

**El núcleo genómico común de cepas de *Ralstonia solanacearum* y su  
relación con la patogénesis en plantas**

Stiven Saldarriaga Buriticá

Trabajo de grado para optar al título de Biólogo

Asesor:  
Juan Esteban Pérez Jaramillo, Ph, D.

Co-asesor:  
Cristian David Grisales Vargas

Universidad de Antioquia  
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales  
Instituto de Biología  
El Carmen de Viboral  
2020

## Resumen

La bacteria *R. solanacearum* comprende un complejo de especies con una gama muy amplia de cepas que varían en sus orígenes geográficos, rangos de hospedadores y determinantes de patogenicidad y es considerada como uno de los fitopatógenos con un efecto más devastador en la producción agrícola a nivel mundial. Durante la interacción *Ralstonia solanacearum*-hospedero vegetal, se ha demostrado que varios rasgos genéticos y fenotípicos contribuyen a la patogenicidad y virulencia de las cepas de *R. solanacearum*. Mediante el uso de datos de transcriptoma de diferentes cepas obtenidos durante el proceso de infección de sus respectivos hospedadores vegetales, se identificaron las funciones del núcleo común de genes diferencialmente expresados entre las cepas de *R. solanacearum* UW163, IBSBF1503 y UY031. A través del uso de herramientas bioinformáticas que permiten predecir el potencial codificante y sus posibles funciones, se analizaron los genes pertenecientes al núcleo común identificado en el proceso de patogénesis, y se encontraron diferencialmente expresadas funciones relacionadas con procesos de transporte y metabolismo de azúcares, detoxificación de compuestos celulares nocivos como algunos compuestos nítricos, entre otros. Se discuten las probables funciones del núcleo común de genes entre las cepas de *R. solanacearum* UW163, IBSBF1503 y UY031 en el contexto de un posible mecanismo común de infección entre estas diferentes cepas que pueda ser empleado para futuros estudios de control biológico de este patógeno.

**Palabras clave:** Patogénesis, Interacción, RNA-seq dual, Núcleo genómico, Bioinformática.

## Contenido

<b>1. Marco teórico</b> .....	4
<b>2. Problemática</b> .....	9
<b>3. Justificación</b> .....	9
<b>4. Objetivos</b> .....	9
4.1 Objetivo general.....	10
4.2 Objetivo específicos.....	10
<b>5. Métodos</b> .....	11
5.1 Núcleo genómico asociado a la patogénesis .....	11
5.2 Búsqueda de la funcionalidad del núcleo candidato virulento .....	12
5.3 Elección de los genes del núcleo virulento candidato .....	13
5.4 Identificación del potencial codificante de los genes asociados al núcleo virulento .....	13
<b>6. Resultados</b> .....	14
6.1 Elección de los genes del núcleo virulento candidato para analizar ...	14
6.2 Funcionalidad del núcleo virulento candidato .....	14
6.3 Identificación del potencial codificante del núcleo virulento candidato .....	15
6.4 Genes del núcleo virulento candidato importantes en la patogénesis	15
<b>7. Discusión</b> .....	19
<b>8. Referencias</b> .....	22

## 1. Marco teórico

*Ralstonia solanacearum* (Smith 1896) es una bacteria habitante del suelo causante del marchitamiento bacteriano en una gran variedad de cultivos de importancia económica y es reconocida como una de las bacterias fitopatógenas más importantes debido a su letalidad, persistencia, distribución y amplio rango de hospederos (Denny., 2006; Genin and Denny., 2012). *R. solanacearum* está compuesta por múltiples grupos genéticos, por lo que se considera como un complejo de especies (Fegan y Prior, 2005). En las últimas décadas se presentaron varios esquemas de clasificación que incluyen razas, biovares, filotipos y secuevares según diferentes criterios (Fegan y Prior, 2005). Recientemente, Safni *et al.* (2014) propuso modificar la clasificación en tres genoespecies sobre la base del análisis del genoma, que comprenden *R. solanacearum* (solo filotipo II), *Ralstonia syzygii* (solo filotipo IV) y *Ralstonia pseudosolanacearum* (filotipos I y III). De todos los filotipos, el filotipo I infecta la más amplia gama de especies de plantas. Se ha reportado que este patógeno afecta a más de 250 especies vegetales, incluidos cultivos ornamentales estratégicos y cultivos de solanáceas, generando impactos económicos considerables (Blomme *et al.*, 2017). El marchitamiento bacteriano causado por *R. solanacearum* es considerado una de las enfermedades de plantas más destructivas a nivel mundial, donde las pérdidas de cosecha pueden alcanzar hasta el 100% en banano, el 90% en tomate y papa, el 30% en tabaco (Elphinstone., 2005). En una encuesta realizada a 458 patólogos bacterianos en todo el mundo para votar sobre las 10 bacterias más patógenas en términos de su importancia científica y económica, *R. solanacearum* obtuvo el segundo lugar (Mansfield *et al.*, 2012). En Colombia, *R. solanacearum* es el agente causal de una devastadora enfermedad conocida como Moko, la cual ha reducido seriamente la producción de plátano y banano en las principales áreas sembradas. Las áreas más afectadas en Colombia por marchitamiento bacteriano se presentan en la región de Urabá, departamento de Antioquia, donde se han erradicado áreas extensas de cultivos de plátano y banano infestados (Castañeda y Espinosa, 2005). En el Urabá Antioqueño, el control de la enfermedad que normalmente se emplea requiere la eliminación de plantas sanas alrededor del foco de infección, así como de prolongados períodos de

cuarentena de la zona afectada. La principal razón para que esta sea la alternativa de manejo más comúnmente utilizada es la ausencia de productos, de origen químico o biológico, que muestren eficacia sostenible en el tiempo controlando la enfermedad. Por lo tanto, el control vigente basado en la exclusión y erradicación del material infectado conlleva también a la pérdida de material vegetal sano y a la inutilización de tierras fértiles. En consecuencia, la puesta a punto de una estrategia de manejo de la enfermedad que controle los brotes, erradique y prevenga la dispersión de la bacteria, y que además sea compatible con prácticas ambientalmente sostenibles y costo-efectivas es una necesidad en Antioquia y Colombia.

*R. solanacearum* normalmente infecta a la planta a través de heridas en las raíces, ingresa al cuerpo vegetal, coloniza los vasos de xilema y luego se mueve rápidamente por todo el sistema vascular afectando la eficiencia del transporte de agua y causando un marchitamiento letal generalizado (Hayward 1991). La capacidad de este fitopatógeno para infectar plantas y multiplicarse dentro del tejido vegetal depende de proteínas secretadas como adhesinas, toxinas y enzimas degradantes (Genin & Denny., 2012). Las proteínas asociadas a la virulencia se pueden secretar a través de vesículas de la membrana externa, que permiten el transporte de grandes cantidades de proteínas desde el periplasma bacteriano al medio extracelular (Bonnington y Kuehn 2013, Ellis y Kuehn 2010). Actualmente, la regulación de la patogenicidad en *R. solanacearum* se centra en un sistema de secreción esencial para la patogenicidad y que consiste en una jeringa molecular llamada sistema de secreción de tipo 3 (T3SS), que administra factores de virulencia, los efectores de tipo 3 (T3E), a las células huésped. En conjunto, estos efectores constituyen una de las principales armas del arsenal de patogenicidad de *R. solanacearum*, como es el caso de muchas otras bacterias fitopatógenas gramnegativas como *Pseudomonas* spp., *Xanthomonas* spp. Y *Erwinia* spp. (Lonjon *et al.*, 2016). A través de este sistema, las bacterias patógenas de la planta envían de 15 a 30 proteínas efectoras a la célula huésped para permitir la infección bacteriana mediante la explotación de las vías de señalización de la planta, suprimiendo así sus sistemas de defensa (Ahmad *et al.*, 2017). También otros factores como el polisacárido extracelular (EPS), el sistema de secreción de tipo dos (T2SS), el

lipopolisacárido (LPS) y las lectinas desempeñan papeles cruciales en el proceso de patogenicidad (Jha *et al.*, 2005, Korotkov *et al.*, 2012, Nivaskumar y Francetic., 2014). Como patógeno vascular y de las raíces, *R. solanacearum* es un sistema modelo para estudiar la patogenicidad bacteriana (Mansfield *et al.*, 2012). Sin embargo, como un patógeno vegetal que comprende un "complejo de especies", su red reguladora con respecto a los determinantes de patogenicidad aún no está clara.

