



UNIVERSIDAD DE CHILE – FACULTAD DE CIENCIAS – ESCUELA DE PREGRADO

**“GENÓMICA COMPARATIVA DE CEPAS DE *XANTHOMONAS ARBORÍCOLA* PV
JUGLANDIS ASOCIADAS A BROTES DE PESTE NEGRA EN NOGALES CHILENOS”**

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de:

Ingeniero en Biotecnología Molecular.

JAIME ALONSO BARRUETO ESTAY

Director y Codirector del Seminario de Título:

Dr. Gastón Higuera Guajardo

Dr. Daniel Castillo Bermúdez

Junio de 2022

Santiago – Chile



INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile, que el Seminario de Título, presentado por el candidato:

JAIME ALONSO BARRUETO ESTAY

“GENÓMICA COMPARATIVA DE CEPAS DE *XANTHOMONAS ARBORÍCOLA* PV *JUGLANDIS* ASOCIADAS A BROTES DE PESTE NEGRA EN NOGALES CHILENOS”

Ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular

Dr. Gastón Higuera Guajardo
Director Seminario de Título

Dr. Daniel Castillo Bermúdez
Co-director del Seminario de Título

Dr. Francisco Chávez Espinosa
Profesor Patrocinante

COMISIÓN REVISORA Y EVALUADORA:

Dr. Andrés Marcoleta Caldera
Presidente

Dra. Claudia Stange Klein
Correctora

Santiago de Chile, Junio 2022

BIOGRAFÍA

Nací un 30 de agosto del año 1995 en la comuna de Llay Llay, región de Valparaíso. Mis padres Laura y Jaime decidieron nombrarme Jaime Alonso. He vivido toda mi vida en la sencillez y tranquilidad de la comuna del Viento Viento, viento que pareciera forjar un carácter de perseverancia, pero también de constante motivación de cambio, cual brisa eterna de mi comuna.

De pequeño asistía a un jardín infantil, y los dos años en él me dejaron excelentes enseñanzas, costumbres y recuerdos, sobre todo las horas de juego con niños de mí misma edad, y los juguetes y juegos hacían eternas las tardes, tardes que deseaba no terminaran nunca.

Mi enseñanza básica la cursé en el colegio Agustín Edwards de Llay Llay, y puedo decir que los 8 años que siguieron trajeron consigo los mejores recuerdos y vivencias. Amigos y mentores que han marcado mi vida, carácter y temple para siempre. A ellos les debo mucho. En esta etapa descubrí la ciencia y fue cuando supe que quería ser científico en el futuro. También fue en esta época, muy a temprana edad, cuando llegué a saber acerca de la biotecnología y los alcances de ella en ese entonces. Por lo que, ya a mis 13 años tuve una meta y deseos fijos: estudiar Biotecnología en la Universidad de Chile.

Lo que vino después fue la enseñanza media, la cual cursé en el Liceo Politécnico de Llay Llay. En este seguí nutriendo mi formación científica, descubriendo, probando y jugando. Sin embargo, sabía que estos años eran tiempo preciado, por lo que también los disfruté de la manera más sencilla: con los amigos y la familia. Recuerdo las tardes jugando Voleibol, Tenis o simplemente dando vueltas por las calles de Llay Llay, charlando y compartiendo con los amigos, años en los que nos creíamos grandes filósofos, teníamos la vida por delante, y ya nos creíamos amos de todo, lo cual es naturalmente inherente en un adolescente.

Luego vino una nueva etapa, una que prontamente culminará. Ésta, a mi parecer la más difícil, con altos y bajos, pero sin duda, la que más me ha enseñado y formado en todo sentido. Años de clases, combinando el estrés y la euforia de aprender y aplicar; divertidos prácticos de laboratorio; estudios hasta la madrugada, cafés por la mañana, tarde y noche; hojas y hojas de lectura; teclas y teclas para completar un informe. Pero nada de lo anterior habría sido posible sin la compañía y apoyo esencial de los compañeros de clases y de vida, pero sobre todo por el apoyo desinteresado de mi familia.

Pronto esto terminará, y no será más que otra etapa, otro desafío en mi camino que habré cumplido, camino que por delante es amplio, pero que con convicción y optimismo recorreré, pues el futuro es de aquellos que se atreven a hacerlo.

Esto es para mis padres y hermano. Con mucho cariño y convicción, les dedico este trabajo. Espero algún día poder retribuir cada palabra y gesto que lograron consolar y animar este largo camino que pronto acaba.

*Dedicado a la memoria de mi padre, Jaime Barreto Verdejo.
No ha habido nadie más que haya querido tanto ver dónde he llegado hoy.
Donde quiera que estés, esto es para ti.
Gracias por todo.*

El hombre, por mucho que busque el avance y el futuro, no debe rehuir el pasado y lo ancestral, pues es la base del mañana. Entender ello es entender qué es el futuro.

- Anónimo.

AGRADECIMIENTOS

Llegado cierto momento es inevitable no detenerse y mirar hacia atrás, cual caminata en un cerro, donde el hermoso y vasto paisaje a los pies resulta ser tan bello como el viaje con aquellos a quien paso a dar mis más sinceros agradecimientos.

Primero, cómo no estar agradecido de mi director y codirector de tesis, los Dres. Gastón Higuera y Daniel Castillo, sin ellos esto habría sido como recorrer un camino a oscuras. Espero sigamos trabajando juntos por mucho tiempo.

A mis buenos amigos y compañeros de la facultad de ciencias, por su compañía, apoyo, palabras de ánimo, pero sobre todo por las risas, que sin duda, son los recuerdos que más perdurarán. Carlos, Pablo, Solange, Pilar, Carolina y Jota, gracias por todo.

A mis amigos de la vida, aquellos que uno sabe que siempre estarán para ti, a pesar de estar a kilómetros de distancia, y que con un sencillo mensaje te alegran el día entero. Danitza, Héctor, Jorge, Allan, Tania. Esto es gracias a ustedes, sin su compañía y apoyo esto no habría sido posible. Que vengan años y años de billar, cerveza y charlas infinitas.

A todo el equipo del laboratorio de Biotecnología de Alimentos del INTA, por su guía, compañerismo, conocimientos y sabiduría. Francisca, Carolina, Pamela, Juan Pablo, Victoria. Su apoyo y guía han hecho posible esta tesis.

No agradecer a mi familia es como negarme a mí mismo, de todo lo que soy y he llegado a ser. Sin ellos, no estaría aquí hoy. Para mí, la familia siempre ha sido mi pilar fundamental, son aquellos que siempre estarán a pesar de todo. A mi padre, que en paz descanse, quien deseaba mucho que llegase a ser un profesional, de quien estoy muy orgulloso y agradecido, pues lo que soy es gracias a él. Mi madre, que sin su cariño y amor yo no habría resistido ni un día. Es a ella a quien más le debo, y este trabajo es para ti, espero el tiempo nos dé muchos años más para seguir juntos y poder llegar a agradecer todo lo que me has dado. A mi hermano, por su genialidad y brillantez, no puedo tener un ejemplo de superación y esfuerzo más grande que él. Te quiero mucho hermano mío. A mi cuñada Tania y su familia, quienes han sido un pilar más que fundamental en estos últimos años, no tan solo en lo cotidiano, sino que también en lo fraternal, todas las alegrías y compañía que nos dan son irreprochables. Agradecer también a mi sobrino querido, Bruno, quien es la alegría y energía de mi día a día, desde que llegaste al mundo estás en mi mente y corazón, y es por ti que trabajo y lucho a día, para algún día poder entregarte todo lo que mereces y poder enseñarte del mundo entero.

Por último, agradecer a todos aquellos que siendo para bien o para mal me han dado una lección, que me ha permitido madurar y aprender, muchas veces cayéndome, pero levantándome muchas más. A todos ellos, muchas gracias.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

1.	INTRODUCCIÓN.....	1
1.1	Epidemiología de <i>Xanthomonas arboricola</i> pv <i>juglandis</i>: fitopatógeno causante de la “Peste Negra” en el Nogal Persa	1
1.2	Manejo y control de <i>Xanthomonas arboricola</i> pv <i>juglandis</i>	4
1.2.1	Control convencional	4
1.2.2	Cepas de Xaj resistentes a cobre en Chile y el mundo	5
1.2.3	Genes de resistencia al cobre en especies de <i>Xanthomonas</i>	6
1.3	Necesidad de estudios de comparativa genómica de cepas de <i>Xanthomonas arboricola</i> pv <i>juglandis</i>	10
1.3.1	El Pan-genoma, genes accesorios y la plasticidad del genoma bacteriano	11
1.3.2	Elementos genéticos móviles (EGMs)	12
1.3.3	Herramientas bioinformáticas para el análisis de genomas bacterianos	14
2.	OBJETIVOS	17
2.1	Objetivo general	17
2.2	Objetivos específicos.....	17
3.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	18
3.1	Aislamiento y caracterización de <i>Xanthomonas arboricola</i> pv <i>juglandis</i> chilenas	18
3.1.1	Determinación de tolerancia a cobre de cepas Xaj.....	18
3.1.2	Secuencias de <i>Xanthomonas arboricola</i> pv <i>juglandis</i> nacionales	18
3.2	Secuencias génicas de cepas de referencia de <i>Xanthomonas arboricola</i> pv <i>juglandis</i>: análisis genométrico	19
3.3	Anotación alternativa del genoma de las cepas de <i>Xanthomonas arboricola</i> pv <i>juglandis</i> y búsqueda manual de genes relacionados con la respuesta al ion cobre	19
3.4	Búsqueda predictiva de elementos tipo profago en el genoma de las cepas de <i>Xanthomonas arboricola</i> pv <i>juglandis</i>	20
3.5	Búsqueda predictiva de Islas Genómicas en los genomas de las cepas de <i>Xanthomonas arboricola</i> pv <i>juglandis</i>	21
3.6	Mapeo e identificación de genes, elementos tipo Profagos e Islas genómicas en Xaj.....	22
3.7	Análisis del Pan-genoma de las cepas <i>Xanthomonas arboricola</i> pv <i>juglandis</i>	23
3.8	Análisis de Filogenia.....	24
3.8.1	Árbol filogenético	24
3.8.2	Matriz de identidad nucleotídica promedio (ANI)	25
3.9	Análisis de Sintenia de los genes relacionados con la respuesta a cobre	25
4.	RESULTADOS.....	28
4.1	Análisis del contenido genómico de las cepas <i>Xanthomonas arboricola</i> pv <i>juglandis</i>.....	28
4.1.1	Caracterización de los genomas de las cepas de Xaj internacionales	29
4.1.2	Caracterización de los genomas de las cepas de Xaj nacionales.....	30

4.1.3	Anotación alternativa de genomas y primera búsqueda de genes relacionados con la respuesta al ion cobre	32
4.1.4	Predicción de elementos genéticos móviles en genomas de cepas Xaj	34
4.1.4.1	Secuencias tipo profago.....	34
4.1.4.2	Islas Genómicas.....	37
4.2	Análisis del pan-genoma de las cepas <i>Xanthomonas arboricola</i> pv <i>juglandis</i>	40
4.2.1	Pan-genoma, genes accesorios y <i>singletons</i>	40
4.2.2	Filogenia de las cepas Xaj.....	43
4.3	Identificación y construcción de banco de genes relacionados con la respuesta al ion cobre de las cepas de <i>Xanthomonas arboricola</i> pv <i>juglandis</i>	47
4.3.1	Operón <i>cop</i> y otros genes relacionados con la respuesta a cobre codificados en el genoma central	47
4.3.2	Operón <i>cop</i> y otros genes de respuesta a de metales pesados asociados a Elementos genéticos móviles en cepas de Xaj.....	49
4.3.3	Búsqueda de genes ortólogos asociados a la tolerancia a cobre en otras bacterias patógenas.....	52
4.4	Presencia de determinantes genéticos estudiados y su relación con el fenotipo de tolerancia a cobre en <i>Xanthomonas arboricola</i> pv <i>juglandis</i> chilenas.....	56
5.	DISCUSIÓN Y PROYECCIONES.....	58
5.1	Pan-genoma de las cepas de <i>Xanthomonas arboricola</i> pv <i>juglandis</i>	58
5.1.1	Genoma central de Xaj	58
5.1.1.1	Operón <i>copABL</i> y otros genes de transporte de cationes en cepas Xaj.....	60
5.1.2	Genoma accesorio de Xaj	61
5.1.2.1	Principales Islas Genómicas presentes en Xaj	62
5.1.2.2	Elementos tipo profago presentes en los genomas de Xaj	64
5.1.2.3	Genes ortólogos de tolerancia a cobre en genomas de otros patógenos ambientales	66
5.2	Ruta evolutiva hipotética.....	68
5.3	Pan-genoma y la relación con el Fenotipo de <i>Xanthomonas arboricola</i> pv <i>juglandis</i>.....	72
5.4	Proyecciones.....	73
6.	CONCLUSIÓN.....	75
7.	REFERENCIAS	76
8.	ANEXOS	84

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mapa de distribución de <i>Xanthomonas arboricola</i> pv <i>juglandis</i> a nivel mundial	2
Figura 2. Sintomatología propia de la Peste Negra de nogal causado por <i>Xanthomonas arboricola</i> pv <i>juglandis</i>	4
Figura 3. El concepto del pan-genoma	11
Figura 4. Mecanismos de modificación de la arquitectura del genoma bacteriano	14
Figura 5. Flujo de trabajo	27
Figura 6. Profagos (Pp) predichos por PHASTER y mapeados en los genomas de las cepas Xaj mediante Geneious	36
Figura 7. Desarrollo de Pan-genoma vs genoma central de <i>X. arboricola</i> pv <i>juglandis</i>	41
Figura 8. Pan-genoma de <i>X. arboricola</i> pv <i>juglandis</i> (Xaj)	42
Figura 9. Matriz de identidad promedio de nucleótidos (ANI) obtenida a partir de la comparación blastn de las secuencias génicas del genoma de las cepas de <i>Xanthomonas arboricola</i> pv <i>juglandis</i>	44
Figura 10. Filogenia basada en el genoma central de las cepas <i>Xanthomonas arboricola</i> pv <i>juglandis</i>	46
Figura 11. Región cromosómica compartida por las cepas Xaj (genoma central) correspondiente al operón <i>copABL</i> y un clúster río arriba de genes codificantes de transportadores ABC y de eflujo RND	48
Figura 12. Islas genómicas con contenido génico relacionado a mecanismos de tolerancia a cobre y otros metales pesados en cepas <i>Xanthomonas arboricola</i> pv <i>juglandis</i>	51
Figura 13. Esquematzación de genes ortólogos recuperados de diversos patógenos ...	55
Figura 14. Ruta evolutiva hipotética de las cepas <i>Xanthomonas arboricola</i> pv <i>juglandis</i>	71
Anexo III. Alineamientos múltiples de secuencias genómicas de cepas <i>Xanthomonas arboricola</i> pv <i>juglandis</i>	89
Anexo IV. Bloques co-linealmente localizados obtenidos del alineamiento MAUVE de las secuencias correspondientes a los 3 profagos mayormente compartidos por las cepas <i>Xanthomonas arboricola</i> pv <i>juglandis</i>	90
Anexo V. Resumen esquemático del resto de IGs halladas en las 3 cepas usadas como referencia (Xaj 417, CFSAN033079, CFBP 7179) (continuación)	93
Anexo VI. Representación esquemática e integrada del mapeo de las secuencias genéticas correspondientes a profagos (Pp), Islas genómicas (IG) relacionadas a cobre, y operón <i>copABL</i> de las cepas Xaj 417, CFSAN033079 y CFBP 7179	94
Anexo X. Modelos de los sistemas de operones de resistencia a cobre <i>cop</i> (<i>Pseudomonas syringae</i>) y <i>pco</i> (<i>Escherichia coli</i>)	100

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I. Información general del origen del aislamiento de las cepas de <i>Xanthomonas arboricola</i> pv <i>juglandis</i> analizadas en este estudio	28
Tabla II. Datos genómicos de las cepas de <i>Xanthomonas arboricola</i> pv <i>juglandis</i> analizadas en este estudio	31
Tabla III. Presencia o ausencia de los genes <i>cop</i> en los genomas de las cepas Xaj entregada por el software RAST.....	33
Tabla IV. Islas genómicas predichas en los genomas de las cepas de <i>Xanthomonas arboricola</i> pv <i>juglandis</i>	38
Tabla V. Presencia o ausencia de las islas genómicas putativas en los genomas de las cepas de <i>Xanthomonas arboricola</i> pv <i>juglandis</i>	39
Tabla VI. Genes ortólogos asociados a mecanismos de respuesta a cobre y otros metales pesados contenidos en genomas de otros patógenos ambientales	54
Tabla VII. Comparación entre los valores de concentración mínima inhibitoria de cobre (CMI-Cu) y el contenido de genes <i>cop/cus</i> accesorios y centrales presentes en el genoma de las cepas nacionales de <i>Xanthomonas arboricola</i> pv <i>juglandis</i>	57
Anexo I: Listado de cepas de <i>Xanthomonas arboricola</i> pv <i>juglandis</i> aisladas de distintas localidades chilenas	84
Anexo II. Características generales de los elementos tipo profagos predichos por la plataforma PHASTER	85
Anexo VII. Porcentajes de la identidad por pares y el grado obtenidos en el análisis de sintenia de genes de elementos genéticos móviles	95
Anexo VIII. Clasificación pan-genómica de las cepas Xaj	98
Anexo IX. Banco de genes relacionados con la respuesta a cobre o metales pesados en general	99

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
EGM	Elemento genético móvil
ECI	Elemento conjugativo integrativo (ICE, por sus siglas en inglés)
IG/GI	Isla genómica
ORF	Marco de lectura abierto
Pp	Elemento tipo Profago
pb	bases nucleotídicas
BLAST	Basic local alignment search tool
Xaj	<i>Xanthomonas arboricola</i> pv <i>juglandis</i>
pv	patovar

RESUMEN

Xanthomonas arboricola pv *juglandis* (Xaj) es el patógeno causante de la Peste Negra del nogal, enfermedad bacteriana responsable de las mayores pérdidas productivas del fruto. Su control se basa en el manejo cultural y aplicación de pesticidas a base de cobre. El uso reiterado de estos agroquímicos cúpricos ha propiciado la selección de cepas resistentes de Xaj. Se ha descrito genes involucrados en mecanismos de resistencia al metal en *Xanthomonas* fitopatógenas, principalmente del operón *cop*. Sin embargo, aún se desconoce a cabalidad todos los determinantes genéticos en cepas de Xaj nacionales. Por lo tanto, el objetivo fue investigar la diversidad genética de cepas de Xaj asociadas a brotes de Peste Negra en nogales chilenos. Se realizó genómica comparativa de los genomas publicados de Xaj chilenas e internacionales, a través de herramientas bioinformáticas, caracterizando así, la diversidad genética y el contenido de determinantes de tolerancia a cobre. La diversidad genética de las cepas Xaj fue baja (identidad $\geq 98\%$). Se identificaron tanto el operón *copABL* como genes de transporte de cationes en los genomas de Xaj. Además, se determinó que tres Islas Genómicas (IGs) contenían genes *cop* y de resistencia a otros cationes y metales pesados. Más aun, estos genes se encontraron en elementos genéticos móviles en otros patógenos ambientales, permitiendo especular un posible origen horizontal de estos genes en Xaj. No se hallaron determinantes de tolerancia a cobre codificados en elementos tipo profago (Pp). Se propuso una ruta evolutiva hipotética de Xaj, considerando la adquisición temprana y/o contemporánea de IGs, Pp y la filogenia basada en el genoma central. Finalmente, los resultados obtenidos no permitieron explicar las diferencias en el fenotipo de resistencia a cobre de las cepas Xaj chilenas.

