

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 646 132**

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 15186038 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.08.2017 EP 3000873**

54 Título: **Un procedimiento para aumentar la tolerancia a sequía en una planta**

30 Prioridad:

12.03.2010 US 313415 P

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

12.12.2017

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:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

Observaciones:

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

ES 2 646 132 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

Un procedimiento para aumentar la tolerancia a sequía en una planta

Se realiza la presente invención con apoyo gubernamental bajo el contrato número DE-AC02-98CH10886, otorgado por el Departamento de Energía de los Estados Unidos. El Gobierno tiene determinados derechos en la invención.

5 Antecedentes de la invención

La presente invención se refiere al uso de una especie novedosa de *Enterobacter* en relación con el aumento de la tolerancia y/o resistencia a sequía en una planta.

30 Se puede esperar que los cambios climáticos de la Tierra tengan un fuerte efecto sobre la productividad agrícola. Por ejemplo, se considera que en aumento de las emisiones de combustión de combustibles fósiles han afectado el clima de la Tierra, lo que ha hecho que sea más deseable la producción de biocombustibles a partir de recursos renovables. Otra forma en que se espera que el cambio climático afecte la productividad agrícola es la aumentar las temperaturas y afectar los patrones de lluvia.

15 Aunque es deseable una mayor demanda de recursos agrícolas en la producción de materias primas para la producción de biocombustibles, esta mayor demanda se equilibra con un aumento simultáneo de la demanda de alimentos para sustentar una población mundial aún en crecimiento.

20 Por lo tanto, subsiste la necesidad de prácticas sostenibles que se puedan utilizar para optimizar la producción de alimentos y materias primas para biocombustibles. Dichas prácticas aumentarían de forma óptima la productividad general de las plantas de forma sostenible, aumentarían la tolerancia a la sequía en las plantas de tal manera que los cultivos y materias primas puedan soportar las principales fluctuaciones en los patrones de lluvia y aumentar la tolerancia a infecciones de patógenos en las plantas.

Weyens et al. (Trends in Biotechnology, Elsevier Publications, Cambridge, GB, 27(10): 591-598 (2009) se refiere a los efectos beneficiosos de las bacterias asociadas a plantas para aumentar la producción de biomasa y mejorar las medidas correctivas.

25 Taghavi et al. (Applied y Environmental Microbiology, American Society for Microbiology, US, 75(3): 748-757 (2009) divulga la capacidad de las bacterias endofíticas para promover el crecimiento y el desarrollo de árboles populares.

Taghavi et al. (PLOS Genetics, 6(5)) identifica y caracteriza la secuencia de genomas de la bacteria endofítica que promueve el crecimiento de la planta *Enterobacter* sp. 638.

Sumario de la invención

30 La presente invención se refiere a un procedimiento para aumentar la tolerancia a sequía en una planta. El procedimiento incluye aplicar una composición a la planta en una cantidad efectiva para aumentar la tolerancia a enfermedades en la planta. La composición incluye un cultivo aislado de *Enterobacter* sp. 638.

En una realización preferida, el procedimiento comprende aplicar la composición a una raíz, un brote, una hoja, y/o una semilla de la planta.

35 En otra realización preferida, la planta es una angiosperma especialmente tomate, álamo, soja, maíz, pepino, guisante, rábano, brócoli o espinaca.

Breve descripción de los dibujos

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

40 La Figura 2 es una representación circular del cromosoma de *Enterobacter* sp. 638. Los círculos muestran (desde el exterior): la desviación en porcentaje de GC (ventana de GC-GC media) en una ventana de 1000 bp, las CDS predichas transcritas en la dirección horaria, las CDS predichas transcritas en la dirección contrahoraria, CDS en dirección horaria y dirección contrahoraria en color de acuerdo con sus clases COG, la posición de todas las repeticiones palindrómicas, la posición de las 100 repeticiones palindrómicas (CCCTCTCCCXX(X)GGGAGAGGG) (SEQ ID NO: 1), asimetría GC (G+C/G-C) en una ventana de 1000 bp, y coordenadas en pares de kilo bases. Las regiones sintéticas comparadas K12 de *E. coli* se muestran con genes exhibidos en naranja, mientras que los genes exhibidos en púrpura corresponden a una región no sintética. Las flechas indican funciones putativas de genes ubicados en regiones que no están en sintenia con K12 de *E. coli* (para detalles adicionales sobre el contenido de genes para cada una de las regiones véase Tabla 1). Una región sintética se define por un mínimo de tres genes consecutivos que están presentes en una secuencia del genoma bacteriano, y que muestran una organización genética similar a la de los mismos genes en otros genomas bacterianos.

50 La Figura 3 es una representación circular del pENT638-1 de *Enterobacter* sp. 638. Los círculos muestran desde el exterior: la subdivisión del grupo pENT-01 de la función, anotación de gen, la desviación en porcentaje de GC

(ventana de GC-GC media) en una ventana de 1000 bp, las CDS predichas (rojo) transcritas en la dirección horaria, las CDS predichas (azul) transcritas en la dirección contrahoraria, asimetría GC (G+C/G-C) en una ventana de 1000 bp, elementos transponibles a partir de elementos IS (rosado) y pseudogenes (gris). Los sistemas de toxina/antitoxina T (TA) se muestran con un asterisco (*).

5 La Figura 4 representa los índices de crecimiento de esquejes de álamo inoculados con diferentes bacterias endofíticas. Se determinan los índices de crecimiento 10 semanas después de la inoculación y plantación de los esquejes en suelo arenoso. Por condición, se utilizan siete plantas. Las plantas se cultivaron en el invernadero. Se utilizaron plantas no inoculadas como referencias. Las barras indican errores estándar. Se calcularon los índices de crecimiento como $(Mt-M0)/M0$ después de 10 semanas de crecimiento de plantas inoculadas y no inoculadas. M0, peso de la planta (g) en la semana 0; Mt, peso de la planta (g) después de 10 semanas. La significancia estadística del aumento de producción de biomasa de plantas inculadas, en comparación con aquella de plantas de control no inoculadas, se confirmó en el nivel de 5 % (***) utilizando la prueba de Dunnet.

15 La Figura 5 muestra los efectos de *Enterobacter* sp. 638 sobre la formación de brote y raíz del álamo DN-34. Las plantas se incubaron hidropónicamente en solución de Hoagland a media concentración en la ausencia (Control) o presencia (638) de la cepa 638. Se presenta el desarrollo de raíz y brote después de 1 (A) y 10 (B) semanas.

La Figura 6 muestra el peso total de los tomates cosechados durante un período de crecimiento de 4 meses. Las plantas inoculadas con *Enterobacter* sp. 638 uvieron un rendimiento mayor del 10 % en comparación con plantas de control no inoculadas.

20 La Figura 7 presenta una reducción en el tiempo de floración luego de la inoculación de la planta de girasol inoculada con *Enterobacter* sp. 638 en comparación con plantas de girasol no inoculadas como controles.

La Figura 8 muestra una comparación de cromatogramas de extractos de *Enterobacter* sp. 638 que crecen en la ausencia (cromatograma superior) o presencia (cromatograma inferior) de los extractos de planta. Observe la producción de Acetoína y 2,3-Butanodiol en la presencia de los extractos de planta. Este resultado se confirmó en un medio definido que contenía sacarosa.

25 La Figura 9 muestra el porcentaje de genes de una clase de COG particular que depende de su localización genética: cromosoma o plásmido pENT638-1. Leyenda de la clase Cog: D: Control de ciclo celular, división celular, particionamiento de cromosoma; M Biogénesis de pared/membrana/envoltura de célula; N Motilidad celular; O Modificación postraduccional, recambio de proteínas, chaperones; T Mecanismos de transducción de señal; U Tráfico intracelular, secreción, y transporte vesicular; V Mecanismos de defensa; W Estructuras extracelulares; J Traducción, estructura ribosómica 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 Solo predicción de función general; S Función desconocida.

35 La Figura 10 muestra la distribución de las repeticiones palindrómicas sobre el cromosoma de *Enterobacter* sp. 638. Los círculos exhiben (desde el exterior): las CDS predichas transcritas en la dirección horaria y contrahoraria, la posición de todas las repeticiones palindrómicas y de la repetición palindrómica "CCCTCTCCCXX(X)GGGAGAGGG" (SEQ ID NO: 1) encontrada en el genoma de *Enterobacter* sp. 638, la desviación en porcentaje de GC, sesgo de GC. La Tabla en el lado muestra la variación de secuencias de nucleótidos XX(X) y sus números acumulativos.

40 La Figura 11 muestra en aumento de producción de biomasa de tabaco cuando se inocula con *Enterobacter* sp. 638. Para comparación, se incluyen las plantas de control no inoculadas y las plantas inoculadas con *Pseudomonas putida* W619. Para el tabaco, no solo las plantas inoculadas con *Enterobacter* sp. 638 mostraron el mayor aumento de crecimiento, pero también un inicio más temprano de floración como se vio con el girasol.

Descripción detallada de la invención

45 Un depósito biológico del *Enterobacter* sp. 638 se acuerdo con la invención se realizó el 4 de marzo de 2011 con el Depositario de Patentes ATCC, 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110.

A. Cultivo de *Enterobacter* sp. 638

50 La *Enterobacter* sp. 638 es una cepa bacteriana no fitopatógena. La cepa de *Enterobacter* sp. 638 se aisló bajo condiciones aeróbicas de las muestras de raíz y tallo esterilizadas en la superficie tomadas de árboles de álamo híbrido H11-11 que se cultivaron en un suelo franco limoso con agua subterránea debajo de aquel que estaba contaminada con tetracloruro de carbono o tricloroetileno.

55 La cepa de *Enterobacter* sp. 638 incluye un único cromosoma circular de 4,518,712 bp con un contenido de G+C total de 52,98 %, e incluye de forma estable un plásmido pENT638-1 de 157,749 bp, que tiene un contenido de G+C total de 50,57 %. El plásmido pENT638-1 exhibe, con base en el contenido de GC, por lo menos cuatro regiones distintas (Figura 3). El plásmido pENT638-1 se refiere a plásmidos F encontrados en otra *Enterobacteriaceae*. Los

plásmidos de esta familia están involucrados en la interacción y virulencia del anfitrión, tal como el plásmido pFra del microbio de la peste *Yersinia pestis*. Sin embargo, en pENT638-1, la isla de patogenicidad pFra se reemplaza por una única isla genómica putativa de 23-kb (flanqueada por un gen integrasa y que tiene un contenido de GC que es significativamente diferente que aquel del resto del plásmido).

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

10 B. Inoculante para una planta

Se divulga un inoculante para una planta. El inoculante incluye un cultivo aislado del *Enterobacter sp.* 638 y un medio biológicamente aceptable. Los términos “inoculante microbiano” o “inoculante” se refieren a una preparación que incluye un cultivo aislado de *Enterobacter sp.* 638.

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

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

25 En una divulgación, el inoculante adicional incluye un microorganismo que promueve el crecimiento de planta, que incluye, por ejemplo, una bacteria endofítica, hongo, bacteria rizosfera y/o un hongo micorriza que promueven el crecimiento de planta. Ejemplos específicos de microorganismos que promueven el crecimiento de planta incluyen, pero no se limitan a miembros de los géneros *Actinobacter*, *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Buttiauxella*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Kluyvera*, *Pseudomonas*, *Rahnella*, *Ralstonia*, *Rhizobium*, *Serratia*, y *Stenotrophomonas*.

C. Procedimiento para aumentar el crecimiento

30 En otra divulgación, se presenta un procedimiento para aumentar el crecimiento en una planta. El procedimiento incluye aplicar una cantidad efectiva de una composición que incluye un cultivo aislado de *Enterobacter sp.* 638 a la planta.

35 Una “planta” como se utiliza aquí se refiere a cualquier tipo de planta, tal como un árbol, arbusto, flor, hierba, vid, o césped. El término “planta” también se refiere a cualquier parte de la planta, por ejemplo, a una planta entera, una parte de planta, una célula vegetal, o un grupo de células vegetales, tales como tejido vegetal, o progenie de las mismas. Las plántulas también se incluyen dentro del significado de “planta”. Las plantas incluyen, por ejemplo, gimnospermas y angiospermas, tanto en monocotiledóneas como dicotiledóneas, y árboles.

Ejemplos de angiospermas monocotiledóneas incluyen, pero no se limitan a, espárrago, maíz de campo y dulce, cebada, trigo, arroz, sorgo, cebolla, mijo perla, centeno y avena y otros granos de cereales, caña de azúcar, hierba de elefante, pasto aguja y miscantus.

40 Ejemplos de angiospermas dicotiledóneas incluyen, pero no se limitan a tomate, tabaco, algodón, colza, habas, soja, pimientos, lechugas, guisantes, alfalfa, trébol, cultivos de col o *Brassica oleracea* (por ejemplo, col, brócoli, coliflor, coles de Bruselas), rábano, zanahoria, remolacha, berenjena, espinacas, pepino, calabaza, melón, melón cantalupo, girasol y diversas plantas ornamentales. En una divulgación preferida, planta es tomate. En otra divulgación preferida, la planta es girasol. En aún otra divulgación preferida, la planta es tabaco.

45 Ejemplos de especies leñosas de plantas incluyen álamo, pino, secoya, cedro, roble, etc. Las especies de árboles incluyen adicionalmente, por ejemplo, abeto, pino, picea, alerce, cedro, cicuta, acacia, aliso, álamo, haya, abedul, liquidámbar, sicómoro, álamo, sauce, y similares. En una divulgación preferida, la planta es un álamo.

50 Como se utiliza aquí, el término “aumentar” crecimiento se refiere a un aumento en una característica de crecimiento de una planta tratada con un procedimiento o una composición divulgada, en la que el aumento de la característica de crecimiento es mayor que el crecimiento de una planta de control correspondiente cuando se cultivan bajo condiciones idénticas sin la aplicación del procedimiento o composición divulgada. Una planta de control “correspondiente” se refiere a una planta de tipo silvestre que es del mismo tipo o especie como la planta tratada con un procedimiento o una composición divulgada.

El aumento en el crecimiento puede ser un aumento en el crecimiento de una parte particular de la planta, tal como raíces, brotes, hojas, flores, frutos, y/o semillas, o el crecimiento se puede distribuir a través de toda la planta. Los medios para medir el crecimiento son conocidos en la técnica.

5 El aumento del crecimiento puede incluir, por ejemplo, un aumento en por lo menos una, o una combinación de, las siguientes características en la planta y/o una parte de la planta: altura, anchura, masa, una acumulación de carbono radiactivo, un aumento de peso seco, un aumento en el peso fresco y/o un aumento en la tasa de dichos aumentos durante un período de tiempo específico.

10 El aumento de crecimiento también puede incluir, por ejemplo, un aumento en la cantidad de fruto producido, una disminución en el tiempo de floración, y/o un aumento en la masa de las partes vegetativas que sirven a un propósito útil, tales como raíces o tubérculos de plantas en las que estas partes son una fuente de alimento.

15 El aumento en el 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 que crece bajo condiciones idénticas sin la aplicación del procedimiento o composición divulgada. Por ejemplo, una planta que tiene un mayor 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 que crece bajo condiciones idénticas sin la aplicación del procedimiento o composición divulgada.

D. Procedimiento para aumentar la biomasa

Se divulga adicionalmente un procedimiento para aumentar la biomasa en una planta. El procedimiento incluye aplicar una cantidad efectiva de una composición que incluye un cultivo aislado de *Enterobacter sp.* 638 a la planta.

20 El término "biomasa" se refiere al peso seco o peso fresco de la planta. La biomasa incluye, por ejemplo, todas las partes de la planta a menos que se estipule lo contrario, tales como en referencia a biomasa de brote (todas las partes de la planta por encima del suelo), biomasa de hoja, y biomasa de raíz. El término "peso seco" se refiere al peso de una planta que se ha secado para eliminar la mayoría 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 técnica.

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

30 El aumento en 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 que crece bajo condiciones idénticas sin la aplicación del procedimiento o composición de la invención. Por ejemplo, una planta que tiene un aumento de biomasa en comparación con la planta tipo 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 que crece bajo condiciones idénticas sin la aplicación del procedimiento o composición de la invención.

E. Procedimiento para aumentar tolerancia y/o resistencia a enfermedades

40 Sin embargo, se divulga adicionalmente un procedimiento para aumentar la tolerancia y/o resistencia a enfermedad en una planta. El procedimiento incluye aplicar una cantidad efectiva de una composición que incluye un cultivo aislado de *Enterobacter sp.* 638 a la planta. Aunque no se limita a ninguna teoría en particular, la *Enterobacter sp.* 638 puede aumentar la tolerancia y/o resistencia a enfermedad en una planta debido a una producción de acetoina y 2,3-butanodiol por la *Enterobacter sp.* 638, o debido a una producción de los compuestos antimicrobianos 2-feniletanol y 4-hidroxibenzoato, o a través de la competición directa por los nutrientes esenciales a través de la síntesis de enterobactina de sideróforo, y/o a través de la absorción de complejos de sideróforos de hierro producidos de forma heteróloga por *Enterobacter sp.* 638.

45 El término "tolerancia a enfermedad" se refiere a la capacidad de una planta para soportar o resistir una enfermedad mientras que se mantiene la capacidad de funcionamiento y producción a pesar de la enfermedad. Una enfermedad incluye, por ejemplo, la presencia de una patología que afecta adversamente la viabilidad de una planta, tal como, por ejemplo, una infección por un patógeno (por ejemplo, un hongo, virus, o bacterias) en y/o sobre la planta.

50 El término "resistencia a enfermedad" se refiere a la capacidad de una planta para desarrollar un menor número de síntomas de la enfermedad luego de exposición a una enfermedad de la planta de control correspondiente que no presenta resistencia a enfermedad cuando se cultivan bajo condiciones y enfermedades idénticas. La resistencia a enfermedad incluye la resistencia completa a la enfermedad y/o diversos grados de resistencia que se manifiestan como disminución de los síntomas, mayor supervivencia, u otros parámetros de enfermedad, tales como mayor rendimiento, aumento del crecimiento, aumento de la biomasa, maduración acelerada del fruto, etc. Una enfermedad puede ser, por ejemplo, una infección por hongos tales como *Septoria*, *Melampsora*, o *septotina*, una infección por

virus tal como el virus del mosaico del álamo, y/o una infección bacteriana, tal como una infección de *Agrobacterium*, *Rickettsia*, o *Corynebacterium*.

5 El término “aumentar” tolerancia y/o resistencia a la enfermedad se refiere a un aumento de la tolerancia y/o resistencia de una planta enferma tratada con un procedimiento o composición divulgada, en la que la tolerancia y/o resistencia a enfermedad es mayor que tolerancia y/o resistencia a enfermedad en una planta de control correspondiente que se cultiva bajo condiciones y enfermedades idénticas.

10 El aumento de tolerancia y/o resistencia a 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 que crece bajo exposición a condiciones y enfermedad idénticas. Por ejemplo, una planta que tiene aumento de tolerancia y/o resistencia a enfermedad en comparación con la planta tipo silvestre puede tener 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 75 %, 80 %, 90 %, 100 % o más tolerancia y/o resistencia a enfermedad que la planta de control correspondiente que crece bajo condiciones idénticas sin aplicación del procedimiento o composición divulgada.

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

F. Procedimiento para aumentar la Productividad de frutos y/o semillas

20 Incluso se divulga adicionalmente un procedimiento para aumentar la productividad de frutos y/o semillas en una planta. El procedimiento incluye aplicar una cantidad efectiva de una composición que incluye un cultivo aislado de *Enterobacter sp.* 638 a la planta.

25 “Aumento de la productividad” se refiere al aumento de la masa o cantidad de frutos y/o semillas producidas por una planta tratada con un procedimiento o una composición divulgada, en la que el aumento de la productividad es una cantidad mayor que la cantidad de la productividad en una planta de control correspondiente cuando se cultivan bajo condiciones idénticas sin la aplicación del procedimiento o composición divulgada.

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

30 La productividad se aumenta en una planta si, por ejemplo, se aumenta la cantidad de frutos producidos por la planta, se aumenta el peso de los frutos individuales producidos por la planta, se reduce el tiempo de floración de la planta, se reduce el tiempo para maduración del fruto de la planta, y/o se aumenta el número de semillas producidas por un fruto o una flor de la planta individual cuando se compara con una planta de control correspondiente cuando se cultiva bajo condiciones idénticas sin la aplicación del procedimiento o composición divulgada.

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

G. Procedimiento para aumentar tolerancia y/o resistencia a sequía

45 La invención se refiere a un procedimiento para aumentar la tolerancia y/o resistencia a sequía en una planta. El procedimiento incluye tratar la planta con una composición que incluye un cultivo aislado de *Enterobacter sp.* 638. Aunque no se limita a ninguna teoría particular, la *Enterobacter sp.* 638 puede aumentar la tolerancia y/o resistencia a sequía en una planta debido a una producción de acetoina y 2,3-butanodiol por la *Enterobacter sp.* 638.

