

Inserciones en secuencias de proteínas para la taxonomía y filogenia de las familias *Pseudomonadaceae* y *Moraxellaceae* (Orden Pseudomonadales)

Insertions in protein sequences for Taxonomy and Phylogeny in Pseudomonadaceae and Moraxellaceae families (Pseudomonadales Order)

Ania Margarita Cutiño-Jiménez^a, Heidy Annia Peña Cutiño^b

^a Centro de Estudios de Biotecnología Industrial. Facultad de Ciencias Naturales y Exactas. Universidad de Oriente. Ave. Patricio Lumumba s/n., Santiago de Cuba, CP 90 500 aniacutino@uo.edu.cu.

^b Clínica Estomatológica Fé Dora, Santiago de Cuba.

Recibido: 18 de abril de 2019;

Aceptado: 2 de mayo de 2019.

RESUMEN

Las familias *Pseudomonadaceae* y *Moraxellaceae* comprenden especies de gran relevancia para la Medicina, Agricultura y Biotecnología. *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii*, por ejemplo, constituyen patógenos oportunistas responsables de numerosas infecciones nosocomiales. La familia *Pseudomonadaceae* incluye además a la bacteria fitopatógena *Pseudomonas syringae* y a la fijadora de nitrógeno *Azotobacter vinelandii*, ambas con impacto en la agricultura. A pesar de que *Pseudomonadaceae* y *Moraxellaceae* han sido ampliamente estudiadas, pocos estudios han estado dirigidos a la determinación de marcadores moleculares que distinguen a sus miembros de otros grupos de bacterias. Los marcadores índices (inserciones/delecciones) en secuencias de proteínas conservadas han sido utilizados para estudios taxonómicos y evolutivos en bacterias. En el presente estudio se analiza si las inserciones identificadas en proteínas altamente conservadas constituyen marcadores moleculares para estudios taxonómicos y filogenéticos en *Pseudomonadaceae* y *Moraxellaceae*. Se analizaron secuencias de proteínas relacionadas con la replicación y la reparación del ADN, obtenidas de bases de datos internacionales y alineadas con el programa ClustalX2. Se identificó una inserción de un aminoácido en la proteína ADN polimerasa I que distingue a las familias *Pseudomonadaceae* y *Ventrosimonadaceae*, además de una mayor de 11 aminoácidos que soporta la monofilia de los géneros *Psychrobacter* y *Moraxella*. Mientras que la inserción de 5 aminoácidos en la proteína ADN polimerasa (subunidad alfa) es distintiva de la familia *Moraxellaceae*. Las inserciones evaluadas constituyen marcadores moleculares útiles para abordar la taxonomía de *Pseudomonadaceae* y *Moraxellaceae*, y proveen de herramientas para estudios filogenéticos y la identificación molecular de bacterias incluidas en estas importantes familias.

Palabras clave: Marcadores moleculares; Taxonomía; Filogenia; *Pseudomonadaceae*, *Moraxellaceae*.

ABSTRACT

Pseudomonadaceae and *Moraxellaceae* families comprise species with medical, agricultural and biotechnological relevance. *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*, for example, are opportunist pathogens responsible for several nosocomial infections. The *Pseudomonadaceae* family also includes the phytopathogenic bacteria *Pseudomonas syringae* and the denitrifying species *Azotobacter vinelandii*, both with agriculture impact. Even though *Pseudomonadaceae* and *Moraxellaceae* have been widely studied, few studies have been conducted to

the identification of molecular markers that could be used to distinguish members of these families from other groups of bacteria. The identification of Indels (insertions or deletions) in conserved proteins sequences has been widely used for taxonomic and evolutionary studies in bacteria. In the present study, we investigated whether insertions identified in highly conserved proteins may be used as molecular markers for taxonomic and phylogenetic studies in *Pseudomonadaceae* and *Moraxellaceae* families. For this purpose, DNA repair and replication-related protein sequences were obtained from the international databases and aligned using ClustalX2. The one amino acid length insertion identified in the protein DNA polymerase I distinguishes the *Pseudomonadaceae* y *Ventrosimonadaceae* families; and the larger 11 amino acids insertion, also identified in this protein, supports the monophyletic grouping of *Psychrobacter* and *Moraxella* genera. Moreover, the five amino acids insertion in the protein DNA polymerase III (alpha subunit) is distinctive to the *Moraxellaceae* family. Thus, the insertions evaluated constitute molecular markers useful to assess taxonomy in *Pseudomonadaceae* and *Moraxellaceae*, and also provide tools for phylogenetic studies and molecular identification of bacteria included in these important families.

Keywords: Molecular markers; Taxonomy; Phylogeny; *Pseudomonadaceae*; *Moraxellaceae*.

INTRODUCCIÓN

El orden Pseudomonadales, incluido de la clase Gammaproteobacteria, constituye un grupo fenotípicamente heterogéneo de bacterias Gram negativas que incluye a las familias *Pseudomonadaceae* y *Moraxellaceae*, las cuales comprenden especies de importancia médica, económica, ecológica, biotecnológica y para la agricultura.¹ La familia *Pseudomonadaceae* incluye a *Pseudomonas aeruginosa*, un patógeno oportunista responsable de infecciones nosocomiales en salas de terapia intensiva, y a *Pseudomonas syringae*, un importante fitopatógeno que causa pérdidas en cultivos como el café, el frijol y otros de importancia económica.^{2,3} Esta incluye además a la bacteria *Azotobacter vinelandii*, que es utilizada en la Biotecnología y tiene valor para la agricultura por ser una especie fijadora de nitrógeno.^{4,5}

Dentro de la familia *Moraxellaceae* se encuentran los géneros *Moraxella*, *Acinetobacter* y *Psychrobacter*. Las especies patógenas *M. catarrhalis* y *M. nonliquefaciens* han sido aisladas en humanos a partir de la cavidad nasal y de muestras del tracto respiratorio de pacientes con bronquitis crónica y otras infecciones de las vías respiratorias.⁶ Especies del género *Psychrobacter* y varias cepas de *Acinetobacter* también han sido reportadas como responsables de numerosas infecciones nosocomiales.^{7,8}