Los enfoques combinatorios que ofrecen las ómicas, que comprenden genómica, metagenómica, transcriptómica, proteómica, lipidómica, glicómica y metabolómica, constituyen enfoques complementarios que permiten dilucidar de manera detallada el proceso de infección y sus determinantes (Hemaiswarya *et al.*, 2013, Marco y Abram 2019). Los datos ómicos recopilados de patógenos y/o células infectadas son componentes cruciales que permiten, a través de análisis bioinformáticos, la construcción y el análisis de genes en redes reguladoras, metabólicas y proteína-proteína específicas de la infección (Cerveau y Jackson 2016, Durmuş *et al.* 2015, Quinn y Chang 2016, Schulze *et al.* 2015, Westermann *et al.*, 2012 - 2017). En la última década, se han realizado esfuerzos para dilucidar el ciclo de vida, la patogenicidad y los mecanismos de adaptación de patógenos vegetales utilizando diferentes herramientas (Kim *et al.*, 2016 ; Soto-Suarez *et al.*, 2010 ; Wang *et al.*, 2017 ; Zhang *et al.*, 2013). Especial atención merece la herramienta RNA-Seq, el cual es un método poderoso para el análisis de transcriptomas de alto rendimiento basado en la medición de los niveles de expresión génica en diferentes condiciones. Esta tecnología ha sido empleada con éxito para examinar la expresión diferencial de genes en diferentes patosistemas. Por ejemplo, Orshinsky *et al.* (2012), determinaron que glicosil hidrolasas, proteasas y transportadores ABC son importantes en la patogénesis llevada a cabo por *Sclerotinia homoeocarpa* en plantas del género *Agrostis*. Los transportadores ABC se asocian a la resistencia a múltiples fármacos, y pueden ser importantes para el desarrollo de resistencia tanto a los fungicidas como a los compuestos de defensa de las plantas. Adhikari *et al.* (2012), trabajando con el patógeno oomiceto *Pseudoperonospora cubensis*, agente causal del mildiú vellosa en cucurbitáceas, observó la rápida inducción de genes clave relacionados con la defensa, incluidas catalasas, quitinasas, lipoxigenasas,

peroxidasas e inhibidores de proteasa al día uno después de la inoculación, lo que sugiere la detección del patógeno por parte del huésped. Los análisis de redes de coexpresión revelaron redes transcripcionales con distintos patrones de expresión, incluida la regulación negativa de genes de respuesta de defensa 2 días después de la inoculación, lo que sugiere una supresión coordinada de las respuestas del huésped por parte del patógeno. Wang *et al.*, 2017 trabajando con dos cepas de *R. solanaceum* con diferentes grados de virulencia, denominadas RsH (patógena para Hawaii 7996, una variedad de tomate resistente a la mayoría de las cepas) y RsM (no patógena para Hawaii 7996), determinó que la patogenicidad estaba relacionada con la abundancia de proteínas relacionadas con la virulencia y el metabolismo, como la UDP-N-acetilglucosamina 2-epimerasa (epsC) y la isocitrato liasa (ICL), más abundantes en la cepa de alta patogenicidad RsH, comparado con RsM. Posiblemente las diferencias en patogenicidad observadas entre RsM y RsH puedan explicarse por diferencias en polisacáridos extracelulares (EPS) y proteínas relacionadas con el metabolismo del glioxilato.

Con el uso de las técnicas ómicas también se pueden investigar los conjuntos de genes particulares y globales en especies relacionadas, núcleo genómico y pangenoma respectivamente, con base en los datos de secuencias del genoma (Tettelin *et al.*, 2005). Los conceptos de núcleo genómico y pangenoma se introdujeron originalmente para integrar la información del genoma de las bacterias (Tettelin *et al.*, 2005), pero también se han aplicado frecuentemente para estudiar los genomas de eucariotas (Cao *et al.*, 2011, Dunn *et al.*, 2012, Hirsch *et al.*, 2014, Read *et al.*, 2013). El pangenoma describe la relación de secuencias genéticas presentes y compartidas en los organismos estudiados (es decir, conjunto global de genes) que existen en organismos dentro del mismo clado filogenético, y comprende el núcleo genómico (secuencias de nucleótidos esenciales compartidas por todos los genomas en la cohorte), genoma dispensable (secuencias nucleotídicas compartidas por un subconjunto de genomas en la cohorte) y genes específicos de cepas (secuencias de nucleótidos que existen sólo dentro de un genoma particular en la cohorte) ( Medini *et al.*, 2005, Tettelin *et al.*, 2005). Este tipo de enfoques han venido siendo utilizados con los genomas secuenciados de

diversas cepas de *R. solanacearum* con el fin de encontrar genes claves en el proceso patogénico y así sentar las bases para el desarrollo de posibles estrategias de control. El primer genoma de *R. solanacearum* secuenciado fue el genoma GMI1000, publicado en el 2002 (Salanoubat *et al.*, 2002), y desde entonces las secuencias del genoma de 145 cepas están disponibles en bases de datos públicas como el NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/browse#!/prokaryotes/490>), o RalstoT3E (<https://iant.toulouse.inra.fr/bacteria/annotation/site/prj/T3Ev3>), y de éstas al menos 44 genomas se han secuenciado con la plataforma PacBio o poseen una cobertura muy profunda que permite usarlas para ensamblajes completos (Sabbagh *et al.*, 2019). Adicionalmente, la disponibilidad de datos del transcriptoma ha permitido la identificación de genes expresados diferencialmente. Por lo tanto, estudiar la interacción *R. solanacearum*-Hospedero, analizando los perfiles de expresión e identificando aquellos genes posiblemente implicados en el proceso patogénico, tiene el potencial de proporcionar vías para el posible control de la enfermedad (Kumar *et al.*, 2020; Wang *et al.*, 2017). Grisales-Vargas *et al.* (Comunicación personal) realizó la comparación preliminar de la expresión génica de las cepas de *R. solanacearum* UW163, IBSBF1503 y UY031. La cepa UW163 fue aislada en 1967 de plátano en Perú; se clasifica filogenéticamente como filotipo IIB4 y pertenece al patotipo causante de la enfermedad del banano Moko. La cepa IBSBF1503 se aisló en 1999 de pepino en Brasil; se clasifica filogenéticamente como filotipo IIB4 y pertenece al patotipo no patogénico para banano, pero patógena para las cucurbitáceas (Ailloud *et al.*, 2016). Finalmente, la cepa UY031 se clasifica filogenéticamente como filotipo IIB, sequevar 1, y fue originalmente aislada de papa (Puigvert *et al.*, 2017). Con las tres cepas mencionadas se logró identificar un núcleo genómico, y se planteó que el incremento en la expresión de dichos genes está relacionado con el mecanismo de patogénesis empleado por la bacteria para llevar a cabo la infección. En el presente trabajo se estudió la relación patógeno-huésped de *R. solanacearum* con algunos de sus hospederos vegetales, teniendo como referencia el núcleo genómico previamente identificado, seleccionando elementos de este núcleo que estuvieran diferencialmente expresados, presumiendo que el incremento en su expresión esté relacionado con el mecanismo de patogénesis empleado por la bacteria

para llevar a cabo la infección y se exploró su potencial para entender y dilucidar mecanismos clave que permitan encontrar un método eficiente para el manejo de *R. solanacearum*.