50 El término “tolerancia a la sequía” se refiere a la capacidad de una planta para soportar o resistir las condiciones de sequía. “Sequía” se refiere a una condición en la que una planta se somete a estrés osmótico o potencial reducido de agua. Por ejemplo, la sequía puede ser provocada por la falta de agua disponible por un periodo de tiempo. Las condiciones de sequía se pueden evaluar al comparar la cantidad de agua requerida para el crecimiento o la maduración de una planta con la cantidad de agua disponible para la planta. Las condiciones de sequía pueden ser provocadas, por ejemplo, por falta de lluvia o riego, en relación con la cantidad de agua utilizada internamente o transpirada por una planta.

55 El término “resistencia a la sequía” se refiere a la capacidad de una planta para desarrollar menos síntomas de estrés hídrico (por ejemplo, una menor productividad, pérdida de hojas, muerte) que la planta de control correspondiente cuando se cultiva bajo condiciones idénticas a estrés hídrico. La resistencia a la sequía incluye

resistencia completa a los efectos de la sequía (sin pérdida de productividad) o diversos grados de resistencia manifestados como disminución de los síntomas o una supervivencia más larga.

5 Se puede utilizar la evaluación fenotípica de los síntomas para determinar si, y en qué medida, una planta está sufriendo de sequía. Por ejemplo, la tolerancia y/o resistencia a la sequía se puede evaluar al observar y calificar el marchitamiento, detención del crecimiento, muerte, productividad, pérdida de hojas (por ejemplo, laminación de la hoja, distorsión de la hoja, caída de hojas, quema de hoja), muerte regresiva de tallos o ramas, eficiencia fotosintética, floración, y nivel de rendimiento en una planta. Adicionalmente, la tolerancia y/o resistencia a la sequía de una planta se puede determinar, por ejemplo, mediante ensayos basados en ácidos nucleicos o bioquímicos para medir la expresión o activación de genes de respuesta específicos en la planta.

10 La tolerancia y/o resistencia a la sequía se aumenta en una planta si la planta demuestra menos síntomas graves de estrés provocado por la sequía. Por ejemplo, la tolerancia y/o resistencia a la sequía se aumenta si se reduce el marchitamiento, detención del crecimiento, muerte, pérdida de hojas (por ejemplo, laminación de hoja, distorsión de hoja, caída de hojas, quema de hoja), y/o o muerte regresiva de tallos o ramitas cuando se compara con una planta de control correspondiente cuando se cultiva bajo condiciones idénticas sin la aplicación del procedimiento o composición de la invención. Otros ejemplos de una mayor tolerancia y/o resistencia a la sequía incluyen un aumento en la productividad, vigor de la planta, eficiencia fotosintética, floración, y/o nivel de rendimiento en una planta en comparación con una planta de control correspondiente cuando se cultiva bajo condiciones idénticas sin la aplicación del procedimiento o composición de la invención.

20 De acuerdo con lo anterior, el término "aumentar" la tolerancia y/o resistencia a sequía se refiere a un aumento en la tolerancia y/o resistencia a sequía de una planta impactada tratada con un procedimiento o composición de la invención, en la que la tolerancia y/o resistencia es mayor que la tolerancia y/o resistencia a sequía en una planta de control correspondiente que crece bajo condiciones y estrés hídrico idénticos.

25 El aumento de tolerancia y/o resistencia a 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 que crece bajo condiciones idénticas y estrés hídrico. Por ejemplo, una planta que tiene aumento de tolerancia y/o resistencia a sequía en comparación con la planta control puede tener 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 75 %, 80 %, 90 %, 100 % o más tolerancia y/o resistencia a sequía que la planta de control correspondiente que crece bajo condiciones idénticas sin aplicación del procedimiento o composición de la invención.

H. Procedimientos generales

30 Se puede utilizar cualquier procedimiento para aplicar una composición a una planta en el procedimiento de la presente invención. Los procedimientos para aplicar una composición sobre y/o en una planta se conocen en la técnica. En una divulgación, la composición se puede inocular en el suelo con la planta. En otra realización, la composición de la invención se puede introducir en las raíces de las plantas a través del crecimiento en un medio hidropónico o rociar sobre las hojas de una planta.

35 La composición de la invención se puede aplicar a cualquier parte de la planta, incluyendo las semillas a través del uso de un mecanismo de recubrimiento o aglutinante adecuado. La composición de la invención se puede aplicar en las plantas antes de la siembra o se introduce en los surcos para las plantas durante la siembra. Como otro ejemplo, la composición de la invención se puede aplicar a las raíces de la planta. La composición de la invención se puede preparar con o sin un portador y vender como un inoculante independiente que se inserta directamente en los surcos en el que se siembran las plantas.

40 De acuerdo con el procedimiento de la invención, una cantidad efectiva de la composición de la invención es esa cantidad suficiente para establecer suficiente crecimiento bacteriano de tal manera que el resultado deseado se consigue en la planta tratada. Una cantidad efectiva de la composición de la invención se puede determinar por medios conocidos en la técnica para una especie vegetal particular. Por ejemplo, la inoculación con la composición de la invención se puede llevar a cabo en el cultivo hidropónico durante seis días, y la suspensión bacteriana se puede renovar después de tres días luego de inoculación.

45 En una realización, la cantidad efectiva puede, por ejemplo, ser cualquier cantidad desde aproximadamente 10^1 hasta aproximadamente 10^{12} células por planta. En otra realización, la cantidad efectiva es una concentración celular desde aproximadamente 10^5 hasta aproximadamente 10^{10} CFU/ml de inóculo, más preferiblemente desde aproximadamente 10^6 hasta 10^8 CFU/ml, y aún más preferiblemente aproximadamente 10^8 CFU/ml. En todavía otra realización, la composición de la invención se puede mezclar con el suelo en una cantidad desde aproximadamente 10^5 hasta 10^{10} células por gramo de suelo.

Ejemplos

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

55 Se recolectaron muestras de raíz y brote del árbol de álamo H11-11 híbrido de 10 años de edad (*Populus trichocarpa* _*P. deltoides*) que había estado creciendo en presencia de tetracloruro de carbono (12 ppm de forma

homogénea) durante 8 años en un sitio experimental en el estado de Washington. Adicionalmente, se recogió material de sauce nativo (*Salix gooddingii*) de 5 años de edad, las plantas nativas habían estado creciendo en presencia de tricloroetileno (18 ppm) y tetracloruro de carbono (12 ppm) durante 5 años. Se retiraron los esquejes de las plantas con máquinas de cortar que se lavaron con etanol entre los cortes y se colocaron en frascos de análisis orgánicos volátiles enjuagados con acetona que se colocaron en hielo para su envío desde el campo. Las raíces y brotes se trataron por separado. Las muestras de raíces y brotes frescas se lavaron vigorosamente en agua destilada durante 5 min, la superficie se esterilizó durante 5 min en una solución que contenía 1 % (peso/vol) de cloruro activo (agregado como una solución de hipoclorito de sodio [NaOCl]) suplementada con 1 gota de Tween 80 por 100 ml de solución, y se enjuagaron tres veces en agua destilada estéril. Una muestra de 100 µl del agua del tercer enjuague se sembró 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 10 mM utilizando un mezclador Polytron PT1200 (Kinematica A6). Se hicieron diluciones en serie, y las muestras de 100 µl se colocaron en placas en medios no selectivos con el fin de probar la presencia de los endófitos y sus características.

Se aisló *Enterobacter sp.* 638 bajo condiciones aerobias a partir de muestras de raíz y tallo esterilizadas en superficie tomadas de árbol de álamo H11-11 híbrido y sauce nativo (*Salix gooddingii*) que se hicieron crecer en un suelo franco limoso con aguas subterráneas por debajo de estos que estaba contaminada con tetracloruro de carbono o tricloroetileno y tetracloruro de carbono, respectivamente. Su ADN genómico total se extrajo y se utilizó para amplificar el gen rARN 16. Los genes rARN 16S se amplificaron mediante PCR utilizando el grupo de cebadores 26F-1392R estándar (Amann, 1995)

Ejemplo 2: Cribado de bacterias endofíticas para propiedades que promueven el crecimiento de plantas en álamo.

Se prepararon los inóculos (cultivo de 250 ml) al hacer crecer bacterias endofíticas en un medio 869 en concentración de 1/10 (25) a 30°C sobre un agitador rotatorio hasta que se alcanzó una concentración celular de 10⁹ CFU/ml (densidad óptica a 660 nm [DO660] de 1). Las células se recolectaron mediante centrifugación, se lavaron dos veces en MgSO₄ 10 mM, y se suspendieron en 1/10 del volumen original (en MgSO₄ 10 mM) para obtener un inóculo con una concentración celular de 10¹⁰ CFU/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 precipitados de 1 litro que contenía 0,5 litros de una solución nutritiva de Hoagland estéril de resistencia media (5), que se refresca cada 3 días. Se permitieron esquejes en la raíz durante aproximadamente 4 semanas hasta que comenzó la formación de raíces. Posteriormente, se agregó un inóculo bacteriano a cada frasco a una concentración final de 10⁸ CFU/ml en solución de Hoagland de fuerza media. Después de 3 días de incubación, los esquejes se pesaron y se plantaron en suelo arenoso no estéril y se colocaron en el invernadero con una temperatura constante de 22°C y ciclo de 10 h de luz-14 h de oscuridad con radiación activa fotosintética de 165 mmol/m²s. Después de 10 semanas, se recolectaron las plantas, y se determinaron su biomasa total, su aumento de la biomasa, y la biomasa de diferentes tejidos de la planta. También se recogieron datos de las plantas de control no inoculadas. Se calcularon los índices de crecimiento como (Mt-M0)/M0 después de 10 semanas de crecimiento en presencia o ausencia de inóculo endofítico, donde M0 es el peso de la planta (g) en la semana 0 y Mt es el peso de la planta (g) después de 10 semanas. El significado estadístico de los resultados se confirmó en el nivel de 5 % mediante la prueba de Dunnett. Para determinar los efectos de las bacterias endofíticas en el enraizamiento de álamo DN-34, los esquejes se trataron como se describió anteriormente, excepto que se agregó el inóculo endofítico desde el día 1.

Se probó la *Enterobacter sp.* 638 aislada de álamo para determinar su capacidad para mejorar el crecimiento de sus plantas anfitrionas, junto con otras gammaproteobacterias endofíticas encontradas en álamos. *Burkholderia* Bu72 cepacia, un endófito originalmente aislado de altramuz amarillo que se encontró tenía efectos que promueven el crecimiento de plantas en los árboles de álamo, y *Cupriavidus metallidurans* CH34 (también denominada como *Ralstonia metallidurans* CH34), una bacteria típica del suelo sin efectos que promueven el crecimiento de las plantas conocidos se incluyó como controles positivos y negativos, respectivamente. Adicionalmente, se utilizaron esquejes no inoculados como controles.

Después de la formación de raíces en condiciones hidropónicas y posterior inoculación de endófitos, los esquejes de álamo DN-34 se plantaron en un suelo arenoso marginal y se dejaron crecer durante 10 semanas, después de lo cual se recolectaron las plantas y se determinaron sus biomásas. Después de 10 semanas de crecimiento, los álamos inoculados con *M. populi* BJ001 tenían menos nueva biomasa que los controles (Figura 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 (Figura 4), como se refleja en sus índices de crecimiento. Los efectos que promueven el crecimiento de plantas de *Enterobacter sp.* 638 y *B. cepacia* BU72 fueron reproducibles en experimentos realizados independientemente.

Bajo las condiciones de invernadero probadas, no se encontraron diferencias en los índices de crecimiento entre aquellos de las plantas no inoculadas de control y aquellos de las plantas inoculadas con *S. maltophilia* R551-3, *P. putida* W619, y *S. proteamaculans* 568; su crecimiento fue comparable con aquel observado para plantas inoculadas con *C. metallidurans* CH34. También, las plantas de control y las plantas inoculadas con las bacterias endofíticas parecían sanas, a excepción de las plantas inoculadas con *M. populi* BJ001, que mostraron signos de estrés, que incluyen clorosis de las hojas.

Ejemplo 3: Cribado de bacterias endofíticas para propiedades promotoras de crecimiento de plantas en el tabaco.

Dado que las especies de *Nicotiana* se utilizan en el laboratorio como modelos de plantas grandes para estudios de transformación y metabolitos, sería útil ser capaz de utilizar dicha planta para el estudio, incluso si no es útil para aplicaciones de campo. Las plántulas de *Nicotiana Xanthi* se iniciaron 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 con 10^8 CFU de *Enterobacter sp.* 638. Después de 3 días, se refrescaron los inóculos, y después de un período adicional de tres días, las plantas se colocaron en macetas en el invernadero.

Se monitorizó el crecimiento de las plantas semanalmente y se registró el tiempo hasta el inicio de la floración. Las plantas alcanzaron tamaño completo más rápidamente que las plantas no inoculadas, y la mayoría de las plantas estaban en flor un mes antes de que el mismo número de plantas no inoculadas estuvieran en flor.

Ejemplo 4: Efectos de bacterias endofíticas sobre el desarrollo de la raíz del álamo

Para probar adicionalmente los efectos de bacterias endofíticas sobre el desarrollo de la raíz, se realizaron experimentos de enraizamiento en presencia y ausencia de los derivados marcados con *gfp* de *Enterobacter sp.* 638. La formación de raíz era muy lenta para las plantas no inoculadas. Por el contrario, para los esquejes que se permitieron en la raíz en la presencia de los endófitos seleccionados, la formación de raíces se inició dentro de 1 semana, y la formación de brotes fue más pronunciada en comparación con aquella de las plantas no inoculadas (Figura 5A). Después de 10 semanas, la formación de raíces para los controles no inoculados era todavía pobre; sin embargo, en las plantas inoculadas con *Enterobacter sp.* 638, las raíces y brotes estaban bien desarrollados (Figura 5B). La microscopía de fluorescencia se utiliza para visualizar la colonización interna de las raíces de las plantas por las cepas marcadas con *gfp*, lo que confirma su comportamiento endófito. La formación de microcolonias sobre la superficie de la raíz, como se observa para *P. putida* W619, estaba ausente sobre las plantas inoculadas con *Enterobacter sp.* 638, donde solo se observó colonización interna. No se detectó la expresión de *gfp* para las raíces de las plantas de control no inoculadas.

Ejemplo 5: Efecto de la bacteria endófito sobre fructificación y productividad de floración

Para probar el efecto de las bacterias endofíticas de masa de producción de frutos, semillas de tomate (variedad tradicional Brandywine, Park Seed) se inició en una matriz de perlita/agua, y luego se transfirió a una solución hidropónica de solución de Hoagland de 1/2 resistencia. Cuando las plantas tenían aproximadamente 3 pulgadas de altura, se transfirieron a soluciones que contenían 10^8 CFU por mL de bacterias endofíticas como se describió anteriormente. Tres días después de inoculación, las plántulas se plantaron en el invernadero en ProMix, una mezcla comercial para macetas. Las fechas de la primera producción de frutos y la masa total de los tomates se registraron durante tres meses. Las plantas de tomate inoculadas con *Enterobacter* 638 tuvieron un aumento de 10 % en la productividad del fruto sobre 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).

Las plántulas de girasol (Mammoth, Park Seed) se iniciaron utilizando el procedimiento descrito, y se registró el tiempo de la floración. Bajo condiciones de invernadero, los girasoles inoculados comenzaron floración 5 días antes de las plantas no inoculadas, y el 50 % estaban en la flor, mientras que sólo florecieron el 10 % de las plantas no inoculadas; 100 % de las plantas inoculadas florecieron mientras que sólo florecieron el 70 % de las plantas no inoculadas (Figura 7).

Ejemplo 6: Resistencia a la sequía

Se colocaron esquejes de madera de álamo híbrido (*Populus deltoides x P. nigra* OP-367) en agua durante tres días para iniciar la formación de raíz, y después se trasladó a una solución de Hoagland de 1/2 resistencia que contenía 10^8 CFU por mL de bacterias endofíticas durante tres días. Los esquejes luego se plantaron en macetas que contenían tierra de jardín y se hicieron crecer en el invernadero durante tres meses con agua suministrada excedente. Después de tres meses, se suspendió el riego de las plantas, y se monitorizó el tiempo para senescencia. Las plantas inoculadas en promedio mostraron un retraso del 20 % en el inicio de los síntomas de sequía, en comparación con las plantas no inoculadas.

Ejemplo 7: Resistencia a enfermedades

Debido a que el aumento de vigor de las plantas, así como los elementos genéticos presentes en las bacterias endofíticas, esas plantas inoculadas demostrarán ser más resistente a la colonización de patógenos y esos síntomas serán menos evidentes en las plantas inoculadas.

Los esquejes de álamo híbrido, tanto H11-11 (altamente susceptibles a enfermedad fúngica) como OP-367 (resistentes a las enfermedades por hongos) ambos serán inoculados como se describe. Las plantas se sierran en mezcla para macetas estéril, y se hicieron crecer hasta que estuvieron presentes seis a ocho hojas. Las plantas se expondrán después a patógenos fúngicos, y por lo tanto se monitorizará el tiempo de inicio y gravedad de los

síntomas físicos de la infección. Las plantas también se pueden analizar para determinar la actividad de genes responsables de la enfermedad conocida.

Ejemplo 8: Estructura del genoma y características generales

5 El genoma de la *Enterobacter* sp gamma-proteobacteria. 638 (Figura 2) incluye un único cromosoma circular de 4,518,712 pb con un contenido de G+C total de 52,98 %, e incluye un plásmido pENT638-1 de 157,749 bp, que tiene un contenido de G+C total de 50,57 % (Tabla I). El cromosoma de *Enterobacter* sp. 638 muestra una transición de sesgo de GC, que corresponde con su origen de replicación (oriC) y terminal (Figura 2). El sitio oriC contiene un cuadro perfecto de unión a DnaA-(TTATCCACA) (SEQ ID NO: 2), que se encuentra 31,985 pb en dirección 5' del codón de inicio ATG dnaA (en la coordenada 4,487,245 bp).

10 El plásmido exhibe pENT638-1, basado en el contenido de GC, por lo menos cuatro regiones distintas (Figura 3). El plásmido incluye una cadena principal ancestral, que es común a los plásmidos de la familia F y contiene las funciones básicas del plásmido para la transferencia y replicación de las regiones que probablemente fueron adquiridas a través de transferencia de genes horizontal. Estas regiones en el plásmido pENT638-1 muestran una matriz de uso de codón diferente del resto de las especies de *Enterobacteriaceae*. Adicionalmente, estas regiones no tienen sintenia a los cromosomas secuenciados o plásmidos de cepas estrechamente relacionadas, y estas regiones interesantes codifican genes relacionados con la adhesión y colonización a planta. El mantenimiento estable en *Enterobacter* sp. 638 de pENT638-1 y estas regiones, que presumiblemente desempeñan un papel en la interacción exitosa entre *Enterobacter* sp. 638 y su planta anfitriona, parece importante con respecto a la presencia de sistemas de seis toxinas relBE/anti-toxina (TA).

20 Por el contrario, el cromosoma de *Enterobacter* sp. 638 codifica sólo tres parejas de toxina/anti-toxina (Ent638_0434-0435, Ent638_0476-0477, y Ent638_2066-2067). Este número bajo es representativo de organismos asociados a anfitrión.

25 El cromosoma codifica 4395 secuencias de codificación putativas (CDS) 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 %) se podría asignar a una función biológica putativa, mientras que 835 CDS (18,4 %) se anotaron como proteínas hipotéticas de función desconocida. Las proteínas hipotéticas conservadas se representan por 684 CDS (15,0 %), mientras que 151 CDS (3,3 %) no tenían homología con ninguna secuencia previamente reportada. Utilizando el módulo de COGNITOR desde el sistema de MAGE, 3597 CDS (79,1 %) se podrían asignar a una o más clases funcionales (véase Figura 9). El reparto de CDS de *Enterobacter* sp. 638 entre las diferentes clases COG es muy similar a lo que se observa para *E. coli* K12. Las tres clases más abundantes son transporte y metabolismo de aminoácidos (E), hidratos de carbono (G) y hierro inorgánico (P) y representan más del 37 % de todas las CDS, apuntando a los estilos de vida simbióticos de *Enterobacter* sp. 638 y *E. coli* K12 que requieren absorción eficiente de los nutrientes del anfitrión proporcionados. Se encontraron siete conjuntos de 5S, 16S, genes 23S rARN y un gen adicional 5S rARN. Se identificó un total de 35 83 genes de tARN con especificidades para los 20 aminoácidos, y un único tARN para selenocisteína.

El genoma de *Enterobacter* sp. 638 codifica 8 factores sigma: fliA (Ent638_2509; Sigma 28), tres Sigma 24 similares a rpoE (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).

40 La *Enterobacter* sp. 638 codifica una metilasa dam activa implicada en la metilación de adenina en los sitios GATC, como se confirmó por digestión de *Mbol* y *Sau3AI* del ADN, la primera enzima es incapaz de digerir el ADN de *Enterobacter* sp. 638 metilada.

45 Sobre el genoma de *Enterobacter* sp. 638 se encontraron cien repeticiones palindrómicas (CCCTCTCCCXX(X)GGGAGAGGG) distribuidas de forma desigual sobre el cromosoma (véase Figura 10). Estos bucles de horquilla que forman repeticiones (con XX(X) principalmente son TGT/ACA o AC/TG) a menudo se encuentra en duplicado o triplicado en el extremo 3' de los genes y el papel presumiblemente cumple una función en la terminación de transcripción.