Los estudios proteómicos y la disponibilidad de genomas completamente secuenciados para un gran número de bacterias, constituye una oportunidad para estudios filogenéticos y de taxonomía molecular. De acuerdo a la metodología de Gupta, la comparación de secuencias conservadas de proteínas mediante el alineamiento múltiple, permite inferir la existencia de marcadores moleculares Indeles (inserciones y deleciones) útiles para esclarecer la ubicación taxonómica y filogenia de bacterias.^{9,10} Debido a que las mutaciones involucradas en el origen de los indeles han ocurrido generalmente en el ancestro común más reciente a un determinado grupo, todas las líneas descendientes probablemente lo compartirán. De manera que el hallazgo de indeles de secuencia y tamaño definido, en la misma posición de las secuencias de proteínas de todos los miembros de dos o más taxa, permite estimar su posible proximidad evolutiva.

A pesar de que las familias *Pseudomonadaceae* y *Moraxellaceae* han sido ampliamente estudiadas, pocos estudios han estado dirigidos a la estimación de marcadores genéticos o bioquímicos que distingan a sus miembros de otros grupos de bacterias. Teniendo en cuenta

que las mismas comprenden especies de gran relevancia, el presente estudio se basa en la metodología de Gupta, para la estimación de indeles de tipo inserción en proteínas relacionadas con la reparación y replicación del ADN, que pudieran ser utilizados como marcadores moleculares para abordar la taxonomía y estimar la filogenia de estas importantes familias.

MATERIALES Y MÉTODOS

Fueron analizadas secuencias de las proteínas ADN polimerasa III (subunidad alfa) y ADN polimerasa I pertenecientes a especies de clase Gammaproteobacteria, obtenidas de la base de datos de proteínas Uniprot.¹¹ La lista de las especies incluidas con su nomenclatura correspondiente es mostrada en el Anexo 1. Las secuencias escogidas fueron organizadas en conjuntos, archivadas en formato FASTA y posteriormente alineadas con el programa ClustalX2, considerando los parámetros sugeridos por la literatura especializada, alineamiento par a par (apertura de gap 35 y extensión de gap 0,75) y alineamiento múltiple (apertura de gap 15 y extensión de gap 0,30).^{12,13} Los alineamientos obtenidos se analizaron mediante inspección visual para identificar las inserciones, considerando relevantes aquellas flanqueadas por regiones conservadas y con igual longitud en todas las especies que la comparten, como fue propuesto por otros autores.¹⁴

El árbol filogenético fue inferido por el método de Máxima Verosimilitud y utilizando el programa MEGA5 a partir del alineamiento concatenado de las proteínas ADN polimerasa III (subunidad alfa) y ADN polimerasa I, el cual estuvo conformado por 69 secuencias y 966 posiciones aminoacídicas.^{15,16} El modelo de sustitución aminoacídica, calculado igualmente con el programa MEGA5, fue el WAG con parámetros para sitios invariables (+I), frecuencia aminoacídica (+F) y distribución gamma (+G) de categorías 5. Se utilizaron 1000 réplicas en el análisis de Bootstrap para estimar la robustez de los nodos.^{17,18} Como grupo externo se utilizaron las secuencias del orden Xanthomonadales, el cual tiene una posición basal dentro de la clase.¹⁹

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Actualmente, los marcadores indeles se emplean como complemento para la taxonomía basada en el análisis del gen ARNr 16S en la descripción de nuevas especies bacterianas y han sido utilizados además para estudios evolutivos en otros grupos de organismos, incluyendo plantas, animales y hongos.²⁰⁻²²

En el presente trabajo se identificaron inserciones en secuencias conservadas de las proteínas ADN polimerasa III (subunidad alfa) y ADN polimerasa I, las cuales fueron evaluadas para estimar si estas constituyen marcadores moleculares útiles para estudios de taxonomía y filogenia de las familias *Pseudomonadaceae* y *Moraxellaceae*. En cada figura, la nomenclatura es seguida por el número de acceso de la secuencia en la base de datos. Los puntos muestran identidad con el aminoácido de la primera secuencia en el alineamiento, los guiones (-) representan brechas que indican ausencia de la inserción que está señalada por un cuadro.

El alineamiento de la proteína ADN polimerasa I permitió estimar la presencia de una inserción del aminoácido Glicina en las secuencias homólogas de los miembros de *Pseudomonadaceae*, la cual es compartida por las especies *Ventosimonas gracilis* y

Chromohalobacter salexigens, ésta última del orden Oceanospirillales (Fig. 1). Esta inserción está ausente en secuencias de los géneros *Psychrobacter*, *Moraxella* y *Acinetobacter* de la familia *Moraxellaceae*. Este hallazgo sugiere la ocurrencia de eventos moleculares en la rama de *Pseudomonadaceae* y *Ventosimonas gracilis* tras su divergencia del resto de los miembros del Pseudomonadales. La misma está incluida dentro de una inserción mayor presente en la mayoría de los miembros de la clase Gammaproteobacteria y que excluye también a la familia *Moraxellaceae* sugiriendo que sus miembros constituyen líneas que divergieron antes dentro del orden.

