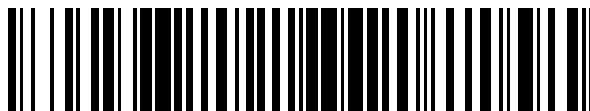


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 602 992**

21 Número de solicitud: 201690024

51 Int. Cl.:

**A01N 63/00** (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A2

22 Fecha de presentación:

**04.12.2014**

30 Prioridad:

**04.12.2013 US 61/911,577**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**23.02.2017**

71 Solicitantes:

**NEWLEAF SYMBIOTICS, INC. (100.0%)  
Brdg Park 1005 North Warson Road  
63132 St Louis MO Missouri US**

72 Inventor/es:

**FLORO, Rachel Didonato;  
LEE, Justin y  
BOGOSIAN, Gregg**

74 Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

54 Título: **Composiciones y métodos para mejorar la producción de fruta**

57 Resumen:

Composiciones y métodos para mejorar la producción de fruta.

La presente invención proporciona composiciones que comprenden Methylobacterium y exentas de sustancias que promueven el crecimiento de microorganismos residentes sobre una planta o semilla, métodos para mejorar la producción de fruta, métodos para preparar las composiciones, y métodos para tratar una planta o semilla con una composición que comprende Methylobacterium. También se proporcionan métodos y composiciones que comprenden Methylobacterium que proporcionan una producción de fruta mejorada.

## DESCRIPCIÓN

Composiciones y métodos para mejorar la producción de fruta

### Referencia cruzada a solicitudes relacionadas

Esta solicitud de patente reivindica el beneficio de la solicitud de patente provisional de EE.UU. N° 61/911.577, presentada el 4 de diciembre de 2013, que se incorpora en la presente memoria por referencia.

### Antecedentes

Compuestos orgánicos de un carbono tales como metano y metanol se encuentran extensamente en la naturaleza, y son utilizados como fuentes de carbono por bacterias clasificadas como metanótrofos y metilótrofos. Las bacterias metanotróficas incluyen especies en los géneros *Methylobacter*, *Methylomonas*, *Methylomicrobium*, *Methylococcus*, *Methylosinus*, *Methylocystis*, *Methylosphaera*, *Methylocaldum*, y *Methylocella* (Lidstrom, 2006). Los metanótrofos poseen la enzima metano monooxigenasa, que incorpora un átomo de oxígeno del O<sub>2</sub> al metano, formando metanol. Todos los metanótrofos son utilizadores de un carbono obligados que son incapaces de usar compuestos que contienen enlaces carbono-carbono. Los metilótrofos, por el contrario, pueden utilizar también compuestos orgánicos más complejos, tales como ácidos orgánicos, alcoholes superiores, azúcares y similares. Así, las bacterias metilotróficas son metilótrofos facultativos. Las bacterias metilotróficas incluyen especies en los géneros *Methylobacterium*, *Hyphomicrobium*, *Methylophilus*, *Methylobacillus*, *Methylophaga*, *Aminobacter*, *Methylorhabdus*, *Methylopila*, *Methylosulfonomonas*, *Marinosulfonomonas*, *Paracoccus*, *Xanthobacter*, *Ancylobacter* (conocido también como *Microcyclus*), *Thiobacillus*, *Rhodopseudomonas*, *Rhodobacter*, *Acetobacter*, *Bacillus*, *Mycobacterium*, *Arthobacter*, y *Nocardia* (Lidstrom, 2006).

La mayoría de las bacterias metilotróficas del género *Methylobacterium* están pigmentadas de rosa. Se denominan convencionalmente bacterias PPFM, que son metilótrofos facultativos pigmentados de rosa (siglas en inglés). Green (2005, 2006) identificó doce especies validadas en el género *Methylobacterium*, específicamente *M. aminovorans*, *M. chloromethanicum*, *M. dichloromethanicum*, *M. extorquens*, *M. fujisawaense*, *M. mesophilicum*, *M. organophilum*, *M. radiotolerans*, *M. rhodesianum*, *M. rhodinum*, *M. thiocyanatum*, y *M. zatmanii*. Sin embargo, *M. nidulans* es un *Methylobacterium* fijador de nitrógeno que no es un PPFM (Sy *et al.*, 2001). Los *Methylobacterium* son ubicuos en la naturaleza, encontrándose en el suelo, polvo, agua fresca, sedimentos y superficies de hojas, así como en entornos industriales y clínicos (Green, 2006).

**Compendio**

En la presente memoria se proporcionan composiciones que comprenden *Methylobacterium* que están exentas de sustancias que promueven el crecimiento de bacterias residentes sobre la planta o semilla, composiciones que comprenden una sustancia sólida con *Methylobacterium* adherente cultivado sobre la misma o una emulsión que tiene *Methylobacterium* cultivado en la misma, composiciones que comprenden ciertas cepas de *Methylobacterium* y derivados de las mismas y un adyuvante y/o excipiente aceptable desde el punto de vista agrícola, métodos para usar las composiciones para mejorar la producción de fruta, y métodos para preparar las composiciones. Tales composiciones se denominan en la presente memoria en ciertos casos simplemente “composiciones que contienen *Methylobacterium*”. En ciertas realizaciones, el *Methylobacterium* en la composición o que se usa es la cepa NLS0038, NLS0046, NLS0020, NLS0017, NLS0042, NLS0089, NLS0068, NLS0065, NLS0069, NLS0062, NLS0064, NLS0021, NLS0066, o NLS0037. En ciertas realizaciones, el *Methylobacterium* en la composición o que se usa es la cepa NLS0037, NLS0042, o NLS0062. En ciertas realizaciones, el *Methylobacterium* en la composición o que se usa es la cepa NLS0037, NLS0042, o NLS0062. En ciertas realizaciones de cualesquiera de las realizaciones anteriores, la composición comprende además un adyuvante y/o excipiente aceptable desde el punto de vista agrícola.

Se proporcionan en la presente memoria métodos para mejorar la producción de fruta que comprenden: (a) aplicar una composición que comprende *Methylobacterium* a una planta o semilla productora de fruta, composición que comprende: (i) una sustancia sólida con *Methylobacterium* adherente cultivado sobre la misma; (ii) una emulsión que tiene *Methylobacterium* cultivado en la misma, o (iii) composiciones que comprenden ciertas cepas de *Methylobacterium* y derivados de las mismas; en donde la planta o planta cultivada a partir de la semilla exhibe un cuajado más rápido de la fruta, cuajado de la fruta aumentado, maduración más temprana, y/o maduración de la fruta más uniforme en comparación con una planta de control no tratada, obteniendo de este modo una producción de fruta mejorada. En ciertas realizaciones, los métodos comprenden además (b) cosechar la fruta de la planta o una planta crecida a partir de la semilla. En ciertas realizaciones de los métodos, la composición comprende *Methylobacterium* en un título de aproximadamente  $1 \times 10^6$  CFU/g a aproximadamente  $1 \times 10^{14}$  CFU/g para la composición que contiene sólido o en un título de aproximadamente  $1 \times 10^6$  CFU/ml a aproximadamente  $1 \times 10^{11}$  CFU/ml para la composición que contiene emulsión. En ciertas realizaciones, la composición está exenta de sustancias que promueven el crecimiento de bacterias residentes sobre una planta o semilla. En ciertas realizaciones del método, la planta productora de fruta es una planta de

manzana, pera, uva, cítrico, melón, pimiento, tomate, baya, kiwi, mango o plátano. En ciertas realizaciones, la planta de baya es una planta de mora, fresa o arándano. En ciertas realizaciones del método, la composición aplicada reviste o reviste parcialmente la planta, una parte de la misma, o la semilla. En ciertas realizaciones, el *Methylobacterium* en la composición o que se usa se selecciona del grupo que consiste en NLS0017 (NRRL B-50931), NLS0020 (NRRL B-50930), NLS0021 (NRRL B-50939), NLS0037 (NRRL B-50941), NLS0038 (NRRL B-50942), NLS0042 (NRRL B-50932), NLS0046 (NRRL B-50929), NLS0062 (NRRL B-50937), NLS0064 (NRRL B-50938), NLS0065 (NRRL B-50935), NLS0066 (NRRL B-50940), NLS0068 (NRRL B-50934), NLS0069 (NRRL B-50936), NLS0089 (NRRL B-50933), y derivados de los mismos. En ciertas realizaciones, el *Methylobacterium* en la composición o que se usa se selecciona del grupo que consiste en NLS0037 (NRRL B-50941), NLS0038 (NRRL B-50942), NLS0042 (NRRL B-50932), NLS0062 (NRRL B-50937), y derivados de los mismos. En ciertas realizaciones, el *Methylobacterium* en la composición o que se usa se selecciona del grupo que consiste en NLS0038 (NRRL B-50942), NLS0042 (NRRL B-50932), NLS0062 (NRRL B-50937), y derivados de los mismos.

También se proporcionan en la presente memoria métodos para mejorar la producción de fruta, comprendiendo el método: (a) aplicar una composición que comprende *Methylobacterium* a una planta o semilla productora de fruta, en donde la composición comprende un *Methylobacterium* sp. seleccionado del grupo que consiste en NLS0017 (NRRL B-50931), NLS0020 (NRRL B-50930), NLS0021 (NRRL B-50939), NLS0037 (NRRL B-50941), NLS0038 (NRRL B-50942), NLS0042 (NRRL B-50932), NLS0046 (NRRL B-50929), NLS0062 (NRRL B-50937), NLS0064 (NRRL B-50938), NLS0065 (NRRL B-50935), NLS0066 (NRRL B-50940), NLS0068 (NRRL B-50934), NLS0069 (NRRL B-50936), NLS0089 (NRRL B-50933), y derivados de los mismos y un adyuvante, excipiente o combinación de los mismos aceptable desde el punto de vista agrícola. En ciertas realizaciones, los métodos comprenden además (b) cosechar fruta de la planta o una planta cultivada a partir de la semilla, en donde la planta o planta cultivada a partir de de la semilla exhibe un cuajado más rápido de la fruta, cuajado de la fruta aumentado, maduración más temprana, y/o maduración de la fruta más uniforme en comparación con una planta de control no tratada, obteniendo de este modo una producción de fruta mejorada. En ciertas realizaciones, la composición comprende *Methylobacterium* en un título de aproximadamente  $1 \times 10^6$  unidades formadoras de colonias por gramo (CFU/g) de sólido a aproximadamente  $1 \times 10^{14}$  CFU/g de sólido para una composición que comprende una sustancia sólida con *Methylobacterium* adherente cultivado sobre la misma o en un título de aproximadamente  $1 \times 10^6$  CFU/ml a aproximadamente  $1 \times 10^{11}$  CFU/ml para una composición

que comprende una emulsión que tiene *Methylobacterium* cultivado en la misma. En ciertas realizaciones, la planta productora de fruta es una planta de manzana, pera, uva, cítrico, melón, pimiento, tomate, baya, kiwi, mango o plátano. En ciertas realizaciones, la composición está exenta de sustancias que promueven el crecimiento de microorganismos residentes sobre la planta o semilla. En ciertas realizaciones, el *Methylobacterium* se selecciona del grupo que consiste en NLS0037 (NRRL B-50941), NLS0038 (NRRL B-50942), NLS0042 (NRRL B-50932), NLS0062 (NRRL B-50937), y derivados de los mismos. En ciertas realizaciones, el *Methylobacterium* se selecciona del grupo que consiste en NLS0038 (NRRL B-50942), NLS0042 (NRRL B-50932), NLS0062 (NRRL B-50937), y derivados de los mismos. En ciertas realizaciones, la composición reviste o reviste parcialmente la planta o una parte de la misma, o la semilla.

También se proporcionan en la presente memoria métodos para mejorar la producción de fruta que comprenden: (a) aplicar a una planta o semilla productora de fruta una composición que comprende *Methylobacterium* que está exenta de sustancias que promueven el crecimiento de bacterias residentes sobre dicha planta o semilla, en donde la planta o planta crecida de la semilla exhibe un cuajado más rápido de la fruta, cuajado de la fruta aumentado, maduración más temprana, y/o maduración de la fruta más uniforme en comparación con una planta de control no tratada, obteniendo de este modo una producción de fruta mejorada. En ciertas realizaciones, los métodos comprenden además (b) cosechar fruta de la planta o una planta crecida de la semilla. En ciertas realizaciones del método, la composición comprende una sustancia sólida con *Methylobacterium* adherente cultivado sobre la misma, en donde el título de *Methylobacterium* es de aproximadamente  $1 \times 10^6$  CFU/g a aproximadamente  $1 \times 10^{14}$  CFU/g, o comprende un líquido, una sustancia sólida con *Methylobacterium* adherido a la misma en un líquido, una sustancia sólida con *Methylobacterium* adherido a la misma en una emulsión, o una emulsión que tiene *Methylobacterium* cultivado en la misma en un título de aproximadamente  $1 \times 10^6$  CFU/ml a aproximadamente  $1 \times 10^{11}$  CFU/ml. En ciertas realizaciones del método, la planta productora de fruta es una planta de manzana, pera, uva, cítrico, melón, pimiento, tomate, baya, kiwi, mango o plátano. En ciertas realizaciones, la planta de baya es una planta de mora, fresa o arándano. En ciertas realizaciones del método, la composición aplicada reviste o reviste parcialmente la planta, una parte de la misma, o la semilla. En ciertas realizaciones, el *Methylobacterium* en la composición o que se usa se selecciona del grupo que consiste en NLS0017 (NRRL B-50931), NLS0020 (NRRL B-50930), NLS0021 (NRRL B-50939), NLS0037 (NRRL B-50941), NLS0038 (NRRL B-50942), NLS0042 (NRRL B-50932), NLS0046 (NRRL B-50929), NLS0062 (NRRL B-50937), NLS0064 (NRRL B-50938), NLS0065 (NRRL B-50935), NLS0066 (NRRL B-50940), NLS0068 (NRRL B-50934),

NLS0069 (NRRL B-50936), NLS0089 (NRRL B-50933), y derivados de los mismos. En ciertas realizaciones, el *Methylobacterium* en la composición o que se usa se selecciona del grupo que consiste en NLS0037 (NRRL B-50941), NLS0038 (NRRL B-50942), NLS0042 (NRRL B-50932), NLS0062 (NRRL B-50937), y derivados de los mismos. En ciertas realizaciones, el *Methylobacterium* se selecciona del grupo que consiste en NLS0038 (NRRL B-50942), NLS0042 (NRRL B-50932), NLS0062 (NRRL B-50937), y derivados de los mismos.

También se proporcionan en la presente memoria métodos para preparar una composición de tratamiento de una planta o semilla de planta que comprende *Methylobacterium* y está exenta de sustancias que promueven el crecimiento de bacterias residentes sobre una planta o semilla. Tales métodos comprenden (a) cultivar un mono-cultivo o co-cultivo de *Methylobacterium* en un medio que comprende: (i) una fase acuosa; (ii) una fase líquida y una fase sólida; o (iii) una emulsión, obteniendo de este modo un medio que contiene *Methylobacterium*; (b) separar el *Methylobacterium* de al menos otra porción del medio que contiene *Methylobacterium*; y (c) reconstituir el *Methylobacterium* en una matriz que carece de sustancias que promueven el crecimiento de bacterias residentes sobre una planta o semilla. En ciertas realizaciones, la etapa de separación se efectúa por centrifugación, filtración o sedimentación del medio que contiene *Methylobacterium* y retirada del exceso de líquido o emulsión del mismo. En ciertas realizaciones, la sustancia que promueve el crecimiento de bacterias residentes sobre una planta o semilla se selecciona del grupo que consiste en una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno, una fuente de fósforo, una fuente de azufre, una fuente de magnesio, y combinaciones de las mismas. En ciertas realizaciones, la matriz es un líquido, una emulsión, o uno o más sólidos, y comprende un adyuvante y/o excipiente aceptable desde el punto de vista agrícola. En ciertas realizaciones; los *Methylobacterium* se cultivan en medios que comprenden una fase líquida y una sustancia sólida con *Methylobacterium* adherente cultivado sobre la misma, la sustancia sólida es separada de la fase líquida del medio que contiene *Methylobacterium*, y la sustancia sólida con *Methylobacterium* adherente cultivado sobre la misma es reconstituida en la matriz mencionada anteriormente. En ciertas realizaciones, la sustancia sólida con *Methylobacterium* adherente no es una sustancia que promueve el crecimiento de microorganismos residentes sobre una planta, parte de planta o semilla de planta. En ciertas realizaciones, el *Methylobacterium* en la composición o que se usa se selecciona del grupo que consiste en NLS0017 (NRRL B-50931), NLS0020 (NRRL B-50930), NLS0021 (NRRL B-50939), NLS0037 (NRRL B-50941), NLS0038 (NRRL B-50942), NLS0042 (NRRL B-50932), NLS0046 (NRRL B-50929), NLS0062 (NRRL B-50937), NLS0064 (NRRL B-50938), NLS0065 (NRRL B-50935), NLS0066 (NRRL B-50940), NLS0068 (NRRL B-50934),

NLS0069 (NRRL B-50936), NLS0089 (NRRL B-50933), y derivados de los mismos. En ciertas realizaciones, el *Methylobacterium* en la composición o que se usa se selecciona del grupo que consiste en NLS0037 (NRRL B-50941), NLS0038 (NRRL B-50942), NLS0042 (NRRL B-50932), NLS0062 (NRRL B-50937), y derivados de los mismos. En ciertas realizaciones, el *Methylobacterium* se selecciona del grupo que consiste en NLS0038 (NRRL B-50942), NLS0042 (NRRL B-50932), NLS0062 (NRRL B-50937), y derivados de los mismos.

Se proporciona en la presente memoria un método para tratar una planta o semilla con una composición que comprende *Methylobacterium* y exenta de sustancias que promueven el crecimiento de bacterias residentes sobre una planta o semilla. Tal método comprende: (a) preparar una composición que contiene *Methylobacterium* que está exenta de sustancias que promueven el crecimiento de bacterias residentes sobre una planta o semilla según cualquiera de los métodos mencionados anteriormente; y, (b) aplicar la composición a una planta o semilla. En ciertas realizaciones de los métodos, la composición se aplica a la planta o una parte de la misma o semilla como una pulverización, o dicha composición se aplica a dicha planta, parte de la misma o semilla por inmersión. En ciertas realizaciones de los métodos, la composición aplicada reviste o reviste parcialmente la planta, la parte de la misma o la semilla. En ciertas realizaciones de los métodos, la sustancia sólida con *Methylobacterium* adherente no es una sustancia que promueve el crecimiento de microorganismos residentes sobre una planta o semilla. En ciertas realizaciones de los métodos, la composición comprende un adyuvante y/o excipiente aceptable desde el punto de vista agrícola. En ciertas realizaciones de cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, la composición comprende una sustancia sólida con *Methylobacterium* adherente cultivado sobre la misma, en donde el título de *Methylobacterium* es de aproximadamente  $1 \times 10^6$  CFU/g a aproximadamente  $1 \times 10^{14}$  CFU/g o comprende un líquido, una sustancia sólida con *Methylobacterium* adherido a la misma en un líquido, una sustancia sólida con *Methylobacterium* adherido a la misma en una emulsión, o una emulsión que tiene *Methylobacterium* cultivado en la misma en un título de aproximadamente  $1 \times 10^6$  CFU/ml a aproximadamente  $1 \times 10^{11}$  CFU/ml. También se proporcionan partes de plantas o semilla de plantas que están revestidas o parcialmente revestidas con una composición que comprende *Methylobacterium* que está exenta de sustancias que promueven el crecimiento de microorganismos residentes sobre una planta o semilla, en donde las partes de plantas o semillas de plantas se obtienen por cualquiera de los métodos mencionados anteriormente. En ciertas realizaciones, el *Methylobacterium* en la composición o que se usa se selecciona del grupo que consiste en NLS0017 (NRRL B-50931), NLS0020 (NRRL B-50930), NLS0021 (NRRL B-50939), NLS0037 (NRRL B-50941), NLS0038 (NRRL B-50942), NLS0042 (NRRL

B-50932), NLS0046 (NRRL B-50929), NLS0062 (NRRL B-50937), NLS0064 (NRRL B-50938), NLS0065 (NRRL B-50935), NLS0066 (NRRL B-50940), NLS0068 (NRRL B-50934), NLS0069 (NRRL B-50936), NLS0089 (NRRL B-50933), y derivados de los mismos. En ciertas realizaciones, el *Methylobacterium* en la composición o que se usa se selecciona del grupo que consiste en NLS0037 (NRRL B-50941), NLS0038 (NRRL B-50942), NLS0042 (NRRL B-50932), NLS0062 (NRRL B-50937), y derivados de los mismos.