Ocho elementos de inserción de secuencia (IS) se encontraron en el genoma de *Enterobacter* sp. 638: dos de la familia IS3/IS51 (un compuesto de tres ORFs con un desplazamiento de marco (Ent638_0739, Ent638_0740, Ent638_0741) y un compuesto de un único 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 putativas (véase la sección a continuación).

55 El plásmido pENT638-1 posee dos elementos IS completos, uno de la familia Tn3 compuesto por un ORF (Ent638_4224) y uno de la familia IS3/IS407 compuesto de dos ORFs (Ent638_4320 y Ent638_4321), así como dos transposasas truncadas de la última familia. El IS completo y la transposasa truncada de las familias IS3/S407 están flanqueando una gran región que codifica los genes implicados en mantenimiento y replicación del plásmido (*sopAB*, *repA*) y genes implicados en la transferencia de plásmido mediante conjugación (*tra*). Esta región de 75 kb puede se puede considerar como la estructura principal pENT638-1.

Al comparar el genoma de *Enterobacter sp.* 638 con aquellas cepas estrechamente relacionadas, *Enterobacter cancerogenus* ATCC 35316 se determinó que era el genoma más cercano con 80,4 % de las CDS en sintenia con *Enterobacter sp.* 638, a continuación, *Klebsiella pneumoniae* 342 y MGH 78578 (ambos con 74 % de los CDS en sintenia), seguido por *Citrobacter koseri* ATCC BAA-895 (73 %) y luego la especie *Escherichia coli* (entre 63 a 73 %)

5 La adaptación específica de *Enterobacter sp.* 638 a su planta anfitriona se examinó a través de la comparación del genoma con otros microbios asociados de la planta y la bacteria gastrointestinal *E. coli* K12 (MG1655). Esta cepa, elegida como un organismo de referencia, ya que es el mejor genoma bacteriano anotado, compartido (criterios de 80 % de identidad sobre el 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.

10 Se identificaron cincuenta y seis regiones en el genoma de *Enterobacter sp.* 638, que no estaban en sintenia con los genomas de bacterias estrechamente relacionados. Entre ellos, dieciocho regiones cumplen los criterios de islas genómicas putativas (destacadas en gris en el cuadro 2). Estas islas genómicas llevan genes que codifican las proteínas implicadas en el transporte de azúcar (sistema PTS), adhesión, utilización de pectato, receptores de la absorción a través de sideróforos de hierro, reducción de nitrato, biosíntesis de pilus, así como muchos otros transportadores y reguladores. El número de región 47 es un ejemplo ilustrativo de la adquisición de una isla genómica que contiene genes implicados en la adaptación de un estilo de vida endófito. Esta región codifica un transportador de pectato putativo y proteínas de degradación, lo que puede permitir que la cepa 638 crezca en pectato (un compuesto sintetizado de planta importante) como fuente de carbono. Esta isla genómica está flanqueada por un gen de integrasa y se inserta en un sitio tARN-Gly.

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

25 Adicionalmente, el cromosoma de *Enterobacter sp.* 638 contiene una región con Repeticiones Palindrómicas Cortas Agrupadas y Regularmente Interespaciadas (CRISPR) situada junto a seis genes (Ent638_1401-1406) que codifican secuencias asociadas a CRISPR (CAS). Es probable que la CRISPR proporcione tolerancia adquirida contra los bacteriófagos. Seis de los ocho profagos se flanquean por regiones, que carecen de sintenia con las regiones correspondientes de bacterias estrechamente relacionadas, tales como *E. coli* K12, O157-H7 y UT189, *Klebsiella pneumoniae* MGH 78578 o *Citrobacter koseri* BAA-895, y que pueden haber sido adquiridas a través de transducción del fago. Estas regiones contienen genes importantes en interacciones de bacterias/plantas tales como aminoácidos y transportadores de hierro/sideróforos, hemolisina (HCP), y una proteína y transportador de hemaglutinina (Tabla 2, Figura 2). Hasta ahora, no se demostró experimentalmente la movilidad inter o extracelular de las islas genómicas, fagos y elementos IS.

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

35 En general, el álamo se multiplica por esquejes, y puesto que el número de endofitos en esquejes es muy bajo, muchas especies de bacterias endófitas tienen que sobrevivir en el suelo antes de la colonización de álamo. La *Enterobacter sp.* 638 se adapta bien para sobrevivir en la rizosfera de plantas, ya que codifica muchos transportadores implicados en carbohidratos de, aminoácidos y la absorción de hierro, así como algunos genes de resistencia a metales pesados. La mayoría de las rutas metabólicas descritas a continuación fueron confirmadas por el cultivo de la cepa 638 en condiciones de crecimiento selectivas (Taghavi et al. 2009).

Metabolismo de carbohidratos

45 El genoma de *Enterobacter sp.* 638 codifica todas las vías de metabolismo central, que incluyen el ciclo del ácido tricarbóxico, las rutas Entner-Doudoroff, EmbdenMeyerhof-Pamas y pentosa-fosfato. La cepa es incapaz de crecer fr forma autotrófica, pero puede utilizar 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 et al. 2009). La *Enterobacter sp.* 638 posee una lactasa (lacZ, Ent638_0928), una isomerasa de xilosa (Ent638_0156) y una xiluloquinasa (Ent638_0157). La utilización de lactosa como única fuente de carbono es una característica de la *Enterobacteriaceae*. La *Enterobacter sp.* 638 tiene la capacidad genética de crecer en malonato, su genoma contiene un grupo de nueve genes (*mdcABCDEFGHR*, Ent638_3779-Ent638_3772) que participan en la descarboxilación del malonato que cataliza la conversión de malonato en acetato.

La diversidad de utilización de azúcar podría estar relacionada con la diversidad de glicósido hidrolasas. El genoma de *Enterobacter sp.* 638 lleva 55 genes que codifican glicósido hidrolasas putativas, que representan 24 familias diferentes (base de datos CAZY). Por el contrario, también se debe mencionar que el patógeno *Enterobacter sakazakii* humano posee 63 glicósido hidrolasas (base de datos CAZY).

55 Las bacterias patógenas de plantas y la ganancia hongos acceden al degradar activamente los compuestos de pared celular de planta utilizando glicósido hidrolasas, que incluyen celulasas/endoglucanasas (que incluyen miembros de las familias de glicósido hidrolasa GH5, GH9, GH44, GH48 y GH74), lichenases (GH16) y xilanasas (GH10, GH11). Las hidrolasas sin glicósido que representan a los miembros putativos de las familias endo, exo,

celulasa y hemicelulasa comúnmente utilizadas para descomponer polímeros de la pared celular de plantas se codificaron en el genoma de *Enterobacter sp.* 638. Esta observación es consistente con el comportamiento no fitopatogénico de *Enterobacter sp.* 638. Sin embargo, hay que señalar que dos endo-1,4-D-gluconasas (GH8) (bcsZ: Ent638_3928, Ent638_3936) se encontraron como parte de un locus de síntesis de celulosa bacteriana.

5 Absorción de nutrientes de plantas

Los organismos que viven en asociación simbiótica, como *Enterobacter sp.* 638 y su anfitrión álamo, 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 permitan tomar los nutrientes liberados de las plantas. Un total de 631 ORFs codifican las proteínas transportadoras putativas: entre ellas 295 transportadores ABC codificados (que incluyen un transportador de fosfato), 81 transportadores codificados de la principal superfamilia facilitadora (MFS), 41 transportadores codificados de la familia de sistemas de fosfo transferasa (PTS) y 14 transportadores codificados de la familia de nodulación resistente y división celular (RNO) (véase la lista completa de los transportadores putativos y sus sustratos en SOM). Esta observación es consistente con el estilo de vida asociado a planta de *Enterobacter sp.* 638, que requiere absorción eficiente de los nutrientes sintetizados de plantas, que incluyen aquellos liberados en la rizosfera.

El genoma de *Enterobacter sp.* 638 codifica muchos transportistas PTS. Se utilizó el análisis filogenético para asignar la especificidad de sustrato a los transportadores PTS de *Enterobacter sp.* 638: 7 pertenecían a los α -glicósidos (para absorción de glucosa, N-acetilglucosamina, maltosa, glucosamina y α -glicósidos), 7 a los β -glicósidos (para absorción de sacarosa, trehalosa, ácido N-acetilmurámico y β -glicósidos), 2 eran transportadores PTS de fructosa (para absorción de l fructosa, manitol, manosa y D-glicerato de 2-O- α - manosilo) y 6 eran transportadores PTS de lactosa (para absorción de lactosa, celobiosa y beta-glicósidos aromáticos).

Resistencia a metales pesados

El genoma de *Enterobacter sp.* 638 lleva genes supuestamente implicados en la resistencia de cobre, que incluyen una ATPasa CopA de tipo P (Ent638_0962) cuya expresión está regulada por CueR (Ent638_09630), el operón de eflujo de cobre *cusABC* (Ent638_1157-1154), el CueO de oxidasa de cobre múltiple (Ent638_0671) y un operón que codifica las proteínas putativas de resistencia de cobre COPC y EPOC (Ent638_2411-12). Curiosamente, la cepa no logró crecer en medio mínimo de glucosa 284 en presencia de 100 μ M de $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$.

El genoma de *Enterobacter sp.* 638 también codifica un grupo de resistencia a arsénico/arseniato que se encontró contiguo al origen de replicación del plásmido pENT638-1 (arsHRBC, Ent638_4254-Ent638_4257), y se encontró que la cepa 638 era crece con éxito en medio mínimo de glucosa 284 en presencia de arseniato 200 μ M (como Na_2HAsO_4).

La presencia de genes de resistencia a arseniato y cobre putativo no es inesperada, ya que la *Enterobacter sp.* 638 se aisló a partir del álamo que crece en la zona que fue afectada por las emisiones la fundición ASARCO en Tacoma, WA, una fundición de cobre que durante las operaciones de 1905 a 1982 fue considerada como una de las mayores fuentes de emisión de arsénico en los EE.UU..

Otros genes de resistencia a metales pesados localizados en el cromosoma incluyen una reductasa cromato putativo (YieF o ChrR, Ent638_4144) y una ATPasa ZntA de eflujo tipo P (Ent638_3873) que participan en la resistencia de zinc/cadmio/cobalto. La cepa 638 fue capaz de crecer en medio mínimo de glucosa 284 en presencia de ZnSO_4 500 μ M, CdCl_2 500 μ M, CoCl_2 100 mM, y NiCl_2 50 mM. Aunque se podría argumentar que estos genes también están presentes en otras especies de *E. coli*, su presencia puede ser suficiente para proporcionar una ventaja selectiva sobre otras bacterias para sobrevivir en la rizosfera, especialmente cuando estos metales están presentes.

Los metales pesados también son cofactores importantes, y el genoma de *Enterobacter sp.* 638 codifica varios genes implicados en la absorción y eflujo de metales pesados. Se encontraron genes para transportadores ABC que participan en la absorción de zinc (*znuACB*, Ent638_2426-2428) y níquel (*nikABCDE*, Ent638_1834-Ent638_1838). El níquel es un cofactor esencial para la ureasa (Dosañh et al. 2007), y a diferencia de *E. coli* K12 y *S. proteamaculans* 568, *Enterobacter sp.* 638 es capaz de convertir la urea en amoníaco (*ureABC*, Ent638_3464-Ent638_3466).

Estrés oxidativo, que neutraliza el mecanismo de defensa de la planta

Las plantas utilizan una variedad de mecanismos de defensa contra infecciones bacterianas, víricas y fúngicas, que incluyen la producción de especies de oxígeno reactivas (ROS) (superóxido, radical de peróxido de hidrógeno hidroperóxido y especies de radicales hidroxilo), óxido nítrico y fitoalexinas. Antes de la colonización de raíz, la cepa 638 tiene que sobrevivir en un ambiente de rizosfera oxidativo. El cromosoma de *Enterobacter sp.* 638 codifica tres superóxido dismutasas: SodC, una superóxido dismutasa de Mn (Ent638_4063); SodB una superóxido dismutasa de Fe (Ent638_1191); y sodC, una superóxido dismutasa de Cu/Zn (Ent638_1801). También contiene tres catalasas, KatE (Ent638_1712), KatN (Ent638_3129) y KatG (Ent638_4032), tres hidroperóxido reductasas, *ahpC* (Ent638_0872 y Ent638_1145) y *ahpF* (Ent638_1146), dos hidroperóxido 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).

También se identificaron una proteína con resistencia a peróxido putativa orgánica (*ohr*, Ent638_0518) situada al lado de su sensor/regulador de peróxido orgánico (*ohrR*, Ent638_0519).

- 5 La *Enterobacter sp.* 638 parece capaz de desintoxicar óxido nítrico de radicales libres por la presencia dioxigenasa de óxido nítrico de flavohemoproteína (Ent638_3037) y un operón de reducción de nitrato anaeróbico (*norRVW*, Ent638_3181-3183). La expresión de los sistemas de respuesta a estrés oxidativo se controla a través de redes reguladoras complejas. Un regulador clave es sensor de peróxido de hidrógeno OxyR (Ent638_4025), que activa la expresión de un regulón de genes inducibles por peróxido de hidrógeno tales como *katG*, *gor* (glutación reductasa, Ent638_3913), *ahpC*, *ahpF*, *oxyS* (un ARN regulador, Ent638_mise ARN_29), *dpsA* (una protección del ADN durante proteína de privación, Ent638_1299), *fur* (un regulador transcripcional de unión a ADN doble de la biosíntesis y transporte de sideróforo, Ent638_1198) y *grxA* (glutarredoxina, Ent638_1364), todos los cuales están presentes en *Enterobacter sp.* 638. Tres genes de glutación S-transferasa (GST) (Ent638_0139, Ent638_0268 y Ent638_1329), una transportador ABC de glutación (GsiABCD, Ent638_1323-1326), dos glutación peroxidases (Ent638_1732 y Ent638_2699), una ligasa gamma-glutamato-cisteína (*GshA*, Ent638_3168), glutación 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 también fue identificado en el genoma de *Enterobacter sp.* 638.

Ejemplo 10: Colonización Endofítica y establecimiento en la planta anfitriona

- 20 La colonización endofítica de un anfitrión de planta se pueden dividir en un proceso de cuatro etapas (van der Lelie et al 2009.).

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

- 25 La *Enterobacter sp.* 638 está bien equipado para moverse activamente hacia las raíces de las plantas, el sitio preferido de la colonización endofítica. Su genoma contiene tres operones de biosíntesis flagelar (*figNMABCDEFGHIJKL*, *flhEAB fimA yraLJlpjD cheZYBR tap tar csuEDCAB int cheWA motBAf lhCDf liYZA fliCDSTFGHIJKLMNOPQR*, Ent638_2445-2541 y *fliEFHJKLMNOPQR*).

- 30 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 la adquisición posterior. La *Enterobacter sp.* 638 también tiene una gran cantidad de genes de biosíntesis de pilus/fimbrias (por lo menos 60 genes). En la *Enterobacter sp.* 638, los genes de biosíntesis de pilus/fimbrias se agrupan en 10 regiones distintas. También se descubrieron determinantes implicados en la quimiotaxis (*che*) dentro del grupo de genes de biosíntesis flagelar.

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

- 35 En la *Enterobacter sp.* 638, se identificaron diversos genes que codifican las proteínas implicadas en la adhesión putativa a la raíz. Muchos se encuentran en las islas genómicas o en el plásmido pENT638-1, que apunta hacia una función específica de este plásmido durante esta etapa de la colonización de las raíces de plantas. En particular, pENT638-1 contiene una isla putativa genómica de 23 kb (flanqueada por un gen de integrasa, y que tiene un % de GC de 56,2, que es significativamente mayor que el resto del plásmido), así como un operón *srfABC* putativo. La función exacta del operón *srfABC* aún no es clara, pero se considera que está involucrada en la colonización del anfitrión.

- 40 Muchos otros genes implicados en la invasión de plantas están presentes en pENT638-1, e incluyen proteínas putativas con un dominio autotransportador (tipo V de secreción) y un dominio de virulencia/adherencia (hemaglutinina (Ent638_4267), pertactina (Ent638_4201 y Ent638_4206) y adhesión (Ent638_4317)) (Figura 3).

- 45 Hemaglutinina: El cromosoma de *Enterobacter sp.* 638 codifica dos proteínas de hemaglutinina putativas (Ent638_0148, Ent638_3119), y un grupo compuesto de cinco genes que codifican la hemaglutinina filamentosa (Ent638_0052-0057).

Adicionalmente, se encontraron varios genes sobre el cromosoma de *Enterobacter sp.* 638 que codifican las proteínas autotransportadoras con un dominio de pectina liasa/pertactina (Ent638_1775, Ent638_0318, Ent638_0501), o un dominio de adhesión (Ent638_1867, Ent638_3408).

- 50 Los dos genes *yadA* de *Enterobacter sp.* 638 (Ent638_1867 y Ent638_4317) ambos codifican una proteína con un dominio autotransportador y un dominio de invasina/adhesión. La proteína *YadA* podría promover la colonización/invasión de plantas, pero también puede representar un remanente de un estilo de vida entérico antiguo.

El gen de hemaglutinina sobre pENT638-1 (Ent638_4267) está rodeado por dos sistemas de toxina RelBIE/anti-toxina. La hipótesis es que la hemaglutinina Ent63_4267 debe desempeñar una función importante en la adhesión

de raíz para ser estabilizada de esta manera sobre pENT638-1. Junto con el gen de hemaglutinina Ent638_4267, se identificaron dos genes (Ent638_4265-4266) que codifican una proteína que contiene un dominio de repetición de tetratricopéptido (TPR-2), supuestamente implicados en la interacción proteína-proteína y el montaje correcto del aparato de adhesión.

- 5 Pili Tipo I y IV: Seis proteínas indicadoras putativas se encontraron en el genoma de *Enterobacter sp.* 638 (Ent638_0084, Ent638_0403, Ent638_0990, Ent638_1071, Ent638_2450, y Ent638_2459). Esta cantidad es mucho mayor que la cantidad promedio de proteínas indicadoras encontradas en otros géneros de bacterias vegetales asociados.

- 10 En el cromosoma de *Enterobacter sp.* 638 se identificaron 56 genes implicados en la biosíntesis de pili/curli/fimbrias, que incluyen 6 grupos de genes de la biosíntesis de pili tipo I (Ent638_0074-0086, Ent638_0401-0409, Ent638_0987-0994, Ent638_1068-1072, Ent638_2448-2451, Ent638_2458-2462). Los dos últimos grupos se flanquean y separan por genes implicados en quimiotaxis y motilidad (biosíntesis flagelar) (véase sección motilidad), y están posiblemente involucrados en la formación de biopelículas sobre las superficies abióticas. Esta región (Ent638_2445-2541) representa un buen ejemplo de la agrupación de genes implicados en diferentes aspectos de la
15 colonización de raíces de planta (quimiotaxis, motilidad y adhesión).

Pili tipo IV. Sobre el genoma de *Enterobacter sp.* 638, se identificaron dos grupos de genes de biosíntesis de pili tipo IV, (Ent638_0650-0652, y Ent638_3266-3268), así como un grupo de genes de biosíntesis de pilus no caracterizados putativos (Ent638_3804 y Ent638_3808) que están posiblemente involucrados en la absorción de ADN.

- 20 Fibras Curli. Estructuralmente y bioquímicamente, el curli pertenece a una clase creciente de fibras conocidas como amiloides. Sobre el genoma de *Enterobacter sp.* 638, se identificó un grupo para la biosíntesis de curli (Ent638_1553-1559).

Biosíntesis de celulosa

- 25 De acuerdo con su comportamiento no patógeno el genoma de *Enterobacter sp.* 638 no codifica las proteínas implicadas en la degradación de celulosa. Sin embargo, se identificó un operón responsable de la biosíntesis de celulosa (Ent638_3927-3940).

Virulencia

Los estudios microscópicos mostraron que la *Enterobacter sp.* 638 coloniza el xilema de raíz entre el lumen de las lenticelas; no se observó ninguna colonización intracelular (Taghavi et al. 2009).

- 30 A pesar de que no se encontró que la *Enterobacter sp.* 638 actuara como un patógeno oportunista en los estudios de colonización de planta, sus códigos de genoma para diversas proteínas están implicados en la virulencia. Cabe señalar que la virulencia también puede requerir una estrecha interacción entre la bacteria y su anfitrión, similar a lo que puede ser necesario para la colonización endófito. Se identificaron un gen (*yqfA*, Ent638_3317) que codifica para una hemolisina de membrana interna (familia III), una CDS parcial (*went638_0251*) que contiene un dominio de
35 hemolisina putativo, y tres genes *hcp* que codifican factores de virulencia (Ent638_0829, Ent638_2912 y Ent638_3004).

- Otros factores de virulencia putativos incluyen *pagC* (Ent638_3136) y *msgA* (Ent638_1656), que son necesarios para la virulencia y supervivencia dentro de los macrófagos, y *virK* putativo; los genes (Ent638_1394 y Ent638_2409), cuyo producto es necesario para expresión y localización de la membrana correcta de VirG
40 (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 requisito previo para un estilo de vida activo virulento típico para patógenos tales como *Erwinia* y *P. syringae*, sobre el genoma de *Enterobacter sp.* 638.

