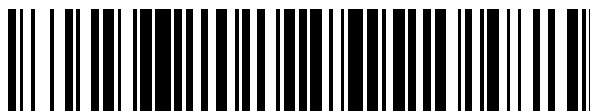


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 550 210**

51 Int. Cl.:

C12N 1/20 (2006.01)

C12N 1/38 (2006.01)

C12N 5/04 (2006.01)

C12N 5/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.03.2011** **E 11754054 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.09.2015** **EP 2545161**

54 Título: **Método de uso de enterobacter sp. 638**

30 Prioridad:

12.03.2010 US 313415 P

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

05.11.2015

73 Titular/es:

BROOKHAVEN SCIENCE ASSOCIATES, LLC

(100.0%)

40 Brookhaven Avenue, Building 460

Upton, NY 11973, US

72 Inventor/es:

NEWMAN, LEE;

VAN DER LELIE, DANIEL y

TAGHAVI, SAFIYH

74 Agente/Representante:

LAZCANO GAINZA, Jesús

ES 2 550 210 T3

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

Descripción

Método de uso de *enterobacter* sp. 638

5 Esta invención se realizó con el apoyo del gobierno bajo el número de contrato DE-AC02-98CH10886, otorgado por el Departamento de Energía de los EE.UU. El gobierno tiene determinados derechos sobre la invención.

Antecedentes de la invención

10 La presente invención se relaciona con el uso de *Enterobacter* sp. 638 en relación con el aumento de la masa o el número de frutos y/o semillas, o la disminución del tiempo hasta la floración o del tiempo hasta la maduración de los frutos, de una angiosperma.

15 Puede preverse que los cambios en el clima de la Tierra tengan un fuerte efecto sobre la productividad agrícola. Por ejemplo, se considera que el aumento de las emisiones procedentes de la combustión de combustibles fósiles ha afectado el clima de la Tierra, lo que ha hecho más deseable la producción de biocombustibles a partir de recursos renovables. Otra manera en la que se prevé que el cambio climático afecte la productividad agrícola es por el aumento de la temperatura y por la afectación de los patrones de precipitaciones. Aunque es deseable un aumento de la demanda de recursos agrícolas en la producción de materias primas para la producción de biocombustibles, este aumento de la demanda se compensa con un aumento simultáneo en la demanda de alimentos para el suministro a la aún creciente población mundial.

25 Por lo tanto, existe una necesidad de prácticas sostenibles que puedan usarse para optimizar la producción de alimentos y materias primas para los biocombustibles. Tales prácticas podrían aumentar de forma óptima la productividad general de las plantas de una manera sostenible, aumentar la tolerancia a la sequía en las plantas de manera que los cultivos y materias primas puedan soportar fluctuaciones importantes en los patrones de precipitaciones, y aumentar la tolerancia a las infecciones por patógenos en las plantas, Weyens y otros, Trends in Biotechnology, publicaciones Elsevier, Cambridge GB, Vol. 27, núm. 10 (2009) proporciona una reseña concerniente a los efectos beneficiosos de las bacterias asociadas a las plantas para aumentar la producción de biomasa. Se discuten varios mecanismos de promoción directa e indirecta del crecimiento vegetal.

Taghavi y otros (2009, Vol. 75, núm. 3, p. 748-757, Applied and environmental Microbiology) describe la capacidad del *Enterobacter* sp. 636 para promover el crecimiento de los árboles de álamos.

35 Breve descripción de la invención

40 En un aspecto, la invención se relaciona con un método para aumentar la masa o el número de frutos y/o semillas, o disminuir el tiempo hasta la floración o el tiempo hasta la maduración de los frutos, de una planta, el método comprende aplicar una composición a la planta en una cantidad eficaz para aumentar la masa o el número de frutos y/o semillas, o disminuir el tiempo hasta la floración o el tiempo hasta la maduración de los frutos, en donde la composición comprende un cultivo aislado de *Enterobacter* sp. 638, en donde la planta es una angiosperma.

45 En otro aspecto, la invención se relaciona con un método de la invención, el método comprende aplicar la composición a una raíz, un brote, una hoja, y/o una semilla de la planta.

En aún otro aspecto, la invención se relaciona con un método de la invención, en donde la angiosperma es tomate.

En un aspecto adicional, la invención se relaciona con un método de la invención, en donde la angiosperma es girasol.

50 En aún un aspecto adicional, la invención se relaciona con un método de la invención, en donde la angiosperma es tabaco.

Breve descripción de las figuras

55 La Fig. 1 es un análisis filogenético 16S del la cepa 638 de *Enterobacter* sp. .

60 La Fig. 2 es una representación circular del cromosoma 638 de *Enterobacter* sp. . Los círculos muestran (desde la parte exterior): la desviación del porcentaje de GC (ventana GC - media GC) en una ventana de 1000 pb, las CDS predichas transcritas en la dirección en el sentido de las manecillas del reloj, las CDS predichas transcritas en la dirección contraria al sentido de las manecillas del reloj, las CDS en la dirección en el sentido de las manecillas del reloj y contraria al sentido de las manecillas del reloj coloreadas de acuerdo con sus clases COG, la posición de todas las repeticiones palindrómicas, la posición de las 100 repeticiones palindrómicas (CCCTCTCCCXX(X)GGGAGAGGG) (sec. con núm. de ident.: 1), el sesgo GC (G+C/G-C) en una ventana de 1000 pb, y las coordenadas en pares de kilo bases. Las regiones sinténicas en comparación con E. coli K12 se muestran con genes que aparecen en naranja, mientras que los genes que aparecen en morado corresponden a la región no sinténica. Las flechas indican las funciones putativas de

genes ubicados en regiones que no están en sintenia con *E. coli* K12 (para detalles adicionales del contenido génico de cada una de las regiones ver la Tabla I). Una región sinténica se define por un mínimo de tres genes consecutivos que están presentes en una secuencia de genoma bacteriano, y que muestran una organización genética similar a la de esos mismos genes en otros genomas bacterianos.

La Fig. 3 es una representación circular del plásmido pENT638-1 de *Enterobacter* sp. 638. Los círculos muestran desde la parte exterior: la subdivisión de pENT -01 en grupos de funciones, la anotación de los genes, la desviación del porcentaje de GC (ventana GC - media GC) en una ventana de 1000 pb, las CDS predichas (rojo) transcritas en la dirección en el sentido de las manecillas del reloj, las CDS predichas (azul) transcritas en la dirección contraria al sentido de las manecillas del reloj, el sesgo GC (G+C/G-C) en una ventana de 1000 pb, los elementos de transposición de elementos IS (rosa) y pseudogenes (gris). Los sistemas toxina/antitoxina T (TA) se muestran con un asterisco (*).

La Fig. 4 representa los índices de crecimiento de esquejes de álamo inoculados con diferentes bacterias endofíticas. Los índices de crecimiento se determinaron 10 semanas después de la inoculación y la siembra de los esquejes en suelo arenoso. Se usaron siete plantas, por condición. Las plantas se cultivaron en el invernadero. Se usaron plantas no inoculadas como referencias. Las barras indican los errores estándar. Los índices de crecimiento se calcularon como (Mt - M0)/M0 después de 10 semanas de crecimiento de las plantas inoculadas y las no inoculadas. M0, peso de la planta (g) en la semana 0; Mt, peso de la planta (g) después de 10 semanas. La significación estadística del aumento de la producción de biomasa de las plantas inoculadas, en comparación con la de las plantas no inoculadas de control, se confirmó al nivel de 5 % (**) mediante el uso de la prueba de Dunnett.

La Fig. 5 muestra los efectos de *Enterobacter* sp. 638 sobre la formación de brotes y raíces de álamo DN-34. Las plantas se incubaron hidropónicamente en solución de Hoagland de fortaleza media en ausencia (Control) o presencia (638) de la cepa 638. El desarrollo de las raíces y los brotes se presenta después de (A) y 10 (B) semanas.

La Fig. 6 muestra el peso total de tomates cosechados después de un período de crecimiento de 4 meses. Las plantas inoculadas con *Enterobacter* sp. 638 tenían un rendimiento 10 % superior en comparación con las plantas no inoculadas de control.

La Fig. 7 presenta una disminución del tiempo hasta la floración después de la inoculación de plantas de girasol inoculadas con *Enterobacter* sp. 638 en comparación con plantas de girasol no inoculadas como controles.

La Fig. 8 muestra una comparación de cromatografías de extractos de *Enterobacter* sp. 638 cultivados en ausencia (cromatografía en la parte superior) o presencia (cromatografía en la parte inferior) de extractos vegetales. Nótese la producción de Acetoína y 2,3-Butanodiol en presencia de extractos vegetales. Este resultado se confirmó en un medio definido que contiene sacarosa.

La Fig. 9 muestra el porcentaje de genes de una clase COG particular en dependencia de su localización genética: cromosoma o plásmido pENT638-1. Leyenda de la clase Cog: D: control del ciclo celular, división celular, división de cromosomas; M biogénesis de pared celular/membrana/envoltura; N motilidad celular; O modificación postraduccional, recambio de proteínas, chaperonas; T mecanismos de transducción de señales; U tráfico intracelular, secreción, y transporte vesicular; V mecanismos de defensa; W estructuras extracelulares; J traducción, estructura ribosomal y biogénesis; K transcripción; L replicación, recombinación y reparación; C producción y conversión de energía; E transporte y metabolismo de aminoácidos; F transporte y metabolismo de nucleótidos; G transporte y metabolismo de carbohidratos; H transporte y metabolismo de coenzimas; I transporte y metabolismo de lípidos; P transporte y metabolismo de iones inorgánicos; Q biosíntesis, transporte y catabolismo de metabolitos secundarios; R predicción sólo de la función general; S función desconocida.

La Fig. 10 muestra la distribución de las repeticiones palindrómicas en el cromosoma de *Enterobacter* sp. 638. Los círculos muestran (desde la parte exterior): las CDS predichas transcritas en la dirección en el sentido de las manecillas del reloj y contraria al sentido de las manecillas del reloj, la posición de todas las repeticiones palindrómicas y de la repetición palindrómica "CCCTCTCCCXX(X)GGGAGAGGG" (sec. con núm. de ident.: I) que se encuentra en el genoma de *Enterobacter* sp. 638, la desviación del porcentaje de GC, el sesgo GC. La tabla al lado muestra la variación de las secuencias de nucleótidos XX(X) y sus números acumulativos.

La Fig. 11 muestra el aumento de la producción de biomasa de tabaco cuando se inocula con *Enterobacter* sp. 638. Para la comparación, se incluyeron las plantas no inoculadas de control y las plantas inoculadas con *Pseudomonas putida* W619. Para tabaco, las plantas inoculadas con *Enterobacter* sp. 638 no sólo mostraron el mayor aumento del crecimiento, sino, además, la aparición más temprana de la floración como se observó con girasol.

Descripción detallada de la invención

El 4 de marzo de 2011 se realizó un depósito biológico de *Enterobacter* sp. 638 de acuerdo con la invención con la Depositaria de Patentes ATCC, 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110.

A. Cultivo de *Enterobacter* sp. 638

Enterobacter sp. 638 es una cepa bacteriana no fitopatógica. La cepa 638 de *Enterobacter* sp. se aisló en condiciones aerobias a partir de muestras de raíces y tallos con superficie estéril tomadas de árboles de álamo híbrido H11-11 que se cultivaron en un suelo franco limoso con agua subterránea por debajo contaminada con tetracloruro de carbono o tricloroetileno.

La cepa 638 del *Enterobacter* sp. incluye un solo cromosoma circular de 4,518,712 pb con un contenido general G+C de 52.98 %, e incluye establemente un plásmido pENT638-1 de 157,749 pb, que tiene un contenido general G+C de 50.57 %. El plásmido pENT638-1 muestra, basado en el contenido de GC, al menos cuatro regiones distintas (Fig. 3). El plásmido pENT638-1 está relacionado con los plásmidos F encontrados en otras *Enterobacteriaceae*. Los plásmidos de esta familia están involucrados en la interacción con el huésped y la virulencia, tales como el plásmido pFra del microbio plaga *Yersinia pestis*. En pENT638-1, sin embargo, la isla de patogenidad de pFra se sustituye por una isla genómica putativa única de 23 kb (flanqueada por un gen de integrasa y que tiene un contenido de GC que es significativamente diferente al del resto del plásmido).

Un "cultivo aislado" se refiere a un cultivo del microorganismo que no incluye otros materiales (i) que se encuentran normalmente en el suelo en el que crece el microorganismo, y/o (ii) a partir del cual se aísla el microorganismo. Además, dicho cultivo puede ser un cultivo que no contiene ninguna otra especie biológica, de microorganismo, y/o bacteriana en cantidades suficientes para interferir con la replicación del cultivo o para ser detectadas mediante técnicas bacteriológicas, de biología molecular, y/o químicas normales.

B. Inoculante para una planta

Para facilitar el cultivo de la *Enterobacter* sp. 638, el cultivo puede diluirse, por ejemplo, con un medio o portador adecuado. Un "medio biológicamente aceptable" se refiere a un medio que no interfiere con la eficacia de la actividad biológica de *Enterobacter* sp. 638 y que no es tóxico para *Enterobacter* sp. 638.

Los ejemplos de un medio biológicamente aceptable incluyen un medio mínimo de sales con gluconato y un medio rico diluido (LB 1/100). El medio biológicamente aceptable puede incluir fuentes de carbono, tales como los siguientes compuestos ilustrativos: D-manitol, lactosa, sacarosa, arbutina, salicina, trehalosa, D-manosa, L-arabinosa, maltosa, celobiosa, xilosa, gluconato y glucosa. Preferentemente, el medio incluye glucosa, sacarosa, otros azúcares derivados de plantas, y/o extracto de álamo para inducir la inducción de fitohormonas promotoras del crecimiento vegetal (acetoina, 2,3-butanodiol, ver Fig. 8).

En una modalidad, el inoculante incluye, además, un microorganismo promotor del crecimiento vegetal, que incluye, por ejemplo, una bacteria endofítica, un hongo, una bacteria de la rizosfera y/o un hongo micorrizal promotor del crecimiento vegetal. Los microorganismos promotores del crecimiento vegetal ilustrativos incluyen pero no se limitan a los miembros de los géneros *Actinobacter*, *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Buttiauxella*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Kluyvera*, *Pseudomonas*, *Rahnella*, *Ralstonia*, *Rhizobium*, *Serratia*, y *Stenotrophomonas*.

C. Método para aumentar el crecimiento (descripción)

Una "planta" como se usa en la presente descripción se refiere a cualquier tipo de planta, tal como un árbol, arbusto, flor, hierba, vid, o pasto. El término "planta" se refiere, además, a cualquier parte de la planta, por ejemplo, a una planta completa, una parte de la planta, una célula vegetal, o un grupo de células vegetales, tales como tejido vegetal, o progenie de estas. Las plántulas también se incluyen dentro del significado de "planta." Las plantas incluyen cualquiera de las angiospermas, tanto monocotiledóneas como dicotiledóneas, y árboles de angiospermas. La invención se limita a las angiospermas.

Los ejemplos de angiospermas monocotiledóneas incluyen, pero no se limitan a, espárrago, maíz dulce y de campo, cebada, trigo, arroz, sorgo, cebolla, mijo perla, centeno y avena y otros cereales, caña de azúcar, pasto elefante, pasto varilla y miscanthus.

Los ejemplos de angiospermas dicotiledóneas incluyen, pero no se limitan a tomate, tabaco, algodón, semilla de colza, habas, soja, pimientos, lechugas, guisantes, alfalfa, trébol, cultivos de coles o *Brassica oleracea* (p. ej., repollo, brócoli, coliflor, coles de Bruselas), rábano, zanahoria, remolacha, berenjena, espinaca, pepino, calabacín, melón, melón cantalupo, girasol y varias plantas ornamentales. En una modalidad preferida, la planta es un tomate. En otra modalidad preferida, la planta es girasol. En aún otra modalidad preferida, la planta es tabaco.

Los ejemplos de especies leñosas de angiospermas incluyen álamo, secoya, roble, etc. Las especies de árboles angiospermas incluyen, además, por ejemplo, acacia, aliso, álamo temblón, haya, abedul, goma dulce, sicómoro, álamo, sauce, y lo similar. En una modalidad preferida, la angiosperma es un álamo.

Como se usa en la presente descripción, el término "aumento" del crecimiento se refiere a un aumento en una

característica de crecimiento de una planta tratada con un método o composición de la descripción, en la que el aumento de la característica de crecimiento es mayor que el crecimiento en una planta de control correspondiente cuando se cultiva en condiciones idénticas sin la aplicación del método o composición. Una planta de control "correspondiente" se refiere a una planta silvestre que es del mismo tipo o especie que la planta tratada con un método o composición de la descripción.

El aumento del crecimiento puede ser un aumento del crecimiento de una parte particular de la planta, tal como las raíces, los brotes, las hojas, las flores, los frutos, y/o las semillas, o el crecimiento puede estar distribuido por toda la planta. Los medios para medir el crecimiento se conocen en la técnica.

El aumento del crecimiento puede incluir, por ejemplo, un aumento en al menos una, o una combinación de, las siguientes características en la planta y/o una parte de la planta: altura, ancho, masa, una acumulación de carbono radioactivo, un aumento del peso seco, un aumento del peso fresco y/o un aumento de la velocidad de dichos aumentos en un período de tiempo específico.

El aumento del crecimiento puede ser un aumento que es 2, 4, 5, 6, 8, 10, 20 (o más) veces mayor en comparación con el crecimiento de una planta de control correspondiente cultivada en condiciones idénticas sin aplicación del método o composición. Por ejemplo, una planta que tiene aumento del crecimiento en comparación con la planta de control puede tener 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 75 %, 80 %, 90 %, 100 % o más crecimiento que la planta de control correspondiente cultivada en condiciones idénticas sin aplicación del método o composición.

D. Método para aumentar la biomasa (descripción)

El término "biomasa" se refiere al peso seco o al peso fresco de la planta. La biomasa incluye, por ejemplo, todas las partes de la planta a menos que se estipule de cualquier otra manera, tal como en referencia a la biomasa de los brotes (todas las partes de la planta por encima del suelo), la biomasa de las hojas, y la biomasa de las raíces. El término "peso seco" se refiere al peso de una planta que se ha secado para eliminar la mayor parte del agua celular. El término "peso fresco" se refiere al peso de una planta que no se ha secado para eliminar la mayor parte del agua celular. Los medios para medir la biomasa se conocen en la materia.

El término "aumento de la biomasa" se refiere a un aumento de la biomasa de una planta tratada con un método o composición de la descripción, en la que el aumento de la biomasa es una cantidad mayor que la cantidad de biomasa en una planta de control correspondiente cultivada en condiciones idénticas sin aplicación del método o composición.

El aumento de la biomasa puede ser un aumento que es 2, 4, 5, 6, 8, 10, 20 (o más) veces mayor en comparación con la biomasa de una planta de control correspondiente cultivada en condiciones idénticas sin aplicación del método o composición. Por ejemplo, una planta que tiene aumento de la biomasa en comparación con la planta silvestre puede tener 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 75 %, 80 %, 90 %, 100 % o más biomasa que la planta de control correspondiente cultivada en condiciones idénticas sin aplicación del método o composición.

E. Método para aumentar la tolerancia y/o resistencia a la enfermedad (descripción)

El término "tolerancia a la enfermedad" se refiere a la capacidad de una planta para soportar o resistir una enfermedad a la vez que mantiene la capacidad de funcionar y producir a pesar de la enfermedad. Una enfermedad incluye, por ejemplo, la presencia de una patología que afecta negativamente la viabilidad de una planta, tal como, por ejemplo, una infección por un patógeno (p. ej., un hongo, un virus, o una bacteria) en y/o sobre la planta.

El término "resistencia a la enfermedad" se refiere a la capacidad de una planta para desarrollar menos síntomas de enfermedad después de la exposición a una enfermedad que la planta de control correspondiente que no exhibe resistencia a la enfermedad cuando se cultiva en condiciones y con enfermedad idénticas. La resistencia a la enfermedad incluye resistencia completa a la enfermedad y/o grados variables de resistencia manifestados como disminución de los síntomas, mayor supervivencia, u otros parámetros de la enfermedad, tales como mayor rendimiento, aumento del crecimiento, aumento de la biomasa, maduración acelerada de los frutos, etc. Una enfermedad puede ser, por ejemplo, una infección fúngica tal como Septoria, Melampsora, o septotina, una infección viral tal como el virus del mosaico del álamo, y/o una infección bacteriana, tal como una infección de *Agrobacteria*, *Rickettsia*, o *Corinobacteria*.

El término "aumentar" la tolerancia y/o resistencia a la enfermedad se refiere a un aumento de la tolerancia y/o resistencia a la enfermedad de una planta enferma tratada con un método o composición de la descripción, en la que la tolerancia y/o resistencia a la enfermedad es mayor que la tolerancia y/o resistencia a la enfermedad en una planta de control correspondiente cultivada en condiciones y con enfermedad idénticas.