Se proporcionan en la presente memoria métodos para tratar una planta o semilla con *Methylobacterium*. Tales métodos comprenden aplicar a una planta o semilla una composición que comprende una sustancia sólida con *Methylobacterium* adherente cultivado sobre la misma y exenta de sustancias que promueven el crecimiento de microorganismos residentes sobre una planta o semilla. En ciertas realizaciones, la composición se aplica a la planta o una parte de la misma como una pulverización, o la composición se aplica a la planta, una parte de la misma o semilla por inmersión. En ciertas realizaciones, la composición aplicada reviste o reviste parcialmente la planta, la parte de la misma, o la semilla. En ciertas realizaciones, la sustancia sólida con *Methylobacterium* no es una sustancia que promueve el crecimiento de microorganismos residentes sobre una planta o semilla. En ciertas realizaciones, la composición comprende un adyuvante y/o excipiente aceptable desde el punto de vista agrícola. En ciertas realizaciones de los métodos, la composición aplicada reviste o reviste parcialmente la planta, la parte de la misma, o la semilla. En ciertas realizaciones de los métodos, la sustancia sólida con *Methylobacterium* adherente no es una sustancia que promueve el crecimiento de microorganismos residentes sobre una planta o semilla. En ciertas realizaciones de cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, la composición comprende una sustancia sólida con *Methylobacterium* adherente cultivado sobre la misma, en donde el título de *Methylobacterium* es de aproximadamente  $1 \times 10^6$  CFU/g a aproximadamente  $1 \times 10^{14}$  CFU/g o comprende un líquido, una sustancia sólida con *Methylobacterium* adherido a la misma en un líquido, una sustancia sólida con *Methylobacterium* adherido a la misma en una emulsión, o una emulsión que tiene *Methylobacterium* cultivado en la misma en un título de aproximadamente  $1 \times 10^6$  CFU/ml a aproximadamente  $1 \times 10^{11}$  CFU/ml. También se proporcionan partes de plantas o semillas de plantas que están revestidas o parcialmente revestidas con una composición que comprende *Methylobacterium* que está exenta de sustancias que promueven el crecimiento de microorganismos residentes sobre una planta o semilla, en donde las partes de plantas o semillas de plantas se obtienen por cualquiera de los métodos mencionados anteriormente. En ciertas realizaciones, el *Methylobacterium* en la composición o que se usa se selecciona del grupo que consiste en NLS0017 (NRRL B-50931), NLS0020 (NRRL B-50930), NLS0021 (NRRL B-50939), NLS0037 (NRRL B-50941),



NLS0038 (NRRL B-50942), NLS0042 (NRRL B-50932), NLS0046 (NRRL B-50929), NLS0062 (NRRL B-50937), NLS0064 (NRRL B-50938), NLS0065 (NRRL B-50935), NLS0066 (NRRL B-50940), NLS0068 (NRRL B-50934), NLS0069 (NRRL B-50936), NLS0089 (NRRL B-50933), y derivados de los mismos. En ciertas realizaciones, el *Methylobacterium* en la composición o que se usa se selecciona del grupo que consiste en NLS0037 (NRRL B-50941), NLS0038 (NRRL B-50942), NLS0042 (NRRL B-50932), NLS0062 (NRRL B-50937), y derivados de los mismos.

Se proporciona en la presente memoria además una composición que comprende una sustancia sólida con *Methylobacterium* adherente cultivado sobre la misma, en donde la composición está exenta de sustancias que promueven el crecimiento de microorganismos residentes sobre una planta o semilla. En ciertas realizaciones, los *Methylobacterium* adherentes están en un título de al menos aproximadamente  $1 \times 10^6$  CFU/g a al menos aproximadamente  $1 \times 10^{14}$  CFU/g. En ciertas realizaciones, la composición es una composición sólida y los *Methylobacterium* están en un título de aproximadamente  $1 \times 10^6$  CFU/g a aproximadamente  $1 \times 10^{14}$  CFU/g. En ciertas realizaciones, los *Methylobacterium* adherentes en la composición sólida están en un título de al menos aproximadamente  $5 \times 10^8$  CFU/g a al menos aproximadamente  $5 \times 10^{13}$  CFU/g. En ciertas realizaciones, la composición es un líquido o una emulsión que contiene la sustancia sólida y los *Methylobacterium* están en un título de aproximadamente  $1 \times 10^6$  CFU/ml a aproximadamente  $1 \times 10^{11}$  CFU/ml. En ciertas realizaciones, los *Methylobacterium* en el líquido o emulsión están en un título de aproximadamente  $5 \times 10^8$  CFU/ml a aproximadamente  $1 \times 10^{11}$  CFU/ml. En ciertas realizaciones, los *Methylobacterium* adherentes están en un título de al menos aproximadamente  $5 \times 10^8$  CFU/g a al menos aproximadamente  $1 \times 10^{14}$  CFU/g y la composición está exenta de sustancias que promueven el crecimiento de microorganismos residentes sobre una planta o semilla. En ciertas realizaciones, la sustancia que promueve el crecimiento de microorganismos residentes sobre una planta o semilla se selecciona del grupo que consiste en una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno, una fuente de fósforo, una fuente de azufre, una fuente de magnesio, y combinaciones de las mismas. En ciertas realizaciones, la composición comprende un adyuvante y/o excipiente aceptable desde el punto de vista agrícola. En ciertas realizaciones de cualquiera de las composiciones mencionadas anteriormente, el *Methylobacterium* es la cepa NLS0038, NLS0046, NLS0020, NLS0017, NLS0042, NLS0089, NLS0068, NLS0065, NLS0069, NLS0062, NLS0064, NLS0021, NLS0066, o NLS0037. En ciertas realizaciones, el *Methylobacterium* en la composición o que se usa se selecciona del grupo que consiste en NLS0017 (NRRL B-50931), NLS0020 (NRRL B-50930), NLS0021 (NRRL B-50939), NLS0037 (NRRL B-50941), NLS0038 (NRRL B-50942), NLS0042 (NRRL B-50932),

NLS0046 (NRRL B-50929), NLS0062 (NRRL B-50937), NLS0064 (NRRL B-50938), NLS0065 (NRRL B-50935), NLS0066 (NRRL B-50940), NLS0068 (NRRL B-50934), NLS0069 (NRRL B-50936), NLS0089 (NRRL B-50933), y derivados de los mismos. En ciertas realizaciones, el *Methylobacterium* en la composición o que se usa se selecciona del grupo que consiste en NLS0037 (NRRL B-50941), NLS0038 (NRRL B-50942), NLS0042 (NRRL B-50932), NLS0062 (NRRL B-50937), y derivados de los mismos. En ciertas realizaciones de cualquiera de las composiciones mencionadas anteriormente, la sustancia sólida con *Methylobacterium* adherente cultivado sobre la misma no es una sustancia que promueve el crecimiento de microorganismos residentes sobre una planta o semilla. En ciertas realizaciones de cualquiera de las composiciones mencionadas anteriormente, la composición se adapta para el uso en el tratamiento de una planta o semilla. También se proporciona en la presente memoria una parte de planta o semilla de planta que está revestida o revestida parcialmente con cualquiera de las composiciones mencionadas anteriormente. También se proporcionan en la presente memoria métodos para tratar plantas y/o partes de plantas con las composiciones. Las plantas tratadas, partes de planta tratadas de las mismas, incluyen, pero no se limitan a, maíz, Brassica sp. (p.ej., *B. napus*, *B. rapa*, *B. juncea*), alfalfa, arroz, centeno, sorgo, mijo (p.ej., mijo perla (*Pennisetum glaucum*), mijo proso (*Panicum miliaceum*), mijo de foxtail (*Setaria italica*), mijo de dedo (*Eleusine coracana*)), girasol, cártamo, soja, tabaco, patata, cacahuetes, algodón, batata (*Ipomoea batatas*), mandioca, café, coco, piña, árboles cítricos, cacao, té, plátano, aguacate, higo, guava, mango, aceituna, papaya, anacardo, macadamia, almendra, remolachas de azúcar, caña de azúcar, avena, cebada, tomates, lechuga, judías verdes, judías de Lima, garbanzos, cucurbitáceas tales como pepino, cantalupo y melón almizcleño, ornamentales, y coníferas. Las partes de las plantas que son tratadas incluyen, pero no se limitan a, hojas, tallos, flores, raíces, semillas, fruta, tubérculos, coleóptilos y similares. Plantas ornamentales y partes de plantas que se pueden tratar incluyen, pero no se limitan a, azalea, hydrangea, hibisco, rosas, tulipanes, narcisos, petunias, clavel, flor de pascua y crisantemo. Plantas coníferas y partes de planta que se pueden tratar incluyen, pero no se limitan a, pinos tales como pino taeda, pino ellioti, pino ponderosa, pino contorta y pino Monterrey; abeto de Douglas; Tsuga del pacífico; picea de Sitka; secuoya; abetos verdaderos tales como abeto blanco y abeto balsámico; y cedros tales como cedro rojo del oeste y cedro amarillo de Alaska. Plantas de césped y partes de planta que se pueden tratar incluyen, pero no se limitan a, pasto azul anual, césped inglés anual, pasto azul de Canadá, festuca, agrostis, pasto de trigo, pasto azul de Kentucky, pasto ovillo, césped inglés, agrostis gigantea, pasto de Bermudas, pasto de San Agustín, y pasto zoysia. Semillas u otros propágulos de cualquiera de las plantas mencionadas anteriormente se pueden tratar con las composiciones proporcionadas en la

presente memoria. En ciertas realizaciones, el *Methylobacterium* en la composición o que se usa se selecciona del grupo que consiste en NLS0017 (NRRL B-50931), NLS0020 (NRRL B-50930), NLS0021 (NRRL B-50939), NLS0037 (NRRL B-50941), NLS0038 (NRRL B-50942), NLS0042 (NRRL B-50932), NLS0046 (NRRL B-50929), NLS0062 (NRRL B-50937), NLS0064 (NRRL B-50938), NLS0065 (NRRL B-50935), NLS0066 (NRRL B-50940), NLS0068 (NRRL B-50934), NLS0069 (NRRL B-50936), NLS0089 (NRRL B-50933), y derivados de los mismos. En ciertas realizaciones, el *Methylobacterium* en la composición o que se usa se selecciona del grupo que consiste en NLS0037 (NRRL B-50941), NLS0038 (NRRL B-50942), NLS0042 (NRRL B-50932), NLS0062 (NRRL B-50937), y derivados de los mismos.

## Descripción

### Definiciones

Como se emplean en la presente memoria, las frases “adheridos a la misma” y “adherentes” se refieren a *Methylobacterium* que están asociados con una sustancia sólida por cultivo, o que han sido cultivados, sobre una sustancia sólida.

Como se emplea en la presente memoria, la frase “adyuvante aceptable desde el punto de vista agrícola” se refiere a una sustancia que aumenta el rendimiento de un agente activo en una composición para tratamiento de plantas y/o partes de plantas. En ciertas composiciones, un agente activo puede comprender un mono-cultivo o co-cultivo de *Methylobacterium*.

Como se emplea en la presente memoria, la frase “excipiente aceptable desde el punto de vista agrícola” se refiere a una sustancia esencialmente inerte que se puede usar como diluyente y/o vehículo para un agente activo en una composición para tratamiento de plantas y/o partes de plantas. En ciertas composiciones, un agente activo puede comprender un mono-cultivo o co-cultivo de *Methylobacterium*.

Como se emplea en la presente memoria, el término “*Methylobacterium*” se refiere a bacterias que son metilótrofos facultativos del género *Methylobacterium*. El término *Methylobacterium*, como se emplea en la presente memoria, no abarca por tanto especies en los géneros *Methylobacter*, *Methylomonas*, *Methylomicrobium*, *Methylococcus*, *Methylosinus*, *Methylocystis*, *Methylosphaera*, *Methylocaldum*, y *Methylocella*, que son metanótrofos obligados.

Como se emplea en la presente memoria, la frase “co-cultivo de *Methylobacterium*” se refiere a un cultivo de *Methylobacterium* que comprende al menos dos cepas de

*Methylobacterium* o al menos dos especies de *Methylobacterium*.

Como se emplea en la presente memoria, la frase “microorganismo contaminante” se refiere a microorganismos en un cultivo, caldo de fermentación, producto de caldo de fermentación o composición que no fueron identificados antes de la introducción en el cultivo, caldo de fermentación, producto de caldo de fermentación o composición.

Como se emplea en la presente memoria, la frase “derivados de los mismos”, cuando se usa en el contexto de una cepa de *Methylobacterium*, se refiere a cualquier cepa que se obtiene a partir de la cepa de *Methylobacterium*. Derivados de una cepa de *Methylobacterium* incluyen, pero no se limitan a, variantes de la cepa obtenida por selección, variantes de la cepa seleccionada por mutagénesis y selección, y aislamientos transformados genéticamente obtenidos a partir de la cepa de *Methylobacterium*.

Como se emplea en la presente memoria, el término “emulsión” se refiere a una mezcla coloidal de dos líquidos inmiscibles en donde un líquido es la fase continua y el otro líquido es la fase dispersa. En ciertas realizaciones, la fase continua es un líquido acuoso y la fase dispersa es un líquido que no es miscible, o parcialmente miscible, en el líquido acuoso.

Como se emplea en la presente memoria, la frase “esencialmente exento de microorganismos contaminantes” se refiere a un cultivo, caldo de fermentación, producto de fermentación o composición donde al menos aproximadamente 95% de los microorganismos presentes por cantidad o tipo en el cultivo, caldo de fermentación, producto de fermentación o composición son los *Methylobacterium* deseados u otros microorganismos deseados de identidad predeterminada.

Como se emplea en la presente memoria, la frase “sustancia sólida inanimada” se refiere a una sustancia que es insoluble o parcialmente soluble en agua o soluciones acuosas y que o bien no está viva o bien no es una parte de un organismo aún vivo a partir del que se derivó.

Como se emplea en la presente memoria, la frase “mono-cultivo de *Methylobacterium*” se refiere a un cultivo de *Methylobacterium* que consiste en una única cepa de *Methylobacterium*.

Como se emplea en la presente memoria, el término “péptido” se refiere a cualquier polipéptido de 50 residuos de aminoácidos o menos.

Como se emplea en la presente memoria, el término “pimiento” se refiere a plantas *Capsicum sp.* Plantas *Capsicum sp.* incluyen, pero no se limitan a, *C. annuum*, *C. baccatum*,

*C. chinense*, *C. frutescens*, y *C. pubescens*.

Como se emplea en la presente memoria, el término “proteína” se refiere a cualquier polipéptido que tiene 51 o más residuos de aminoácidos.

5 Como se emplea en la presente memoria, un “pesticida” se refiere a un agente que es insecticida, fungicida, nematocida, bactericida, o cualquier combinación de los mismos.

Como se emplea en la presente memoria, la frase “agente bacteriostático” se refiere a agentes que inhiben el crecimiento de bacterias pero no matan las bacterias.

10 Como se emplea en la presente memoria, la frase “pesticida no inhibe sustancialmente el crecimiento de dicha *Methylobacterium*” se refiere a cualquier pesticida que, cuando se proporciona en una composición que comprende un producto de fermentación que comprende una sustancia sólida en donde un mono-cultivo o co-cultivo de *Methylobacterium* está adherido a la misma, da como resultado no más que un 50% de inhibición del crecimiento de *Methylobacterium* cuando la composición se aplica a una planta o parte de planta en comparación con una composición que carece del pesticida. En ciertas  
15 realizaciones, el pesticida da como resultado no más que un 40%, 20%, 10%, 5%, o 1% de inhibición del crecimiento de *Methylobacterium* cuando la composición se aplica a una planta o parte de planta en comparación con una composición que carece del pesticida.

Como se emplea en la presente memoria, el término “bacterias PPFM” se refiere sin limitación a especies bacterianas en el género *Methylobacterium* distintas a *M. nodulans*.

20 Como se emplea en la presente memoria, la frase “sustancia sólida” se refiere a una sustancia que es insoluble o parcialmente soluble en agua o soluciones acuosas.

Como se emplea en la presente memoria, la frase “fase sólida que puede ser suspendida en la misma” se refiere a una sustancia sólida que puede ser distribuida en todo un líquido por agitación.

25 Como se emplea en la presente memoria, el término “no regenerable” se refiere bien a una parte de planta o bien un producto de planta procesado que no puede ser regenerado en una planta entera.

30 Como se emplea en la presente memoria, la frase “sustancialmente toda la fase sólida está suspendida en la fase líquida” se refiere a medios en donde al menos 95%, 98%, o 99% de sustancia(s) sólida(s) que comprenden la fase sólida están distribuidos en todo el líquido por agitación.

Como se emplea en la presente memoria, la frase “sustancialmente toda la fase sólida no

está suspendida en la fase líquida” se refiere a medios donde menos que 5%, 2%, o 1% del sólido está en una forma de partículas que está distribuida en todo el medio por agitación.

Como se emplea en la presente memoria, la frase “microorganismo residente” se refiere a bacterias, hongos o levaduras residentes.

- 5 Como se emplea en la presente memoria, la frase “sustancia que promueve el crecimiento de microorganismos residentes sobre una planta o semilla” se refiere a una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno, una fuente de fósforo, y combinaciones de los mismos.

Hasta el punto en que cualquiera de las definiciones precedentes sea inconsistente con definiciones proporcionadas en cualquier referencia de patente o no de patente incorporada  
10 en la presente memoria por referencia, cualquier referencia de patente o no de patente citada en la presente memoria, o en cualquier referencia de patente o no de patente encontrada en otro sitio, se entiende que se usará en la presente memoria la definición precedente.

Composiciones que contienen *Methylobacterium* exentas de sustancias que promueven el  
15 crecimiento de bacterias residentes sobre una planta o semilla, métodos de su uso, y métodos de preparación

Se proporcionan en la presente memoria composiciones que comprenden *Methylobacterium* que están exentas de sustancias que promueven el crecimiento de bacterias residentes sobre una planta o semilla, métodos para usar las composiciones para mejorar la producción  
20 de fruta, y métodos para preparar las composiciones. En ciertas realizaciones de cualquiera de las composiciones mencionadas anteriormente, la composición comprende una sustancia sólida en donde un mono-cultivo o co-cultivo de *Methylobacterium* está adherido a la misma. En ciertas realizaciones donde el *Methylobacterium* está adherido a una sustancia sólida, la composición comprende un coloide formado por la sustancia sólida en donde un mono-  
25 cultivo o co-cultivo de *Methylobacterium* está adherido a la misma y un líquido. En ciertas realizaciones, el coloide es un gel. En ciertas realizaciones de ciertas composiciones mencionadas anteriormente, la composición es una emulsión que no contiene una sustancia sólida.

Se proporcionan composiciones que comprenden una sustancia sólida con  
30 *Methylobacterium* adherente cultivado sobre la misma. En ciertas realizaciones, el *Methylobacterium* adherente puede estar en un título de al menos aproximadamente  $5 \times 10^8$  CFU/g a al menos aproximadamente  $5 \times 10^{13}$  CFU/g o aproximadamente  $1 \times 10^{14}$  CFU/g y la composición está exenta de sustancias que promueven el crecimiento de microorganismos

residentes sobre una planta o semilla.

En ciertas realizaciones, las composiciones que contienen *Methylobacterium* proporcionadas o usadas en la presente memoria están exentas de sustancias que promueven el crecimiento de los microorganismos residentes cuando una o más de esas sustancias están ausentes o están esencialmente ausentes. En ciertas realizaciones, la composición está exenta de sustancias que promueven el crecimiento de los microorganismos residentes cuando esas sustancias están presentes en un porcentaje de no más que aproximadamente 5%, 2%, 1%, 0,5%, 0,2%, o 0,1% de la masa total, masa/volumen total, o volumen total de la composición. En ciertas realizaciones, la sustancia que promueve el crecimiento de microorganismos residentes sobre una planta o semilla se selecciona del grupo que consiste en una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno, una fuente de fósforo, una fuente de azufre, una fuente de magnesio, y combinaciones de las mismas. Fuentes de carbono incluyen, pero no se limitan a, alcoholes, monosacáridos, disacáridos, polisacáridos, lípidos, ácidos grasos y similares. Alcoholes que están exentos incluyen, pero no se limitan a, metanol, etanol, glicerol y similares. Fuentes de nitrógeno incluyen, pero no se limitan a, amoníaco y diversos compuestos que contienen grupos amino que pueden ser metabolizados por microorganismos. En ciertas realizaciones, la sustancia que está exenta es una fuente de dos o más de una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno, una fuente de fósforo, una fuente de azufre y una fuente de magnesio. Por ejemplo, la composición que está exenta de aminoácidos o péptidos y carece de otras fuentes de carbono o nitrógeno está exenta tanto de una fuente de carbono como de nitrógeno. En ciertas realizaciones, la composición comprende un adyuvante y/o excipiente aceptable desde el punto de vista agrícola.