ABSTRACT

Xanthomonas arboricola pv *juglandis* (Xaj) is the pathogen that causes the Walnut Blight, a bacterial disease responsible for the greatest productive losses worldwide. Its control is based on cultural control and application of copper-based pesticides. The repeated use of these copper agrochemicals has led to the selection of resistant strain of Xaj. Genes involved in metal resistance mechanisms have been described in phytopathogenic, mainly the *cop* operon. However, all the genetic determinants in national Xaj are still completely unknown. Therefore, the aim was to investigate the genetic diversity of Xaj strains associated with outbreaks of Walnut Blight in Chilean walnut trees. Comparative genomics on the published national and international Xaj genomes was performed, through bioinformatics tools, thus characterization the genetic diversity and the content of copper tolerance determinants. The genetic diversity of the Xaj strains was low ($\geq 95\%$ identity). Both the *cop*ABL operon and cation transport genes were identified in the Xaj genomes. In addition, three Genomic Islands (GIs) were found to contained *cop* genes and genes for resistance to other cations and heavy metals. Furthermore, these were found in mobile genetic elements in other environmental pathogens, allowing to speculate a possible horizontal origin of these genes in Xaj. No copper tolerance determinants encoded in prophage-like elements (Pp) were found. A hypothetical evolutionary pathway of Xaj was proposed, considering the early and/or contemporary acquisition of IGs, Pp and the central genome-based phylogeny. Finally, the results obtained did not allow to explain the differences in the copper resistance phenotype of the national Xaj strains.

1. INTRODUCCIÓN

El Nogal Persa o Inglés (*Juglans regia*) es una de las especies del grupo de frutos secos más ampliamente cultivadas alrededor del mundo. Esta especie es apreciada por sus características organolépticas y culinarias, así como por sus propiedades fitofarmacológicas (I. T. Shah et al., 2014; U. N. Shah et al., 2018). Lo anterior explica por qué globalmente es recomendado su consumo en una dieta balanceada.

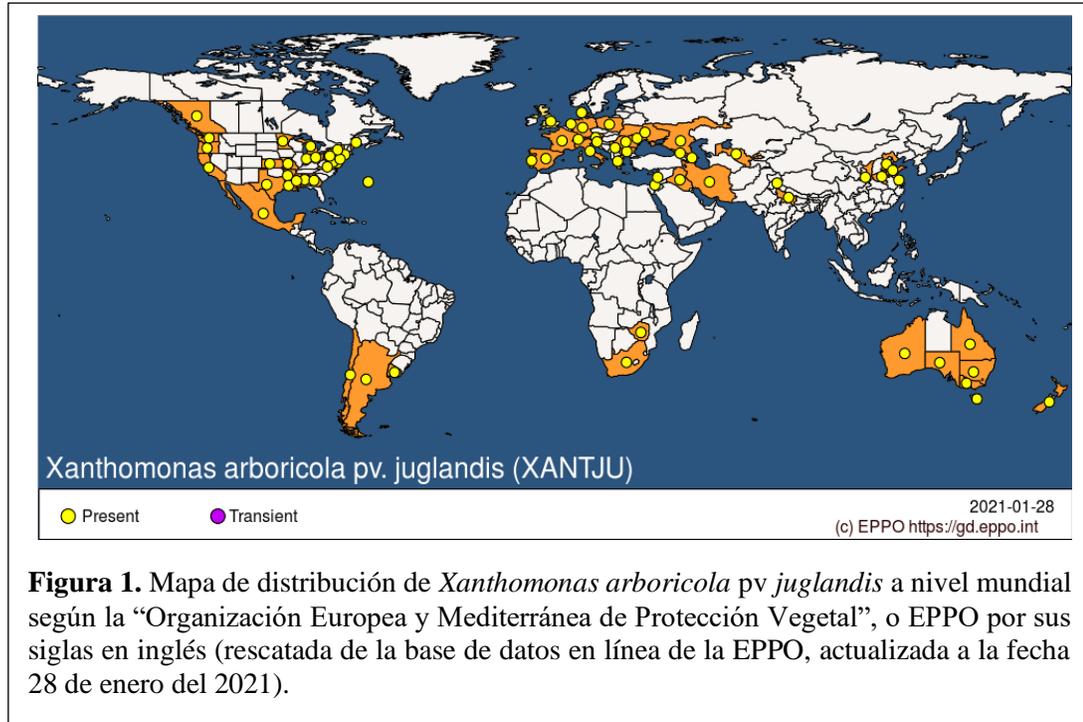
Los mayores productores a nivel mundial son China y Estados Unidos, los cuales concentran cerca del 75 % de toda la producción. Sin embargo, Chile en la última década se ha posicionado en los primeros puestos, logrando ser el tercer mayor productor con un equivalente al 8% de la producción global y el segundo mayor exportador, con un equivalente al 21% de la exportación global, en el año 2019 (COMTRADE, 2019).

Chile ha sabido posicionarse como un productor y exportador de frutos de este tipo a nivel mundial. Sin embargo, para obtener una alta producción de frutos con estándares de exportación, se requiere superar constantemente limitaciones que afectan a esta industria, como son las enfermedades causadas por microorganismo fitopatógenos. Entre las más devastadoras se encuentra la Peste Negra.

1.1 Epidemiología de *Xanthomonas arboricola* pv *juglandis*: fitopatógeno causante de la “Peste Negra” en el Nogal Persa

La Peste Negra del nogal es la principal enfermedad bacteriana responsable de pérdidas productivas en nogales, con mermas de hasta un 50% de no contenerse adecuadamente (Buchner et al., 2010).

Esta enfermedad se encuentra ampliamente distribuida a nivel mundial, prácticamente en todos los países productores y exportadores de este fruto (Figura 1) (Du Plessis & van der Westhuizen, 1995; Jay Ram Lamichhane, 2014; Lang et al., 2006; Lang & Evans, 2010; Mulrean, 1982).



El agente etiológico causante de la “Peste Negra” o Tizón Bacteriano de la nuez es *Xanthomonas arboricola* pv *juglandis* (Xaj) (Vauterin et al., 1995), anteriormente clasificada como *Xanthomonas campestris* pv *juglandis* (Dye et al., 1980), fue aislada y descrita por primera vez a fines del siglo XIX e inicios del siglo XX en California, U.S.A. (Pierce, 1901). Xaj es una gammaproteobacteria, Gram-negativa, de morfología bacilar, motil, con un flagelo polar, no esporulada, estrictamente aeróbica y quimio-órgano-heterótrofa. Además, produce un pigmento amarillo característico llamado

xanthomonadina y un polisacárido extracelular llamado xanthano (Bradbury, 1986; Melgarejo Nárdiz et al., 2010).

Los brotes de Xaj se ven favorecidos en locaciones con primaveras cálidas y lluviosas, condiciones que promueven la proliferación del desarrollo de la bacteria (Woeste et al., 2019). Por otra parte, factores como el viento, salpicaduras de agua, polen y material contaminado, promueven el esparcimiento del inóculo (Ark, 1944). Esta bacteria infecta diversas estructuras como flores, brotes, hojas, ramitas, amentos masculinos y femeninos (Belisario et al., 1999, 2002). Sin embargo, cabe destacar que el principal daño se da en el fruto, puesto que la infección temprana en su desarrollo produce la decoloración y la caída de la nuez (Gardan et al., 1993), e infecciones en etapas más tardías generan daño en el pericarpio, disminuyendo así la calidad e impidiendo su comercialización (Ninot et al., 2002). La sintomatología de esta enfermedad principalmente corresponde a deformaciones de las hojas y presencia de manchas necróticas junto con halos cloróticos en estas, chancros necróticos en ramillas y tronco, los cuales exudan en verano generando manchas en la madera. Además, en etapas tardías, se da lugar la necrosis apical en frutos, la cual no se debe solamente a la presencia de actividad bacteriana sino también a la presencia de hongos oportunistas (Figura 2) (Scortichini, 2010).



Figura 2. Sintomatología propia de la Peste Negra de nogal causado por *Xanthomonas arboricola* pv *juglandis*. Se observan los síntomas característicos, como lesiones necróticas rodeadas de halos cloróticos en la superficie superior de las hojas y necrosis apical en nueces. (Extraído y adaptado de (Lamichhane, 2014).

1.2 Manejo y control de *Xanthomonas arboricola* pv *juglandis*

1.2.1 Control convencional

El control de la enfermedad se divide en dos maneras principalmente: Control Cultural y Control Químico. El control cultural consiste en una serie de medidas y planificación previa, dentro del proceso normal de la producción que contribuyen a la prevención de la enfermedad, en las cuales se encuentran por ejemplo: diseño racional y planificado de plantaciones, con el fin de promover una correcta ventilación y evitar exceso de humedad ambiental; podas y control de malezas para la eliminación de material infectado y evitar la generación de microclimas húmedos (CORFO & Chilenut, 2010).

El control químico, por su parte, consiste principalmente en la aplicación de productos cúpricos, tales como: oxiclорuro de cobre, sulfato de cobre, hidróxido de cobre (I), entre

otros. Todos estos productos han sido utilizados por más de 20 años de manera preventiva y continua (CORFO & Chilenut, 2010).

Estos productos actúan recubriendo la superficie de las hojas liberando iones que dañan las membranas y proteínas de las bacterias, retardando o inhibiendo así su crecimiento (J. R. Lamichhane & Varvaro, 2014). Sin embargo, el uso de estas soluciones no siempre garantiza el control de la enfermedad y su uso desmedido conlleva problemas de fitotoxicidad y de acumulación del ion Cu^{+2} en el suelo, generando un desequilibrio del contenido de polifenoles en el nogal (asociado a la defensa natural del vegetal hacia la bacteria), predisponiendo la necrosis en los frutos (Ninot et al., 2002). También se ha reportado alteración de la capacidad de las plantas en metabolizar nitrógeno (Delas, 1963) e interferencia en la captación de hierro y otros nutrientes (Timmer et al., 1998). Pero sin duda, la selección de cepas resistentes a cobre, producto del uso extensivo y desmesurado de este ion, es una de las consecuencias negativas más importantes, generando la pérdida de eficacia de este tipo de control (Lee et al., 1994).

1.2.2 Cepas de Xaj resistentes a cobre en Chile y el mundo

Los primeros reportes que identificaron cepas de Xaj resistentes al ion cobre fueron en Francia (Gardan et al., 1993), con concentraciones mínimas inhibitorias (MIC-Cu) de $64 \mu\text{g Cu}^{+2} \text{ mL}^{-1}$. Desde entonces, también se han identificado cepas resistentes en huertos australianos, con una MIC-Cu de 0,4 mM (Saravanan, 2007). Recientemente, se han reportado varios brotes en diferentes partes del mundo de cepas resistentes a cobre con MIC-Cu de hasta 64 y 500 ppm en Francia e Italia, respectivamente (Cesbron et al., 2015b;

Giovanardi et al., 2016), y $100 \mu\text{g Cu}^{+2} \text{ mL}^{-1}$ en California, Estados Unidos (Adaskaveg et al., 2020).

En Chile, el primer reporte de cepas de Xaj resistentes al ion cobre, en huertos de la zona centro sur del país, se realizó en el año 2007 por Esterio y colaboradores (Esterio et al., 2007). En este estudio determinaron que de un total de 131 cepas obtenidas, cerca del 30% tuvieron concentraciones mínimas inhibitorias de cobre (MIC-Cu) por sobre los $32 \mu\text{g Cu}^{+2} \text{ mL}^{-1}$, MIC-Cu que indica el alto nivel de tolerancia a este metal por parte de la bacteria (Gardan et al., 1993). En el año 2018, Moya-Elizondo y equipo reportaron cepas de Xaj con niveles de resistencia a cobre superiores a los detectados hasta esa fecha, provenientes de la región del Bio-Bio en Chile (Moya-Elizondo et al., 2018).

1.2.3 Genes de resistencia al cobre en especies de *Xanthomonas*

Los iones metálicos como el cobre cumplen un rol fundamental y central en la biología de las células procariotas y eucariotas, actuando como componentes celulares esenciales y cofactores de metaloproteínas y enzimas. No obstante, concentraciones excesivas pueden resultar tóxicas para las células vivas. Es por esto, que el mantenimiento de la homeostasis de dichos metales mediante el flujo y la distribución de los iones, tanto al exterior como en el interior de las células, resulta imperioso (Argüello et al., 2013). Para el caso del ion cobre las células han desarrollado y/o adaptado varios sistemas que le permiten controlar los niveles de este, induciendo mecanismos de resistencia/tolerancia cuando las concentraciones sobrepasan la concentración óptima requerida para una correcta homeostasis. Dos de los sistemas más estudiados son los sistemas *pco* y *cop*.

El sistema *cop*, descrito ampliamente en *Pseudomonas syringae*, contiene por lo general los genes *copA*, *copB*, *copC*, *copD*, *copR* y *copS*. Estos han sido descrito por su rol fundamental en la homeostasis y tolerancia a exceso de cobre en diversos organismos fitopatógenos. Los genes *copABCD* codifican para cuatro proteínas estructurales que determinan la resistencia a cobre: CopA y CopC son proteínas periplásmicas que actúan uniendo iones de cobre; CopB y CopD son proteínas de membrana interna y externa, respectivamente, que actúan en el movimiento de cobre a través de la membrana. Los productos proteicos de *copRS*, CopR y CopS, funcionan como un sistema de regulación transcripcional de dos componentes mediado por metales de los genes estructurales *copABCD* (Silver & Phung, 1996). Cepas que contienen el operón acumulan cobre en el periplasma y membrana externa, por lo que el mecanismo de resistencia es de secuentro y absorción, evitando altas concentraciones del ion en el citoplasma (Cooksey, 1994) (Anexo X). Por otro lado, el sistema *pco* descrito en *Escherichia coli* posee los genes *pcoABCD*, sistema conocido como mecanismo de eflujo y es responsable de bombear el exceso de cobre fuera del citoplasma. Este también está regulado por un sistema de dos componentes, *pcoRS* (Cooksey, 1993) (Anexo X).

Para el caso del género *Xanthomonas*, los genes de resistencia a metales pesados se han encontrado tanto en plásmidos auto-transmisibles como codificados en el cromosoma bacteriano (Basim et al., 2005; Bender & Cooksey, 1986). Se han caracterizado genes asociados a tolerancia al cobre de varias xanthomonadales.

Por ejemplo, en *Xanthomonas axonopodis* pv *vesicatoria* (Xav) se han descrito genes homólogos a determinantes génicos de resistencia a cobre tanto en ADN de plásmido como en ADN cromosómico, todos ellos en un solo operón *cop* (Cooksey et al., 1990).

Por otro lado, los genes *copRS*, reguladores de la expresión de *copA*, informados para otras especies patógenas (Munson et al., 2000; Puig et al., 2002), no suelen estar presentes en el genoma de especies de *Xanthomonas*, y en su lugar, para la expresión inducible de *copA* es requerido otro marco de lectura abierto (ORF), el gen *copL* (Andreas E. Voloudakis et al., 2005).

Un estudio que caracterizó genes de resistencia en *X. axonopodis* pv *citri* (Xac), logró identificar un *cassette copAB* inducible por cobre. Dicho estudio llegó a la conclusión que los genes *copAB* son esenciales para otorgar la resistencia al cobre (Teixeira et al., 2008).

En cuanto a *Xanthomonas arboricola* pv *juglandis* (Xaj), Lee y colaboradores caracterizaron la región cromosómica asociada a la resistencia a cobre (Lee et al., 1994).

El tamaño de la región se estimó en 4.9 kb, muy cercano al tamaño de la región de genes de resistencia a cobre de Xac y Pst (4.5 y 4.8 kb respectivamente). El análisis de sus genomas mostró que las cepas resistentes de Xaj contienen cuatro ORFs en una organización similar a *copABCD*. Análisis de expresión e inactivación mostraron que se requirieron los cuatro ORFs para una expresión completa de la resistencia a cobre.

Además, se concluyó que los ORF 1 y 2 tendrían el mayor porcentaje de identidad con homólogos de estos genes en otros fitopatógenos, siendo estos los que poseen la mayor

conservación funcional y/o estructural que los otros genes de resistencia a cobre. Estos ORFs corresponderían respectivamente a *copA* y *copB* (Lee et al., 1994).

Contrastantemente, Behlau y colaboradores, encontraron que las cepas de Xaj estudiadas poseían un determinante de la resistencia a cobre diferente al descrito anteriormente. En lugar de una organización similar a *copABCD*, se encontró que el grupo de genes se disponía en una organización *copABL*, similar a la hallada en los estudios con Xav y Xac. Adicionalmente, se demostró que el ORF 1, homólogo a *copA*, poseía el mayor porcentaje de identidad con homólogos de este gen en otros fitopatógenos, que los ORFs homólogos a *copBL* (Behlau et al., 2013).

A pesar de conocer todo lo anterior, aún se necesita comprender más profundamente cuáles son todos los componentes determinantes que otorgarían la resistencia a cobre en *Xanthomonas*. Si bien se conoce en general cuáles son estos determinantes en *Xanthomonas arboricola* pv *juglandis* y en familiares cercanos, la evidencia actual indica que ciertos elementos implicados en la resistencia al cobre estarían codificados en elementos genéticos móviles. En la búsqueda de intentar comprender esto, la comparativa genómica resulta una alternativa muy llamativa, puesto que por medio de la comparación de genomas completos se puede indagar, descubrir y comprender tanto los cambios evolutivos, reordenamientos y adquisición de elementos genéticos.

1.3 Necesidad de estudios de comparativa genómica de cepas de *Xanthomonas arboricola* pv *juglandis*

La comparación del genoma resulta en la actualidad muy útil a la hora de discernir y resolver las relaciones filogenéticas entre las especies, como también descubrir las diferencias genómicas que pueden existir entre estas y que pueden ayudar a entender mejor ciertas relaciones bacterianas con sus nichos ecológicos.

