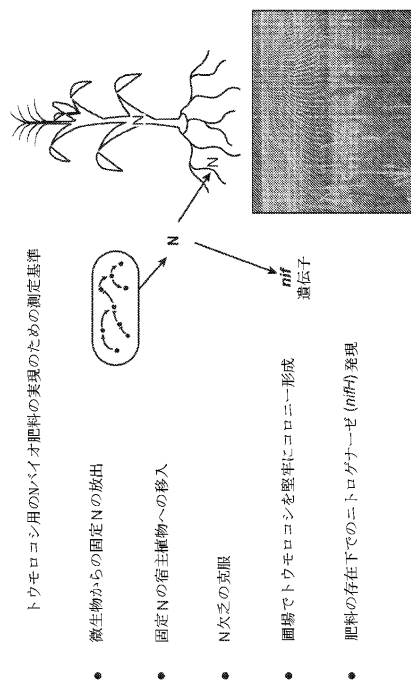
10

20

【 図 1 I 】



【 図 1 J 】

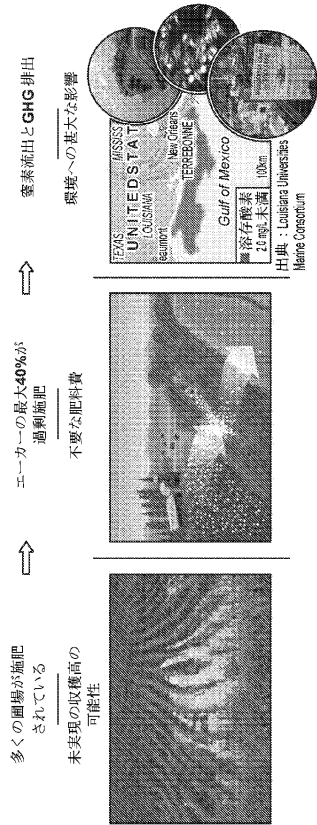


30

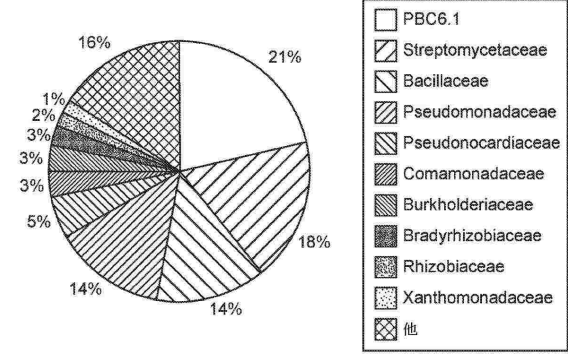
40

50

【 図 10 】



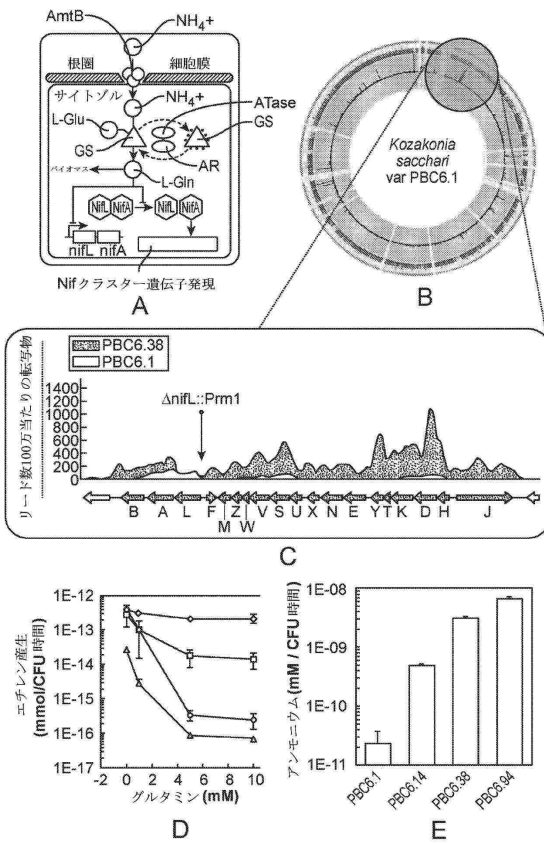
【 図 2 】



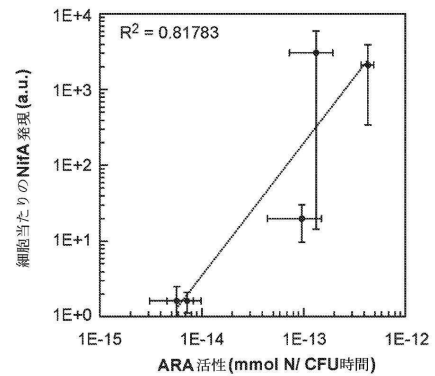
10

20

【 図 3 】



【 図 4 】

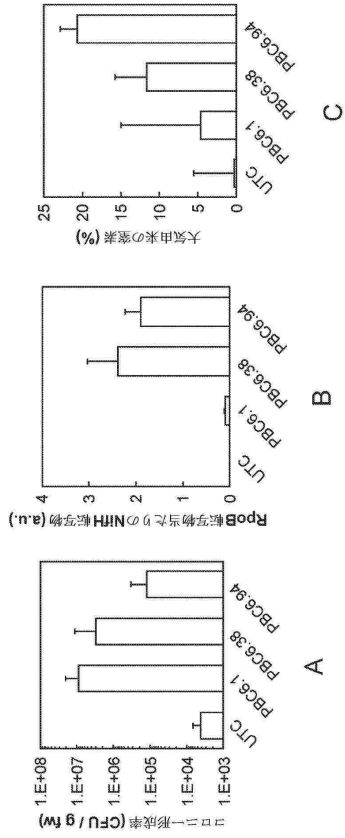


30

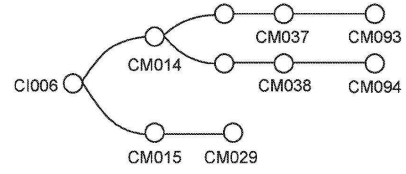
40

50

【 図 5 】



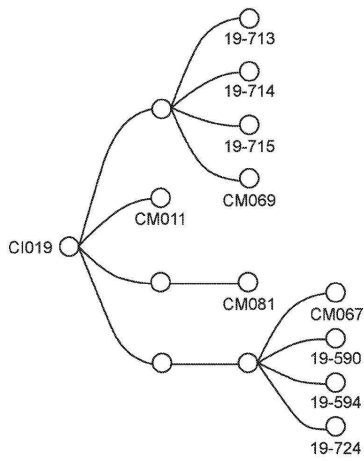
【 図 6 】



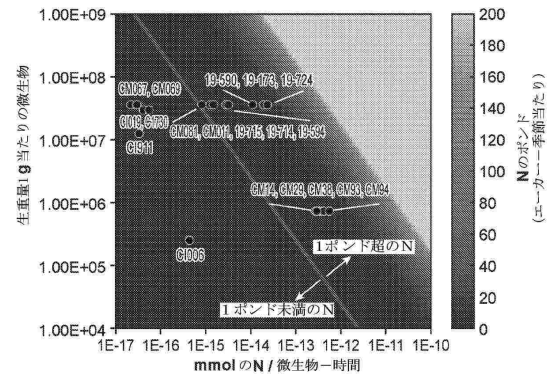
10

20

【 図 7 】



【 図 8 】



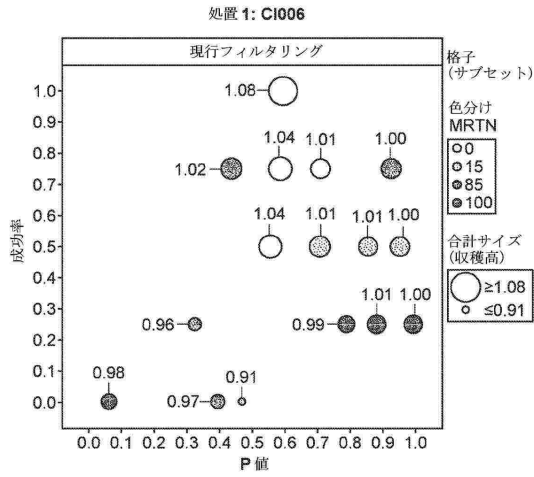