La Figura 2 muestra el árbol filogenético consenso obtenido por el método de Máxima Verosimilitud a partir del alineamiento concatenado de las dos proteínas. El resultado del análisis filogenético es congruente con la inserción en la proteína ADN polimerasa I, la especie *Ventosimonas gracilis* se encuentra muy próxima a la rama de *Pseudomonadaceae* con un valor de Bootstrap de 96%. Este resultado coincide con estudios previos basado en el análisis del gen ARNr 16S en los que se propone a la cepa aislada del intestino de tortugas como una nueva especie, que representa un nuevo género y una nueva familia dentro del orden Pseudomonadales, en este caso la familia *Ventosimonadaceae*.²³

La inserción en la proteína ADN polimerasa I es compartida además con la especie del orden Oceanospirillales *Chromohalobacter salexigens* (CHASA). Hallazgo que también coincide con el análisis filogenético, considerando que la especie está muy próxima a la familia *Pseudomonadaceae*, aunque el valor de Bootstrap es sólo de 82%. En estudios previos se confirmó la proximidad de los órdenes Oceanospirillales y Pseudomonadales a partir del análisis filogenético de un concatenado de 11 proteínas.¹⁹

Aunque la inserción no es exclusiva del género *Pseudomonas*, resulta importante la determinación de marcadores moleculares específicos del mismo. La especie *P. aeruginosa* es considerada como una de las bacterias más ampliamente distribuida; las opciones terapéuticas contra este patógeno están limitadas debido a la propagación de cepas resistentes a múltiples antibióticos y desinfectantes.^{24,25} Por otro lado, la bacteria fitopatógena *Pseudomonas syringae* comprende numerosos patovares que afectan a un gran número de plantas de interés agrícola y ha estado relacionada con pérdidas considerables a diferentes cultivos a nivel mundial.²⁶

Otro hallazgo en la proteína ADN polimerasa I es una inserción de 11 aminoácidos característica de los géneros *Psychrobacter* y *Moraxella*, la cual está ausente en el género *Acinetobacter* (Fig. 3). La misma fue identificada en estudios previos como útil para la identificación de bacterias de importancia médica en los géneros *Psychrobacter* y *Moraxella*.²⁷ En el presente estudio dicha inserción se evalúa con un enfoque evolutivo ya que soporta la naturaleza monofilética de la rama *Psychrobacter-Moraxella*. Resultado que coincide con el análisis filogenético ya que los géneros *Psychrobacter* y *Moraxella* se encuentran ubicados en una misma rama soportada por un valor de Bootstrap de 100%.

El alineamiento de la proteína ADN polimerasa III (subunidad alfa) evidenció una inserción de cinco aminoácidos compartida por todos los miembros de *Moraxellaceae* (Fig.4). Esta inserción soporta la monofilia de esta familia y constituye un marcador distintivo que puede ser utilizado como un carácter molecular complementario en estudios taxonómicos ya que distingue a sus miembros del resto de las gammaproteobacterias. Este marcador

complementaría también los estudios filogenéticos basados en los métodos tradicionales, debido a que es congruente con el árbol de máxima verosimilitud obtenido, la rama de la familia *Moraxellaceae* está soportada por un valor de Bootstrap del 100%.

Los marcadores del tipo inserción son muy utilizados como caracteres moleculares distintivos a determinados grupos en estudios taxonómicos y evolutivos. Actualmente se utilizan como complemento a la taxonomía basada en el análisis del gen ARNr 16S para la descripción de nuevas especies bacterianas.^{20,21,28}

En Cuba, especies del género *Acinetobacter* representaron más del 50% de los aislados causantes de infecciones nosocomiales en unidades de cuidados intensivos entre 2001 y 2007.²⁵ La inserción en la proteína ADN polimerasa III (subunidad alfa) pudiera ser considerada como un marcador útil en la identificación molecular de bacterias de este género. Hay que destacar que la mayoría de sus miembros comparten los mismos aminoácidos, excepto para las especies *Acinetobacter sp.* y *A. junii* que presentan Alanina en vez de Serina en la segunda posición. Entre las especies que comparten la secuencia aminoacídica Prolina-Serina-Asparagina-Prolina-Ácido aspártico en la inserción se encuentran *Acinetobacter haemolyticus*, *A. proteolyticus* y *A. baumannii*. Específicamente *A. baumannii* es una bacteria que ha emergido como uno de los agentes nosocomiales de mayor relevancia a nivel mundial.²⁹

Por otro lado, las especies *Moraxella macacae*, *Moraxella boevei* y *Moraxella osloensis* comparten con los miembros del género *Psychrobacter* la siguiente secuencia de aminoácidos en la inserción: Prolina-Ácido aspártico-Asparagina-Metionina-Ácido aspártico. Este hallazgo resulta interesante desde el punto de vista médico, considerando que las cepas de *Psychrobacter* aisladas en humanos pertenecen mayormente a la especie *P. immobilis* y aunque no se consideran clínicamente relevantes, han sido reportadas como patógenos oportunistas.⁷

Las inserciones analizadas no sólo representan un aporte teórico para el conocimiento de la biología de *Pseudomonadaceae* y *Moraxellaceae*, constituyen además marcadores moleculares útiles para futuros estudios genéticos y bioquímicos, además de poseer un valor práctico como caracteres distintivos en estudios taxonómicos y filogenéticos en estas importantes familias.

CONCLUSIONES

El análisis de las proteínas permitió la estimación de inserciones que pueden ser utilizadas como marcadores moleculares que complementan los estudios taxonómicos y filogenéticos en las familias *Pseudomonadaceae* y *Moraxellaceae*. La proteína ADN polimerasa I presenta una inserción de un aminoácido que permite distinguir a las familias *Pseudomonadaceae* y *Ventrosimonadaceae*, además de una mayor de 11 aminoácidos que soporta la monofilia de los géneros *Psychrobacter* y *Moraxella*. Mientras que la proteína ADN polimerasa III (subunidad alfa) mostró una inserción de cinco aminoácidos característica de *Moraxellaceae*, que además de constituir un marcador importante para la clasificación taxonómica y la identificación molecular en esta familia, confirma que sus miembros constituyen un grupo monofilético.