En las últimas décadas, varios estudios se han encargado de comprender qué elementos del genoma bacteriano definen a las cepas patógenas de las que no, y cuál de estos elementos otorgan grado de resistencia frente a ambientes selectivos (Essakhi et al., 2015). Se ha demostrado en diversos estudios que cepas virulentas/patogénicas poseen una dotación genómica muy diferente de las cepas no patógenas, ya que la presencia de genes de virulencia, sistemas de secreción, resistencia a metales pesados, resistencia a antimicrobianos, etc., generan una plasticidad característica en el genoma bacteriano de las especies patógenas (Garita-Cambronero et al., 2017; Timilsina et al., 2020).

Para comprender cómo influye la dotación genética de las especies bacterianas, conocer el concepto del Pan-genoma resulta muy útil. Con él es posible clasificar y ordenar el genoma entero de una especie o grupo bacteriano, lo cual a su vez permite distinguir los genes adquiridos verticalmente de los adquiridos horizontalmente.

1.3.1 El Pan-genoma, genes accesorios y la plasticidad del genoma bacteriano

El pan-genoma es la colección completa de genes de una especie, o bien, de un grupo de cepas. Dentro de este se pueden distinguir tres grupos de genes: el “*core-genome*” o genoma central, el cual es compartido por todas las cepas del grupo de comparación; el “*accessory genome*” o genoma accesorio, se refiere a los genes que no están presentes en todas las cepas (genoma dispensable), y aquellos genes que están presentes en solo uno (“*strain-specific genes*”, o genes cepa-específicos) o algunos de los genomas de las cepas (Figura 3) (Soucy et al., 2015).

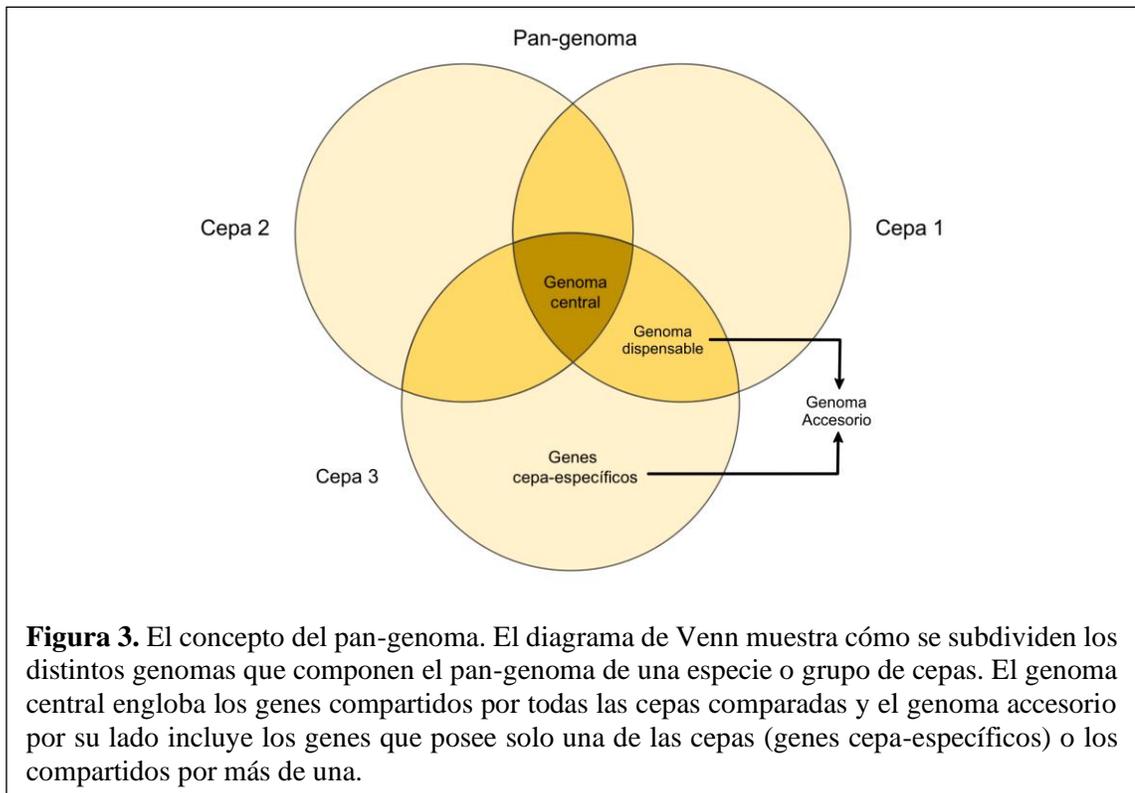


Figura 3. El concepto del pan-genoma. El diagrama de Venn muestra cómo se subdividen los distintos genomas que componen el pan-genoma de una especie o grupo de cepas. El genoma central engloba los genes compartidos por todas las cepas comparadas y el genoma accesorio por su lado incluye los genes que posee solo una de las cepas (genes cepa-específicos) o los compartidos por más de una.

1.3.2 Elementos genéticos móviles (EGMs)

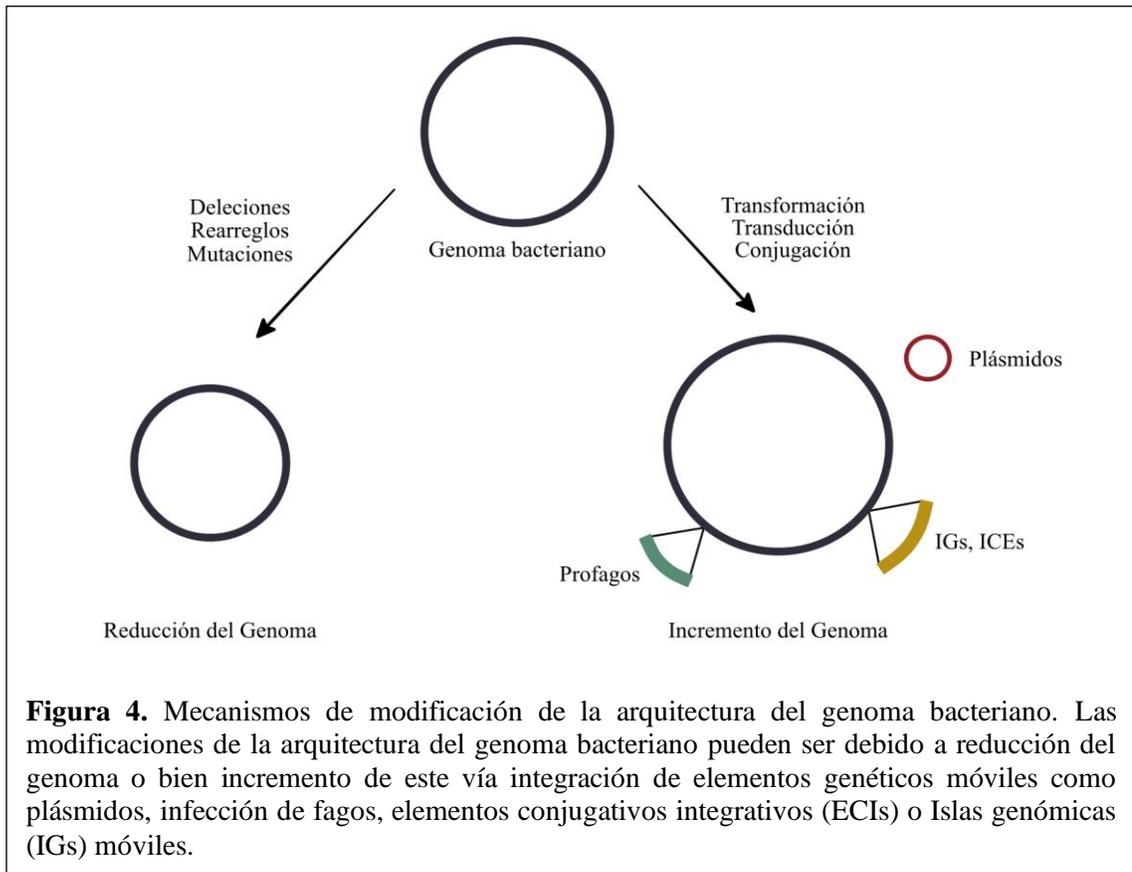
Al igual como ocurre con todos los genomas microbianos, los patógenos bacterianos han evolucionado y modificado la arquitectura de su genoma mediante tres procesos principales: i) modificación de genes existentes, ii) pérdida de genes que ya no están bajo selección, y iii) ganancia de genes que confieren beneficio en su nicho ecológico actual (Figura 4) (Gal-Mor & Finlay, 2006). Estos, por lo general están asociados a mecanismos dependientes de eventos de recombinación homóloga y/o mutaciones.

Los mecanismos de transferencia horizontal de genes (HGT, por sus siglas en inglés) involucran elementos genéticos móviles (EGM) tales como plásmidos conjugativos (PC), bacteriófagos, transposones (Tns), secuencias de inserción (IS, por sus siglas en inglés), elementos conjugativos integrativos (ECI) e islas genómicas (IGs). Estos son susceptibles de cambiar de posición dentro del mismo ADN cromosómico/plasmídico, o bien, ser movilizado hacia un nuevo hospedero.

Las IS se encuentran entre los EGMs más pequeños, y junto con los Tns, se componen de genes de transposasas, enzima que cataliza la recombinación entre las secuencias repetidas e invertidas (IR) que limitan a dichos elementos.

Los ECIs, de un tamaño mayor, poseen una naturaleza intermedia entre los plásmidos conjugativos y los bacteriófagos, capaces de conjugarse, ya sea independientemente o comovilizarse mediante la conjugación de otros elementos. Los ECIs frecuentemente portan muchos genes accesorios y otros EGMs (Johansson et al., 2021).

Las Islas Genómicas (IGs) también resultan interesantes por su gran tamaño y alta carga genética que pueden acarrear. Son segmentos de ADN discreto que difieren entre cepas bacterianas estrechamente relacionadas, a las que se atribuye normalmente, cierta movilidad pasada o presente. Son segmentos relativamente grandes de ADN, entre 10 a 200 kb. Estos se pueden reconocer mediante el estudio de estadística de nucleótidos (% GC, uso de codones, etc.) que generalmente difiere del resto del ADN cromosómico. Estos elementos suelen insertarse frecuentemente en genes que codifican para ARNt (Juhas et al., 2009), característica que comparten con los ECIs. Además, suelen estar flanqueados por repeticiones directas (DR), las que surgen generalmente por la integración específica de las IGs. Esto lleva a ser utilizadas como reconocimiento para una posible escisión enzimática, puesto que a menudo codifican para integrasas que median dicha integración o escisión. Además, cabe destacar que estos elementos a menudo llevan elementos de inserción, transposones, fragmentos de bacteriófagos y/o plásmidos, que pueden haber estado implicados en HGT. Estos EGMs suelen acarrear genes que ofrecen una ventaja selectiva a las cepas hospedadoras, por lo que según el contenido de estos, se clasifican como: islas de patogenicidad, simbiosis, metabolismo, aptitud o resistencia (Dobrindt et al., 2004; Juhas et al., 2009).



1.3.3 Herramientas bioinformáticas para el análisis de genomas bacterianos

Desde la secuenciación de próxima generación (NGS, por sus siglas en inglés) hasta la actualidad, se han ido modernizando cada vez más los métodos utilizados en este rubro, y con ello el aumento drástico en la cantidad de secuencias de genomas microbianos, disponibles en las bases de datos alrededor del mundo.

Entre las bases de datos más utilizadas globalmente se pueden mencionar las del Centro Nacional de Información Biotecnológica e Instituto Europeo de Bioinformática (NCBI y EBI respectivamente, por sus siglas en inglés) (Yu et al., 2017). Esto ha traído consigo la

necesidad de la creación y modernización de las herramientas y softwares bioinformáticos para el análisis y comparación de secuencias genéticas.

Debido a la demanda y posibilidad de anotación genómica automatizada ha sido posible la creación de softwares en línea que permitan llevar a cabo dicha función. RAST (del inglés, **R**apid **A**nnotations using **S**ubsystems **T**echonology) es un software de acceso abierto, que permite identificar genes que codifican para proteínas, ARNt y ARNr, asignar funciones a los ORFs, predecir y clasificar subsistemas representados en el genoma. Además, permite el uso de genómica comparativa entre dos o más genomas microbianos (Overbeek et al., 2014; Wattam et al., 2014).

La colección conjunta de los datos de múltiples géneros y subgéneros de especies bacterianas ha permitido el análisis en profundidad de la diversidad intraespecífica desde varios aspectos. Se está aplicando cada vez más el análisis pan-genómico, donde el software EDGAR permite identificación de genes ortólogos y análisis filogenéticos en diferentes genomas. Esta herramienta bioinformática resulta muy útil para analizar genes del genoma central que comparten un grupo de organismos, o por el contrario, conocer los genes cepa-específicos (singletons) para dilucidar propiedades específicas de este organismo en particular (Blom et al., 2016).

Por otro lado, la plataforma PHASTER (Arndt et al., 2016), se ha convertido en el servidor web más utilizados en la búsqueda e identificación de elementos de tipo-profagos en genomas bacterianos, esto, por su sencillez, rapidez de procesamiento, accesibilidad web, entre otras características que hacen de estas plataformas una excelente herramienta en genómica comparativa.

En cuanto a la búsqueda e identificación de Islas Genómicas, está disponible IslandViewer (Dhillon et al., 2013), plataforma disponible en la web para la predicción computacional y análisis de IGs en genomas bacterianos y arqueales. Esta usa tres de los métodos más precisos disponibles: IslandPath-DIMOB, SIGI-HMM e IslandPick. Hasta la fecha, solo se puede comparar con genomas cargados en su base de datos o bien permitir la carga de secuencias de genomas bacterianos completos para ser usados como “molde”.

Para la organización, visualización y análisis de datos genómicos, el software Geneious resulta ser una herramienta de escritorio bastante eficiente, flexible y fácil de utilizar. En ella se pueden cargar archivos de genomas bacterianos en diversos formatos, mapear conjuntos de genes en otras secuencias genéticas, realizar genómica comparativa y análisis filogenéticos (Kearse et al., 2012).

La presente investigación se centró en la búsqueda de los genes determinantes de la resistencia a cobre ya mencionados, con el fin de realizar un análisis de genómica comparativa en un número de genomas de Xaj obtenidos desde la base de datos de NCBI (sección “*genoma*”), y conocer más acabadamente la distribución de estos genes a nivel global. Para esto, se usaron diversas herramientas bioinformáticas y de dominio público, que permitieron la comparación a nivel genómico de las cepas Xaj. Además, se indagó la transferencia génica inter e intra-especie vía elementos genéticos móviles (EGM), como profagos y/o islas genómicas, que pudieran explicar las características fenotípicas de resistencia a concentraciones elevadas de cobre, como también los posibles orígenes de estos determinantes.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Investigar la diversidad genética de la tolerancia a cobre de cepas *Xanthomonas arboricola* pv *juglandis* asociadas a brotes de Peste Negra en nogales chilenos.

2.2 Objetivos específicos

- 2.2.1 Analizar el pan-genoma de las cepas *Xanthomonas arboricola* pv *juglandis*.
- 2.2.2 Seleccionar y construir un banco de genes asociados a la tolerancia a cobre de *Xanthomonas arboricola* pv *juglandis*.
- 2.2.3 Establecer asociación entre el genotipo y fenotipo de tolerancia al ion cobre de *Xanthomonas arboricola* pv *juglandis*.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Aislamiento y caracterización de *Xanthomonas arboricola* pv *juglandis* chilenas

Un total de 13 cepas de *Xanthomonas arboricola* pv *juglandis* (Xaj) nacionales, se utilizaron para secuenciar sus genomas. Tales cepas provienen de muestras de huertos de nogales de distintas localidades chilenas (Anexo I).

El cepario de Xaj se encuentra en el Laboratorio de Biotecnología del Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos (INTA) de la Universidad de Chile.

3.1.1 Determinación de tolerancia a cobre de cepas Xaj

Para determinar la tolerancia a cobre de las cepas de Xaj se prepararon placas de agar CYE (1,7 g casitona, 0,35 g extracto de levadura, 2 g glicerol, 15 g agar y 1 L de agua destilada) suplementadas con distintas concentraciones de CuSO_4 (0,16 mM, 0,32 mM, 0,64 mM, 0,8 mM, 1,0 mM, 1,2 mM). Se sembraron 10 μL de cada cultivo bacteriano, ajustado a una densidad óptica (620 nm) de 0,5. Esto se realizó por duplicado. Las placas se cultivaron a 28°C por 72 horas, y se cuantificó el crecimiento bacteriano.

Se consideró la concentración mínima inhibitoria de cobre (CMI-Cu) como la concentración más baja donde no hubo crecimiento del cultivo. Las cepas con un CMI-Cu mayor a 1,0 mM CuSO_4 se consideraron como tolerantes (Martin et al., 2004).

3.1.2 Secuencias de *Xanthomonas arboricola* pv *juglandis* nacionales

Las secuencias genómicas correspondientes a las cepas aisladas por el Laboratorio de Biotecnología de los Alimentos del Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos

de la Universidad de Chile, fueron descargadas de la base de datos de genomas de NCBI, buscando específicamente los genomas con código de acceso CFSAN0330XX (donde XX cambia de acuerdo al genoma de una cepa específica). Todas ellas se presentan en calidad de contigs en cuanto a su ensamblaje.

3.2 Secuencias génicas de cepas de referencia de *Xanthomonas arboricola* pv

juglandis: análisis genómico

Las secuencias de los genomas de las cepas Xaj de referencia se obtuvieron desde la base de datos de secuencias de nucleótidos del Centro Nacional para la información Biotecnológica (NCBI, por sus siglas en inglés). Para esto se consideraron los genomas, disponibles a la fecha de la búsqueda (26 de septiembre del 2020), que se obtuvieron en el ítem “*genome*” usando las palabras claves “*Xanthomonas*” y “*arboricola*”, y posterior filtro con la palabra clave “*juglandis*”. Los números de acceso de las cepas obtenidas de la búsqueda se muestran en la Tabla I. A continuación, para cada una se procedió a obtener la información general de las cepas Xaj, del ensamblaje del genoma, del contenido genómico, o sea, cantidad de genes, genes codificantes para proteínas, codificantes para ARNt, número de pseudogenes, etc., y finalmente, a descargar los archivos GenBank y fastas. Los valores del contenido genómico se le denominó *genometría*.

3.3 Anotación alternativa del genoma de las cepas de *Xanthomonas arboricola* pv

***juglandis* y búsqueda manual de genes relacionados con la respuesta al ion cobre**

Una segunda anotación se realizó en la plataforma RAST (por sus siglas en inglés de “*Rapid Annotation using Subsystem Technology*”) (Aziz et al., 2008; Overbeek et al.,

2014) ya que se generó una anotación genómica con clasificación de subsistemas de los genes presentes, en base a comparación con las colecciones de subsistemas y familia de proteínas en su base de datos.

Una vez se tuvieron todos los genomas anotados alternativamente, se procedió a obtener la información entregada sobre los genes relacionados con la homeostasis, resistencia y/o tolerancia a metales pesados, en específico a cobre.