30

40

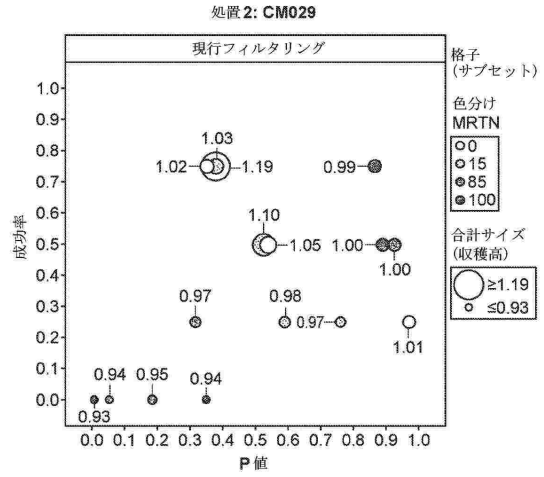
菌株名	活性 (mmol N / 微生物-時間)	コロニー形成ピーク (CFU / g fw)
CI006	4.45E-16	2.55E+05
CM038	3.26E-13	7.39E+05
CM014	2.72E-13	7.39E+05
CM093	4.27E-13	7.39E+05
CM094	5.49E-13	7.39E+05
CM029	2.95E-13	7.39E+05
CI019	4.32E-17	2.89E+07
CM011	2.95E-15	3.49E+07
CM067	2.30E-17	3.49E+07
CM069	3.10E-17	3.49E+07
CM081	8.63E-16	3.49E+07
19-715	1.28E-15	3.49E+07
19-714	1.57E-15	3.49E+07
19-594	3.31E-15	3.49E+07
19-590	1.14E-14	3.49E+07
19-713	1.96E-14	3.49E+07
19-724	2.41E-14	3.49E+07
CI911	3.48E-17	1.24E+07
CI730	5.64E-17	2.89E+07