El aumento de la tolerancia y/o resistencia a la enfermedad puede ser un aumento que es 2, 4, 5, 6, 8, 10, 20 (o más) veces mayor en comparación con la tolerancia y/o resistencia de una planta de control correspondiente cultivada en condiciones y exposición a la enfermedad idénticas. Por ejemplo, una planta que tiene aumento de la tolerancia y/o resistencia a la enfermedad en comparación con la planta silvestre puede tener 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 75 %, 80 %, 90 %, 100 % o más tolerancia y/o resistencia que la planta de control correspondiente cultivada en condiciones y con enfermedad idénticas.

50 %, 60 %, 70 %, 75 %, 80 %, 90 %, 100 % o más tolerancia y/o resistencia a la enfermedad que la planta de control correspondiente cultivada en condiciones idénticas sin aplicación del método o composición.

5 Los métodos para evaluar la tolerancia y/o resistencia a la enfermedad se conocen en la materia. Por ejemplo, dichos métodos pueden incluir observaciones y calificación de las manifestaciones físicas de los síntomas de la enfermedad, pérdida del vigor de la planta, o muerte, y activación de genes específicos de respuesta a la enfermedad, en comparación con una planta de control.

F. Método para aumentar la productividad de frutos y/o semillas (invención)

10

La invención se relaciona con un método para aumentar la productividad de frutos y/o semillas en una planta, en donde la planta es una angiosperma. El método incluye aplicar una cantidad eficaz de una composición que incluye un cultivo aislado de *Enterobacter* sp. 638 a la planta.

15 "Aumentar la productividad" se refiere a aumentar la masa o número de frutos y/o semillas producidos por una planta tratada con un método de la invención, en la que el aumento de la productividad es una cantidad mayor que la cantidad de productividad en una planta de control correspondiente cuando se cultiva en condiciones idénticas sin aplicación del método.

20 Los métodos para evaluar un aumento de la productividad pueden incluir, por ejemplo, determinar el número de frutos producidos por la planta, el peso de los frutos individuales producidos por la planta, el tiempo hasta la floración en la planta, el tiempo hasta la maduración de los frutos en la planta, y/o el número de semillas producidas por un fruto o flor individual de la planta.

25 La productividad aumenta en una planta si, por ejemplo, el número de frutos producidos por la planta aumenta, el peso de los frutos individuales producidos por la planta aumenta, el tiempo hasta la floración en la planta disminuye, el tiempo hasta la maduración de los frutos en la planta disminuye, y/o el número de semillas producidas por un fruto o flor individual de la planta aumenta en comparación con una planta de control correspondiente cuando se cultiva en condiciones idénticas sin aplicación del método o composición.

30

El aumento o disminución de la productividad puede ser un aumento o disminución respectivo que es 2, 4, 5, 6, 8, 10, 20 (o más) veces mayor o menor que la productividad de una planta de control correspondiente cultivada en condiciones idénticas sin aplicación del método o composición. Por ejemplo, una planta que tiene aumento de la productividad en comparación con la planta de control puede tener 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 75 %, 80 %, 35 90 %, 100 % o más productividad que la planta de control correspondiente cultivada en condiciones idénticas sin aplicación del método o composición.

G. Método para aumentar la tolerancia y/o resistencia a la sequía (descripción)

40 El término "tolerancia a la sequía" se refiere a la capacidad de una planta para soportar o resistir condiciones de sequía. "Sequía" se refiere a una condición en la que una planta está sometida a estrés osmótico o reducción del potencial de agua. Por ejemplo, la sequía puede ser provocada por la falta de agua disponible durante un período de tiempo. Las condiciones de sequía pueden evaluarse mediante la comparación de la cantidad de agua necesaria para el crecimiento o maduración de una planta con la cantidad de agua disponible para la planta. Las condiciones de sequía pueden ser provocadas, por ejemplo, por la falta de precipitaciones o de irrigación, con relación a la cantidad de agua usada internamente o transpirada por una planta.

45

El término "resistencia a la sequía" se refiere a la capacidad de una planta para desarrollar menos síntomas de estrés hídrico (p. ej., menor productividad, pérdida de las hojas, muerte) que la planta de control correspondiente cuando se cultiva en condiciones idénticas de estrés hídrico. La resistencia a la sequía incluye la resistencia completa a los efectos de la sequía (sin pérdida de la productividad) o grados variables de resistencia manifestada como la disminución de los síntomas o mayor supervivencia.

50

La evaluación fenotípica de los síntomas puede usarse para determinar si, y en qué medida, una planta padece la sequía. Por ejemplo, la tolerancia y/o resistencia a la sequía puede evaluarse mediante la observación y calificación del marchitamiento, la detención del crecimiento, la muerte, la productividad, la pérdida de las hojas (p. ej., enrollamiento de las hojas, distorsión de las hojas, caída de las hojas, quemadura de las hojas), la muerte regresiva de tallos o ramas, la eficiencia fotosintética, la floración, y el nivel de rendimiento en una planta. Además, la tolerancia y/o resistencia a la sequía de una planta puede evaluarse, por ejemplo, mediante ensayos bioquímicos o basados en ácidos nucleicos para medir la expresión o activación de genes de respuesta específicos en la planta.

60

La tolerancia y/o resistencia a la sequía aumenta en una planta si la planta demuestra síntomas menos severos de estrés provocado por la sequía. Por ejemplo, la tolerancia y/o resistencia a la sequía aumenta si disminuyen el marchitamiento, la detención del crecimiento, la muerte, la pérdida de las hojas (p. ej., enrollamiento de las hojas, distorsión de las hojas, caída de las hojas, quemadura de las hojas), y/o la muerte regresiva de tallos o ramas en

65

comparación con una planta de control correspondiente cuando se cultiva en condiciones idénticas sin aplicación del método o composición. Otros ejemplos de un aumento de la tolerancia y/o resistencia a la sequía incluyen un aumento de la productividad, el vigor de la planta, la eficiencia fotosintética, la floración, y/o el nivel de rendimiento de una planta en comparación con una planta de control correspondiente cuando se cultiva en condiciones idénticas sin aplicación del método o composición.

En consecuencia, el término "aumentar" la tolerancia y/o resistencia a la sequía se refiere a un aumento de la tolerancia y/o resistencia a la sequía de una planta afectada tratada con un método o composición de la invención, en la que la tolerancia y/o resistencia es mayor que la tolerancia y/o resistencia a la sequía en una planta de control correspondiente cultivada en condiciones y con estrés hídrico idénticos.

El aumento de la tolerancia y/o resistencia a la sequía puede ser un aumento que es 2, 4, 5, 6, 8, 10, 20 (o más) veces mayor en comparación con la tolerancia y/o resistencia de una planta de control correspondiente cultivada en condiciones y con estrés hídrico idénticos. Por ejemplo, una planta que tiene aumento de la tolerancia y/o resistencia a la sequía en comparación con la planta de control puede tener 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 75 %, 80 %, 90 %, 100 % o más tolerancia y/o resistencia a la sequía que la planta de control correspondiente cultivada en condiciones idénticas sin aplicación del método o composición.

H. Métodos Generales

Cualquier método para aplicar una composición a una planta puede usarse en los métodos de la presente invención. Los métodos para aplicar una composición sobre y/o en una planta se conocen en la materia. En una modalidad, la composición puede inocularse en el suelo con la planta. En otra modalidad, la composición puede introducirse a las raíces de las plantas a través del crecimiento en un medio hidropónico o la pulverización sobre las hojas de una planta.

La composición puede aplicarse a cualquier parte de la planta, que incluye las semillas a través del uso de un mecanismo o aglutinante de revestimiento adecuado. La composición puede aplicarse sobre las plantas antes de la siembra o introducirse en los surcos de las plantas durante la siembra. Como otro ejemplo, la composición puede aplicarse a las raíces de la planta. La composición puede prepararse con o sin un portador y venderse como un inoculante separado para insertarlo directamente en los surcos en los que se siembra la planta.

De acuerdo con los métodos de la invención, una cantidad eficaz de la composición es aquella cantidad suficiente para establecer suficiente crecimiento bacteriano de tal manera que se logre el resultado deseado en la planta tratada. Una cantidad eficaz de la composición puede determinarse por medios conocidos en la materia para una especie vegetal particular. Por ejemplo, la inoculación con la composición puede realizarse en solución hidropónica durante seis días, y la suspensión bacteriana puede renovarse a los tres días después de la inoculación.

En una modalidad, la cantidad eficaz puede ser, por ejemplo, cualquier cantidad de aproximadamente 10^1 a aproximadamente 10^{12} células por planta. En otra modalidad, la cantidad eficaz es una concentración celular de aproximadamente 10^5 a aproximadamente 10^{10} UFC/ml de inóculo, con mayor preferencia de aproximadamente 10^6 a 10^8 UFC/ml, y con la máxima preferencia aproximadamente 10^8 UFC/ml. En aún otra modalidad, la composición puede mezclarse con el suelo en una cantidad de aproximadamente 10^5 a 10^{10} células por gramo de suelo.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Aislamiento y caracterización de *Enterobacter* sp. 638

Se recogieron muestras de raíces y brotes de árbol de álamo híbrido HII-II (*Populus trichocarpa* _*P. deltoides*) de 10 años de edad que creció en presencia de tetracloruro de carbono (12 ppm homogéneamente) durante 8 años en un sitio experimental en el Estado de Washington. Además, se recogió material de sauce nativo (*Salix gooddingii*) a partir de plantas nativas de 5 años de edad cultivadas en presencia de tricloroetileno (18 ppm) y tetracloruro de carbono (12 ppm) durante 5 años. Los esquejes se retiraron de las plantas con tijeras podadoras que se lavaron con etanol entre cortes y se colocaron en frascos de análisis orgánicos volátiles enjuagados con acetona que se colocaron en hielo para el traslado desde el campo. Las raíces y los brotes se trataron por separado. Las muestras frescas de raíces y brotes se lavaron vigorosamente en agua destilada durante 5 min, la superficie se esterilizó durante 5 min en una solución que contenía 1 % (p/vol) de cloruro activo (añadido como una solución de hipoclorito sódico [NaOCl]) complementado con 1 gotita de Tween 80 por 100 ml de solución, y se enjuagó tres veces en agua destilada estéril. Una muestra 100-1-11 del agua del tercer enjuague se sembró en placa en medio 869 (25) para verificar la eficiencia de la esterilización. Después de la esterilización, las raíces y los brotes se maceraron en 10 ml de MgSO₄ a 10 mM mediante el uso de un mezclador Polytron PT1200 (Kinematica A6). Se hicieron diluciones seriadas, y las muestras 100-J11 se sembraron en placa en medio no selectivo para probarlas para la presencia de los endófitos y sus características.

El *Enterobacter* sp. 638 se aisló en condiciones aerobias a partir de muestras de raíces y tallos con superficie estéril tomadas de árbol de álamo híbrido HII-II y sauce nativo (*Salix gooddingii*) que se cultivaron en un suelo franco limoso con agua subterránea por debajo contaminada con tetracloruro de carbono o tricloroetileno y tetracloruro de carbono,

respectivamente. Se extrajo el ADN genómico total y se usó para amplificar el gen del ARNr 16S. Los genes de ARNr 16S se amplificaron por PCR mediante el uso del conjunto de cebadores estándar 26F-1392R (Amann, 1995)

Ejemplo 2: Tamizaje de bacterias endofíticas para las propiedades promotoras del crecimiento vegetal en álamo.

Los inóculos (250 ml de cultivo) se prepararon mediante el cultivo de bacterias endofíticas en medio 869 de fortaleza 1110 (25) a 30 °C en un agitador rotatorio hasta que se alcanzó una concentración celular de 109 UFC/ml (densidad óptica a 660 nm (00660) de l). Las células se recogieron por centrifugación, se lavaron dos veces en MgSO₄ a 10 mM, y se resuspendieron en 1110 del volumen original (en MgSO₄ a 10 mM) para obtener un inóculo con una concentración celular de 10¹⁰ UFC/ml. Por cepa microbiana probada, se pesaron siete esquejes de álamo (*Populus deltoides* x *P. nigra*) DN-34 de aproximadamente 30 cm y se colocaron en un vaso de precipitado de 1 litro que contenía 0.5 litros de una solución nutriente de Hoagland estéril de fortaleza media (5), que se renovó cada 3 días. Los esquejes se dejaron enraizar durante aproximadamente 4 semanas hasta que comenzó la formación de las raíces. Posteriormente, se añadió un inóculo bacteriano a cada vasija a una concentración final de 108 UFC/ml en solución de Hoagland de fortaleza media. Después de 3 días de incubación, los esquejes se pesaron y se sembraron en suelo arenoso no estéril y se colocaron en el invernadero con una temperatura constante de 22 °C y un ciclo de 14 h de luz / 0 h de oscuridad con radiación fotosintética activa de 165 mmol m⁻² s⁻¹. Después de 10 semanas, las plantas se cosecharon, y se determinó su biomasa total, su aumento de biomasa, y la biomasa de diferentes tejidos vegetales. Se recogieron, además, los datos de las plantas no inoculadas de control. Los índices de crecimiento se calcularon como (Mt - MO)/MO después de 10 semanas de crecimiento en presencia o ausencia de inóculo de bacterias endofíticas, donde MO es el peso de la planta (g) en la semana 0 y Mt es el peso de la planta (g) después de 10 semanas. La significación estadística de los resultados se confirmó al nivel de 5 % mediante el uso de la prueba de Dunnett. Para determinar los efectos de las bacterias endofíticas sobre el enraizamiento del álamo DN-34, los esquejes se trataron como se describió anteriormente, salvo que el inóculo de bacterias endofíticas se añadió a partir del día 1.

El *Enterobacter* sp. 638 aislado de álamo se probó para su capacidad de mejorar el crecimiento de sus plantas huéspedes, junto con otras gammaproteobacterias endofíticas que se encuentran en árboles de álamo. *Burkholderia cepacia* Bu72, un endófito aislado originalmente de altramuza amarillo el cual se encontró que tiene efectos promotores del crecimiento vegetal sobre árboles de álamo, y *Cupriavidus metallidurans* CH34 (referido también como *Ralstonia metallidurans* CH34), una bacteria típica del suelo sin efectos promotores del crecimiento vegetal, se incluyeron como controles positivos y negativos, respectivamente. Además, se usaron esquejes no inoculados como controles.

Después de la formación de las raíces en condiciones hidropónicas y la posterior inoculación de bacterias endofíticas, los esquejes de álamo DN-34 se sembraron en un suelo arenoso marginal y se dejaron crecer durante 10 semanas, después de las cuales las plantas se cosecharon y se determinaron sus biomásas. Después de 10 semanas de crecimiento, los árboles de álamo inoculados con *M. populi* BJ001 tenían menor biomasa nueva que los controles (Fig. 4) ($P < 0.05$). Los esquejes de álamo inoculados con *Enterobacter* sp. 638 ($P = 0.018$) y *B. cepacia* BU72 ($P = 0.042$) mostraron estadísticamente mejor crecimiento que las plantas de control (Fig. 4), como se refleja por sus índices de crecimiento. Los efectos promotores del crecimiento vegetal de *Enterobacter* sp. 638 y *B. cepacia* BU72 fueron reproducibles en experimentos realizados independientemente.

En las condiciones de invernadero probadas, no se encontraron diferencias en los índices de crecimiento entre los de las plantas no inoculadas de control y los de las plantas inoculadas con *S. maltophilia* R551-3, *P. putida* W619, y *S. proteamaculans* 568; su crecimiento fue comparable al observado en plantas inoculadas con *C. metallidurans* CH34. Además, las plantas de control y las plantas inoculadas con las bacterias endofíticas tenían apariencia saludable, salvo por las plantas inoculadas con *M. populi* BJ001, las que mostraron signos de estrés, que incluyen clorosis de las hojas.

Ejemplo 3: Tamizaje de bacterias endofíticas para las propiedades promotoras del crecimiento vegetal en tabaco.

Debido a que las especies de *Nicotiana* se usan en el laboratorio como modelos de plantas grandes para estudios de transformación y de metabolitos, sería útil poder usar dicha planta para el estudio, incluso si no es útil para las aplicaciones de campo. Se dio inicio a plántulas de *Nicotiana xanthi* en medio de crecimiento sin suelo, y después del desarrollo de las hojas primarias, se transfirieron a soluciones hidropónicas. Después de una semana, las plantas se colocaron en soluciones que contenían 10⁸ UFC de *Enterobacter* sp. 638. Después de 3 días, los inóculos se renovaron, y después de tres días adicionales, las plantas se colocaron en macetas en el invernadero.

El crecimiento vegetal se controló semanalmente, y se registró el tiempo hasta la aparición de la floración. Las plantas alcanzaron su tamaño completo más rápidamente que las plantas no inoculadas, y la mayor parte de las plantas estaban en flor un mes antes que el mismo número de plantas no inoculadas estuvieran en flor.

Ejemplo 4: Efectos de las bacterias endofíticas sobre el desarrollo de raíces de álamo

Para probar, además, los efectos de las bacterias endofíticas sobre el desarrollo de las raíces, se realizaron experimentos de enraizamiento en presencia y ausencia de derivados de *Enterobacter* sp. etiquetados con gfp 638. La formación de las raíces fue muy lenta para las plantas no inoculadas. En contraste, para los esquejes que se dejaron

enraizar en presencia de los endófitos seleccionados, la formación de las raíces comenzó dentro de 1 semana, y la formación de los brotes fue más pronunciada en comparación con la de las plantas no inoculadas (Fig. 5A). Después de 10 semanas, la formación de las raíces en los controles no inoculados era todavía pobre; sin embargo, en las plantas inoculadas con *Enterobacter* sp. 638, las raíces y los brotes estaban bien desarrollados (Fig. 5B). La microscopía de fluorescencia se usó para visualizar la colonización interna de las raíces de las plantas mediante las cepas etiquetadas con *gfp*, lo que confirmó su comportamiento endofítico. La formación de microcolonias sobre la superficie de las raíces, como se observó para *P. putida* W619, estuvo ausente en las plantas inoculadas con *Enterobacter* sp. 638, donde sólo se observó colonización interna. No se detectó expresión de *gfp* para las raíces de las plantas no inoculadas de control.

Ejemplo 5: Efecto de las bacterias endofíticas sobre la productividad de la formación de frutos y de la floración

Para probar el efecto de las bacterias endofíticas de masa de producción de frutos, se dio inicio a semillas de tomate (variedad tradicional Brandywine, Park Seed) en una matriz de perlita/agua, y después se transfirieron a una solución hidropónica de solución de Hoagland de fortaleza 1/2. Cuando las plantas alcanzaron aproximadamente 3 pulgadas de alto, se transfirieron a soluciones que contenían 10^8 UFC por ml de bacterias endofíticas como se describió anteriormente. Tres días después de la inoculación, las plántulas se sembraron en el invernadero en ProMix, una mezcla comercial para macetas. Las fechas de la primera aparición de frutos y la masa total de tomates se registraron durante tres meses. Las plantas de tomate inoculadas con *Enterobacter* 638 tenían un 10 % de aumento de la productividad de frutos respecto a las plantas no inoculadas. Las plantas no inoculadas produjeron 82 frutos con una masa total de 22.374 kg, mientras que las plantas inoculadas produjeron 90 frutos con una masa combinada de 24.909 kg (Figura 6).

Se dio inicio a plántulas de girasol (Mammoth, Park Seed) mediante el uso del método descrito, y se registró el tiempo hasta la floración. En condiciones de invernadero, los girasoles inoculados comenzaron a florecer 5 días más temprano que las plantas no inoculadas, y 50 % estaban en flor mientras que sólo el 10 % de las plantas no inoculadas estaban en floración; 100 % de las plantas inoculadas estaban en floración mientras que sólo el 70 % de las plantas no inoculadas estaban en floración (Figura 7).

Ejemplo 6: Resistencia a la sequía

Esquejes de álamo híbrido de madera dura (OP-367 *Populus deltoides* x *P. nigra*) se colocaron en agua durante tres días para iniciar la formación de las raíces, y después se trasladaron a una solución de Hoagland de fortaleza 1/2 que contenía 10^8 UFC por ml de bacterias endofíticas durante tres días. Después los esquejes se sembraron en macetas que contenían suelo de jardín y se cultivaron en el invernadero durante tres meses con suministro de agua en exceso. Después de tres meses, se suspendió el riego de las plantas, y se controló el tiempo hasta la senescencia. Las plantas inoculadas mostraron como promedio 20 % de retraso en la aparición de los síntomas de sequía, en comparación con las plantas no inoculadas.

Ejemplo 7: Resistencia a la enfermedad

Debido al aumento del vigor de la plantas, así como a los elementos genéticos presentes en las bacterias endofíticas, las plantas inoculadas probarán ser más resistentes a la colonización por patógenos y los síntomas serán menos evidentes en las plantas inoculadas.

Esquejes de álamo híbrido, tanto H11-11 (muy susceptible a enfermedades fúngicas) como OP-367 (resistente a enfermedades fúngicas) se inocularán como se describe. Las plantas se sembrarán en mezcla estéril para macetas, y se cultivarán hasta que estén presentes de seis a ocho hojas. Después las plantas se expondrán a patógenos fúngicos, y se controlarán tanto para el tiempo de aparición como para la severidad de los síntomas físicos de la infección. Las plantas pueden analizarse, además, para determinar la actividad de genes conocidos de respuesta a la enfermedad.