Microorganismos residentes sobre la planta o semilla incluyen, pero no se limitan a, bacterias, hongos y levaduras. Las sustancias que promueven el crecimiento de tales microorganismos pueden ser identificadas por métodos que incluyen, pero no se limitan a, ensayar la superficie de la planta o semilla en cuanto a la cantidad o número de microorganismos presentes antes de la exposición de la planta o semilla a la sustancia (o a una composición que contiene la sustancia), exponer la planta o semilla ensayada a la sustancia o composición en paralelo con una composición de control que carece de la sustancia, y después reensayar la superficie de la planta o semilla en cuanto a la cantidad o número de microorganismos presentes después de un intervalo de tiempo adecuado y bajo condiciones adecuadas de temperatura para permitir el crecimiento de los microorganismos residentes. Los ensayos para números de microorganismos incluyen, pero no se limitan a, determinaciones de unidades formadoras de colonias por una cantidad de planta o semilla

expuesta a la sustancia y el control.

Sin buscar estar limitados por la teoría, se cree que las composiciones que contienen *Methylobacterium* proporcionadas o usadas en la presente memoria que están exentas de sustancias que promueven el crecimiento de los microorganismos residentes pueden dar como resultado resultados superiores en comparación con otras composiciones que contienen tales sustancias cuando se aplican a plantas, partes de plantas o semillas. Se cree que tales resultados superiores incluyen, pero no se limitan a, rendimiento de planta mejorado, maduración de fruta mejorado y similares. Aunque no se busca estar limitados por la teoría, se cree que las composiciones que contienen *Methylobacterium* que están exentas de sustancias que promueven el crecimiento de los microorganismos residentes permiten una colonización más eficaz y o extensiva de la planta, parte de la misma, o semilla, ya que la competición por uno o más del espacio o los nutrientes por los microorganismos residentes es reducida.

También se proporcionan en la presente memoria métodos para mejorar la producción de fruta que comprenden aplicar cualquiera de las composiciones mencionadas anteriormente proporcionadas en la presente memoria a una planta productora de fruta, parte de planta, o semilla, y cosechar fruta de la planta o una planta cultivada a partir de la semilla. En ciertas realizaciones, la composición reviste o reviste parcialmente la planta productora de fruta, parte de planta o semilla. La planta o planta cultivada a partir de la semilla exhibe un cuajado de la fruta más rápido, cuajado de la fruta aumentado, maduración más temprana, y/o produce fruta más madura en comparación con una planta de control no tratada, obteniendo de este modo una producción de fruta mejorada. En ciertas realizaciones, la fruta que es producida por los métodos y composiciones proporcionados en la presente memoria exhiben una maduración de la fruta más uniforme en que madura más fruta en un lapso de tiempo más corto en comparación con la fruta producida por una planta de control no tratado. La uniformidad aumentada de maduración de fruta proporcionada en la presente memoria puede permitir la cosecha de una fruta que es más uniforme en su grado de madurez, de tal modo que se cosecha menos fruta inmadura, inmadurada, y/o sobremadurada en comparación con la fruta cosechada de una planta de control no tratada. En ciertas realizaciones, la aplicación de las composiciones proporciona aproximadamente un 5% o 10% a aproximadamente un 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 50%, 60%, 75% o 80% de aumento en el número de fruta madurada presente durante un lapso de tiempo dado en la planta tratada, parte de planta, o una planta derivada de las mismas en comparación con la planta de control no tratada, parte de planta, o planta obtenida a partir de las mismas. En ciertas realizaciones, la aplicación de las composiciones proporciona aproximadamente un



5% o 10% a aproximadamente un 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 50%, 60%, 75% o 80% de disminución en el número de fruta inmadura, inframadurada, y/o sobremadurada cosechada de la planta tratada, parte de planta, o una planta derivada de las mismas en comparación con la planta de control no tratada, parte de planta, o planta obtenida a partir de las mismas.

5 En ciertas realizaciones, la aplicación de las composiciones proporciona al menos aproximadamente un 5%, 10%, 15% o 20% de disminución en el tiempo para el cuajado de la fruta o para la maduración de la fruta en la planta, parte de planta, o una planta derivada a partir de las mismas en comparación con la planta de control no tratada, parte de planta, o planta obtenida a partir de las mismas. En ciertas realizaciones, la aplicación de la

10 composición proporciona aproximadamente un 5% o 10% a aproximadamente un 15%, 20%, 25%, 30%, o 35% de aumento en el cuajado de la fruta o en la producción de fruta madura en la planta, parte de planta, o una planta derivada de las mismas en comparación con la planta de control no tratada, parte de planta, o planta obtenida a partir de las mismas. En ciertas realizaciones, la aplicación de la composición proporciona al menos

15 aproximadamente un 5%, 10%, 15% o 20% de disminución en el tiempo para el cuajado de la fruta o la maduración de la fruta en la planta, parte de planta, o una planta derivada a partir de las mismas en comparación con la planta de control no tratada, parte de planta, o planta obtenida a partir de las mismas. En ciertas realizaciones, la aplicación de la composición proporciona aproximadamente un 5% o 10% a aproximadamente un 15%,

20 20%, 25%, 30%, o 35% de aumento en el cuajado de la fruta o la producción de fruta madura en la planta, parte de planta, o una planta derivada de las mismas en comparación con la planta de control no tratada, parte de planta, o planta obtenida a partir de las mismas. En ciertas realizaciones, la planta productora de fruta es una planta de manzana, pera, uva, cítrico, melón, pimiento, tomate, baya, kiwi, mango o plátano, y la parte de planta es una

25 hoja, un tallo, una flor, una raíz, un tubérculo o una semilla. En ciertas realizaciones, la planta de baya es una planta de mora, fresa o arándano. En ciertas realizaciones, la planta es una planta de pimiento. En ciertas realizaciones, el método comprende además las etapas de cultivar la planta y/o la etapa de cosechar al menos una parte de planta seleccionada del grupo que consiste en una hoja, un tallo, una flor, una raíz, un tubérculo o

30 una semilla de la planta o parte de planta. En ciertas realizaciones de cualquiera de los métodos anteriores, los métodos comprenden además obtener un alimento procesado o composición de alimentación a partir de la planta o parte de planta. En ciertas realizaciones, el alimento procesado o composición de alimentación es una harina o una pasta.

También se proporcionan métodos para preparar una composición de tratamiento de plantas

35 o semillas de plantas que comprende *Methylobacterium* y está exenta de sustancias que promueven el crecimiento de bacterias residentes sobre una planta o semilla. Tal método

comprende (i) cultivar un mono-cultivo o co-cultivo de *Methylobacterium* en un medio que comprende una fase acuosa, una fase líquida y una fase sólida, o una emulsión, obteniendo de este modo un medio que contiene *Methylobacterium*; (ii) separar el *Methylobacterium* de al menos una otra porción del medio que contiene *Methylobacterium*; y (iii) reconstituir el *Methylobacterium* en una matriz que carece de sustancias que promueven el crecimiento de bacterias residentes en una planta o semilla. En ciertas realizaciones, la etapa de separación se efectúa por centrifugación, filtración o sedimentación del medio que contiene *Methylobacterium* y retirada del exceso de líquido o emulsión del mismo. En ciertas realizaciones, la sustancia que promueve el crecimiento de bacterias residentes sobre una planta o semilla se selecciona del grupo que consiste en una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno, una fuente de fósforo, y combinaciones de las mismas. En ciertas realizaciones, la matriz es un líquido, una emulsión, o uno o más sólidos, y comprende un adyuvante y/o excipiente aceptable desde el punto de vista agrícola. Aún en ciertas realizaciones; los *Methylobacterium* se cultivan en medios que comprenden una fase líquida y una sustancia sólida con *Methylobacterium* adherente cultivado sobre la misma. La sustancia sólida es separada de la fase líquida del medio que contiene *Methylobacterium*, y la sustancia sólida con *Methylobacterium* adherente cultivada sobre la misma se reconstituye en la matriz mencionada anteriormente. En ciertas realizaciones de los métodos, el *Methylobacterium* sp., se selecciona del grupo que consiste en *M. aminovorans*, *M. extorquens*, *M. fujisawaense*, *M. mesophilicum*, *M. radiotolerans*, *M. rhodesianum*, *M. nodulans*, *M. phyllosphaerae*, *M. thiocyanatum*, y *M. oryzae*. En ciertas realizaciones de los métodos, el *Methylobacterium* no es *M. radiotolerans* o *M. oryzae*. En ciertas realizaciones de los métodos, el *Methylobacterium* está adherido a una sustancia sólida. En ciertas realizaciones de los métodos, el *Methylobacterium* que está adherido a la sustancia sólida está combinado con un líquido para formar una composición que es un coloide. En ciertas realizaciones de los métodos, el coloide es un gel. En ciertas realizaciones de los métodos, el *Methylobacterium* adherido a la sustancia sólida se proporciona cultivando el *Methylobacterium* en presencia de la sustancia sólida. En ciertas realizaciones de los métodos, la composición comprende una emulsión. En ciertas realizaciones de los métodos, el *Methylobacterium* se proporciona cultivando el *Methylobacterium* en una emulsión.

Se ha encontrado que los métodos donde los *Methylobacterium* se cultivan en medios bifásicos que comprenden una fase líquida y una sustancia sólida aumentan significativamente el rendimiento resultante de *Methylobacterium* en relación a métodos donde los *Methylobacterium* se cultivan en medios líquidos solos. En ciertas realizaciones, los métodos pueden comprender cultivar los *Methylobacterium* en medios líquidos con una sustancia sólida en partículas que puede ser suspendida en el líquido por agitación bajo

condiciones que proporcionan el crecimiento de *Methylobacterium*. En ciertas realizaciones donde se usan sustancias sólidas en partículas, al menos sustancialmente toda la fase sólida puede ser suspendida así en la fase líquida tras agitación. Tales sustancias sólidas en partículas pueden comprender materiales que tienen aproximadamente 1 milímetro o menos de longitud o diámetro. En ciertas realizaciones, el grado de agitación es suficiente para proporcionar una distribución uniforme de la sustancia sólida en partículas en la fase líquida y/o niveles óptimos de aireación de cultivo. Sin embargo, en otras realizaciones proporcionadas en la presente memoria, al menos sustancialmente toda la fase sólida no está suspendida en la fase líquida, o porciones de la fase sólida están suspendidas en la fase líquida y porciones de la fase sólida no están suspendidas en la fase líquida. Se pueden usar sustancias sólidas no en forma de partículas en ciertos medios bifásicos donde la fase sólida no está suspendida en la fase líquida. Tales sustancias sólidas no en forma de partículas incluyen, pero no se limitan a, materiales que son mayores que aproximadamente 1 milímetro de longitud o diámetro. Tales sustancias sólidas en forma de partículas y no en forma de partículas también incluyen, pero no se limitan a, materiales que son porosos, fibrosos, o configurados de otro modo para proporcionar áreas superficiales aumentadas para el crecimiento adherente del *Methylobacterium*. Medios bifásicos donde porciones de la fase sólida están suspendidas en la fase líquida y porciones de la fase sólida no están suspendidas en la fase líquida pueden comprender una mezcla de sustancias sólidas en forma de partículas y no en forma de partículas. Tales sustancias sólidas en forma de partículas y no en forma de partículas usadas en cualquiera de los medios bifásicos mencionados anteriormente también incluyen, pero no se limitan a, materiales que son porosos, fibrosos, o configurados de otro modo para proporcionar áreas superficiales aumentadas para el crecimiento adherente *Methylobacterium*. En ciertas realizaciones, el medio comprende un coloide formado por un sólido y una fase líquida. Un coloide que comprende un sólido y un líquido puede ser preformado y añadido a un medio líquido o puede ser formado en un medio que contiene un sólido y un líquido. Coloides que comprenden un sólido y un líquido pueden ser formados sometiendo ciertas sustancias sólidas a un cambio químico y/o térmico. En ciertas realizaciones, el coloide es un gel. En ciertas realizaciones, la fase líquida del medio es una emulsión. En ciertas realizaciones, la emulsión comprende un líquido acuoso y un líquido que no es miscible, o sólo parcialmente miscible, en el líquido acuoso. Líquidos que no son miscibles, o sólo parcialmente miscibles, en agua incluyen, pero no se limitan a, cualquiera de los siguientes: (1) líquidos que tienen una miscibilidad en agua que es igual a o menor que la del pentanol, hexanol, o heptanol a 25 grados C; (2) líquidos que comprenden un alcohol, un aldehído, una cetona, un ácido graso, un fosfolípido, o cualquier combinación de los mismos; (3) alcoholes seleccionados

del grupo que consiste en alcoholes alifáticos que contienen al menos 5 carbonos y esteroides; (4) un aceite animal, aceite microbiano, aceite sintético, aceite vegetal, o combinación de los mismos; y/o, (5) un aceite vegetal que se selecciona del grupo que consiste en maíz, soja, algodón, cacahuate, girasol, oliva, lino, coco, palma, colza, sésamo, cártamo, y combinaciones de los mismos. En ciertas realizaciones, el líquido inmiscible o parcialmente inmiscible puede comprender al menos aproximadamente 0,02% a aproximadamente 20% de la fase líquida en masa. En ciertas realizaciones, los métodos pueden comprender obtener un medio de cultivo bifásico que comprende el líquido, el sólido, y *Methylobacterium* e incubar el cultivo bajo condiciones que proporcionen el crecimiento de *Methylobacterium*. Medios de cultivo bifásicos que comprenden el líquido, el sólido, y *Methylobacterium* pueden ser obtenidos por diversos métodos que incluyen, pero no se limitan a, cualquiera de: (a) inocular un medio bifásico que comprende el líquido y la sustancia sólida con *Methylobacterium*; (b) inocular la sustancia sólida con *Methylobacterium* e introducir después la sustancia sólida que comprende el *Methylobacterium* en el medio líquido; (c) inocular la sustancia sólida con *Methylobacterium*, incubar el *Methylobacterium* sobre la sustancia sólida, e introducir después la sustancia sólida que comprende el *Methylobacterium* en el medio líquido; o (d) cualquier combinación de (a), (b), o (c). Se describen métodos y composiciones para cultivar *Methylobacterium* en medios bifásicos que comprenden un líquido y un sólido en la solicitud de patente de EE.UU. cedida con la presente N° 13/907.161, presentada el 31 de mayo de 2013, que se incorpora en la presente memoria por referencia en su totalidad, y en la solicitud de patente internacional cedida con la presente PCT/US13/43722, presentada el 31 de mayo de 2013, que se incorpora en la presente memoria por referencia en su totalidad.

Se ha encontrado también que métodos donde se cultivan *Methylobacterium* en medios que comprenden una emulsión aumentan significativamente el rendimiento resultante de *Methylobacterium* en relación a métodos donde los *Methylobacterium* se cultivan en medios líquidos solos. En ciertas realizaciones, los métodos para preparar las composiciones proporcionadas en la presente memoria pueden comprender cultivar el agente *Methylobacterium* en una emulsión bajo condiciones que proporcionan el crecimiento de *Methylobacterium*. Se pueden obtener medios que comprenden la emulsión y *Methylobacterium* por diversos métodos que incluyen, pero no se limitan a, cualquiera de: (a) inocular un medio que comprende la emulsión con *Methylobacterium*; (b) inocular el líquido acuoso con el *Methylobacterium*, introducir el líquido no acuoso, y mezclar para formar una emulsión; (c) inocular el líquido acuoso con el *Methylobacterium*, introducir el líquido no acuoso, y mezclar para formar una emulsión; o (d) cualquier combinación de (a), (b), o (c). En ciertas realizaciones, la emulsión comprende un líquido acuoso y un líquido

que no es miscible, o sólo parcialmente miscible, en el líquido acuoso. Líquidos no acuosos que no son miscibles, o sólo parcialmente miscibles, en agua incluyen, pero no se limitan a, cualquiera de los siguientes: (1) líquidos que tienen una miscibilidad en agua que es igual a o menor que la de n-pentanol, n-hexanol o n-heptanol a 25 grados C; (2) líquidos que comprenden un alcohol, un aldehído, una cetona, un ácido graso, un fosfolípido, o cualquier combinación de los mismos; (3) alcoholes que se seleccionan del grupo que consiste en alcoholes alifáticos que contienen al menos 5, 6, o 7 carbonos y esteroides; (4) un aceite animal, aceite microbiano, aceite sintético, aceite vegetal, o combinación de los mismos; y/o, (5) un aceite vegetal que se selecciona del grupo que consiste en maíz, soja, algodón, cacahuete, girasol, oliva, lino, coco, palma, colza, sésamo, cártamo, y combinaciones de los mismos. En ciertas realizaciones, el líquido no acuoso inmiscible o parcialmente inmiscible puede comprender al menos aproximadamente 0,02% a aproximadamente 20% de la emulsión en masa. En ciertas realizaciones, el líquido no acuoso inmiscible o parcialmente inmiscible puede comprender al menos aproximadamente cualquiera de aproximadamente 0,05%, 0,1%, 0,5%, o 1% a aproximadamente 3%, 5%, 10%, o 20% de la emulsión en masa. Se describen métodos y composiciones para cultivar *Methylobacterium* en medios que comprenden una emulsión en la solicitud de patente internacional cedida con la presente PCT/US2014/040218, presentada el 30 de mayo de 2014, que se incorpora en la presente memoria por referencia en su totalidad.

En ciertas realizaciones, el caldo de fermentación, producto de caldo de fermentación, o composiciones que comprenden *Methylobacterium sp.* pueden comprender además uno o más microorganismos introducidos de identidad predeterminada distintos a *Methylobacterium*. Otros microorganismos que se pueden añadir incluyen, pero no se limitan a, microorganismos que son biopesticidas o proporcionan algún otro beneficio cuando se aplican a una planta o parte de planta. Microorganismos biopesticidas o beneficiosos de otro modo incluyen así, pero no se limitan a, diversos *Bacillus sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Coniothyrium sp.*, *Pantoea sp.*, *Streptomyces sp.*, y *Trichoderma sp.* Los biopesticidas microbianos pueden ser una bacteria, hongo, virus o protozoo. Microorganismos biopesticidas particularmente útiles incluyen diversas cepas de *Bacillus subtilis*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus pumilis*, *Pseudomonas syringae*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma virens*, y *Streptomyces lydicus*. Otros microorganismos que se añaden pueden ser aislamientos tratados por ingeniería genética o de tipo salvaje que están disponibles como cultivos puros. En ciertas realizaciones, se prevé que el microorganismo bacteriano o fúngico pueda ser proporcionado en el caldo de fermentación, producto de caldo de fermentación, o composición en la forma de una espora.

En ciertas realizaciones, el medio de cultivo líquido se prepara a partir de componentes baratos y fácilmente disponibles, que incluyen, pero no se limitan a, sales inorgánicas tales como fosfato de potasio, sulfato de magnesio y similares, fuentes de carbono tales como glicerol, metanol, ácido glutámico, ácido aspártico, ácido succínico y similares, y mezclas de aminoácidos tales como peptona, triptona y similares. Medios líquidos ilustrativos que se pueden usar incluyen, pero no se limitan a, medio de sales minerales de amonio (AMS) (Whittenbury *et al.*, 1970), medio de cultivo mínimo de Vogel-Bonner (VB) (Vogel y Bonner, 1956), y caldo LB (“Caldo Luria–Bertani”).