50

【 図 9 】

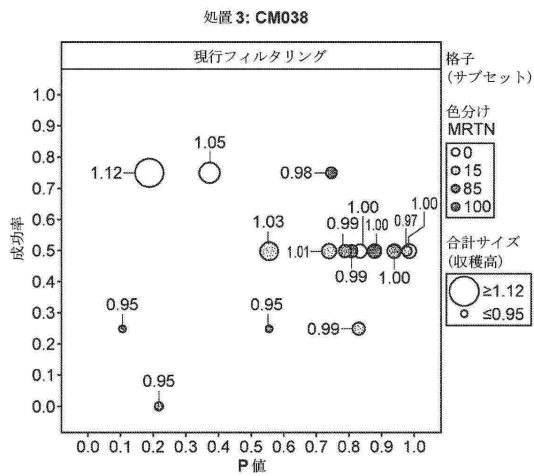


【 図 10 】

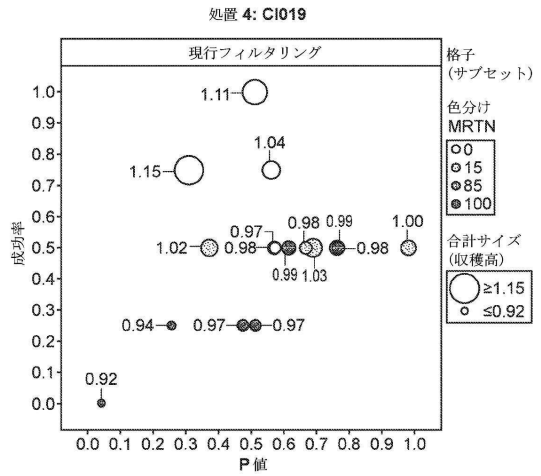


10

【 図 11 】



【 図 12 】



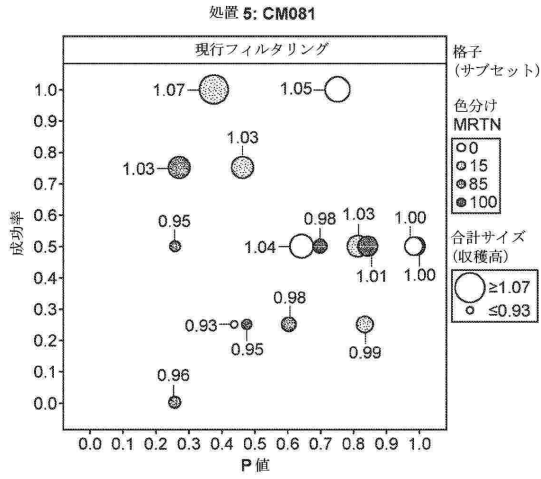
20

30

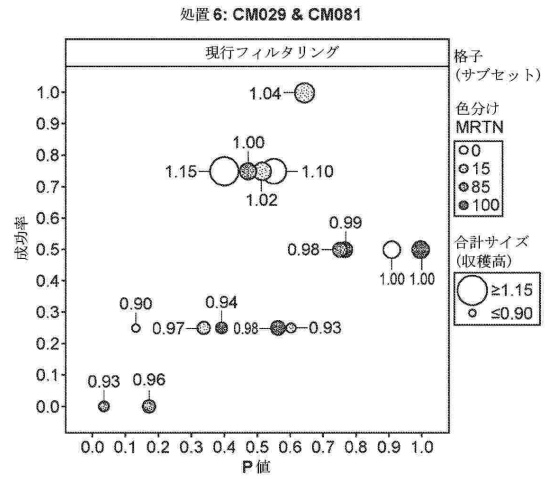
40

50

【 図 1 3 】

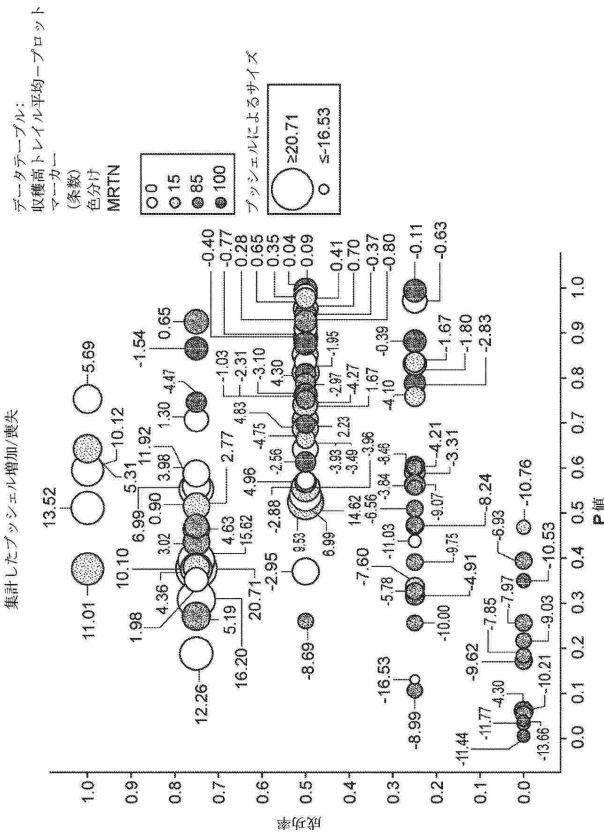


【 図 1 4 】

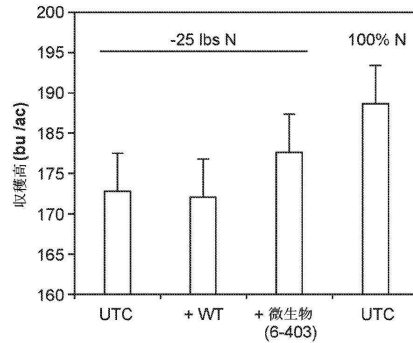


10

【 図 1 5 】



【 図 1 6 】



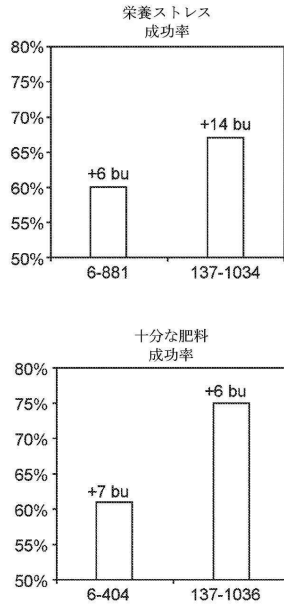
20

30

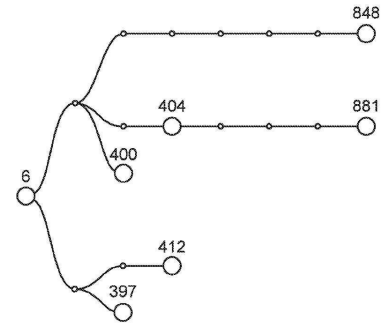
40

50

【 図 17 】

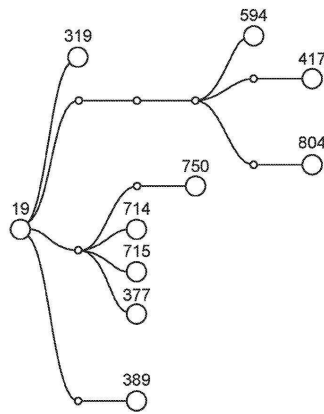


【 図 18 】

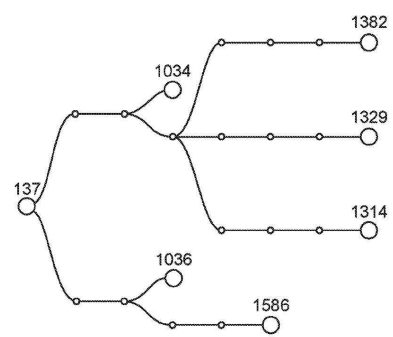


10

【 図 19 】



【 図 20 】



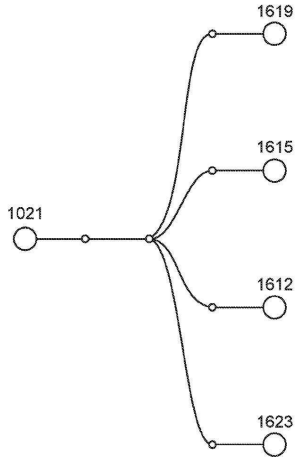
20

30