## **2. Problemática**

Durante la interacción de *R. solanacearum*-hospedero, se ha demostrado que varios rasgos contribuyen a la virulencia de las cepas de *R. solanacearum* ubicándolo como un patógeno de plantas de gran importancia, en parte porque existen una gama muy amplia de cepas que varían en sus orígenes geográficos, rangos de hospedadores y determinantes de patogenicidad (Mansfield *et al.*, 2012). Adicionalmente, el complejo *R. solanacearum* tiene una alta diversidad genética y una sobresaliente capacidad de supervivencia a largo plazo en el suelo y el agua (Addy *et al.*, 2019; Ahmad *et al.*, 2017). Durante la interacción entre *R. solanacearum* y la planta, se ha demostrado que varios rasgos genéticos, fenotípicos y adaptativos contribuyen a la virulencia de las cepas de *R. solanacearum* (Wang *et al.*, 2018). Las medidas de control actuales para el control y manejo de *R. solanacearum* basadas el uso de antibióticos están perdiendo su eficacia debido al desarrollo natural de resistencia bacteriana a estos agentes (Laxminarayan *et al.*, 2013; Luepke *et al.*, 2017; Lin *et al.*, 2017) y se reconocen como estrategias ambientalmente hostiles (Álvarez y Biosca., 2017; Buttimer *et al.*, 2017). Los cambios en la expresión génica del patógeno *R. solanacearum* pueden dar información clave acerca del proceso patogénico puesto que estos cambios controlan la transición desde una relación comensal a parasitaria con el hospedador, lo que tiene como objetivo subvertir el metabolismo o desarrollo del hospedador en beneficio del patógeno (Stes *et al.*, 2011).

## **3. Justificación**

En el presente estudio, aprovechando el enorme potencial que tiene la información albergada en las bases de datos públicas, utilizamos datos del transcriptoma expresados por las cepas de *R. solanacearum* UW163, IBSBF1503 y UY031 en hospederos específicos y compartidos, en la búsqueda

de un núcleo de genes presente en las tres cepas, presumiendo que su expresión está relacionada con el mecanismo de patogénesis empleado por la bacteria para llevar a cabo la infección. Ya que *R. solanacearum* es un patógeno que pertenece a un grupo ampliamente distribuido mundialmente además de pertenecer a un complejo de especies bastante diverso, existe la necesidad de encontrar una característica común en la patogénesis que puedan estar compartiendo este grupo de bacterias para diseñar un mecanismo que permita controlar y/o manejar la enfermedad que causan. En este trabajo se identificaron genes diferencialmente expresados en común en las tres cepas de *Ralstonia solanacearum* en su relación con sus respectivos hospederos, sentando un precedente para investigaciones futuras con la finalidad de encontrar un mecanismo común de patogenicidad. Estos resultados pueden ser interpretados como generadores de hipótesis que permitirán explorar herramientas, como el silenciamiento o la edición génica, para verificar experimentalmente que esos genes están efectivamente implicados en la patogénesis.

## **4. Objetivos**

### **4.1 Objetivo general**

- Identificación de la funcionalidad del núcleo genómico candidato asociado con la patogénesis en las cepas UW163, IBSBF1503, UY031 de *Ralstonia solanacearum*.

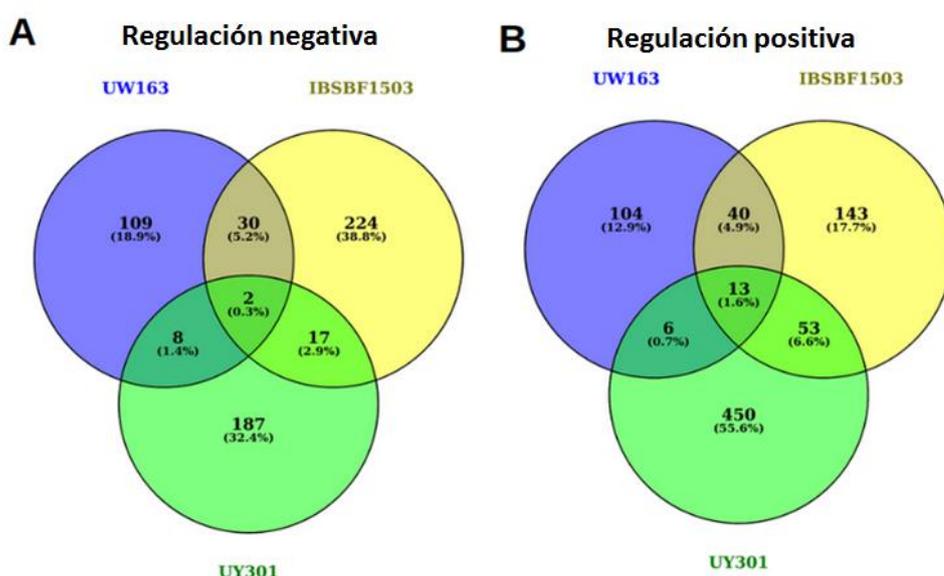
### **4.2 Objetivos específicos**

- Identificar las posibles funciones de los genes del núcleo genómico asociado a la patogénesis en tres cepas de *R. solanacearum* UW163, IBSBF1503 y UY031.
- Evidenciar el potencial codificante de los genes seleccionados del núcleo genómico de las tres cepas *R. solanacearum* UW163, IBSBF1503 y UY031.

## 5. Métodos

### 5.1. Núcleo genómico asociado a la patogénesis

El núcleo candidato asociado a la patogénesis base del presente trabajo fue identificado por Grisales-Vargas *et al.* (Comunicación personal) por medio del análisis de datos de transcriptoma que cumplieran con los siguientes criterios de inclusión: i) datos presentes en repositorios públicos obtenidos mediante RNAseq; ii) que el estudio cuente al menos con dos réplicas por tratamiento; iii) que haya presencia del respectivo control; y iv) que la cepa de *R. solanacearum* estudiada se encuentre correctamente identificada y sin ambigüedades taxonómicas. Con estos criterios de inclusión se seleccionaron tres estudios que emplearon métodos de RNA-seq para determinar la expresión génica común entre las cepas de *Ralstonia solanacearum* UW163, IBSBF1503 y UY031 durante la infección de sus respectivos hospedadores vegetales (**Fig. 1**). De este núcleo candidato, se estudiará la funcionalidad de los genes diferencialmente expresados (DEGs) comunes entre las cepas de *R. solanacearum* mencionadas y su implicación en la patogénesis.



**Figura 1.** Núcleo virulento identificado por Grisales-Vargas *et al.* (Comunicación personal), de las cepas UW163, IBSBF1503 y UY031 de *Ralstonia solanacearum*. Relación de transcritos identificados en las cepas

pertenecientes a la regulación negativa o Downs (A) y los correspondientes a la regulación positiva (B).