- 45 Por último, similar al plásmido pENT638-1, un operón *srfABC* (Ent638_2108-Ent638_2110) fue encontrado en los cromosomas de *Enterobacter sp.* 638. La función de estos genes en el comportamiento endófito sigue sin estar clara.

Etapas 4: Invasión de la raíz y establecimiento de planta a través de colonización activa

- 50 La *Enterobacter sp.* 638 puede entrar en las raíces de las plantas en los sitios de daño de tejidos porque su secuencia de genoma no codifica endo/exo-celulasas o hemicelulasas que permitirían la colonización endófito a través de la descomposición activa de paredes celulares de la planta.

Degradación de pectina/pectato

Aunque la *Enterobacter sp.* 638 no es capaz de crecer sobre pectina (poli(1,4-alfa-D-galacturonato) como única fuente de carbono, su genoma contiene una isla genómica que codifica los genes implicados en la degradación de

pectato, la estructura principal desmetilada de pectina y un constituyente de la pared celular de la planta. La capacidad de *Enterobacter sp.* 638 para degradar pectato podría desempeñar una función en la colonización de la región interespacial entre células vegetales.

5 Una liasa pectato secretada, PelB, involucrada en la división de pectato en oligosacáridos con 4 grupos 4-desoxi-alfa-D-galact-enuronosilo en sus extremos no reductores se encontró al lado de una porina específica a oligogalacturonato, KdgM, implicada en la absorción de oligogalacturónidos en el periplasma. Una pectinasa periplásmica, PelX, codificada por una diferente región del genoma, está implicada en la degradación periplásmica de oligogalacturónidos.

10 En otra región, se identificaron un transportador ABC de absorción de carbohidratos, TogMNAB, involucrado en la translocación de oligogalacturónidos a través de la membrana interna y diversas proteínas adicionales, Ogl, Kdul y KduD, involucradas en la degradación de oligogalacturónidos en 2- deshidro-3-desoxi-D-gluconato. Los KdgK y KdgA implicados en el metabolismo de D-glucuronato, degradan adicionalmente 2-deshidro-3-desoxi-D-gluconato en piruvato y 3- fosfogliceraldehído, ambos compuestos del metabolismo celular general. Esta región, que está
15 flanqueado por una transposasa de la familia IS481, podría haber sido adquirida a través de transferencia de genes horizontal. Las proteínas UxaA, UxaB, y UxaC, necesarias para la ruta alternativa para degradar galacturonato en 2-deshidro-3-desoxi-D-gluconato, también están codificadas por el cromosoma de *Enterobacter sp.* 638. La degradación de pectato tiene que estar bien regulada con el fin de evitar un efecto patológico.

El plásmido pENT638-1 lleva dos genes vecinos (Ent638_4201, Ent638_4206) que codifican las proteínas autotransportadoras con un dominio de pectina liasa. Estas proteínas pueden estar implicadas en la adhesión de
20 *Enterobacter sp.* 638 a las raíces de álamo o como parte de un mecanismo de colonización que implica la exportación de enzimas capaces de lisar las paredes celulares de las células de la raíz. Entre estos dos genes, se identificaron dos reguladores transcripcionales componentes, lo que sugiere una estrecha regulación, así como dos genes adicionales implicados en la biosíntesis de polisacárido capsular (Ent638_4207) y la codificación de una glicosiltransferasa (Ent638_4208). Se ha planteado la hipótesis de que los lipopolisacáridos de la superficie celular
25 (LPS) están involucrados en la especificidad del anfitrión, y la proximidad de estos genes sugiere un papel de colaboración en la invasión de plantas por *Enterobacter sp.* 638.

La celobiosa fosforilasa del plásmido pENT638-1

Sobre el plásmido pENT638-1, el gen ndvB (8532 pb) situado próximo al origen del plásmido de replicación codifica una proteína implicada en la producción de β - (1->2)-glucano. La proteína NdvB unida a membrana cataliza tres
30 actividades enzimáticas: la iniciación (proteína de glicosilación), alargamiento, y ciclación in situ de β -(1->2)-glucano, que luego se libera en el periplasma.

Ejemplo 11: Interacciones sinérgicas con la planta anfitriona: salud y promoción de crecimiento de la planta

Efectos indirectos que promueven el crecimiento de plantas

Fijación de nitrógeno y metabolismo

35 La *Enterobacter sp.* 638 es incapaz de fijar el nitrógeno y carece de los genes nif requeridos. Sin embargo, contiene los genes necesarios para rutas de reducción de nitrato disimilatorias y asimilatorias. Los genes de transporte de nitrato y reducción de nitrato/nitrito están presentes dentro de los dos operones (*narI/JHGKXL* y *nasAB ntrCBA nasR*, Ent638_2312-Ent638_2326) separados por una integrasa y un gen de adhesión/invasión putativo. Otras regiones implicadas en el transporte y reducción de nitrito (*nirBDC*, Ent638_3793-3795), transporte y reducción de nitrato
40 (*narUZYWV*, Ent638_2061-Ent638_2065), y un transportador de absorción de amonio (*amtB*, Ent638_0919) y su regulador (Ent638_0918), así como la proteína de sensor de nitrato/nitrito (*narQ*, Ent638_2964) en su cromosoma.

Sideróforos

La *Enterobacter sp.* 638 ha desarrollado una solución intermedia para hacer frente a la absorción de hierro. Su genoma contiene dos sistemas de absorción de hierro ferroso (FeoAB, EfeUOB) y nueve transportadores ABC de
45 hierro.

La *Enterobacter sp.* 638 es capaz de sintetizar la enterobactina sideróforo ((EntD, EntF, EntC, EntE, EntB y EntA) para secretarla (EntS), para recuperar el complejo de hierro-enterobactina utilizando un sistema de absorción de sideróforo férrico (ExbDB), y extraer el hierro utilizando una esterasa enterobactina (Fes) después de la internalización del complejo de hierro-enterobactina. Los genes implicados en esta biosíntesis de enterobactina se
50 agrupan junto con genes que codifican dos transportadores ABC implicados en la absorción de hierro (*sitABCD* y *fepCGDB*) en un gran grupo de 17 genes (Ent638_1111-1128). Adicionalmente, la *Enterobacter sp.* 638 posee 12 receptores de sideróforos relacionados férricos y relacionados con férricos de la membrana externa (TonB dependiente), que es casi el doble de la cantidad encontrada en *E. coli* K12 (que sólo posee 7 receptores de sideróforos). Esta observación es consistente para una bacteria que tiene que competir por el hierro. Por lo tanto, la
55 presencia de un sistema de absorción de hierro eficiente puede contribuir a proteger a la planta anfitriona contra la infección fúngica.

Compuestos antimicrobianos

5 La *Enterobacter sp.* 638 mostró producir constitutivamente feniletanol. Esta molécula, que se utiliza comúnmente en perfumería, da un aroma floral agradable de *Enterobacter sp.* 638, pero más interesante tiene propiedades antimicrobianas. Dos genes candidatos (Ent638_1306 y Ent638_1876) codifican una enzima supuestamente implicada en la conversión de fenilacetaldehído en feniletanol. Estos dos genes se encuentran en las regiones no sintéticas con otras cepas estrechamente relacionadas.

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

10 El genoma de *Enterobacter sp.* 638 codifica una cloranfenicol acetiltransferasa (*cat*, Ent638_1533) implicada en resistencia al cloranfenicol y pueden ayudar a las bacterias a sobrevivir contra los compuestos antimicrobianos producidos por otros organismos endófitos o rizosféricos.

Ejemplo 12: Promoción del crecimiento de planta directo de promoción mediante *Enterobacter sp.* 638

1-aminociclopropano 1-carboxilato desaminasa

15 El 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) desaminasa (*acd*), (EC: 3.5.99.7) está ausente del genoma *Enterobacter* 638, lo que confirma los estudios anteriores de que la cepa es incapaz de metabolizar ACC (Taghavi et al. 2009). Sin embargo, se encontró que la desaminasa de aminoácidos, pero todos ellos carecen de aminoácidos particulares, E 296 y L 323 (sustituídos respectivamente por una T o S y una T) que se acercan al átomo de nitrógeno de piridina de PLP en el sitio activo.

20 Producción de las hormonas que promueven crecimiento de las raíces acetoína y 2,3-butanodiol

El genoma de *Enterobacter sp.* 638 lleva el gen *poxB* (Ent638_1387) que codifica una piruvato deshidrogenasa. Mientras que la función principal de *poxB* es convertir el piruvato en acetaldehído, una pequeña fracción del piruvato se convierte en acetoína, como un subproducto del intermedio de la reacción de difosfato hidroxietil-tiamina.

25 El genoma de *Enterobacter sp.* 638 codifica una acetolactato sintasa (*budB*, Ent638_2027) implicada en la conversión de piruvato en acetolactato. La descarboxilasa acetoína (*BudA*, Ent638_2026) cataliza la conversión de acetolactato en acetoína. La acetoína se puede liberar por las bacterias o posteriormente se convierte en 2,3-butanodiol mediante la reductasa acetoína (*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 se puede convertir en acetoína por la proteína deshidrogenasa acetoína (Ent638_2737).

30 La biosíntesis de compuestos volátiles mediante *Enterobacter sp.* 638 y su inducción mediante la adición de extractos de hojas de álamo se investigó mediante espectrometría de masas. La producción de 2,3-butanodiol y acetoína se observó en las muestras que contenían *Enterobacter sp.* 638 y extracto de hoja de álamo a partir de 12 horas después de inducción (Figura 8). Cabe señalar que la síntesis de diacetilo no pudo ser confirmada, pero es probable que se produzca sobre la base de la presencia de las rutas metabólicas completas para los tres compuestos. Se observaron picos adicionales tanto en las muestras experimentales y de control (6:42, 9:45, y 14:01) y se realiza actualmente la identificación de estos compuestos.

35 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 ningún efecto antagónico entre la producción y degradación de estas hormonas de crecimiento de plantas mediante *Enterobacter sp.* 638.

40 Producción de la hormona 1AA de crecimiento de plantas

45 La producción de ácido indol acético (IAA) por *Enterobacter sp.* 638 se demostró experimentalmente (Taghavi et al. 2009). La biosíntesis de IAA es probablemente a través de la producción de indolpiruvato como una molécula intermedia por la ruta de degradación de triptófano VII (aminotransferasa de aminoácidos aromáticos, Ent638_1447). La descarboxilasa indolpiruvato PIDC (Ent638_2923) y las deshidrogenasas indol-3-acetaldehído putativas (Ent638_0143) catalizan la síntesis adicional IAA.

TABLA 1

Rasgos	<i>Enterobacter sp.</i> 638	
	Cromosomas	Plásmido
tamaño (bp)	4, 518, 712	157, 749
contenido G+C	52,98	50,57
Números ORF	4406	152
función asignada (incluyendo putativa)	3457	108

ES 2 646 132 T3

Rasgos	<i>Enterobacter sp. 638</i>	
	Cromosomas	Plásmido
biosíntesis de aminoácidos	174	2
familia de aminoácidos aromáticos	28	0
Familia de aspartato	44	0
Familia de glutamato	47	1
Familia de piruvato	35	1
Familia de serina	21	0
Familia de histidina	11	0
Purinas, pirimidinas, nucleósidos y nucleótidos	93	0
ácido graso y metabolismo de fosfolípidos	71	0
Biosíntesis de cofactores, grupos prostéticos, y portadores	195	2
Metabolismo intermediario central	218	2
Metabolismo de energía	553	2
Transporte y proteínas de unión	631	3
Porcentaje de proteínas transportadoras	14 %	2 %
Familia ABC	293	2
Familia MFS	79	2
Familia PTS	41	0
Familia RND	14	0
Aminoácidos, péptidos y aminas	118	0
Aniones	20	0
Carbohidratos, alcoholes orgánicos, y ácidos	106	1
Cationes y compuestos que llevan hierro	109	1
Nucleósidos, purinas y pirimidinas	9	0
Porinas	18	0
Sustrato o fármaco desconocido	2	0
Metabolismo del ADN	152	4
Transcripción	281	4
Síntesis de proteína	177	0
Destino de proteína	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 plásmido	7	42
plásmido integrado putativo	1	0
Pareja de toxina/antitoxina	3	7
Funciones de profago	302	0
Regiones de fago	8	

Tabla 2

Región	desde	Ent638_	hasta	Ent638_8_	tamaño	ORFs	in trip	Repite en ext.	Pro-fago	tRNA	matriz de codón alternat.	Sintenia con K12	Sintenia con 342	Sintenia con 568
1	37506	0034	83855	0066	46349	35	-	+	-	tRNA-Sec	+	-	+/-(*)	+/-(*)
2	93676	0074	103614	0086	9938	13	-	-	-	-	-	-	-	-
3	124182	0108	132857	0114	8675	7	-	-	-	-	-	-	-	-
4	166637	0147	169882	0148	3345	3	-	-	-	-	-	-	-	-
5	205544	0179	212385	0183	6841	8	-	+	-	tRNA-Pro	-	-	-	-
6	332190	283	335579	286	3389	18	-	-	-	-	-	-	+	+
7	364148	0317	373015	0321	8867	5	-	+	-	tRNA-Phe	-	-	-	-
8	436726	0385	441887	0391	5171	7	-	-	-	-	-	-	-	-
9	454627	0401	464073	0410	9446	11	-	-	-	-	-	+/-	-	+
10	477929	0423	487952	0435	10023	12	-	-	-	-	-	-	+	+
11	523760	0463	573310	0506	49650	43	+	-	-	tRNA-Leu	+	-	-	-
12	642565	572	648283	576	5718	5	-	-	-	-	-	-	+	+/-
13	852653	0750	860429	0756	7776	7	-	-	-	tRNA-Asp	-	-	-	-
14a	875620	0770	912564	820	59647	50	+	+	Fago 1	tRNA-Thr	+	-	-	-
14b	912987	821	935287	0837		10								
15	1027052	0924	1042473	0937	15421	15	-	-	-	+	-	+/-	+	-
16a	1107864	0986	1154361	1055	46497	59	+	-	Fago 2	tRNA-Arg	+	-	-	-
16b	1154789	1056	1223024	1114	68235	58							+	+/-

Región	desde	Ent638_	hasta	Ent638_	tamaño	ORFs	in t	trp	Repite en ext.	Pro-fago	tRNA	matriz de codón alternat.	Sintenia con K12	Sintenia con 342	Sintenia con 568
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	tRNA(rydB)	+	-	-	-
22	1533390	1400	1544126	1406	10736	7	-	-	+	-	-	+	-	-	-
23	1636354	1484	1691939	1538	52585	29	-	-	+	-	tRNA-Ser	+/-	-	+/-(*)	-
24	1804662	1650	1812852	1661	8190	12	+	-	-	Fago 4	-	+	-	-	-(*)
25	1886255	1737	1892165	1742	5910	6	-	-	-	-	-	-	-	+	+
26	1929035	1775	1937050	1781	8015	7	-	-	-	-	tRNA-Val	-	-	+/-(*)	+/-(*)
27	2000083	1841	2001815	1843	1732	4	+	-	-	-	-	+	-	-	-
28	2015509	1868	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		24									
33	2540012	2320	2519110	2329	15098	10	+	-	+	-	-	-	-	+	+
34	2534142	2346	2547263	2356	13121	11	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Región	desde	Ent638_	hasta	Ent638_8_	tamaño	ORFs	int	trp	Repite en ext.	Pro-fago	tRNA	matriz de codón alternat.	Sintenia con K12	Sintenia con 342	Sintenia con 568
35	2652901	2458	2661174	2464	8273	7	+	-	+	-	-	-	-	-	+
36	2706828	2510	2720695	2521	13667	12	-	-	-	-	-	-	-	-	-
37a	2747355	2553	2783747	2578	36392	25							-	+	-
37b	2784850	2579	2824258	2626	39408	49	+	-	-	Fago 6	tRNA-Asn	+	-	-	-
38	2847062	2647	2851589	2650	4527	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-
39	2902276	2690	2935856	2719	33130	30	-	-	-	-	-	+	-	+/-(*)	+/-(*)
40	3125655	2887	3162212	2916	33557	30	+	-	-	-	IRNA-Avg	+	-	+	-
41	3236067	2980	3241398	2983	5331	4	-	+	-	-	-	-	-	-	-
42	3253890	2994	3259862	2997	5472	4	-	-	-	-	-	-	-	+	-
43a	3375316	3101	3420151	9112	3386099	11	+	-	-	Fago 7	tmRNA	+/-	-	-	-
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	+	-	-	-	IRNA-Gly	-	-	+	+/-(*)
48	3688251	3384	3715198	3408	26947	25	-	-	-	-	IRNA-Phe	-	-	-	-
49	3738015	3433	3750557	3442	12542	10	-	-	-	-	-	-	-	+/-(*)	-
50	3772076	3463	3777014	3469	4938	7	-	-	-	-	-	-	-	+	-
51a	3783633	3475	3814474	3514	30841	39	+	-	-	Fago 8	IRNA-Met	+	-	-	-

Región	desde	Ent638_	hasta	Ent638_	Ent638_	tamaño	ORFs	in t	trp	Repite en ext.	Pro-fago	tRNA	matriz de codón alternat.	Sintenia con K12	Sintenia con 342	Sintenia con 568
51b	3814471	3516	3832226	3530	17755	24								-	-	-
52	4069288	3771	4076336	3779	7048	9		-	-	-	-	-	-	-	+	-
53	4192504	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		-	-	-	-	-	-	-	+	-(*)

Tabla 2 (Continuación)

Región	Contenido génico	Presencia en (*)	Comentarios/observaciones adicionales
1	transportador para absorción de azúcar (familia lactosa PTS), Beta-glucosidasa (conversión de celobiosa en glucosa o glucósido en glucosa), hemaglutinina filamentosa, transportador (familia FMZ) hidrolasas dependientes de ZN predichas, ORF de función desconocida	Transportador para absorción de azúcar (familia lactosa PTS), Beta-glucosidasa (conversión de celobiosa en glucosa o glucósido en glucosa), hemaglutinina filamentosa	
2	Biosíntesis de fimbriae		
3	Membrana putativa - metal asociado – hidrolasa dependiente, glicosiltransferasa		dentro de un operón waa
4	Activación de hemolisina/secreción de proteína		
5	Rhs, unión de peptidoglicano (LysM), diversa duplicación parcial	Rhs	
6	Fructoquinasa, aldolasa bifosfato fructosa		delante de esta región un precursor de quinasa histidina híbrido de sensor de membrana integral está ausente del genoma K12
7	Quelación de níquel para absorción o uso como cofactor, autotransportador de membrana externa con factor de plegado/virulencia de pectina liasa		
8	Regulador, NADH-azoreductasa 2 dependiente de FMN, proteína de función desconocida, resistencia antibiótica		
9	Biosíntesis de fimbriae para adhesión/virulencia, genes duplicados		
10	Citocromo, regulador, función desconocida, dihidroorotasa (peptidasa), sintasa selenocisteína putativa L-seril-t-ARN(Ser) selenio transferasa (dependiente de piridoxal fosfato)		
11	Integrasa, proteína fago, reparación de ADN (proteínas Dnd), sistema de estabilización de plásmido, peptato liasa, porina específica de oligogalacturonato (Kdgm), proteasa, posible antioxidante, reguladores, autotransportador/hemaglutinina filamentosa/adesina, regulador, regulador transcripcional implicado en virulencia, sistema de secreción, posiblemente secreción de factor de virulencia		
12	Transportador de hidroximato hierro (familia MFS y ABC)		

Región	Contenido génico	Presencia en (*)	Comentarios/observaciones adicionales
13	Regulador, transportador ABC para aminoácidos		la síntesis se rompe, pero los genes de esta región están presentes en los genomas K12, 342 y 568
14a	Integrasa, proteína fago		
14b	Transducción con fago 1: hidrolasa alfa/beta, proteína fimbrial, transportador de aminoácidos, metiltransferasa, dos componentes sensor/regulador, permeasa, transportador S- metilmetionina, S-metilmetionina: homocisteína metil transferasa, proteína haemolisina coregulada (HCP), transportador ABC férrico (sintético con K12), integrasa		
15	Regulador, degradación de lactosa (sintético con K12), transducción de señal (dominio EAL), transportador (familia PTS beta-glucósido)		
16a	Integrasa fago, proteínas fago		
16b	Transducción con fago 2: receptor sideróforo dependiente de TonB putativo, transportador fenilalanina, nucleósido: Simportador H+, regulador transcripcional (LacI, XRE, TetR, LysR, GntR), permeasa (familia MFS), fimbriae, reductasa dihidropteridina, metalohidrolasa/oxidoreductasa, receptor sideroforo dependiente de ferricisobactina TonB, enterocherine esterasa, transportador ATPasa tipo P, transportador RND, subunidad grande ribosómica pseudouridina sintasa A, proteína de dominio de unión de ADN de choque frío putativo, receptor dependiente de TonB, transportador ABC para aminoácidos, N-acetiltransferasa relacionada con GCN5, transportador ABC para hierro quelado (SitABCD)		
17	Absorción de ribosa de transportador ABC, quinasa ribosa, metabolismo metionina		La región de flaqueo (Entf638_1145-1152) codifica reductasa hidropéroxido alquilo (subunidad F52a), peróxido cloruro, y ribonucleasa se encuentran en 342 pero no en 568 y parcialmente en el genoma K12
18	Degradación de histidina (hutIGCUH)		
19	Aldoeto-oxidoreductasa, hidrolasa glicósido (familia 1), transportador (familia de lactosa PTS/celobiosa, subunidad IIC), regulador transcripcional (GntR)		