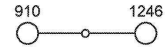
40

50

【 図 2 1 】

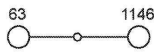


【 図 2 2 】

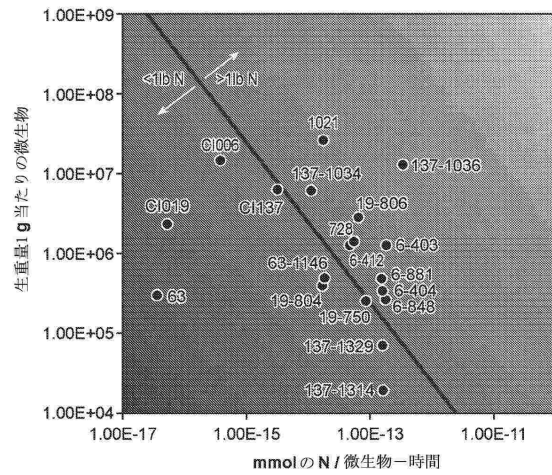


10

【 図 2 3 】



【 図 2 4 】



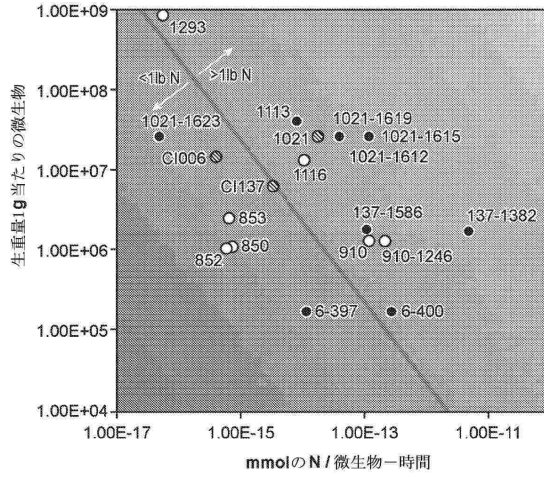
20

30

40

50

【 図 2 5 】



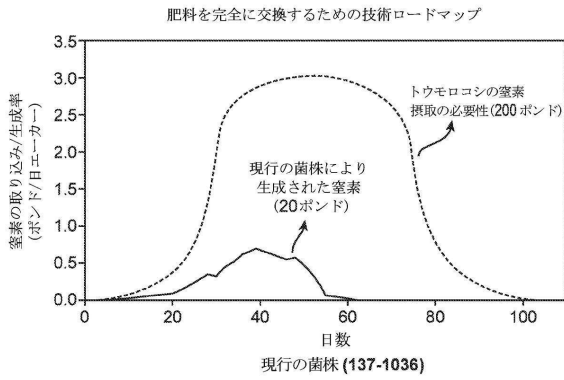
【 図 2 6 】

高等植物のミネラル栄養	 自由生活性の (例: Azotobacter, Klebsiella, Rhodospirillum)	独立栄養生物: 光合成	25
	 結合 (例: Azospirillum, Azotobacter paspali)	従属栄養生物: 植物の残留物 の養分	0.1 - 0.5
	 共生 (例: Rhizobium, 放線菌)	宿主植物からの 根の浸出液	12 - 313
	 共生 (例: Rhizobium, 放線菌)	スクロース (及び宿主植物からの 他の炭水化物)	マメ科植物: 57 - 600 結実後の非マメ科植物: 2 - 300
N_2 固定の システム ($N_2 \rightarrow NH_3$) 及び 関与する微生物		エネルギー源 (有機炭素)	固定能力 (kg N/ha・年)