Ejemplo 8: Estructura y características generales del genoma

El genoma de la gammaproteobacteria *Enterobacter* sp. 638 (Fig. 2) incluye un solo cromosoma circular de 4,518,712 pb con un contenido general de G+C de 52.98 %, e incluye un plásmido pENT638-1 de 157,749 pb, que tiene un contenido general de G+C de 50.57 % (Tabla I). El cromosoma de *Enterobacter* sp. 638 muestra una transición del sesgo GC, que corresponde con su origen (*oriC*) y término de la replicación (Fig. 2). El sitio *oriC* contiene una caja perfecta de unión a DnaA (TTATCCACA) (sec. con núm. de ident.: 2), la cual se ubica 31,985 pb corriente arriba del codón de iniciación ATG de *dnaA* (en la coordenada 4,487,245 pb).

El plásmido pENT638-1 muestra, basado en el contenido de GC, al menos cuatro regiones distintas (Fig. 3). El plásmido incluye una cadena principal ancestral, que es común para los plásmidos de la familia F y contiene las funciones básicas del plásmido para la transferencia y la replicación, y de regiones que son propensas a adquirirse por medio de la transferencia horizontal de genes. Estas regiones en el plásmido pENT638- 1 muestran una matriz de uso de codones diferente del resto de las especies de *Enterobacteriaceae*. Además, estas regiones no tienen sintenia con cromosomas o plásmidos secuenciados de cepas estrechamente relacionadas, y curiosamente estas regiones codifican genes

relacionados con la adhesión a la planta y su colonización. El mantenimiento estable en *Enterobacter* sp. 638 de pENT638-1 y estas regiones, que probablemente juegan un papel en la interacción exitosa entre *Enterobacter* sp. 638 y su planta huésped, parece importante si se tiene en cuenta la presencia de seis sistemas toxina/antitoxina (TA) relBE.

5 En contraste, el cromosoma de *Enterobacter* sp. 638 codifica sólo tres parejas de toxina/antitoxina (Ent638_0434-0435, Ent638_0476-0477, y Ent638_2066-2067). Este bajo número es representativo para organismos asociados a huéspedes.

10 El cromosoma codifica 4395 secuencias codificantes (CDS) putativas que representan una densidad de codificación de 87.9 %, y el plásmido pENT638-1 codifica 153 CDS putativas que tienen una densidad de codificación de 80.4 %. Después de su anotación manual, 3562 CDS (78.3 %) pudieron asignarse a una función biológica putativa, mientras que 835 CDS (18.4 %) se anotaron como proteínas hipotéticas de función desconocida. Las proteínas hipotéticas conservadas están representadas por 684 CDS (15.0 %), mientras que 151 CDS (3.3 %) no tuvieron homología con ninguna secuencia reportada anteriormente. Mediante el uso del módulo COGNITOR del sistema MaGe, 3597 CDS (79.1 %)
15 pudieron asignarse a una o más clases COG funcionales (ver Fig. 9). La repartición de 638 CDS de *Enterobacter* sp. entre las diferentes clases COG es muy similar a la que se observa para *E. coli* K12. Las tres clases más abundantes son el transporte y metabolismo de aminoácidos (E), carbohidratos (G) y hierro inorgánico (P) y representan más del 37 % de todas las CDS, lo que apunta a los estilos de vida simbióticos de *Enterobacter* sp. 638 y *E. coli* K12 que requieren la captación eficiente de los nutrientes proporcionados por el huésped. Se encontraron siete conjuntos de genes de ARNr 5S, 16S, 23S y un gen de ARNr 5S adicional. Se identificó un total de 83 genes de ARNr con especificidades para los 20 aminoácidos, y un solo ARNr para selenocisteína.

25 El genoma de *Enterobacter* sp. 638 codifica 8 factores Sigma: *flhA* (Ent638 _ 2509; Sigma 28), tres similares a *rpoE* Sigma 24 (Ent638 _3060, Ent638 _3117 y Ent638 _3389), *rpoS* (Ent638 _3212, Sigma 38), *rpoD* (Ent638 _3473, Sigma 70), *rpoN* (Ent638 _3638, Sigma 54) y *rpoH* (Ent638 _3865, Sigma 32).

El *Enterobacter* sp. 638 codifica una dam metilasa activa involucrada en la metilación de la adenina en los sitios GATC, como se confirmó por digestión *MboI* y *Sau3AI* del ADN, la primera enzima es incapaz de digerir el ADN metilado de *Enterobacter* sp. 638.

30 En el genoma de *Enterobacter* sp. 638 se encontraron cien repeticiones palindrómicas (CCCTCTCCCXX(X)GGGAGAGGG) distribuidas de manera no uniforme en el cromosoma (ver Fig. 10). Estas repeticiones que forman bucles en horquilla (con XX(X) que son principalmente TGT/ACA o AC/TG) frecuentemente se ubican por duplicado o triplicado en el extremo 3' de los genes y probablemente juegan un papel en la terminación de la transcripción.

35 Se encontraron ocho elementos de secuencia de inserción (IS) en el genoma de *Enterobacter* sp. 638: dos de la familia IS3/IS51 (uno compuesto de tres ORF con un desplazamiento del marco (Ent638 _0739, Ent638 _0740, Ent638 _0741) y uno compuesto de un solo ORF (Ent638_0060)), un elemento IS de la familia IS110 (Ent638_1530), y tres elementos IS de la familia IS481 (Ent638_2980, Ent638_3160 y Ent638_3288). Algunos de estos elementos IS delimitan islas genómicas (ver la sección más abajo).

45 El plásmido pENT638-1 tiene dos elementos IS completos, uno de la familia Tn3 compuesto de un ORF (Ent638 _4224) y uno de la familia IS3/IS407 compuesto de dos ORF (Ent638 _4320 y Ent638 _4321), así como dos transposasas truncadas de esta última familia. La IS completa y la transposasa truncada de las familias IS3/S407 flanquean una gran región que codifica genes involucrados en el mantenimiento y la replicación del plásmido (*sopAB*, *repA*) y genes involucrados en la transferencia del plásmido por conjugación (*tra*). Esta región de 75 kb puede considerarse como la cadena principal de pENT638-1.

50 Cuando se comparó el genoma de *Enterobacter* sp. 638 con el de las cepas estrechamente relacionadas, se determinó que el genoma de *Enterobacter* cancerogenus ATCC 35316 es el más cercano con 80.4 % de las CDS en sintenia con *Enterobacter* sp. 638, después *Klebsiella pneumoniae* 342 y MGH 78578 (ambas con 74 % de las CDS en sintenia), seguido por *Citrobacter koseri* ATCC BAA-895 (73 %) y después las especies de *Escherichia coli* (entre 63 a 73 %)

55 La adaptación específica de *Enterobacter* sp. 638 a su planta huésped se analizó a través de la comparación del genoma con otros microbios asociados a plantas y con la bacteria gastrointestinal *E. coli* K12 (MGI655). Esta cepa, seleccionada como un organismo de referencia debido a que es el genoma bacteriano mejor anotado, compartía (criterio 80 % de identidad en 80 % de la longitud de la proteína) 2938 CDS sinténicas (69.2 % de su genoma) con *Enterobacter* sp. 638. Las regiones sinténicas se agrupan en 304 sintones con un número promedio de 10.5 CDS por sintón.

60 Se identificaron cincuenta y seis regiones en el genoma de *Enterobacter* sp. 638, que no estaban en sintenia con los genomas de bacterias estrechamente relacionadas. Entre ellas, dieciocho regiones cumplen los criterios para islas genómicas putativas (destacadas en gris en la tabla 2). Estas islas genómicas contienen genes que codifican proteínas involucradas en el transporte de azúcares (sistema PTS), la adhesión, la utilización de pectato, la captación de hierro a

través de receptores de sideróforos, la reducción de nitrato, la biosíntesis del pilus, así como muchos otros transportadores y reguladores. La región número 47 es un ejemplo ilustrativo de la adquisición de una isla genómica que contiene genes involucrados en la adaptación a un estilo de vida endofítico. Esta región codifica un transportador y proteínas de degradación de pectato putativos, lo que puede permitir que la cepa 638 crezca en pectato (un compuesto importante sintetizado por las plantas) como fuente de carbono. Esta isla genómica está flanqueada por un gen de integrasa y está insertada en un sitio de ARNt-Gli.

Se encontraron ocho fagos y un plásmido putativo integrado en el cromosoma. Un total de 302 proteínas de fagos, que incluyen 18 genes putativos de integrasa, se identificaron.

Además, el cromosoma de *Enterobacter* sp. 638 contiene una región con repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas (CRISPR) ubicada próxima a seis genes (Ent638_1401-1406) que codifican secuencias asociadas a CRISPR (Cas). Las CRISPR son propensas a proporcionar tolerancia adquirida contra bacteriófagos. Seis de los ocho profagos están flanqueados por regiones, que carecen de sintenia con las regiones correspondientes en bacterias estrechamente relacionadas tales como *E. coli* K12, 0157-H7 y UT189, *Klebsiella pneumoniae* MGH 78578 o *Citrobacter koseri* BAA-895, y que pueden haberse adquirido a través de la transducción de fagos. Estas regiones contienen genes importantes en las interacciones bacteria/planta tales como transportadores de aminoácidos y hierro/sideróforo, hemolisina (HCP), y una proteína y transportador de hemaglutinina (Tabla 2, Fig. 2). Hasta ahora, la movilidad intercelular o extracelular, de las islas genómicas, los fagos y los elementos IS no se demostraron experimentalmente.

Ejemplo 9: Supervivencia en la rizosfera de la planta: visión general de las capacidades metabólicas de *Enterobacter* sp. 638

Generalmente, el álamo se multiplica por esquejes, y dado que el número de endófitos en los esquejes es muy bajo, muchas especies de bacterias endofíticas deben sobrevivir en el suelo antes de colonizar al álamo. *Enterobacter* sp. 638 está bien adaptada para sobrevivir en la rizosfera de la planta porque codifica muchos transportadores involucrados en la captación de carbohidratos, aminoácidos y hierro, así como algunos genes de resistencia a metales pesados. La mayoría de las rutas metabólicas que se describen más abajo se confirmaron mediante el cultivo de la cepa 638 en condiciones de crecimiento selectivo (Taghavi y otros, 2009).

Metabolismo de carbohidratos

El genoma de *Enterobacter* sp. 638 codifica todas las rutas del metabolismo central, que incluyen las rutas del ciclo del ácido tricarboxílico, de Entner-Doudoroff, de Embden-Meyerhof-Parnas y de las pentosas fosfato. La cepa no es capaz de crecer autotróficamente, pero puede usar una gran variedad de compuestos como fuentes de carbono: D-manitol, lactosa, sacarosa, arbutina, salicina, trehalosa, D-manosa, L-arabinosa, maltosa, celobiosa, xilosa, gluconato y glucosa (Taghavi y otros 2009). El *Enterobacter* sp. 638 tiene una lactasa (*lacZ*, Ent638_0928), una xilosa isomerasa (Ent638_0156) y una xilulocinasa (Ent638_0157). La utilización de lactosa como una única fuente de carbono es una característica de las *Enterobacteriaceae*. *Enterobacter* sp. 638 tiene la capacidad genética de crecer en malonato, su genoma contiene un agregado de nueve genes (*mdcABCDEFGHR*, Ent638_3779-Ent638_3772) involucrados en la descarboxilación de malonato que cataliza la conversión de malonato en acetato.

La diversidad de utilización de azúcares podría estar relacionada con la diversidad de glicosido hidrolasas. El genoma de *Enterobacter* sp. 638 porta los 55 genes que codifican las glicosido hidrolasas putativas, que representan 24 familias diferentes (base de datos de CAZy). En contraste, debe mencionarse que el patógeno *Enterobacter sakazakii* de humanos tiene 63 glicosido hidrolasas (base de datos de CAZy).

Las bacterias y hongos patógenos de las plantas ganan acceso mediante la degradación activa de los compuestos de la pared celular vegetal mediante el uso de las glicosido hidrolasas que incluyen las celulasas/endoglucanasas (que incluyen los miembros de las familias GH5, GH9, GH44, GH48 y GH74 de la glicosido hidrolasa), liquenasas (GH16) y xilanasas (GH10, GH11). Las hidrolasas no glicosídicas que representan los miembros putativos de las familias de las endo, exo, celulasas y hemicelulasas usadas comúnmente para romper los polímeros de la pared celular vegetal se codificaron en el genoma de *Enterobacter* sp. 638. Esta observación es consistente con el comportamiento no fitopatogénico de *Enterobacter* sp. 638. Sin embargo, debe notarse que se encontraron dos endo-1,4-D-gluconasas (GH8) (*bcsZ*: Ent638_3928, Ent638_3936) como parte de un locus bacteriano de síntesis de celulosa.

Captación de nutrientes vegetales

Los organismos que viven en asociación simbiótica, como *Enterobacter* sp. 638 y su álamo huésped, por ejemplo, necesitan compartir recursos, por lo tanto, se espera que el genoma de *Enterobacter* sp. 638 codifique una gran diversidad de transportadores que le permitirán captar los nutrientes liberados por las plantas. Un total de 631 ORF codificaron las proteínas transportadoras putativas: entre ellas 295 codificaron los transportadores ABC (que incluyen un transportador fosfato), 81 codificaron los transportadores de la superfamilia principal facilitadora (MFS), 41 codificaron los transportadores de la familia del sistema de fosfotransferasas (PTS) y 14 codificaron los transportadores de la familia

de nodulación, resistencia y división celular (RNO) (ver la lista completa de los transportadores putativos y sus sustratos en SOM). Esta observación es consistente con el estilo de vida asociado a plantas de *Enterobacter* sp. 638, que requiere la captación eficiente de los nutrientes sintetizados en las plantas, que incluyen los liberados en la rizosfera.

- 5 El genoma de *Enterobacter* sp. 638 codifica muchos transportadores PTS. El análisis fitogenético se usó para asignar la especificidad por el sustrato a los transportadores de PTS de *Enterobacter* sp. 638: 7 pertenecieron a los α -glicósidos (para la captación de glucosa, N-acetilglucosamina, maltosa, glucosamina y α -glicósidos), 7 a los β -glicósidos (para la captación de sacarosa, trehalosa, ácido N-acetilmurámico y β - glicósidos), 2 fueron transportadores PTS de fructosa (para la captación de fructosa, manitol, manosa y 2-O- α -manosil D-glicerato) y 6 fueron transportadores PTS de lactosa (para la captación de lactosa, celobiosa y β -glicósidos aromáticos).

Resistencia a metales pesados

- 15 El genoma de *Enterobacter* sp. 638 porta los genes putativos involucrados en la resistencia al cobre, que incluyen una ATPasa CopA tipo P (Ent638 _0962) cuya expresión se regula por CueR (Ent638 _09630), el operón de eflujo de cobre *cusABC* (Ent638 _1157-1154), la cobre oxidasa múltiple CueO (Ent638 _0671), y un operón que codifica las proteínas putativas de resistencia a cobre CopC y CopO (Ent638 _2411-12). De manera interesante, la cepa no creció en medio mínimo de glucosa 284 en presencia de 100 11M CU(NO₃)₂.

- 20 El genoma de *Enterobacter* sp. 638 codifica, además, un agregado de resistencia a arsénico/arsenato que se encontró próximo al origen de replicación del plásmido pENT638-1 (*arsHRBC*, Ent638_4254-Ent638 _4257), y se encontró que la cepa 638 crece exitosamente en medio mínimo de glucosa 284 en presencia de 200 μ M de arsenato (como Na₂HAsO₄).

- 25 La presencia de arsenato y genes putativos de resistencia a cobre no es inesperada, ya que *Enterobacter* sp. 638 se aisló de álamos cultivados en el área que fue afectada por las emisiones del fundidor ASARCO en Tacoma, WA, un fundidor de cobre que durante las operaciones desde 1905 hasta 1982 se consideró una de las fuentes más grandes de emisión de arsénico en los EE. UU.

- 30 Otros genes de resistencia a metales pesados ubicados en el cromosoma incluyen una cromato reductasa putativa (YieF o ChrR, Ent638 _4144) y una ATPasa ZntA de eflujo de tipo P (Ent638 _3873) involucradas en la resistencia a zinc/cadmio/cobalto. La cepa 638 fue capaz de crecer en medio mínimo de glucosa 284 en presencia de 500 μ M de ZnSO₄, 500 μ M de CdCl₂, 100 μ M de CdCl₂, 50 μ M de NiCl₂. Aunque puede sugerirse que estos genes están presentes, además, en otras especies de *E. coli*, la presencia de estos puede ser suficiente para proporcionar una ventaja selectiva sobre otras bacterias para sobrevivir en la rizosfera, especialmente cuando están presentes estos metales.

- 35 Los metales pesados son, además, cofactores importantes, y el genoma de *Enterobacter* sp. 638 codifica varios genes involucrados en la captación y eflujo de metales pesados. Se encontraron los genes de los transportadores ABC involucrados en la captación de zinc (*znuACB*, Ent638_2426- 2428) y níquel (*nikABCDE*, Ent638_1834-Ent638_1838). El níquel es un cofactor esencial de la ureasa (Dosanjh y otros 2007), y a diferencia de *E. coli* K12 y *S. proteamaculans* 568, *Enterobacter* sp. 638 es capaz de convertir urea en amonio (*ureABC*, Ent638 _3464-Ent638 _3466).

Estrés oxidativo, que contrarresta el mecanismo de defensa de las plantas

- 45 Las plantas emplean una variedad de mecanismos de defensa contra infecciones bacterianas, virales y fúngicas, que incluyen la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) (especies radicales de superóxido, radicales hidropéroxilo, peróxido de hidrógeno e hiroxilo), óxido nítrico y fitoalexinas. Antes de la colonización de las raíces, la cepa 638 tiene que sobrevivir en un medio ambiente oxidativo de la rizosfera. El cromosoma de *Enterobacter* sp. 638 codifica tres superóxido dismutasas: SodA, una superóxido de Mn dismutasa (Ent638 _4063); SodB una superóxido de Fe dismutasa (Ent638_1191); y SodC, una superóxido de Cu/Zn dismutasa (Ent638_1801). Contiene, además, tres catalasas, KatE (Ent638 _1712), KatN (Ent638 _3129) y KatG (Ent638_4032), tres hidropéroxido reductasas, *ahpC* (Ent638 _0872 y Ent638 _1145) y *ahpF* (Ent638 _1146), dos hidropéroxido reductasas adicionales (una *ahpC* Ent638 _3391 y Ent638 _0498 putativa que tiene un dominio AhpD), una cloroperoxidasa (Ent638 _1149), y dos tiol peroxidases (Ent638_2151 y Ent638_2976).

- 55 Se identificó, además, una proteína de resistencia a peróxido orgánico (*ohr*, Ent638_0518) ubicada próxima a su sensor/regulador de peróxido orgánico (*ohrR*, Ent638_0519).

- 60 *Enterobacter* sp. 638 parece capaz de desintoxicar el radical libre de óxido nítrico por la presencia de una flavohemoproteína óxido nítrico dioxigenasa (Ent638_3037) y un operón de reducción de nitrato anaeróbico (*norRVW*, Ent638_3181-3183). La expresión de los sistemas de respuesta al estrés oxidativo se controla por medio de redes reguladoras complejas. Un regulador clave es el sensor OxyR de peróxido de hidrógeno (Ent638 _4025), que activa la expresión de un regulón de genes inducibles por peróxido de hidrógeno tales como katG, gor (glutatión reductasa, Ent638 _3913), *ahpC*, *ahpF*, *oxyS* (un ARN regulador, Ent638 _mise_RNA_29), *dpsA* (una proteína de protección del ADN durante la inanición, Ent638 _1299), *fur* (un regulador doble transcripcional de unión al ADN de la biosíntesis y transporte de sideróforos, Ent638 _1198) y *grxA* (glutaredoxina, Ent638 _1364), todos presentes en *Enterobacter* sp.

638. Tres genes de la glutatión S transferasa (GST) (Ent638 _ 0139, Ent638 _ 0268 y Ent638 _ 1329), un transportador ABC de glutatión (GsiABCD, Ent638_1323-1326), dos glutatión peroxidasa (Ent638_1732 y Ent638_2699), una gamma-glutamato-cisteína ligasa (GshA, Ent638_3168), glutatión sintetasa (GshB, Ent638 _ 3351) y gamma-glutamiltanspeptidasa (GGT, Ent638 _ 3850) se encontraron en el genoma de *Enterobacter* sp. 638. Un locus AcrAB (Ent638 _ 0943-0944), que pertenece a la familia RND de transportadores se identificó, además, en el genoma de *Enterobacter* sp. 638.

Ejemplo 10: Colonización y establecimiento endofítico en la planta huésped

La colonización endofítica de un huésped vegetal puede dividirse en un proceso de cuatro etapas (van der Lelie y otros 2009).

Etapas 1: Movimiento hacia las raíces de álamo: motilidad/quimiotaxis

El *Enterobacter* sp. 638 está bien preparada para moverse activamente hacia las raíces vegetales, el sitio preferido de colonización endofítica. Su genoma contiene tres operones de biosíntesis flagelar (*flgNMABCDEFGHIJKL*, *flhEAB fimA yraJJ/pjD cheZYBR tap tar csuEDCAB int cheWA motBA flhCD fliYZA fliCDSTFGHJKLMNOPQR*, Ent638_2445-2541 *yfliEFHJKLMNOPQR*).