Región	Contenido génico	Presencia en (*)	Comentarios/observaciones adicionales
20	Alfa-glucosidasas (familia 31 de glicosilhidrolasas), transportador hexuronato, regulador transcripcional de proteína/Laci de unión periplásmica		
21	4-O-acetilasa fucosa putativa y Acetiltransferasas relacionadas, proteínas fago, receptor sideroforo dependiente de TonB putativo	Sintasa fosfolípido-acil-graso-ciclopropano, amina oxidasa codificada en el genoma 342	
22	Proteína asociada crispr		
23	Sintetasa fosfolípido-acilo-graso-ciclopropano, amino oxidasa transportador(MFS), regulador transcripcional, Glicosiltransferasa, Aminopeptidasa metionina (MAP) (Peptidasa M), arilsulfatasa: metabolismo de azufre, ruta de degradación de pirimidina alternativa, autotransportador/hemaglutinina filamentososa/adhesina (fragmentos), transportasa IS (familia IS110), acetiltransferasa cloranfenicol (CAT), ruta de degradación de pirimidina alternativa		La ruta de degradación pirimidina está presente del genoma tres bacterias 342, 568 y K12. Junta esta región (Ent_ 1551-1562), 342 y 568 de una región de codificación para la producción de curli
24	Proteínas Fago	El gen (reguladores en ciclasa diguanilato) de la región 24 de flaqueo (Ent638_ 1658-1669) está ausentes en 568.	La región Ent638_ 1584-1597 implicada en la biosíntesis flagelar está ausente en 342 (figNMABCDEFHGHIJKL). Los genes Ent638_ 1688-1695 (Transferasa fosfatidilo, transportador de azufre tiosulfato ABC y transferasa de azufre tiosulfato) están ausentes del genoma 568.
25	Proteína de la familia del receptor hemo/hemoglobina dependiente de TonB para absorción de hierro		
26	Autotransportador para adhesión, sistema transportador ABC para absorción de aminoácidos/glutamina, Rhnsa dependiente de metal putativo, consiste de un dominio metalo-beta-lactamasa y un dominio KH de unión ARN, anhidrasa carbónica	El genoma de 342 y 568 tienen el sistema transportador ABC para los genes de absorción de aminoácidos/glutamina de esta región	
27	Integrasa fago (fragmento), fago incompleto insertado en un sensor/regulador de dos componentes (RstAB)		

Región	Contenido génico	Presencia en (*)	Comentarios/observaciones adicionales
28	Quimiotaxis/movilidad?, Proteína de autotransportador de tipo adhesina/invasina (YadA), biosíntesis de antibióticos, modulación de sistema de flujo RND, biosíntesis de antibióticos?, resistencia de fármaco de sistema de flujo RND, función desconocida pero pequeña lectina leguma posible, dominio beta para adhesión, transportador MFS, lisofosfolipasa, coagulasafibrinolisisina, regulador fago, respuesta SOS		
29	Transportador RND, Acetiltransferasa peptina, Muchos genes implicados en el transporte de aminoácidos, muchos reguladores transcripcionales, acetiltransferasa IAA putativa, utilización de sacarosa/fructosa con PTS de la familia beta-glc, síntesis de acetoina, isomerasa disulfuro periplásmica/oxidasa tioldisulfuro (DsbG), despolimerización de alginatos, muchos transportadores y muchos reguladores	Posiblemente no una isla si no adquisición de muchos genes (en comparación con k12) durante evolución Endófitica	Sintenia discontinua: Delimitación no clara de la región
30	Transportador ABC de glutamato, transportador ABC de aminoácidos, quimiotaxis: aerotaxis	Posiblemente no una isla si no adquisición de muchos genes (en comparación con k12) durante evolución Endófitica	
31	Proteína SrfA de virulencia sintasa metionina, poligalacturonasa, liasa pectato (secretada), condroitina AC, alginato liasa, junto con liasa pectato importante para colonización (secretada), hidrolasa putativa (secretada), regulador transcripcional, Quimiotaxis: aerotaxis	Presencia de genes srlABC en el genoma 568	
32a	Fago, integrasa fago		
32b	Transducción con fago 6: N- acetiltransferasa relacionada con GCN5, regulador transcripcional (TetR), reductasa N-etilmaleimida, oxidoreductasa, permeasa/ transportador, deshidrogenasa, proteína de separación intracelular putativa implicada en división celular, hidrolasa, extensión de membrana TonB, 2-deshidropantecoato, fármaco putativo/portador de metabolitos (familia DMT)		
33	Integrasa, nitrato reductasa (NasA), nitrato reductasa (NasB), transportador de nitrato (NrtCBA), región flanqueada por el operón nar implicado en la reducción de nitratos y el transporte de nitratos/nitrato		Presencia de la región completa excepto la región integrada

Región	Contenido génico	Presencia en (*)	Comentarios/observaciones adicionales
34	Oxidoreductasa, transportadora ABC de aminoácidos, eflujo de ribonucleasa purina, trealasa (degradación de trealosa), sideróforo dependiente de TonB		
35	Integrasa, fimbria/pili (ubicado junto a los genes de quimiotaxis y genes de fimbria)	342 también carece de región flanqueo que codifica genes implicados de la biosíntesis fimbrial	Los genomas 568 carecen de la región Ent638_2477-2490 que codifica genes para una proteasa/amilasa intracelular, una proteína similar ferritina, un transportador C4-dicarboxilato anaeróbico, un transportador (familia MFS), una galactosa isomerasa/ribosa putativa, una fosfohidrolasa dependiente de metal putativo, otra proteína de almacenamiento de hierro ferritina, un transportador tirosina y diversas proteínas conservadas de función desconocida. Algunos de estos agentes también están presentes en K12
36	Acil-CoA reductasa (LuxC) y acilo-proteína sintetasa (LuxE) que son sustratos para la producción liviana de luciferasa, transketolasa, biosíntesis de ácidos grasos	Junto a la región grande de flagelos que codifican genes fli que faltan en 342	
37a	Transducción con fago 7: proteína de membrana externa ácido N, N-acetilmurámico 6-fosfatoeterasa, sensor/regulador de dos componentes, tiamina de biosíntesis de lipoproteína, Oxidoreductasa NADH putativo: oxidoreductasa flavina transportador tartrato, fumarato hidratasa clase I anaeróbica, reguladores (para biosíntesis de cisteína y asimilación de nitrógeno, ATPasa tipo P1, proteína G de estrés universal, transportador (RND), acetiltransferasa putativa, transferasa palmitoilo para lípido A, transportador shikimate, nucleosidasa AMP, aminopeptidasa P, cuatro locus tRNA-Asn, inhibidor ADN girasa D-alanil-D-alanina carboxipeptidasa		
37b	Integrasa fago, proteínas fago	Transducción con el fago?	
38	Biosíntesis LPS		La mayor parte de la región de flanqueo de Ent638_2645 a Ent638_2672 implicada en biosíntesis LPS ausente en los genomas 342 y 568 pero presente en K12

Región	Contenido génico	Presencia en (*)	Comentarios/observaciones adicionales
39	Peroxidasa glutatona, fosforilación de lípido, transportador ABC de aminoácidos, catabolismo de diaminobutirato, tirosina quinasa, fosfatasa	Presencia de transportador ABC de aminoácidos catabolismo en los genomas 342_y568	
40	Plásmido integrado putativo: Integrasa, fago, función de plásmido, integrasa fago, reorganización de superficie que resulta en aumento de adherencia y aumento de frecuencia de conjugación	Plásmido integrado putativo	
41	Transposasa (IS481), transportador (familia lactosa PTS), asparaginsa, amidopeptidasa leucilo		
42	Regulador transcripcional, transportador MFS, beta-xilosidasa, transportador Xilosida		
43a	Integrasa fago, endonucleasa, proteína fago (fago incompleto)		
43b	Transducción con fago 8: Quinasa, factor sigma/antisigma, proteína hemaglutinina/hemolisina putativa, transportador de hemaglutinina (proteína de membrana externa, permeasa ABC, MFP), transaminasa 2-aminoacipato putativa, rpoS catalasa dependiente de (KatN) que contiene manganeso sin haemo, oxidasa ubiquinol bd citocromo, subunidad I y II, proteína A inducible de daño de competencia, proteína de membrana de virulencia (PagC), regulador transcripcional (LysR), deshidrogenasa/reductasa de cadena corta, metil transferasa tipo 11, desaminasa/amidohidrolasa putativa con dominio hidrolasa metalodependiente, quinasa carbonato putativa, permeasa/xantina/uracilo/vitaminaC, regulador transcripcional de unión de ADN putativo	El gen codifica catalasa que contiene manganeso sin haemo dependiente de rpoS (KatN), ubiquinol oxidasa bd citocromo, subunidad I y II, proteína A inducible de daño de competencia están presentes en el genoma 342	
44	Transportador ABC		
45	Transportador ABC implicado en transporte de Fe3+ (EitABCD)		
46	GCN4-N-acetiltransferasa, regulador transcripcional, 6-P-beta-glucidasa, transportador (familia PTS, lactosa, celobiosa), regulador similar a lacI		
47	Proteína de dregadación pectina, familia IS481 transposasa, transportador ABC (posiblemente para azúcar con una especialización en transporte de pectina) (TogMNAB), degradación de pectina, precursor porina específico de oligogalacturonato (producto de degradación de pectina), regulador	Excepto los genes Ent638_3288: elemento IS (familia IS481) y Ent638_3293 que codifica liasa oligogalacturonida. El genoma de 568 no codifica las proteínas implicadas en la degradación de pectina	

Región	Contenido génico	Presencia en (*)	Comentarios/observaciones adicionales
48	Autotransportador con dominio de adhesión, antioxidante, transportador ABC de molibdeno, proteína de transporte ABC de hierro, componente de unión periplásmico, canal de iones mecanosensibles, regulador de quimiotaxis, autotransportador con un dominio de adhesina rico en serina		
49	Transportador de azúcar (MFS), proteína de unión de compuesto de hierro de la familia transportadora ABC, componente periplásmico (transportador enterobactina de hierro), receptor sideróforo dependiente de TonB	Genoma 342 carece de Ent638_3433-3436 (hidrolasa glucurilino insaturada, oligosacárido/symporter H+, una proteína conservada de función desconocida y un regulador transcripcional (familia AraC))	
50	Ureasa (ureDABCEFG)		
51a	Integrasa fago, proteínas fago (conservadas en K. pneumoniae, E. coli UT189)	Algunos de los genes fago son sintéticos con 568	
51b	Transducción con fago 9: fosfatidilglicerol-membrana-oligosacárido glicerofosfortransferasa, reguladores transcripcionales (LysR, TetR, XRE), metalo hidrolasa, endoribonucleasa mARN putativa, proteína de choque térmico (DnaJ) sideróforo, transductor de señal fusionada para aerotaxi sensorial, putrescina: 2-aminotransferasa de ácido oxoglutarico		
52	Maltosa (genes mdc), transportador maltonato (familia de portador de flujo auxina) (MdcF)		Ent638_3662: transportador de ácido salicílico, N-acetilmanosamida quinasa y N-acetilneuraminata liasa putativas y el regulador (nanKTAR) están ausentes en ek_genoma de 342 y 568

ES 2 646 132 T3

Región	Contenido génico	Presencia en (*)	Comentarios/observaciones adicionales
53	Biosíntesis de ácidos grasos	Excepto los genes Ent638_3900-3905 que codifican una transferasa 4'-fosfopanteteinilo (acpT), una deshidrogenasa/reductasa SDR precursora de cadena corta, un precursor de proteína NLP/P60 (similar a hidrolasas asociadas con pared celular putativa) proteínas asociadas con invasión), una hidrolasa de superfamilia HAD, subfamilia IB (similar a PSPasa), una proteína de resistencia de teluro (terC) y una proteína de transporte 2 de iones	
54	Biosíntesis de celulosa (bcsZDCBA)		
55	Transportador (familia PTS beta-glucósido)		
56	Transportador ABS ribosa, operón rafinosa (transporte/utilización)	Adicionalmente, 568 carece de la región de flaqueo Ent638_4064-4070 que codifica el rhaTRSBADBA (L-ramnosa:symporter de protones, activador transcripcional de unión de ADN, unión de L-ramnosa, activador transcripcional de unión de ADN, unión de L-ramnosa, ramnonuquinasa, isomerasa L-ramnosa, aldolasa ramnulosa -1-fosfato, transportador ABC D-ribosa precursor de proteína de unión ramnosa periplásmica, proteína rbsA 1 de unión ATP de importación ribosa	

5 Las coordenadas dadas son aquellas de los genes, no aquellas de la repetición del organismo del fago utilizado para la comparación: *K. pneumoniae* MGH78578, *E. coli* K12, 0157-H7, UTI89, *C. koseri* BAA-895 En comparación con 568 y 342, K12 y 638 tienen los operones: porinas y lipoproteínas 0231-0234;

TABLA S1 (CEBADORES)

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

ES 2 646 132 T3

Ent638_4249	repAr	GCAGTCGCTCATCAGCTTGA	59
Ent638_R0104	16S	AGTGATTGACGTTACTCGCAGAAG	59
Ent638_R0104	16Sr	TTTACGCCCAGTAATTCCGATT	59

Tabla S4 Micromatrices

SEQ_ID	Cambio de veces (Rico/Pobre)	Valor P (FDR)	Estadística T	Función	COGclas SID	Descripción de clase
Ent638_0190	2,127	0,0263	10,447	factorEF-Tude alargamiento de cadena de proteina(duplicado de tufA)	J	Traducción, estructura ribosómica y biogénesis
Ent638_0194	2,453	0,0257	11,518	Proteina L1 de subunidad ribosómica 50S	J	Traducción, estructura ribosómica y biogénesis
Ent638_0195	3,1	0,0837	3,807	Proteina L10 de subunidad ribosómica 50S	J	Traducción, estructura ribosómica y biogénesis
Ent638_0197	2,372	0,0269	10,192	Polimerasa de ARN subunidad beta	K	Transcripción
Ent638_0200	2,687	0,0242	13,404	Sistema de fosfotransferasa, subunidad IIB específica de lactosa/celobiosa	G	Metabolismo y transporte de carbohidratos
Ent638_0213	3,284	0,133	2,85	HU, regulador transcripcional de unión de AD, subunidad alfa	T	Mecanismo de transducción de señal
Ent638_0238	2,351	0,0202	17,811	Subunidad transportador maltosa; componente de unión periplasmico de superfamilia ABC	G	Metabolismo y transporte de carbohidratos
Ent638_0241	6,748	0,00954	58,758	Porina de membrana externa maltosa (maltoporina)	G	Metabolismo y transporte de carbohidratos
Ent638_0285	2,719	0,0369	7,441	aldosa 1de Fructosa-bifosfato	G	Metabolismo y transporte de carbohidratos
Ent638_0286	2,061	0,0767	4,042	sistema de transporte azúcar tipo ABC Putativo, componente auxiliar	R	Solamente predicción de función general
Ent638_0287	4,625	0,0166	22,815	Proteina de unión ribosa periplasmica del sistema de transporte ABC	G	Metabolismo y transporte de carbohidratos
Ent638_0326	8,129	0,018	35,517	amonialiasa aspartato	C; E	Producción y conservación de energía; metabolismo y transporte de aminoácidos
Ent638_0449	3,34	0,066	4,515	precursor de portador anaeróbico C4-dicarboxilato Putativo	R	Solamente predicción de función general
Ent638_0450	3,464	0,0439	6,095	carbamoiltransferasa 1 Ornitinea (OTCasa 1)	F	Metabolismo y transporte de Nucleótidos
Ent638_0451	4,851	0,0779	4,01	Quinasa Carbamato	E	Metabolismo y transporte de aminoácidos
Ent638_0452	4,792	0,0298	9,144	Arginina (AD1) (dihidrolasa Arginina) (AD)	E	Metabolismo y transporte de aminoácidos
Ent638_0641	2,63	0,0294	9,327	Proteina de división celular similar a tubulina de unión GTP	D	Control de ciclo celular, división celular, particionamiento de cromosoma
Ent638_0660	3,804	0,0179	29,044	deshidrogenasa piruvato, componente E1, descarboxilasa, unión tiamina	C; G	Conversión y producción de energía; metabolismo y transporte de carbohidratos

SEQ_ID	Cambio de veces (Rico/Pobre)	Valor P (FDR)	Estadística T	Función	COGclas sid	Descripción de clase
Ent638_0662	4,208	0,000915	219,599	Deshidrogenasa lipoamida componente E3, hace parte de los tres complejos de enzima	C	Conversión y producción de energía
Ent638_0665	3,576	0,0247	13,073	Hidratasa 2 aconitato bifuncional y deshidratasa 2- metiliscitrato	C;E	Conversión y producción de energía; Metabolismo y transporte de aminoácidos
Ent638_0685	2,019	0,0799	3,932	Regulador de transcripción de unión de ADN de transcripción de ARN, proteína supresora DnaK	T	Mecanismo de transducción de señal
Ent638_0716	2,254	0,0262	10,425	Chaperon periplasmico	M	Biogenia de pared celular/ /membrana/envoltura
Ent638_0759	2,044	0,0348	7,757	isomerasa 7-fosfato D-sedoheptulosa	G;M	Metabolismo y transporte de carbohidratos; Biogenia de pared celular/ /membrana/envoltura
Ent638_0896	2,304	0,0289	9,511	Subunidad IV de oxidasa ubiquinol o citocromo	C	Conversión y producción de energía
Ent638_0897	3,49	0,0506	5,52	Subunidad III de oxidasa ubiquinol o citocromo	C	Conversión y producción de energía
Ent638_0898	2,487	0,103	3,372	Subunidad I de oxidasa ubiquinol o citocromo	C	Conversión y producción de energía
Ent638_0899	3,03	0,0151	27,174	Subunidad II de oxidasa ubiquinol o citocromo	C	Conversión y producción de energía
Ent638_0903	2,094	0,00815	50,908	cis/trans isomerasa de peptidil-prolilo (factor activador)	O	Modificación Posttransduccional, recambio de proteína, chaperones
Ent638_0987	2,028	0,024	12,433	proteína fimbrial Tipo-1, precursor de cadena A (pilina 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 familia G-D-S-L	R	Solamente predicción de función general
Ent638_1182	3,201	0,0161	24,254	Subunidad transportadora de aspartato y glutamato; componente de unión periplasmico de superfamilia ABC	E; T	Metabolismo y transporte de aminoácidos, mecanismos de transducción de señal
Ent638_1204	2,631	0,0184	20,459	Simportador de putrescina/protón: antiporter de putrescina/ornitina	E	Metabolismo y transporte de aminoácidos,
Ent638_1205	4,027	0,0258	10,764	isosima decarboxilasa ornitina, inducible	E	Metabolismo y transporte de aminoácidos,
Ent638_1221	2,03	0,0244	12,635	Sintasa citrato	C	Conversión y producción de energía
Ent638_1224	2,59	0,024	12,596	deshidrogenasa succinato, subunidad de flavoproteína	C	Conversión y producción de energía

SEQ_ID	Cambio de veces (Rico/Pobre)	Valor P (FDR)	Estadística T	Función	COGclias sid	Descripción de clase
Ent638_1226	5,448	0,0244	13,456	descarboxilasa 2-oxoglutarato, que requiere tiamina	C	Conversión y producción de energía
Ent638_1227	4,206	0,0309	8,724	dihidrolipoiltranssuccinasa	C; I	Conversión y producción de energía; Metabolismo y transporte y lípidos
Ent638_1228	2,918	0,0417	6,508	sintetasa succinil-CoA, subunidad beta	C	Conversión y producción de energía
Ent638_1229	4,423	0,0171	23,421	sintetasa succinil-CoA, unión NAD(P), subunidad alfa	C	Conversión y producción de energía
Ent638_1231	2,735	0,0329	8,087	oxidasa de terminal d de citocromo, subunidad II	C	Conversión y producción de energía
Ent638_1263	3,27	0,116	3,114	hidratasa Urocanato (Urocanasa) (hidrolasa Imidazolonepropionato)	C	Conversión y producción de energía
Ent638_1298	2,106	0,0633	4,648	Subunidad de transportador de glutamina; componente de unión periplasmico de la superfamilia ABC	E; T	Metabolismo y transporte de aminoácidos; mecanismos de transducción de señal
Ent638_1338	-3,102	0,0533	-5,307	4-O-acetilasa Fucosa Putativa y acetiltransferasas relacionadas	G	Metabolismo y transporte de carbohidratos
Ent638_1341	-2,111	0,0583	-4,928	proteína exportada de fago hipotético conservada de función desconocida	D; L; N; T	Control de ciclo celular, división celular, posicionamiento de cromosoma; replicación, recombinación y reparación; motilidad celular; mecanismos de transducción de señal
Ent638_1430	2,324	0,0436	6,138	proteína S1 de subunidad ribosómica 30S	J	Traducción de estructura ribosómica, y biogénesis
Ent638_1469	2,039	0,0254	11,293	proteína A de membrana externa (3a,II*;G;d)	M	Biogenia de Pared celular /membrana/envoltura
Ent638_1490	3,067	0,15	2,63	Oxidoreductasa putativa, deshidrogenasa de cadena corta/familia reductasa	R	Solamente predicción de función general
Ent638_1499	-2,164	0,0429	-6,238	Glicosiltransferasa	G	Metabolismo y transporte de carbohidratos
Ent638_1514	3,223	0,0191	19,678	Fosfatasa glucosa-1-fosfatasa/inositol	G	Metabolismo y transporte de carbohidratos
Ent638_1526	-2,828	0,0203	-18,472	Proteína de autotransportador putativo (fragmento)	U	Trafico intracelular, secreción, y de transporte vesicular
Ent638_1587	3,209	0,0163	22,337	Componente flagelar de parte proximal celular de barra de cuerpo basal	N	Motilidad celular
Ent638_1588	5,216	0,0263	10,4	Componente flagelar de parte proximal celular de barra de cuerpo basal	N	Motilidad celular
Ent638_1589	3,559	0,0167	24,377	Proteína de ensamble de gancho flagelar	N	Motilidad celular