Se usó la clasificación e información de subsistemas, para lo cual se seleccionó cualquiera de los genomas anotados y en “recuento de características del subsistema” se seleccionó la categoría “Transporte de membrana” y luego la subcategoría “Transportadores de cationes”. Lo mismo se realizó para la categoría “Virulencia, enfermedad y defensa” y luego en las subcategorías “Homeostasis de cobre” y “Tolerancia a cobre”. La información desplegada se presentó como una tabla comparativa de los genes clasificados en la categoría seleccionada, entre todas las cepas del estudio. Se rescató esta, además de cada uno de los genes relacionados a homeostasis, resistencia y/o tolerancia a cobre en formato fasta informados en la plataforma. Las cuales se ocuparon en una actividad final para crear un banco de genes.

3.4 Búsqueda predictiva de elementos tipo profago en el genoma de las cepas de

Xanthomonas arboricola pv juglandis

Para la identificación y selección de posibles elementos tipo profago en los genomas de cada una de las cepas Xaj provenientes de la infección de bacteriófagos (profagos), se utilizó la plataforma web PHASTER (Arndt et al., 2016).

Los profagos identificados en los genomas de Xaj se clasificaron, según los criterios de integridad de PHASTER, como completo, incompleto y cuestionable. El resultado se presentó como una tabla resumen con las características de los posibles elementos profagos predichos, se rescató dicha información, como también las secuencias genómicas de dichos elementos para el resto de los análisis comparativos.

3.5 Búsqueda predictiva de Islas Genómicas en los genomas de las cepas de *Xanthomonas arboricola* pv *juglandis*

La búsqueda de posibles islas genómicas (IGs) en los genomas de las cepas Xaj, se realizó con la plataforma web IslandViewer 4 (Bertelli et al., 2017). Este servidor web permitió tanto la predicción como la visualización interactiva de las IGs en los genomas cargados.

IslandViewer 4 integra tres de las herramientas de predicción de IGs más precisas y complementarias: IslandPath-DIMOB, que se basa en el sesgo de nucleótidos y presencia de genes movilidad; SIGI-HMM, basado en el sesgo de uso de codones con un enfoque del modelo de Markov oculto; y IslandPick, basado en un enfoque de comparativa genómica.

En primer lugar, se predijeron las islas genómicas en los genomas completos de las cepas de referencia CFBP 427 (LR824643) y Xaj 417 (CP012251). En segundo lugar, las islas genómicas identificadas en estos genomas de referencia fueron usadas como templado para su búsqueda en el resto de los genomas estudiados, a través del programa Geneious.

3.6 Mapeo e identificación de genes, elementos tipo Profagos e Islas genómicas en Xaj

Para la identificación y mapeo de los genes relacionados con la respuesta al ion cobre obtenidos por la plataforma RAST en los genomas de las cepas Xaj se usó el software Geneious Prime® v2021.1.1. Para esto, con el fin de conocer la arquitectura de los genomas de Xaj, se realizó un mapeo de dichos genes contra los genomas de las cepa Xaj de manera independiente.

En cuanto a elementos de profagos predichos por PHASTER, estos fueron mapeados en conjunto contra su cepa correspondiente, conociendo así, la posición exacta en el genoma, o bien, el contig (genomas incompletos). Paralelamente, se realizó un alineamiento de genoma completo, usando la instalación manual “*plugin*” del algoritmo progressiveMAUVE (Darling et al., 2010) en Geneious, de todos los grupos de profagos compartidos entre las cepas de Xaj, con el fin de comparar el contenido genético de estos EGMs en cada cepa.

Para el mapeo e identificación de las islas genómicas predichas en las dos cepas de referencia, se procedió a realizar una búsqueda en la plataforma Geneious y selección manual de aquellas que cumplieran las siguientes características: que la región codificara un número igual o mayor a 5 ORFs (>5 kb), uno o más elementos escindibles (transposasas, integrasas, elementos integrativo-conjugativo, etc.), y en cercanías de algún gen que codificara para un ARNt. Una vez encontradas y seleccionadas las IGs que cumplieran estas características se procedió extraer los CDS anotados de dichas regiones

del genoma, utilizándolos como plantados para su búsqueda en los genomas del resto de las cepas Xaj (IGs putativas).

Posterior a ello, para analizar conservación o divergencia génica de estos CDSs en el resto de las cepas se realizó un análisis comparativo usando progressiveMauve entre las IGs putativas encontradas en cada una de las cepas Xaj.

3.7 Análisis del Pan-genoma de las cepas *Xanthomonas arboricola* pv *juglandis*

La predicción y análisis del pan-genoma fue posible gracias a la plataforma EDGAR (Blom et al., 2016), la cual permite la determinación del genoma central y genes accesorios. Para esto, EDGAR usa un criterio de ortología que implementa los denominados valores de razón de puntajes de BLAST (SRV, por sus siglas en inglés) y define automáticamente un límite maestro usado en la comparación de múltiples genomas para la identificación de genes ortólogos. Este límite de ortología es bastante estricto, ya que permite filtrar los resultados BLAST de baja calidad. Se usa un genoma como referencia y un conjunto de otros genomas con los que se compara, el cual es el punto de partida para la extensión o reducción iterativa del conjunto de genes resultantes en una cantidad definida de genomas comparados. Los genomas de las cepas Xaj fueron cargados en la base de datos de EDGAR para todos los análisis, seleccionando a la cepa Xaj 417 (CP012251) como referencia para los análisis comparativos.

Así, el genoma central representa todos los genes del genoma de referencia que no hayan sido descartados (conjunto básico) al compararse iterativamente con el resto de los genomas (presentes en el 100% de los genomas comparados) bajo el criterio de ortología

mencionado anteriormente. Por su parte, el pan-genoma se calcula de manera similar. Todo conjunto de genes de un genoma que no tiene ortólogo en el conjunto básico del genoma de referencia se agrega a este. Esto se itera por cada genoma a comparar hasta lograr la totalidad del pan-genoma. El genoma accesorio por su parte se estimó como la resta del número de genes totales en el genoma de cada cepa Xaj y el número total de genes del genoma central de las cepas Xaj.

Adicionalmente, se realizó una gráfica del desarrollo del pan-genoma vs genoma central. Esto permite ver cómo varía tanto el genoma central como el pan-genoma con la adición de un cierto número de genomas a la vez. Se calculan los tamaños del genoma central y pan-genoma iterativamente. Para esto, el programa en la plataforma de EDGAR permitió seleccionar 15 genomas. Se escogieron seis de las 13 cepas chilenas (LHBK01, LHBL01, LHBM01, LHBN01, LHBR01 y LHBW01) debido a la alta similitud de sus genomas. De los genomas internacionales de Xaj se escogieron nueve (JZEG01, JZEF01, MDSM01, UIHD01, UNRN01, UNRM01, PNRC01, CP012251 y LR824643).

3.8 Análisis de Filogenia

3.8.1 Árbol filogenético

La relación filogenética de las cepas Xaj se estableció a través de la plataforma EDGAR, utilizando todos los genes ortólogos del genoma central de las especies bacterianas estudiadas.

Para esto, se seleccionaron los 22 genomas de las cepas de Xaj y se realizó en primer lugar un alineamiento múltiple por separado de cada conjunto de genes ortólogos encontrados

en todos los genomas usando el software MUSCLE (Edgar, 2004). Luego, se enmascararon las regiones no coincidentes con el programa GBLOCKS (Talavera & Castresana, 2007) y los alineamientos de los conjuntos de genes coincidentes se concatenaron. Finalmente se calculó la matriz de distancias utilizando el método de unión de vecinos y se construyó el árbol filogenético con el paquete PHYLIP (Felsenstein, 1989).

3.8.2 Matriz de identidad nucleotídica promedio (ANI)

Para ahondar aún más en la relación filogenética y distancias evolutivas que presentan las cepas Xaj estudiadas, se calculó y construyó una matriz de identidad nucleotídica promedio (ANI, por sus siglas en inglés). El método se basa en una comparación BLASTn de las secuencias genómicas del genoma de las cepas Xaj. Se seleccionaron los 22 genomas de las cepas Xaj y se calculó la identidad media de todas las coincidencias de BLASTn que mostraron más de un 30% de identidad con la secuencia general en un región que alineó en al menos un 70% de su largo, lo que permitió descartar el error en la inferencia de homología en la búsqueda de similitud de ciertas regiones (Goris et al., 2007). Se construyó finalmente un mapa de calor del valor ANI que presentaron las 22 cepas Xaj al compararlas bajo este análisis.

3.9 Análisis de Sintenia de los genes relacionados con la respuesta a cobre

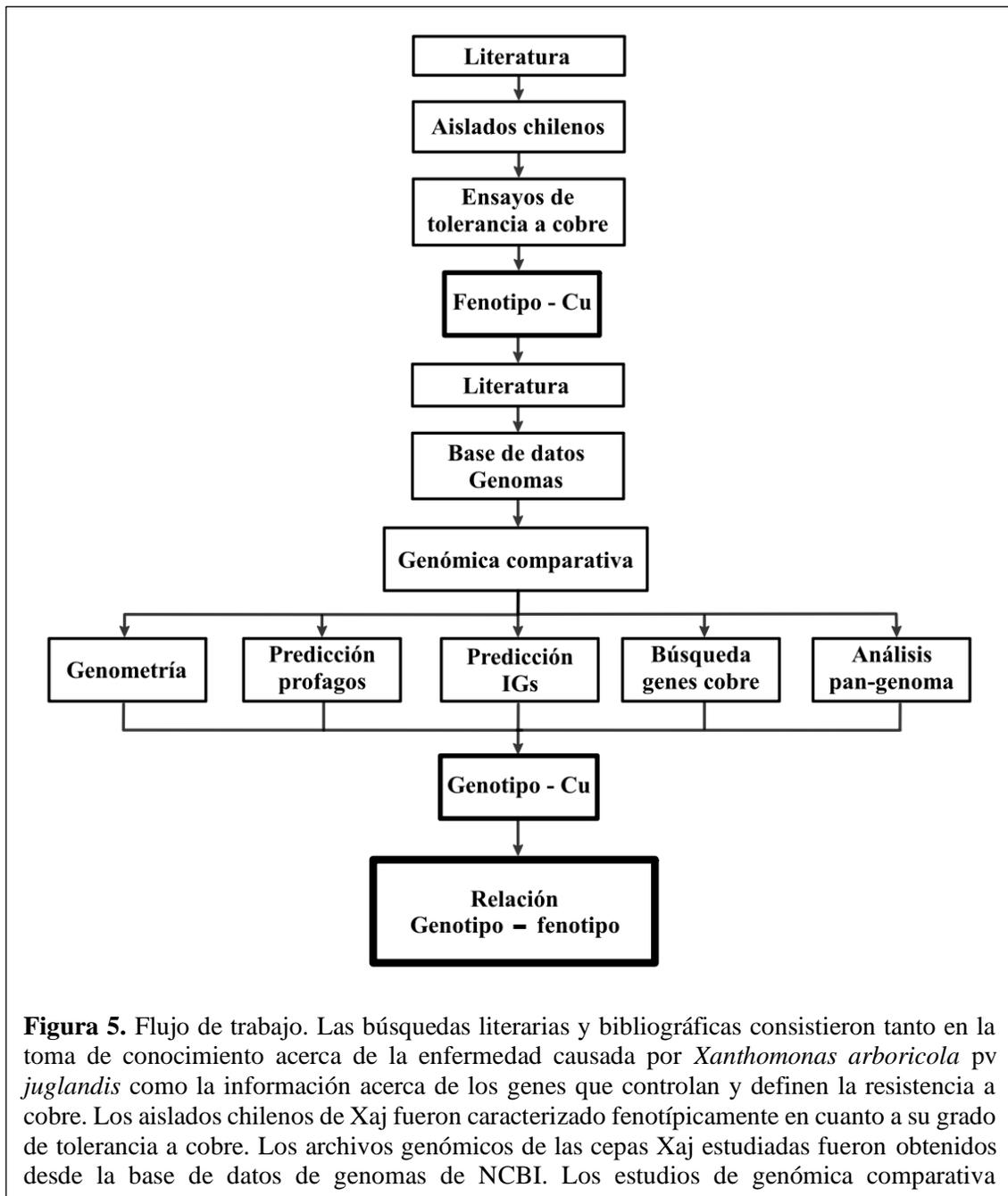
Para indagar acerca de posibles orígenes de transferencia horizontal de los genes relacionados con la respuesta a cobre, codificados en el genoma de las cepas Xaj, se

buscaron ortólogos de los genes presentes en los elementos genéticos móviles ya predichos en otras bacterias ambientales y/o fitopatógenas.

Para esto, se utilizó el complemento de BLAST en Geneious Prime, el cual se configuró usando la base de datos de nucleótidos de NCBI en modalidad “blastn”. El máximo de *hits* se configuró en 6 y la recuperación del “*match*” se configuró para que entregara un contexto genómico de un intervalo de 15 kb río arriba y río abajo.

El programa se ejecutó en lote para el grupo de genes de los EGMs de cada cepa analizada. Luego de obtener los 6 mejores *hits* para cada gen al que se le realizó blastn, se revisó su valor E y su grado (puntuación ponderada para el acierto que se compone del valor E, la identidad por pares y la cobertura). Se eligieron aquellos resultados con mejor puntuación y se agruparon los genes ortólogos hallados para una misma cepa (ver números de acceso) en búsqueda de posibles EGMs en estas cepas ortólogas.

El resumen del flujo de trabajo integrado que se siguió para el presente trabajo se muestra en la Figura 5.



4. RESULTADOS

4.1 Análisis del contenido genómico de las cepas *Xanthomonas arboricola* pv *juglandis*

Se estudiaron 22 genomas de cepas de *Xanthomonas arboricola* pv *juglandis* de distintos orígenes geográficos. Trece de estas correspondieron a genomas de Xaj aisladas por el grupo del laboratorio de Biotecnología de alimentos del Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos (INTA), mientras que los otros nueve correspondieron a cepas internacionales, disponibles en la base de datos de NCBI (Tabla I).

Tabla I. Información general del origen del aislamiento de las cepas de *Xanthomonas arboricola* pv *juglandis* analizadas en este estudio. Se indican los números de acceso de los genomas obtenidos desde la base de datos de NCBI (National Center for Biotechnology Information).

Cepa	Origen	Año de Aislamiento	Nº de acceso de genoma NCBI
CFBP 2528	Nueva Zelanda	1956	NZ JZEF01000000
CFBP 7179	Francia	2002	NZ JZEG01000000
CFBP 8253	Francia	2002	NZ MDSM01000000
CFSAN033077	Chile	2014	NZ LHBK01000000
CFSAN033078	Chile	2014	NZ LHBL01000000
CFSAN033079	Chile	2014	NZ LHBM01000000
CFSAN033080	Chile	2014	NZ LHBN01000000
CFSAN033081	Chile	2014	NZ LHBO01000000
CFSAN033082	Chile	2014	NZ LHBP01000000
CFSAN033083	Chile	2014	NZ LHBQ01000000
CFSAN033084	Chile	2014	NZ LHBR01000000
CFSAN033085	Chile	2014	NZ LHBS01000000
CFSAN033086	Chile	2014	NZ LHBT01000000
CFSAN033087	Chile	2014	NZ LHBU01000000
CFSAN033088	Chile	2014	NZ LHBV01000000
CFSAN033089	Chile	2014	NZ LHBW01000000
CPBF 1521	Portugal	2014	NZ UIHD01000000
CPBF 367	Portugal	2016	NZ UNRN01000000
CPBF 426	Portugal	2016	NZ UNRM01000000
CPBF 427	Portugal	2020	NZ LR824643
DW3F3	China	2015	NZ PNRC01000000
Xaj 417	Estados Unidos	2012	NZ CP012251

4.1.1 Caracterización de los genomas de las cepas de Xaj internacionales

Para las cepas internacionales, los tamaños de sus genomas variaron entre los 4,89 Mb y las 5,23 Mb aproximadamente, con contenido de GC de entre un 65,4 y un 65,9 %. El rango de la cantidad de genes de las cepas de Xaj internacionales fue de entre 4.143 y 4.503 genes, en cambio, las secuencias codificantes (CDS, por sus siglas en inglés) variaron de 4.000 a 4.242 CDS. El número de pseudogenes, por otro lado, fue de entre los 68 a los 165 pseudogenes. En cuanto al contenido de ARNr y ARNt, estos variaron entre 2 y 7, y 51 y 54 operones, respectivamente. El número de contigs y el N50 (la longitud del *contig* más corto que logra cubrir el 50% de la longitud total del genoma) de las cepas Xaj internacionales, variaron entre 1 y 91, y 173 Kb y los 5,2 Mb aproximadamente, respectivamente (Tabla II), lo que da cuenta de las diferencia de calidad del ensamblaje de los genomas de cepas internacionales, probablemente debido a las diferentes tecnologías de secuenciación y algoritmos de ensamblajes utilizados por los grupos que las estudiaron.

En este punto es importante recalcar algunas diferencias en cuanto a los valores genómicos mencionados. Las cepas extranjeras CPBF 426, CPBF 367 y CFBP 8253 presentaron un menor número de genes, al igual que sus CDS. En particular, las cepas CPBF 426 y CPBF 367 poseen ligeramente un mayor porcentaje de GC, un mayor número de genes codificantes para ARNr, pero un número menor de pseudogenes (Tabla II), con respecto al resto de las cepas Xaj internacionales.

Por otro lado, las cepas Xaj 417 y CPBF 427 presentaron los mayores valores de N50, con 5.228.174 y 1.963.325 bases, respectivamente, indicando la calidad del ensamblaje, ya

que se observó que, por su parte, el genoma de la cepa CPBF 427 se encuentra completo, mientras que la cepa Xaj 417 presenta un genoma fragmentado en un menor número de contigs.

4.1.2 Caracterización de los genomas de las cepas de Xaj nacionales

Para las cepas nacionales, los tamaños de sus genomas variaron entre los 5,10 Mb y las 5,18 Mb aproximadamente, con contenido de GC de entre un 65,4 y un 65,6 %. El rango de la cantidad de genes de las cepas de Xaj nacionales fue de entre 4.398 y 4.508 genes, en cambio, las secuencias codificantes (CDS, por sus siglas en inglés) variaron de 4.148 a 4.261 CDS. El número de pseudogenes, por otro lado, fue de entre los 130 a los 194 pseudogenes. En cuanto al contenido de ARNr y ARNt, estos variaron entre 3 y 5, y 49 y 52 operones, respectivamente. El número de contigs y el N50 de las cepas Xaj nacionales, variaron entre 196 y 232, y 42 y 53 Kb aproximadamente, respectivamente (Tabla II), valores que dan cuenta de la homogeneidad de la tecnología de secuenciación y algoritmo de ensamblaje utilizadas en estas cepas.