## **5.2. Búsqueda de la funcionalidad del núcleo candidato virulento.**

Entre la información proporcionada en la tabla de cada una de las secuencias tenemos su loci, ubicación genómica (cromosoma, megaplásmido), media Log2FoldChange (índice de expresión diferencial, representando regulación positiva o negativa), clase (genes regulados positivamente (Up) o negativamente (Down), producto génico (Factor de transcripción o proteína, etc.)). Los criterios de selección tomados en cuenta para filtrar la información son: i) que las secuencias hayan sido identificadas en las tres cepas; y ii) que presenten un score alto en expresión diferencial. Luego, se buscaron las secuencias FASTA con NCBI BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>), que se utilizaron como datos de entrada para las diferentes herramientas de predicción basadas en la web.

La función de las proteínas se infirió analizando la similitud de su secuencia con otras proteínas de funciones bien caracterizadas. En caso de alto porcentaje de similitud en la identidad de secuencia, la anotación de una proteína con una función conocida se transfirió a la proteína con una función desconocida. Posteriormente, se utilizaron las secuencias FASTA ya obtenidas por medio de la búsqueda BLAST, en el análisis con la herramienta FACop (GSA pro v3) (<http://facop.molgenrug.nl>), la cual es empleada en la clasificación de genes para el análisis de enriquecimiento génico, pero que también brinda información importante para realizar la anotación de la proteína con datos sobre el producto génico, la descripción funcional y el ID del gen. En caso de no encontrar información relacionada en FACop usamos InterProScan 5.41-78.0 (Jones *et al.*, 2014) para encontrar la información de las proteínas con problemas en su anotación, las cuales además son corroboradas por medio de HMMER3 (Potter *et al.*, 2018). El enfoque más utilizado para encontrar similitudes entre dos o más proteínas es BLAST (Altschul *et al.*, 1990). Sin embargo, HMMER3 (Potter *et al.*, 2018) es uno de los métodos más utilizados para buscar en las bases de datos de secuencias homólogas de proteínas; éste utiliza modelos probabilísticos llamados modelos de perfil ocultos de Markov y es el programa de construcción de modelos subyacente a la base de datos PFAM (Finn *et al.*, 2014).

Adicionalmente se realizó un enriquecimiento de genes en la plataforma de KOBAS para identificar vías en las que estuvieran implicados los transcritos.

### **5.3. Elección de los genes del núcleo virulento candidato**

Los datos obtenidos se tabularon en una tabla de Excel, compuesta por los productos génicos identificados en el estudio transcriptómico realizado anteriormente. Se identificaron 110 secuencias diferencialmente expresadas para cada una de las cepas, que fueron filtradas mediante los siguientes parámetros básicos: i) Los transcritos deben haber sido identificados en cada una de las tres cepas de *R. solanacearum* incluídas en la comparación y ii) que correspondan a la regulación positiva por ser estas las más representadas (**Fig. 2**). Basados en la premisa de que en el proceso de interacción patógeno huésped, la adaptación y correcta coordinación de la maquinaria molecular facilita el proceso de colonización de la célula vegetal, posteriormente se eligieron los valores que presenten un índice de expresión (Media Log<sub>2</sub>FC) que esté entre 5 y 3.

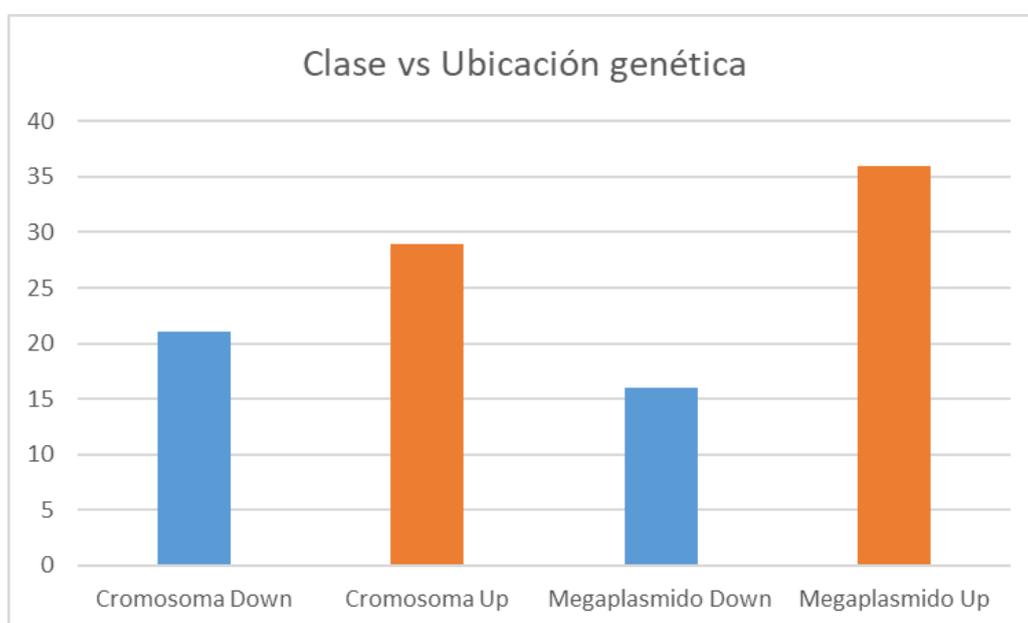
### **5.4. Identificación del potencial codificante de los genes asociados al núcleo virulento**

Para la identificación del potencial codificante el primer paso fue la retrotranscripción de la secuencia aminoacídica o proteica hacia su secuencia nucleotídica más probable, utilizando la herramienta web EMBOSS backtranseq (Rice *et al.*, 2000). Para esto se ingresó el archivo FASTA encontrado en la búsqueda BLAST cómo entrada y se obtuvo como archivo de salida la secuencia nucleotídica, que fue empleada para correr los programas CPC2 (Kang *et al.*, 2017) y PORTRAIT (Arrial *et al.*, 2009) los cuales implementan máquinas de soporte vectorial (SVM), método de clasificación basado en esquemas de k-mer y características intrínsecas de las secuencias que ayudan a predecir si el transcrito a analizar tiene probabilidades o no de convertirse en proteína (Wu 2010)

## 6. Resultados

### 6.1. Elección de los genes del núcleo virulento candidato para analizar

Después de haber realizado el proceso de filtrado no quedamos con: i) Los transcritos identificados en cada una de las tres cepas de *R. solanacearum* incluídas en la comparación (**25** secuencias); y ii) las secuencias que corresponden a la regulación positiva, por ser estas las más representadas (**Figura 2**), (**17** secuencias). Posteriormente se eligieron los valores que para la característica correspondiente al índice de expresión (Media Log2FC) estén entre 5 y 3, quedando al final **9** secuencias candidatas a analizar, siendo clasificados como potenciales productos diferencialmente expresados.



**Figura 2.** Gráfica de “Ups” (Regulación positiva - barras naranjas) y “Downs” (Regulación negativa - barras azules) y ubicación genética (Cromosoma ó Megaplásmido). En el eje Y se representa la cantidad de genes para cada categoría.

### 6.2. Funcionalidad del núcleo virulento candidato

En la fase de anotación se identificaron productos relacionados con diferentes elementos según la herramienta utilizada, bien sea FaCop (GSEA pro v3) o Uniprot. A nivel general los resultados indican que la funcionalidad de los

transcritos apuntan hacia reguladores de transcripción, transporte de azúcares, transporte de oxígeno, transporte de electrones y productos implicados en el metabolismo de carbohidratos, sin embargo, es contrastante que la búsqueda realizada en FaCop (GSEA pro v3) tiene un nivel de profundidad más elevado logrando relacionar el transcrito con una función más puntual o específica. Por ejemplo, el producto génico AMP71847.1 con FaCop corresponde a una Maltoporina, y en Uniprot está clasificada como una Porina. En general las funciones más representadas corresponden al transporte de azúcares y a procesos de detoxificación (**Tablas 1 y 2**).