SEQ_ID	Cambio de veces (Rico/Pobre)	Valor P (FDR)	Estadística T	Función	COGclas SID	Descripción de clase
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 parte proximal celular de barra de cuerpo basal	N	Motilidad celular
Ent638_1596	2,019	0,149	2,64	Proteína 1 de unión de filamento de gancho flagelar	N; T	Motilidad celular; mecanismos de transducción de señal
Ent638_1597	2,902	0,0555	5,128	Proteína de unión de filamento de gancho flagelar	N	Motilidad celular
Ent638_1656	-2,303	0,0245	-12,219	msgA de proteína de Virulencia	R	Solamente predicción de función general
Ent638_1657	-2,183	0,0554	-5,161	Transductor sensorial de quimiotaxis que acepta metilo	N; T	Motilidad celular; mecanismos de transducción de señal
Ent638_1724	2,288	0,0974	3,474	Sintetasa treonilo-tARN	J	Traducción, estructura ribosómica y biogenia
Ent638_1725	2,256	0,111	3,214	Factor 3 de iniciación de traducción bacteriana (BIF-3)	J	Traducción, estructura ribosómica y biogenia
Ent638_1750	2,083	0,0467	5,875	Deshidrogenasa formiato, inducible por nitrato, subunidad principal	C	Conversión y producción 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 periplásmico de la superfamilia ABC	P	Metabolismo y transporte de iones inorgánicos
Ent638_1804	-2,004	0,0317	-8,356	Proteína conservada de función desconocida	S	Función desconocida
Ent638_1841	-2,107	0,0415	-6,448	Integrasa Rac de profago lambdaoide putativo (fragmento)	L	Replicación, recombinación y reparación
Ent638_1856	-2,048	0,0317	-8,405	Fragmento de regulador transcripcional de unión de ADN (parte 2)	T	Mecanismos de transducción de señal
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 de proteína de choque ácido	R	Solamente predicción de función general
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	Isomerasa disulfuro periplásmico/tiodisulfuro oxidasa	O	Modificación postraducciona, recambio de proteína, chaperones
Ent638_2051	-2,094	0,0432	-6,201	Quinasa polifosfato putativa	F	Metabolismo y transporte de nucleótidos
Ent638_2057	2,542	0,0477	5,757	Proteína porina de membrana externa	M	Biogenia de pared celular /membrana/envoltura
Ent638_2166	-2,293	0,0395	-6,835	Proteína de choque fago de membrana interna periférica	R	Solamente predicción de función general

SEQ_ID	Cambio de veces (Rico/Pobre)	Valor P (FDR)	Estadística T	Función	COGclas sID	Descripción de clase
Ent638_2_210	-2,647	0,0248	-11,137	Fragmento de proteína conservada de función desconocida (parte 2)	S	Función desconocida
Ent638_2_218	-2,072	0,0248	-11,07	Proteína fago	-	-
Ent638_2_221	-2,12	0,0237	-14,041	Lipoproteína de fago putativa	-	-
Ent638_2_243	-2,466	0,0268	-10,246	Proteína conservada de función desconocida	S	Función desconocida
Ent638_2_246	-2,359	0,0353	-7,673	Proteína hipotética de función desconocida	S	Función desconocida
Ent638_2_250	-2,339	0,0879	-3,692	Proteína de dominio N-4/N-6 metilasa de ADN fago	L	Replicación, recombinación y reparación
Ent638_2_256	-3,509	0,0169	-23,668	Proteína I inducible de daño de AND fago	-	-
Ent638_2_269	-2,086	0,0247	-13,482	Integrasa lambda profago (Int(Lambda)) (integrasa e14 Profago)	L	Replicación, recombinación y reparación
Ent638_2_281	-2,145	0,024	-12,802	Deshidrogenasa alcohol, proteína de dominio de unión de zinc	C	Conversión y producción de energía
Ent638_2_282	-2,245	0,0189	-19,648	Proteína de membrana conservada de función desconocida	S	Función desconocida
Ent638_2_302	3,151	0,0753	4,113	Subunidad de transportador de oligopéptidos; componente de unión periplásmico de la superfamilia ABC	E	Metabolismo y transporte de aminoácidos
Ent638_2_303	-2,254	0,0545	-5,217	Proteína de membrana conservada de función desconocida	S	Función desconocida
Ent638_2_306	-2,221	0,0312	-8,509	Regulador H-NS dual transcripcional de unión de ácido nucleico global	R	Solamente predicción de función general
Ent638_2_313	3,051	0,199	2,167	Subunidad de chaperon de ensamblaje cofactor-molibdeno (subunidad delta) de reductasa 1 nitrato	O	Modificación postraducciona, recambio de proteína, chaperones
Ent638_2_314	6,367	0,0415	6,486	Reductasa 1 nitrato, subunidad beta (Fe-S)	C	Conversión y producción de energía
Ent638_2_315	7,849	0,0258	11,405	Reductasa 1 nitrato, subunidad alfa	C	Conversión y producción de energía
Ent638_2_387	2,074	0,0294	9,374	Componente IIC de enzima específico de manosa de PTS	G	Metabolismo y transporte de carbohidratos
Ent638_2_465	2,693	0,0548	5,199	Proteína de quimiotaxis de unión de purina	N; T	Motilidad celular; mecanismos de transducción de señal
Ent638_2_466	3,068	0,13	2,89	Histidina quinasa sensorial quimiotáctica funcionada en Sistema regulador de dos componentes con CheB y CheY	T	Mecanismos de transducción de señal
Ent638_2_497	-2,021	0,0643	-4,597	cspB de proteína similar a choque frío (CSP-B)	K	Transcripción
Ent638_2_502	-2,125	0,0174	-28,928	Proteína conservada de función desconocida	S	Función desconocida
Ent638_2_508	2,655	0,0579	4,969	Regulador putativo de actividad FilA	T	Mecanismos de transducción de señal

SEQ_ID	Cambio de veces (Rico/Pobre)	Valor P (FDR)	Estadística T	Función	COGclas SID	Descripción de clase
Ent638_2_509	2,86	0,13	2,882	Polimerasa de ARN, factor sigma 28 (sigma F)	J	traducción, estructura ribosómica y biogénesis
Ent638_2_522	6,843	0,0198	18,732	Proteína estructural de filamento flagelar (flagelina)	N; T	Motilidad celular; Mecanismos de transducción de señal
Ent638_2_523	5,717	0,0572	5,012	Proteína de tapa de filamento flagelar	N	Motilidad celular
Ent638_2_524	3,188	0,0406	6,71	Polimerización de potenciación de proteína flagelar	N; O; U	posttraduccional, recambio de proteína, chaperones; tráfico intracelular, secreción, y transporte vesicular
Ent638_2_533	2,468	0,0388	6,904	Proteína flagelar	N; O; U	Motilidad celular; modificación posttraduccional, recambio de proteína, chaperones; tráfico intracelular, secreción, y transporte vesicular
Ent638_2_534	2,802	0,0365	7,502	Proteína de control de longitud de gancho flagelar	C; N	Conversión y producción de energía and; Motilidad celular
Ent638_2_542	-3,17	0,0476	-5,778	Activador transcripcional de unión de ADN, corregulador con RcsB	K; T	Transcripción; Mecanismos de transducción de señal
Ent638_2_543	-2,171	0,0152	-27,401	Proteína conservada de función desconocida	S	Función desconocida
Ent638_2_579	-2,28	0,0234	-14,287	Colicina putativa	N; T; U	Motilidad celular; Mecanismos de transducción de señal; tráfico intracelular, secreción, y transporte vesicular
Ent638_2_610	-2,258	0,0263	-10,572	Proteína de lisis S putativa; profago Qin	-	-
Ent638_2_626	-2,122	0,068	-4,409	Proteína de la familia integrasa fago	L	Replicación, recombinación y reparación
Ent638_2_651	-2,429	0,0329	-8,064	dTDP-4-desoxitramnosa-3,5-epimerasa	M	Biogénesis de pared celular/membrana/envoltura
Ent638_2_750	4,192	0,0223	16,152	Subunidad de transportador de metil-galactosida; componente de unión periplásmico de la superfamilia ABC	G	Metabolismo y transporte de carbohidratos
Ent638_2_795	2,662	0,031	8,549	Proteína C de porina de membrana externa	M	Pared celular; membrana; biogénesis de envoltura
Ent638_2_828	2,486	0,0284	9,737	NADH: oxidoreductasa ubiquinona, cadena F	C	Conversión y producción de energía
Ent638_2_837	2,01	0,0286	9,639	Fosfatasa putativa	R	Solamente predicción de función general
Ent638_2_904	-2,736	0,0284	-9,812	Regulador transcripcional fago, AlpA	K	Transcripción
Ent638_2_958	3,828	0,0373	7,411	Oxidoreductasa de enzima mállica fusionada putativa; fosfoacetilasa	C	Conversión y producción de energía
Ent638_3_059	4,692	0,0372	7,409	factor anti-sigma	T	Mecanismos de transducción de señal

SEQ_ID	Cambio de veces (Rico/ Pobre)	Valor P (FDR)	Estadística T	Función	COGclas sid	Descripción de clase
Ent638_3_076	2,493	0,0411	6,566	Proteína de choque frío asociada con subunidad ribosómica 30S	J	Traducción, estructura ribosómica y biogenia
Ent638_3_088	3,12	0,0387	6,942	tARN (guanina-1-)-metiltransferasa	J	Traducción, estructura ribosómica y biogenia
Ent638_3_112	-2,019	0,0814	-3,876	Proteína conservada de función desconocida	S	Función desconocida
Ent638_3_127	-2,428	0,0452	-5,987	Proteína conservada de función desconocida	S	Función desconocida
Ent638_3_133	-2,01	0,08	-3,929	Proteína conservada de función desconocida	S	Función desconocida
Ent638_3_249	2,827	0,043	6,214	Transportador de serina putativa	E	Metabolismo y transporte de aminoácidos
Ent638_3_322	2,185	0,0171	24,827	Descarboxilasa glicina, dependiente de PLP, subunidad (proteína P) de complejo de división de glicina	E	Metabolismo y transporte de aminoácidos
Ent638_3_323	2,857	0,101	3,402	Lipoilproteína de complejo de división de glicina	E	Metabolismo y transporte de aminoácidos
Ent638_3_324	2,681	0,0931	3,563	Aminometiltransferasa, tetrahidrofolato-dependiente, subunidad (proteína T) de complejo de división de glicina	E	Metabolismo y transporte de aminoácidos
Ent638_3_338	3,036	0,0172	25,473	Aldolasa fructosa-bisfosfato, clase II	G	Metabolismo y transporte de carbohidratos
Ent638_3_339	3,055	0,0251	11,974	quinasa fosfoglicerato	G	Metabolismo y transporte de carbohidratos
Ent638_3_532	2,017	0,0435	6,165	aldolasa putativa	G	Metabolismo y transporte de carbohidratos
Ent638_3_561	2,706	0,0174	32,635	Formiato-licasa piruvato 4/2-cetobutirato formato-licasa	C	Conversión y producción de energía
Ent638_3_562	2,214	0,0429	6,316	quinasa C de quinasa /acetato propionato, anaeróbico	C	Conversión y producción de energía
Ent638_3_563	4,426	0,00332	113,406	Transportador de L-treonina/L-serina	E	Metabolismo y transporte de aminoácidos
Ent638_3_564	2,11	0,0248	11,174	Deshidratasa treonina catabólica, dependiente de PLP	E	Metabolismo y transporte de aminoácidos
Ent638_3_666	2,499	0,0331	8,017	proteína L13 de subunidad ribosómica 50S	J	Traducción, estructura ribosómica y biogenia
Ent638_3_671	3,291	0,0186	29,163	deshidrogenasa malato, unión NAD(P)	C	Conversión y producción de energía
Ent638_3_679	-2,051	0,124	-2,996	Proteína de membrana de Sistema de flujo	M	Biogenia de pared celular/membrana/envoltura
Ent638_3_686	2,015	0,025	11,894	complejo MreBCD estructural de pared celular de componente MreC de transmembrana	M	Biogenia de pared celular/membrana/envoltura
Ent638_3_701	-2,131	0,0253	-11,29	proteína conservada de función desconocida	S	Función desconocida

SEQ_ID	Cambio de veces (Rico/ Pobre)	Valor P (FDR)	Estadística T	Función	COGclas sID	Descripción de clase
Ent638_3_722	-2,133	0,048	-5,712	Canal mecanosensible	M	Biogenia de pared celular/membrana/envoltura
Ent638_3_723	-2,564	0,0611	-4,795	proteína conservada de función desconocida	S	Función desconocida
Ent638_3_726	3,616	0,0248	11,127	Polimerasa de ARN, subunidad alfa	K	Transcripción
Ent638_3_729	2,758	0,0306	8,691	proteína S13 de subunidad ribosómica 30S	J	Traducción, estructura ribosómica y biogenia
Ent638_3_730	4,562	0,0242	12,313	proteína L36 de subunidad ribosómica 50S	J	Traducción, estructura ribosómica y biogenia
Ent638_3_731	2,315	0,066	4,512	subunidad de membrana translocasa de proteína	U	Tráfico Intracelular, secreción, y transporte vesicular
Ent638_3_732	2,484	0,0247	12,117	proteína L15 de subunidad ribosómica 50S	J	Traducción, estructura ribosómica y biogenia
Ent638_3_733	2,832	0,0307	8,659	proteína L30 de subunidad ribosómica 50S	J	Traducción, estructura ribosómica y biogenia
Ent638_3_735	2,087	0,0483	5,676	proteína L18 de subunidad ribosómica 50S	J	Traducción, estructura ribosómica y biogenia
Ent638_3_736	2,371	0,0477	5,736	proteína L6 de subunidad ribosómica 50S	J	Traducción, estructura ribosómica y biogenia
Ent638_3_737	2,068	0,129	2,923	proteína S8 de subunidad ribosómica 30S	J	Traducción, estructura ribosómica y biogenia
Ent638_3_744	2,017	0,0632	4,657	proteína L16 de subunidad ribosómica 50S	J	Traducción, estructura ribosómica y biogenia
Ent638_3_745	3,16	0,0219	15,304	proteína S3 de subunidad ribosómica 30S	J	Traducción, estructura ribosómica y biogenia
Ent638_3_746	4,129	0,0198	17,793	proteína L22 de subunidad ribosómica 50S	J	Traducción, estructura ribosómica y biogenia
Ent638_3_747	4,589	0,0316	8,444	proteína S19 de subunidad ribosómica 30S	J	Traducción, estructura ribosómica y biogenia
Ent638_3_748	3,398	0,0248	13,648	proteína L2 de subunidad ribosómica 50S	J	Traducción, estructura ribosómica y biogenia
Ent638_3_749	2,993	0,0225	15,415	proteína L23 de subunidad ribosómica 50S	J	Traducción, estructura ribosómica y biogenia
Ent638_3_750	2,484	0,0316	8,39	proteína L4 de subunidad ribosómica 50S	J	Traducción, estructura ribosómica y biogenia
Ent638_3_751		20,0386	6,918	proteína L3 de subunidad ribosómica 50S	J	Traducción, estructura ribosómica y biogenia
Ent638_3_752	4,398	0,019	19,524	proteína S10 de subunidad ribosómica 30S	J	Traducción, estructura ribosómica y biogenia

SEQ_ID	Cambio de veces (Rico/Pobre)	Valor P (FDR)	Estadística T	Función	COGclas sID	Descripción de clase
Ent638_3 756	2,017	0,00832	57,878	factor EF-Tu de alargamiento de cadena de proteína (duplicado de tufA)	J	Traducción, estructura ribosómica y biogénea
Ent638_3 757	2,087	0,0324	8,231	factor EF-G de alargamiento de cadena de proteína, unión GTP	J	Traducción, estructura ribosómica y biogénea
Ent638_3 816	5,186	0,0352	7,667	carboxiquinasa fosfoenolpiruvato	C	Conversión y producción de energía
Ent638_3 925	3,294	0,0696	4,326	ácido C4-dicarboxílico, orotato y transportador citrato	C	Conversión y producción de energía
Ent638_4 010	2,24	0,0202	17,884	regulador dual transcripcional de unión de ADN	K	Transcripción
Ent638_4 063	-2,339	0,0436	-6,128	dismutasa superóxido, Mn	P	transporte de iones inorgánicos y metabolismo
Ent638_4 128	4,463	0,0247	11,192	sector F0 de sintasa ATP de unión de membrana, subunidad b	C	Conversión y producción de energía
Ent638_4 129	3,599	0,0188	34,113	sector F1 de sintasa ATP de unión de membrana, subunidad delta	C	Conversión y producción de energía
Ent638_4 130	3,583	0,0231	14,582	sector F1 de sintasa ATP de unión de membrana, subunidad alpha	C	Conversión y producción de energía
Ent638_4 131	2,8	0,0306	8,832	sector F1 de sintasa ATP de unión de membrana, subunidad gama	C	Conversión y producción de energía
Ent638_4 132	4,856	0,0176	21,153	sector F1 de sintasa ATP de unión de membrana, subunidad beta	C	Conversión y producción de energía
Ent638_4 133	3,713	0,0506	5,526	sector F1 de sintasa ATP de unión de membrana, subunidad epsilon subunidad	C	Conversión y producción de energía
Ent638_4 202	-2,485	0,0305	-8,972	Regulador de respuesta de dos componentes putativa	T	Mecanismos de transducción de señal
Ent638_4 204	-2,712	0,0382	-7,009	Regulador transcripcional de dos componentes, familia LuxR	T	Mecanismos de transducción de señal
Ent638_4 205	-2,202	0,0516	-5,436	Proteína conservada de función desconocida	S	Función desconocida
Ent638_4 206	-2,27	0,047	-5,835	Precursor de dominio de cilindro autotransportador de membrana externo Putativo.	U	Tráfico Intracelular, secreción, y transporte vesicular
Ent638_4 214	-2,019	0,0762	-4,057	Proteína yfeJ similar a amidotransferasea glutamina	E	Metabolismo y transporte de aminoácidos
Ent638_4 215	-2,55	0,0408	-6,676	Sistema de estabilización de plásmidos, sistema ParE de toxina de antitoxina (TA)	D	Control de ciclo celular, división celular, particionamiento de cromosoma
Ent638_4 228	-2,516	0,0666	-4,487	Fragmento de toxina de sistema de toxina-antitoxina RelE-RelB; Profago Qin (parte 2)	D	Control de ciclo celular, división celular, particionamiento de cromosoma

SEQ_ID	Cambio de veces (Rico/Pobre)	Valor P (FDR)	Estadística T	Función	COGclas sID	Descripción de clase
Ent638_4_244	-2,09	0,0854	-3,762	Proteína inducida por estrés, proteína de unión ATP	R	Solamente predicción de función general
Ent638_4_249	-2,253	0,0748	-4,131	Proteína repA de replicación	L	Replicación, recombinación y reparación
Ent638_4_268	-3,098	0,0248	-11,941	Antitoxina bifuncional del sistema toxina antitoxina RelE-RelB y represor transcripcional, profago Qin	D	Control de ciclo celular, división celular, particionamiento de cromosoma
Ent638_4_280	-2,424	0,0409	-6,625	Transglucosilasa lítica Putativa, catalítica (factores de virulencia del tipo lisozima)	-	-
Ent638_4_281	-2,236	0,0533	-5,312	Señal de emparejamiento de transferencia conjugada Putativa (TraM)	D	Control de ciclo celular, división celular, particionamiento de cromosoma
Ent638_4_282	-2	0,0323	-8,245	Proteína de función desconocida	S	Función desconocida
Ent638_4_313	-2,362	0,0418	-6,422	Proteína de función desconocida	S	Función desconocida
Ent638_4_319	-2,086	0,0736	-4,179	transposasa Truncada (Tn3)	-	-
ENT63019_2	-2,306	0,156	-2,566	Proteína exportada de función desconocida	S	Función desconocida
ENT63019_4	-2,286	0,0556	-5,129	Proteína exportada de función desconocida	S	Función desconocida
ENT63106_8	-2,732	0,0248	-11,061	Proteína de función desconocida	S	Función desconocida
ENT631584	-2,087	0,037	-7,431	Proteína de autotransportador Putativo (fragmento)	U	Tráfico intracelular, secreción, y transporte vesicular
ENT631894	-2,007	0,0174	-21,346	Proteína de resistencia Beta-lactam	R	Solamente predicción de función general
ENT631979	-2,11	0,0229	-14,717	Elemento ISPutativo IS (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 transposasa parcial Putativa	-	-
ENT63p0070	-2,3	0,0375	-7,358	proteína de función desconocida	S	Función desconocida