Tabla II. Datos genómicos de las cepas de *Xanthomonas arboricola* pv *juglandis* analizadas en este estudio. Se desglosan dichos valores en cepas internacionales y cepas nacionales analizadas por el grupo de Biotecnología de los Alimentos del INTA.

	Cepa	Tamaño (pb)	N° de Contigs	N50 (pb)	N° genes totales	CDS totales	% GC	N° pseudogenes	ARNr	ARNt
Cepas Internacionales	CFBP 2528	5.084.477	19	431.859	4.388	4.132	65,5	157	2	52
	CFBP 7179	5.157.457	23	479.113	4.485	4.222	65,4	165	4	51
	CFBP 8253	4.999.462	91	1.562.36	4.238	4.007	65,6	134	4	52
	CPBF 1521	5.194.740	56	173.159	4.503	4.242	65,4	165	6	52
	CPBF 367	4.956.382	22	687.415	4.162	4.015	65,8	69	6	54
	CPBF 426	4.894.012	11	730.188	4.143	4.000	65,9	68	6	51
	CPBF 427	5.228.174	1	5.228.174	4.463	4.237	65,4	128	6	54
	DW3F3	5.144.433	8	1.706.766	4.390	4.158	65,4	133	7	53
	Xaj 417	5.218.943	4	1.963.325	4.425	4.172	65,4	157	3	52
Cepas Nacionales	CFSAN033077	5.101.226	197	52.493	4.445	4.163	65,4	189	3	52
	CFSAN033078	5.116.263	215	42.433	4.428	4.148	65,6	178	3	49
	CFSAN033079	5.140.693	215	47.879	4.441	4.193	65,5	154	3	51
	CFSAN033080	5.184.222	225	43.231	4.489	4.259	65,5	137	3	50
	CFSAN033081	5.141.924	186	53.016	4.462	4.216	65,4	154	3	51
	CFSAN033082	5.184.404	232	43.232	4.508	4.261	65,5	153	3	51
	CFSAN033083	5.117.849	206	51.170	4.408	4.157	65,6	157	3	51
	CFSAN033084	5.138.566	210	45.363	4.422	4.181	65,6	148	3	49
	CFSAN033085	5.118.988	196	52.430	4.428	4.158	65,6	176	3	51
	CFSAN033086	5.144.142	205	47.552	4.475	4.188	65,4	194	3	52
	CFSAN033087	5.104.256	215	47.618	4.393	4.158	65,5	139	5	51
	CFSAN033088	5.173.660	221	42.061	4.478	4.253	65,5	130	3	52
	CFSAN033089	5.134.564	213	45.291	4.424	4.174	65,5	155	3	51

4.1.3 Anotación alternativa de genomas y primera búsqueda de genes relacionados con la respuesta al ion cobre

Se utilizó la plataforma web RAST para realizar una anotación alternativa de los genomas de las 22 cepas Xaj, lo cual permitió categorizar los genes de acuerdo con su funcionalidad en subsistemas. Haciendo uso de esta característica, se buscó, comparó y rescató aquellas secuencias de genes relacionados con la resistencia y/o tolerancia al ion cobre. Como resultado se identificó un total de 8 genes, los que correspondieron a genes *copABCDGKL* (Tabla III).

Estos genes fueron categorizados en la subcategoría “Resistencia a antibióticos y compuestos tóxicos” en el subsistema “Virulencia, enfermedad y defensa”, y según RAST corresponden a genes involucrados en la homeostasis de cobre, los que correspondieron a: *copA*, que codifica para una multicobre oxidasa (MO); *copB*, codifica una proteína B de resistencia a cobre (CRB); *copC*, codifica para la proteína C de resistencia a cobre; *copD*, codifica para la proteína D de resistencia a cobre; *copF* o *ctpA*, codifica una ATPasa tipo P de traslocación de cobre (CIA); *copG*, codifica una proteína G.

Tabla III. Presencia o ausencia de los genes *cop* en los genomas de las cepas Xaj entregada por el software RAST. Las casillas de color negro y gris indican la presencia y ausencia de genes *cop*, respectivamente. Se indica con el símbolo “X” acompañado de un número la abundancia del gen en el genoma de la cepa correspondiente.

Cepas Xaj	Genes <i>cop</i>							
	<i>copA</i>	<i>copB</i>	<i>ctpA</i>	<i>copC</i>	<i>copD</i>	<i>copG</i>	<i>copK</i>	<i>copL</i>
CFBP 2528	■	■	■	■	■	■	■	■
CFBP 7179	X2	X2	■	■	■	■	■	■
CFBP 8253	■	■	■	■	■	■	■	■
CFSAN033077	■	■	■	■	■	■	■	■
CFSAN033078	■	■	■	■	■	■	■	■
CFSAN033079	X2	X2	■	■	■	■	■	X2
CFSAN033080	■	■	■	■	■	■	■	■
CFSAN033081	■	■	■	■	■	■	■	■
CFSAN033082	■	■	■	■	■	■	■	■
CFSAN033083	■	■	■	■	■	■	■	■
CFSAN033084	■	■	■	■	■	■	■	■
CFSAN033085	■	■	■	■	■	■	■	■
CFSAN033086	■	■	■	■	■	■	■	■
CFSAN033087	■	■	■	■	■	■	■	■
CFSAN033088	■	■	■	■	■	■	■	■
CFSAN033089	■	■	■	■	■	■	■	■
CPBF 1521	■	■	■	■	■	■	■	■
CPBF 367	■	■	■	■	■	■	■	■
CPBF 426	■	■	■	■	■	■	■	■
CPBF 427	■	■	■	■	■	■	■	■
DW3F3	■	■	■	■	■	■	■	■
Xaj 417	X2	X2	■	■	■	■	■	X3

Con el fin de conocer si los genes relacionados con la resistencia y/o tolerancia al ion cobre encontrados en RAST tienen origen por transferencia horizontal, a continuación se predijeron los elementos genéticos móviles (EGMs), tales como islas genómicas y profagos, en los genomas de las cepas Xaj.

4.1.4 Predicción de elementos genéticos móviles en genomas de cepas Xaj

4.1.4.1 Secuencias tipo profago

El software PHASTER permitió la predicción de elementos de tipo profago contenidos en las cepas Xaj, y a través de Geneious se localizaron dichos elementos en las secuencias genómicas

Se predijo un total de 12 elementos tipo profago distribuidos entre las 22 cepas de Xaj. El tamaño de las regiones varió de 7 a 61 kb, con un total de proteínas codificadas en estas regiones de entre 7 y 55. El porcentaje de GC varió entre 59.8 y 68.8 %, (Anexo II).

Se observó que de los 12 elementos tipo profagos predichos, los profagos “Xantho”, “Stenot” y “Burkho” (denominados Pp1, Pp2 y Pp3, respectivamente), fueron los más compartidos por las cepas Xaj en diferentes grados de integridad del elemento. Por otro lado, los profagos Pp4 a Pp12 parecieran ser menos prevalentes y solo estar presentes en las cepas CPBF 426 y Xaj 417 (Figura 6).

Por su lado, todas las cepas chilenas de Xaj comparten el profago “Xantho” (Pp1), independiente el grado de integridad del elemento (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**). El porcentaje de similitud en el alineamiento múltiple de las secuencias

tipo profago de las cepas que lo compartieron arrojó un 80% (Ver Figura 6 y Anexo II, III-B y IV-A).

Para el caso del profago Pp2, este no fue compartido por todas las cepas Xaj chilenas, sin embargo, en las que si lo compartieron se presentó un porcentaje de similitud de las secuencias nucleotídicas cercano al 66% (ver Anexos II, III-C, IV-B). En cuanto al profago Pp3, fue el menos compartido por las cepas Xaj, presentándose en solo 2 cepas chilenas (Ver figura 6 y Anexo II, III-D y IV-C).

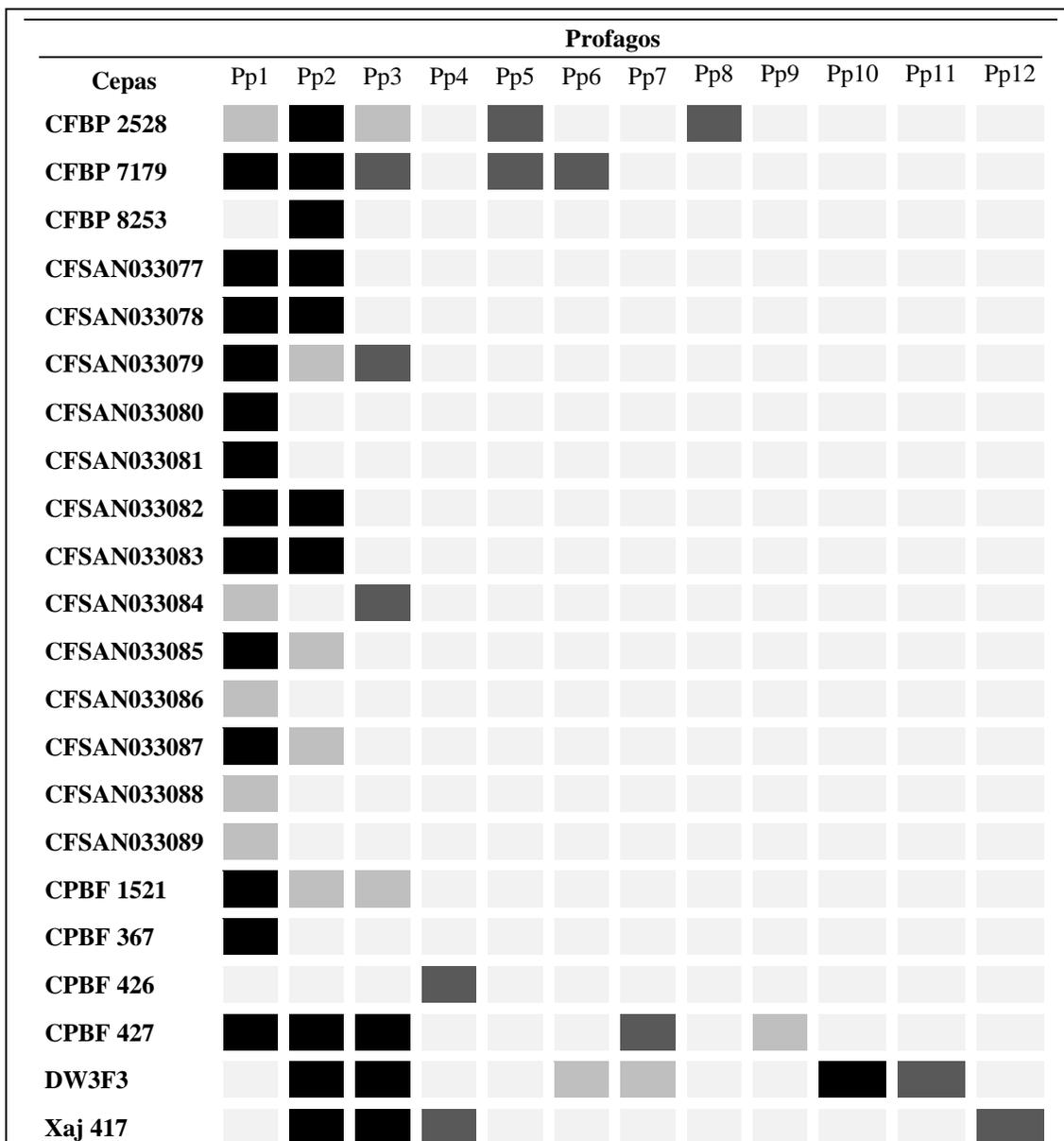


Figura 6. Profagos (Pp) predichos por PHASTER y mapeados en los genomas de las cepas Xaj mediante Geneious. El mapa de calor muestra tanto la presencia/ausencia de los profagos predichos como también el grado de “completitud” de dicho elemento. Las casillas negras indican la calidad “intacto” del profago, las casillas gris oscuro indican la calidad “cuestionable” del profago, las casillas gris medio indican la calidad “incompleto” del profago y la casilla gris claro indica ausencia de profago en el genoma de la cepa Xaj.

4.1.4.2 Islas Genómicas

En cuanto a las Islas genómicas (IGs), se usaron los genomas de las cepas Xaj 417 y CPBF 427 como referencia. Los tamaños aproximado de estas variaron entre 11 y 61 kb, el número de ORFs entre 11 y 83, y el porcentaje de GC entre 57.9 y 64.8% (Tabla IV).

Se usaron estas como templatado y se predijeron y mapearon contra el resto de las cepas en búsqueda de IGs putativas. Como resultado se encontró un total de 19 IGs (Tabla V) que cumplieron con los requisitos establecidos (ver Materiales y Métodos).

Las distintas características de las IGs predichas se resumen en la Tabla IV. Las IGs putativas halladas en el resto de las cepas se presentan en la Tabla V.

En cuanto a la distribución, se observó que las IGs 9 y 16 estuvieron presentes en todas las cepas Xaj, mientras que las IGs #1, #3, #4, #5, #7, #8, #10, #13, #15 y #17 solo estuvieron presentes hasta un mínimo de 73% de todas las cepas Xaj. Las IGs #2, #6, #11, #12, #14, #18 y #19 parecieran ser cepa-específicas. Cabe mencionar además, que en las cepas CFBP 7179 (contig 2) y CFSAN033079 (contig 15) se identificaron dos IGs únicas para estas (Tabla V). A excepción de la IG#1, se encontraron en el resto de las IGs, genes relacionados con ARNt y/o integrasas/transposasas.

Se buscó la presencia de genes relacionados con la respuesta al ion cobre dentro de estas. Se identificaron diversos genes relacionados con la respuesta a cobre, entre los que se destacan los hallados en las islas IG#2, IG#18 e IG#19 (Tablas IV y V). En secciones próximas se ahondará en ellos.

Tabla IV. Islas genómicas predichas en los genomas de las cepas de *Xanthomonas arboricola* pv *juglandis*. Se detallan sus características genómicas junto con el principal atributo del contenido de estas. Se listan las islas genómicas predichas usando como referencia los genomas de las cepas Xaj 417 y CPBF 427 y las IGs encontradas únicamente en las cepas CFBP 7179 y CFSAN033079.

GI#	Posición de la región (pb)	Tamaño (pb)	Nº ORFs	% GC	Principal atributo
Xaj 417 (cromosoma)					
1	2.062-51.679	49.617	36	61,6	Virulencia y resistencia
2	133.331-146.711	13.380	12	59,5	Resistencia a cobre
3	163.791-175.829	12.038	12	63,5	Metabolismo ADN
4	186.630-199.180	12.550	12	61,3	Metabolismo ADN
5	207.648-219.578	11.930	11	64,8	Conjugación/integración
6	219.845-255.952	36.107	32	57,9	Virulencia
7	715.751-771.850	56.099	49	60,5	Virulencia y resistencia
8	780.772-804.874	24.102	27	59,2	Virulencia y resistencia
9	872.279-894.900	22.621	19	63,1	Transportadores de eflujo
10	1.392.367-1.405.664	13.297	12	61,7	Metabolismo ADN
11	2.456.992-2.518.520	61.528	49	59,1	Metabolismo ADN
12	2.673.089-2.687.894	14.805	13	62,8	Metabolismo y energía
13	3.836.944-3.874.112	37.168	37	59,5	Metabolismo ADN
14	4.238.991-4.258.546	19.555	21	62,6	Quimiotaxis
15	4.531.898-4.562.689	30.791	29	60,1	Funciones hipotéticas
16	4.767.555-4.792.975	25.420	30	63,7	Metabolismo y energía
CPBF 427 (cromosoma)					
17	2.709.432-2.767.326	57.894	83	64,1	Genes tipo profago
CFBP 7179 (contig 2)					
18	760.535-786.809	26.274	27	63,9	Resistencia a metales pesados
CFSAN033079 (contig 15)					
19	16.600-42.915	26.315	26	61,2	Resistencia a cobre

Tabla V. Presencia o ausencia de las islas genómicas putativas en los genomas de las cepas de *Xanthomonas arboricola* pv *juglandis*. Las casillas negras indican la presencia del elemento genético móvil, mientras que las casillas gris claro indican la ausencia en dichas cepas.