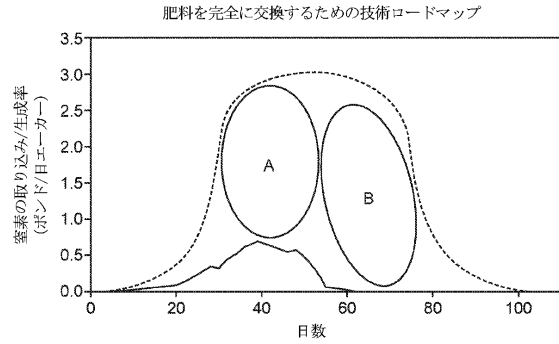
10

20

【 図 2 7 】



【 図 2 8 A 】

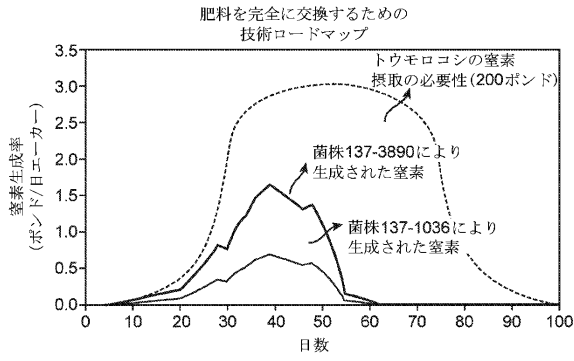


30

40

50

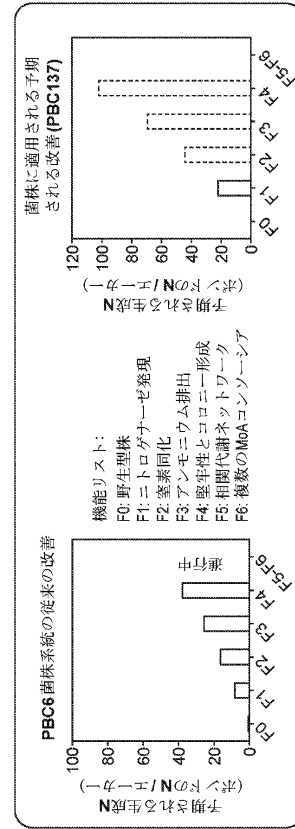
【 図 2 8 B 】



【 図 2 9 A 】

菌株の活性を5倍に改善

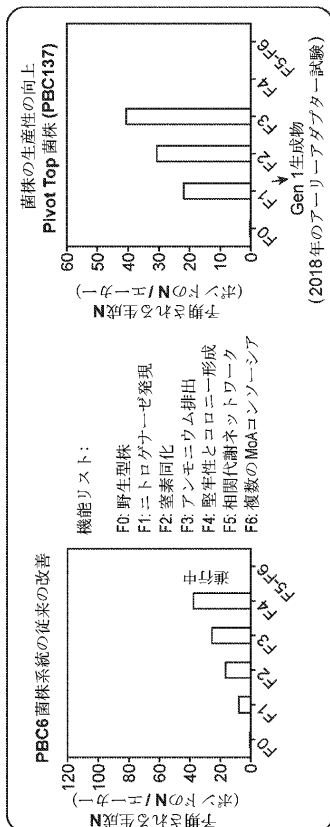
- 従来の菌株から学習した以前の標的を現在の菌株に適用
- 期待される改善: 40~60ポントN/エーカー



10

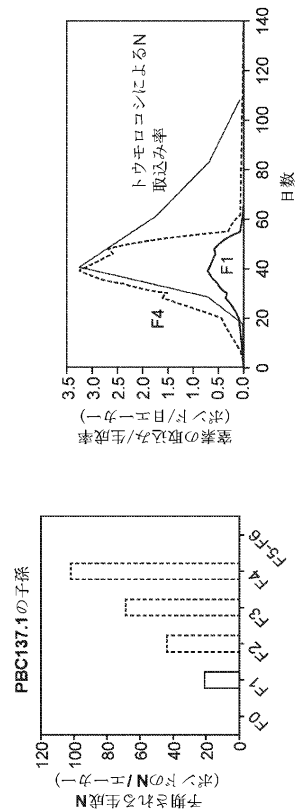
20

【 図 2 9 B 】



【 図 3 0 A 】

PBC137.1菌株の予測される性能



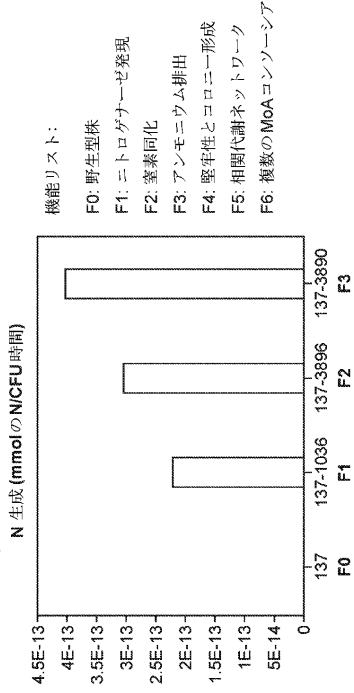
30

40

50

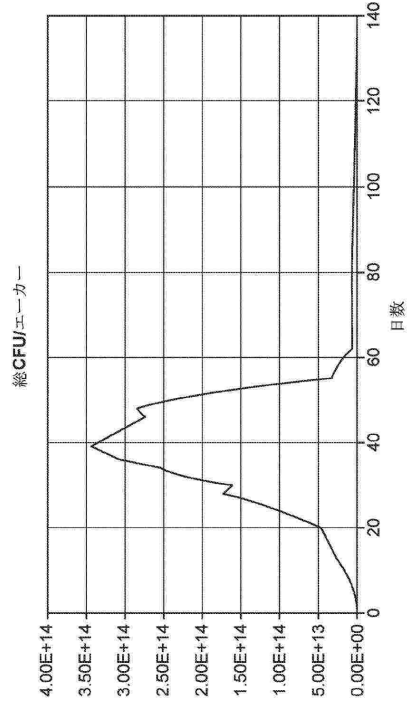
【 3 0 B 】

topリモデリング菌株137のN生成率



【 3 1 】

17ポイントのNを提供するリモデリング菌株137-1036は以下の活性を有する:
5.49E-13 mmolのN/1時間あたりCFUまたは4.07E-16ポイントのN/1日あたりCFU

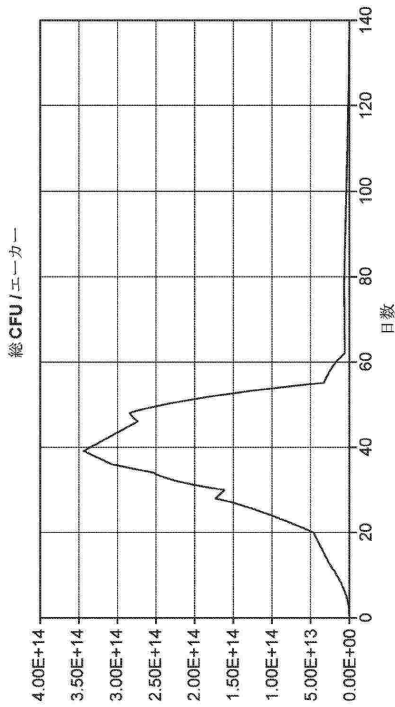


10

20

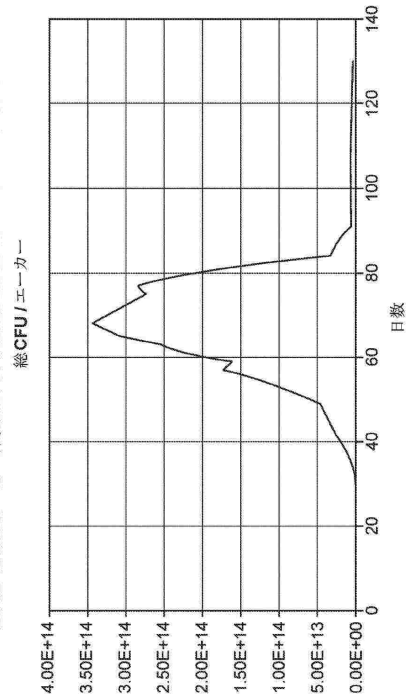
【 3 2 】

137-1036のリモデリング子孫は、100ポイントのNを提供することを目標としており、以下の活性が期待される:
2.75E-12 mmolのN/1時間あたりCFUまたは2.03E-15ポイントのN/1日あたりCFU