TABLA S-3 Comparación de trasportador Ent638

	Sprot568	Ent638	E. coli		E. carotovara SCRU1043	K. pneumoniae	
			K12	O157-H7		MGH785	342
1.A. Canales tipo α							
La Superfamilia de Canal de Ion Abierto por Tensión (VIC)	1.A.1	1	2	1	1	1	1
La Familia de Proteína Intrínseca Principal (MIP)	1.A.8	2	2	2	2	5	4
La Familia de Canal de Transportador de Amoniaco (Amt)	1.A.11	1	1	1	1	1	1
La Familia de Canal de Ion Mecanosensible de Conductancia Grande (MscL)	1.A.22	1	1	1	1	1	1
La Familia de Canal de Ion Mecanosensible de Conductancia Pequeña (MscS)	1.A.23	6	7	6	6	7	7
La Familia de Transportador de Urea (UT)	1.A.28	0	0	0	0	0	0
La Familia de Transportador de Ion de Metal (MIT) CorA	1.A.35	4	2	2	3	3	3
Total		15	15	13	14	18	17
2.A. Portadores (uniportadores, simportadores, antiportadores)							
La Superfamilia de Facilitador Principal (MFS)	2.A.1	114	81	70	76	119	128
La Familia Simportadora Glicosida-Pentosa-Hexuronida (GPH):Cación	2.A.2	1	5	6	6	8	9
La Familia de Aminoácidos-Poliamina-Organocación (APC)	2.A.3	21	12	22	21	20	22
La Familia de Facilitador de Difusión de Cación (CDF)	2.A.4	3	2	2	2	5	5
La Familia de Permeasa (ZIP) Zinc (Zn2+)-Hierro (Fe2+)	2.A.5	1	1	0	0	1	1
La Superfamilia de Resistencia-Nodulación-División Celular (RND)	2.A.6	14	14	9	12	14	15
La Superfamilia de Fármaco/Transportador de Metabolitos	2.A.7	26	19	16	16	25	28
La Familia de Gluconato.H+ Simportador (GntP)	2.A.8	6	2	7	4	4	6
La Familia de Biogenia Oxidasa Citocromo (Oxal)	2.A.9	1	1	1	1	1	1
La Familia de Transportador de 2-ceto-3-Desoxigluconato (KDGT)	2.A.10	0	1	1	1	1	1
La Familia de Citrato-Mg2+:H+ (CitM) Citrato-Ca2+:H+ (CitH) Simportador (CitMHS)	2.A.11	0	0	0	0	0	0
La Familia de Antiportador ATP-ADP (AAA)	2.A.12	0	0	0	0	0	0
La Familia de absorción C4-Dicarboxilato (Dcu)	2.A.13	2	2	2	2	2	2
La Familia de Permeasa Lactato (LctP)	2.A.14	1	1	2	1	1	1
La Familia de Transportador de Betaina/Carnitina/Colina (BCCT)	2.A.15	2	0	3	3	3	2
La Familia de Transportador de Telurita-resistencia/Dicarboxilato (TDT)	2.A.16	1	1	1	1	1	1
La Familia de Transportador de Oligopéptidos dependiente de Protones (POT)	2.A.17	4	2	4	4	6	5

La Familia de Antiportador Ca2+-Cation (CaCA)	2.A.19	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
La Familia de Transportador de Fosfato Inorgánico (PIT)	2.A.20	2	1	2	2	2	1	1	1	1	1	1
La Familia de Simportador de Sodio (SSS)	2.A.21	4	3	4	4	4	4	4	4	4	4	3
La Familia de Dicarboxilato/Aminoácido:Cation (Na+ o H+) Simportador (DAACS)	2.A.23	4	5	3	5	6	5	6	5	5	5	5
La Familia de Transportador 2-Hidroxicarboxilato (2-HCT)	2.A.24	2	1	0	0	2	2	2	2	2	2	3
La Familia de Simportador de Alanina o Glicina:Cation (AGCS)	2.A.25	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
La Familia de Simportador Aminoácido de Cadena Ramificada:Cation (LIVCS)	2.A.26	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
La Familia de Simportador de Glutamato:Na+ (ESS)	2.A.27	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1
La Familia de Simportador de Ácido Biliar:Na+ (BASS)	2.A.28	3	2	1	1	2	2	2	2	2	2	2
La Familia de Antiportador de NhaA Na+:H+ (NhaA)	2.A.33	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
La Familia de Antiportador de NhaB Na+:H+ (NhaB)	2.A.34	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
La Familia de Antiportador de NhaC Na:H (NhaC)	2.A.35	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
La Familia de Antiportador-1 de Cation Monovalente:Protón (CPA1)	2.A.36	2	2	2	2	1	2	1	3	3	3	3
La Familia de Antiportador-2 de Cation Monovalente:Protón (CPA2)	2.A.37	4	3	3	3	2	3	2	3	3	3	3
La Familia de K+ Transportador (Trk)	2.A.38	2	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1
La Familia de K Transportador (Trk)	2.A.39	2	0	2	2	2	2	2	3	3	3	4
La Familia de Simportador-2 de Nucleobase:Cation (NCS2)	2.A.40	6	5	10	11	4	7	7	7	7	7	7
La Familia de Transportador de Nucleósido Concentrador (CNT)	2.A.41	4	2	3	3	3	3	3	3	3	3	2
La Familia de Permeasa de Aminoácido Hidroxil/Aromático (HAAAAP)	2.A.42	5	5	8	8	3	7	7	7	7	7	7
La Familia de Transportador de Formiato-Nitrito (FNT)	2.A.44	3	3	4	4	2	2	2	2	2	2	2
La Familia de Eflujo Arsenita-Antimonita (ArsB)	2.A.45	1	1	2	1	1	1	1	2	2	2	2
La Familia de Simportador de Benzoato:H+ (BenE)	2.A.46	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
La Familia de Simportador de Anión Divalente:Na+ (DASS)	2.A.47	4	4	5	5	4	6	6	8	8	8	8
La Familia de Portador de Cloruro/Canal (ClC)	2.A.49	3	3	3	3	0	4	4	4	4	4	4
La Familia de Transportador de Ion de Cromato (CHR)	2.A.51	2	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1
La Familia de Transportador Ni2+-Co2+ (NiCoT)	2.A.52	2	3	0	0	1	3	3	3	3	3	3
La Familia de Permeasa de Sulfato (SuIP)	2.A.53	4	2	1	1	1	2	4	3	3	3	3
La Familia de Transportador de Ion de Metal (Mn2+-hierro) (Nramp)	2.A.55	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2
La Familia de Transportador de ATP Tripartito-Periplásmico independiente (TRAP-T)	2.A.56	5	4	3	0	3	0	0	0	0	0	0
La Familia de Simportador de Fosfato:Na+ (PNaS)	2.A.56	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2
La Familia de Resistencia Arsenica-3 (ACR3)	2.A.59	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
La Familia de Absorción C de C4-dicarboxilato (DcuC)	2.A.61	1	2	2	2	1	1	1	1	1	1	1
La Familia de Cation Monovalente (K+ o Na+): Antiportador-3 de Protones (CPA3)	2.A.63	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

La familia de Objetivo de Arginina Gemelo (Tat)	2.A.64	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
La Superfamilia de Multifármaco/Oligosacárido-lípido/Polisacárido (MOP) Fippasa	2.A.66	9	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
La familia de Transportador de Oligopéptido (OPT)	2.A.67	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
La familia de Transportador p-Aminobenzolil-glutamato (AbgT)	2.A.68	1	1	1	2	0	0	1	1	1	1	1	1	1
La familia de Portador de Eflujo de Auxina (AEC)	2.A.69	1	1	1	1	2	1	1	2	1	1	1	3	3
La familia de Simportador Malonato:Na+ (MSS)	2.A.70	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
La familia de Permeasa K+ Absorción (KUP)	2.A.72	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
La familia de Absorción de Ácido Graso de Cadena Corta (AtoE)	2.A.73	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
La familia de Exportador L-Lisina (Lyse)	2.A.75	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
La familia de Resistencia a Homoserina/Treonina (RhtB)	2.A.76	9	4	5	5	11	7	9	9	7	9	9	9	9
La familia de Exportador de Aminoácido de Cadena Ramificada (LIV-E)	2.A.78	1	2	1	1	2	3	2	2	3	2	2	2	2
La familia de Exportador Treonina /Serina (ThrE)	2.A.79	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
La familia de Treonina Tricarboxilato (TTT)	2.A.80	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
La familia de Intercambiador de Aspartato:Alanina (AAE)	2.A.81	2	2	1	0	2	2	2	2	2	2	2	2	2
La familia de Exportador Ácido Aromático (ArAE)	2.A.85	5	5	3	3	0	6	8	5	3	0	6	8	8
La familia de Exportador Autoinductor-2 (AI-2E) (anteriormente la Familia PerM, TC #9.B.22)	2.A.86	4	6	0	0	0	0	0	4	6	0	0	0	0
La familia de Transportador de Hierro Vacuolar (VIT)	2.A.89	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
total		319	241	244	244	244	202	319	241	244	202	319	241	244
3.A. Transportadores accionados por hidrólisis de enlaces P-P-														
La Superfamilia de Casete de unión de ATP (ABC)	3.A.1	354	295	210	239	358	386	422	354	295	239	358	386	422
La familia de translocación H+- o Na+- tipo F, tipo V y ATPasa tipo A (FATPasa)	3.A.2	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9
La familia de ATPasa tipo P (P-ATPasa)	3.A.3	7	8	6	6	6	6	6	7	8	6	6	6	6
La familia de Eflujo de Arsenita-Antimonita (ArsAB)	3.A.4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
La familia de Ruta Secretora General (Sec)	3.A.5	7	6	0	0	0	0	3	7	6	0	0	0	3
La familia de Pirofosfataza de Translocación H+- (H+-PPasa)	3.A.10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
La familia de Translocador de DNA de Septo (S-DNA-T)	3.A.12	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0
total		378	319	225	254	373	408	446	378	319	254	373	408	446
4.A. Traslocadores de grupo accionados por fosfotransfer														
4.A		45	41	50	63	45	84	78	45	41	50	63	45	84

9.A. Transportadores reconocidos de mecanismo bioquímico desconocido												
La Familia de Permeasa (Hg2+) Ion Mercurico MerTP (MerTP)	9.A.2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
La Familia de Absorción-B YggT o Fanciful K+ (FkuB; YggT)	9.A.4	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
La Familia de Absorción de Hierro Férrico (FeoB)	9.A.8	1	2	1	1	0	1	0	1	0	1	1
La Superfamilia de Transportador de Hierro/Plomo (ILT)	9.A.10	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
La Superfamilia de Transportador de Hierro/Plomo (ILT)	9.A.18	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1
La Familia de Transportador-E Mg2 (MgtE)	9.A.19	2	2	0	0	0	0	1	2	2	2	2
La Familia de Facilitador Etanolamina (EAF)	9.A.28	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
La Familia de Permeasa de Absorción de Sulfonato de 4-Tolueno Putativo (TSUP)	9.A.29	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
La Familia de Resistencia de Ion de Teluro (TerC)	9.A.30	4	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0
La Familia de Proteína de Fibra de Cola Fago 2 Plocina R2 (Plocina R2)	9.A.33	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
La Familia de HlyC/CorC (HCC)	9.A.40	4	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
La Familia de Exportador de Polisacárido Capsular (CPS-E)	9.A.41	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Total		17	15	2	2	2	2	1	4	4	4	4
TOTAL		774	631	534	577	630	833	14,1	16,1	15,3	885	
%		15,4	14,4	12,9	10,9	14,1	16,1	15,3				

Fuentes: (1) <http://www.membranetransport.org/> y (2) <http://www.tcdb.org/>

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para aumentar la tolerancia a sequía en una planta que comprende aplicar una composición a la planta en una cantidad efectiva para aumentar la tolerancia a sequía en la planta, en el que la composición comprende un cultivo aislado de *Enterobacter* sp. 638.
- 5 2. El procedimiento de la reivindicación 1, que comprende aplicar la composición a una raíz, un brote, una hoja, y/o una semilla de la planta.
3. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la planta es una angiosperma.
4. El procedimiento de la reivindicación 3, en el que la angiosperma es tomate.
5. El procedimiento de la reivindicación 3, en el que la angiosperma es un álamo.
- 10 6. El procedimiento de la reivindicación 3, en el que la angiosperma es soja.
7. El procedimiento de la reivindicación 3, en el que la angiosperma es maíz.
8. El procedimiento de la reivindicación 3, en el que la angiosperma es pepino.
9. El procedimiento de la reivindicación 3, en el que la angiosperma es guisante.
10. El procedimiento de la reivindicación 3, en el que la angiosperma es rábano.
- 15 11. El procedimiento de la reivindicación 3, en el que la angiosperma es brócoli.
12. El procedimiento de la reivindicación 3, en el que la angiosperma es espinaca.

Fig. 1

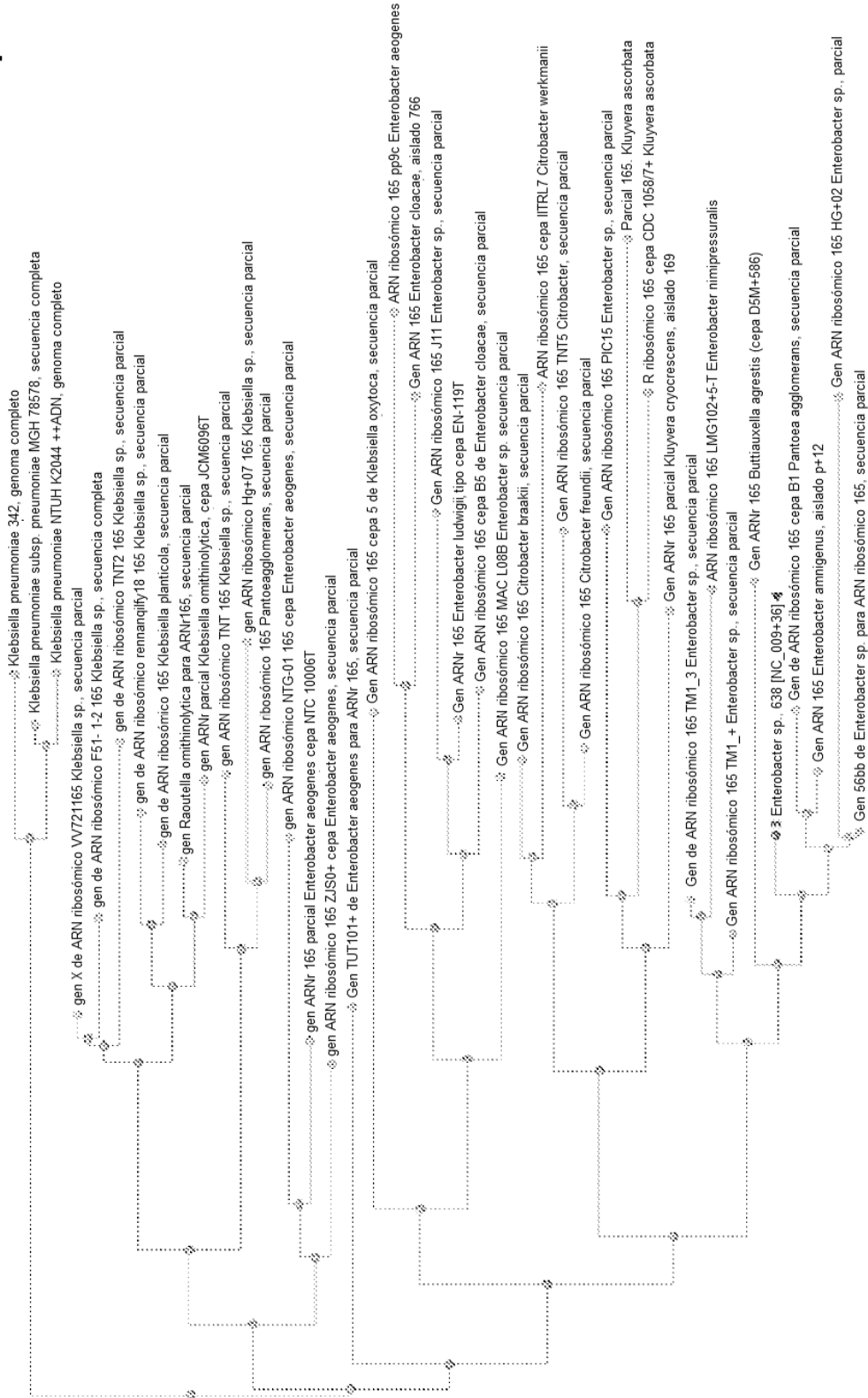
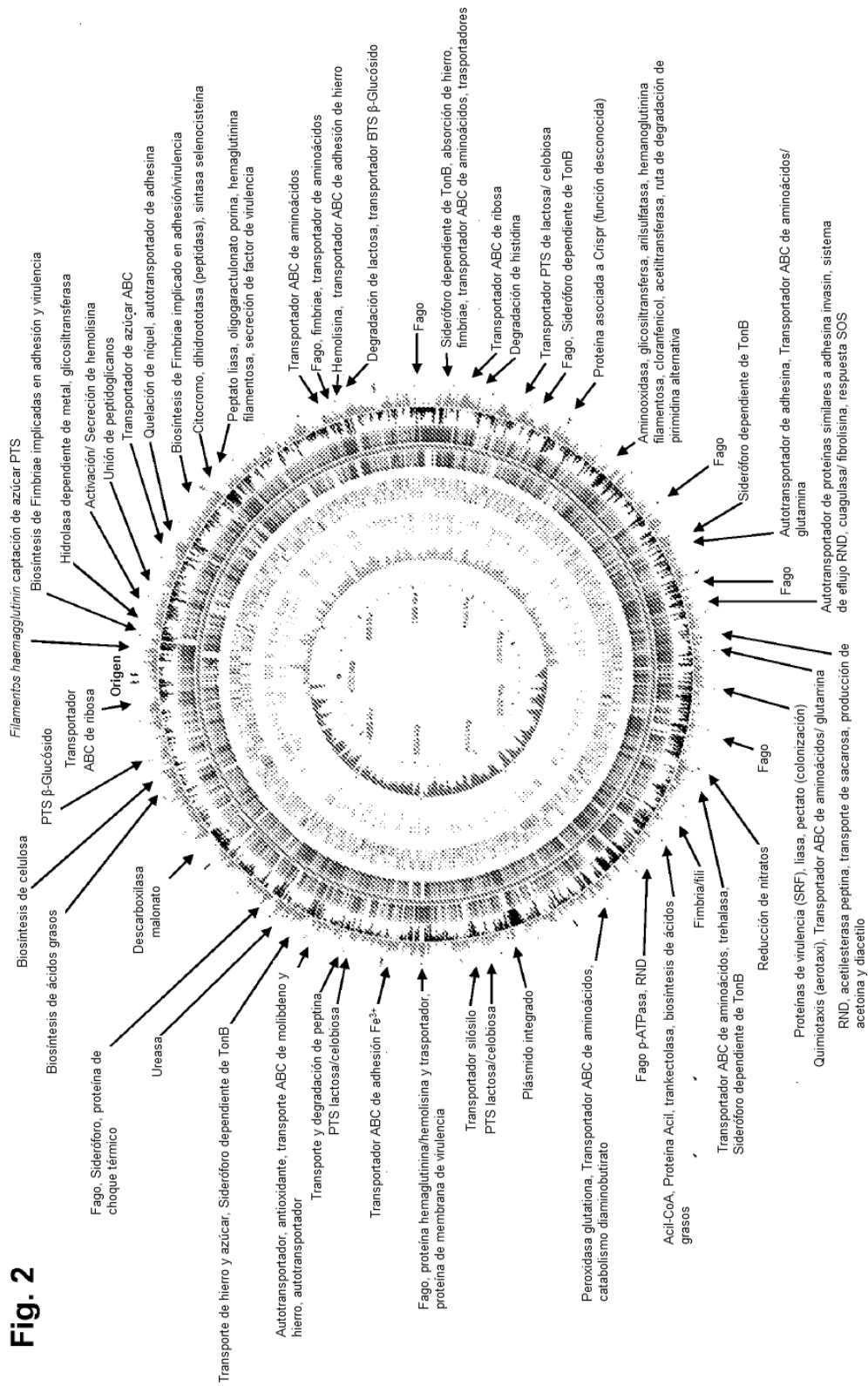