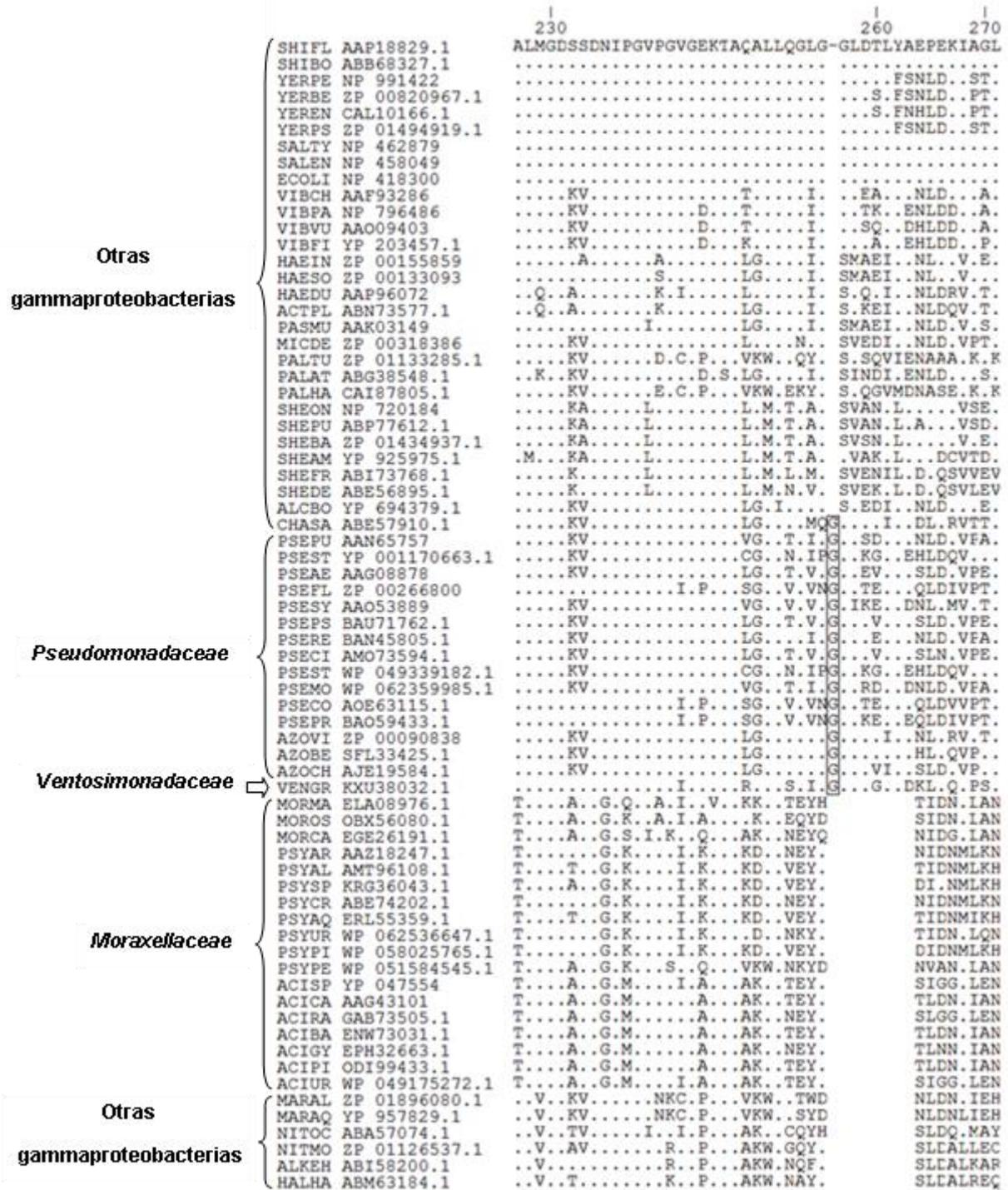


Figura. 1. Segmento del alineamiento de la proteína ADN polimerasa I mostrando inserción de un aminoácido en la familia Pseudomonadaceae, representada por los géneros Pseudomonas y Azotobacter, presente además en las especies Ventosimonas gracilis y Chromohalobacter salexigens.