Sin embargo, el operón *flh* de *Enterobacter* sp. 638 contiene dos inserciones de genes de biosíntesis de pili. Una de estas regiones (*csu*) está flanqueada por una integrasa, que apunta a una captación posterior. *Enterobacter* sp. 638 tiene, además, un gran número de genes de biosíntesis de pilus/fimbrias (al menos 60 genes). En *Enterobacter* sp. 638, los genes de biosíntesis de pilus/fimbrias se agrupan en 10 regiones diferentes. Los determinantes implicados en la quimiotaxis (*che*) se descubrieron, además, dentro del agregado de genes de biosíntesis flagelar.

Etapas 2 y 3: Adhesión y colonización de la superficie de las raíces

En *Enterobacter* sp. 638, se identificaron varios genes que codifican proteínas implicadas en la adhesión putativa a la raíz. Muchos se ubican en islas genómicas o en plásmidos pENT638-1, que apuntan hacia un papel específico de este plásmido durante esta etapa de la colonización de las raíces de las plantas. En particular, pENT638-1 contiene una isla genómica putativa de 23kb (flanqueada por un gen de integrasa, y que tiene un % de GC de 56.2, que es significativamente superior que el resto del plásmido), así como un operón *srfABC* putativo. La función exacta del operón *srfABC* permanece confusa, pero se piensa que está involucrado en la colonización del huésped.

Muchos otros genes involucrados en la invasión a la planta están presentes en pENT638-1, e incluyen las proteínas putativas con un dominio autotransportador (secreción tipo V) y un dominio de virulencia/adhesión (hemaglutinina (Ent638 _ 4267), pertactina (Ent638 _ 4201 y Ent638 _ 4206) y adhesión (Ent638 _ 4317)) (Fig. 3).

Hemaglutinina: El cromosoma de *Enterobacter* sp. 638 codifica dos proteínas hemaglutininas putativas (Ent638 _ 0148, Ent638 _ 3119), y un agregado compuesto de cinco genes que codifican la hemaglutinina filamentosa (Ent638 _ 0052-0057).

Además, se encontraron muchos genes en el cromosoma de *Enterobacter* sp. 638 que codifican proteínas autotransportadoras con un dominio de pectina liasa/pertactina (Ent638 _ 1775, Ent638 _ 0318, Ent638 _ 0501), o un dominio de adhesión (Ent638 _ 1867, Ent638 _ 3408).

Los dos genes *yadA* de *Enterobacter* sp. 638 (Ent638 _ 1867 and Ent638 _ 4317) codifican una proteína con un dominio autotransportador y un dominio de invasina/adhesión. La proteína YadA puede promover la colonización/invasión de la planta, pero podría representar, además, un remanente de un estilo de vida entérico antiguo.

El gen de hemaglutinina en pENT638-1 (Ent638_ 4267) está rodeado por dos sistemas RelBIE toxina/antitoxina. Se hace la hipótesis de que el Ent638 _ 4267 de hemaglutinina puede jugar un papel importante en la adhesión a las raíces por estabilizarse de esta forma en el pENT638-1. Junto con el gen Ent638_ 4267 de hemaglutinina, se identificaron dos genes (Ent638_ 4265-4266) que codifican una proteína que contiene un dominio de repetición de tetratricopéptido (TPR-2), involucrados putativamente en la interacción proteína-proteína y el ensamblaje correcto del aparato de adhesión.

Pili tipo I y IV: Seis proteínas usher putativas se encontraron en el genoma de *Enterobacter* sp. 638 (Ent638 _ 0084, Ent638 _ 0403, Ent638 _ 0990, Ent638 _ 1071, Ent638 _ 2450, y Ent638 _ 2459). Este número es muy superior al número promedio de proteínas usher encontradas en otros géneros de bacterias asociadas con las plantas.

En el cromosoma de *Enterobacter* sp. 638, se identificaron 56 genes involucrados en la biosíntesis de pili/curli/fimbrias, que incluyen 6 agregados de los genes de biosíntesis de pili tipo I (Ent638_0074-0086, Ent638_0401-0409, Ent638_0987-0994, Ent638_1068-1071, Ent638_2448-2451, Ent638_2458-2462). Los últimos dos agregados están flanqueados y separados por genes involucrados en la quimiotaxis y motilidad (biosíntesis flagelar) (ver sección de motilidad), y están involucrados posiblemente en la formación de una película biológica sobre las superficies abióticas.

Esta región (Ent638 _ 2445- 2541) representa un buen ejemplo de genes de agregación involucrados en diferentes aspectos de la colonización de las raíces de las plantas (quimiotaxis, motilidad, y adhesión).

Pili tipo IV. En el genoma de *Enterobacter* sp. 638, se identificaron dos agregados de genes de la biosíntesis de pili tipo IV, (Ent638 _ 0650-0652, y Ent638 _3266-3268), así como un agregado de genes putativos de la biosíntesis de pilus sin caracterizar (Ent638 _3804 and Ent638 _3808) que están implicados posiblemente en la captación del ADN.

Fibras Curli. Estructuralmente y bioquímicamente, curli pertenece a una clase de crecimiento de las fibras conocidas como amiloides. En el genoma de *Enterobacter* sp. 638, se identificó un agregado para la biosíntesis de curli (Ent638 _1553-1559).

Biosíntesis de celulosa

Consistente con este comportamiento no patológico el genoma de *Enterobacter* sp. 638 no codifica proteínas involucradas en la degradación de celulosa. Sin embargo, se identificó un operón responsable de la biosíntesis de celulosa (Ent638 _3927-3940).

Virulencia

Estudios microscópicos mostraron que *Enterobacter* sp. 638 coloniza el xilema de las raíces entre el lumen de las lenticelas; no se observó colonización intracelular (Taghavi y otros 2009).

Aunque nunca se encontró que el *Enterobacter* sp. 638 actúa como un patógeno oportunista en los estudios de colonización vegetal, su genoma codifica varias proteínas involucradas putativamente en la virulencia. Debe notarse que la virulencia puede requerir, además, la interacción cercana entre la bacteria y su huésped, similar a la que puede requerirse para la colonización endofítica. Un gen (*yqfA*, Ent638 _33 I 7) que codifica para una hemolisina de membrana interna (familia III), una CDS parcial (Ent638 _025I) que contiene un dominio putativo de hemolisina, y tres genes *hcp* que codifican para los factores de virulencia (Ent638 _ 0829, Ent638 _ 2912 y Ent638 _3004 se identificaron.

Otros factores putativos de virulencia incluyen *pagC* (Ent638 _3136) y *msgA* (Ent638 _1656), los que se requieren para la virulencia y la supervivencia dentro de macrófagos, y los genes *virK* putativos; (Ent638 _1394 y Ent638 _ 2409), cuyo producto se requiere para la expresión y la ubicación correcta en la membrana de VirG (Ent638 _3560) sobre la superficie celular bacteriana.

Sin embargo, no se identificaron los genes que codifican un sistema de secreción de tipo III, que es un prerrequisito para un estilo de vida virulento activo típico de patógenos tales como *Erwinia* y *P. syringae*, en el genoma de *Enterobacter* sp. 638.

Finalmente, similar al plásmido pENT638-1, se encontró un operón *sifABC* (Ent638 _2108-Ent638 _ 2110) en los cromosomas de *Enterobacter* sp. 638. La función de estos genes en el comportamiento endofítico permanece confuso.

Etapas 4: Invasión de la raíz y establecimiento en planta por medio de la colonización activa

El *Enterobacter* sp. 638 puede entrar en las raíces de las plantas en sitios de tejidos dañados debido a que su secuencia genómica no codifica endo/exo-celulasas o hemicelulasas que permitirían la colonización endofítica por medio de la ruptura activa de las paredes de las células vegetales.

Degradación de Pectinpectato

Aunque *Enterobacter* sp. 638 no es capaz de crecer en pectina (poli(1,4-alfa-D-galacturonato) como una única fuente de carbono, su genoma contiene una isla genómica que codifica los genes involucrados en la degradación de pectato, la cadena principal desmetilada de pectina y un constituyente de la pared celular vegetal. La capacidad de *Enterobacter* sp. 638 para degradar pectato podría jugar un papel en la colonización de la región interespecial entre las células vegetales.

Una pectato liasa secretada, PelB, involucrada en el clivaje de pectato en los oligosacáridos con grupos 4-desoxi-alfa-D-galact-4-enuronosil en sus extremos no reductores se encontró próxima a una porina específica de oligogalacturonato, KdgM, implicada en la captación de oligogalacturónidos en el periplasma. Una pectinasa periplásmica, PelX, codificada por una región diferente del genoma, está involucrada en la degradación periplásmica del oligogalacturónido.

En otra región, se identificaron un transportador ABC de captación de carbohidratos, TogMNAB, implicado en la translocación del oligogalacturónido entre la membrana interna y varias proteínas adicionales, Ogl, Kdul y KduD, involucradas en la degradación de oligogalacturónido en 2-dehidro-3-desoxi-D-gluconato. KdgK y KdgA, involucradas en el metabolismo de D-glucuronato, degradan, además, 2-deshidro-3-desoxi-D-gluconato en piruvato y 3-fosfogliceraldehído, compuestos del metabolismo celular general. Esta región, que está flanqueada por una transposasa

de la familia IS481, podría haberse adquirido por medio de la transferencia génica horizontal. Las proteínas UxaA, UxaB, y UxaC, necesarias para la ruta alternativa para degradar galacturonato en 2-deshidro-3-desoxi-D-gluconato, se codifican, además, por el cromosoma de *Enterobacter* sp. 638. La degradación de pectato tiene que regularse bien para evitar un efecto patogénico.

El plásmido pENT638-1 porta dos genes vecinos (Ent638_420 I, Ent638_4206) que codifican proteínas autotransportadoras con un dominio pectina liasa. Estas proteínas pueden estar involucradas en la adhesión de *Enterobacter* sp. 638 a las raíces de álamo o como parte de un mecanismo de colonización que involucra la exportación de enzimas capaces de lisar las paredes celulares de las células de las raíces. Entre estos dos genes, se identificaron dos componentes reguladores transcripcionales, lo que sugiere una regulación fina, así como dos genes adicionales involucrados en la biosíntesis de polisacáridos capsulares (Ent638_4207) y que codifican para una glicosiltransferasa (Ent638_4208). Se ha hecho la hipótesis de que los lipopolisacáridos de la superficie celular (LPS) están involucrados en la especificidad del huésped, y la proximidad de estos genes sugiere un papel colaborativo en la invasión a la planta por *Enterobacter* sp. 638.

La celobiosa fosforilasa del plásmido pENT638-1

(00134) En el plásmido pENT638-1, el gen ndvB (8532 pb) ubicado próximo al origen de replicación de los plásmidos codifica una proteína involucrada en la producción de f3-(1→2)-glucano. La proteína NdvB unida a membrana cataliza tres actividades enzimáticas: la iniciación (glicosilación proteica), elongación, y ciclización in situ de f3-(1→2)-glucano, que se libera después en el periplasma.

Ejemplo 11: Interacciones sinérgicas con la planta huésped: promoción del crecimiento y salud vegetal

Crecimiento indirecto de las plantas que promueve los efectos de fijación y metabolismo de nitrógeno

Enterobacter sp. 638 es incapaz de fijar nitrógeno y carece de los genes nif requeridos. Sin embargo, contiene los genes requeridos para las rutas asimilatorias y no asimilatorias de reducción de nitrato. Los genes de transporte de nitrato y de reducción de nitrato/nitrito están presentes dentro de dos operones (*narJHKGXL* y *nasAB ntrCBA nasR*, Ent638_2312-Ent638_2326) separados por una integrasa y un gen putativo de adhesión/invasión. Otras regiones involucradas en el transporte y reducción de nitrito (*nirBDC*, Ent638_3793-3795), transporte y reducción de nitrato (*narUZYWV*, Ent638_2061-Ent638_2065), y un transportador de captación de amonio (*amtB*, Ent638_0919) y su regulador (Ent638_0918), así como la proteína sensor de nitrato/nitrito (*narQ*, Ent638_2964) se encontraron, además, en su cromosoma.

Sideróforos

El *Enterobacter* sp. 638 desarrolló una solución intermedia para hacer frente a la captación de hierro. Su genoma contiene dos sistemas ferrosos de captación de hierro (FeoAB, EfeUOB) y nueve transportadores ABC de hierro.

El *Enterobacter* sp. 638 es capaz de sintetizar la enterobactina de los sideróforos (EntD, EntF, EntC, EntE, EntB y EntA), secretarla (EntS), recuperar el complejo hierro-enterobactina mediante el uso de un sistema férrico de captación de sideróforos (ExbDB), y extraer el hierro mediante el uso de una enterobactina esterasa (Fes) después de la internalización del complejo hierro-enterobactina. Los genes involucrados en la biosíntesis de enterobactina se agrupan junto con los genes que codifican dos transportadores ABC involucrados en la captación de hierro (*sitABCD* y *fepCGDB*) en un gran agregado de 17 genes (Ent638_1111-1128). Además, *Enterobacter* sp. 638 tiene 12 receptores férricos de membrana interna y de sideróforos relacionados con hierro (dependientes de TonB), que es casi el doble del número encontrado en *E. coli* K12 (que solo tiene 7 receptores de sideróforos). Esta observación es consistente para una bacteria que necesita competir por hierro. La presencia de un sistema eficiente de captación de hierro contribuye a proteger la planta huésped contra la infección fúngica.

Compuestos Antimicrobianos

El *Enterobacter* sp. 638 mostró que produce constitutivamente feniletanol. Esta molécula, que se usa comúnmente en perfumería, da al *Enterobacter* sp. 638 un olor floral agradable, pero más interesantemente tiene propiedades antimicrobianas. Dos genes candidatos (Ent638_1306 y Ent638_1876) codifican una enzima involucrada putativamente en la conversión de fenilacetaldéhidio en feniletanol. Estos dos genes se ubican en regiones que no son sinténicas con otras cepas estrechamente relacionadas.

El 4-hidroxibenzoato es un precursor de la ubiquinona importante portadora de electrones, pero se conoce, además, que tiene actividad antimicrobiana. El *Enterobacter* sp. 638 tiene el gen *ubiC* (Ent638_0243) que codifica la proteína putativa capaz de realizar esta reacción.

El genoma del *Enterobacter* sp. 638 codifica una cloranfenicol acetil transferasa (*cat*, Ent638_1533) involucrada en la

resistencia a cloranfenicol y que puede ayudar a las bacterias a sobrevivir contra los compuestos antimicrobianos producidos por otros organismos endofíticos o rizosféricos.

Ejemplo 12: Promoción directa del crecimiento de las plantas por *Enterobacter* sp. 638

1-aminociclopropano-1-carboxilato desaminasa

La 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) desaminasa (acd), (EC: 3.5.99.7) está ausente del genoma de *Enterobacter* 638, lo que confirma los estudios previos de que la cepa es incapaz de metabolizar ACC (Taghavi y otros 2009). Sin embargo, se encontró la aminoácido desaminasa, pero todas carecen de los aminoácidos particulares E 296 y L 323 (reemplazados respectivamente por una T o S y una T) que acerca el átomo de nitrógeno de piridina de PLP en el sitio activo.

Producción de las hormonas acetoína, 2,3-butanodiol promotoras de crecimiento de las raíces

El genoma de *Enterobacter* sp. 638 porta el gen *poxB* (Ent638 _1387) que codifica una piruvato deshidrogenasa. Mientras la función principal de *PoxB* es convertir piruvato en acetaldehído, una fracción pequeña del piruvato se convierte a acetoína, como un subproducto de la reacción intermedia hidroxietilo-tiamina difosfato.

El genoma de *Enterobacter* sp. 638 codifica una acetolactato sintasa (*budB*, Ent638_2027) involucrada en la conversión de piruvato a acetolactato. La acetoína descarboxilasa (*budA*, Ent638_2026) cataliza la conversión de acetolactato en acetoína. La acetoína puede ser liberada por las bacterias o convertirse posteriormente en 2,3-butanodiol por la acetoína reductasa (*budC*, Ent638 _ 2028) ya sea por *Enterobacter* sp. 638 o por el álamo. Bajo condiciones aeróbicas, el acetolactato se convierte espontáneamente en diacetilo, que a su vez puede convertirse en acetoína por la proteína acetoína deshidrogenasa (Ent638_2737).

La biosíntesis de compuestos volátiles por *Enterobacter* sp. 638 y su inducción mediante la adición de extractos de hoja de álamo se investigó a través de espectrometría de masa. La producción de 2,3-butanodiol y acetoína se vio en muestras que contienen *Enterobacter* sp. 638 y extracto de hojas de álamo y comienza 12 horas después de la inducción (Fig. 8). Debe notarse que podría no confirmarse la síntesis de diacetilo, pero es similar a lo que ocurre en base a la presencia de las rutas metabólicas completas para los tres compuestos. Los picos adicionales se vieron en las muestras experimentales y los controles (6:42, 9:45, y 14:01) y la identificación de estos compuestos se realiza actualmente.

El genoma de *Enterobacter* sp. 638 carece de los genes (*acoABCX adh*) involucrados en la conversión catabólica de acetoína y 2,3-butanodiol a metabolitos centrales. Por lo tanto no existe efecto antagonista entre la producción y la degradación de estas hormonas de crecimiento vegetal por *Enterobacter* sp. 638.

Producción de la hormona IAA de crecimiento vegetal

La producción de ácido indol acético (IAA) por *Enterobacter* sp. 638 se demostró experimentalmente (Taghavi y otros 2009). La biosíntesis de IAA es posiblemente a través de la producción de indolpiruvato como una molécula intermedia por la ruta VII de degradación de triptófano (aminoácido aromático aminotransferasa, Ent638_1447). La indolpiruvato descarboxilasa *lpcC* (Ent638 _ 2923) y las indol-3-acetaldehído deshidrogenasas putativas (Ent638_0143) catalizan, además, la síntesis de IAA.

Tabla 1

	<i>Enterobacter</i> sp. 638	
rasgos	Cromosoma	Plásmido
tamaño (pb)	4, 518, 712	157, 749
contenido G+C	52.98	50.57
números ORF	4406	152
Función asignada (e incluye la putativa)	3457	108
Biosíntesis de aminoácido	174	2

ES 2 550 210 T3

Familia de aminoácidos aromáticos	28	0
Familia del aspartato	44	0
Familia del glutamato	47	1
Familia del piruvato	35	1
Familia de la serina	21	0
Familia de la histidina	11	0
Porcentaje de proteínas transportadoras	14%	2%
Familia ABC	293	2
Familia MFS	79	2
Familia PTS	41	0
Familia RND	14	0
Aminoácido, péptidos y aminos	118	0
Aniones	20	0
Carbohidratos, alcoholes orgánicos, y ácidos	106	1
Cationes y compuestos que portan hierro	109	1
Nucleósidos, purinas y pirimidinas	9	0
Porinas	18	0
Sustratos o fármacos desconocidos	2	0
Metabolismo de ADN	152	4
Transcripción	281	4
Síntesis de proteína	177	0
Destino de las proteínas	188	1
Funciones reguladoras	515	6
sistema de dos componentes	65	3
Envoltura celular	279	3
Procesos Celulares	457	6
Procesos biológicos	276	0
RHS	2	0
Funciones de los plásmidos	7	42
plásmido putativo integrado	1	0
pareja de toxina/antitoxina	3	7
funciones de Prge	302	0
Regiones Fago	8	

TABLA 2

Región	Desde	Ent638	Hasta	Ent638	Tamaño	ORF	int	tnp	Repet. en ext.	Pro-fago	ARNt	Matriz codón alternat.	Sintenia con K12	Sintenia con 342	Sintenia con 568
1	37506	0034	83855	0066	46349	35	-	+	+	-	ARNi-Sec	+	-	+/- (*)	+/- (*)
2	93676	0074	103614	0086	9938	13	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	124182	0108	132857	0114	8675	7	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	166537	0147	169882	0148	3345	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	205544	0179	212385	0183	6841	8	-	-	+	-	ARNi-Pro	-	-	-	-
6	332190	283	335579	286	3389	18	-	-	-	-	-	-	-	+	+
7	364148	0317	373015	0321	8867	5	-	-	+	-	ARNi-Phe	-	-	-	-
8	436726	0385	441897	0391	5171	7	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	454627	0401	464073	0410	9446	11	-	-	-	-	-	-	+/-	-	+
10	477929	0423	487952	0435	10023	12	-	-	-	-	-	-	-	+	+
11	523760	0463	573310	0508	49550	43	+	-	-	-	ARNi-Leu	+	-	-	-
12	642565	572	648283	576	5718	5	-	-	-	-	-	-	-	+	+/-
13	852653	0750	860429	0756	7776	7	-	-	-	-	ARNi-Asp	-	-	-	-
14a	875620	0770	912564	820	59647	50	+	-	+	Fago 1	ARNi-Thr	+	-	-	-
14b	912987	821	935267	0837		10	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15	1027052	0924	1042473	0937	15421	15	-	-	-	-	+	-	+/-	+	-
16a	1107864	0996	1154361	1055	46497	59	+	-	-	Fago 2	ARNi-Arg	+	-	-	-
16b	1154789	1056	1223024	1114	68235	58	-	-	-	-	-	-	-	+	+/-
17	1248443	1135	1258304	1143	9861	8	-	-	-	-	-	-	+/-	+	+
18	1386002	1260	1392280	1264	6278	5	-	-	-	-	-	-	-	+	+
19	1433737	1306	1438417	1309	4680	5	-	-	-	-	-	-	-	+	-
20	1441382	1312	1446428	1314	5046	3	-	-	-	-	-	-	-	+	+
21	1472316	1338	1492323	1361	20007	23	+	-	-	Fago 3	ARNi-(ybb)	+	-	-	-
22	1533390	1400	1544126	1406	10736	7	-	-	+	-	-	+	-	-	-
23	1639354	1484	1691939	1538	52585	29	-	-	+	-	ARNi-	+/-	-	+/- (*)	-