【 3 3 】

137-1036のコロニー形成プロファイルと相補的なコロニー形成プロファイルを持つ微生物は、
100ポイントのNを提供することを目標としており、以下の活性が期待される:
2.75E-12 mmolのN/1時間あたりCFUまたは2.03E-15ポイントのN/1日あたりCFU



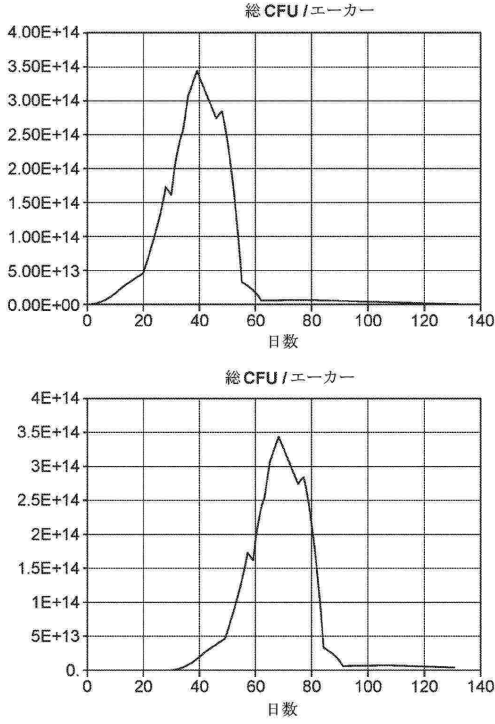
30

40

50

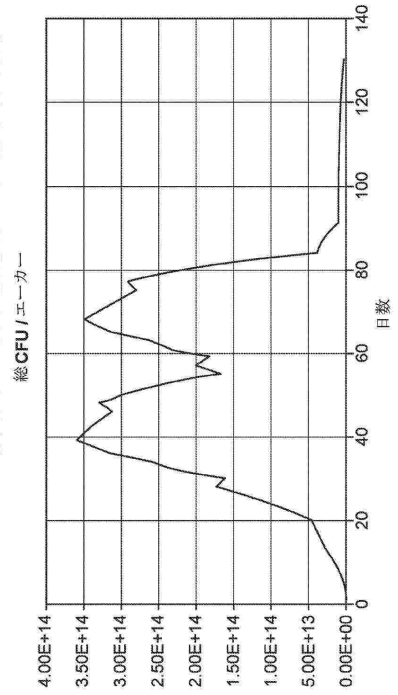
【 図 3 4 】

図31/32の137-1036コロナー形成プロファイルと図33の微生物の相補的コロナー形成プロファイルの比較



【 図 3 5 】

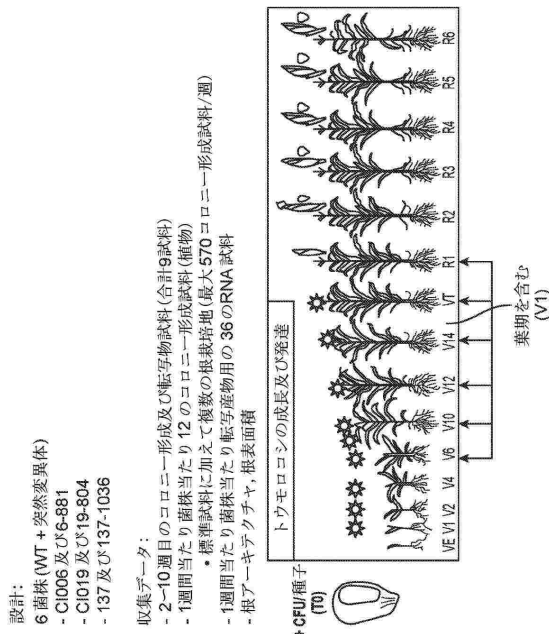
相補的なコロナー形成プロファイルを備えた微生物のコンソーシア、または示されたコロナー形成プロファイルを備えた単一の微生物のいずれか。各微生物は、100ポンドのNを提供することを目標とし、以下の活性が期待される:
 2.75E-12 mmolのN/時間あたりCFUまたは2.03E-15ポンドのN/1日あたりCFU