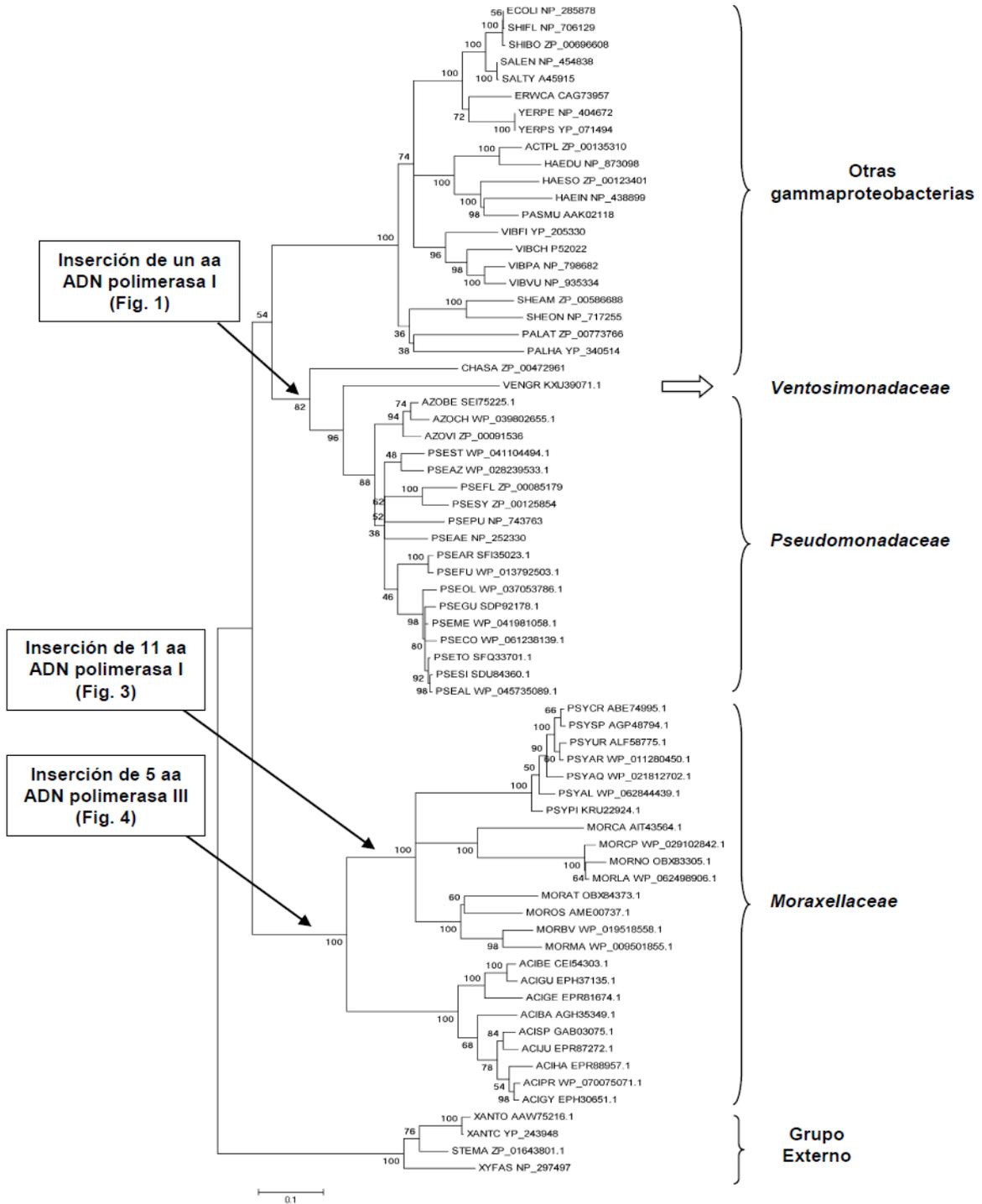


Figura. 2. *Árbol filogenético consenso de Máxima Verosimilitud obtenido a partir del alineamiento concatenado de las dos proteínas analizadas. Los números en los nodos internos indican los valores de Bootstrap, las flechas indican las ramas donde se estima hayan ocurrido los eventos moleculares que originaron las inserciones.*

		1020	1040	1050	1060	
		VHKDDVCAVAKQIHQLMENCT	-----	RLDVPLLVEVGS		
Otras gammaproteobacterias	SHIFL AAP18829.1	
	SHIBO ABB68327.1	..ESVLSAEQK.RE...QSM	Q.A...K.D..V.	
	YERPE NP 991422	..ESVLSAEQK.RE...QSM	Q.A...K.D..V.	
	YERBE ZP 00820967.1	..ESVLSAEQK.RE...QSM	Q.A...K.D..V.	
	YEREN CAL10166.1	..ESVLSAEQK.RE...QSM	Q.A...K.D..V.	
	YERPS ZP 01494919.1	..ESVLSAEQK.RE...QSM	Q.A...K.D..V.	
	SALTY NP 462879L.....R.....I.....	
	SALEN NP 458049L.....R.....I.....	
	ECOLI NP 418300	
	VIBCH AAF93286	.KESSLSEIESKVQ...SAA	E.A...VA.A.H.	
	VIBPA NP 796486	.EESLSEIESKVQK...SAA	E.K...VA.A.H.	
	VIBVU AAO09403	.EESCLTEIESKVQ...SAA	Q.N...VA.A.H.	
	VIBFI YP 203457.1	.KE.AL.E.TTKVRE...CAA	Q....VA.A.F.	
	HAEIN ZP 00155859	.RSEK.AFFRE..K.H..AAA	E.V...I...V.	
	SHEFR ABI73768.1	.DEAÇAETLTKVCD..AÇAA	S...T..A.A.I.	
SHEDE ABE56895.1	.DEAÇAETLTKAK.CL..AÇAA	D...T..A.A.I.		
ALCBO YP 694379.1	.AD.Q..DLV.EVKAR..SAA	E.K...I..A.A.		
CHASA ABE57910.1	.KEAQ...FTAVR.R..GAA	K.....T..ANA.		
Pseudomonadaceae	PSEPU AAN65757	.RE.L.QQ.KDE.R.H.SCAA	Q.....A.V.	
	PSEST YP 001170663.1	.RE.L.EQ.REA.CP..SGAA	Q.....A.V.	
	PSEAE AAG08878	.RE.L.EQ.CEG.RP..SGAA	T.....V.A.V.	
	PSEFL ZP 00266800	.RE.L..Q.REE.RVH.SCAA	K.....V.	
	PSESY AAO53889	.RE.L..QISE..RPH.SCAA	E.A.....V.	
	PSEPS BAU71762.1	.RE.L.ER.RDTLRP..SGAA	E.....V.A.V.	
	PSERE BAN45805.1	.RE.L.EE.SAK.RP..SGAA	E.....V...T.	
	PSECI AMO73594.1	.RE.L.EE..AKLRD..GKAA	Q.A...I..T...	
	PSEST WP 049339182.1	.RE.L.EQ.REA.CP..SGAA	Q.....A.V.	
	PSEMO WP 062359985.1	.RE.L.EQ.KDE.RGY.SCAA	D.....V.	
	PSECO AOE63115.1	.RE.L.EQ.S.E.R.H.SAAA	T.....V.	
	PSEPR BAO59433.1	.RE.L..Q.REE.RGH.SCAA	T.....V.	
	Ventrosimonadaceae	AZOVI ZP 00090838	.RE.Q.E.LKAGLLPR.SCAA	A.....A.V.
		VENGR KXU38032.1	.RQ.LLQS.RE.LRR...AA	S.S.....T...
		MORMA ELA08976.1	ADEHKAYEIGEL.KNT.Q.VFCDTAKKLGWQVDFEV.
MOROS OBX56080.1		ADENK..EI..L.KNA.QDVLSTAKKKGWQVDFEV...I.	
MORCA EGE26191.1		.DT.KAHDIGNL.KTA.Q.ALTDIATKKGWQVDFEFV..I..I.	
PSYAR AAZ18247.1		.LANK..EISQL.TEA.Q.VLITATAVEKGNVNFTD..	
PSYAL AMT96108.1		.EA.K.G..SQL.THA.QDVLTTTAVDKGNVNFTD..	
PSYSP KRG36043.1		.EA.K..E.SQ.L.TEA.QDVLTTTAVEKGNVNFTD..	
PSYCR ABE74202.1		.EA.K..EISQL.TNA.QDVLITATAVEKGNVNFTD..	
PSYAQ ERL55359.1		.EA.K..EISQL.TEA.QDVLTTTAAQKGNVNFTD..	
PSYUR WP 062536647.1		.EA.KAADIS.L.KNA.QEVLSTTAVASGNVNFTDI.	
PSYPI WP 058025765.1		.EA.K...SQL.TEA.QDVLRTTAVDKGNVNFTD..	
PSYPE WP 051584545.1		.EA.K..EISEL.KNA.Q.VLSDTAKEMGNVNFT.V.	
ACISP YP 047554		.EA.LA.EL.PKIAET.QSVV	NIS.....Q.	
ACICA AAG43101		ADQNIAEELS...AKV..SVV	EIS...V...Q.	
ACIRA GAB73505.1	.DENIA.EL.P.LAEV..SVV	EIS.....K.		
ACIBA ENW73031.1	.DSNIA.ELS...ADV.QSVL	EIS...V...Q.		
ACIGY EPH32663.1	ACAAIA.ELS...AEV.QSVL	EIS..FV...Q.		
ACIPI ODI99433.1	ADQNIAEELS...ATV..SVV	KIS...V...Q.		
ACIUR WP 049175272.1	.EA.LA.EL.PKIAET.QSVV	EIS...V...K.		
Otras gammaproteobacterias	MARAL ZP 01896080.1	.RESA..TIREGLEKR.SAAA	S.....A.V.	
	MARAQ YP 957829.1	.REEA..K.KDGLVKR.SAAA	S.....A.V.	
	NITOC ABA57074.1	.AE.KLE.TIPA.REN.AAAA	Q.K...I..I...	
	NITMO ZP 01126537.1	.PTP..Q...ER.RAF.VGAA	E.S...T..A.W.	