Cepas	Islas Genómicas (IG #)																		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
CFBP 2528	■	□	□	□	□	□	□	□	■	□	□	■	■	□	■	■	■	□	□
CFBP 7179	■	□	■	■	■	□	□	□	■	□	□	□	■	□	■	■	■	■	□
CFBP 8253	■	□	■	□	□	□	■	■	■	□	□	□	■	□	■	■	□	□	□
CFSAN033077	■	□	■	■	■	■	■	■	■	■	□	□	■	□	■	■	■	□	□
CFSAN033078	■	□	■	■	■	□	■	■	■	■	□	□	■	□	■	■	■	□	□
CFSAN033079	■	□	■	■	■	■	■	■	■	■	□	□	■	□	■	■	■	□	■
CFSAN033080	■	□	■	■	■	■	□	■	■	■	□	□	■	□	■	■	■	□	□
CFSAN033081	■	□	■	■	■	□	■	■	■	■	□	□	■	□	■	■	■	□	□
CFSAN033082	■	□	■	■	■	□	■	■	■	■	□	□	■	□	■	■	■	□	□
CFSAN033083	■	□	■	■	■	□	■	■	■	■	□	□	■	□	■	■	■	□	□
CFSAN033084	■	□	■	■	■	■	■	■	■	■	■	□	■	■	■	■	■	□	□
CFSAN033085	■	□	■	■	■	□	■	■	■	■	□	□	■	□	■	■	■	□	□
CFSAN033086	■	□	■	■	■	□	■	■	■	■	□	□	■	□	■	■	■	□	□
CFSAN033087	■	□	■	■	■	□	■	■	■	■	□	□	■	□	■	■	■	□	□
CFSAN033088	■	□	■	■	■	□	■	■	■	■	□	□	■	□	■	■	■	□	□
CFSAN033089	■	□	■	■	■	■	■	■	■	■	■	□	■	■	■	■	■	□	□
CPBF 1521	■	□	■	■	■	■	■	■	■	■	□	□	□	□	■	■	■	□	□
CPBF 367	□	□	□	□	□	□	□	□	■	□	□	□	□	□	□	■	□	□	□
CPBF 426	□	□	□	□	□	□	□	□	■	□	□	□	□	□	□	■	□	□	□
CPBF 427	■	□	■	■	■	■	■	■	■	■	□	■	□	□	■	■	■	□	□
DW3F3	■	□	■	■	■	□	□	□	■	□	□	■	■	□	■	■	□	□	□
Xaj 417	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	□	□	□

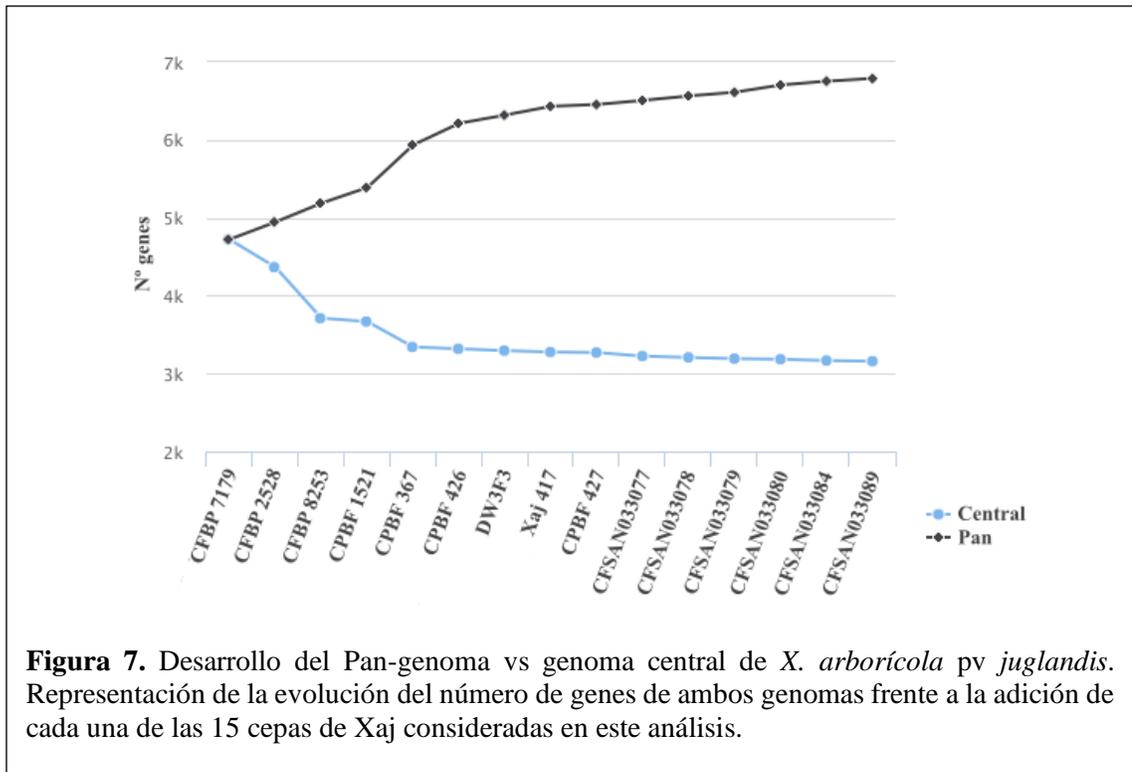
4.2 Análisis del pan-genoma de las cepas *Xanthomonas arboricola* pv *juglandis*

4.2.1 Pan-genoma, genes accesorios y *singletons*

Utilizando la plataforma EDGAR, se determinó la clasificación pan-genómica del genoma de las cepas Xaj. El repertorio de genes del pan-genoma de Xaj aumentó con la adición secuencial de las secuencias del genoma de cada una de las cepas Xaj analizadas. Y así se observó en la curva de desarrollo del pan-genoma vs genoma central (Figura 7), que representa la evolución del pan-genoma y genoma central con la adición de genomas a la comparación, mostrándose una curva con comportamiento asintótico. Esto quiere decir que, el modelo predice que por cada nuevo genoma que se agregue al análisis, nuevos genes serán identificados y el pan-genoma seguirá en aumento, con lo cual se consideraría que el pan-genoma de Xaj es abierto. Se calculó que este poseía un total de 6970 genes cuando se incluyeron los 22 genomas de Xaj y se utilizó la cepa Xaj 417 como referencia (Figura 8).

En contraste con el aumento del pan-genoma, por su lado, el genoma central (“*core-genome*”) de las cepas Xaj disminuyó con la adición de cada nuevo genoma a la comparación, tal como se esperaba, manteniéndose casi constante aun así con la adición de más genomas (Figura 7). El contenido genético promedio de este fue de 3.111 genes, cuando se analizaron los 22 genomas de Xaj y la cepa Xaj 417 como cepa de referencia (Figura 8), representando cerca de un 71% del total de genes promedio (4.409) de las cepas Xaj.

Por otro lado, el genoma accesorio tuvo en promedio una cantidad de 1298 genes totales, siendo las cepas CPBF 426 y CPBF 367 las que poseen un menor número de estos, con 1032 y 1051 genes, respectivamente, y las cepas CPBF 1521 y CFSAN033082 las que poseen un mayor número, con 1392 y 1397 genes, respectivamente. Además, dentro de los genes accesorios se diferenciaron aquellos genes específicos de cepa (genes cepa-específico o *singletons*), siendo las cepas CPBF 426 y CPBF 367 las que mostraron un número mayor de genes *singletons*, con un total de 196 y 293, respectivamente. Por el contrario, cabe destacar que las cepas chilenas de Xaj poseen un menor número de genes *singletons*, siendo la cepa CFSAN033080 la que posee un mayor número de estos, con 12 *singletons*, mientras que otras solo poseen uno o cero (Figura 8).



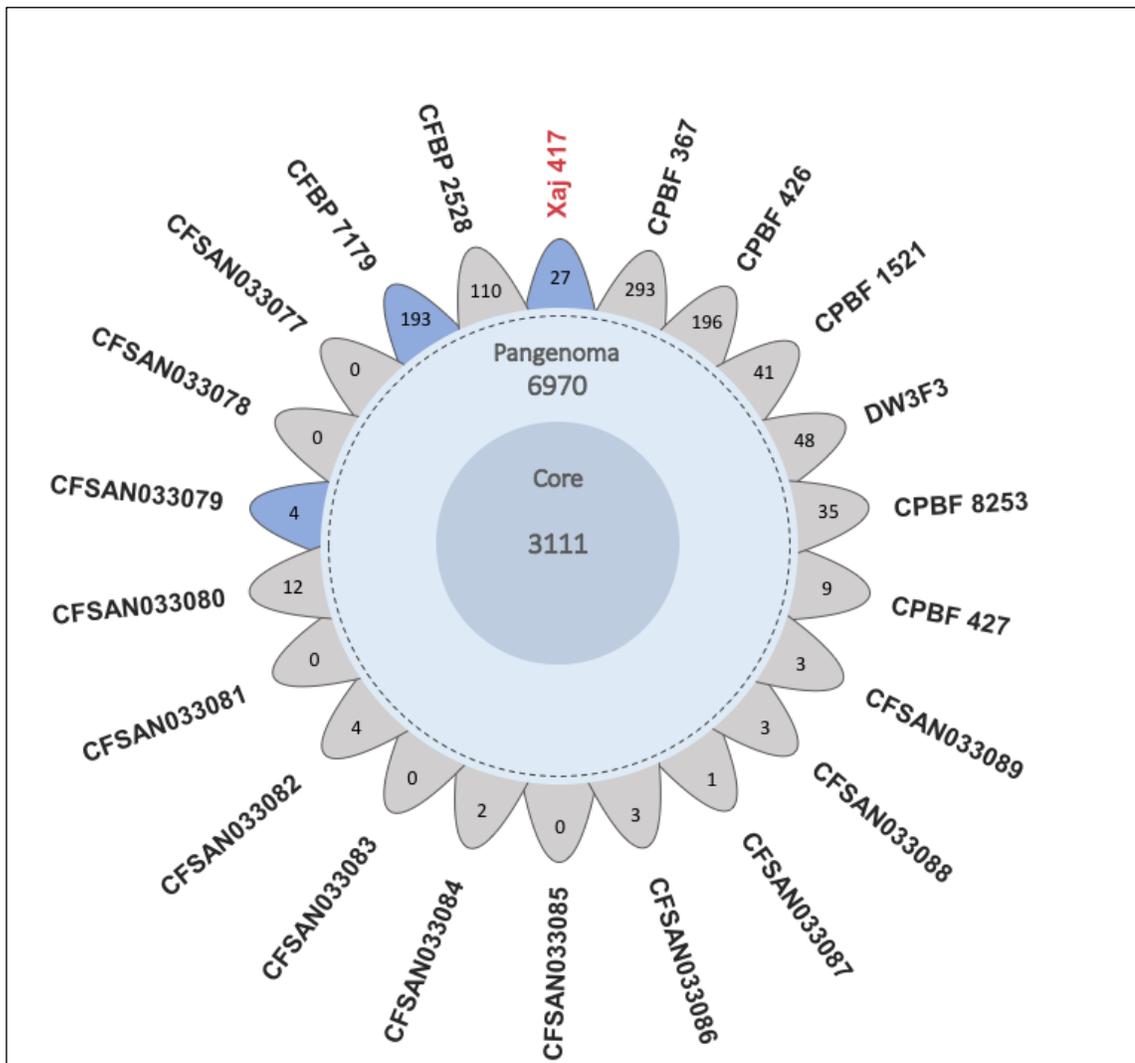
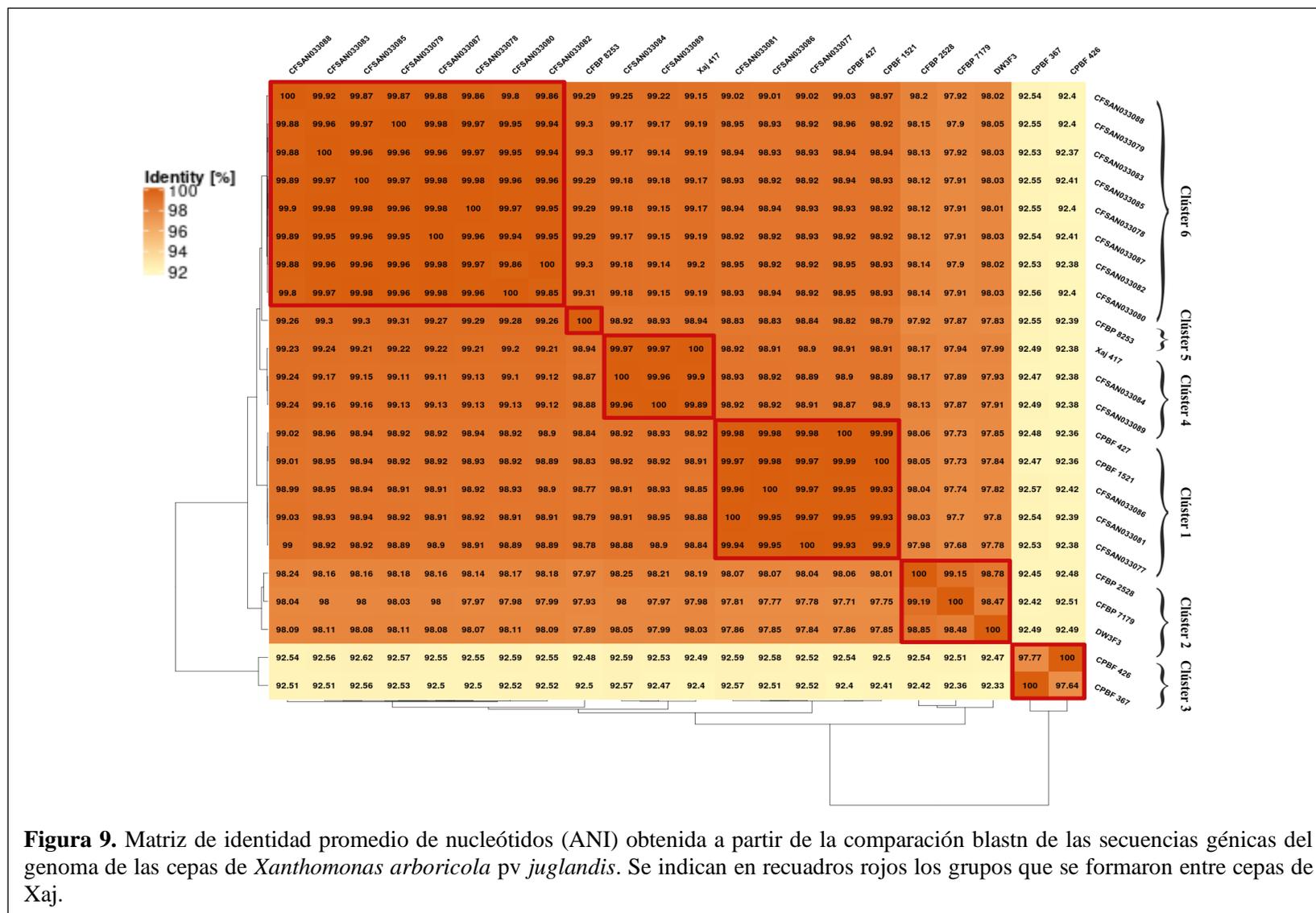


Figura 8. Pan-genoma de *X. arboricola* pv *juglandis* (Xaj). El diagrama de pétalos representa en su centro el número de genes compartidos (genoma central o *Core*), la suma de todos los genes de las cepas comparadas (Pan-genoma) y los pétalos, propiamente tal, representan a los genes cepa-específicos (singletons) que se encuentran en cada genoma de las cepas de Xaj analizadas. Los pétalos destacados con color azul intenso indican la presencia de genes posiblemente relacionados con resistencia a cobre dentro de ese grupo de singletons. Se indica de color rojo la cepa que se usó como cepa referencia en el análisis en EDGAR.

4.2.2 Filogenia de las cepas Xaj

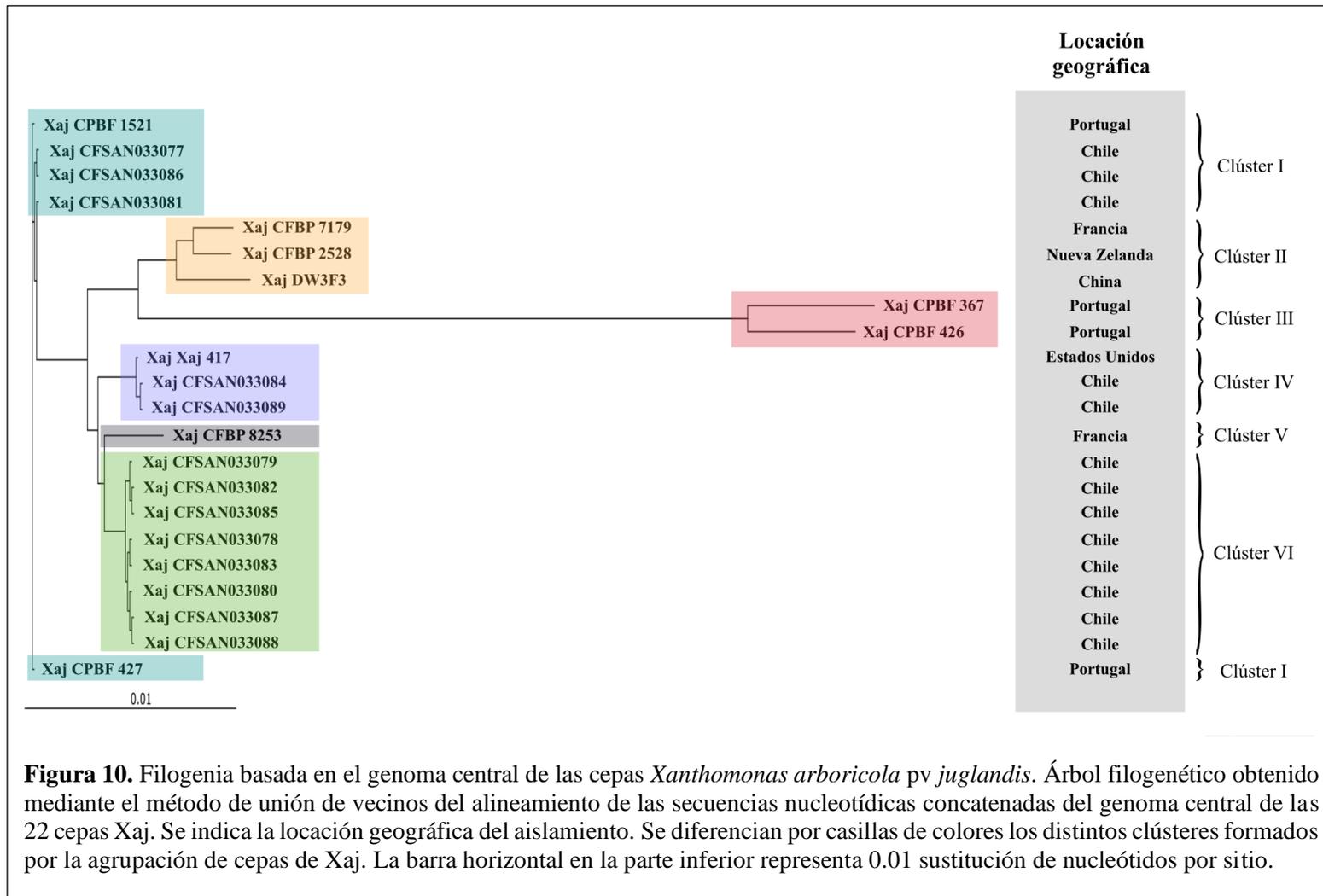
Con el fin de conocer la diversidad genética entre las cepas Xaj y examinar posibles relaciones entre el genoma central y su capacidad de tolerancia a cobre, se indagó la filogenia basada en las secuencias correspondientes al genoma central de estas.

En primer lugar, se construyó una matriz ANI para representar mediante un mapa de calor la similitud de las cepas Xaj (porcentaje de identidad). Se observó que una fracción de 20/22 cepas Xaj tuvo una similitud entre ellas mayor a 95%. Se destacó la formación de seis grupos. En particular, refiriéndose a las cepas chilenas, se observó la formación de un grupo solo con algunas de ellas, el clúster 6. Un par más de cepas chilenas se agruparon en el clúster 4 con la cepa estadounidense, Xaj 417. Finalmente, otras tres cepas chilenas se agruparon en el clúster 1 con las cepas portuguesas CPBF 1521 y CPBF 427. En adición se observó nuevamente que las cepas extranjeras CPBF 367 y CPBF 426 se diferenciaron del resto del grupo, pues mostraron un menor porcentaje de similitud ($< 95\%$) y estas se agruparon solas en el clúster 3 (Figura 9).



Posteriormente se construyó un árbol filogenético utilizando la concatenación del alineamiento de los 3.111 genes ortólogos codificantes para proteínas del genoma central (Figura 10). Se observaron seis agrupamientos (Clústeres I a VI), a simple vista semejantes a los seis grupos formados en la matriz ANI (Figura 9). Se vio que el clúster VI está totalmente compuesto por cepas chilenas, mostrando un bajo grado de sustitución de nucleótido por sitio entre ellas (Figura 10). El resto de cepas chilenas se agruparon con cepas internacionales en diversos clústeres. Se observó que las cepas extranjeras CPBF 426 y CPBF 367, agrupadas en el clúster III, fueron las que mostraron un grado mayor de sustitución de nucleótido por sitio, corroborando la menor similitud que poseen con el resto de cepas Xaj (Figura 10).