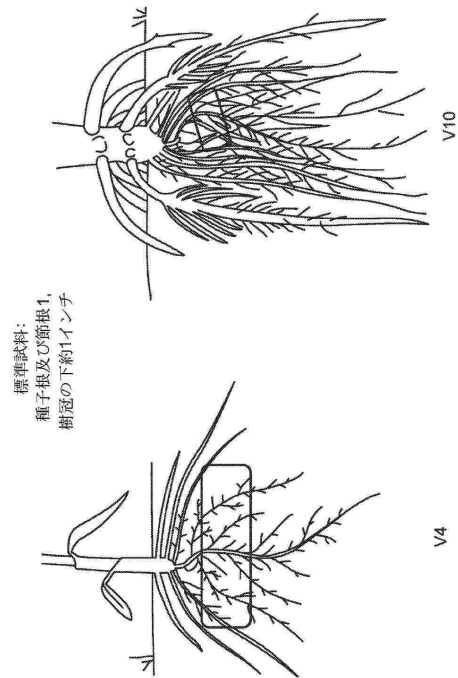
10

20

【 図 3 6 】



【 図 3 7 】



30

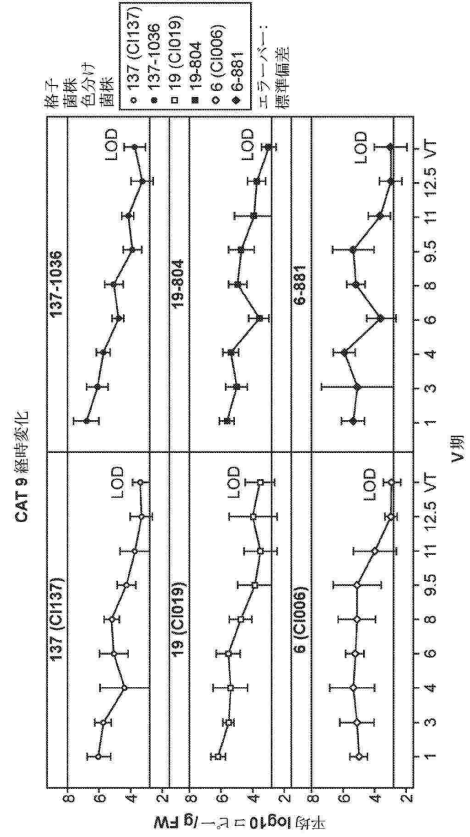
40

50

【 図 3 8 】



【 図 3 9 】



10

20

【 図 4 0 】

局在化サンプリングスキーム
節

ラウンド	0.5	1	2	3	4	5
ラウンド1	Yes	No	NA	NA	NA	NA
ラウンド2	Yes	Yes	NA	NA	NA	NA
ラウンド3	Yes	Yes	Yes	NA	NA	NA
ラウンド4	No	No	No	Yes	Yes	NA
ラウンド5	No	No	No	Yes	Yes	NA
ラウンド6	Yes	No	No	No	Yes	No
ラウンド7	Yes	No	No	No	Yes	No
ラウンド8	Yes	No	No	No	Yes	No
ラウンド9	Yes	No	No	No	Yes	No

標準試料 (○) 周辺試料 (◇)

【 図 4 1 】

CAT 9 標準試料と中間及び周辺試料

CAT9 ラウンド	6			19			137		
	標準試料	周辺	差異	標準試料	周辺	差異	標準試料	周辺	差異
CAT9 ラウンド1	5.02	4.02	1.00	6.24	5.17	1.07	6.04	5.34	0.70
CAT9 ラウンド2	5.04	3.71	1.33	5.53	4.53	1.00	5.82	4.8	1.02
CAT9 ラウンド3	5.46	4.65	0.81	5.76	4.91	0.85	4.99	4.56	0.41
CAT9 ラウンド4	5.25	3.81	1.44	5.59	4.99	0.60	5.11	4.61	0.50
CAT9 ラウンド5	5.13	3.83	1.30	4.8	3.48	1.32	5.23	4.01	1.22
CAT9 ラウンド6	5.14	3.65	1.49	3.97	2.89	1.08	4.26	3.92	0.34
CAT9 ラウンド7	3.88	2.95	0.93	3.67	2.74	0.93	3.72	3.75	-0.03
CAT9 ラウンド8	2.85	2.78	0.07	4.43	3.28	1.15	3.51	3.2	0.31
CAT9 ラウンド9	2.98	2.71	0.27	3.59	3.05	0.54	3.39	2.8	0.59
平均差異:			0.97			0.95			0.54
標準偏差:			0.49			0.25			0.40

CAT9 ラウンド	6			19			137		
	標準試料	中央根	差異	標準試料	中央根	差異	標準試料	中央根	差異
CAT9 ラウンド1	5.02	4.35	0.67	6.24	5.53	0.71	6.04	5.52	0.52
CAT9 ラウンド2	5.04	4.19	0.85	5.53	5.09	0.44	5.82	5.15	0.67
CAT9 ラウンド3	5.46	5.15	0.31	5.76	5.58	0.18	4.99	5.46	-0.47
CAT9 ラウンド4	5.25	4.35	0.90	5.59	5.2	0.39	5.11	4.61	0.50
CAT9 ラウンド5	5.13	4.57	0.56	4.8	3.97	0.83	5.23	5.01	0.22
CAT9 ラウンド6	5.14	3.62	1.52	3.97	3.08	0.89	4.26	4.1	0.16
CAT9 ラウンド7	3.88	3.2	0.68	3.67	3.32	0.35	3.72	3.75	-0.03
CAT9 ラウンド8	2.95	2.65	0.30	4.43	3.53	0.90	3.31	3.42	-0.11
平均差異:			0.70			0.59			0.18
標準偏差:			0.43			0.28			0.38

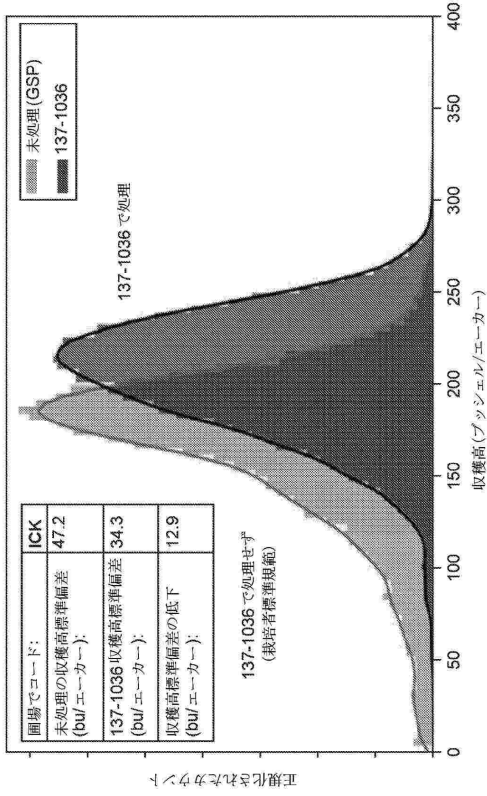
※ 有意差を示す、 $\alpha = 0.05$ (Tukey-Kramer 検定)