Figura. 3. Alineamiento de la proteína ADN polimerasa I mostrando inserción de 11 aminoácidos en los géneros *Psychrobacter* y *Moraxella*.

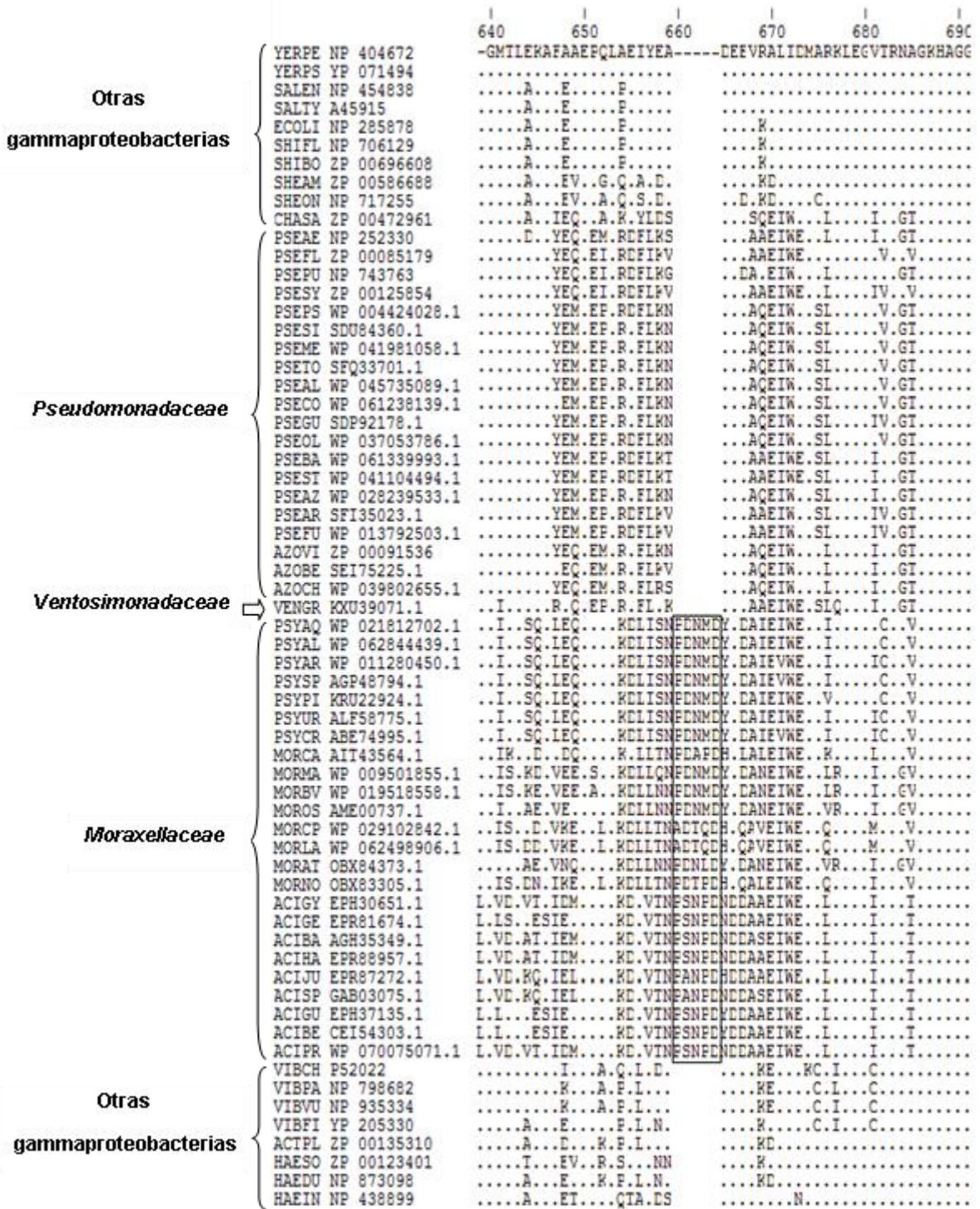


Figura. 4. Segmento del alineamiento de la subunidad alfa de la proteína ADN polimerasa III, que muestra inserción de 5 aminoácidos característica de la familia Moraxellaceae.