Al relacionar la filogenia y la locación geográfica se observó que 8 de las 13 cepas chilenas están más emparentadas entre sí, en comparación con las cepas portuguesas que se separan en diferentes grupos filogenéticos (Figura 10). Sin embargo, no pareciera existir un patrón de agrupamiento en cuanto a la locación geográfica de los aislados.



4.3 Identificación y construcción de banco de genes relacionados con la respuesta al ion cobre de las cepas de *Xanthomonas arboricola* pv *juglandis*

Se realizó la búsqueda de genes relacionados con la tolerancia al cobre en las cepas de *Xanthomonas arboricola* pv *juglandis*, que evidenciara la capacidad del patógeno en sobrellevar condiciones de altas concentraciones de agroquímicos, ya sea por genes propios al genoma central de las cepas o bien, genes ubicados en Elementos Genéticos Móviles (EGMs).

Los resultados obtenidos se clasificaron respecto a si pertenecían al genoma central o accesorio. Además, se realizó la búsqueda de ortólogos de estos genes en otros patógenos, lo que permitiría dar una evidencia de los posibles orígenes de dicha transferencia horizontal.

4.3.1 Operón *cop* y otros genes relacionados con la respuesta a cobre codificados en el genoma central

Las secuencias génicas (genes descritos en el punto 4.1.2) fueron mapeados en los respectivos genomas de cada una de las cepas de Xaj, a través de esto se determinó la vecindad génica en la que estaban inmersos dichos genes.

Se observó que las 22 cepas de Xaj poseían los genes *copABL* en una configuración u orden similar río abajo de genes codificantes para transportadores ABC y de eflujo tipo Resistencia-Nodulación-División (RND) (Figura 11). En adición, este resultado también se comparó con los resultados obtenidos en el análisis del pan-genoma, corroborando que estos genes, tanto el operón *copABL* como los genes codificantes de transportadores presentes río arriba, pertenecían al genoma central de la cepas Xaj.

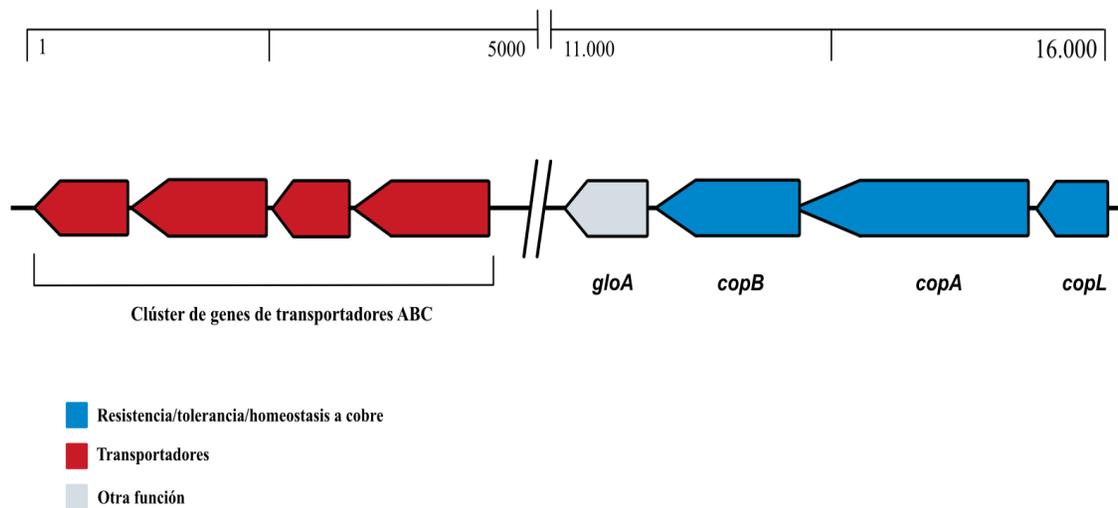


Figura 11. Región cromosómica compartida por las cepas Xaj (genoma central) correspondiente al operón *copABL* y un clúster río arriba de genes codificantes de transportadores ABC y de eflujo RND. La región mostrada tuvo un tamaño de alrededor de 16 kb.

4.3.2 Operón *cop* y otros genes de respuesta a de metales pesados asociados a Elementos genéticos móviles en cepas de Xaj

A pesar de lo anterior, se destacó la presencia extra de los genes *copABL* en otras regiones del genoma de las cepas CFSAN033079, CFBP 7179 y Xaj 417, que parecieron ser únicos de estas y encontrarse específicamente en estas regiones. Sumado a estos genes, la búsqueda por palabras claves “cop” y/o “copper”, arrojó que genes como *copCDFGK* acompañaban a los genes *copABL* extras en su contexto genómico, presentes en las cepas mencionadas. Por lo que a continuación, se evaluó si estos genes pudieran estar relacionados a elementos genéticos móviles, tales como las islas genómicas y profagos predichos previamente.

Se observó que, en algunas regiones predichas como IGs, se encontraron diversos genes relacionados con la respuesta al cobre, específicamente en las IG#2, IG#18 y IG#19 de las cepas Xaj 417, CFBP 7179 y CFSAN033079, respectivamente (Figura 12).

Se destacó que la IG#2 (13.4 kb) de la cepa Xaj 417, posee tanto los genes *copCDG*, un gen extra de *copL*, el gen *ctpA* (denominado *copF* más adelante) y *secC*. Cabe destacar que esta cepa, en esta misma región, cuenta con un operón *copABL* extra al que ya se había observado en el genoma central.

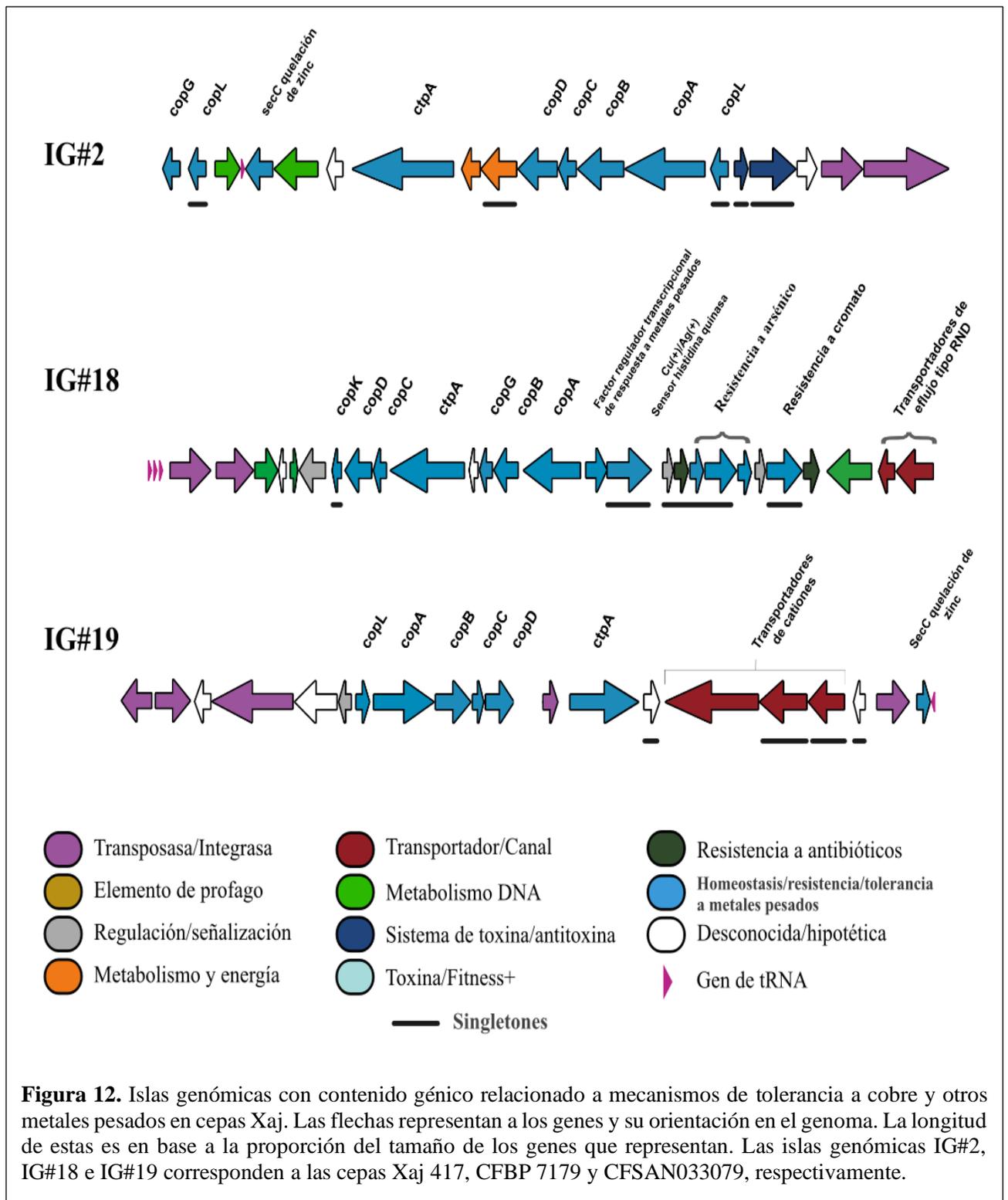
Por otro lado, la cepa CFSAN033079 contiene en la IG#19 (26.3 Kb) tanto el operón *copABCDL*, así como los genes *ctpA* y *secC*. Además, posee un clúster de genes relacionados con transporte de cationes.

La cepa CFBP 717 en la IG#18 (26.3 Kb), contenía los genes *copABCDG* y el gen *ctpA*, sumado a los genes involucrados en respuesta a metales pesados (arsénico, cromato, cobre, zinc) y otros relacionados con el transporte de eflujo RND, entre los que destaca un sensor de histidina quinasa y un regulador transcripcional, ambos involucrados en la respuesta a metales pesados (Figura 12).

Cabe destacar que en las tres IGs mencionadas anteriormente, algunos genes relacionados con la respuesta al cobre o metales pesados correspondieron a *singletons*. Esto fue corroborado una vez se localizaron los *singletons* en las secuencias genómicas de cada cepa en particular (CFSAN033079, Xaj 417 y CFBP 7179)

Para la cepa CFSAN033079, los *singletons* mapeados dentro del contexto genómico de la IG#19 correspondieron a dos transportadores de cationes y dos proteínas hipotéticas. Para la cepa Xaj 417 se mapearon cinco *singletons* dentro del contexto de la IG#2, siendo dos de ellos correspondientes a los genes de *copL*. Para la cepa CFBP 7179, se mapearon varios *singletons* dentro del contexto de la IG#18, de los cuales se destacan los correspondientes a *copK*, el sensor de histidina quinasa y varios genes implicados en la resistencia al arsénico y cromato (Figura 12).

Finalmente, en las regiones del genoma de las cepas Xaj predichas como secuencias tipo profago, no se encontraron genes relacionados con la respuesta a cobre.



4.3.3 Búsqueda de genes ortólogos asociados a la tolerancia a cobre en otras bacterias patógenas

Se indagaron posibles orígenes de transferencia horizontal de los genes relacionados con la resistencia a cobre encontrados en este estudio, mediante una consulta blastn (Anexo VII).

Los genes pertenecientes a la IG#18 (CFBP 7179), fueron en su totalidad hallados en otros seis genomas de diferentes patógenos (Tabla VI). Los genes ortólogos encontrados se disponen en un operón de resistencia a metales pesados en cercanía de genes de transposasas/integrasas, al igual como se describió en la IG#18 (ver Figura 13A).

Con este análisis, se determinó que los genes descritos previamente como “Histidina quinasa sensora de metales pesados Cu(+)/Ag(+)”, “Factor de transcripción regulador de respuesta de metales pesados” y *ctpA* correspondieron a *cusS*, *cusR* y *copF*, respectivamente.

El gen *copG* hallado en los genomas de las Xaj estudiadas no mapeó con ninguno de los *copG* ortólogos visualizados en la vecindad genómica recuperada por las cepas consultadas por el blastn.

En cuanto a los genes comparados de la IG#19 (CFSAN033079), estos se encontraron en otros seis genomas, siendo una de ellas Xaj 417, indicando una alta similitud nucleotídica y cercanía en cuanto a estos genes (ver Tabla VI). Esto permitió identificar los genes *cusA*, *cusB* y *cusC* (Anexo IX) denominados previamente como “Transportador de Eflujo RND

de Cationes”, “Subunidad Adaptadora Periplásmica del Transportador de Eflujo RND” y “Proteína de Membrana Externa de Eflujo RND de Metales Pesados”

Cabe mencionar además que el plásmido de *Xanthomonas sp* posee en su contenido los genes *cusABC*, un duplicado de estos mismos río abajo, y variados genes *cop* (ver Figura 13D).

De los genes presentes en la IG#2 (Xaj 417), estos se hallaron en otros seis genomas diferentes (Tabla VI). Se encontró que el gen *copB*, posee un grado de similitud con su homólogo codificado en una Isla Genómica de una cepa bacteriana de *Stenotrophomonas acidaminiphila*.

Los resultados anteriores en conjunto permitieron la construcción de una lista y banco de genes relacionados con la respuesta al cobre, ya sea a un nivel de tolerancia, o bien, resistencia a dicho ion (Anexo IX).

Tabla VI. Genes ortólogos asociados a mecanismos de respuesta a cobre y otros metales pesados contenidos en genomas de otros patógenos ambientales. Se listan las cepas de los patógenos que poseen los genes ortólogos y su número de acceso.

Cepa/IG	Ortólogos		
	Cepa	Nº de acceso de NCBI	Genes/operón
CFBP 7179 (IG#18)	<i>Xanthomonas arboricola</i> pv <i>juglandis</i> cepa CFBP 765	HG999365	
	<i>Achromobacter xylosoxidans</i> cepa FDAARGOS_984	CP055291	<i>cusS, cusR, copA, copB, copF, copC, copD, copK</i>
	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> cepa PC240	CP060022	
	Cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	CP006931 CP023255 CP024630	
CFSAN033079 (IG#19)	<i>Xanthomonas arboricola</i> pv <i>juglandis</i> cepa Xaj 417	CP012251	<i>copA, copB, copC, copD, copF</i>
	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv <i>vesicatoria</i> (operon <i>cop</i>)	AY536748	<i>copF, copB,</i>
	<i>Stenotrophomonas</i> sp. WZN-1	CP021768	<i>cusA, cusB, cusC, copF</i>
	<i>Xanthomonas</i> sp. gxlp16 plásmido pXAC219	CP062259	<i>cusA, cusB, cusC,</i>
	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> cepa SJTL3	CP029773	<i>cusA, cusB, cusC</i>
	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> cepa D457	HE798556	
Xaj 417 (IG#2)	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv <i>vesicatoria</i> (operón <i>cop</i>)	AY536748	<i>copB, copF</i>
	<i>Thermomonas</i> sp. XSG	CP061497	<i>copL, copG, copF</i>
	<i>Thermomonas brevis</i> cepa KACC 16975	CP060711	
	<i>Pseudoxanthomonas mexicana</i> cepa GTZY	CP060028	<i>copL, copB, copF</i>
	<i>Stenotrophomonas acidaminiphila</i> cepa ZAC14D2_NAIMI4_2 (Isla genómica)	CP012900	<i>copB</i>
	<i>Cupriavidus metallidurans</i>	CP026544 CP046333	<i>copC</i>

4.4 Presencia de determinantes genéticos estudiados y su relación con el fenotipo de tolerancia a cobre en *Xanthomonas arboricola* pv *juglandis* chilenas

Con el fin de indagar si existe una relación entre el contenido genómico y el fenotipo relacionado a la respuesta al cobre, se determinó la tolerancia de las cepas *Xanthomonas arboricola* pv *juglandis* chilenas.

Como resultado, cerca de un 70% de las cepas Xaj nacionales presentó un valor de Concentración Mínima Inhibitoria de Cobre (CMI-Cu) de 0,32 mM y la cepa CFSAN033080 un valor de CMI-Cu igual a 0,16 mM, siendo consideradas entonces como cepas no tolerantes al ion cobre. Por otro lado, las cepas CFSAN033079 y CFSAN033087 presentaron un CMI-Cu de 1,0 mM (Tabla VII), considerándose entonces como cepas altamente tolerantes al ion cobre.

Por otro lado, finalmente no se pudo establecer una asociación/relación clara entre el contenido genómico y el fenotipo resistente a cobre. Un mayor número de genes relacionados con la tolerancia a cobre no significó un mayor MIC-Cu (cepa CFSAN033079), o por el contrario, un mayor MIC-Cu no significó que esas cepas presentaran un mayor número de determinantes genéticos de tolerancia a cobre en comparación con el resto de cepas. Relacionando además con el análisis filogenético, no se observó que la distribución de las cepas en distintos clústeres definiera la diferencia en la tolerancia a cobre que estas poseen (MIC-Cu).

Tabla VII. Comparación entre los valores de concentración mínima inhibitoria de cobre (CMI-Cu) y el contenido de genes *cop/cus* accesorios y centrales presentes en el genoma de las cepas nacionales de *Xanthomonas arboricola* pv *juglandis*.

Cepas Xaj chilenas	CMI-Cu (mM)	Genes <i>cop/cus</i>	Clúster filogenético*
CFSAN033080	0,16	<i>copABL</i>	Clúster VI
CFSAN033077	0,32	<i>copABL</i>	Clúster I
CFSAN033078	0,32	<i>copABL</i>	Clúster VI
CFSAN033082	0,32	<i>copABL</i>	Clúster VI
CFSAN033083	0,32	<i>copABL</i>	Clúster VI
CFSAN033084	0,32	<i>copABL</i>	Clúster IV
CFSAN033085	0,32	<i>copABL</i>	Clúster VI
CFSAN033086	0,32	<i>copABL</i>	Clúster I
CFSAN033088	0,32	<i>copABL</i>	Clúster VI
CFSAN033089	0,32	<i>copABL</i>	Clúster IV
CFSAN033081	0,64	<i>copABL</i>	Clúster I
CFSAN033079	1,0	<i>copABL</i> <i>copABCDFL</i> <i>cusABC</i>	Clúster VI
CFSAN033087	1,0	<i>copABL</i>	Clúster VI

* Ver figura 10

5. DISCUSIÓN Y PROYECCIONES

El cultivo del nogal (*Juglans regia*), el cual es ampliamente distribuido en diversas regiones del mundo, es constantemente afectado por la enfermedad de la Peste Negra, generando grandes pérdidas económicas. A este hecho, se le suma la selección de cepas de *Xanthomonas arboricola* pv *juglandis* tolerantes a cobre (Adaskaveg et al., 2020; Cesbron et al., 2015b; Giovanardi et al., 2016; Moya-Elizondo et al., 2018). Debido a esto, se hace necesario estudiar la diversidad actual que existe en cuanto a Xaj y cuáles son todos los elementos genómicos-moleculares que determinan dicha resistencia.