La sustancia sólida usada en los métodos y composiciones que proporcionan el crecimiento eficaz de *Methylobacterium* puede ser cualquier sustancia sólida adecuada que sea insoluble o sólo parcialmente soluble en agua o soluciones acuosas. Tales sustancias sólidas adecuadas son también no bactericidas o no bacteriostáticos con respecto a *Methylobacterium* cuando las sustancias sólidas se proporcionan en los medios de cultivo líquidos. En ciertas realizaciones, tales sustancias sólidas adecuadas son también sustancias sólidas que se obtienen fácilmente en forma estéril o se hacen estériles. Las sustancias sólidas usadas en la presente memoria pueden ser esterilizadas por cualquier método que proporcione la retirada de microorganismos contaminantes, e incluyen por tanto, pero no se limitan a, métodos tales como tratamiento en autoclave, irradiación, tratamiento químico, y cualquier combinación de los mismos. Estas sustancias sólidas incluyen sustancias naturales de origen animal, vegetal, microbiano, fúngico o mineral, sustancias hechas por el hombre, o combinaciones de sustancias naturales y hechas por el hombre. En ciertas realizaciones, las sustancias sólidas son sustancias sólidas inanimadas. Sustancias sólidas inanimadas de origen animal, vegetal, microbiano o fúngico se pueden obtener de animales, plantas, microbios u hongos que sean inviables (es decir, que no vivan más) o que han sido hechos inviables. Las conchas de diatomea son así sustancias sólidas inanimadas cuando algas de diatomea asociadas previamente han sido retiradas o hechas inviables de otro modo. Dado que las conchas de diatomea son sustancias sólidas inanimadas, no se considera que sean organismos fotosintéticos o microorganismos fotosintéticos. En ciertas realizaciones, sustancias sólidas incluyen, pero no se limitan a, arena, limo, tierra, arcilla, ceniza, carbón vegetal, tierra de diatomeas y otros minerales similares, vidrio molido o perlas de vidrio, materiales cerámicos molidos, perlas de cerámica, bentonita, caolín, talco, perlita, mica, vermiculita, sílices, polvo de cuarzo, montmorillonita, y combinaciones de los mismos. En ciertas realizaciones, la sustancia sólida puede ser un polímero o perlas poliméricas. Polímeros que se pueden usar como sustancia sólida incluyen, pero no se limitan a, diversos polisacáridos tales como polímeros celulósicos y polímeros quitinosos que son insolubles o sólo parcialmente solubles en agua o soluciones acuosas, agar (p.ej.

galactanos), y combinaciones de los mismos. En ciertas realizaciones, la sustancia sólida puede ser un cristal de sal insoluble o sólo parcialmente soluble. Cristales de sal que se pueden usar incluyen, pero no se limitan a, carbonatos, cromatos, sulfitos, fosfatos, hidróxidos, óxidos, y sulfuros insolubles o sólo parcialmente solubles. En ciertas realizaciones, la sustancia sólida puede ser una célula microbiana, célula fúngica, espora microbiana o espora fúngica. En ciertas realizaciones, la sustancia sólida puede ser una célula microbiana o espora microbiana en donde la célula microbiana o espora microbiana no es un microorganismo fotosintético. En ciertas realizaciones, la célula microbiana o espora microbiana no es un microorganismo fotosintético, donde el microorganismo fotosintético se selecciona del grupo que consiste en algas, cianobacterias, diatomeas, *Botryococcus braunii*, *Chlorella*, *Dunaliella tertiolecta*, *Gracilaria*, *Pleurochrysis carterae*, *Sargassum*, y *Ulva*. En aún otras realizaciones, la sustancia sólida puede ser una célula microbiana, célula fúngica, espora microbiana o espora fúngica inactivadas (es decir, inviables). En aún otras realizaciones, la sustancia sólida puede ser una lula microbiana, célula fúngica, espora microbiana o espora fúngica quiescentes (es decir, viables pero que no se dividen activamente). En aún otras realizaciones, la sustancia sólida puede ser restos celulares de origen microbiano. En aún otras realizaciones, la sustancia sólida puede ser materia en partículas de cualquier parte de una planta. Partes de plantas que se pueden usar para obtener la sustancia sólida incluyen, pero no se limitan a, mazorcas, cáscaras, vainas, hojas, raíces, flores, tallos, cortezas, semillas, y combinaciones de los mismos. También se pueden usar productos obtenidos a partir de partes de plantas procesadas que incluyen, pero no se limitan a, bagazo, fibra de trigo, sémola de soja, pasta de semillas machacadas, rastrojo y similares. Tales partes de plantas, plantas procesadas, y/o partes de plantas procesadas pueden ser molidas para obtener el material sólido en una forma de partículas que se puede usar. En ciertas realizaciones, se puede usar madera o un producto de madera que incluye, pero no se limita a, pulpa de madera, serrín, virutas y similares. En ciertas realizaciones, la sustancia sólida puede ser una materia en partículas de un (unos) animal(es), que incluye, pero no se limita a, harina de hueso, gelatina, conchas molidas o en polvo, pelo, piel macerada y similares.

En ciertas realizaciones, la sustancia sólida se proporciona en una forma de partículas que proporciona la distribución de la sustancia sólida en el medio de cultivo. En ciertas realizaciones, la sustancia sólida está comprendida de partículas de aproximadamente 2 micrómetros a aproximadamente 1.000 micrómetros de longitud media o diámetro medio. En ciertas realizaciones, la sustancia sólida está comprendida de partículas de aproximadamente 1 micrómetro a aproximadamente 1.000 micrómetros de longitud media o diámetro medio. En ciertas realizaciones, la sustancia sólida es una partícula de

aproximadamente 1, 2, 4, 10, 20, o 40 micrómetros a cualquiera de aproximadamente 100, 200, 500, 750, o 1.000 micrómetros de longitud media o diámetro medio. Características deseables de las partículas usadas en los métodos y composiciones proporcionados en la presente memoria incluyen humedecibilidad adecuada, de tal modo que las partículas  
5 puedan ser suspendidas en todo el medio tras agitación.

En ciertas realizaciones, la sustancia sólida se proporciona en el medio como un coloide en donde la fase continua es un líquido y la fase dispersa es el sólido. Sólidos adecuados que se pueden usar para formar coloides en medios líquidos usados para cultivar *Methylobacterium* incluyen, pero no se limitan a, diversos sólidos que se denominan  
10 hidrocoloides. Tales hidrocoloides usados en los medios, métodos y composiciones proporcionados en la presente memoria pueden ser polímeros hidrófilos, de origen vegetal, animal, microbiano o sintético. Los polímeros hidrocoloidales usados en los métodos pueden contener muchos grupos hidroxilo y/o pueden ser polielectrolitos. Polímeros hidrocoloidales usados en las composiciones y métodos proporcionados en la presente memoria incluyen,  
15 pero no se limitan a, agar, alginato, arabinosilano, carragenina, carboximetilcelulosa, celulosa, curdlana, gelatina, gelana,  $\beta$ -glucano, goma guar, goma arábica, goma garrofín, pectina, almidón, goma xantana y mezclas de los mismos. En ciertas realizaciones, el coloide usado en los medios, métodos y composiciones proporcionados en la presente memoria pueden comprender un polímero hidrocoloidal y una o más proteínas.

En ciertas realizaciones, la sustancia sólida puede ser una sustancia sólida que proporciona un crecimiento adherente de *Methylobacterium* sobre la sustancia sólida. Los *Methylobacterium* que están adheridos a una sustancia sólida *Methylobacterium* que no pueden ser retirados sustancialmente lavando simplemente la sustancia sólida con los *Methylobacterium* adherentes con medio de cultivo, mientras que los *Methylobacterium* no  
20 adherentes pueden ser retirados sustancialmente lavando la sustancia sólida con medio de cultivo líquido. En este contexto, "retirados sustancialmente" significa que al menos aproximadamente 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, o 80% de los *Methylobacterium* presentes son retirados cuando la sustancia sólida se lava con tres volúmenes de medio de cultivo líquido. Tal lavado puede ser efectuado por diversos métodos que incluyen, pero no se  
25 limitan a, decantar líquido de una fase sólida lavada o hacer pasar líquido a través de una fase sólida sobre un filtro que permite el flujo a su través de bacterias en el líquido. En ciertas realizaciones, los *Methylobacterium* adherentes que están asociados con el sólido pueden incluir tanto *Methylobacterium* que están unidos directamente al sólido como/o *Methylobacterium* que están unidos indirectamente a la sustancia sólida. *Methylobacterium*  
30 que están unidos indirectamente a la sustancia sólida incluyen, pero no se limitan a,



*Methylobacterium* que están unidos a otros *Methylobacterium* o a otro microorganismo que está unido a la sustancia sólida, *Methylobacterium* que están unidos a la sustancia sólida estando unidos a otra sustancia que está unida a la sustancia sólida, y similares. En ciertas realizaciones, al menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99%, 99,5% o 99,9% de los *Methylobacterium* en el caldo de fermentación, producto de caldo de fermentación o composiciones son *Methylobacterium* que están adheridos a la sustancia sólida. En ciertas realizaciones, *Methylobacterium* adherentes pueden estar presentes en la superficie de la sustancia sólida en el caldo de fermentación, producto de caldo de fermentación o composición en una densidad de al menos aproximadamente 1 *Methylobacterium*/20 micrómetros cuadrados, de al menos aproximadamente 1 *Methylobacterium*/10 micrómetros cuadrados, de al menos aproximadamente 1 *Methylobacterium*/10 micrómetros cuadrados, de al menos aproximadamente 1 *Methylobacterium*/5 micrómetros cuadrados, de al menos aproximadamente 1 *Methylobacterium*/2 micrómetros cuadrados, o de al menos aproximadamente 1 *Methylobacterium*/micrómetro cuadrado. En ciertas realizaciones, *Methylobacterium* adherentes pueden estar presentes en la superficie de la sustancia sólida en el caldo de fermentación, producto de caldo de fermentación, o composición en una densidad de al menos aproximadamente 1 *Methylobacterium*/20 micrómetros cuadrados a aproximadamente 1 *Methylobacterium*/micrómetro cuadrado, de al menos aproximadamente 1 *Methylobacterium*/10 micrómetros cuadrados a aproximadamente 1 *Methylobacterium*/micrómetro cuadrado, de al menos aproximadamente 1 *Methylobacterium*/10 micrómetros cuadrados a aproximadamente 1 *Methylobacterium*/micrómetro cuadrado, de al menos aproximadamente 1 *Methylobacterium*/5 micrómetros cuadrados a aproximadamente 1 *Methylobacterium*/micrómetro cuadrado, o de al menos aproximadamente 1 *Methylobacterium*/2 micrómetros cuadrados a aproximadamente 1 *Methylobacterium*/micrómetro cuadrado. En ciertas realizaciones, *Methylobacterium* adherentes pueden estar presentes en la superficie de la sustancia sólida en el caldo de fermentación, producto de caldo de fermentación o composición en una densidad de al menos aproximadamente 1 *Methylobacterium*/20 micrómetros cuadrados a aproximadamente 1 *Methylobacterium*/2 micrómetros cuadrados, de al menos aproximadamente 1 *Methylobacterium*/10 micrómetros cuadrados a aproximadamente 1 *Methylobacterium*/2 micrómetros cuadrados, de al menos aproximadamente 1 *Methylobacterium*/10 micrómetros cuadrados a aproximadamente 1 *Methylobacterium*/2 micrómetros cuadrados, o de al menos aproximadamente 1 *Methylobacterium*/5 micrómetros cuadrados a aproximadamente 1 *Methylobacterium*/2 micrómetros cuadrados. Los caldos de

fermentación bifásicos proporcionados en la presente memoria pueden comprender una fase líquida que contiene *Methylobacterium* no adherente. En ciertas realizaciones, los títulos de *Methylobacterium* no adherente en la fase líquida pueden ser menores que aproximadamente 100.000, 10.000, o 1.000 CFU/ml.

- 5 Los métodos de cultivo bifásicos proporcionados pueden dar caldos de fermentación con *Methylobacterium* en un título mayor que aproximadamente  $5 \times 10^8$  unidades formadoras de colonias por mililitro, en un título mayor que aproximadamente  $1 \times 10^9$  unidades formadoras de colonias por mililitro, en un título mayor que aproximadamente  $1 \times 10^{10}$  unidades formadoras de colonias por mililitro, en un título de al menos aproximadamente  $3 \times 10^{10}$  unidades formadoras de colonias por mililitro. En ciertas realizaciones, los caldos de fermentación proporcionados en la presente memoria pueden comprender *Methylobacterium* en un título de al menos aproximadamente  $5 \times 10^8$  unidades formadoras de colonias por mililitro a al menos aproximadamente  $3 \times 10^{10}$  unidades formadoras de colonias por mililitro, al menos aproximadamente  $5 \times 10^8$  unidades formadoras de colonias por mililitro a al menos aproximadamente  $4 \times 10^{10}$  unidades formadoras de colonias por mililitro, o al menos aproximadamente  $5 \times 10^8$  unidades formadoras de colonias por mililitro a al menos aproximadamente  $6 \times 10^{10}$  unidades formadoras de colonias por mililitro. En ciertas realizaciones, los caldos de fermentación proporcionados en la presente memoria pueden comprender *Methylobacterium* en un título de al menos aproximadamente  $1 \times 10^9$  unidades formadoras de colonias por mililitro a al menos aproximadamente  $3 \times 10^{10}$  unidades formadoras de colonias por mililitro, al menos aproximadamente  $1 \times 10^9$  unidades formadoras de colonias por mililitro a al menos aproximadamente  $4 \times 10^{10}$  unidades formadoras de colonias por mililitro, o al menos aproximadamente  $1 \times 10^9$  unidades formadoras de colonias por mililitro a al menos aproximadamente  $6 \times 10^{10}$  unidades formadoras de colonias por mililitro. En ciertas realizaciones, los caldos de fermentación proporcionados en la presente memoria comprenderán *Methylobacterium* en un título de al menos aproximadamente  $1 \times 10^{10}$  unidades formadoras de colonias por mililitro a al menos aproximadamente  $3 \times 10^{10}$  unidades formadoras de colonias por mililitro, al menos aproximadamente  $1 \times 10^{10}$  unidades formadoras de colonias por mililitro a al menos aproximadamente  $4 \times 10^{10}$  unidades formadoras de colonias por mililitro, o al menos aproximadamente  $1 \times 10^{10}$  unidades formadoras de colonias por mililitro a al menos aproximadamente  $6 \times 10^{10}$  unidades formadoras de colonias por mililitro. En ciertas realizaciones, los caldos de fermentación proporcionados en la presente memoria comprenderán *Methylobacterium* en un título de al menos aproximadamente  $3 \times 10^{10}$  unidades formadoras de colonias por mililitro a al menos aproximadamente  $4 \times 10^{10}$  unidades formadoras de colonias por mililitro, o al menos aproximadamente  $3 \times 10^{10}$  unidades formadoras de colonias por mililitro, o al menos aproximadamente  $3 \times 10^{10}$  unidades formadoras de colonias por mililitro.

formadoras de colonias por mililitro a al menos aproximadamente  $6 \times 10^{10}$  unidades formadoras de colonias por mililitro.

Se pueden usar sustancias sólidas con *Methylobacterium* adherente que se pueden obtener como productos de fermentación para preparar diversas composiciones útiles para tratar plantas o partes de plantas para mejorar el rendimiento de planta, y/o mejorar la producción de fruta de la planta productora de fruta. En ciertas realizaciones, la composición comprende *Methylobacterium* y está exenta de sustancias que promueven el crecimiento de bacterias residentes. Composiciones proporcionadas en la presente memoria que comprenden *Methylobacterium*, sustancias sólidas con *Methylobacterium* cultivado sobre las mismas, o que comprenden emulsiones con *Methylobacterium* cultivado en las mismas se pueden usar para tratar plantas o partes de plantas. Se proporcionan por tanto plantas, partes de plantas, y, en particular, semillas de plantas que han sido al menos parcialmente revestidas o revestidas con los productos de caldo de fermentación o composiciones que comprenden *Methylobacterium*. También se proporciona productos vegetales procesados que contienen los productos de caldo de fermentación o composiciones con *Methylobacterium* o *Methylobacterium* adherente. Se pueden usar sustancias sólidas con *Methylobacterium* adherente para preparar diversas composiciones que son particularmente útiles para tratar semillas de plantas. Se proporcionan por tanto semillas que han sido al menos parcialmente revestidas con los productos de caldo de fermentación o composiciones. También se proporcionan productos de semilla procesados, que incluyen, pero no se limitan a, harina, pienso y copos que contienen los productos de caldo de fermentación o composiciones proporcionados en la presente memoria. En ciertas realizaciones, el producto vegetal procesado será no regenerable (es decir, será incapaz de desarrollarse hasta una planta). En ciertas realizaciones, la sustancia sólida usada en el producto de fermentación o composición que reviste al menos parcialmente la planta, parte de planta o semilla de planta o que está contenida en la planta, parte de planta o producto de semilla procesados comprende una sustancia sólida y *Methylobacterium* asociados o adherentes que pueden ser identificados fácilmente comparando una planta, parte de planta, semilla de planta o producto procesado de los mismos, tratados y no tratados. El revestimiento parcial de una planta, una parte de una planta o una semilla incluye, pero no se limita a, revestir al menos aproximadamente 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99%, o aproximadamente 99,5% del área de superficie de la planta, parte de planta o semilla de planta.

También se proporcionan en la presente memoria métodos para preparar una composición de tratamiento de una planta o semilla de planta que comprende *Methylobacterium* y está

exenta de sustancias que promueven el crecimiento de bacterias residentes sobre una planta o semilla. Tales métodos pueden comprender (i) cultivar un mono-cultivo o co-cultivo de *Methylobacterium* en medio que comprende: (a) una fase acuosa; (b) una fase líquida y una fase sólida; o (c) una emulsión, obteniendo de este modo un medio que contiene

5 *Methylobacterium*; (ii) separar los *Methylobacterium* de al menos una otra porción del medio que contiene *Methylobacterium*; y (iii) reconstituir los *Methylobacterium* en una matriz que carece de sustancias que promueven el crecimiento de bacterias residentes sobre una planta o semilla. En ciertas realizaciones, la etapa de separación se efectúa por

10 centrifugación, filtración o sedimentación del medio que contiene *Methylobacterium* y retirada del exceso de líquido o emulsión del mismo. En ciertas realizaciones donde los *Methylobacterium* son cultivados en presencia de una sustancia sólida, la separación proporcionará una fracción que contiene *Methylobacterium* con crecimiento adherente a la sustancia sólida y algo de *Methylobacterium* no adherente que puede ser reconstituido en la matriz. En ciertas realizaciones, la sustancia que promueve el crecimiento de bacterias

15 residentes sobre una planta o semilla se selecciona del grupo que consiste en una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno, una fuente de fósforo, una fuente de azufre, una fuente de magnesio, y combinaciones de las mismas. En ciertas realizaciones, la matriz es un líquido, una emulsión, o uno o más sólidos, y comprende un adyuvante y/o excipiente aceptable desde el punto de vista agrícola. En ciertas realizaciones, los *Methylobacterium* son

20 cultivados en medios que comprenden una fase líquida y una sustancia sólida con *Methylobacterium* adherente cultivado sobre la misma. La sustancia sólida es separada de la fase líquida del medio que contiene *Methylobacterium*, y la sustancia sólida con *Methylobacterium* adherente cultivado sobre la misma es reconstituida en la matriz mencionada anteriormente. En ciertas realizaciones, la matriz puede ser un líquido que

25 incluye, pero no se limita a, agua, y tampón acuoso exento de sustancias que promueven el crecimiento de bacterias residentes sobre una planta o semilla, o una disolución acuosa exenta de sustancias que promueven el crecimiento de bacterias residentes sobre una planta o semilla.

También se proporcionan en la presente memoria composiciones que comprenden

30 cualquiera de los siguientes aislamientos de *Methylobacterium sp.* proporcionados en la siguiente Tabla 1, así como plantas, partes de plantas y semillas de plantas que son revestidas o revestidas parcialmente con las composiciones.

Tabla 1. Aislamientos de *Methylobacterium* sp.