Nomenc.	Especie	Nomenc.	Especie
ACIBA	<i>Acinetobacter baumannii</i>	PSECI	<i>Pseudomonas citronellolis</i>
ACIBE	<i>Acinetobacter bereziniae</i>	PSECO	<i>Pseudomonas corrugata</i>
ACICA	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	PSEFU	<i>Pseudomonas fulva</i>
ACIGE	<i>Acinetobacter gernerii</i>	PSEFL	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
ACIGU	<i>Acinetobacter guillouiae</i>	PSEGU	<i>Pseudomonas guguanensis</i>
ACIGY	<i>Acinetobacter gyllenbergii</i>	PSEME	<i>Pseudomonas mendocina</i>
ACIHA	<i>Acinetobacter haemolyticus</i>	PSEMO	<i>Pseudomonas mosselii</i>
ACIJU	<i>Acinetobacter junii</i>	PSEOL	<i>Pseudomonas oleovorans</i>
ACIPI	<i>Acinetobacter pittii</i>	PSEPU	<i>Pseudomonas putida</i>
ACIPR	<i>Acinetobacter proteolyticus</i>	PSEPR	<i>Pseudomonas protegens</i>
ACIRA	<i>Acinetobacter radioresistens</i>	PSEPS	<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>
ACISP	<i>Acinetobacter sp.</i>	PSERE	<i>Pseudomonas resinovorans</i>
ACIUR	<i>Acinetobacter ursingii</i>	PSEST	<i>Pseudomonas stutzeri</i>
ACTPL	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	PSESI	<i>Pseudomonas sihuiensis</i>
ALCBO	<i>Alcanivorax borkumensis</i>	PSESY	<i>Pseudomonas syringae</i>
ALKEH	<i>Alkalilimnicola ehrlichei</i>	PSETO	<i>Pseudomonas toyotomiensis</i>

AZOCH	<i>Azotobacter chroococcum</i>	PSYAR	<i>Psychrobacter arcticus</i>
AZOBE	<i>Azotobacter beijerinckii</i>	PSYAL	<i>Psychrobacter alimentarius</i>
AZOVI	<i>Azotobacter vinelandii</i>	PSYAQ	<i>Psychrobacter aquaticus</i>
CHASA	<i>Chromohalobacter salexigens</i>	PSYCR	<i>Psychrobacter cryohalolentis</i>
ECOLI	<i>Escherichia coli</i>	PSYPE	<i>Psychrobacter phenylpyruvicus</i>
HAEDU	<i>Haemophilus ducreyi</i>	PSYPI	<i>Psychrobacter piscatorii</i>
HAEIN	<i>Haemophilus influenzae</i>	PSYSP	<i>Psychrobacter sp.</i>
HAESO	<i>Haemophilus somnus</i>	PSYUR	<i>Psychrobacter urativorans</i>
HALHA	<i>Halorhodospira halophila</i>	SALEN	<i>Salmonella enterica</i>
MARAL	<i>Marinobacter algicola</i>	SALTY	<i>Salmonella typhimurium</i>
MARAQ	<i>Marinobacter aquaeolei</i>	SHEAM	<i>Shewanella amazonensis</i>
MICDE	<i>Microbulbifer degradans</i>	SHEBA	<i>Shewanella baltica</i>
MORCA	<i>Moraxella catarrhalis</i>	SHEDE	<i>Shewanella denitrificans</i>
MORMA	<i>Moraxella macacae</i>	SHEFR	<i>Shewanella frigidimarina</i>
MOROS	<i>Moraxella osloensis</i>	SHEON	<i>Shewanella oneidensis</i>
MORBV	<i>Moraxella boevrei</i>	SHEPU	<i>Shewanella putrefaciens</i>
MORCP	<i>Moraxella caprae</i>	SHIBO	<i>Shigella boydii</i>

MORLA	<i>Moraxella lacunata</i>	SHIFL	<i>Shigella flexneri</i>
MORAT	<i>Moraxella atlantae</i>	STEMA	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
MORNO	<i>Moraxella nonliquefaciens</i>	VENGR	<i>Ventosimonas gracilis</i>
NITMO	<i>Nitrococcus mobilis</i>	VIBCH	<i>Vibrio cholerae</i>
NITOC	<i>Nitrosococcus oceani</i>	VIBFI	<i>Vibrio fischeri</i>
PALAT	<i>Pseudoalteromonas atlantica</i>	VIBPA	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>
PALHA	<i>Pseudoalteromonas haloplanktis</i>	VIBVU	<i>Vibrio vulnificus</i>
PALTU	<i>Pseudoalteromonas tunicata</i>	XANTO	<i>Xanthomonas oryzae</i>
PASMU	<i>Pasteurella multocida</i>	XANTC	<i>Xanthomonas campestris</i>
PSEAE	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	XYFAS	<i>Xylella fastidiosa 9a5c</i>
PSEAR	<i>Pseudomonas argentinensis</i>	YERPE	<i>Yersinia pestis</i>
PSEAL	<i>Pseudomonas alcaliphila</i>	YERPS	<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>
PSEAZ	<i>Pseudomonas azotifigens</i>	YERBE	<i>Yersinia bercovieri</i>
PSEBA	<i>Pseudomonas balearica</i>	YEREN	<i>Yersinia enterocolitica</i>

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.