### **6.3. Identificación del potencial codificante del núcleo virulento candidato**

Según CPC2 se determinó que la mayoría de los productos génicos evaluados tienen alta probabilidad de ser transcritos a proteínas, solamente el producto AMP71443.1 obtuvo una probabilidad por debajo de 0,5 indicando que no es codificante. Sin embargo, al realizar una segunda predicción que permita corroborar estos resultados en una plataforma alterna (Portrait), la cual puede potencialmente brindar una cantidad más amplia de información al relacionar cada producto génico con su respectivo porcentaje sobre la predicción de codificar o no, encontramos que todos los productos génicos presentan un alto porcentaje de codificación superando el 80% y logramos identificar 5 productos génicos con un porcentaje de no codificación entre 15 y 18 % (**Tabla 3**). También se lograron identificar dos características informativas para cada uno de los transcritos, cómo la longitud de la secuencia aminoácidica encontrando secuencias peptídicas que van desde 102 la menor hasta 851 aminoácidos la mayor, además, nos informa sobre la integridad del marco abierto de lectura u ORF (**Tabla 3**).

### **6.4. Genes del núcleo virulento candidato importantes en la patogénesis**

Los resultados anteriores, además de la información respecto a la expresión diferencial de los genes escogidos postulan genes importantes en el proceso del mantenimiento de la integridad celular, que realizan funciones de oxidorreducción o desintoxicación celular, de compuestos nítricos altamente tóxicos a elevados

niveles en la célula (*hmp*, *RSc3398*, *norB*) los cuales representan el 33% de los transcritos elegidos. Además, identificamos que gran parte de éstos están implicados en el metabolismo y transporte de azúcares (*fruB(HI)*, *lamB*, *sacA*, *scrA*) y representan el 44% del total de los transcritos.

**Tabla 1.** Transcritos codificantes identificados mediante la fase de anotación usando el programa FaCop (GSEA pro v3).

Tabla 1							FaCop (GSEA pro v3)	
Locus_tag	UW163	IBSBF1503	UY031	Media Log2FC	Producto génico	Descripción	ID gen	
UW163_20470	+	+	+	3,151995101	AMP71850.1	Proteína A de control de catabolitos	ccpA	
UW163_20450	+	+	+	3,906865303	AMP71846.1	Proteína de transferencia de multifosforilo	fruB(HI)	
UW163_04390	+	+	+	4,129936698	AMP68768.1	Flavoheмоproteína	hmp	
UW163_20455	+	+	+	4,305581393	AMP71847.1	Maltoporina	lamB	
UW163_16320	+	+	+	5,606726338	AMP71121.1	Subunidad B de óxido nítrico reductasa	norB	
UW163_04385	+	+	+	3,025940406	AMP68767.1	Policétido ciclasa	PI87_07835	
UW163_20460	+	+	+	4,230308608	AMP71848.1	Sacarosa-6-fosfato hidrolasa	sacA	
UW163_20465	+	+	+	4,042024289	AMP71849.1	Componente EIBC específico de sacarosa	scrA	
UW163_18125	+	+	+	4,468070176	AMP71443.1	Flavoproteína	RSc3398	

**Tabla 2.** Transcritos codificantes identificados mediante la fase de anotación usando Uniprot.

Tabla 2						Uniprot	
Locus_tag	UW163	IBSBF1503	UY031	Media Log2FC	Proceso biológico	Función molecular	
UW163_20470	+	+	+	3,151995101	Regulador de transcripción	Activador, represor	
UW163_20450	+	+	+	3,906865303	Transporte de azúcar	Quinasa	
UW163_04390	+	+	+	4,129936698	Transporte de oxígeno	Oxidoreductasa	
UW163_20455	+	+	+	4,305581393	Transporte de azúcar	Porina	
UW163_16320	+	+	+	5,606726338	Transporte de electrones	Oxidoreductasa	
UW163_04385	+	+	+	3,025940406	Ciclasa	Biosíntesis policétido	
UW163_20460	+	+	+	4,230308608	Metabolismo carbohidratos	Hidrolasa	
UW163_20465	+	+	+	4,042024289	Transporte de azúcar	Quinasa, transferasa	
UW163_18125	+	+	+	4,468070176	Desintoxicación	Oxidoreductasa	

**Tabla 3.** Resultados del análisis del potencial codificante de las proteínas predichas en la fase de anotación

Potencial codificante	CPC2		PORTRAIT		Tabla 3	
ID	Etiqueta	% codificación	% codificación	% no codificante	Longitud del péptido (aa)	Integridad ORF
AMP68767.1	codificante	0,965	81,40%	18,60%	142	completo
AMP68768.1	codificante	1	83,72%	16,28%	402	completo
AMP71121.1	codificante	1	92,40%	7,60%	759	completo
AMP71443.1	no codificante	0,472	83,39%	16,61%	102	completo
AMP71846.1	codificante	1	84,55%	15,45%	851	completo
AMP71847.1	codificante	1	92,75%	7,25%	414	completo
AMP71848.1	codificante	1	81,01%	18,99%	477	completo
AMP71849.1	codificante	1	89,29%	10,71%	466	completo
AMP71850.1	codificante	1	93,83%	6,17%	341	completo

## 7. Discusión

En este estudio se emplearon datos provenientes de transcriptómica, más específicamente de RNAseq, para indagar acerca del mecanismo global utilizado por *R. solanacearum* en la interacción patogénica con diferentes hospedantes. Los datos de RNAseq fueron obtenidos de bases de datos públicas y debieron cumplir rigurosos criterios de inclusión para ser tenidos en cuenta en este estudio. Entre los resultados con potencial asociación a los procesos de patogénesis, no por ser efectores reconocidos, sino por haber presentado una importante expresión diferencial correlacionada con las necesidades metabólicas y de andamiaje para efectuar la virulencia, encontramos el producto del gen *hmp*, que participa en la desintoxicación de Óxido Nítrico (NO), mediante un proceso aeróbico, denominado reacción de óxido nítrico dioxigenasa (NOD), el cual utiliza O<sup>2</sup> y NADPH para convertir NO en nitrato, este proceso protege a la bacteria de varios compuestos nitrogenados nocivos de la planta. Se sabe que el gen *hmp* juega un papel central en la respuesta inducible al estrés por compuestos reactivos de nitrógeno (Poole 2020) lo que nos lleva a pensar que tiene un factor clave durante la infección de las plantas, ya que la desintoxicación puede desempeñar funciones sinérgicas en la patogénesis bacteriana al convertir el arma química del huésped en una fuente de energía. Otro producto génico importante encontrado en este estudio es el gen *ccpA*, el cual es un regulador transcripcional global de la represión de catabolitos de carbono (CCR) y activación de catabolitos de carbono (CCA), y que asegura un uso óptimo de la energía en diversas condiciones (Schumacher *et al.*, 2011). El gen *lamB*, está