<b>AISLAMIENTO No.</b>	<b>NLS No.</b>	<b>USDA ARS NRRL No.<sup>1</sup></b>
ISO01	NLS0046	NRRL B-50929
ISO02	NLS0020	NRRL B-50930
ISO03	NLS0017	NRRL B-50931
ISO04	NLS0042	NRRL B-50932
ISO05	NLS0089	NRRL B-50933
ISO06	NLS0068	NRRL B-50934
ISO07	NLS0065	NRRL B-50935
ISO08	NLS0069	NRRL B-50936
ISO09	NLS0062	NRRL B-50937
ISO10	NLS0064	NRRL B-50938
ISO11	NLS0021	NRRL B-50939
ISO12	NLS0066	NRRL B-50940
ISO13	NLS0037	NRRL B-50941
ISO14	NLS0038	NRRL B-50942

<sup>1</sup> Número de depósito para cepa depositada con el AGRICULTURAL RESEARCH SERVICE CULTURE COLLECTION (NRRL) del National Center for Agricultural Utilization Research, Agricultural Research Service, U.S. Department of Agriculture, 1815 North University Street, Peoria, Illinois 61604 U.S.A. bajo los términos del Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos para los Fines de Procedimiento de Patentes. Sujetas a 37 CFR §1.808(b), todas las restricciones impuestas por el depositante sobre la disponibilidad al público del material depositado serán retiradas irrevocablemente tras la concesión de cualquier patente a partir de esta solicitud de patente.

Solicitudes de patente cedidas con la presente que describen usos específicos adicionales

de las cepas de *Methylobacterium* de la Tabla 1 tales como: (1) aumentar el rendimiento de maíz (US 61/911780, presentada el 4/12/2013; y solicitud internacional que reivindica beneficio de la misma presentada el 4/12/2014); (2) aumentar el rendimiento de soja (US 61/911698, presentada el 4/12/2013; y solicitud internacional que reivindica beneficio de la misma presentada el 4/12/2014); (3) mejorar el cultivo de lechuga (solicitud de patente internacional PCT/US14/68558, presentada el 4/12/2014); (4) mejorar el crecimiento de tomate (solicitud de patente internacional PCT/US14/68611, presentada el 4/12/2014) y se incorporan cada una por referencia en la presente memoria en sus totalidades. Incorporados específicamente en la presente memoria por referencia en sus totalidades son las secuencias de aminoácidos y de ácidos nucleicos genómicos de *Methylobacterium* sp. NLS017, NLS020, NLS037, NLS042, NLS065, y NLS066 que se describen en la solicitud de patente internacional PCT/US14/68558, presentada el 4/12/2014. También incorporados específicamente en la presente memoria por referencia en sus totalidades son las secuencias de aminoácidos y de ácidos nucleicos genómicos de *Methylobacterium* sp. NLS017 y NLS066 descritas en la solicitud de patente internacional PCT/US14/68611 presentada el 4/12/2014. Tales secuencias de aminoácidos y de ácidos nucleicos genómicos se pueden usar para identificar composiciones, partes de plantas, semillas de plantas, o productos vegetales procesados que comprenden *Methylobacterium* sp. NLS017, NLS020, NLS037, NLS042, NLS065, y NLS066.

Composiciones proporcionadas en la presente memoria que son útiles para tratar plantas o partes de plantas que comprenden *Methylobacterium*, y/o están exentas de sustancias que promueven el crecimiento de bacterias residentes sobre una planta o semilla, contienen una sustancia sólida con *Methylobacterium* adherente cultivado sobre la misma, o que comprenden emulsiones con *Methylobacterium* cultivado en las mismas también pueden comprender además un adyuvante aceptable desde el punto de vista agrícola o un excipiente aceptable desde el punto de vista agrícola. Un adyuvante aceptable desde el punto de vista agrícola o un excipiente aceptable desde el punto de vista agrícola es típicamente un ingrediente que no causa fitotoxicidad indebida u otros efectos adversos cuando es expuesto a una planta o parte de planta. En ciertas realizaciones, la sustancia sólida puede ser por sí misma un adyuvante aceptable desde el punto de vista agrícola o un excipiente aceptable desde el punto de vista agrícola siempre y cuando no sea bactericida o bacteriostático para los *Methylobacterium*. En otras realizaciones, la composición comprende además al menos uno de un adyuvante aceptable desde el punto de vista agrícola o un excipiente aceptable desde el punto de vista agrícola. Cualquiera de las composiciones mencionadas anteriormente también puede comprender además un pesticida. Pesticidas usados en la composición incluyen, pero no se limitan a, un insecticida,

un fungicida, un nematocida y un bactericida. En ciertas realizaciones, el pesticida usado en la composición es un pesticida que no inhibe sustancialmente el crecimiento de los *Methylobacterium*. Como los *Methylobacterium* son bacterias gram negativas, bactericidas adecuados usados en las composiciones pueden incluir, pero no se limitan a, bactericidas que exhiben actividad contra bacterias gram positivas pero no bacterias gram negativas. Las composiciones proporcionadas en la presente memoria también pueden comprender un agente bacteriostático que no inhibe sustancialmente el crecimiento de los *Methylobacterium*. Agentes bacteriostáticos adecuados para el uso en las composiciones proporcionadas en la presente memoria incluyen, pero no se limitan a, los que exhiben actividad contra bacterias gram positivas pero no bacterias gram negativas. Cualquiera de las composiciones mencionadas anteriormente también puede ser un producto esencialmente seco (es decir, que tiene aproximadamente 5% o menos de contenido de agua), una mezcla de la composición con una emulsión, o una suspensión. Cualquiera de las composiciones proporcionadas en la presente memoria se puede usar para revestir o revestir parcialmente una planta, parte de planta o semilla de planta. El revestimiento parcial de una planta, una parte de planta o una semilla incluye, pero no se limita a, revestir al menos aproximadamente 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99%, o aproximadamente 99,5% del área de superficie de la planta, parte de planta o semilla de planta.

Adyuvantes aceptables desde el punto de vista agrícola usados en las composiciones que comprenden *Methylobacterium* incluyen, pero no se limitan a, componentes que aumentan la eficacia del producto y/o productos que aumentan la facilidad de aplicación del producto. Adyuvantes que aumentan la eficacia del producto pueden incluir diversos humectantes/esparcidores que promueven la adhesión a y extensión de la composición sobre partes de la planta, agentes de pegajosidad que promueven la adhesión a la parte de la planta, penetrantes que pueden promover el contacto del agente activo con tejidos interiores, extensores que aumentan la semivida del agente activo inhibiendo la degradación ambiental, y humectantes que aumentan la densidad o el tiempo de secado de las composiciones pulverizadas. Humectantes/esparcidores usados en las composiciones pueden incluir, pero no se limitan a, tensioactivos no iónicos, tensioactivos aniónicos, tensioactivos catiónicos, tensioactivos anfóteros, tensioactivos de organo-silicato, y/o tensioactivos acidificados. Agentes de pegajosidad usados en las composiciones pueden incluir, pero no se limitan a, sustancias basadas en látex, terpeno/pinoleno, y sustancias basadas en pirrolidona. Penetrantes pueden incluir aceite mineral, aceite vegetal, aceite vegetal esterificado, tensioactivos de organo-silicato, y tensioactivos acidificados. Extensores usados en las composiciones pueden incluir, pero no se limitan a, sulfato de

amonio, o sustancias basadas en menteno. Humectantes usados en las composiciones pueden incluir, pero no se limitan a, glicerol, propilenglicol y dietilglicol. Adyuvantes que mejoran la facilidad de aplicación del producto incluyen, pero no se limitan a, agentes acidificantes/amortiguadores, agentes antiespumantes/desespumantes, agentes de compatibilidad, agentes reductores de deriva, colorantes y acondicionadores del agua. Agentes antiespumantes/desespumantes usados en las composiciones pueden incluir, pero no se limitan a, dimetopolisiloxano. Agentes de compatibilidad usados en las composiciones pueden incluir, pero no se limitan a, sulfato de amonio. Agentes reductores de deriva usados en las composiciones pueden incluir, pero no se limitan a, poliacrilamidas y polisacáridos. Acondicionadores del agua usados en las composiciones pueden incluir, pero no se limitan a, sulfato de amonio.

También se proporcionan en la presente memoria métodos para tratar plantas y/o partes de plantas con los caldos de fermentación, productos de caldo de fermentación, y composiciones que comprenden *Methylobacterium*. Plantas tratadas y partes de plantas tratadas obtenidas a partir de las mismas incluyen, pero no se limitan a, una planta de pimiento, tomate, baya o plátano. Partes de plantas que se tratan incluyen, pero no se limitan a, hojas, tallos, flores, raíces, semillas, fruta, tubérculos, coleóptilos y similares. Semillas u otros propágulos de cualquiera de las plantas mencionadas anteriormente pueden ser tratadas con los caldos de fermentación, productos de caldos de fermentación, productos de fermentación, y/o composiciones proporcionadas en la presente memoria.

En ciertas realizaciones, las plantas y/o partes de plantas se tratan aplicando los caldos de fermentación, productos de caldos de fermentación, productos de fermentación y composiciones que comprenden *Methylobacterium* como una pulverización. Tales aplicaciones de pulverización incluyen, pero no se limitan a, tratamientos de una única parte de planta o cualquier combinación de partes de plantas. La pulverización se puede conseguir con cualquier dispositivo que distribuya los caldos de fermentación, productos de caldos de fermentación, productos de fermentación, y composiciones a la planta y/o parte(s) de plantas. Dispositivos de pulverización útiles incluyen un pulverizador de lanza, un pulverizador de mano o de mochila, fumigadores de cultivos (p.ej. pulverización aérea), y similares. También se pueden usar dispositivos de pulverización y o métodos que proporcionan la aplicación de los caldos de fermentación, productos de caldos de fermentación, productos de fermentación, y composiciones a una cualquiera o ambas de la superficie adaxial y/o la superficie abaxial. Plantas y/o partes de plantas que son al menos revestidas parcialmente con cualquiera de un cado de fermentación bifásico, un producto de caldo de fermentación, producto de fermentación o composiciones que comprenden una



sustancia sólida con *Methylobacterium* adheridos a la misma también se proporcionan en la presente memoria. También se proporcionan en la presente memoria productos vegetales procesados que comprenden una sustancia sólida con *Methylobacterium* adheridos a la misma. Se puede usar cualquiera de las composiciones proporcionadas en la presente memoria para revestir o revestir parcialmente una planta, parte de planta o semilla de planta. El revestimiento parcial de una planta, una parte de planta o una semilla incluye, pero no se limita a, revestir al menos aproximadamente 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99%, o aproximadamente 99,5% del área de superficie de la planta, parte de planta o semilla de planta.

En ciertas realizaciones, las semillas se tratan exponiendo las semillas a los caldos de fermentación, productos de caldos de fermentación, productos de fermentación y composiciones que comprenden *Methylobacterium*. Las semillas se pueden tratar con los caldos de fermentación, productos de caldos de fermentación y composiciones proporcionados en la presente memoria por métodos que incluyen, pero no se limitan a, imbibición, revestimiento, pulverización y similares. En ciertas realizaciones, semillas esterilizadas en superficie se tratan con una composición que comprende *Methylobacterium*. En ciertas realizaciones, semillas no esterilizadas (p.ej. semillas que no han sido sometidas a esterilización superficial) se tratan con una composición que comprende *Methylobacterium* que ha sido desprovista de sustancias que promueven el crecimiento de microorganismos residentes sobre la semilla. Los tratamientos de semillas se pueden efectuar con tratadores de semillas tanto continuos como discontinuos. En ciertas realizaciones, las semillas revestidas se pueden preparar suspendiendo las semillas con una composición de revestimiento que contiene un caldo de fermentación, producto de caldo de fermentación o composiciones que comprenden la sustancia sólida con *Methylobacterium* y secando al aire el producto resultante. El secado al aire se puede llevar a cabo a cualquier temperatura que no sea perjudicial para la semilla o los *Methylobacterium*, pero será típicamente no mayor que 30 grados centígrados. La proporción de revestimiento que comprende una sustancia sólida y *Methylobacterium* incluye, pero no se limita a, un intervalo de 0,1 a 25% en peso de la semilla, 0,5 a 5% en peso de la semilla, y 0,5 a 2,5% en peso de la semilla. El revestimiento parcial de una semilla puede incluir, pero no se limita a, revestir al menos aproximadamente 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99%, o aproximadamente 99,5% del área de superficie de la semilla. En ciertas realizaciones, una sustancia sólida usada en el revestimiento o tratamiento de la semilla tendrá *Methylobacterium* adheridos sobre la misma. En ciertas realizaciones, una sustancia sólida usada en el revestimiento o tratamiento de la semilla estará asociada con *Methylobacterium* y será un caldo de fermentación, producto de caldo de fermentación o composición

obtenidos por los métodos proporcionados en la presente memoria. Diversas composiciones de tratamiento de semillas y métodos para el tratamiento de semillas descritos en las patentes de EE.UU. Nos. 5.106.648, 5.512.069 y 8.181.388 se incorporan en la presente memoria por referencia en sus totalidades, y se pueden adaptar para uso con un agente activo que comprende los caldos de fermentación, productos de caldos de fermentación o composiciones proporcionados en la presente memoria. En ciertas realizaciones, la composición usada para tratar la semilla puede contener excipientes aceptables desde el punto de vista agrícola que incluyen, pero no se limitan a, harinas de madera, arcillas, carbón activado, tierra de diatomeas, sólidos inorgánicos de grano fino, carbonato de calcio y similares. Arcillas y sólidos inorgánicos que se pueden usar con los caldos de fermentación, productos de caldos de fermentación o composiciones proporcionados en la presente memoria incluyen, pero no se limitan a, bentonita de calcio, caolín, arcilla de china, talco, perlita, mica, vermiculita, sílices, polvo de cuarzo, montmorillonita y mezclas de los mismos. Adyuvantes aceptables desde el punto de vista agrícola que promueven el pegado a la semilla que se pueden usar incluyen, pero no se limitan a, poli(acetatos de vinilo, copolímero de poli(acetato de vinilo), poli(acetatos de vinilo) hidrolizados, copolímero de polivinilpirrolidona-acetato de vinilo, poli(alcoholes vinílicos), copolímeros de poli(alcohol vinílico), poli(éter vinilmetílico), copolímero de poli(éter vinilmetílico)-anhídrido maleico, ceras, polímeros de látex, celulosas, que incluyen etilcelulosas y metilcelulosas, hidroximetilcelulosas, hidroxipropilcelulosa, hidroximetilpropilcelulosas, polivinilpirrolidonas, alginatos, dextrinas, maltodextrinas, polisacáridos, grasas, aceites, proteínas, goma karaya, goma jaguar, goma tragacanto, gomas de polisacáridos, mucílago, goma arábica, gomas lacas, polímeros y copolímeros de cloruro de vinilideno, polímeros y copolímeros de proteínas basadas en soja, lignosulfonatos, copolímeros acrílicos, almidones, poli(acrilatos de vinilo), zeinas, gelatina, carboximetilcelulosa, chitosán, poli(óxido de etileno), polímeros y copolímeros de acrilamida, poli(acrilato de hidroxietilo), monómeros de metilacrilamida, alginato, etilcelulosa, policloropreno y jarabes o mezclas de los mismos. Otros adyuvantes aceptables desde el punto de vista agrícola útiles que pueden promover el revestimiento incluyen, pero no se limitan a, polímeros y copolímeros de acetato de vinilo, copolímero de polivinilpirrolidona-acetato de vinilo y ceras solubles en agua. Diversos tensioactivos, dispersantes, agentes antiapelmazamiento, agentes de control de espuma y colorantes descritos en la presente memoria y en la patente de EE.UU. N° 8.181.388 pueden ser adaptados para uso con un agente activo que comprende los caldos de fermentación, productos de caldos de fermentación o composiciones proporcionados en la presente memoria.

Se proporcionan en la presente memoria composiciones que comprenden *Methylobacterium*

que proporcionan un rendimiento de planta mejorado, así como producción de fruta mejorada de plantas productoras de fruta en relación a plantas no tratadas que no han sido expuestas a las composiciones. En ciertas realizaciones, partes de plantas, que incluyen, pero no se limitan a, una semilla, una hoja, un fruto, un tallo, una raíz, un tubérculo o un coleóptilo pueden ser tratadas con las composiciones proporcionadas en la presente memoria para mejorar el rendimiento de planta, control de insectos, control fúngico, y/o producción de fruta. Los tratamientos o aplicaciones pueden incluir, pero no se limitan a, pulverización, revestimiento, revestimiento parcial, inmersión y/o imbibición de la planta o partes de la planta con las composiciones proporcionadas en la presente memoria. En ciertas realizaciones, una semilla, una hoja, un fruto, un tallo, una raíz, un tubérculo o un coleóptilo pueden ser sumergidos y/o embebidos con un líquido, semilíquido, emulsión o suspensión de una composición proporcionada en la presente memoria. Tal inmersión o imbibición de la semilla puede ser suficiente para proporcionar un rendimiento de planta mejorado, control de insectos, control fúngico, y/o producción de fruta en una planta o parte de planta tratada en comparación con una planta o parte de planta no tratadas. La producción de fruta mejorada incluye, pero no se limita a, cuajado más rápido de la fruta, cuajado de la fruta aumentado, maduración más temprana, y/o producción de fruta más madura en relación con plantas no tratadas. En ciertas realizaciones, las semillas de plantas pueden ser sumergidas y/o embebidas durante al menos 1, 2, 3, 4, 5, o 6 horas. Tal inmersión y/o imbibición puede, en ciertas realizaciones, ser realizada a temperaturas que no sean perjudiciales para la semilla de planta o los *Methylobacterium*. En ciertas realizaciones, las semillas pueden ser tratadas a aproximadamente 15 a aproximadamente 30 grados centígrados o a aproximadamente 20 a aproximadamente 25 grados centígrados. En ciertas realizaciones, la imbibición o inmersión de la semilla puede ser realizada con agitación suave.

Se espera por lo tanto que las composiciones proporcionadas en la presente memoria que comprenden *Methylobacterium* sean útiles en mejorar la producción de fruta en una amplia variedad de plantas, que incluyen, pero no se limitan a: una planta de manzana, pera, uva, cítrico, melón, pimiento, tomate, baya, kiwi, mango o plátano. En ciertas realizaciones, la planta de baya es una planta de mora, fresa o arándano. Se espera por lo tanto que las composiciones proporcionadas en la presente memoria que comprenden *Methylobacterium* sean útiles en mejorar el rendimiento de planta, control de insectos en plantas, y control de hongos patógenos de plantas en una amplia variedad de plantas, que incluyen, pero no se limitan a: maíz, Brassica sp. (p.ej., *B. napus*, *B. rapa*, *B. juncea*), alfalfa, arroz, centeno, sorgo, mijo (p.ej., mijo perla (*Pennisetum glaucum*), mijo proso (*Panicum miliaceum*), mijo de foxtail (*Setaria italica*), mijo de dedo (*Eleusine coracana*)), girasol, cártamo, soja, tabaco,

patata, cacahuetes, algodón, batata (*Ipomoea batatas*), mandioca, café, coco, piña, árboles cítricos, cacao, té, plátano, aguacate, higo, guava, mango, aceituna, papaya, anacardo, macadamia, almendra, remolachas de azúcar, caña de azúcar, avena, cebada, tomates, lechuga, judías verdes, judías de Lima, garbanzos, cucurbitáceas tales como pepino, cantalupo y melón almizcleño, ornamentales, y coníferas. Partes de planta que se tratan incluyen, pero no se limitan a, hojas, tallos, flores, raíces, semillas, fruto, tubérculos, coleóptilos y similares. Plantas ornamentales y partes de plantas que se pueden tratar incluyen, pero no se limitan a, azalea, hydrangea, hibisco, rosas, tulipanes, narcisos, petunias, clavel, flor de pascua y crisantemo. Plantas coníferas y partes de planta que se pueden tratar incluyen, pero no se limitan a, pinos tales como pino taeda, pino ellioti, pino ponderosa, pino contorta y pino Monterrey; abeto de Douglas; Tsuga del pacífico; picea de Sitka; secuoya; abetos verdaderos tales como abeto blanco y abeto balsámico; y cedros tales como cedro rojo del oeste y cedro amarillo de Alaska. Plantas de césped y partes de planta que se pueden tratar incluyen, pero no se limitan a, pasto azul anual, césped inglés anual, pasto azul de Canadá, festuca, agrostis, pasto de trigo, pasto azul de Kentucky, pasto ovillo, césped inglés, agrostis gigantea, pasto de Bermudas, pasto de San Agustín, y pasto zoysia. Semillas u otros propágulos de cualquiera de las plantas mencionadas anteriormente se pueden tratar con las composiciones proporcionadas en la presente memoria.