- Garrity GM, Bell JA, Lilburn T. Order Pseudomonadales. En Brenner DJ, Krieg R and Staley JT (Eds.). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2nd Ed., Vol.2, Part B, Springer, New York, 323, 2005.
- Palleroni NJ. Genus I. *Pseudomonas*. En Brenner DJ, Krieg R and Staley JT (Eds.). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2nd Ed., Vol.2, Part B, Springer, New York, 323-379, 2005.
- Zhang Z, Wu Y, Gao M, Zhang J, Kong Q, Liu Y, *et al.* Disruption of PAMP-Induced MAP Kinase Cascade by a *Pseudomonas syringae* Effector Activates Plant Immunity Mediated by the NB-LRR Protein SUMM2. *Cell Host & Microbe*; 2012;11(3):253-63.
- Wiig JA, Hu Y, Ribbe MW. NifEN-B complex of *Azotobacter vinelandii* is fully functional in nitrogenase FeMo cofactor assembly. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*; 2011;108(21):8623-8627.
- Noar JD, Bruno-Bárcena JM. Complete genome sequences of *Azotobacter vinelandii* wild-type strain CA and tungsten-tolerant mutant strain CA6. *Genome Announc*; 2013;1(3):e00313-13.
- Sanchén A, Rodríguez Y, Martínez RY, Estévez I. Resistencia antimicrobiana en bacterias potencialmente patógenas aisladas en nasofaringes de niños de círculos infantiles. *Revista Archivo Médico de Camagüey*; 2011;15:516-27.
- Deschaght P, Janssens M, Vanechoutte M, Wauters G. *Psychrobacter* isolates of human origin, other than *Psychrobacter phenylpyruvicus*, are predominantly *Psychrobacter faecalis* and *Psychrobacter pulmonis*, with emended description of *P. faecalis*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*; 2012;62:671-4.
- Prado A, Arias NL, Chávez M, Cabrera CE, Gómez RF. Caracterización fenotípica de aislamientos de *Acinetobacter baumannii* en una institución de salud de alta complejidad de Cali. *Biomédica*; 2014;34:101-7.
- Gupta RS. Identification of conserved indels that are useful for classification and evolutionary studies. *Methods in Microbiology*. Academic Press, 2014.
- Gupta RS. Impact of genomics on the understanding of microbial evolution and classification: the importance of Darwin's views on classification. *FEMS Microbiology Reviews*. 2016;40:520-553.
- UniProt Consortium. UniProt: a worldwide hub of protein knowledge. *Nucleic Acids Res*; 2019;47:D506-D515.
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*; 1997;25:4876-4882.

- Hall BG. Comparison of the accuracies of several phylogenetic methods using protein and DNA sequences. *Molecular Biology and Evolution*; 2004;22:792-802.
- Naushad S, Lee B, Gupta, RS. Conserved signature indels and signature proteins as novel tools for understanding microbial phylogeny and systematics: identification of molecular signatures that are specific for the phytopathogenic genera *Dickeya*, *Pectobacterium* and *Brenneria*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*; 2014;64:366-383.
- Felsenstein J. *Inferring phylogenies*. Sinauer Associates, Inc., Massachusetts, 2004.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Genetics*; 2011;28:2731-2739.
- Whelan S, Goldman N. A General Empirical Model of Protein Evolution Derived from Multiple Protein Families Using a Maximum-Likelihood Approach. *Molecular Biology and Genetics*; 2001;18(5): 691-699.
- Pattengale ND, Alipour M, Bininda-Emonds ORP *et al.* How many bootstrap replicates are necessary. *Journal of Computational Biology*; 2010;17:337-354.
- Cutiño-Jimenez AM, Martins-Pinheiro M, Lima WC, Martin-Tornet A, Morales O, Martins-Menck CF. Evolutionary placement of Xanthomonadales based on conserved protein signature sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*; 2010;54(2):524-534.
- Gao B, Gupta RS. Phylogenetic Framework and Molecular Signatures for the Main Clades of the Phylum Actinobacteria. *Microbiology and Molecular Biology*: 2012;76(1):66-112.
- Bhandari V, Naushad S, Gupta RS. Protein based molecular markers provide reliable means to understand prokaryotic phylogeny and support Darwinian mode of evolution. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*; 2012;2(98).
- Ajawanawong P, Baldauf S. Evolution of protein indels in plants, animals and fungi. *BMC Evolutionary Biology*; 2013;13:140-151.
- Lin JY, Hobson WJ, Wertz JT. *Ventosimonas gracilis* gen. nov., sp. nov., a member of the Gammaproteobacteria isolated from *Cephalotes varians* ant guts representing a new family, Ventosimonadaceae fam. nov., within the order 'Pseudomonadales'. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*; 2016;66(8):2869-75.
- Gellatly SL, Hancock REW. *Pseudomonas aeruginosa*: new insights into pathogenesis and host defenses. *Pathogens and Disease*; 2013;67(3):159-73.
- Corrales F, López-Cánovas L. Las Infecciones Nosocomiales en Cuba y su Control mediante las Técnicas Moleculares de Tipificación de Microorganismos. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*; 2016;47(1):27-32.

- Yua X, Lundb SP, Scottc RA, Greenwaldd JW, Recordsd AH, Nettleton D, *et al.* Transcriptional responses of *Pseudomonas syringae* to growth in epiphytic versus apoplastic leaf sites. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America; 2013;110(5):E425-E434.
- Cutiño AM, Barrera L, de la Puente V, Peña H. Marcadores moleculares de tipo inserción en bacterias de importancia médica de las familias *Moraxellaceae* y *Helicobacteraceae* (Phylum Proteobacteria). MEDISAN; 2018;22(1):40-47.
- Ho J, Adeolu M, Khadka B, Gupta RS. Identification of distinctive molecular traits that are characteristic of the phylum “Deinococcus-Thermus” and distinguish its main constituent groups. Systematic and Applied Microbiology; 2016;39(7):453-463.
- Prado A, Arias NL, Chávez M, Cabrera CE, Gómez RF. Caracterización fenotípica de aislamientos de *Acinetobacter baumannii* en una institución de salud de alta complejidad de Cali. Biomédica; 2014;34:101-7.