relacionado con la translocación de maltodextrinas que facilitan la organización de un poro constituido por poliglucósidos con enlaces alfa 1-4, que resultan en una ruta hidrofóbica que sirve para guiar y seleccionar azúcares para el transporte a través de la membrana (Van Gelder *et al.*, 2001) lo que nos lleva a relacionarlo con procesos de obtención de energía para compensar los gastos de la patogénesis con azúcares del ambiente extracelular. Otro transcrito importante fue el gen ***fruB(HI)*** relacionado con el sistema de fosfotransferasa de azúcar dependiente de fosfoenolpiruvato (PTS de azúcar). Este es un importante sistema de transporte activo de carbohidratos, que cataliza la fosforilación de los sustratos de azúcar entrantes concomitantemente con su translocación a través de la membrana celular. El sistema de enzima II FruAB PTS está involucrado en el transporte de fructosa (de Crécy-Lagard *et al.*, 1995). El producto génico de ***norB*** está relacionado con un componente importante de la cadena respiratoria anaeróbica que transforma el nitrato en dinitrógeno (desnitrificación). NorB es la subunidad catalítica del complejo enzimático que gobierna la actividad de la bomba de protones a través de la membrana para desnitrificar las células bacterianas (Heiss *et al.*, 1989). De los genes mencionados hasta el momento los únicos que fueron identificados previamente fueron los genes relacionados con desnitrificación (*norB* y *hmp*). Estos genes hacen parte de la ruta que lleva a cabo la desnitrificación parcial (conversión reductora escalonada de nitrato en óxido nítrico) y la desintoxicación del óxido nítrico son reacciones que ocurren en condiciones de poco oxígeno. En GMI1000, que es el genoma de la cepa de referencia de *R. solanacearum*, se requieren tanto la desnitrificación como la desintoxicación del óxido nítrico para la virulencia y el crecimiento de la bacteria (Dalsing *et al.*, 2015). Es por esto que consideramos que los genes relacionados con la desnitrificación son esenciales para la patogénesis llevada a cabo por las cepas de *R. solanacearum*, por lo menos de las incluidas en nuestro estudio, que representan la patogénesis de diversos hospederos.

En la literatura ya se habían reportado genes relacionados con la virulencia en *R. solanacearum*, que podían ser inducidos independientemente de la interacción con la planta huésped, es también común encontrarlos diferencialmente expresados durante el proceso de infección (muchos de estos corresponden a determinantes de virulencia). Por ejemplo, se reportó que los

genes que codifican el sistema de secreción de tipo III y sus efectores asociados (*popA*, *popB*, *popC*, *popF1*, *ripD*, *ripV2* y *awr5\_1*) se regulan positivamente cuando la bacteria infecta tomate y melón (Ailloud et al., 2016). Esto probablemente indica que estos genes relacionados con el sistema de secreción de tipo III son parte del conjunto mínimo de genes requerido para la virulencia bacteriana. En tomate se identificó que los activadores transcripcionales *flhC* y *flhD*, que regulan los genes codificantes de flagelo y los genes del metabolismo del nitrógeno *narL*, *ptsN* y *hmpX*, presentan una expresión diferencial y regulación positiva, lo que implica que pueden potencialmente jugar un papel clave durante la infección del hospedero vegetal. (Dalsing et al., 2015; Dalsing y Allen, 2014; Jacobs et al., 2012; Tans-Kersten et al., 2004). Estos estudios corroboran que el enfoque bioinformático utilizado en el presente estudio concuerda con lo reportado en la literatura, y que puede ser utilizado para dilucidar los mecanismos de interacción patógeno-huésped. Además de los genes previamente reportados, también encontramos otros genes que pueden estar potencialmente implicados en la interacción patogénica y que valdría la pena explorar en próximos estudios.

Las herramientas bioinformáticas brindan información pertinente partiendo desde los genomas y transcriptomas obtenidos experimentalmente, a pesar de la variabilidad que subyace al uso de determinados programas o plataformas y a la profundidad de la búsqueda realizada. Por ejemplo, en este estudio se evidenció que las dos herramientas de anotación, arrojaron resultados concordantes y a la vez complementarios con respecto al potencial codificante. Es importante resaltar entonces la necesidad de usar las herramientas disponibles que permitan verificar la información resultante de cada método y así generar resultados contrastados. En este estudio aportamos algunos elementos que pueden tener potencial para estudios futuros que pretendan encontrar mecanismos de control para el fitopatógeno *R. solanacearum*. Para destacar, es importante enfatizar que identificamos que la mayoría de los genes encontrados diferencialmente expresados en la interacción bacteria-planta están relacionados con procesos de transporte de azúcares seguramente necesarios en la obtención de la energía necesaria para llevar a cabo el proceso de patogénesis. Adicionalmente, identificamos oxidorreductasas y enzimas relacionadas en la

desintoxicación de compuestos nocivos para la célula bacteriana. El siguiente paso es validar experimentalmente si los genes postulados en este estudio son efectivamente importantes en el proceso de infección. La edición génica y el silenciamiento de genes pueden aportar evidencias de que los genes postulados en este estudio están efectivamente relacionados con el proceso infeccioso, y de esta manera buscar integrar estos conocimientos en estrategias de control biológico.

## 8. Referencias

- Addy HS, Ahmad AA, Huang Q. 2019. Molecular and Biological Characterization of Ralstonia Phage RsoM1USA, a New Species of P2virus, Isolated in the United States. *Front Microbiol.* 10:267.
- Adhikari BN, Savory EA, Vaillancourt B, Childs KL, Hamilton JP, Day B, Buell CR. Expression profiling of *Cucumis sativus* in response to infection by *Pseudoperonospora cubensis*. *PLoS One.* 2012;7:e34954. doi: 10.1371/journal.pone.0034954.
- Ahmad AA, Stulberg MJ, Mershon JP, Mollov DS, Huang Q. 2017. Molecular and biological characterization of  $\phi$ Rs551, a filamentous bacteriophage isolated from a race 3 biovar 2 strain of *Ralstonia solanacearum*. *PLoS One.* 12(9):e0185034.
- Ailloud F., Lowe T. M., Robene I., Cruveiller S., Allen C., Prior P. (2016). In planta comparative transcriptomics of host-adapted strains of *Ralstonia solanacearum*. *PeerJ.* 4:e1549. 10.7717/peerj.1549
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol.* 1990;215:403–410.
- Álvarez B, Biosca EG. 2017. Bacteriophage-Based Bacterial Wilt Biocontrol for an Environmentally Sustainable Agriculture. *Front Plant Sci.*8:1218.
- Arrial R, Togawa R, de M Brigido M. 2009. Screening non-coding RNAs in transcriptomes from neglected species using PORTRAIT: case study of the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *BMC bioinformatics*, 10(239).
- Bateman A., Martin M.-J., Orchard S., Magrane M., Alpi E., Bely B., Bingley M., Britto R., Bursteinas B., Busiello G. et al. .. UniProt: un centro mundial de conocimiento sobre proteínas . *Ácidos nucleicos Res.* 2018; 47 : D506 – D515.