Región	Desde	Ent638	Hasta	Ent638	Tamaño	ORF	int	tnp	Repet. en ext.	Pro-fago	ARNt Ser	Matriz codón alternat.	Sintenia con K12	Sintenia con 342	Sintenia con 568
24	1804662	1650	1812852	1661	8190	12	+	-	-	Fago 4	-	+	-	-	- (*)
25	1886255	1737	1892165	1742	5910	6	-	-	-	-	-	-	-	+	+
26	1929035	1775	1937050	1781	8015	7	-	-	-	-	ARNt-Val	-	-	+/- (*)	+/- (*)
27	2000083	1841	2001815	1843	1732	4	+	-	-	-	-	+	-	-	-
28	2015509	1858	2072420	1909	56911	51	-	-	-	-	-	+	-	-	-
29	2115297	1949	2225046	2051	109749	103	-	-	+	-	-	-	+/-	+	+/-
30	2260061	2081	2272628	2096	12567	16	-	-	+	-	-	-	+/-	+	+/-
31	2285577	2108	2302826	2119	17249	12	-	-	-	-	-	-	-	-	+/- (*)
32a	2405497	2214	2451788	2269	65162	55	+	-	-	Fago 5	-	+	-	-	-
32b	2451959	2270	2470659	2294	15098	24	+	-	-	-	-	-	-	-	-
33	2504012	2320	2519110	2329	13121	10	+	-	+	-	-	-	-	+	+
34	2534142	2346	2547263	2356	8273	11	-	-	-	-	-	-	-	-	-
35	2652901	2458	2661174	2464	13867	7	+	-	+	-	-	-	-	-	+
36	2706828	2510	2720695	2521	36392	12	-	-	-	-	-	-	-	-	-
37a	2747355	2553	2783747	2578	39408	25	-	-	-	Fago 6	ARNt-Asn	-	+	+	-
37b	2784850	2579	2824258	2626	4527	49	+	-	-	-	-	+	-	-	-
38	2847062	2647	2851589	2650	33130	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-
39	2902726	2690	2935856	2719	30	30	-	-	-	-	-	+	-	+/- (*)	+/- (*)
40	3125655	2887	3162212	2916	36557	30	+	-	-	-	ARNt-Arg	+	-	+	-
41	3236067	2980	3241398	2983	5331	4	-	+	-	-	-	-	-	-	-
42	3253890	2994	3259362	2997	5472	4	-	-	-	-	-	-	-	+	-
43a	3375316	3101	3420151	3112	3386099	11	+	-	-	Fago 7	ARNt-tm	+/-	-	-	-
43b	3386662	3113	3429832	3146	43170	15	-	-	-	-	-	-	-	-	-
44	3460156	3176	3462550	3178	2394	3	-	-	-	-	-	-	-	+	+
45	3491626	3205	3495685	3208	4059	4	-	-	-	-	-	-	-	+	+/-
46	3581959	3279	3586075	3282	4116	4	-	-	-	-	+	-	-	+	+
47	3590526	3287	3609775	3305	19249	19	+	-	-	-	ARNt-	-	-	+	+/- (*)

Región	Desde	Ent638	Hasta	Ent638	Tamaño	ORF	int	tnp	Repet. en ext.	Pro- fago	ARNt	Matriz codón alternat.	Sintenia con K12	Sintenia con 342	Sintenia con 568
											Gly ARNt- Phe				
48	3688251	3384	3715198	3408	26947	25	-	-	-	-		-	-	-	-
49	3738015	3433	3750557	3442	12542	10	-	-	-	-		-	-	+/- (*)	-
50	3772076	3463	3777014	3469	4938	7	-	-	-	-		-	-	+	-
51a	3783633	3475	3814474	3514	30841	39	+	-	-	Fago 8	ARNt- Met	+	-	-	- (*)
51b	3814471	3516	3832226	3530	17755	24							-	-	-
52	4069288	3771	4076336	3779	7048	9	-	-	-	-	-	-	-	+	-
53	4192604	3882	4212209	3905	19605	24	-	-	-	-	-	-	-	-	+ (*)
54	4255568	3936	4269242	3944	13674	9	-	-	-	-	-	-	-	+	-
55	4294762	3964	4298896	3966	4134	3	-	-	-	-	-	-	-	+	+
56	4425327	4070	4437770	4081	12443	12	-	-	-	-	-	-	-	+	- (*)
						495									

Tabla 2. Cont.

Región	Contenido génico	Presencia en (*)	Comentarios/Observaciones adicionales
1	transportador para la captación de azúcares (familia de lactosa PTS), Beta-glicosidasa (conversión de celobiosa en glucosa o glucósido en glucosa), hemaglutinina filamentosas, transportador (familia MFS), hidrolasas dependiente de Zn predichas, ORF de función desconocida	transportador para la captación de azúcares (familia de lactosa PTS), Beta-glicosidasa (conversión de celobiosa en glucosa o glucósido en glucosa), hemaglutinina filamentosas	
2	biosíntesis de fimbrias		
3	hidrolasa putativa dependiente de metales asociada a membrana, Glicosiltransferasa		dentro de un operón waa
4	proteína de activación/secreción de hemolisina		
5	Rhs, unión a peptidoglicano (LysM), varias duplicaciones parciales	Rhs	
6	Fructocinasa, fructosa bifosfato aldolasa		corriente debajo de esta región está ausente del genoma K12 un precursor de la histidina cinasa hibridizada con un sensor de membrana integral
7	Quelación de níquel para la captación o el uso como cofactor, Autotransportador de membrana externa con pliegue de Pectina liasa/factor de virulencia (adhesina)		
8	Regulador, azoreductasa 2 de NADH dependiente de FMN, Proteína de función desconocida, Resistencia a antibióticos		
9	Biosíntesis de fimbrias para adhesión/virulencia, genes duplicados		
10	Citocromo, regulador, función desconocida, dihidroorotasa (peptidasa), Selenocisteína sintasa putativa L-seril-ARNt(Ser), selenio transferasa (dependiente de piridoxal fosfato)		

Región	Contenido génico	Presencia en (*)	Comentarios/Observaciones adicionales
11	Integrasa, proteína de fago, reparación de ADN (proteínas Dnd), sistema de estabilización de plásmidos, peptidato liasa, porina específica a oligogalacturonato (KdgM), proteasa, posible antioxidante, reguladores, autotransportador/hemaglutinina filamentosos/adhesina, regulador, regulador transcripcional involucrado en la virulencia, sistema de secreción, posible secreción de factor de virulencia		
12	Transportador hidroximato de hierro (familia MFS y ABC)		
13	Regulador, transportador ABC de aminoácidos		La sintenia se rompe pero los genes de esta región están presentes en los genomas K12, 342 y 568
14a	Integrasa, proteínas de fago		
14b	Traducción con Fago 1: alfa/beta hidrolasa, proteína fimbrial, transportador de aminoácidos, metiltransferasa, sensor/regulador de dos componentes, permeasa, transportador S-metilmationina, S-metilmationina: homocisteina metiltransferasa, proteína coregulada con hemolisina (HCP), transportador ABC férrico (sinténico conK12), integrasa		
15	Regulador, degradación de lactosa (sinténico con K12), traducción de señales (dominio EAL), transportador (familia PTS de beta glicósidos)		
16a	Integrasa de fago, proteína de fago		

Región	Contenido génico	Presencia en (*)	Comentarios/Observaciones adicionales
	Traducción con Fago 2: receptor putativo de sideróforos dependientes de TonB, transportador de fenilalanina, Nucleósido: simportador de H ⁺ , regulador transcripcional (LacI, XRE, TetR, LysR, GntR), permeasa (familia MFS), fimbrias, dihidropterina receptor de sideróforos dependiente de TonB reductasa, metalo hidrolasa/óxido reductasa, receptor de sideróforos dependiente de TonB de la Ferricisobactina, Enteroquelina esterasa, transportador de ATPasa de tipo P, transportador de RND, pseudouridina sintasa A de la subunidad ribosomal grande, proteína de dominio de unión al ADN, receptor dependiente de TonB, transportador ABC de aminoácidos, N-acetiltransferasa relacionada con GCN5, transportador ABC para iones quelados (SitABCD)		
16b	Captación de ribosa por el transportador ABC, ribosa cinasa, Metabolismo de metionina		La región flanqueante) Ent638_1145-1152) que codifica la alquil hidropéroxido reductasa (subunidad F52a), peróxido de cloruro, y ribonucleasa se encontraron en 342 pero no en 568 y parcialmente en el genoma K12.
17			
18	Degradación de histidina (<i>hutI/GCUH</i>)		
	Aldoceto óxido reductasa, Glicósido hidrolasa (familia 1), Transportador (familia lactosa/celobiosa PTS, subunidad IIC), Regulador transcripcional (GntR)		
19	Alfa-glicosidasas (familia 31 de las glicosil hidrolasas), Transportador de hexuronato, Regulador transcripcional de proteína de unión periplásmica/LacI		
20	Fucosa 4-O-acetilasa putativa y acetiltransferasas relacionadas, proteínas de fago, receptor putativo de sideróforos dependientes de TonB	Ciclopropano-graso-acil-fosfolípido sintasa, Amino oxidasa codificada en el genoma 342	
21			
22	Proteína asociada a Crispr		

Región	Contenido génico	Presencia en (*)	Comentarios/Observaciones adicionales
23	Ciclopropano-graso-acil-fosfolípido sintasa, Amino oxidasa, transportador (MFS), regulador transcripcional, Glicosiltransferasa, Metionina aminopeptidasa (MAP) (Peptidasa M), arilsulfatasa: metabolismo de sulfuro, ruta alternativa de degradación de pirimidinas, autotransportador/hemaglutinina filamentososa/adhesina (fragmentos), IS transposasa (familia IS110), cloranfenicol acetiltransferasa (CAT), ruta alternativa de degradación de pirimidinas		La ruta alternativa de degradación de pirimidinas está presente en el genoma de las tres bacterias 342, 568 y K12. Próximo a esta región (Ent_1551-1562), 342 y 568 carecen de una región que codifica para la producción de curli
24	Proteínas de fagos	Los genes (reguladores y diguanilato ciclasa) que flanquean la región 24 (Ent638_1658-1669) están ausentes en 568.	La región Ent368_1584-1597 involucrada en la biosíntesis flagelar está ausente en 342 (flgNMABCDEFHJL). Los genes Ent638_1688-1695 (fosfatidil transferasa, transportador ABC de tiosulfato de azufre y tiosulfato de azufre transferasa) están ausentes del genoma de 568.
25	Proteína de la familia de receptor de hemo/hemoglobina dependiente de TonB para la captación de hierro		
26	Autotransportador para la adhesión, sistema de transportadores ABC para la captación de aminoácidos/glutamina, RNasa putativa dependiente de metales, consiste de un dominio metalo beta lactamasa y un dominio KH de unión a ARN, anhidrasa carbónica	El genoma de 342 y 568 contiene el sistema de transportadores ABC para los genes de captación de aminoácidos/glutamina de esta región.	
27	Fago integrada (fragmento), fago incompleto insertado en un sensor/regulador de dos componentes (RstAB)		
28	Quimiotaxis/movilidad?, Proteína autotransportadora similar a adhesina/invasina (YadA), Biosíntesis de antibióticos, Sistema de nodulación de flujo de RND?, Sistema de resistencia a fármacos de flujo de RND, lectina de legumbre, posible pequeña de función desconocida, dominio beta para la unión, transportador MFS, lisofosfolipasa, coagulasa/fibrinolisis, Regulador de fagos, respuesta a SOS		

Región	Contenido génico	Presencia en (*)	Comentarios/Observaciones adicionales
	Transportador RND, Pectina acetiltransferasa, Muchos genes involucrados en el transporte de aminoácidos, Muchos reguladores transcripcionales, acetiltransferasa putativa de IAA, utilización de sacarosa/fructosa con PTS de la familia beta-glic, síntesis de acetoina, disulfuro isomerasa periplásmica/tiol disulfuro oxidasa (DsbG), despolimerización de alginatos, muchos transportadores y muchos reguladores		
29		Posiblemente no una isla sino la adquisición de muchos genes (comparado con K12) durante la evolución endofítica)	Sintenia discontinua: delimitación poco clara de la región
30	Transportador ABC de glutamato, transportador ABC de aminoácidos, Quimiolaxis: aerotaxis	Posiblemente no una isla sino la adquisición de muchos genes (comparado con K12) durante la evolución endofítica)	
31	Proteínas SrfA de virulencia, metionina sintasa, Poligalacturonasa, pectato liasa (secretada), condroitina AC/alginato liasa, junto con pectato liasa importante para la colonización (secretada), hidrolasa putativa (secretada), Regulador transcripcional, Quimiolaxis: aerotaxis	Presencia de los genes <i>srfABC</i> en el genoma de 568	
32a	Fago, integrasa de fago		
	Traducción con Fago 6: N-acetiltransferasa relacionada con GCN5, Regulador transcripcional (TetR), N-etilmaleimida reductasa, Oxidoreductasa, permeasa/transportador, deshidrogenasa, proleína putativa de tabicación intracelular involucrada en la división celular, hidrolasa, TonB que atraviesa la membrana, 2-deshidropantoato, exportador putativo de fármacos/metabolitos (familia DMT)		
32b	Integrasa, nitrato reductasa, (NasA), nitrato reductasa (NasB), transporte de nitrato (NtrCBA), región flanqueada por el operón <i>nar</i> involucrado en la reducción de nitrato, y transporte de nitrato/nitrito		Presencia de la región completa excepto el gen de integrasa
33	Oxidoreductasa, transportador ABC de aminoácidos, eflujo de purina ribonucleasa, trehalasa (degradación de trealosa), sideróforo dependiente de tonB		
34			

Región	Contenido génico	Presencia en (*)	Comentarios/Observaciones adicionales
			Los genomas 568 carecen de los genes que codifican la región Ent635_2477-2490 de una proteasa/amidasa intracelular, una proteína similar a ferritina, un transportador C4-dicarbóxilato anaeróbico, un transportador (familia MFS), una ribosa/galactosa isomerasa putativa, una fosfohidrolasa putativa dependiente de metales, otra proteína ferritina de almacenamiento de hierro, un transportador de ferritina y varias proteínas conservadas de función desconocida. Algunos de estos genes están ausentes, además, en K12.
35	Integrasa, fimbria/pili (ubicado próximo a los genes de la quimiotaxis y genes de las fimbrias)	342 carece de los genes que codifican la región flanqueante involucrados en la biosíntesis fimbrial	
36	Acil-CoA reductasa (LuxC) y acil proteína sintetasa (LuxE) que son sustratos para la producción de luz por luciferasa, Transcetolasa, biosíntesis de ácidos grasos	Próxima a una región grande de genes fli codificantes de flagelos que está ausente en 342	
37a	Traducción con Fago 7: Proteína de membrana externa ácido N,N-acetilmurámico 6-fosfato eterasa, sensor/regulador de dos componentes, Lipoproteína de la biosíntesis de tiamina, NADH-flavina oxidoreductasa putativa, Transportador de tartrato, fumarato hidratasa anaeróbica clase I, reguladores (de la biosíntesis de cisteína y la asimilación de nitrógeno), ATPasa de tipo P1, Proteína G universal de estrés, transportador (RND), aciltransferasas putativas, palmitoil transferasa para lípido A, transportador de shikimato, AMP nucleosidasa, Aminopeptidasa P, 4 locus de ARNt-Asn, inhibidor D-alanil-D-alanina carboxipeptidasa de ADN girasa		
37b	Fago integrasa, proteínas de fago	Traducción con el fago?	
38	Biosíntesis de LPS		La mayor parte de la región flanqueante desde Ent638_2645 hasta Ent638_2672 involucrada en la biosíntesis de LPS está ausente de los genomas de 342 y 568 pero presente en K12
39	Gluatión peroxidasa, fosforilación de lípidos, transportador ABC de aminoácidos, catabolismo de diaminobutirato, tirosina cinasa, fosfatasa	Presencia del transportador ABC de aminoácidos, catabolismo de diaminobutirato en los genomas de 342 y 568	

Región	Contenido génico	Presencia en (*)	Comentarios/Observaciones adicionales
	Plásmido putativo integrado: integrasa de fago, función del plásmido, fago integrasa, reorganización de la superficie que resulta en aumento de la adherencia y aumento de la frecuencia de conjugación	Plásmido putativo integrado	
40			
41	Transposasa (IS481), Transportador (familia PTS de lactosa), Asparaginasa, leucil amidopeptidasa		
42	Regulador transcripcional, transportador MFS, beta xilosidasa, transportador de xilósidos		
43a	Fago integrasa, endonucleasa, proteína de fagos (fago incompleto)		
43b	Traducción con Fago 8: cinasa, factor sigma/anti sigma, proteína putativa hemaglutinina/hemolisina, Transportador de hemaglutinina (proteína de membrana externa, ABC permeasa, MFP), 2-aminoadipato transaminasa putativa, catalasa que contiene manganeso no hemo dependiente de rpoS (KatN), Citocromo bd ubiquinol oxidasa, subunidad I & II, proteína A de competencia inducible por el daño, proteína de membrana de virulencia (PagC), Regulador transcripcional (LysR), deshidrogenasa/reductasa de cadena corta, metiltransferasa de tipo 11, desaminasa/amidohidrolasa putativa con dominio hidrolasa dependiente de metales, carbamato cinasa putativa, Xantina/uracilo/vitamina C permeasa, regulador putativo transcripcional de unión al ADN	El gen que codifica la catalasa que contiene manganeso no hemo dependiente de rpoS (KatN), Citocromo bd ubiquinol oxidasa, subunidad I & II, proteína A de competencia inducible por el daño están presentes en el genoma de 342.	
44	Transportador ABC		
45	Transportador ABC involucrado en el transporte de Fe3+ (EitABCD)		
46	GCN4-N-acetiltransferasa, regulador transcripcional, 6-P-beta-glucidasa, Transportador (familia PTS de lactosa/celobiosa), regulador similar a lacI		

Región	Contenido génico	Presencia en (*)	Comentarios/Observaciones adicionales
	Proteína de degradación de pectina, familia IS481 de transposasa, transportador ABC (posiblemente para azúcar con una especialización en el transporte de pectina) (TogMNAB), Degradación de pectina, Precursor de porina específico a oligogalacturonato (producto de la degradación de pectina), Regulador	Excepto los genes Ent638_3288 : el elemento IS (familia IS481), y Ent638_3293 que codifica la galacturonido liasa. El genoma de 568 no codifica las proteínas involucradas en la degradación de pectina	
47	Autotransportador con dominio adhesina, antioxidante, Transportador ABC de molibdeno, Proteína transportadora ABC de hierro, componente de unión periplásmica, canal de iones mecanosensible, Regulador de la quimiotaxis, Autotransportador con un dominio adhesina rico en serina		
48	Transportador de azúcares (MFS), Proteína de unión a compuestos de hierro de la familia del transportador ABC, componente periplásmico (transportador de hierro de enterobactina), receptor de sideróforos dependiente de TonB	El genoma 342 carece de Ent638_3433-3436 (glucuronil hidrolasa insaturada, simportador de oligosacáridos/H ⁺ , una proteína conservada de función desconocida y un regulador transcripcional (familia AraC)	
49	Ureasa (<i>ureDABCEFG</i>)		
50	Fago integrasa, proteínas de fago (conservadas en <i>K. pneumoniae</i> , <i>E. coli</i> UT189)	Algunos de los genes de fago son sintéticos con 568.	
51a	Traducción con Fago 9: Fosfatidilglicerol-membrana-oligosacárido		
	glicerofosfotransferasa, Reguladores transcripcionales (LysR, TetR, XRE), Metalohidrolasa, ARNm endorribonucleasa putativa, proteína de shock de calor (DnaJ), sideróforo, traductor de señales fusionado para aerotaxis funcional, putrescina:ácido 2-oxoglutarico aminotransferasa		
51b	Malonato (genes <i>mdc</i>), Transportador de malonato (familia del portador de flujo de auxina) (<i>MdcF</i>)		Ent638_3658-3662: transportador de ácido salicílico, N-acetilmanosamida cinasa y N-acetilneuraminato liasa y el regulador (<i>nanKTAR</i>) están ausentes en el genoma de 342 y 568
52			