En ciertas realizaciones, una cantidad de una composición proporcionada en la presente memoria que es suficiente para proporcionar rendimiento de planta mejorado, control de insectos en plantas mejorado, control de hongos patógenos en plantas mejorado, así como producción de fruta mejorada puede ser una composición con *Methylobacterium* en un título de al menos aproximadamente  $1 \times 10^6$  unidades formadoras de colonias por mililitro, al menos aproximadamente  $5 \times 10^6$  unidades formadoras de colonias por mililitro, al menos aproximadamente  $1 \times 10^7$  unidades formadoras de colonias por mililitro, al menos aproximadamente  $5 \times 10^8$  unidades formadoras de colonias por mililitro, al menos aproximadamente  $1 \times 10^9$  unidades formadoras de colonias por mililitro, al menos aproximadamente  $1 \times 10^{10}$  unidades formadoras de colonias por mililitro, o al menos aproximadamente  $3 \times 10^{10}$  unidades formadoras de colonias por mililitro. En ciertas realizaciones, una cantidad de una composición proporcionada en la presente memoria que es suficiente para proporcionar rendimiento de planta mejorado y/o producción de fruta mejorado puede ser una composición con *Methylobacterium* en un título de aproximadamente al menos aproximadamente  $1 \times 10^6$  unidades formadoras de colonias por mililitro, al menos aproximadamente  $5 \times 10^6$  unidades formadoras de colonias por mililitro, al menos aproximadamente  $1 \times 10^7$  unidades formadoras de colonias por mililitro, o al menos aproximadamente  $5 \times 10^8$  unidades formadoras de colonias por mililitro a al menos

aproximadamente  $6 \times 10^{10}$  unidades formadoras de colonias por mililitro de un líquido o una emulsión. En ciertas realizaciones, una cantidad de una composición proporcionada en la presente memoria que es suficiente para proporcionar rendimiento de planta mejorado y/o producción de fruta mejorado puede ser un producto de caldo de fermentación con un título de *Methylobacterium* de una fase sólida de ese producto es al menos aproximadamente  $5 \times 10^8$  unidades formadoras de colonias por mililitro a al menos aproximadamente  $5 \times 10^{13}$  unidades formadoras de colonias por mililitro de *Methylobacterium* por gramo de la fase sólida. En ciertas realizaciones, una cantidad de una composición proporcionada en la presente memoria que es suficiente para proporcionar rendimiento de planta mejorado y/o producción de fruta mejorado puede ser una composición con un título de *Methylobacterium* de al menos aproximadamente  $1 \times 10^6$  unidades formadoras de colonias por gramo, al menos aproximadamente  $5 \times 10^6$  unidades formadoras de colonias por gramo, al menos aproximadamente  $1 \times 10^7$  unidades formadoras de colonias por gramo, o al menos aproximadamente  $5 \times 10^8$  unidades formadoras de colonias por gramo a al menos aproximadamente  $6 \times 10^{10}$  unidades formadoras de colonias de *Methylobacterium* por gramo de partículas en la composición que contiene las partículas que comprenden una sustancia sólida en donde un mono-cultivo o co-cultivo de *Methylobacterium* está adherido a la misma. En ciertas realizaciones, una cantidad de una composición proporcionada en la presente memoria que es suficiente para proporcionar rendimiento de planta mejorado y/o producción de fruta mejorado puede ser una composición con un título de *Methylobacterium* de al menos aproximadamente  $1 \times 10^6$  unidades formadoras de colonias por ml, al menos aproximadamente  $5 \times 10^6$  unidades formadoras de colonias por ml, al menos aproximadamente  $1 \times 10^7$  unidades formadoras de colonias por ml, o al menos aproximadamente  $5 \times 10^8$  unidades formadoras de colonias por ml a al menos aproximadamente  $6 \times 10^{10}$  unidades formadoras de colonias de *Methylobacterium* por ml en una composición que comprende una emulsión en donde un mono-cultivo o co-cultivo de un *Methylobacterium* adherido a una sustancia sólida está provisto en la misma o cultivado en la misma. En ciertas realizaciones, una cantidad de una composición proporcionada en la presente memoria que es suficiente para proporcionar rendimiento de planta mejorado y/o producción de fruta mejorado puede ser una composición con un título de *Methylobacterium* de al menos aproximadamente  $1 \times 10^6$  unidades formadoras de colonias por ml, al menos aproximadamente  $5 \times 10^6$  unidades formadoras de colonias por ml, al menos aproximadamente  $1 \times 10^7$  unidades formadoras de colonias por ml, o al menos aproximadamente  $5 \times 10^8$  unidades formadoras de colonias por ml a al menos aproximadamente  $6 \times 10^{10}$  unidades formadoras de colonias de *Methylobacterium* por ml en una composición que comprende una emulsión en donde un mono-cultivo o co-cultivo de un

*Methylobacterium* está provisto en la misma o cultivado en la misma.

En ciertas realizaciones, una cantidad de una composición proporcionada en la presente memoria que es suficiente para proporcionar rendimiento de planta mejorado y/o producción de fruta mejorado puede ser una composición con *Methylobacterium sp.* en un título de al menos aproximadamente  $1 \times 10^4$  unidades formadoras de colonias por mililitro, al menos aproximadamente  $1 \times 10^5$  unidades formadoras de colonias por mililitro, al menos aproximadamente  $1 \times 10^6$  unidades formadoras de colonias por mililitro, al menos aproximadamente  $5 \times 10^6$  unidades formadoras de colonias por mililitro, al menos aproximadamente  $1 \times 10^7$  unidades formadoras de colonias por mililitro, al menos aproximadamente  $5 \times 10^8$  unidades formadoras de colonias por mililitro, al menos aproximadamente  $1 \times 10^9$  unidades formadoras de colonias por mililitro, al menos aproximadamente  $1 \times 10^{10}$  unidades formadoras de colonias por mililitro, o al menos aproximadamente  $3 \times 10^{10}$  unidades formadoras de colonias por mililitro. En ciertas realizaciones, una cantidad de una composición proporcionada en la presente memoria que es suficiente para proporcionar rendimiento de planta mejorado y/o producción de fruta mejorado puede ser una composición con *Methylobacterium sp.* en un título de al menos aproximadamente  $1 \times 10^4$  unidades formadoras de colonias por mililitro, al menos aproximadamente  $1 \times 10^5$  unidades formadoras de colonias por mililitro, aproximadamente al menos aproximadamente  $1 \times 10^6$  unidades formadoras de colonias por mililitro, al menos aproximadamente  $5 \times 10^6$  unidades formadoras de colonias por mililitro, al menos aproximadamente  $1 \times 10^7$  unidades formadoras de colonias por mililitro, o al menos aproximadamente  $5 \times 10^8$  unidades formadoras de colonias por mililitro a al menos aproximadamente  $6 \times 10^{10}$  unidades formadoras de colonias por mililitro de un líquido o una emulsión. En ciertas realizaciones, una cantidad de una composición proporcionada en la presente memoria que es suficiente para proporcionar rendimiento de planta mejorado y/o producción de fruta mejorado puede ser un producto de caldo de fermentación con un título de *Methylobacterium sp.* de una fase sólida de ese producto que es al menos aproximadamente  $1 \times 10^4$  unidades formadoras de colonias por gramo, al menos aproximadamente  $1 \times 10^5$  unidades formadoras de colonias por gramo, al menos aproximadamente  $1 \times 10^6$  unidades formadoras de colonias por gramo, al menos aproximadamente  $5 \times 10^6$  unidades formadoras de colonias por gramo, al menos aproximadamente  $1 \times 10^7$  unidades formadoras de colonias por gramo, al menos aproximadamente  $5 \times 10^8$  unidades formadoras de colonias por gramo, al menos aproximadamente  $1 \times 10^9$  unidades formadoras de colonias por gramo, o al menos aproximadamente  $5 \times 10^9$  unidades formadoras de colonias por gramo a al menos aproximadamente  $6 \times 10^{10}$  unidades formadoras de colonias de *Methylobacterium* por

gramo, al menos aproximadamente  $1 \times 10^{11}$  unidades formadoras de colonias de *Methylobacterium* por gramo, al menos aproximadamente  $1 \times 10^{12}$  unidades formadoras de colonias de *Methylobacterium* por gramo, al menos aproximadamente  $1 \times 10^{13}$  unidades formadoras de colonias de *Methylobacterium* por gramo, o al menos aproximadamente  $5 \times 10^{13}$  unidades formadoras de colonias de *Methylobacterium* por gramo de la fase sólida. En ciertas realizaciones, una cantidad de una composición proporcionada en la presente memoria que es suficiente para proporcionar rendimiento de planta mejorado y/o producción de fruta mejorado puede ser una composición con un título de *Methylobacterium* de al menos aproximadamente  $1 \times 10^6$  unidades formadoras de colonias por gramo, al menos aproximadamente  $5 \times 10^6$  unidades formadoras de colonias por gramo, al menos aproximadamente  $1 \times 10^7$  unidades formadoras de colonias por gramo, al menos aproximadamente  $5 \times 10^8$  unidades formadoras de colonias por gramo, al menos aproximadamente  $1 \times 10^9$  unidades formadoras de colonias por gramo, o al menos aproximadamente  $5 \times 10^9$  unidades formadoras de colonias por gramo a al menos aproximadamente  $6 \times 10^{10}$  unidades formadoras de colonias de *Methylobacterium* por gramo, al menos aproximadamente  $1 \times 10^{11}$  unidades formadoras de colonias de *Methylobacterium* por gramo, al menos aproximadamente  $1 \times 10^{12}$  unidades formadoras de colonias de *Methylobacterium* por gramo, al menos aproximadamente  $1 \times 10^{13}$  unidades formadoras de colonias de *Methylobacterium* por gramo, o al menos aproximadamente  $5 \times 10^{13}$  unidades formadoras de colonias de *Methylobacterium* por gramo de partículas en la composición que contiene las partículas que comprenden una sustancia sólida en donde un mono-cultivo o co-cultivo de *Methylobacterium sp.* está adherido a la misma. En ciertas realizaciones, una cantidad de una composición proporcionada en la presente memoria que es suficiente para proporcionar rendimiento de planta mejorado y/o producción de fruta mejorado puede ser una composición con un título de *Methylobacterium* de al menos aproximadamente  $1 \times 10^6$  unidades formadoras de colonias por ml, al menos aproximadamente  $5 \times 10^6$  unidades formadoras de colonias por ml, al menos aproximadamente  $1 \times 10^7$  unidades formadoras de colonias por ml, al menos aproximadamente  $5 \times 10^8$  unidades formadoras de colonias por ml, al menos aproximadamente  $1 \times 10^9$  unidades formadoras de colonias por gramo, o al menos aproximadamente  $5 \times 10^9$  unidades formadoras de colonias por gramo a al menos aproximadamente  $6 \times 10^{10}$  unidades formadoras de colonias de *Methylobacterium* por ml en una composición que comprende una emulsión en donde un mono-cultivo o co-cultivo de un *Methylobacterium sp.* adherido a una sustancia sólida está provisto en la misma o cultivado en la misma. En ciertas realizaciones, una cantidad de una composición proporcionada en la presente memoria que es suficiente para proporcionar rendimiento de planta mejorado y/o

producción de fruta mejorado puede ser una composición con un título de *Methylobacterium* de al menos aproximadamente  $1 \times 10^6$  unidades formadoras de colonias por ml, al menos aproximadamente  $5 \times 10^6$  unidades formadoras de colonias por ml, al menos aproximadamente  $1 \times 10^7$  unidades formadoras de colonias por ml, o al menos aproximadamente  $5 \times 10^8$  unidades formadoras de colonias por ml a al menos aproximadamente  $6 \times 10^{10}$  unidades formadoras de colonias de *Methylobacterium* por mL en una composición que comprende una emulsión en donde un mono-cultivo o co-cultivo de un *Methylobacterium sp.* está provisto en la misma o cultivado en la misma.

En ciertas realizaciones, se proporcionan o usan composiciones con un *Methylobacterium sp.* en un título de al menos aproximadamente  $1 \times 10^4$  unidades formadoras de colonias por mililitro, al menos aproximadamente  $1 \times 10^5$  unidades formadoras de colonias por mililitro, al menos aproximadamente  $1 \times 10^6$  unidades formadoras de colonias por mililitro, al menos aproximadamente  $5 \times 10^6$  unidades formadoras de colonias por mililitro, al menos aproximadamente  $1 \times 10^7$  unidades formadoras de colonias por mililitro, al menos aproximadamente  $5 \times 10^8$  unidades formadoras de colonias por mililitro, al menos aproximadamente  $1 \times 10^9$  unidades formadoras de colonias por mililitro, al menos aproximadamente  $1 \times 10^{10}$  unidades formadoras de colonias por mililitro, o al menos aproximadamente  $3 \times 10^{10}$  unidades formadoras de colonias por mililitro. En ciertas realizaciones, se proporcionan composiciones con *Methylobacterium sp.* en un título de al menos aproximadamente  $1 \times 10^4$  unidades formadoras de colonias por mililitro, al menos aproximadamente  $1 \times 10^5$  unidades formadoras de colonias por mililitro, aproximadamente al menos aproximadamente  $1 \times 10^6$  unidades formadoras de colonias por mililitro, al menos aproximadamente  $5 \times 10^6$  unidades formadoras de colonias por mililitro, al menos aproximadamente  $1 \times 10^7$  unidades formadoras de colonias por mililitro, o al menos aproximadamente  $5 \times 10^8$  unidades formadoras de colonias por mililitro a al menos aproximadamente  $6 \times 10^{10}$  unidades formadoras de colonias por mililitro de un líquido o una emulsión. En ciertas realizaciones, se proporcionan productos de caldos de fermentación con un título de *Methylobacterium sp.* de una fase sólida de ese producto que es al menos aproximadamente  $1 \times 10^4$  unidades formadoras de colonias por gramo, al menos aproximadamente  $1 \times 10^5$  unidades formadoras de colonias por gramo, al menos aproximadamente  $1 \times 10^6$  unidades formadoras de colonias por gramo, al menos aproximadamente  $5 \times 10^6$  unidades formadoras de colonias por gramo, al menos aproximadamente  $1 \times 10^7$  unidades formadoras de colonias por gramo, al menos aproximadamente  $5 \times 10^8$  unidades formadoras de colonias por gramo, al menos aproximadamente  $1 \times 10^9$  unidades formadoras de colonias por gramo, o al menos aproximadamente  $5 \times 10^9$  unidades formadoras de colonias por gramo a al menos



aproximadamente  $6 \times 10^{10}$  unidades formadoras de colonias de *Methylobacterium* por gramo, al menos aproximadamente  $1 \times 10^{11}$  unidades formadoras de colonias de *Methylobacterium* por gramo, al menos aproximadamente  $1 \times 10^{12}$  unidades formadoras de colonias de *Methylobacterium* por gramo, al menos aproximadamente  $1 \times 10^{13}$  unidades formadoras de colonias de *Methylobacterium* por gramo, o al menos aproximadamente  $5 \times 10^{13}$  unidades formadoras de colonias de *Methylobacterium* por gramo de la fase sólida. En ciertas realizaciones, se proporcionan composiciones con un título de *Methylobacterium* de al menos aproximadamente  $1 \times 10^6$  unidades formadoras de colonias por gramo, al menos aproximadamente  $5 \times 10^6$  unidades formadoras de colonias por gramo, al menos aproximadamente  $1 \times 10^7$  unidades formadoras de colonias por gramo, al menos aproximadamente  $5 \times 10^8$  unidades formadoras de colonias por gramo, al menos aproximadamente  $1 \times 10^9$  unidades formadoras de colonias por gramo, o al menos aproximadamente  $5 \times 10^9$  unidades formadoras de colonias por gramo a al menos aproximadamente  $6 \times 10^{10}$  unidades formadoras de colonias de *Methylobacterium* por gramo, al menos aproximadamente  $1 \times 10^{11}$  unidades formadoras de colonias de *Methylobacterium* por gramo, al menos aproximadamente  $1 \times 10^{12}$  unidades formadoras de colonias de *Methylobacterium* por gramo, al menos aproximadamente  $1 \times 10^{13}$  unidades formadoras de colonias de *Methylobacterium* por gramo, o al menos aproximadamente  $5 \times 10^{13}$  unidades formadoras de colonias de *Methylobacterium* por gramo de partículas en la composición que contiene las partículas que comprenden una sustancia sólida en donde un mono-cultivo o co-cultivo de *Methylobacterium sp.* está adherido a la misma. En ciertas realizaciones, se proporcionan composiciones con un título de *Methylobacterium* de al menos aproximadamente  $1 \times 10^6$  unidades formadoras de colonias por ml, al menos aproximadamente  $5 \times 10^6$  unidades formadoras de colonias por ml, al menos aproximadamente  $1 \times 10^7$  unidades formadoras de colonias por ml, o al menos aproximadamente  $5 \times 10^8$  unidades formadoras de colonias por ml a al menos aproximadamente  $6 \times 10^{10}$  unidades formadoras de colonias de *Methylobacterium* por ml en una composición que comprende una emulsión en donde un mono-cultivo o co-cultivo de un *Methylobacterium sp.* adherido a una sustancia sólida está provisto en la misma o cultivado en la misma. En ciertas realizaciones, se proporcionan composiciones con un título de *Methylobacterium* de al menos aproximadamente  $1 \times 10^6$  unidades formadoras de colonias por mL, al menos aproximadamente  $5 \times 10^6$  unidades formadoras de colonias por ml, al menos aproximadamente  $1 \times 10^7$  unidades formadoras de colonias por ml, o al menos aproximadamente  $5 \times 10^8$  unidades formadoras de colonias por ml a al menos aproximadamente  $6 \times 10^{10}$  unidades formadoras de colonias de *Methylobacterium* por ml en una composición que comprende una emulsión en donde un mono-cultivo o co-cultivo de un

*Methylobacterium* sp. está provisto en la misma o cultivado en la misma. En ciertas realizaciones de cualquiera de las composiciones mencionadas anteriormente, el *Methylobacterium* sp. se selecciona del grupo que consiste en NLS0017 (NRRL B-50931), NLS0020 (NRRL B-50930), NLS0021 (NRRL B-50939), NLS0037 (NRRL B-50941), NLS0038 (NRRL B-50942), NLS0042 (NRRL B-50932), NLS0046 (NRRL B-50929), NLS0062 (NRRL B-50937), NLS0064 (NRRL B-50938), NLS0065 (NRRL B-50935), NLS0066 (NRRL B-50940), NLS0068 (NRRL B-50934), NLS0069 (NRRL B-50936), NLS0089 (NRRL B-50933), y derivados de los mismos. En ciertas realizaciones de cualquiera de las composiciones mencionadas anteriormente, la composición puede comprender además un adyuvante aceptable desde el punto de vista agrícola, un excipiente aceptable desde el punto de vista agrícola, o combinación de los mismos. En ciertas realizaciones de cualquiera de las composiciones mencionadas anteriormente, el *Methylobacterium* sp. se selecciona del grupo que consiste en NLS0017 (NRRL B-50931), NLS0020 (NRRL B-50930), NLS0021 (NRRL B-50939), NLS0037 (NRRL B-50941), NLS0038 (NRRL B-50942), NLS0042 (NRRL B-50932), NLS0046 (NRRL B-50929), NLS0062 (NRRL B-50937), NLS0064 (NRRL B-50938), NLS0065 (NRRL B-50935), NLS0066 (NRRL B-50940), NLS0068 (NRRL B-50934), NLS0069 (NRRL B-50936), NLS0089 (NRRL B-50933), derivados de los mismos; y también comprende un adyuvante aceptable desde el punto de vista agrícola, excipiente, o combinación de los mismos. En ciertas realizaciones de cualquiera de las composiciones mencionadas anteriormente, la composición está exenta de sustancias que promueven el crecimiento de microorganismos residentes sobre una planta o semilla. También se proporcionan plantas, partes de plantas, y semillas de plantas que son revestidas o al menos revestidas parcialmente con cualquiera de las composiciones mencionadas anteriormente.

## 25 Ejemplos

Los siguientes ejemplos se incluyen para demostrar ciertas realizaciones de la invención. Los expertos en la técnica apreciarán que las técnicas descritas en los siguientes ejemplos representan técnicas descubiertas por los solicitantes para que funcionen bien en la práctica de la invención, y por tanto puede considerarse que constituyen ejemplos no limitantes para su práctica. Sin embargo, los expertos en la técnica deben, a la luz de la presente descripción, apreciar que se pueden hacer muchos cambios en las realizaciones específicas que se describen, a la vez que se obtienen aún resultados parecidos o similares, sin apartarse del alcance de la invención.