Fig. 2



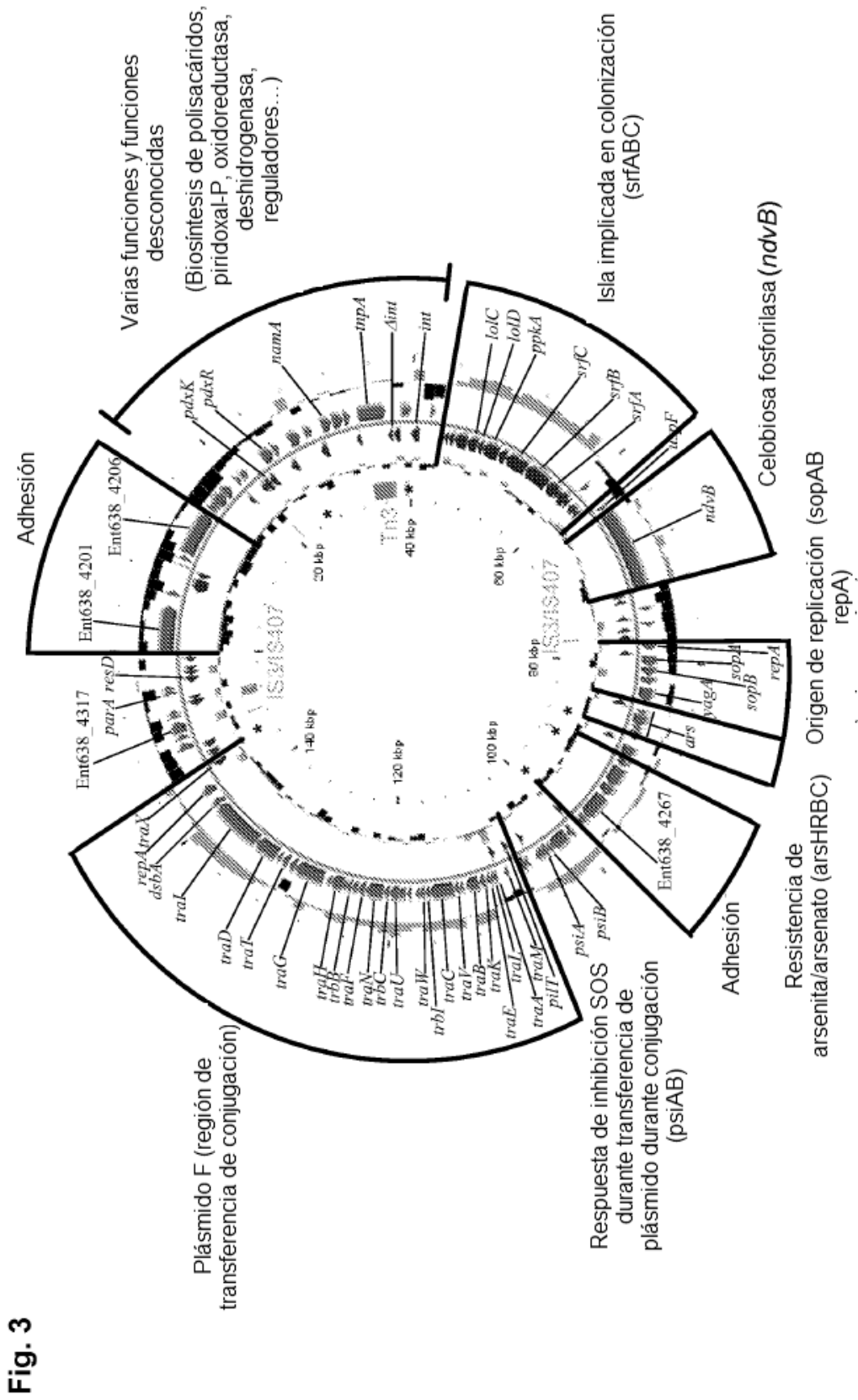


Fig. 4

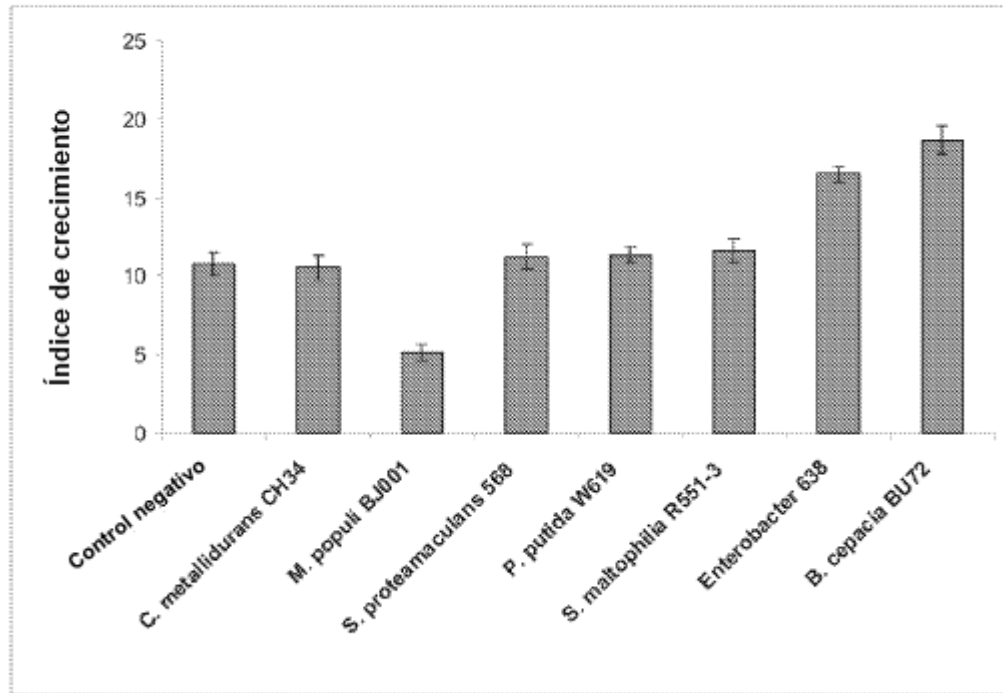


Fig. 5

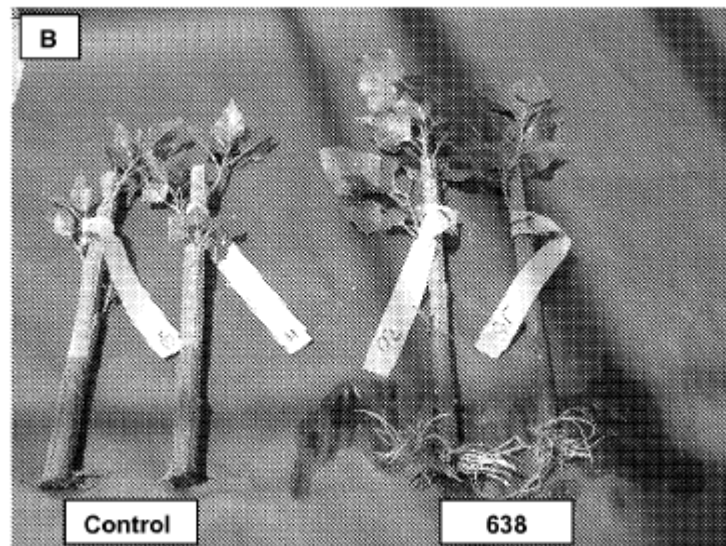
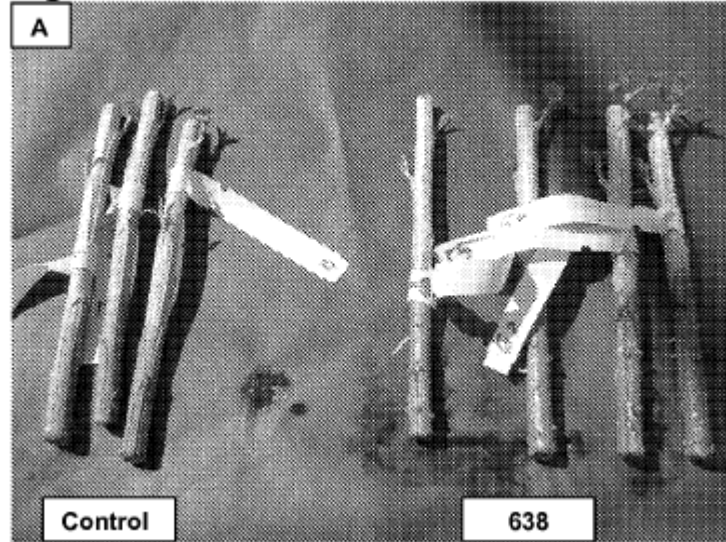


Fig. 6

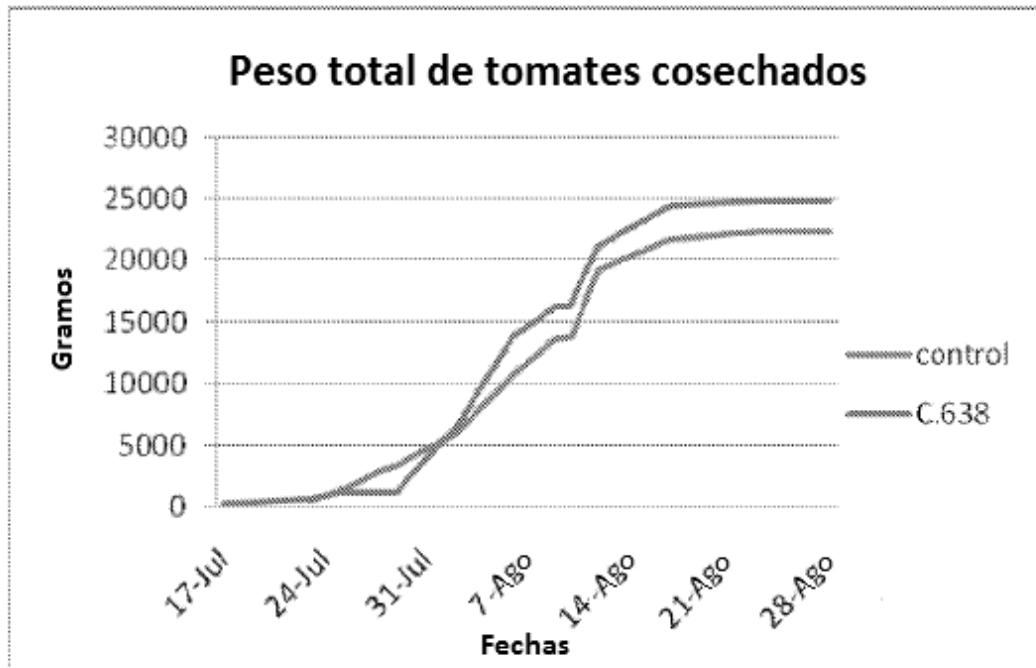


Fig. 7

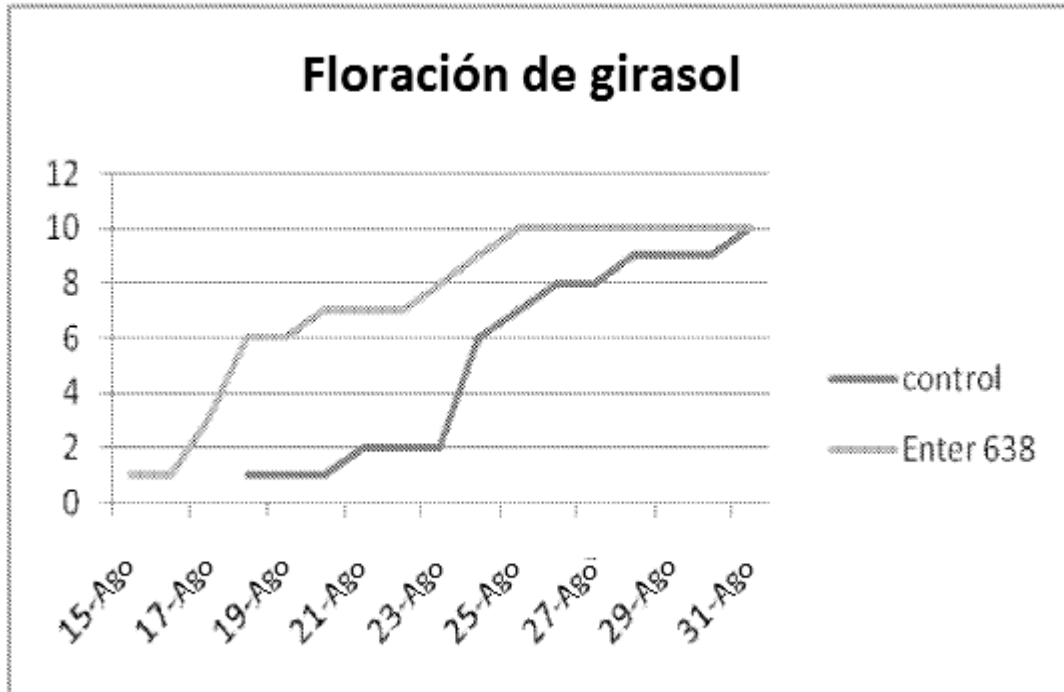


Fig. 8

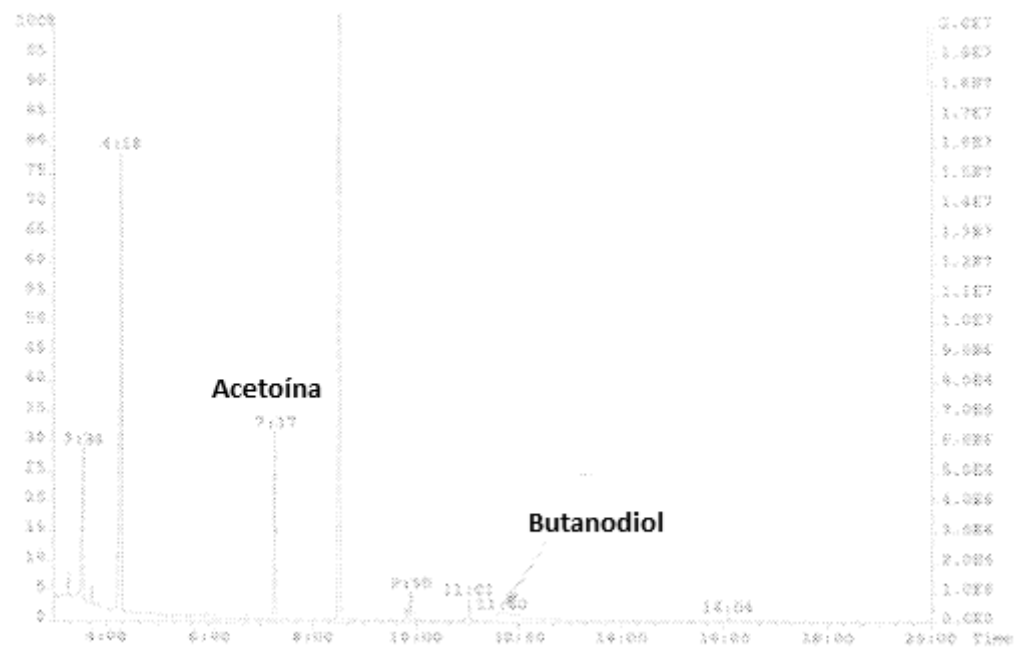
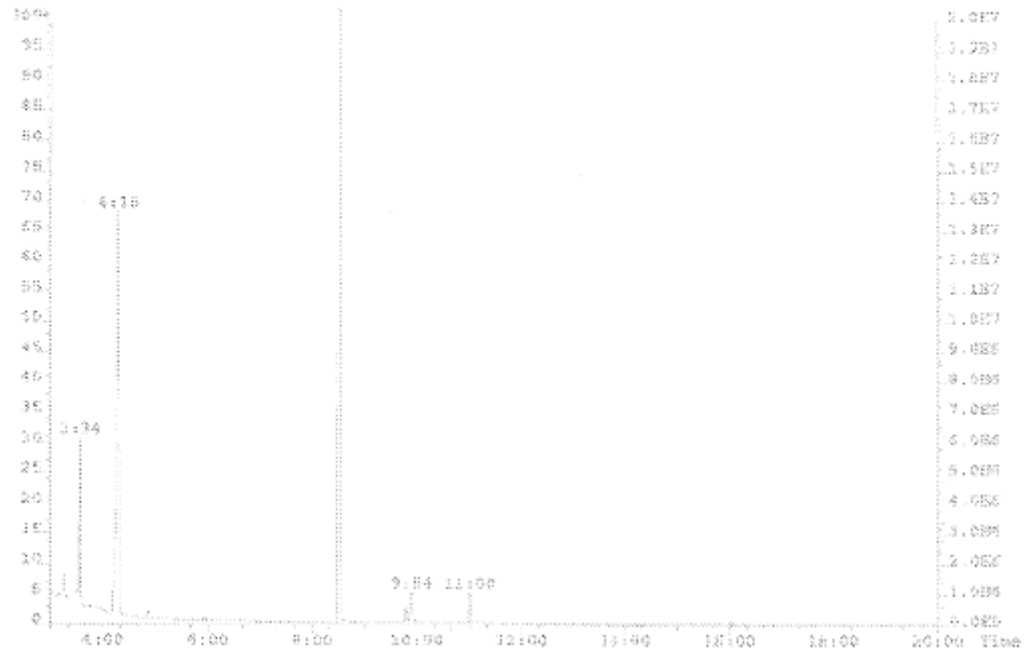


Fig. 9

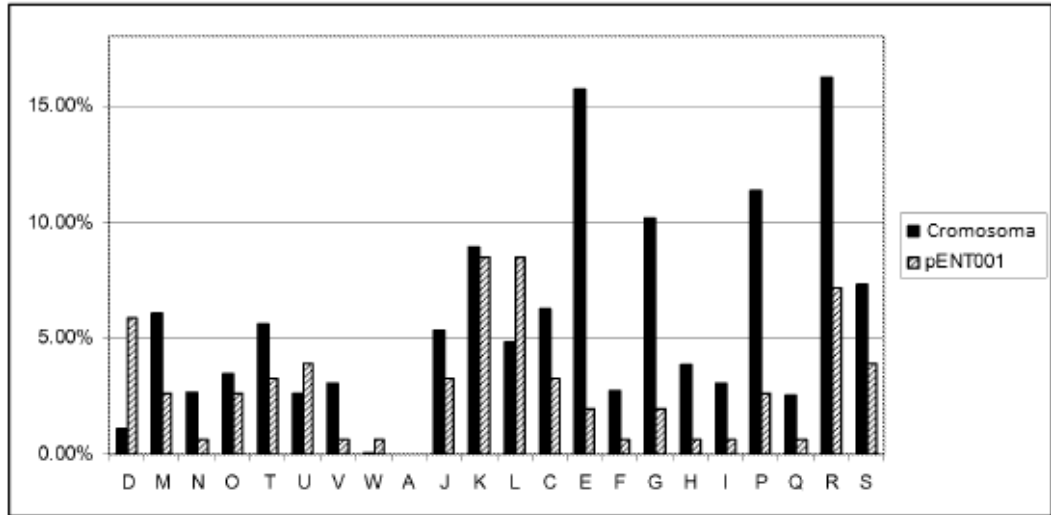
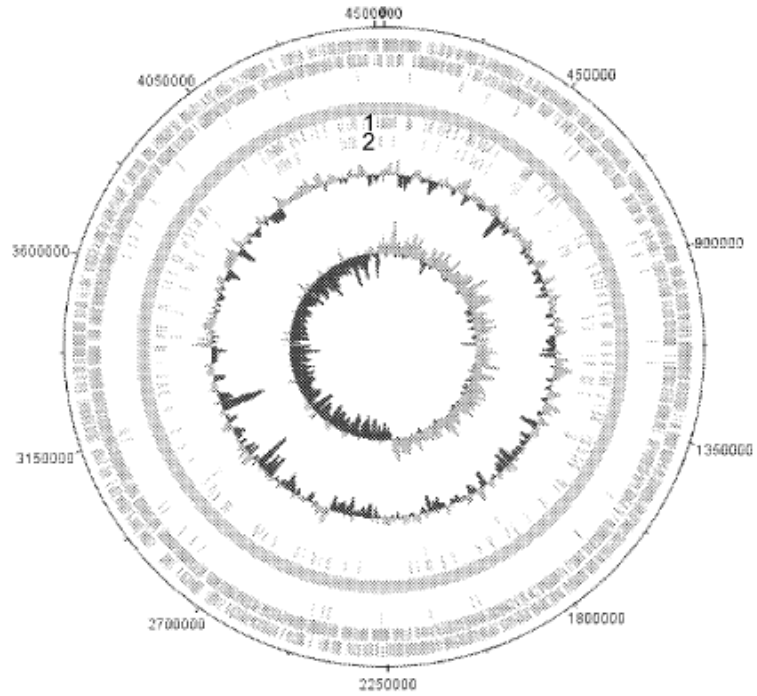


Fig. 10



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	
ACC	1	
CCT	1	
CAT	1	
TCC	1	
CGT	4	
CAA	1	
GGT	3	
CTT	2	

100

- 1: Todas las repeticiones de palíndromo
 2: CCCTCTCCCXX(X)GGGAGAGGG (SEQ ID NO: 1)

Fig. 11