30

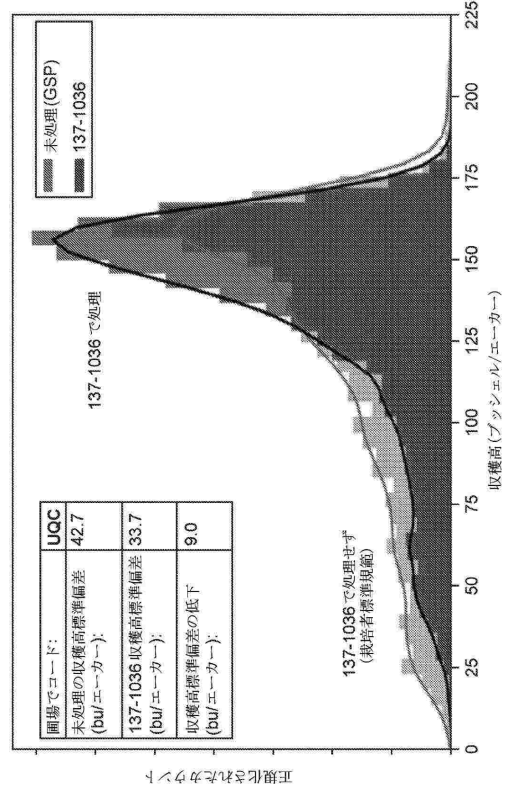
40

50

【 図 4 6 】



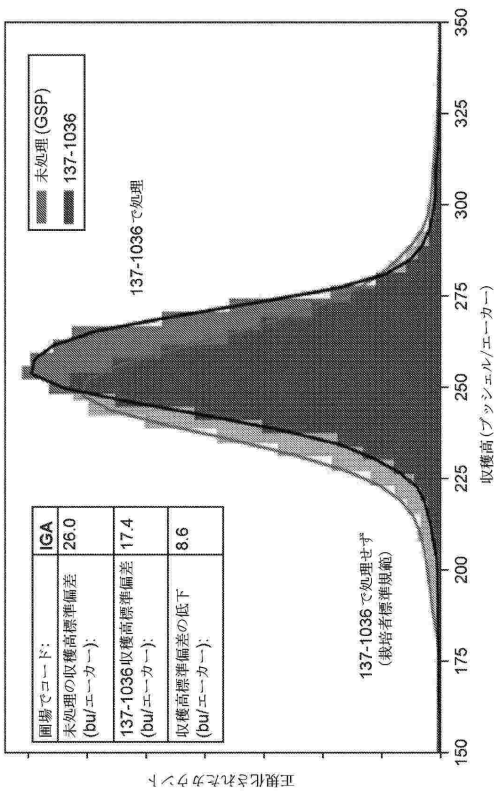
【 図 4 7 】



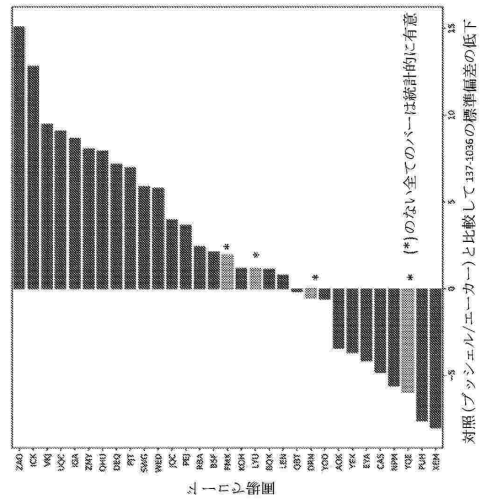
10

20

【 図 4 8 】



【 図 4 9 】

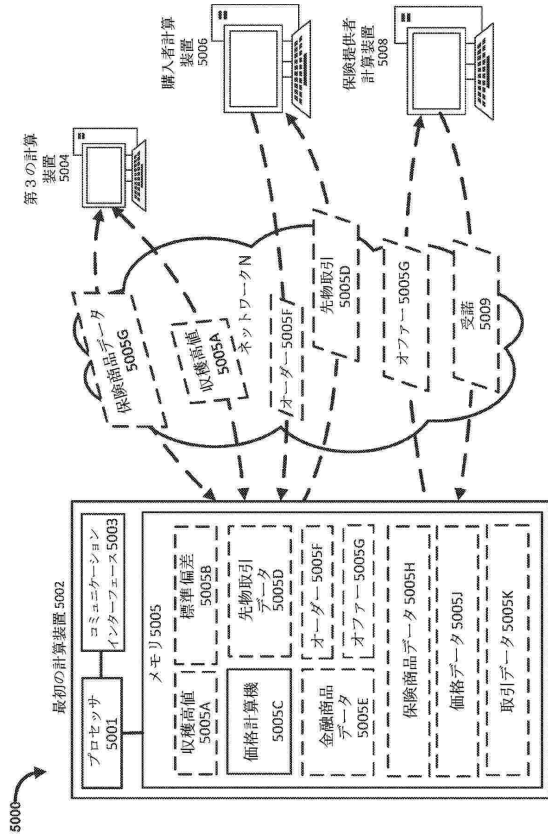


30

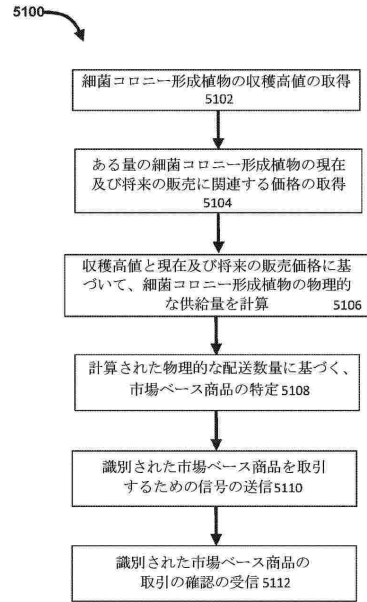
40

50

【 図 5 0 】



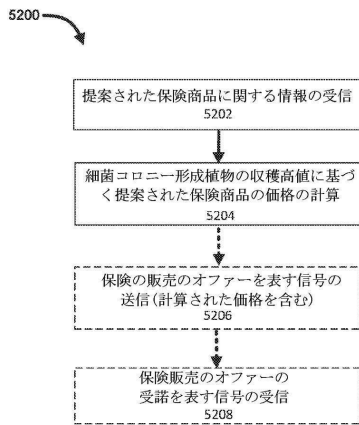
【 図 5 1 】



10

20

【 図 5 2 】



30

【 配列表 】

2024103698000001.app

40

【 外国語明細書 】

2024103698000243.pdf

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I
C 1 2 N 1/20 E

(72)発明者 マーク ライジンガー

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 7 1 0 , バークリー , セブンス ストリート 2 9 1 0 ,
ピボット バイオ , インコーポレイテッド 気付

(72)発明者 アーネスト サンダース

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 7 1 0 , バークリー , セブンス ストリート 2 9 1 0 ,
ピボット バイオ , インコーポレイテッド 気付

(72)発明者 カルステン テム

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 7 1 0 , バークリー , セブンス ストリート 2 9 1 0 ,
ピボット バイオ , インコーポレイテッド 気付