Ejemplo 1. Cultivo de cepas de PPFM en un medio de cultivo líquido suplementado con una sustancia sólida

El medio de cultivo líquido usado para cultivar los cultivos de PPFM fue un medio de sales base suplementado con glicerol, peptona y tierra de diatomeas. El medio de sales base  
5 usado fue medio de sales minerales de amonio (AMS). El medio AMS contiene, por litro, 700 miligramos de fosfato de potasio dibásico anhidro, 540 miligramos de fosfato de potasio monobásico anhidro, un gramo de sulfato de magnesio heptahidrato, 500 miligramos de cloruro de amonio anhidro, y 200 miligramos de cloruro de calcio dihidrato.

El medio base AMS se preparó a partir de tres soluciones patrón, enumeradas a  
10 continuación:

Disolución patrón I: para un litro a concentración 50X

fosfato de potasio dibásico, anhidro 35 gramos

fosfato de potasio monobásico, anhidro 27 gramos

Disolución patrón II: para un litro a concentración 50X

15 sulfato de magnesio heptahidrato 50 gramos

cloruro de amonio, anhidro 25 gramos

Disolución patrón III: para un litro a concentración 50X

cloruro de calcio dihidrato 10 gramos

Las soluciones patrón I, II y III se trataron en autoclave por separado.

20 Para preparar un litro de medio AMS líquido con glicerol, peptona y tierra de diatomeas, se añadió lo siguiente a 920 ml de agua destilada:

20 ml de disolución patrón I

20 ml de disolución patrón II

20 ml de disolución patrón III

25 20 ml de una disolución patrón de glicerol al 50%

10 gramos de peptona

2 gramos de tierra de diatomeas

La disolución resultante con tierra de diatomeas suspendida se esterilizó por tratamiento en

autoclave.

Se pusieron dos litros del medio AMS anterior en un matraz de cuatro litros. Se añadieron dos mililitros de cultivo líquido de PPFMs al medio para inocular. Después se puso el matraz en un agitador incubado ajustado a 240 RPM y 30 grados Celsius. Los cultivos fueron  
5 cultivados durante seis días y almacenados después a 4 grados Celsius para uso futuro.

## Ejemplo 2. Ensayo de cultivo y madurez de pimiento

### Resuspensión en agua de PPFM

Las cepas de PPFM a ser ensayadas fueron cultivadas como se describe en el Ejemplo 1 en un medio líquido suplementado con una sustancia sólida. En la campana biológica, se  
10 pipeteó la cantidad deseada de disolución de PPFM en tubos cónicos (asegurándose de girar/agitar la botella vigorosamente antes de pipetear para suspender en forma de partículas). Se usó una centrífuga para girar a 3.500 RPM durante 15 minutos a 23°C. Mientras eran centrifugados los tubos, se midió un volumen de agua del grifo tibia para llevar el volumen de cada muestra hasta el volumen total.

15 Se vertió cuidadosamente líquido de cada tubo, y el gránulo fue mantenido intacto cuidadosamente. Se añadió el volumen apropiado de agua del grifo a cada tubo para hacer concordar su volumen inicial de disolución de PPFM. Se usaron los PPFMS resuspendidos en agua tan rápidamente como fue posible.

### Preparación de semillas

20 Se contaron 100 semillas de semilla de pimiento 'Bangkok' de Johnny's (Johnny's Selected Semilla, Waterville, ME, USA) por grupo. Se empaparon las semillas en 30 ml de agua del grifo tibia durante 30 minutos para el grupo de control. Se empaparon las semillas en 30 ml de PPFMs resuspendidos en agua, cepa NLS0038, para los grupos de semilla tratados.

### Plantación

25 Se usó una bandeja con tapones de 2,54 centímetros (1 pulgada) de 96 celdas por grupo. Se llenaron dos bandejas con Farfard Super Fine Germination soilless media mix (de Sun Gro Horticulture, Agawam, MA, USA), se nivelaron con la parte superior de la celda, se apretó con los pulgares en cada celda para compactar, después se llenaron de nuevo a nivel con la parte superior de la celda. Se regaron, con agua bien templada, usando el aparato de  
30 ducha. Usando pincitas, se plantaron las semillas a una profundidad de aproximadamente 0,63 cm ( ¼"). Se plantó el grupo de control primero para evitar contaminación cruzada. Se puso 1 semilla en cada celda para un total de 96 semillas por grupo. Se taparon las semillas

y se añadió agua ligeramente. Se marcaron los grupos con etiquetas y se pusieron cúpulas de humedad por encima de los cajas planas.

Cultivo y desarrollo

Las cúpulas de humedad se retiraron después de ocurrir la germinación a los 7 días. A los 5 30 días de madurez, 8 plantas de cada grupo se transplantaron de sus bandejas de 96 celdas a macetas verdes de 11,43 cm (4,5”) llenas de Fafard 3B soilless media mix (de Sun Gro Horticulture, Agawam, MA, USA). A los 81 días, las plantas fueron lo suficientemente grandes para caer. Todas las plantas fueron de un tamaño similar, y se recortaron varios nodos para aligerar las plantas. El grupo de control se cortó primero, después se 10 esterilizaron las podadoras y se cortó el grupo tratado.

Resultados

A los 92 días, más de la mitad de las plantas del grupo tratado presentaron fruto maduro rojo, mientras que las plantas del grupo de control no exhibieron fruto maduro. Tanto el fruto maduro como el inmaduro se contaron para todas las plantas. Los recuentos de fruto totales para el grupo tratado con NLS0038 fueron un 15,8% más altos. Véanse las Tablas 2-4 a 15 continuación.

Tabla 2. Plantas con fruto maduro rojo observado, 92 días de crecimiento

	<b>+NLS0038</b>	<b>Control</b>
Total	5/8	0/8

Tabla 3. Recuentos totales de fruto observados a los 92 días de crecimiento

	<b>+NLS0038</b>	<b>Control</b>
	29	25
	15	29
	30	31
	22	25
	35	21

	<b>+NLS0038</b>	<b>Control</b>
	44	29
	46	32
	31	23
Total	252	215

Tabla 4. Recuentos totales de fruto maduro observados a los 105 días de crecimiento

	<b>+NLS0038</b>	<b>Control</b>
	15	20
	12	12
	5	20
	17	14
	14	9
	23	14
	23	14
	24	18
Total	133	121

Conclusión

- 5 Las plantas de pimiento cultivadas hasta la madurez a partir de semillas tratadas con PPFM, cepa NLS0038, produjeron más fruto maduro y un recuento de fruto total aumentado desde las observaciones iniciales de fruta en maduración a los 92 días. Trece días después de las observaciones iniciales, el grupo tratado continuó mostrando un ligero aumento en recuentos de fruta madura.
- 10 Ejemplo 3. Inoculación de semillas de lechuga 'Rex' para identificar PPFMs que aumentan el

crecimiento de raíces y brotes.

#### Siembra

Se puso un Oasis HorticultureXL™ de 104 celdas (de fondo ranurado, plantador simple; Smithers-Oasis North America, Kent, OH, USA) en una caja plana 1040 sin agujeros. Se retiraron cuatro cubos en el centro de la rejilla para permitir el riego del fondo. El Oasis HorticultureXL™ se regó para que estuviera totalmente saturado, se usó el aparato de ducha con agua templada. Se puso una semilla en cada celda para un total de 100 semillas por grupo.

#### Inoculación de las semillas de lechuga

Se cultivaron las cepas de PPFM a ser ensayadas como se describe en el Ejemplo 1 en un medio líquido suplementado con una sustancia sólida. En la campana biológica, se pipeteó la cantidad deseada de disolución de PPFM en tubos cónicos (asegurándose de girar/agitar la botella vigorosamente antes de pipetear para suspender en forma de partículas). Se usó una centrífuga para girar a 3.500 RPM durante 15 minutos a 23°C. Mientras eran centrifugados los tubos, se midió un volumen de agua del grifo tibia para llevar el volumen de cada muestra hasta el volumen total.

Se vertió cuidadosamente líquido de cada tubo, con cuidado para mantener el gránulo intacto. Se añadió el volumen apropiado de agua del grifo a cada tubo para hacer concordar su volumen inicial de disolución de PPFM. Se usaron los PPFMS resuspendidos en agua tan rápidamente como fue posible.

100 microlitros de disolución (disolución de PPFM para los grupos tratados y agua del grifo para los grupos de control) se pipetearon sobre la parte superior de cada semilla. Después de cada 3 filas, se tapó el tubo y se agitó para resuspender cualesquiera PPFMs que pudieran haber sedimentado en el fondo. Las puntas de las pipetas se cambiaron entre cada grupo para evitar contaminación cruzada. Se marcaron etiquetas y se fecharon para cada caja plana y se pusieron cúpulas de humedad transparentes por encima de la caja plana. Los cajas planas se pusieron en una cámara de crecimiento con ajustes de temperatura a 20° C y días de 12 horas con iluminación de 200 micromoles.

#### Crecimiento

Después de cinco a seis días, se retiraron las cúpulas después de que germinaron las semillas. Las cajas planas se regaron en el fondo solamente, y se fertilizaron con Jack's™ 15-16-17 (JR PETERS, Inc. Allentown, PA, USA) en cada riego (aproximadamente cada dos

días).

Se llevó a cabo una recolocación diaria de los cajas planas para impedir efectos potenciales sobre el crecimiento debidos a variaciones de las condiciones de luz en la cámara de crecimiento.

## 5 Procesamiento

Las cajas planas se cosecharon entre dos y tres semanas. Se pusieron cúpulas de humedad transparentes sobre cada caja plana para impedir la evapotranspiración durante el transporte. Las cúpulas se dejaron en su lugar hasta que la caja fue procesada. Cada planta se cortó directamente por debajo de los cotiledones y se pesó inmediatamente en una  
10 balanza analítica.

## Observaciones

Se observó que algunas cepas mostraron repetidamente un aumento en biomasa de brotes de vástagos de lechuga cuando se trató una semilla en el momento de la plantación. También se hicieron observaciones visuales de la masa y desarrollo de la raíz, los grupos  
15 tratados mostraron más crecimiento en el momento de la cosecha. Debido a la varianza natural de los sistemas biológicos, todos los tamaños de las muestras fueron 98 – 100 plantas como mínimo, y nada por debajo de un 12% diferencia se consideró significativo.

## Conclusión

Fue evidente que las cepas NLS0017, NLS0020, NLS0066, NLS0065, y NLS0089 muestran  
20 un aumento en el peso húmedo de vástagos de lechuga después del tratamiento de las semillas. Las cepas NLS0069, NLS0037, NLS0038, y NLS0062 exhibieron aumentos despreciables en peso húmedo en comparación con los controles. También se advirtió junto con un aumento en la biomasa de los brotes un aumento correspondiente en el desarrollo de la raíz.

25



Tabla 5. Efectos de tratamientos de semillas sobre el crecimiento de lechuga

cepa	título	peso húmedo del vástago (mg)		diferencia (%)	intervalo de confianza
		control	experimental		
NLS0017	2,7E+08	226,18	306,36	35,45%	0,000
NLS0017	1,4E+08	298,27	353,34	18,46%	0,012
NLS0017	2,7E+08	169,56	176,68	4,20%	0,567
NLS0017	1,1E+09	98,92	167,51	69,34%	0,000
NLS0020	7,2E+08	226,18	274,46	21,35%	0,027
NLS0020	1,2E+09	98,92	157,11	58,83%	0,000
NLS0020	1,2E+09	462,20	614,72	33,00%	0,000
NLS0021		462,20	539,39	16,70%	0,008
NLS0037	3,0E+08	226,18	258,68	14,37%	0,085
NLS0038	5,2E+07	462,20	514,99	11,42%	0,070
NLS0042	2,1E+08	226,18	310,85	37,44%	0,000
NLS0042	1,1E+08	169,56	189,46	11,73%	0,105
NLS0046	1,8E+09	462,20	511,78	10,73%	0,084
NLS0062	1,8E+08	169,56	187,62	10,65%	0,121
NLS0064		169,56	157,67	-7,01%	0,275
NLS0065	1,2E+08	169,56	211,92	24,98%	0,001
NLS0065	9,1E+07	98,92	132,35	33,80%	0,000
NLS0066	5,9E+08	56,15	69,57	23,91%	0,000
NLS0066	4,2E+08	546,61	665,46	21,74%	0,000
NLS0066	1,2E+08	98,92	129,81	31,23%	0,000

cepa	título	peso húmedo del vástago (mg)		diferencia (%)	intervalo de confianza
		control	experimental		
NLS0068	3,1E+08	213,52	234,95	10,04%	0,029
NLS0069	5,6E+07	226,18	244,25	7,99%	0,307
NLS0069	5,6E+07	298,27	332,53	11,49%	0,144
NLS0089	1,5E+08	98,92	146,99	48,60%	0,000
NLS0089		462,20	600,82	29,99%	0,000

<sup>1</sup> Cada línea representa datos obtenidos de una caja plana de plantas obtenidas de semilla tratada frente a semilla de control.

Ejemplo 4. Aplicación foliar de lechuga 'Rex' para identificar PPFMs que aumentan el crecimiento de la raíz y brotes.

## 5 Siembra

Se puso un Oasis HorticultureXL de 104 celdas (de fondo ranurado, plantador simple) en una caja plana 1020 sin agujeros. Se retiraron cuatro cubos en el centro de la rejilla para permitir el riego del fondo. El Oasis HorticultureXL™ se regó para que estuviera totalmente saturado, se usó el aparato de ducha con agua templada. Se puso una semilla en cada celda para un total de 100 semillas por grupo. Se marcaron etiquetas y se fecharon para cada caja plana y se pusieron cúpulas de humedad transparentes por encima de la caja plana. Las cajas planas se pusieron en una cámara de crecimiento con ajustes de temperatura a 20° C y días de 12 horas con iluminación de 200 micromoles.

### Inoculación de vástagos de lechuga

Después de cinco a seis días, se retiraron las cúpulas después de que las semillas hubieron germinado. Se inocularon las plantas en este momento, cuando sólo los cotiledones habían emergido. Las cepas de PPFM a ser ensayadas se cultivaron como se describe en el Ejemplo 1 en un medio líquido suplementado con una sustancia sólida. Las cepas de PPFM a ser ensayadas se cultivaron como se describe en el Ejemplo 1 en un medio líquido suplementado con una sustancia sólida. En la campaña biológica, se pipeteó la cantidad deseada de disolución de PPFM en tubos cónicos (después de girar/agitar la disolución

vigorosamente antes de pipetear para suspender en forma de partículas). Se usó una centrífuga para girar a 3.500 RPM durante 15 minutos a 23°C. Mientras eran centrifugados los tubos, se midió un volumen de agua del grifo tibia para llevar el volumen de cada muestra hasta el volumen total.

- 5 Se vertió cuidadosamente líquido de cada tubo, con cuidado para mantener el gránulo intacto. Se añadió el volumen apropiado de agua del grifo a cada tubo para hacer concordar su volumen inicial de disolución de PPFM. Se usaron los PPFMS resuspendidos en agua tan rápidamente como fue posible.

10 Se vertieron 100 mL de solución de PPFM (agua del grifo para control) en un Solo™ Handheld Sprayer de 1 L (Solo™, Newport News, VA, USA). La caja plana se retiró del grupo para evitar contaminación cruzada. Se usó el ajuste de rocío más fino y se pulverizó una capa uniforme de disolución sobre la parte superior de los vástagos, asegurando una cobertura uniforme a través de toda la caja plana. Para cada grupo esto se repitió, usando un tratamiento apropiado.

#### 15 Crecimiento

Las cajas planas se regaron en el fondo solamente y se fertilizaron con Jack's™ 15-16-17 (JR PETERS, Inc. Allentown, PA, USA) en cada riego (aproximadamente cada dos días). Se llevó a cabo una recolocación diaria de los cajas planas para impedir efectos potenciales sobre el crecimiento debidos a variaciones de las condiciones de luz en la cámara de  
20 crecimiento.

#### Procesamiento

Las cajas planas se cosecharon entre dos y semanas. Se pusieron cúpulas de humedad transparentes sobre cada caja plana para impedir la evapotranspiración durante el transporte. Las cúpulas se dejaron en su lugar hasta que la caja fue procesada. Cada planta  
25 se cortó directamente por debajo de los cotiledones y se pesó inmediatamente en una balanza analítica.

#### Observaciones

Se observó que algunas cepas muestran repetidamente un aumento en biomasa de brotes de vástagos de lechuga cuando se trató el vástago en la fase de cotiledón. También se  
30 hicieron observaciones visuales de la masa y desarrollo de la raíz, los grupos tratados mostraron más crecimiento en el momento de la cosecha. Debido a la varianza natural de los sistemas biológicos, todos los tamaños de las muestras fueron 98 – 100 plantas como

mínimo, y nada por debajo de un 12% diferencia se consideró significativo.

#### Conclusión

Es evidente que las cepas NLS0042, NLS0017, NLS0020, y NLS0068 muestran un aumento en el peso húmedo de vástagos de lechuga después de la aplicación foliar. Las cepas  
5 NLS0069, NLS0037, NLS0038, y NLS0062 exhibieron aumentos despreciables en peso húmedo en comparación con los controles. También se advirtió que junto con un aumento en la biomasa de los brotes hay un aumento correspondiente en el desarrollo de la raíz.

Tabla 6. Efectos de tratamientos foliares sobre el crecimiento de lechuga

cepa	títulos	peso húmedo del vástago (mg)		diferencia (%)	intervalo de confianza
		control	experimental		
NLS0017	1,4E+08	197,04	213,76	8,49%	0,075
NLS0017	1,1E+09	157,72	211,03	33,81%	0,000
NLS0020	2,2E+08	104,41	145,95	39,79%	0,000
NLS0020	7,2E+08	205,34	247,12	20,34%	0,030
NLS0020	1,2E+09	280,84	260,95	-7,08%	0,224
NLS0021	1,6E+07	157,72	178,46	13,15%	0,021
NLS0037		197,04	198,93	0,96%	0,846
NLS0038	7,4E+07	197,04	186,04	-5,58%	0,250
NLS0042	9,3E+07	103,36	127,05	22,92%	0,000
NLS0042	2,1E+08	205,34	235,92	14,89%	0,095
NLS0042	6,4E+07	298,27	331,62	11,18%	0,138
NLS0042	1,1E+08	157,72	196,12	24,35%	0,000
NLS0046	1,8E+09	157,72	195,03	23,66%	0,000
NLS0062		280,84	243,09	-13,44%	0,018

cepa	títulos	peso húmedo del vástago (mg)		diferencia (%)	intervalo de confianza
		control	experimental		
NLS0064		205,34	240,47	17,10%	0,042
NLS0064		298,27	306,88	2,89%	0,691
NLS0065	4,2E+08	197,04	214,59	8,91%	0,077
NLS0066	5,9E+08	205,34	241,92	17,81%	0,035
NLS0066	1,2E+08	280,84	166,98	-40,54%	0,000
NLS0068	1,7E+08	104,41	204,26	95,65%	0,000
NLS0068	1,6E+08	205,34	288,46	40,47%	0,000
NLS0068	3,1E+08	298,27	296,68	-0,53%	0,944
NLS0068	3,1E+08	280,84	264,65	-5,76%	0,337
NLS0068	3,1E+08	157,72	183,84	16,56%	0,010
NLS0069	4,5E+07	99,85	103,54	3,70%	0,711
NLS0089	1,3E+09	280,84	282,94	0,75%	0,896

<sup>1</sup> Cada línea representa datos obtenidos de cajas planas independientes de plantas tratadas frente a de control.

#### Ejemplo 5. Ensayo de crecimiento y madurez de pimiento adicionales

Se sometieron plantas de pimiento a ensayos adicionales esencialmente como se describe en el Ejemplo 2, excepto que se ensayaron las cepas de *Methylobacterium* NLS0037, NLS0042, y NLS0062. Los resultados se presentan en la Tabla 7.