Región	Contenido génico	Presencia en (*)	Comentarios/Observaciones adicionales
		Excepto los genes Ent638_3900-3905 que codifican una 4' fosfopanteteinil transferasa (acpT), un precursor de SDR deshidrogenasa/reductasa de cadena corta, un precursor de proteína NLP/P60 (similar a las hidrolasas putativas asociadas a pared celular (proteínas asociadas a invasión), una superfamilia HAD hidrolasa, subfamilia IB (similar a PSPasa), una proteína de resistencia a Telurio (terC), y una proteína 2 de transporte de iones)	
53	Biosíntesis de ácidos grasos		
54	Biosíntesis de celulosa (<i>bcsZDCBA</i>)		
55	Transportador (familia PTS de beta glicósidos)		
56	Transportador ABC de ribosa, operón rafinosa (transporte/utilización)	En adición, 568 carece de la región flanqueante Ent638_4064-4070 que codifica la rha TRSBADBA (simportador L-ramnosa:proton, activador transcripcional de unión al ADN, de unión a L-ramnosa, activador transcripcional de unión al ADN, de unión a L-ramnosa, ramnulocinasa, L-ramnosa isomerasa, ramnulosa-1-fosfato aldolasa, transportador ABC de D-ribosa, precursor de proteína de unión a ramnosa periplásmica, proteína rbsA 1 de unión al ATP de importe de ribosa)	

Las coordenadas dadas son lo de los genes, no los de la repetición de organismos fago usados para la comparación: K. pneumoniae MGH78578, E. coli K12, O157-H7, UTI89, C. koseri BAA-895 Comparado con 568 y 342, K12 y 638 tienen los operones: porinas y lipoproteínas 0231-0234;

TABLA S1 (INICIADORES)

Locus	Gen	Secuencia.	Tm
Ent638 2025	budRf	TATTCCCGCAGGAGATTGCT	58
Ent638 2025	budRr	AAGCTGTGACGACTGCAACATATT	59
Ent638 2026	budAf	GGCGAAATGATTGCCTTCAG	59
Ent638 2026	budAr	CCAGGTCATTACTGCGAAAGGT	59
Ent638 2027	budBf	ACAGCCCCGTTGAATACGAA	59
Ent638 2027	budBr	GGGCACATAGTTGCGTTCTTC	58
Ent638 2028	budCf	TTTGCGGCAGTGGAGAAAG	59
Ent638 2028	budCr	TGGCGTGATCGACTCAATTG	59
Ent638 4249	repAf	TAGCAAGAAAACAGGCGACAAGT	59
Ent638 4249	repAr	GCAGTCGCTCATCAGCTTGA	59
Ent638 R0104	16Sf	AGTGATTGACGTTACTCGCAGAAG	59
Ent638 R0104	16Sr	TTTACGCCCAAGTAATTCCGATT	59

TABLA S4 Microarreglos

SEQ_ID_s	Cambio en veces (Rico/Pobre)	valor p (FDR)	Estadística T	Función	COGclas SID	Descripción de Clase
Ent638_0190	2.127	0.0263	10.447	factor EF-Tu de elongación de la cadena proteica (duplicado de tufA)	j	Traducción, estructura ribosomal y biogénesis
Ent638_0194	2.453	0.0257	11.518	proteína L1 de la subunidad ribosomal 50S	j	Traducción, estructura ribosomal y biogénesis
Ent638_0195	3.1	0.0837	3.807	proteína L10 de la subunidad ribosomal 50S	j	Traducción, estructura ribosomal y biogénesis
Ent638_0197	2.372	0.0269	10.192	ARN polimerasa, subunidad beta	K	Transcripción
Ent638_0200	2.687	0.0242	13.404	Sistema fosfotransferasa, subunidad IIB específica de lactosa/celobiosa	G	Transporte y metabolismo de carbohidratos
Ent638_0213	3.284	0.133	2.85	HU, regulador transcripcional de unión al ADN, subunidad alfa	T	Mecanismos de transducción de señales
Ent638_0238	2.351	0.0202	17.811	subunidad transportadora de maltosa; componente de unión periplásmica de la superfamilia de proteínas ABC	G	Transporte y metabolismo de carbohidratos
Ent638_0241	6.748	0.00954	58.758	porina de maltosa de membrana exterior (malto porina)	G	Transporte y metabolismo de carbohidratos
Ent638_0285	2.719	0.0369	7.441	Fructosa-bisfosfato aldolasa 1	G	Transporte y metabolismo de carbohidratos
Ent638_0286	2.061	0.0767	4.042	Sistema putativo de transporte de azúcares de tipo ABC, componente auxiliar	R	Sólo la predicción de la función general
Ent638_0287	4.625	0.0166	22.815	Proteína de unión a la ribosa periplásmica del sistema de transporte ABC	G	Transporte y metabolismo de carbohidratos
Ent638_0326	8.129	0.018	35.517	aspartato amonio liasa	C; E	Producción y conversión de energía; transporte y metabolismo de aminoácidos
Ent638_0449	3.34	0.066	4.515	Precursor portador anaeróbico putativo de C4-dicarboxilato	R	Sólo la predicción de la función general
Ent638_0450	3.464	0.0439	6.095	Ornitina carbamoiltransferasa 1 (OTCasa 1)	F	Transporte y metabolismo de nucleótidos
Ent638_0451	4.851	0.0779	4.01	Carbamato cinasa	E	Transporte y metabolismo de aminoácidos
Ent638_0452	4.792	0.0298	9.144	Arginina deiminasa (ADI) (Arginina dihidrolasa) (AD)	E	Transporte y metabolismo de aminoácidos
Ent638_0641	2.63	0.0294	9.327	proteína de la división celular similar a la tubulina de unión a GTP	D	Control del ciclo celular, división celular, división de cromosomas
Ent638_0660	3.804	0.0179	29.044	piruvato deshidrogenasa, componente descarboxilasa E1, unión a tiamina	C; G	Producción y conversión de energía; transporte y metabolismo de carbohidratos
Ent638_0662	4.208	0.000915	219.599	lipoamida deshidrogenasa, el componente E3 es parte de tres complejos de enzimas	C	Producción y conversión de energía
Ent638_0665	3.576	0.0247	13.073	aconitato hidratasa 2 y 2-metilisocitrato deshidratasa bifuncionales	C;E	Producción y conversión de energía; transporte y metabolismo de aminoácidos
Ent638_0685	2.019	0.0799	3.932	regulador transcripcional de unión al ADN de la transcripción del ARNr, proteína supresora de DnaK	T	Mecanismos de transducción de señales

ES 2 550 210 T3

Ent638_0716	2.254	0.0262	10.425	chaperona periplásmica	M	Biogénesis de la pared celular/membrana/envoltura
Ent638_0896	2.304	0.0289	9.511	subunidad IV de la citocromo o ubiquinol oxidasa	C	Producción y conversión de energía
Ent638_0897	3.49	0.0506	5.52	subunidad III de la citocromo o ubiquinol oxidasa	C	Producción y conversión de energía
Ent638_0898	2.487	0.103	3.372	subunidad I de la citocromo o ubiquinol oxidasa	C	Producción y conversión de energía
Ent638_0899	3.03	0.0151	27.174	subunidad II de la citocromo o ubiquinol oxidasa	C	Producción y conversión de energía
Ent638_0903	2.094	0.00815	50.908	peptidil-prolil cis/trans isomerasa (factor disparador)	O	Modificación postraduccional, recambio de proteínas, chaperonas
Ent638_0987	2.028	0.024	12.433	Proteína fimbrial de Tipo-1, precursor de la cadena A (pilina de Tipo-1A)	N; U	Motilidad celular; tráfico intracelular, secreción, y transporte vesicular
Ent638_1050	-2.041	0.0481	-5.699	proteína hipotética de función desconocida	S	Función desconocida
Ent638_1053	-2.279	0.0484	-5.665	Enzima lipolítica, precursor de la familia G-D-S-L	R	Sólo la predicción de la función general
Ent638_1182	3.201	0.0161	24.254	subunidad transportadora de glutamato y aspartato; componente de unión periplásmico de la superfamilia de proteínas ABC	E; T	Transporte y metabolismo de aminoácidos; mecanismos de transducción de señales
Ent638_1204	2.631	0.0184	20.459	simportador putrescina/proton: antiportador putrescina/ornitina	E	Transporte y metabolismo de aminoácidos
Ent638_1205	4.027	0.0258	10.764	isozima ornitina descarboxilasa, inducible	E	Transporte y metabolismo de aminoácidos
Ent638_1221	2.03	0.0244	12.635	citrato sintasa	C	Producción y conversión de energía
Ent638_1224	2.59	0.024	12.596	succinato deshidrogenasa, subunidad de flavoproteína	C	Producción y conversión de energía
Ent638_1226	5.448	0.0244	13.456	2-oxoglutarato descarboxilasa, que requiere tiamina	C	Producción y conversión de energía
Ent638_1227	4.206	0.0309	8.724	dihidrolipoiltranssuccinasa	C; I	Producción y conversión de energía; Transporte y metabolismo de lípidos
Ent638_1228	2.918	0.0417	6.508	succinil-CoA sintetasa, subunidad beta	C	Producción y conversión de energía
Ent638_1229	4.423	0.0171	23.421	succinil-CoA sintetasa, de unión a NAD(P), subunidad alfa	C	Producción y conversión de energía
Ent638_1231	2.735	0.0329	8.087	citocromo d terminal oxidasa, subunidad II	C	Producción y conversión de energía
Ent638_1263	3.27	0.116	3.114	Urocanato hidratasa (Imidazolonapropionato hidrolasa) (Urocanasa)	C	Producción y conversión de energía
Ent638_1298	2.106	0.0633	4.648	subunidad transportadora de glutamina; componente de unión periplásmica de la superfamilia de proteínas ABC	E; T	Transporte y metabolismo de aminoácidos; mecanismos de transducción de señales
Ent638_1338	-3.102	0.0533	-5.307	Fucosa 4-O-acetilasa putativa y acetiltransferasas relacionadas	G	Transporte y metabolismo de carbohidratos

ES 2 550 210 T3

Ent638_1341	- 2.111	0.0583	-4.928	proteína hipotética conservada exportada de fago de función desconocida	D; L; N; T	Control del ciclo celular, división celular, división de cromosomas; Replicación, recombinación y reparación; Motilidad celular; Mecanismos de transducción de señales
Ent638_1430	2.324	0.0436	6.138	Proteína S1 de la subunidad ribosomal 30S	j	Traducción, estructura ribosomal y biogénesis
Ent638_1469	2.039	0.0254	11.293	proteína A de membrana externa (3a;II*;G;d)	M	Biogénesis de la pared celular/membrana/envoltura
Ent638_1490	3.067	0.15	2.63	Oxidoreductasa putativa, deshidrogenasa/reductasa de cadena corta familia	R	Sólo la predicción general de la función
Ent638_1499	- 2.164	0.0429	-6.238	Glicosiltransferasa	G	Transporte y metabolismo de carbohidratos
Ent638_1514	3.223	0.0191	19.678	glucosa-1-fosfato/inositol fosfatasa	G	Transporte y metabolismo de carbohidratos
Ent638_1526	- 2.828	0.0203	-18.472	Proteína transportadora putativa (fragmento)	u	Tráfico intracelular, secreción y transporte vesicular
Ent638_1587	3.209	0.0163	22.337	componente flagelar o porción proximal celular del bastoncillo corporal basal	N	Motilidad celular
Ent638_1588	5.216	0.0263	10.4	componente flagelar o porción proximal celular de varilla de cuerpo basal	N	Motilidad celular
Ent638_1589	3.559	0.0167	24.377	proteína de ensamblaje del gancho flagelar	N	Motilidad celular
Ent638_1590	3.744	0.0255	11.515	proteína de gancho flagelar	N	Motilidad celular
Ent638_1591	2.479	0.0333	7.975	componente flagelar de porción proximal celular del bastoncillo corporal basal	N	Motilidad celular
Ent638_1596	2.019	0.149	2.64	proteína 1 de unión de gancho con filamento flagelar	N; T	Motilidad celular; Mecanismos de transducción de señales
Ent638_1597	2.902	0.0555	5.128	proteína de unión de gancho con filamento flagelar	N	Motilidad celular
Ent638_1656	- 2.303	0.0245	-12.219	Proteína msgA de virulencia	R	Sólo la predicción general de la función
Ent638_1657	- 2.183	0.0554	-5.161	Transductor sensorial de quimiotaxis aceptor de metilo	N;T	Motilidad celular; Mecanismos de transducción de señales
Ent638_1724	2.288	0.0974	3.474	treonil-ARNt sintetasa	j	Traducción, estructura ribosomal y biogénesis
Ent638_1725	2.256	0.111	3.214	Factor 3 de iniciación de la traducción bacteriana (BIF-3)	j	Traducción, estructura ribosomal y biogénesis
Ent638_1750	2.083	0.0467	5.875	Formato deshidrogenasa, inducible por nitrato, subunidad principal	C	Producción y conversión de energía
Ent638_1755	- 2.084	0.0612	-4.785	Proteína hipotética de función desconocida	S	Función desconocida
Ent638_1773	- 2.188	0.0251	-10.953	subunidad transportadora de DL-metionina; componente de unión periplásmica de la superfamilia de proteínas ABC	P	Transporte y metabolismo de iones inorgánicos
Ent638_1804	- 2.004	0.0317	-8.356	proteína conservada de función desconocida	S	Función desconocida

ES 2 550 210 T3

End638_1841	- 2.107	0.0415	-6.448	integrasa Rac putativa lambdoid de profago (fragmento)	L	Replicación, recombinación y reparación.
Ent638_1856	- 2.048	0.0317	-8.405	fragmento de regulador transcripcional de unión al ADN (parte 2)	T	Mecanismos de transducción de señales
Ent638_1903	- 2.118	0.0224	-15.399	Proteína hipotética de función desconocida	S	Función desconocida
Ent638_1915	- 2.007	0.0294	-9.325	Precursor proteico de choque ácido	R	Sólo la predicción general de la función
Ent638_1941	- 2.307	0.025	-13.516	Proteína exportada hipotética de función desconocida	S	Función desconocida
Ent638_2031	- 2.058	0.0382	-7.016	Disulfuro isomerasa/tiol-disulfuro oxidasa periplásmica	O	Modificación postraducciona, recambio de proteínas, chaperonas
Ent638_2051	- 2.094	0.0432	-6.201	Polifosfato cinasa putativa	F	Transporte y metabolismo de nucleótidos
Ent638_2057	2.542	0.0477	5.757	Proteína porina de la membrana externa	M	Biogénesis de la pared celular/membrana/ envoltura
Ent638_2166	- 2.293	0.0395	-6.835	proteína de choque de fago de la membrana interna periférica	R	Sólo la predicción general de la función
Ent638_2210	- 2.647	0.0248	-11.137	fragmento de proteína conservada de función desconocida (parte 2)	S	Función desconocida
Ent638_2218	- 2.072	0.0248	-11.07	Proteína de fago	-	-
Ent638_2221	-2.12	0.0237	-14.041	Lipoproteína putativa de fago	-	-
Ent638_2243	- 2.466	0.0268	-10.246	proteína conservada de función desconocida	S	Función desconocida
Ent638_2246	- 2.359	0.0353	-7.673	Proteína hipotética de función desconocida	S	Función desconocida
Ent638_2250	- 2.339	0.0879	-3.692	Proteína de dominio metilasa N-4/N-6 de ADN de fago	L	Replicación, recombinación y reparación
Ent638_2256	- 3.509	0.0169	-23.668	proteína I inducible por el daño al ADN de fago	-	-
Ent638_2269	- 2.086	0.0247	-13.482	Lambda integrasa de profago (Int(Lambda)) (Profago e14 integrasa)	L	Replicación, recombinación y reparación
Ent638_2281	- 2.145	0.024	-12.802	Alcohol deshidrogenasa, proteína de dominio de unión a zinc	C	Producción y conversión de energía
Ent638_2282	- 2.245	0.0189	-19.648	proteína conservada de membrana de función desconocida	S	Función desconocida
Ent638_2302	3.151	0.0753	4.113	subunidad transportadora de oligopéptidos; componente de unión periplásmica de la superfamilia de proteínas ABC	E	Transporte y metabolismo de aminoácidos
Ent638_2303	- 2.254	0.0545	-5.217	proteína conservada de membrana de función desconocida	S	Función desconocida
Ent638_2306	- 2.221	0.0312	-8.509	regulador H-NS doble transcripcional de unión al ácido nucleico general	R	Sólo la predicción general de la función
Ent638_2313	3.051	0.199	2.167	subunidad de la chaperona de ensamblaje de molibdeno con cofactor (subunidad delta) de la nitrato reductasa 1	O	Modificación postraducciona, recambio de proteínas, chaperonas

ES 2 550 210 T3

Ent638_2314	6.367	0.0415	6.486	nitrato reductasa 1, subunidad beta (Fe-S)	C	Producción y conversión de energía
Ent638_2315	7.849	0.0258	11.405	nitrato reductasa 1, subunidad alfa	C	Producción y conversión de energía
Ent638_2387	2.074	0.0294	9.374	componente de PTS de la enzima IIC específica de manosa	G	Transporte y metabolismo de carbohidratos
Ent638_2465	2.693	0.0548	5.199	proteína de la quimiotaxis de unión a purina	N; T	Motilidad celular; Mecanismos de transducción de señales
Ent638_2466	3.068	0.13	2.89	histidina cinasa sensorial quimiotáctica fusionada en el sistema regulador de dos componentes con CheB y CheY	T	Mecanismos de transducción de señales
Ent638_2497	-2.021	0.0643	-4.597	proteína cspB similar al shock frío (CSP-B)	K	Transcripción
Ent638_2502	-2.125	0.0174	-28.928	proteína conservada de función desconocida	S	Función desconocida
Ent638_2508	2.655	0.0579	4.969	regulador putativo de la actividad FliA	T	Mecanismos de transducción de señales
Ent638_2509	2.86	0.13	2.882	ARN polimerasa, factor sigma 28 (sigma F)	j	Traducción, estructura ribosomal y biogénesis
Ent638_2522	6.843	0.0198	18.732	Proteína estructural flagelar de filamentos (flagelina)	N; T	Motilidad celular; Mecanismos de transducción de señales
Ent638_2523	5.717	0.0572	5.012	Proteína flagelar de cubierta de filamentos	N	Motilidad celular
Ent638_2524	3.188	0.0406	6.71	la proteína flagelar potencia la polimerización	N; O; U	Motilidad celular; Modificación postraducciona, recambio de proteínas, chaperonas; Tráfico intracelular, secreción, y transporte vesicular
Ent638_2533	2.468	0.0388	6.904	proteína flagelar	N; O; U	Motilidad celular; Modificación postraducciona, recambio de proteínas, chaperonas; tráfico intracelular, secreción, y transporte vesicular
Ent638_2534	2.802	0.0365	7.502	Proteína de control de la longitud del gancho flagelar	C; N	Producción y conversión de energía; Motilidad celular
Ent638_2542	-3.17	0.0476	-5.778	Activador transcripcional de unión al ADN, corregulador con RcsB	K; T	Transcripción; Mecanismos de transducción de señales
Ent638_2543	-2.171	0.0152	-27.401	proteína conservada de función desconocida	S	Función desconocida
Ent638_2579	-2.28	0.0234	-14.287	Colicina putativa	N; T; U	Motilidad celular; Mecanismos de transducción de señales; Tráfico intracelular, secreción, y transporte vesicular
Ent638_2610	-2.258	0.0263	-10.572	proteína putativa S de lisis; profago Qin	-	-
Ent638_2626	-2.122	0.068	-4.409	Proteína de la familia de las integrasa de fago	L	Replicación, recombinación y reparación
Ent638_2651	-2.429	0.0329	-8.064	dTDP-4-deoxirarnosa-3,5-epimerasa	M	Biogénesis de la pared celular/membrana/ envoltura