- Belalcazar SC, Rosales FE, Pocasangre LE. 2004. "El Moko del banano y el plátano y el rol de las plantas hospederas en su epidemiología," in Proceedings of the XVI International ACORBAT Meeting. 16–35.
- Blomme G, Dita M, Jacobsen KS, Pérez Vicente L, Molina A, Ocimati W, Poussier S, Prior P. 2017. Bacterial Diseases of Bananas and Enset: Current State of Knowledge and Integrated Approaches Toward Sustainable Management. *Front Plant Sci.* 20;8:1290.
- Bonnington KE, Kuehn MJ. Protein selection and export via outer membrane vesicles. *Biochim Biophys Acta.* 2013;1843:1612–9.
- Bonnington KE, Kuehn MJ. Protein selection and export via outer membrane vesicles. *Biochim Biophys Acta.* 2013;1843:1612–9.
- Buttimer C, McAuliffe O, Ross RP, Hill C, O'Mahony J, Coffey A. 2017. Bacteriophages and Bacterial Plant Diseases. *Front Microbiol.* 8:34.
- Cao J, Schneeberger K, Ossowski S, Gunther T, Bender S, Fitz J, et al. Whole-genome sequencing of multiple *Arabidopsis thaliana* populations. *Nat Genet.* 2011;43(10):956–63. 10.1038/ng.911.
- Castañeda, DA, y Espinosa J. 2005. Comportamiento e impacto de la enfermedad de moko en la zona de Urabá (Colombia) en las últimas tres décadas y media propuesta de un índice de riesgo de enfermedad. *Rev. Fac. Nac. Agron. Medellín* 58(1):2587 - 2599.
- Cerveau N, Jackson D. 2016. Combining independent de novo assemblies optimizes the coding transcriptome for nonconventional model eukaryotic organisms. *BMC bioinformatics*, 17(1): 525.
- Dalsing B. L., Allen C. (2014). Nitrate assimilation contributes to *Ralstonia solanacearum* root attachment, stem colonization, and virulence. *J. Bacteriol.* 196, 949–960. 10.1128/JB.01378-13
- Dalsing B. L., Truchon A. N., Gonzalez-Orta E. T., Milling A. S., Allen C. (2015). *Ralstonia solanacearum* uses inorganic nitrogen metabolism for virulence, ATP production, and detoxification in the oxygen-limited host xylem environment. *MBio* 6:e02471. 10.1128/mBio.02471-14
- Denny TP. 2006. "Plant pathogenic *Ralstonia* species," in *Plant-Associated Bacteria*. Springer Publishing. 573–644.
- Dunn B, Richter C, Kvitek DJ, Pugh T, Sherlock G. Analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* pan-genome reveals a pool of copy number variants distributed in diverse yeast strains from differing industrial environments. *Genome Research.* 2012;22(5):908–24. 10.1101/gr.130310.

- Durmuş S, Çakır T, Özgür A, Guthke R. 2015. A review on computational systems biology of pathogen–host interactions. *Frontiers in microbiology*, 6(235).
- Eddy SR. Profile hidden Markov models. *Bioinformatics*. 1998;14:755–763. doi: 10.1093/bioinformatics/14.9.755.
- Ellis TN, Kuehn MJ. Virulence and immunomodulatory roles of bacterial outer membrane vesicles. *Microbiol Mol Biol R*. 2010;74:81–94.
- Elphinstone J. G. 2005. “The current bacterial wilt situation: a global overview,” in *Bacterial Wilt Disease and the Ralstonia solanacearum Species Complex*. APS Press. 9–28.
- Fegan M., Prior P. (2005). “How complex is the Ralstonia solanacearum species complex,” in *Bacterial Wilt Disease and the Ralstonia Solanacearum Species Complex*, eds Allen C., Prior P., Hayward A. C. (Saint Paul, MN: American Phytopathological Society; ), 449–462.
- Finn RD, Bateman A, Clements J, Coggill P, Eberhardt RY, Eddy SR, et al. Pfam: the protein families database. *Nucleic Acids Res*. 2014;42:222–230. doi: 10.1093/nar/gkt1223.
- Fleischmann R. D., Adams M. D., White O., Clayton R. A., Kirkness E. F., Kerlavage A. R. (1995). Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. *Science* 269 496–512. 10.1126/science.7542800
- Galán J.E., Wolf-Watz H. Protein delivery into eukaryotic cells by type III secretion machines. *Nature*. 2006;444:567–573. doi: 10.1038/nature05272.
- Genin S, and Denny, TP. 2012. Pathogenomics of the *Ralstonia solanacearum* Species Complex. *Annual Review of Phytopathology*. 50(1), pp. 67-89.
- Hauser A.R. The type III secretion system of *Pseudomonas aeruginosa*: Infection by injection. *Nat. Rev. Microbiol*. 2009;7:654–665. doi: 10.1038/nrmicro2199.
- Hayward A. C. 1991. Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. *Annu. Rev. Phytopathol*. 29 65–87.
- Hemaiswarya S., Raja R., Ravikumar R., Kumar A., Carvalho I. In: *Omics: Applications in Biomedical, Agricultural, and Environmental Sciences*. Barh D., Zambare V., Azevedo V., editors. CRC Press; Boca Raton, FL, USA; Taylor and Francis; London, UK: 2013. p. 439. Chapter 18.
- Hinton JCD, Hautefort I, Eriksson S, Thompson A, Rhen M. Benefits and pitfalls of using microarrays to monitor bacterial gene expression during

infection. *Curr Opin Microbiol.* 2004;7:277–282. doi: 10.1016/j.mib.2004.04.009

Hirsch CN, Foerster JM, Johnson JM, Sekhon RS, Muttoni G, Vaillancourt B, et al. Insights into the Maize Pan-Genome and Pan-Transcriptome. *The Plant Cell.* 2014;26(1):121–35. 10.1105/tpc.113.119982.

Hogg J.S., Hu F.Z., Janto B., Boissy R., Hayes J., Keefe R., Post J.C., Ehrlich G.D. (2007). Characterization and modeling of the *Haemophilus influenzae* core and supragenomes based on the complete genomic sequences of Rd and 12 clinical nontypeable strains. *Genome Biol.* 8: R103.

Huang Q., Allen C. 2000. Polygalacturonases are required for rapid colonization and full virulence of *Ralstonia solanacearum* on tomato plants. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*

Jha G., Rajeshwari R., Sonti R.V. Bacterial type two secretion system secreted proteins: Double-edged swords for plant pathogens. *Mol. Plant Microbe Interact.* 2005;18:891–898. doi: 10.1094/MPMI-18-0891.

Jones, P., Binns, D., Chang, H. Y., Fraser, M., Li, W., McAnulla, C., McWilliam, H., Maslen, J., Mitchell, A., Nuka, G., Pesseat, S., Quinn, A. F., Sangrador-Vegas, A., Scheremetjew, M., Yong, S. Y., Lopez, R., & Hunter, S. (2014). InterProScan 5: genome-scale protein function classification. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 30(9), 1236–1240. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu031>.

Jacobs J. M., Babujee L., Meng F., Milling A., Allen C. (2012). The in planta transcriptome of *Ralstonia solanacearum*: conserved physiological and virulence strategies during bacterial wilt of tomato. *MBio* 3:e00114–12. 10.1128/mBio.00114-12

Kanehisa M., Goto S. (2000). KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Res.* 28 27–30.

Kang Y, Yang D, Kong L, Hou M, Meng Y, Wei L, Gao G. 2017. CPC2: a fast and accurate coding potential calculator based on sequence intrinsic features. *Nucleic acids research*, 45(1): 12-16.

Kim S, Cho Y-J, Song E-S, Lee SH, Kim J-G, Kang L-W. Time-resolved pathogenic gene expression analysis of the plant pathogen *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *BMC Genomics.* 2016;17:345. doi: 10.1186/s12864-016-2657-7.

Kitano H. (2002). Systems biology: a brief overview. *Science* 295 1662–1664 10.1126/science.1069492.