Tabla 7: Efectos del tratamiento foliar sobre el recuento de flor y pimiento

Tratamiento	Recuento de flores (media por planta) 46 días post-plantación	Recuento de pimientos (media por planta) 64 días post-plantación
No tratado	18,3	25,4
NLS0037	24,8 (p = 0,08)	40,8 (p <0,05)
NLS0042	25,1 (p = 0,09)	38,9 (p <0,05)
NLS0062	24,1 (p = 0,06)	38,8 (p = 0,06)

Fue claro a partir de estos experimentos que los tratamientos con *Methylobacterium* indicados tuvieron un efecto positivo tanto sobre los recuentos de flores como de pimientos.

## 5 Referencias

1. Abanda-Nkpwatt, D., M. Musch, J. Tschiersch, M. Boettner, y W. Schwab. 2006. Molecular interaction between *Methylobacterium extorquens* and seedlings: growth promotion, methanol consumption, and localization of the methanol emission site. *J. Exp. Bot.* 57: 4025-4032.
- 10 2. Broekaert WF, Terras FR, Cammue BP, Vanderleyden J (1990) An automated quantitative assay for fungal growth inhibition. *FEMS Microbiology Letters* 69: 55–60.
3. Cao, Y-R, Wang, Q., Jin, R-X., Tang, S-K., He, W-X., Lai, H-X, Xu, L-H., y C-L Jiang. 2011. *Methylobacterium soli* sp. nov. a methanol-utilizing bacterium isolated from the forest soil. *Antonie van Leeuwenhoek* (2011) 99:629–634.
- 15 4. Corpe, W.A., y D.V. Basile. 1982. Methanol-utilizing bacteria associated with green plants. *Devel. Industr. Microbiol.* 23: 483-493.
5. Corpe, W.A., y S. Rheem. 1989. Ecology of the methylophilic bacteria on living leaf surfaces. *FEMS Microbiol. Ecol.* 62: 243-250.
6. Green, P.N. 2005. *Methylobacterium*. In Brenner, D.J., N.R. Krieg, and J.T. Staley (eds.).  
20 "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Volume two, The Proteobacteria. Part C, The alpha-, beta-, delta-, and epsilonproteobacteria." Second edition. Springer, New York. Pages

567-571.

7. Green, P.N. 2006. *Methylobacterium*. In Dworkin, M., S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer, and E. Stackebrandt (eds.). "The Prokaryotes. A Handbook on the Biology of Bacteria. Volume 5. Proteobacteria: Alpha and Beta Subclasses." Third edition. Springer, New York. Pages 257-265.
8. Holland, M.A. 1997. *Methylobacterium* and plants. Recent. Res. Devel. in Plant Physiol. 1: 207-213.
9. Holland, M.A., y J.C. Polacco. 1994. PPFMs and other covert contaminants: Is there more to plant physiology than just plant? Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 45: 197-209.
10. Kutschera, U. 2007. Plant-associated methylobacteria as co-evolved phytosymbionts. A hypothesis. Plant Signal Behav. 2: 74-78.
11. Lidstrom, M.E. 2006. Aerobic methylotrophic prokaryotes. In Dworkin, M., S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer, and E. Stackebrandt (eds.). "The Prokaryotes. A Handbook on the Biology of Bacteria. Volume 2. Ecophysiology and biochemistry." Third edition. Springer, New York. Pages 618-634.
12. Madhaiyan, M., S. Poonguzhali, H.S. Lee, K. Hari, S.P. Sundaram, y T.M. Sa. 2005. Pink-pigmented facultative methylotrophic bacteria accelerate germination, growth and yield of sugarcane clone Co86032 (*Saccharum officinarum* L.) Biol. Fertil. Soils 41: 350-358.
13. Madhaiyan, M., S. Poonguzhali, M. Senthilkumar, S. Seshadri, H. Chung, J. Yang, S. Sundaram, y T. Sa. 2004. Growth promotion and induction of systemic resistance in rice cultivar C0-47 (*Oryza sativa* L.) by *Methylobacterium* spp. Bot. Bull. Acad. Sin. 45: 315-324.
14. Madhaiyan, M., S. Poonguzhali , y T. Sa. 2007. Influence of plant species and environmental conditions on epiphytic and endophytic pink-pigmented facultative methylotrophic bacterial populations associated with field-grown rice cultivars. J Microbiol Biotechnol. 2007 Oct;17(10):1645-54.
15. Stanier, R.Y., N.J. Palleroni, y M. Doudoroff. 1966. The aerobic pseudomonads: A taxonomic study. J. Gen. Microbiol. 43: 159-271.
16. Sy, A., Giraud, E., Jourand, P., Garcia, N., Willems, A., De Lajudie, P., Prin, Y., Neyra, M., Gillis, M., Boivin-Masson, C., and Dreyfus, B. 2001. Methylotrophic *Methylobacterium* Bacteria Nodulate and Fix Nitrogen in Symbiosis with Legumes. Jour. Bacteriol. 183(1):214-220,

17. Sy, A., A.C.J. Timmers, C. Knief, y J.A. Vorholt. 2005. Methylo-trophic metabolism is advantageous for *Methylobacterium extorquens* during colonization of *Medicago truncatula* under competitive conditions. Appl. Environ. Microbiol. 71: 7245-7252.

5 18. Vogel, H.J., and D.M. Bonner. 1956. Acetylornithinase of *Escherichia coli*: Partial purification and some properties. J. Biol. Chem. 218: 97-106.

19. Vogel, H. J. 1956. A convenient growth medium for *Neurospora* (Medium N). Microbial Genet Bull 13: 42-43

20. Whittenbury, R., S.L. Davies, and J.F. Wilkinson. 1970. Enrichment, isolation and some properties of methane-utilizing bacteria. J. Gen. Microbiol. 61: 205-218.

10 La inclusión de diversas referencias en la presente memoria no es para ser interpretada como ninguna admisión por los solicitantes de que las referencias constituyan técnica anterior. Los solicitantes se reservan expresamente su derecho a rebatir cualesquiera alegaciones de no patentabilidad de las invenciones descritas en la presente memoria sobre las referencias incluidas en la presente memoria.

15 Habiendo ilustrado y descrito los principios de la presente invención, debe ser evidente para las personas expertas en la técnica que la invención puede ser modificada en disposición y detalle sin apartarse de tales principios.

Aunque los materiales y métodos de esta invención han sido descritos en términos de diversas realizaciones y ejemplos ilustrativos, será evidente para los expertos en la técnica  
20 que se pueden aplicar variaciones a los materiales y métodos descritos en la presente memoria sin apartarse del concepto, espíritu y alcance de la invención. Se considera que todos los tales sustitutos similares y modificaciones evidentes para los expertos en la técnica están dentro del espíritu, alcance y concepto de la invención, definida por las reivindicaciones adjuntas.

25



## REIVINDICACIONES

1. Un método para mejorar la producción de fruta, comprendiendo dicho método:
  - (a) aplicar una composición que comprende *Methylobacterium* a una planta o semilla productora de fruta, en donde dicha composición comprende una sustancia sólida con *Methylobacterium* adherentes cultivados sobre la misma o una emulsión que tiene *Methylobacterium* cultivados en la misma; y,
  - (b) cosechar fruta de dicha planta o una planta cultivada a partir de dicha semilla, en donde dicha planta o planta cultivada a partir de dicha semilla exhibe un cuajado más rápido de la fruta, cuajado de la fruta aumentado, maduración más temprana, y/o maduración de la fruta más uniforme en comparación con una planta de control no tratada, obteniendo de este modo una producción de fruta mejorada.
2. El método de la reivindicación 1, en donde dicha composición comprende *Methylobacterium* en un título de aproximadamente  $1 \times 10^6$  unidades formadoras de colonias por gramo (CFU/g) de sólido a aproximadamente  $1 \times 10^{14}$  CFU/g de sólido para la composición que contiene sólido o en un título de aproximadamente  $1 \times 10^6$  CFU/mL a aproximadamente  $1 \times 10^{11}$  CFU/mL para la composición que contiene emulsión.
3. El método de la reivindicación 1, en donde dicha planta productora de fruta es una planta de manzana, pera, uva, cítrico, melón, pimiento, tomate, baya, kiwi, mango o plátano.
4. El método de la reivindicación 1, en donde dicha composición está exenta de sustancias que promueven el crecimiento de microorganismos residentes sobre dicha planta o semilla.
5. El método de la reivindicación 1, en donde el *Methylobacterium* se selecciona del grupo que consiste en NLS0017 (NRRL B-50931), NLS0020 (NRRL B-50930), NLS0021 (NRRL B-50939), NLS0037 (NRRL B-50941), NLS0038 (NRRL B-50942), NLS0042 (NRRL B-50932), NLS0046 (NRRL B-50929), NLS0062 (NRRL B-50937), NLS0064 (NRRL B-50938), NLS0065 (NRRL B-50935), NLS0066 (NRRL B-50940), NLS0068 (NRRL B-50934), NLS0069 (NRRL B-50936), NLS0089 (NRRL B-50933), y derivados de los mismos.
6. El método de la reivindicación 5, en donde el *Methylobacterium* se selecciona del

grupo que consiste en NLS0037 (NRRL B-50941), NLS0038 (NRRL B-50942), NLS0042 (NRRL B-50932), NLS0062 (NRRL B-50937), y derivados de los mismos.

- 5
7. El método de la reivindicación 1, en donde la sustancia sólida con los *Methylobacterium* adherentes cultivados sobre la misma se proporciona en un líquido o una emulsión.
8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde dicha composición reviste o reviste parcialmente dicha planta o una parte de la misma, o dicha semilla.
9. Un método para mejorar la producción de fruta, comprendiendo dicho método:
- 10 (a) aplicar una composición que comprende *Methylobacterium* a una planta o semilla productora de fruta, en donde dicha composición comprende un *Methylobacterium* sp. seleccionado del grupo que consiste en NLS0017 (NRRL B-50931), NLS0020 (NRRL B-50930), NLS0021 (NRRL B-50939), NLS0037 (NRRL B-50941), NLS0038 (NRRL B-50942), NLS0042 (NRRL B-50932), NLS0046 (NRRL B-50929), NLS0062 (NRRL B-50937), NLS0064 (NRRL B-50938), NLS0065 (NRRL B-50935), NLS0066 (NRRL B-50940), NLS0068 (NRRL B-50934), NLS0069 (NRRL B-50936), NLS0089 (NRRL B-50933), y derivados de los mismos, y un adyuvante, excipiente, o combinación de los mismos aceptables desde el punto de vista agrícola; y,
- 15
- (b) cosechar fruta de dicha planta o una planta cultivada a partir de dicha semilla, en donde dicha planta o planta cultivada a partir de dicha semilla exhibe un cuajado más rápido de la fruta, cuajado de la fruta aumentado, maduración más temprana, y/o maduración de la fruta más uniforme en comparación con una planta de control no tratada, obteniendo de este modo una producción de fruta mejorada.
- 20
10. El método de la reivindicación 9, en donde dicha composición comprende el *Methylobacterium* en un título de aproximadamente  $1 \times 10^6$  unidades formadoras de colonias por gramo (CFU/g) de sólido a aproximadamente  $1 \times 10^{14}$  CFU/g de sólido para una composición que comprende una sustancia sólida con *Methylobacterium* adherente cultivado sobre la misma o en un título de aproximadamente  $1 \times 10^6$  CFU/mL a aproximadamente  $1 \times 10^{11}$  CFU/mL para una composición que comprende una emulsión que tiene los *Methylobacterium* cultivados en la misma.
- 25
- 30
11. El método de la reivindicación 9, en donde dicha planta productora de fruta es una planta de manzana, pera, uva, cítrico, melón, pimiento, tomate, baya, kiwi, mango o plátano.

12. El método de la reivindicación 9, en donde dicha composición está exenta de sustancias que promueven el crecimiento de microorganismos residentes sobre dicha planta o semilla.
- 5 13. El método de la reivindicación 9, en donde el *Methylobacterium* se selecciona del grupo que consiste en NLS0037 (NRRL B-50941), NLS0038 (NRRL B-50942), NLS0042 (NRRL B-50932), NLS0062 (NRRL B-50937), y derivados de los mismos.
14. El método de la reivindicación 13, en donde el *Methylobacterium* se selecciona del grupo que consiste en NLS0038 (NRRL B-50942), NLS0042 (NRRL B-50932), NLS0062 (NRRL B-50937), y derivados de los mismos.
- 10 15. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 14, en donde dicha composición reviste o reviste parcialmente dicha planta o una parte de la misma, o dicha semilla.
16. Un método para mejorar la producción de fruta, comprendiendo dicho método:
- 15 (a) aplicar una composición que comprende *Methylobacterium* a una planta o semilla productora de fruta, en donde dicha composición está exenta de sustancias que promueven el crecimiento de microorganismos residentes sobre dicha planta o semilla; y,
- (b) cosechar fruta de dicha planta o una planta cultivada a partir de dicha semilla, en donde dicha planta o planta cultivada a partir de dicha semilla exhibe un cuajado más rápido de la fruta, cuajado de la fruta aumentado, maduración más temprana, y/o maduración de la fruta más uniforme en comparación con una planta de control no tratada, obteniendo de este modo una producción de fruta mejorada.
- 20
17. El método de la reivindicación 16, en donde dicha planta productora de fruta es una planta de manzana, pera, uva, cítrico, melón, pimiento, tomate, baya, kiwi, mango o plátano.
- 25
18. El método de la reivindicación 16, en donde dicha composición comprende una sustancia sólida con *Methylobacterium* adherente cultivado sobre la misma.
19. El método de la reivindicación 18, en donde dicha composición comprende *Methylobacterium* en un título de aproximadamente  $1 \times 10^6$  CFU/g a aproximadamente  $1 \times 10^{14}$  CFU/g.
- 30
20. El método de la reivindicación 16, en donde dicha composición comprende una

emulsión que tiene *Methylobacterium* cultivados en la misma.

21. El método de la reivindicación 20, en donde dicha composición comprende *Methylobacterium* en un título de aproximadamente  $1 \times 10^6$  CFU/mL a aproximadamente  $1 \times 10^{11}$  CFU/mL.
- 5 22. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 21, en donde dicha composición reviste o reviste parcialmente dicha planta o una parte de la misma, o dicha semilla.
23. Un método para preparar una composición de tratamiento de una planta o semilla de planta que comprende *Methylobacterium* que está exenta de sustancias que promueven el crecimiento de microorganismos residentes sobre una planta o semilla, comprendiendo dicho método:
- 10 (a) cultivar un mono-cultivo o co-cultivo de *Methylobacterium* en un medio que comprende una fase acuosa, una fase líquida y una sustancia sólida, o una emulsión, obteniendo de este modo un medio que contiene *Methylobacterium*;
- 15 (b) separar el *Methylobacterium* de al menos una otra porción del medio que contiene *Methylobacterium*; y
- (c) reconstituir el *Methylobacterium* en una matriz que carece de sustancias que promueven el crecimiento de bacterias residentes sobre una planta o semilla; produciendo de este modo una composición de tratamiento de una planta o semilla que comprende *Methylobacterium* que está exenta de sustancias que promueven el crecimiento de microorganismos residentes sobre una planta o semilla.
- 20 24. El método de la reivindicación 23, en donde dicha separación se efectúa por centrifugación, filtración, o sedimentación del medio que contiene *Methylobacterium* y retirada del exceso de líquido o emulsión del mismo.
- 25 25. El método de la reivindicación 23, en donde dicha sustancia que promueve el crecimiento de microorganismos residentes sobre una planta o semilla se selecciona del grupo que consiste en una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno, una fuente de fósforo, y combinaciones de las mismas.
- 30 26. El método de la reivindicación 23, en donde dicha matriz es un líquido, una emulsión, o uno o más sólidos.
27. El método de la reivindicación 23, en donde la matriz comprende un adyuvante y/o

excipiente aceptable desde el punto de vista agrícola.

28. El método de la reivindicación 23, en donde *Methylobacterium* se cultivan en un medio que comprende una fase líquida y una sustancia sólida, la sustancia sólida con *Methylobacterium* adherente cultivado sobre la misma se separa de la fase líquida del medio que contiene *Methylobacterium*, y la sustancia sólida con *Methylobacterium* adherente cultivado sobre la misma se reconstituye en dicha matriz.
29. El método de la reivindicación 23, en donde dicha sustancia sólida con *Methylobacterium* adherente no es una sustancia que promueve el crecimiento de microorganismos residentes sobre una planta o semilla.
30. Un método para tratar una planta o semilla con una composición que comprende *Methylobacterium*, comprendiendo dicho método:
- (a) preparar dicha composición según el método de una cualquiera de las reivindicaciones 23 a 29; y
  - (b) aplicar dicha composición a una planta, una parte de la misma, o una semilla, tratando de este modo la planta o la semilla con una composición que comprende *Methylobacterium* que está exenta de sustancias que promueven el crecimiento de microorganismos residentes sobre una planta o semilla.
31. El método de la reivindicación 30, en donde dicha composición se aplica a dicha planta, parte de la misma, o semilla como una pulverización, o en donde dicha composición se aplica a dicha planta, parte de la misma o semilla por inmersión.
32. El método de la reivindicación 30, en donde la composición aplicada reviste o reviste parcialmente la planta, la parte de la misma, o la semilla.
33. Un método para tratar una planta o semilla con *Methylobacterium*, que comprende aplicar a una planta o semilla una composición que comprende una sustancia sólida con *Methylobacterium* adherente cultivado sobre la misma y exenta de sustancias que promueven el crecimiento de microorganismos residentes sobre una planta o semilla, tratando de este modo la planta o la semilla con *Methylobacterium*.
34. El método de la reivindicación 33, en donde dicha composición se aplica a dicha planta o una parte de la misma como una pulverización, o dicha composición se aplica a dicha planta, parte de la misma o semilla por inmersión.
35. El método de la reivindicación 33, en donde la composición aplicada reviste o reviste

parcialmente la planta, la parte de la misma, o la semilla.

36. El método de la reivindicación 33, en donde la sustancia sólida con *Methylobacterium* adherente no es una sustancia que promueve el crecimiento de microorganismos residentes sobre una planta o semilla.
- 5 37. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 33 a 36, en donde la composición comprende un adyuvante y/o excipiente aceptable desde el punto de vista agrícola.
38. Una composición que comprende una sustancia sólida con *Methylobacterium* adherente cultivado sobre la misma, en donde dicha composición está exenta de  
10 sustancias que promueven el crecimiento de microorganismos residentes sobre una planta o semilla.
39. La composición de la reivindicación 38, en donde dicha sustancia que promueve el crecimiento de microorganismos residentes sobre una planta o semilla se selecciona del grupo que consiste en una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno, una  
15 fuente de fósforo, y combinaciones de las mismas.
40. La composición de la reivindicación 38, que comprende además un adyuvante y/o excipiente aceptable desde el punto de vista agrícola.
41. La composición de la reivindicación 38, en donde la composición es una composición sólida y el *Methylobacterium* están en un título de aproximadamente  $1 \times 10^6$  CFU/g a  
20 aproximadamente  $1 \times 10^{14}$  CFU/g.
42. La composición de la reivindicación 41, en donde dichos *Methylobacterium* adherentes están en un título de al menos aproximadamente  $5 \times 10^8$  CFU/g a al menos aproximadamente  $5 \times 10^{13}$  CFU/g.
43. La composición de la reivindicación 38, en donde la composición es un líquido o una emulsión que contiene la sustancia sólida y los *Methylobacterium* están en un título  
25 de aproximadamente  $1 \times 10^6$  CFU/mL a aproximadamente  $1 \times 10^{11}$  CFU/mL.
44. La composición de la reivindicación 43, en donde los *Methylobacterium* están en un título de aproximadamente  $5 \times 10^8$  CFU/mL a aproximadamente  $1 \times 10^{11}$  CFU/mL.
45. La composición de la reivindicación 38, en donde la sustancia sólida con *Methylobacterium* adherente cultivado sobre la misma no es una sustancia que  
30 promueve el crecimiento de microorganismos residentes sobre una planta o semilla.

46. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 38-45, en donde el *Methylobacterium* se selecciona del grupo que consiste en NLS0017 (NRRL B-50931), NLS0020 (NRRL B-50930), NLS0021 (NRRL B-50939), NLS0037 (NRRL B-50941), NLS0038 (NRRL B-50942), NLS0042 (NRRL B-50932), NLS0046 (NRRL B-50929), NLS0062 (NRRL B-50937), NLS0064 (NRRL B-50938), NLS0065 (NRRL B-50935), NLS0066 (NRRL B-50940), NLS0068 (NRRL B-50934), NLS0069 (NRRL B-50936), NLS0089 (NRRL B-50933), y derivados de los mismos.