ES 2 550 210 T3

Ent638_2750	4.192	0.0223	16.152	subunidad transportadora de metil-galactósido; componente de unión periplásmica de la superfamilia de proteínas ABC	G	Transporte y metabolismo de carbohidratos
Ent638_2795	2.662	0.031	8.549	proteína C de porina de membrana externa	M	Biogénesis de la pared celular; membrana; envoltura
Ent638_2828	2.486	0.0284	9.737	NADH:ubiquinona oxidoreductasa, cadena F	C	Producción y conversión de energía
Ent638_2837	2.01	0.0286	9.639	fosfatasa putativa	R	Sólo la predicción general de la función
Ent638_2904	-2.736	0.0284	-9.812	Regulador transcripcional de fago, AlpA	K	Transcripción
Ent638_2958	3.828	0.0373	7.411	oxidoreductasa putativa de la enzima málica fusionada; fosfotransacetilasa	C	Producción y conversión de energía
Ent638_3059	4.692	0.0372	7.409	factor anti sigma	T	Mecanismos de transducción de señales
Ent638_3076	2.493	0.0411	6.566	proteína de shock frío asociada con la subunidad ribosomal 30S	j	Traducción, estructura ribosomal y biogénesis
Ent638_3088	3.12	0.0387	6.942	ARNt (guanina-1-)-metiltransferasa	j	Traducción, estructura ribosomal y biogénesis
Ent638_3112	-2.019	0.0814	-3.876	proteína conservada de función desconocida	S	Función desconocida
Ent638_3127	-2.428	0.0452	-5.987	proteína conservada de función desconocida	S	Función desconocida
Ent638_3133	-2.01	0.08	-3.929	proteína conservada de función desconocida	S	Función desconocida
Ent638_3249	2.827	0.043	6.214	transportador putativo de serina	E	Transporte y metabolismo de aminoácidos
Ent638_3322	2.185	0.0171	24.827	glicina descarboxilasa, dependiente de PLP, subunidad (proteína P) del complejo de clivaje de glicina	E	Transporte y metabolismo de aminoácidos
Ent638_3323	2.857	0.101	3.402	lipoilproteína del complejo de clivaje de glicina	E	Transporte y metabolismo de aminoácidos
Ent638_3324	2.681	0.0931	3.563	aminometiltransferasa, dependiente de tetrahidrofolato, subunidad (proteína T) del complejo de clivaje de glicina	E	Transporte y metabolismo de aminoácidos
Ent638_3338	3.036	0.0172	25.473	fructosa-bisfosfato aldolasa, clase II	G	Transporte y metabolismo de carbohidratos
Ent638_3339	3.055	0.0251	11.974	fosfoglicerato cinasa	G	Transporte y metabolismo de carbohidratos
Ent638_3532	2.017	0.0435	6.165	aldolasa putativa	G	Transporte y metabolismo de carbohidratos
Ent638_3561	2.706	0.0174	32.635	piruvato formato-liasa 4/2-cetobutirato formato-liasa	C	Producción y conversión de energía
Ent638_3562	2.214	0.0429	6.316	propionato cinasa/acetato cinasa C, anaeróbico	C	Producción y conversión de energía
Ent638_3563	4.426	0.00332	113.406	transportador de L-treonina/L-serina	E	Transporte y metabolismo de aminoácidos
Ent638_3564	2.11	0.0248	11.174	treonina deshidratasa catabólica, dependiente de PLP	E	Transporte y metabolismo de aminoácidos

ES 2 550 210 T3

Ent638_3666	2.499	0.0331	8.017	proteína L13 de la subunidad ribosomal 50S	j	Traducción, estructura ribosomal y biogénesis
Ent638_3671	3.291	0.0186	29.163	malato deshidrogenasa, de unión a NAD(P)	C	Producción y conversión de energía
Ent638_3679	- 2.051	0.124	-2.996	proteína de membrana del sistema de eflujo	M	Biogénesis de la pared celular/membrana/envoltura
Ent638_3686	2.015	0.025	11.894	componente MreC transmembrana del complejo estructural MreBCD de la pared celular	M	Biogénesis de la pared celular/membrana/envoltura
Ent638_3701	- 2.131	0.0253	-11.29	proteína conservada de función desconocida	S	Función desconocida
Ent638_3722	- 2.133	0.048	-5.712	canal mecanosensible	M	Biogénesis de la pared celular/membrana/envoltura
Ent638_3723	- 2.564	0.0611	-4.795	proteína conservada de función desconocida	S	Función desconocida
Ent638_3726	3.616	0.0248	11.127	ARN polimerasa, subunidad alfa	K	Transcripción
Ent638_3729	2.758	0.0306	8.691	proteína S13 de la subunidad ribosomal 30S	j	Traducción, estructura ribosomal y biogénesis
Ent638_3730	4.562	0.0242	12.313	proteína L36 de la subunidad ribosomal SOS	j	Traducción, estructura ribosomal y biogénesis
Ent638_3731	2.315	0.066	4.512	subunidad de membrana de la preproteína translocasa	u	Tráfico intracelular, secreción, y transporte vesicular
Ent638_3732	2.484	0.0247	12.117	proteína L15 de la subunidad ribosomal 50S	j	Traducción, estructura ribosomal y biogénesis
Ent638_3733	2.832	0.0307	8.659	proteína L30 de la subunidad ribosomal 50S	j	Traducción, estructura ribosomal y biogénesis
Ent638_3735	2.087	0.0483	5.676	proteína L18 de la subunidad ribosomal 50S	j	Traducción, estructura ribosomal y biogénesis
Ent638_3736	2.371	0.0477	5.736	proteína L6 de la subunidad ribosomal 50S	j	Traducción, estructura ribosomal y biogénesis
Ent638_3737	2.068	0.129	2.923	proteína S8 de la subunidad ribosomal 30S	j	Traducción, estructura ribosomal y biogénesis
Ent638_3744	2.017	0.0632	4.657	proteína L16 de la subunidad ribosomal 50S	j	Traducción, estructura ribosomal y biogénesis
Ent638_3745	3.16	0.0219	15.304	proteína S3 de la subunidad ribosomal 30S	J	Traducción, estructura ribosomal y biogénesis
Ent638_3746	4.129	0.0198	17.793	proteína L22 de la subunidad ribosomal 50S	J	Traducción, estructura ribosomal y biogénesis
Ent638_3747	4.589	0.0316	8.444	proteína S19 de la subunidad ribosomal 30S	J	Traducción, estructura ribosomal y biogénesis
Ent638_3748	3.398	0.0248	13.648	proteína L2 de la subunidad ribosomal 50S	J	Traducción, estructura ribosomal y biogénesis
Ent638_3749	2.993	0.0225	15.415	proteína L23 de la subunidad ribosomal 50S	J	Traducción, estructura ribosomal y biogénesis
Ent638_3750	2.484	0.0316	8.39	proteína L4 de la subunidad ribosomal 50S	J	Traducción, estructura ribosomal y biogénesis
Ent638_3751	2	0.0386	6.918	proteína L3 de la subunidad ribosomal 50S	J	Traducción, estructura ribosomal y biogénesis
Ent638_3752	4.398	0.019	19.524	proteína S10 de la subunidad ribosomal 30S	J	Traducción, estructura ribosomal y biogénesis

ES 2 550 210 T3

Ent638_3756	2.017	0.00832	57.878	factor EF-Tu de elongación de la cadena de las proteínas (duplicado de tufA)	j	Traducción, estructura ribosomal y biogénesis
Ent638_3757	2.087	0.0324	8.231	factor EF-G de elongación de la cadena de las proteínas, de unión a GTP	j	Traducción, estructura ribosomal y biogénesis
Ent638_3816	5.186	0.0352	7.667	fosfoenolpiruvato carboxicinasa	C	Producción y conversión de energía
Ent638_3925	3.294	0.0696	4.326	transportador de ácido C4-dicarboxílico, orotato y citrato	C	Producción y conversión de energía
Ent638_4010	2.24	0.0202	17.884	regulador doble transcripcional de unión al ADN	K	Transcripción
Ent638_4063	-2.339	0.0436	-6.128	superóxido dismutasa, Mn	P	Transporte y metabolismo de iones inorgánicos
Ent638_4128	4.463	0.0247	11.192	sector F0 de la ATP sintasa unida a membrana, subunidad b	C	Producción y conversión de energía
Ent638_4129	3.599	0.0188	34.113	sector F1 de la ATP sintasa unida a membrana, subunidad delta	C	Producción y conversión de energía
Ent638_4130	3.583	0.0231	14.582	sector F1 de la ATP sintasa unida a membrana, subunidad alfa	C	Producción y conversión de energía
Ent638_4131	2.8	0.0306	8.832	sector F1 de la ATP sintasa unida a membrana, subunidad gamma	C	Producción y conversión de energía
Ent638_4132	4.856	0.0176	21.153	sector F1 de la ATP sintasa unida a membrana, subunidad beta	C	Producción y conversión de energía
Ent638_4133	3.713	0.0506	5.526	sector F1 de la ATP sintasa unida a membrana, subunidad epsilon	C	Producción y conversión de energía
Ent638_4202	-2.485	0.0305	-8.972	Regulador putativo de respuesta de dos componentes	T	Mecanismos de transducción de señales
Ent638_4204	-2.712	0.0382	-7.009	Regulador transcripcional de dos componentes, familia LuxR	T	Mecanismos de transducción de señales
Ent638_4205	-2.202	0.0516	-5.436	proteína conservada de función desconocida	S	Función desconocida
Ent638_4206	-2.27	0.047	-5.835	Precursor putativo del dominio barril del autotransportador de membrana externa	u	Tráfico intracelular, secreción, y transporte vesicular
Ent638_4214	-2.019	0.0762	-4.057	Proteína yfeJ similar a glutamina amidotransferasa	E	Transporte y metabolismo de aminoácidos
Ent638_4215	-2.55	0.0408	-6.676	Sistema de estabilización de plásmidos, sistema ParE de toxina de toxina-antitoxina (TA)	D	Control del ciclo celular, división celular, división de cromosomas
Ent638_4228	-2.516	0.0666	-4.487	fragmento de toxina del sistema toxina-antitoxina RelE-RelB; profago Qin (parte 2)	D	Control del ciclo celular, división celular, división de cromosomas
Ent638_4244	-2.09	0.0854	-3.762	proteína inducida por estrés, proteína de unión a ATP	R	Sólo la predicción general de la función
Ent638_4249	-2.253	0.0748	-4.131	Proteína repA de replicación	L	Replicación, recombinación y reparación
Ent638_4268	-3.098	0.0248	-11.941	antitoxina bifuncional del sistema toxina-antitoxina RelE-RelB y represor transcripcional; profago Qin	D	Control del ciclo celular, división celular, división de cromosomas
Ent638_4280	-2.424	0.0409	-6.625	Transglicosilasa lítica putativa, catalítica (factores de virulencia similares a lisozima)	-	-
Ent638_4281	-2.236	0.0533	-5.312	Transferencia conjugativa putativa: señal de unión (TraM)	D	Control del ciclo celular, división celular, división de cromosomas

ES 2 550 210 T3

Ent638_4282	-2	0.0323	-8.245	Proteína de función desconocida	S	Función desconocida
Ent638_4313	-2.362	0.0418	-6.422	Proteína de función desconocida	S	Función desconocida
Ent638_4319	-2.086	0.0736	-4.179	Transposasa truncada (Tn3)	-	-
ENT630192	-2.306	0.156	-2.566	Proteína exportada de función desconocida	S	Función desconocida
ENT630194	-2.286	0.0556	-5.129	Proteína exportada de función desconocida	S	Función desconocida
ENT631068	-2.732	0.0248	-11.061	Proteína de función desconocida	S	Función desconocida
ENT631584	-2.087	0.037	-7.431	Proteína putativa autotransportadora (fragmento)	u	Tráfico intracelular, secreción, y transporte vesicular
ENT631894	-2.007	0.0174	-21.346	Proteína de resistencia a beta-lactama	R	Sólo la predicción general de la función
ENT631979	-2.11	0.0229	-14.717	Elemento IS putativo (similar a IS600)	-	-
ENT632480	-2.222	0.0545	-5.219	proteína hipotética	S	Función desconocida
ENT632671	-2.25	0.0249	-11.071	Proteína hipotética de función desconocida	S	Función desconocida
ENT632695	-2.206	0.0523	-5.384	Proteína de función desconocida	S	Función desconocida
ENT633422	-2.194	0.0264	-10.451	Proteína de función desconocida	S	Función desconocida
ENT633863	2.227	0.068	4.407	proteína hipotética	S	Función desconocida
ENT63p0011	-2.333	0.0795	-3.948	Proteína de función desconocida	S	Función desconocida
ENT63p0054	-2.572	0.0796	-3.945	Proteína de función desconocida	S	Función desconocida
ENT63p0058	-2.469	0.0637	-4.628	Proteína de función desconocida	S	Función desconocida
ENT63p0066	-2.112	0.0251	-11.251	Proteína de función desconocida	S	Función desconocida
ENT63p0067	-2.132	0.0241	-12.455	Familia IS3/IS407 putativa de transposasa parcial	-	-
ENT63p0070	-2.3	0.0375	-7.358	Proteína de función desconocida	S	Función desconocida

TABLA S-3 Comparación de transportadores de Ent638

	Sprot56		Ent63		<i>E. coli</i>		<i>E. carotovora</i>		<i>K. pneumoniae</i>	
	8		8		K1	O157-H7	SCRI1043	MGH785	78	342
1.A. Canales de Tipo α										
La superfamilia de canales iónicos dependientes de voltaje (VIC)	1	1	2	1	1	1	0	1	1	1
La familia principal de proteínas intrínsecas (MIP)	2	2	2	2	2	2	1	5	5	4
La familia del canal transportador de amonio (Amt)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
La familia de canales iónicos mecanosensibles de gran conductancia (MscL)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
La familia de canales iónicos mecanosensibles de baja conductancia (MscS)	6	7	7	6	6	6	4	7	7	7
La familia de transportadores de urea (UT)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
La familia de transportadores de iones metálicos de CorA	4	2	2	2	2	3	2	3	3	3
Total	15	15	15	13	13	14	9	18	17	17
2.A. Portadores (uniportadores, simportadores, antiportadores)										
La superfamilia principal de facilitadores (MFS)	114	81	81	70	76	64	119	128		
La familia de simportadores de Glicósido-Pentósido-Hexurónido (GPH): cationes	1	5	6	6	6	3	8	9		
La familia de aminoácido-poliamina-cación orgánico (APC)	21	12	22	21	21	11	20	22		
La familia de facilitadores de la difusión de cationes (CDF)	3	2	2	2	2	2	5	5		
La familia de Zinc (Zn2+)-Hierro (Fe2+) permeasa (ZIP)	1	1	0	0	0	0	1	1		
La superfamilia de resistencia-nodulación-división celular (RND)	14	14	9	16	16	19	25	28		
La superfamilia de transportadores de fármacos/metabolitos (DMT)	26	19	16	7	4	3	4	6		
La familia de simportadores gluconato:H+ (GntP)	1	1	1	1	1	1	1	1		
La familia de la biogénesis de la citocromo oxidasa (Oxa1)	0	1	1	1	1	1	1	1		
La familia de transportadores de 2-ceto-3-Desoxigluconato (KDGT)	0	0	0	0	0	2	0	0		
La familia de simportadores citrato-Mg2+:H+ (CitM) citrato-Ca2+:H+ (CitH) (CitMHS)	0	0	0	0	0	0	0	0		
La familia de antiportadores ATP:ADP (AAA)	2	2	2	2	2	2	2	2		
La familia de captación de C4-dicarbóxilato (Dcu)	1	1	1	2	1	1	1	1		
La familia de lactato permeasa (LctP)	2	0	0	3	3	1	3	2		
La familia de transportadores de betaina/carnitina/colina (BCCT)	1	1	1	1	1	0	1	1		
La familia de transportadores de resistencia a tetraildicarbóxilato (TDT)	4	2	2	4	4	1	6	5		
La familia de transportadores de oligopéptidos dependientes de protones (POT)										

[illegible]

[illegible]

LISTA DE SECUENCIAS

	<110> Brookhaven Science Associates, LLC	
5	<120> Enterobacter sp. 638 y Métodos de uso del mismo	
	<130> 369-263 PCT (BSA 10-05)	
	<140>	
10	<141>	
	<150> US 61/313,415	
	<151> 2019-03-12	
15	<160> 2	
	<170> PatentIn versión 3.1	
	<210> 1	
20	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Enterobacter sp. 638	
	<220>	
25	<221> caract._misceláneas	
	<222> (10)..(12)	
	<223> "X" puede ser T,A,G o C o ausente	
	<400> 1	
30	CCCTCTCCCX X(X)GGGAGAGG G	21
	<210> 2	
	<211> 9	
	<212> ADN	
35	<213> Enterobacter sp. 638	
	<400> 2	
	TTATCCACA	9
40		

Reivindicaciones

- 5 1. Un método para aumentar la masa o el número de frutas y/o semillas, o disminuir el tiempo hasta la floración o el tiempo hasta la maduración de los frutos, de una planta, el método comprende aplicar una composición a la planta en una cantidad eficaz para aumentar la masa o el número de frutos y/o semillas, o disminuir el tiempo hasta la floración o el tiempo hasta la maduración de los frutos, en donde la composición comprende un cultivo aislado de *Enterobacter* sp. 638, y en donde la planta es una angiosperma.
- 10 2. El método de la reivindicación 1, el método comprende aplicar la composición a una raíz, un brote, una hoja, y/o una semilla de la planta.
3. El método de la reivindicación 1, en donde la angiosperma es tomate.
- 15 4. El método de la reivindicación 1, en donde la angiosperma es girasol.
5. El método de la reivindicación 1, en donde la angiosperma es tabaco.