- Korotkov K.V., Sandkvist M., Hol W.G. The type II secretion system: Biogenesis, molecular architecture and mechanism. *Nat. Rev. Microbiol.* 2012;10:336–351. doi: 10.1038/nrmicro2762.
- Kumar, A., Kumar, R., Sengupta, D., Das, S. N., Pandey, M. K., Bohra, A., Sharma, N. K., Sinha, P., Sk, H., Ghazi, I. A., Laha, G. S., & Sundaram, R. M. (2020). Deployment of Genetic and Genomic Tools
- Laxminarayan R, Duse A, Wattal C, Zaidi AK, Wertheim HF, Sumpradit N, Vlieghe E, Hara GL, Gould IM, Goossens H, et al. 2013. Antibiotic resistance-the need for global solutions. *Lancet Infect Dis.* 13:1057–1098.
- Ley R. E., Peterson D. A., Gordon J. I. (2006). Ecological and Evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. *Cell* 124 837–848. 10.1016/j.cell.2006.02.017
- Lin DM, Koskella B, Lin HC. 2017. Phage therapy: An alternative to antibiotics in the age of multi-drug resistance. 2017. *World J Gastrointest Pharmacol Ther.*
- Lonjon F, Turner M, Henry C, Rengel D, Lohou D, van de Kerkhove Q, Cazale AC, Peeters N, Genin S, Vailleau F. 2016. Comparative secretome analysis of *Ralstonia solanacearum* Type 3 secretion-associated mutants reveals a fine control of effector delivery, essential for bacterial pathogenicity. *Mol. Cell. Proteom.* 15:598.
- Luepke KH, Suda KJ, Boucher H, Russo RL, Bonney MW, Hunt TD, Mohr JF. 2017. Past, Present, and Future of Antibacterial Economics: Increasing Bacterial Resistance, Limited Antibiotic Pipeline, and Societal Implications. *Pharmacotherapy.* 37:71–84.
- Mansfield J, Genin S, Magori S, Citovsky V, Sriariyanum M, Ronald P, Dow M, Verdier V, Beer SV, Machado MA, Toth I, Salmond G, Foster GD. 2012. Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology. *Mol. Plant Pathol.* 13:614–629.
- Marco D.E., Abram F. Using Genomics, Metagenomics and Other “Omics” to Assess Valuable Microbial Ecosystem Services and Novel Biotechnological Applications. *Front. Microbiol.* 2019;10:151. doi: 10.3389/fmicb.2019.00151.
- Medini D, Donati C, Tettelin H, Massignani V, Rappuoli R. The microbial pan-genome. *Current Opinion in Genetics & Development.* 2005;15(6):589–94.
- Nivaskumar M., Francetic O. Type II secretion system: A magic beanstalk or a protein escalator. *BBA Mol. Cell Res.* 2014;1843:1568–1577. doi: 10.1016/j.bbamcr.2013.12.020.

- Orshinsky AM, Hu J, Opiyo SO, Reddyvari-Channarayappa V, Mitchell TK, Boehm MJ. RNA-Seq analysis of the *Sclerotinia homoeocarpa*--creeping bentgrass pathosystem. *PLoS One*. 2012;7:e41150. doi: 10.1371/journal.pone.0041150
- Potter SC, Luciani A., Eddy SR, Park Y., Lopez R., Finn RD. 2018. Servidor web HMMER: actualización 2018 . *Ácidos nucleicos Res*. 46 : W200 – W204.
- Quinn J, Chang H.2016. Unique features of long non-coding RNA biogenesis and function. *Nature Reviews Genetics*, 17(1): 47-62.
- Read BA, Kegel J, Klute MJ, Kuo A, Lefebvre SC, Maumus F, et al. Pan genome of the phytoplankton *Emiliania underpins* its global distribution. *Nature*. 2013;499(7457):209–13. 10.1038/nature12221
- Sabbagh C. R. R., Carrère S., Lonjon F., Vaillau F., Macho A. P., Genin S., et al. (2019). Pangenomic type III effector database of the plant pathogenic *Ralstonia* spp. *PeerJ*. 7:e27726v1 10.7287/peerj.preprints.27726v1.
- Safni I., Cleenwerck I., De Vos P., Fegan M., Sly L., Kappler U. (2014). Polyphasic taxonomic revision of the *Ralstonia solanacearum* species complex: proposal to emend the descriptions of *Ralstonia solanacearum* and *Ralstonia syzygii* and reclassify current *R. syzygii* strains as *Ralstonia syzygii* subsp. *syzygii* subsp. nov., *R. solanacearum* phylotype IV strains as *Ralstonia syzygii* subsp. *indonesiensis* subsp. nov., banana blood disease bacterium strains as *Ralstonia syzygii* subsp. *celebesensis* subsp. nov. and *R. solanacearum* phylotype I and III strains as *Ralstonia pseudosolanacearum* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 64(Pt 9), 3087–3103.
- Salanoubat M., Genin S., Artiguenave F., Gouzy J., Mangenot S., Arlat M., et al. (2002). Genome sequence of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum*. *Nature* 415 497–502. 10.1038/415497<sup>a</sup>
- Schulze S, Henkel S, Driesch D, Guthke R, Linde J.2015. Computational prediction of molecular pathogen-host interactions based on dual transcriptome data. *Frontiers in microbiology*, 6, 65.
- Soto-Suárez M, Bernal D, González C, Szurek B, Guyot R, Tohme J, Verdier V. In planta gene expression analysis of *Xanthomonas oryzae* pathovar *oryzae*, African strain MA11. *BMC Microbiol.* 2010;10:170. doi: 10.1186/1471-2180-10-170
- S-R, Kim ST. Label-free quantitative secretome analysis of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* highlights the involvement of a novel cysteine protease in its pathogenicity. *J Proteomics*. 2017 doi: 10.1016/j.jprot.2017.02.012. (in press)

- Stes E., Vandeputte O. M., El Jaziri M., Holsters M., Vereecke D. (2011). A successful bacterial coup d'etat: how *Rhodococcus fascians* redirects plant development. *Annu. Rev. Phytopathol.* 49, 69–86. [10.1146/annurev-phyto-072910-095217](https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-072910-095217)
- Tans-Kersten J., Brown D., Allen C. 2004. Swimming motility, a virulence trait of *Ralstonia solanacearum*, is regulated by FlhDC and the plant host environment. *Mol. Plant Microbe Interact.* 17, 686–695. [10.1094/MPMI.2004.17.6.686](https://doi.org/10.1094/MPMI.2004.17.6.686)
- Tettelin H, Massignani V, Cieslewicz MJ, Donati C, Medini D, Ward NL, et al. Genome analysis of multiple pathogenic isolates of *Streptococcus agalactiae*: Implications for the microbial “pan-genome”. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2005;102(39):13950–5. [10.1073/pnas.](https://doi.org/10.1073/pnas.2005.102(39):13950-5)
- Toward Gaining a Better Understanding of Rice-Xanthomonas oryzae pv. oryzae Interactions for Development of Durable Bacterial Blight Resistant Rice. *Frontiers in plant science*, 11, 1152. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.01152>
- Vernikos G., Medini D., Riley D.R., Tettelin H. Ten years of pan-genome analyses. *Curr Opin Microbiol.* 2014;23C:148–154
- Wang G, Kong J, Cui D, Zhao H, Zhao P, Feng S, Zhao Y, Wang W. 2018. Comparative Proteomic Analysis of Two *Ralstonia solanacearum* Isolates Differing in Aggressiveness. *Int J Mol Sci.* 19(8):2444
- Wang Y, Kim SG, Wu J, et al. 2013. Secretome analysis of the rice bacterium *Xanthomonas oryzae* (Xoo) using in vitro and in planta systems. *Proteomics.* 2013 Jun;13(12-13):1901-1912. DOI: [10.1002/pmic.201200454](https://doi.org/10.1002/pmic.201200454).
- Westermann A, Barquist L, Vogel J.2017. Resolving host–pathogen interactions by dual RNA-seq. *PLoS pathogens*, 13(2).
- Wirojsirasak, W., Kalapanulak, S., & Saithong, T. (2019). Pan- and core- gene association networks: Integrative approaches to understanding biological regulation. *PloS one*, 14(1), e0210481. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0210481>.
- Wu J.2010. Testing the coding potential of conserved short genomic sequences. *Advances in bioinformatics*, 2010(287070).
- Zhang F, Du Z, Huang L, Cruz CV, Zhou Y, Li Z. 2013. Comparative transcriptome profiling reveals different expression patterns in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* strains with putative virulence-relevant genes. *PLoS One.* 2013;8:e64267. doi: [10.1371/journal.pone.0064267](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0064267)