20

25

30

35

40

45

50

Fig. 1

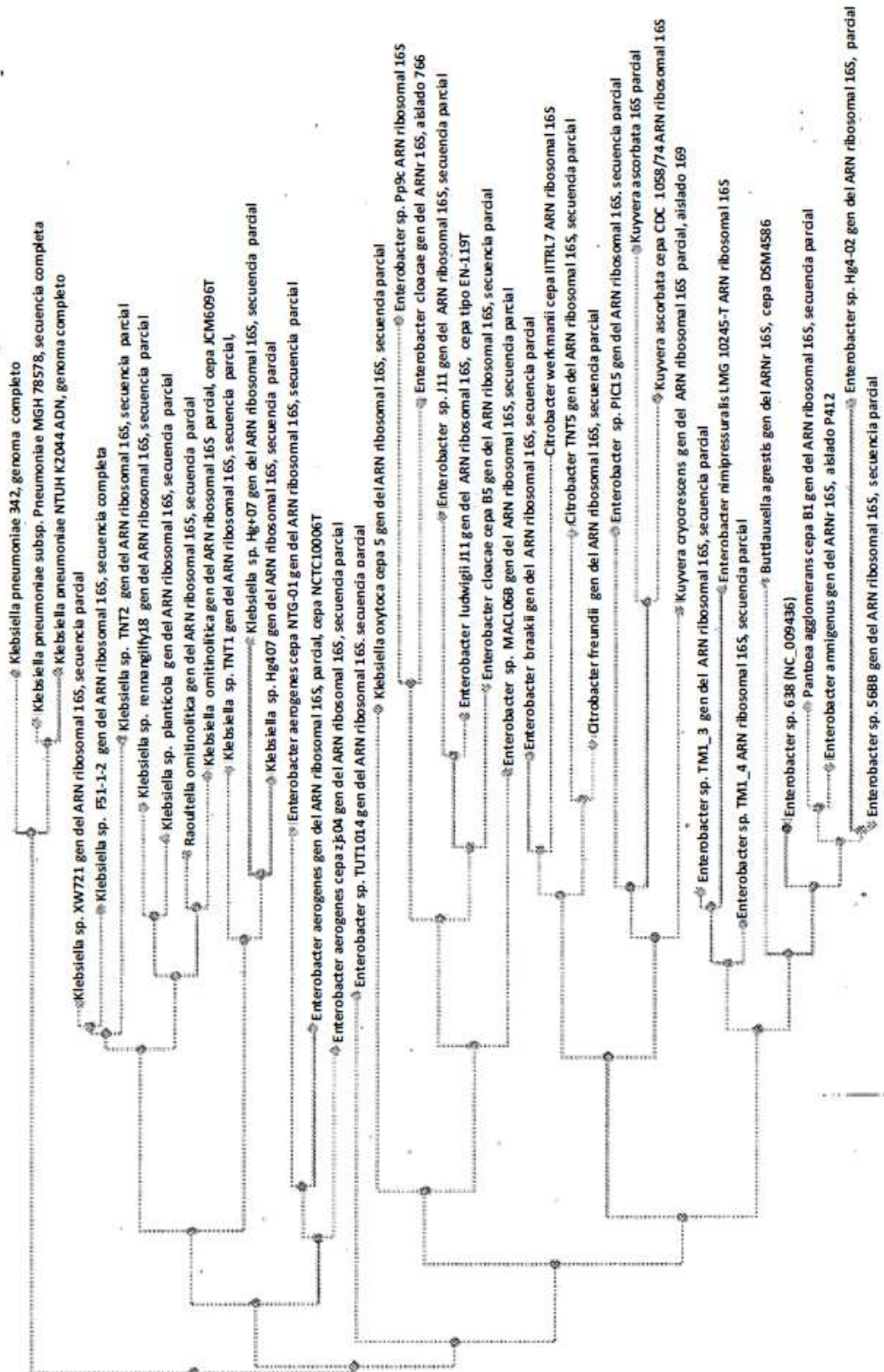


Fig. 2

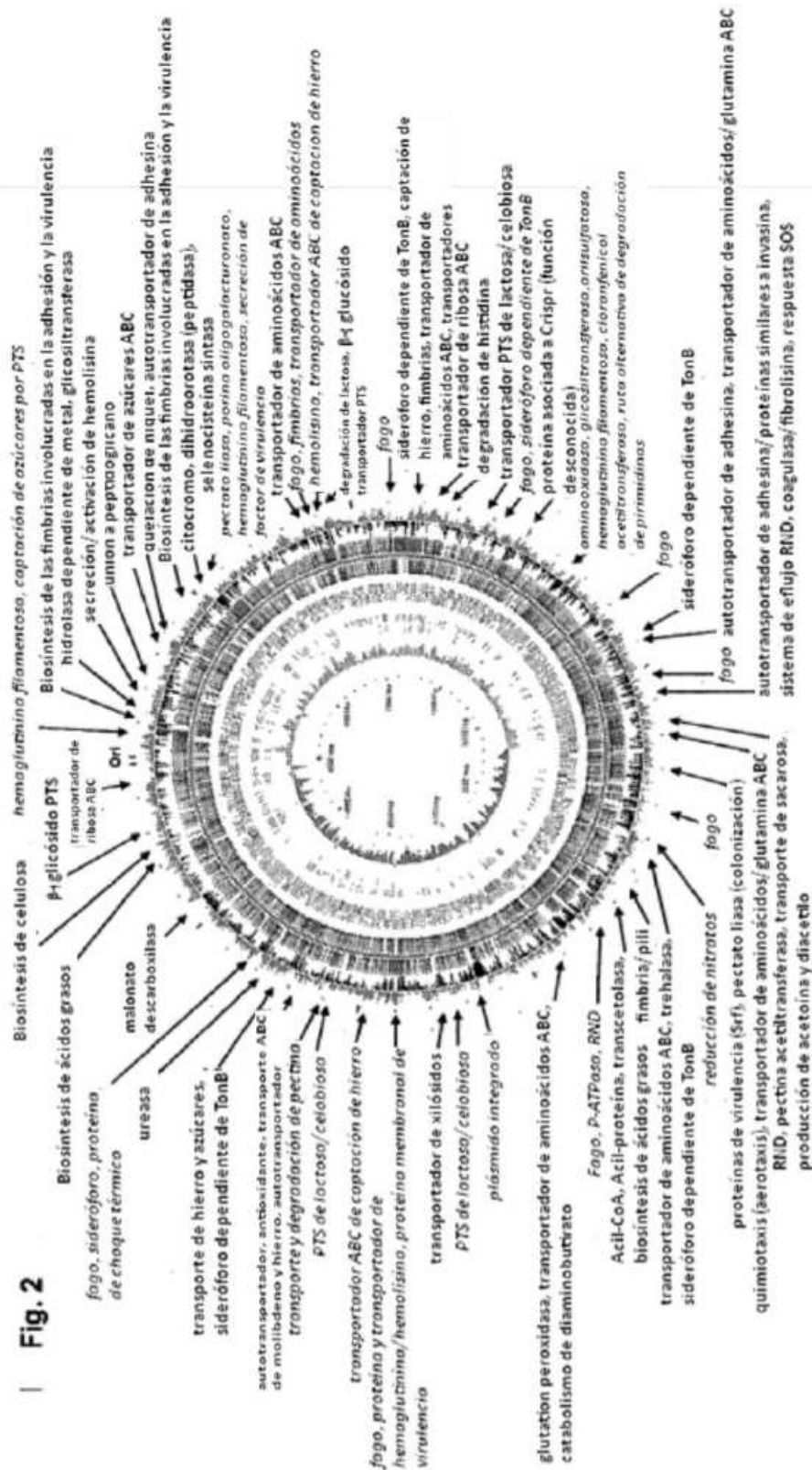


Fig. 3

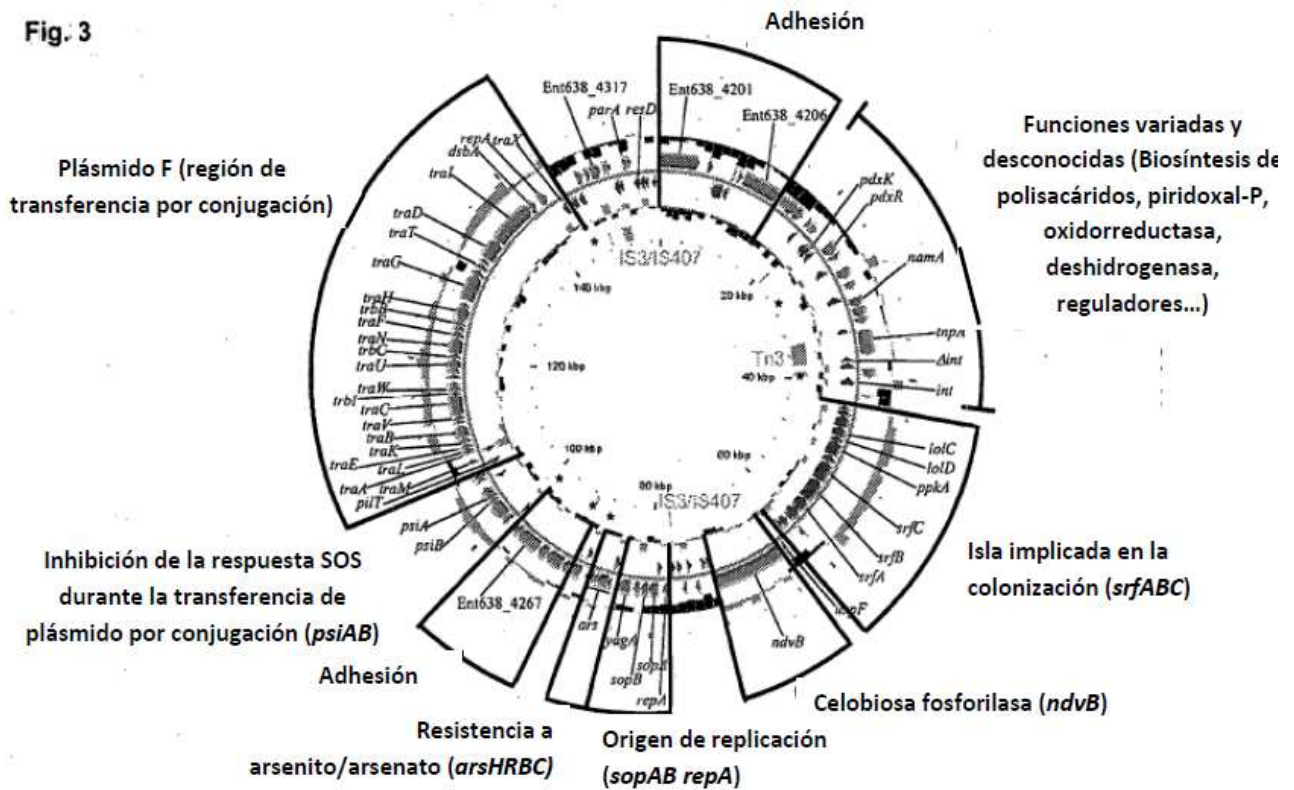


Fig. 4

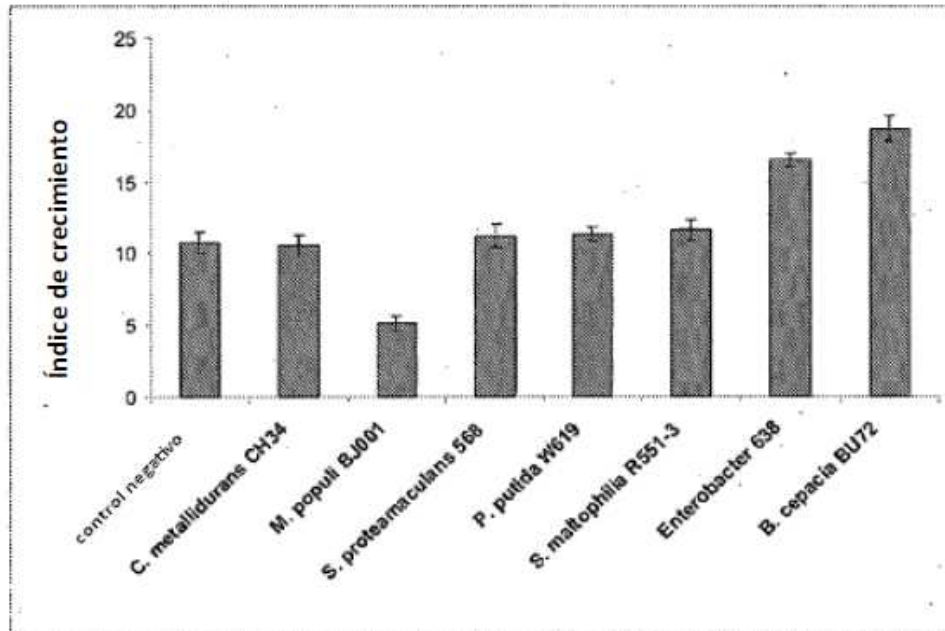


Fig. 5

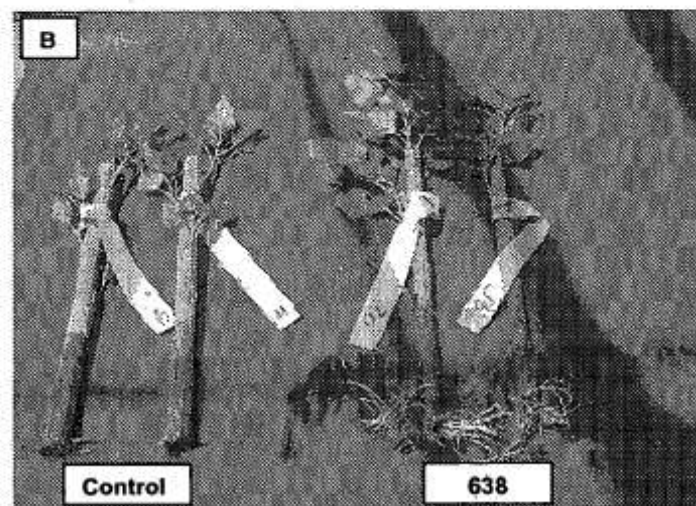
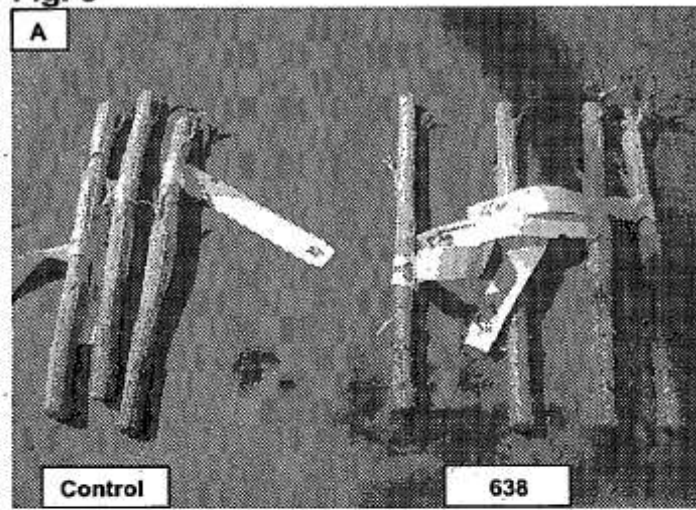


Fig. 6

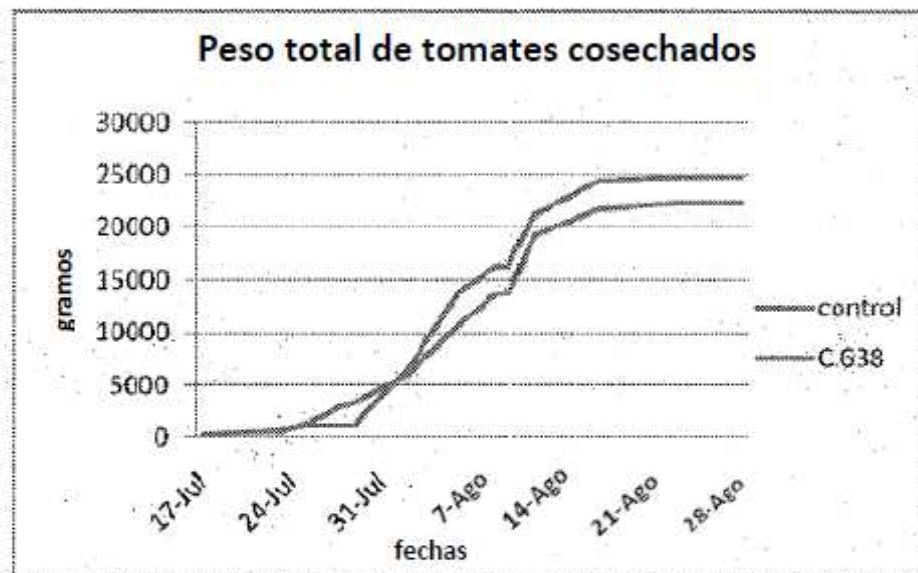


Fig. 7

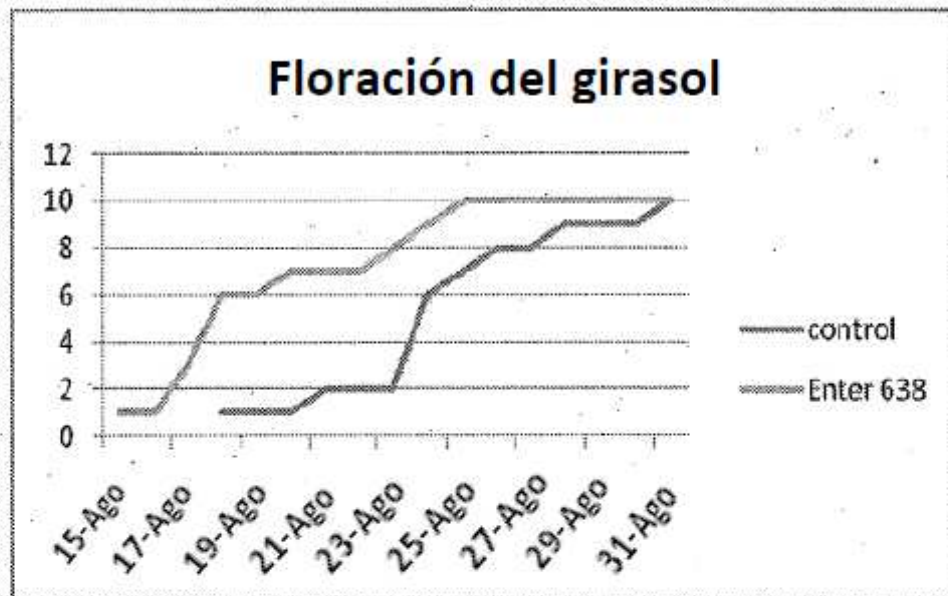


Fig. 8

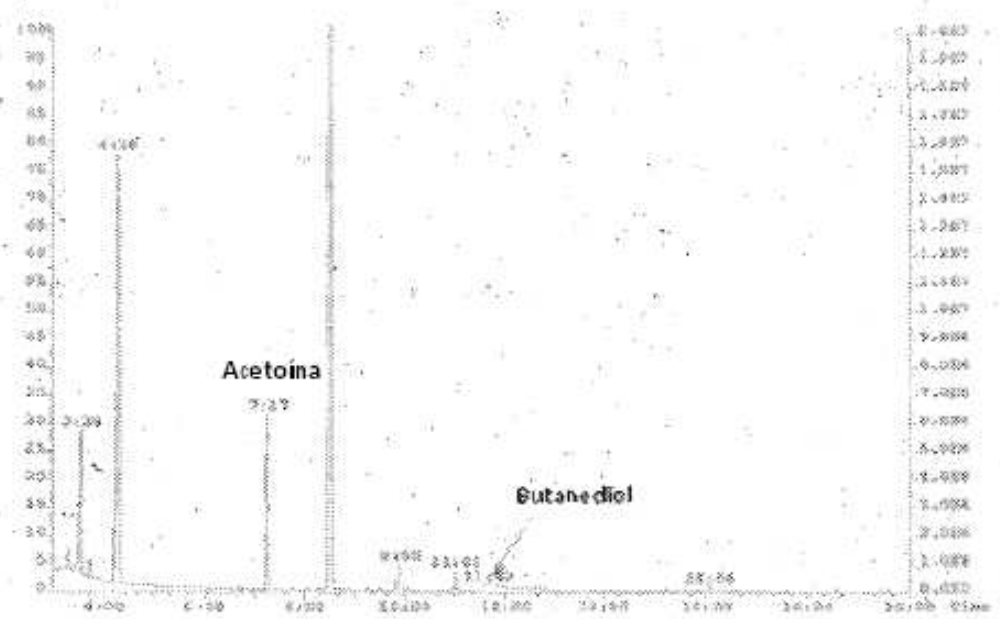
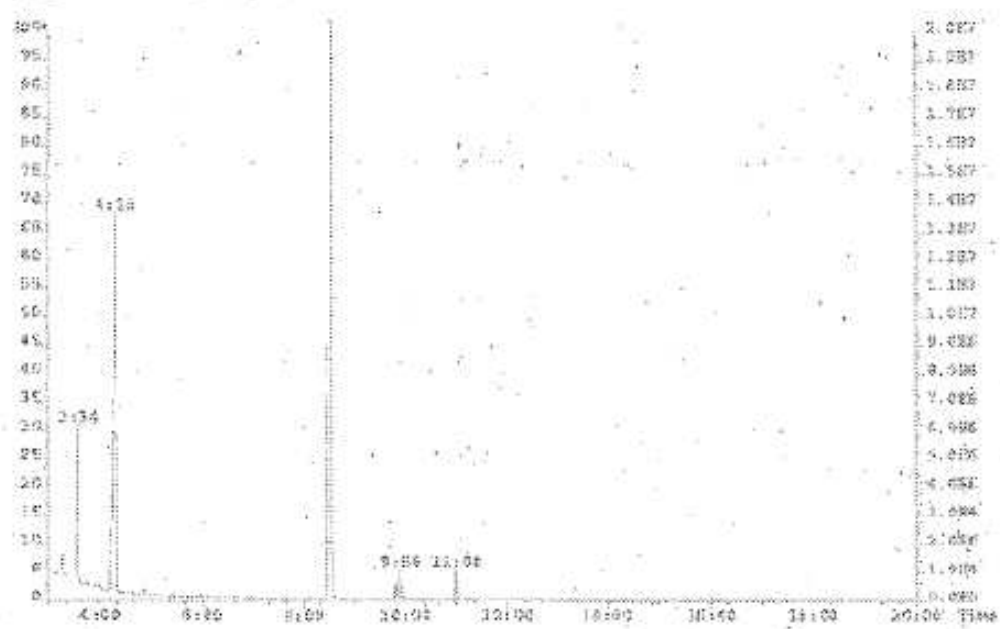


Fig. 9

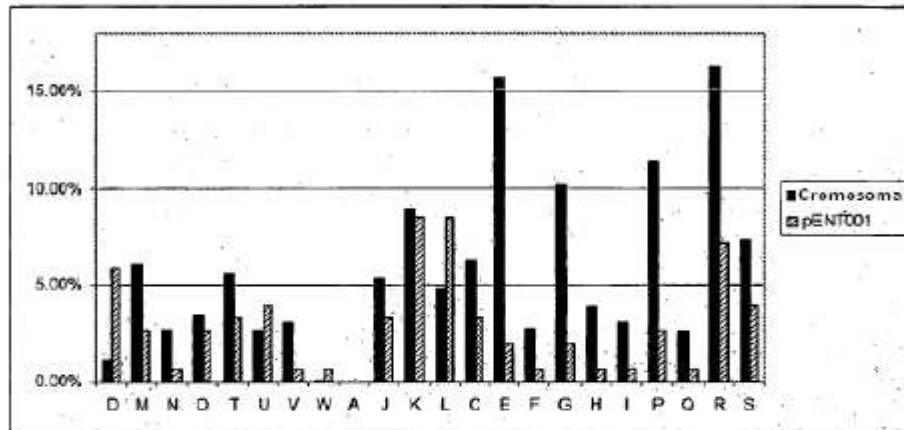
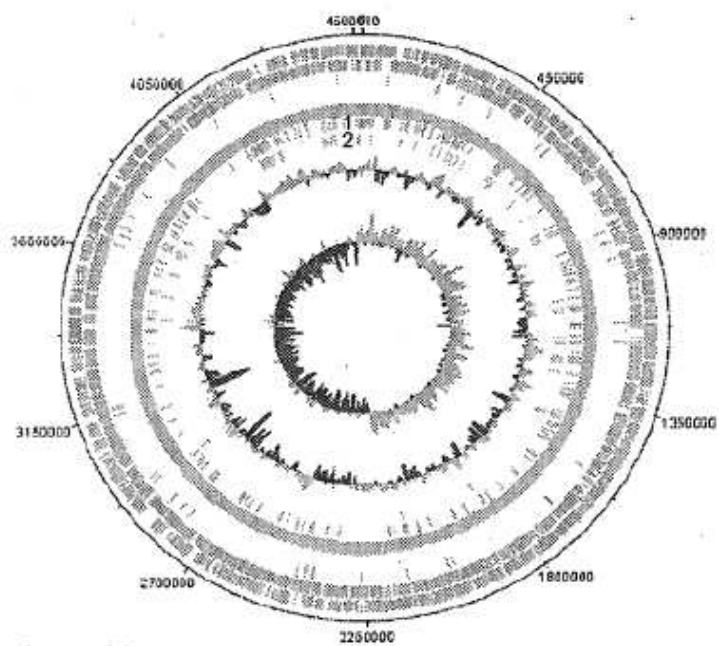


Fig. 10



Distribución de XX(X)

TGT	19	40
ACA	21	
AC	9	25
GT	16	
TTT	6	7
AAA	1	
TTG	3	4
AAC	1	
AGA	1	2
TCT	1	
ACG	8	100
ACC	1	
CCT	1	
CAT	1	
TCC	1	
CGT	4	
CAA	1	
GGT	3	
CTT	2	

1: todas las repeticiones palindrómicas

2: CCCTCTCCCXX(X)GGAGAGGG (sec. con núm. de ident.: 1)

Fig. 11