Aquí se realizó una caracterización de la diversidad genética y búsqueda de determinantes genéticos de la resistencia a cobre en Xaj, mediante un enfoque bioinformático y de genómica comparativa. La diversidad genética de las cepas Xaj estudiadas fue baja y su pan-genoma fue abierto. Todas las cepas Xaj presentaron en su genoma el operón *copABL*, Islas genómicas (IGs) y elementos de tipo profago (Pp). Adicionalmente, algunas IGs presentaron genes *cop* extras, no así los Pp. El número de estos determinantes de resistencia a cobre finalmente no logra explicar los diferentes fenotipos de resistencia a cobre de las cepas Xaj chilenas.

5.1 Pan-genoma de las cepas de *Xanthomonas arboricola* pv *juglandis*

5.1.1 Genoma central de Xaj

Se observó que el genoma central de Xaj a partir de las 22 cepas analizadas, constó de un total de 3.111 genes, correspondientes a entre un 73 y un 78% del total de genes de dichas cepas (Anexo VIII). La diversidad entre las cepas Xaj estudiadas basada en el genoma

central fue baja, y así lo reflejó el árbol filogenético (Figura 10). Sin embargo, la diversidad genética fue baja también cuando se comparó no solo el genoma central, puesto que la matriz ANI (Figura 9) realizada para el genoma total de las cepas Xaj arrojó valores de identidad $\geq 98\%$ para 20 de las 22 cepas analizadas, indicando un alto parentesco entre dichas cepas. Estos resultados se correlacionan con los descritos por Assis y col. (2021) que obtuvieron una distribución similar de las cepas en árbol filogenético del genoma central, donde se observó que la diversidad genética de sus aislados de Xaj estudiados fue baja; además este equipo obtuvo un genoma central de 3.080 genes analizando 32 cepas de Xaj (Assis et al., 2021).

Las cepas CPBF 426 y CPBF 367 se agruparon lejanamente del resto de las cepas estudiadas (Figura 10), con un número diferente de genes y de CDSs (Tabla II). La similitud nucleotídica de estas cepas cayó por debajo del 95% (Figura 9), umbral que separaría a diferentes especies (Richter & Rosselló-Móra, 2009) por lo que estas cepas podrían estar mal clasificadas y pertenecer realmente a otra especie de *Xanthomonas*. Recientemente, Martins y col. (2020) postularon una reclasificación para ambas cepas como *Xanthomonas euroxanthea* según MLSA, ANI e hibridación ADN-ADN digital.

En cuanto a las cepas chilenas, estas se agruparon en tres clústeres diferentes (Figura 10). Se destacó el clúster VI que agrupó ocho de ellas. Para el clúster I, agruparon junto a la cepa internacional CPBF 1521, y el clúster IV, con las cepas internacionales Xaj 417 y CPBF 427 (Figura 10). Este resultado fue similar en la agrupación de genomas que obtuvo Assis y col (2021), donde además clasificó a la cepa Xaj 417 como patógena y altamente virulenta.

Estas agrupaciones también se observaron para los clústeres 6, 1 y 4, respectivamente, en la matriz ANI (Figura 8). Razones por las cuales, las *Xanthomonas arboricola* pv *juglandis* nacionales estarían más emparentadas consigo mismas que con cepas internacionales.

5.1.1.1 Operón *copABL* y otros genes de transporte de cationes en cepas Xaj

En particular, se observó que todas las cepas Xaj estudiadas, incluso aquellas que se infiere están mal clasificadas (CPBF 367 y CPBF 426), mostraron un operón *copABL* codificado en el cromosoma (Figura 11 y Anexo III), ya reportado previamente para la respuesta a cobre en Xaj aisladas en el extranjero (Lee et al., 1994). Esto da cuenta que este operón habría sido transferido verticalmente en todas las cepas Xaj, independiente de su posición geográfica.

Por otro lado, un grupo de genes relacionados con transporte de cationes y eflujo tipo RND fue identificado río arriba del operón *copABL* (Figura 11). A diferencia del operón de resistencia *copABL*, sus secuencias fueron menos conservados entre los genomas de las cepas Xaj (Anexo III). A pesar de ello, el alineamiento de estas secuencias, que incluye tanto los genes de transporte de cationes como el operón *copABL* mostró un 95,3% de similitud nucleotídica (Anexo III).

A pesar de que estos resultados se diferencian con los obtenidos por Cesbron y col. (2015), que indicaron que en los genomas de su estudio no se encontró el gen *copL* (un regulador de la expresión de *copAB*), los resultados de este trabajo indican que sí existe tal

determinante genético de resistencia al cobre. Aun así, quedaría por demostrar su rol como regulador de la expresión de los genes *copAB* en estudios futuros.

Similarmente, un trabajo con *Xanthomonas axonopodis* pv *visicatoria* (Xav), describió la existencia de un marco de lectura, homólogo al gen regulador *copL*, río arriba del operón *copAB* (Andreas E Voloudakis et al., 2005). Este actuaría en alternativa frente a la ausencia de los genes reguladores *copRS*, descritos previamente en cepas de *Pseudomonas syringae* (Mills et al., 1993), *Escherichia coli* (Munson et al., 2000) y el cromosoma de *Xanthomonas campestris* pv *visicatoria* (Xcv) (Basim et al., 2005).

Otros trabajos con diferentes especies del género *Xanthomonas* han reportado la presencia y una alta identidad nucleotídica y organización de los genes *copAB* (Teixeira et al., 2008) con otras especies resistentes a cobre. Por lo que es posible que estos tengan un ancestro común en *Xanthomonas* (Behlau et al., 2013).

5.1.2 Genoma accesorio de Xaj

En cuanto al genoma accesorio, este tuvo un promedio de 1.298 genes. En particular, se observó que las cepas de Xaj poseen un pan-genoma abierto puesto que se aumentó el número de genes que lo conforman con la adición de cada genoma al análisis (Figura 7).

Resulta interesante y sumamente importante conocer los elementos genéticos accesorios que pudieran estar confiriendo una ventaja adaptativa a Xaj, entre ellas las Islas Genómicas (IGs). Por otra parte, los elementos genéticos móviles, como bacteriófagos y plásmidos, son ampliamente conocidos en su rol de transferencia horizontal de elementos

genéticos, que pueden beneficiar a cierta especie bacteriana en un determinado nicho ecológico (Juhás et al., 2009).

5.1.2.1 Principales Islas Genómicas presentes en Xaj

El uso de genomas completos o casi completos, como lo son los genomas de las cepas CPBF 427 y Xaj 417, permitió usarlos como moldes para la búsqueda de secuencias que pudieran representar potenciales islas genómicas.

Se destacó la IG#1, la cual posee algunos genes relacionados con sistema de toxina/antitoxina y *fitness* (conjunto de propiedades o características que mejoran la supervivencia, diseminación y/o transmisión del organismo en un nicho ecológico específico); las IG#7 e IG#8 que interesantemente se enmarcan dentro de lo que se predijo como profago Stenot (Pp2), las cuales poseen genes relacionados con la virulencia, sistema toxina/antitoxina y *fitness* (*vir*, *SSTIV*, *pil*, etc); la IG#17, la cual enmarca en su secuencia lo que se predijo como fago Xantho (Pp1), siendo su contenido genético en su mayoría genes que codifican para proteínas hipotéticas (Anexo V). El resto de IGs parecieran ser menos prevalentes entre las cepas de Xaj estudiadas, y solo las poseen pocas de ellas.

Si bien en este estudio no se indagó en profundidad en el contenido de cada gen hallado en estos elementos móviles, resultan imperativos estudios futuros para dilucidar sus funciones, considerando que presumiblemente genes de resistencia a antibióticos, que se han encontrado en fitopatógenos como *Xanthomonas campestris* y *Pseudomonas syringae*, se han adquirido vía transferencia horizontal de genes (Sundin & Wang, 2018).

Adicionalmente, no se vio que la distribución de IGs en las cepas fuese dependiente de la ubicación geográfica, sin embargo, sí resulta interesante la distribución presente de las IGs 11 y 14 en las cepas CFSA033084, CFSAN033089 y Xaj 417, siendo las dos primeras cepas chilenas y la tercera, una cepa estadounidense, reforzándose la idea de un posible ancestro común de estas tres cepas, tal como se vio en el análisis de filogenia del genoma central (Figura 10) o bien, considerando que se trata de elementos genéticos móviles, la adquisición de dicho elemento por parte de ellas en posible material vegetal infectado.

Además, no se debe pasar por alto que la dotación genética contribuida por la totalidad de islas genómicas, por ejemplo en la cepa Xaj 417 representa cerca de un 8% del total del genoma de esta, indicando la fuerte contribución que pueden llegar a tener estas en la diversidad y *fitness* de Xaj.

En particular, respecto a las IG#2, IG#18 e IG#19) se vio que, la comparación basada en alineamiento MAUVE de dichas secuencias probó que las tres IGs son diferentes entre sí en cuanto al contenido codificante para determinantes de resistencia a cobre y metales pesados.

Cesbron y col. (2015) caracterizaron un elemento conjugativo-integrativo (ECI) de la cepa CFBP 7179 de Xaj, resistente a concentraciones elevadas de cobre. Este ECI está enmarcado en la misma región descrita en la IG#18 (CFBP 7179), y de igual manera, presenta los genes *copABCDGK*, concordando con la predicción de la IG hallada en este estudio.

En el caso de la IG#19 (CFSAN033079), se destaca la presencia de los genes *cusABC*., operón que ha sido descrito previamente en *Pseudomonas syringae* pv *actinidiae* (Psa) tanto en ECIs como en plásmidos, y que está involucrado en la detección y detoxificación del exceso de cobre (Colombi et al., 2017). Resulta fundamental un estudio más acabado en un futuro acerca del rol de estos probables determinantes de resistencia a cobre y/o metales pesados.

En cuanto a las IG#2 e IG#19 de las cepas Xaj 417 y CFSAN033079 respectivamente, las anotaciones a escala fina mostraron que estas comparten una alta similitud en cuanto a los genes *cop* presentes en ellas. Es más, se observó que la similitud entre estas dos cepas no se limita a esta región, ya que en el análisis de filogenia del genoma central se agruparon en un solo clúster (Figura 10). Es por ello, que resulta interesante que cepas muy distantes geográficamente posean en común un elemento móvil, y que, de manera especulativa, ambas podrían presentar mecanismos de resistencia a cobre muy similares.

Finalmente, dada la ubicación geográfica tan distante entre estos dos aislados, además de estar en diferentes clústeres en la filogenia del genoma central (Figura 9) la hipótesis más aceptable que explica este hecho es el transporte de material vegetal infectado de un lugar a otro.

5.1.2.2 Elementos tipo profago presentes en los genomas de Xaj

Los elementos tipo profago predichos en la totalidad de las cepas Xaj analizadas fueron 12, siendo los más compartidos entre dichas cepas los profagos Xantho, Stenot y Burkho (Pp1, Pp2 y Pp3), con aproximadamente un 82, 64 y 36% de presencia en los genomas,

respectivamente, independiente de la calidad del estado de completitud o integridad del elemento. Cabe destacar además, que la distribución anteriormente mencionada no es dependiente del origen geográfico, puesto que tanto cepas chilenas como internacionales poseen dichos elementos.

Estos elementos tipo profagos (Pp1, Pp2, Pp3) fueron predichos como los bacteriofagos de *Xanthomonas* phiL7 (NC_012742), *Stenotrophomonas maltophilia* Smp131 (NC_023588) y *Burkholderia* phiE12-2 (NC_009236), respectivamente (Anexo II).

El fago phiL7 que infecta a *Xanthomonas campestris* pv *campestris* fue descrito como un fago lítico por C.-N. Lee et al. (2009). Esto resulta contradictorio respecto a los resultados obtenidos en este estudio, puesto que se predijeron incluso secuencias intactas del profago en el genoma de Xaj. Las posibles explicaciones serían que el profago predicho aquí sea muy similar genómicamente al fago phiL7.

Por otro lado, el fago Smp131 es un fago lisogénico que infecta a *Stenotrophomonas* y *Xanthomonas*, y que con el tiempo puede haber contribuido a la diversidad de estas especies estrechamente relacionadas, posiblemente por transferencia horizontal de genes mediado por estos bacteriófagos (C.-N. Lee et al., 2014). En este estudio se encontraron diversos elementos de tipo profago en los genomas de cepas Xaj, incluso intactas, por tanto podrían ser inducibles y potenciales vehículos de transferencia horizontal de genes.

Por último, el fago phiE12-2 es de naturaleza lisogénica, e infecta al patógeno *Burkholderia pseudomallei*, organismo de suelo causante de la enfermedad potencialmente mortal melioidosis (Ronning et al., 2010). Si bien *Burkholderia*

pseudomallei esta menos emparentada con *Xanthomonas* o *Stenotrophomonas*, este patógeno Gram-negativo es saprófito de campos de suelo y de arroz, y al igual que ocurre con fagos de amplio rango de hospedero (Ross et al., 2016), phiEs12-2 tiene más de una especie de patógeno como blanco de infección.

Si bien no se encontraron determinantes de resistencia al cobre codificados en estos elementos, se debería tener en cuenta realizar trabajos más profundos en búsqueda de otro contenido de interés, como pueden ser determinantes de resistencia a antibióticos u otros que pudieran otorgar un mayor *fitness* a la bacteria. Más aún, lo anterior resulta imperativo, considerando que en este estudio se encontraron secuencias de profagos intactas (Figura 6) en los genomas de las cepas Xaj, las cuales, podrían ser inducibles y producirse partículas funcionales de fagos y ser potenciales vehículos de transferencia horizontal (Varani et al., 2013).

5.1.2.3 Genes ortólogos de tolerancia a cobre en genomas de otros patógenos ambientales

Con el fin de indagar un posible origen de transferencia horizontal de los genes accesorios vistos aquí, se realizó un análisis de sintenia comparando con otros fitopatógenos. La consulta blastn dio como resultado que para las tres cepas que poseían IGs con genes relacionados con respuesta a cobre se encontraron genes ortólogos en otros patógenos.

La IG#18 compartió similitud en un 100% de su extensión total con cepas de *A. xylooxidans* y Xaj CFBP 765 (no incluida en este estudio), y cepas de *S. maltophilia* y *P. aeruginosa* (Tabla VI, Figura 12, Anexo VII), las cuales se deben destacar puesto que

en trabajos previos, cepas de estas especies ya habían sido descritas por poseer una alta identidad con determinantes de resistencia a cobre contenidos en el genoma de cepas de *Xanthomonas citri* y *Xanthomonas alfafae* (Behlau et al., 2011). *S. maltophila*, por ejemplo, es una bacteria ubicua en ambientes acuosos, suelo y plantas y previamente había sido agrupada en el género *Xanthomonas* antes de clasificarse como especie del género *Stenotrophomonas* (Palleroni & Bradbury, 1993), por lo que la probabilidad de transferencia de material genético vía EGM hacía otras especies emparentadas como Xaj, sería perfectamente factible.

Para los genes contenidos en la IG#19 (CFSAN033079), se encontraron ortólogos de los determinantes de resistencia al cobre *cusABC* y *copBF*, en cepas de *Xanthomonas axonopodis* pv *vesicatoria* (Xav) y cepas de *S. maltophila* (Tabla VI, Figura 13, Anexo VII). En el caso de Xav, previamente se había informado la presencia del operón *copABL* (Andreas E. Voloudakis et al., 2005), sin embargo, el análisis de sintenia arrojado en este estudio indicó además la presencia de los genes *copMGF*., y ya que se encuentran en cercanías de elementos de transposición contenidos en un EGM (Figura 13), estos podrían tener un origen horizontal.

En el caso de los genes contenidos en la IG#2 (Xaj 417), se encontraron ortólogos de los determinantes de resistencia al cobre *copBFL*, en cepas de *Xanthomonas axonopodis* pv *visicatoria* (Xav) (el cual corresponde a un operón de resistencia *cop*), *Thermomonas*, *Pseudoxanthomonas*, *Stenotrophomonas* (Tabla VI, Figura 13, Anexo VII). Cabe destacar la cercanía que existe entre estos patógenos y Xaj, siendo todos estos géneros miembros

de la familia *Xanthomonadaceae*, que agrupan varios patógenos vegetales (Naushad et al., 2015).

En resumen, la mayoría de los genes ortólogos de estos determinantes se encuentran en un contexto genómico que podrían ser operones de resistencia a metales pesados o cobre (Figura 12). Hay que mencionar, además, que la mayoría poseen genes de transposasas/integrasas en sus cercanías, de lo cual se puede inferir y proponer que los determinantes de resistencia a cobre podrían transferirse horizontalmente vía EGMs, tal como se ha visto para *Xav* (Basim et al., 1999) y *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (*Xcc*) (Behlau et al., 2013).

5.2 Ruta evolutiva hipotética

Se realizó un análisis global y en conjunto del contenido genómico de *Xaj*, y las posibles influencias externas que afectan su evolución. Islas genómicas y bacteriófagos promueven la transferencia horizontal de genes o grupos de estos, incidiendo así en la plasticidad del genoma, y en la evolución y diversificación de las comunidades microbianas, y por tanto haciéndolas más competitivas y resistentes a ambientes selectivos (Langille et al., 2010).

Tomando en consideración que la diversidad genética de *Xaj* es baja (Figuras 9 y 10), se propone una ruta evolutiva hipotética que describe e hipotetiza acerca de la adquisición o pérdida de los dos elementos genéticos móviles analizados aquí para *Xanthomonas arboricola* pv *juglandis*. Sin embargo, se debe comprender que este análisis hipotético tiene sus limitaciones, puesto que este se realiza con un número acotado de cepas, y como tal se debe evaluar con cuidado y criterio, tomando en consideración dichas limitaciones.

El análisis en conjunto de islas genómicas (Tabla VI), profagos (IV), filogenético (Figura 10) y pan-genómico (Figura 8) permitió dilucidar tentativamente una posible ruta evolutiva de las cepas Xaj (Figura 14).

Esta ruta evolutiva hipotética propone que los determinantes genéticos de la resistencia al cobre contenidos en el genoma accesorio se obtuvieron a través de la adquisición de islas genómicas en ambientes naturales debido a la alta presión selectiva.

Es necesario señalar además, que tanto la estabilidad como la transferencia de estas IGs fueron especulativas. Por ejemplo, para las IGs número 1, 3 a 5, 7 a 10, 13, y 15 a 17, presentes en al menos el 72% de las cepas independiente de la localización geográfica del aislamiento, se asumió una adquisición temprana en la historia evolutiva, probablemente por un ancestro común de Xaj, y por tanto, una transmisión vertical de estos elementos. Los grupos filogenéticos que no poseyeran dichos elementos, probablemente los habrían perdido paulatinamente en el transcurso del tiempo.

Contrariamente, para el resto de las IGs, que son menos prevalentes entre las cepas Xaj o compartidas solo por algunas de ellas, se consideró una transmisión horizontal de estos elementos vía EGMs, especulativamente por infección de fagos o adquisición de IGs móviles.

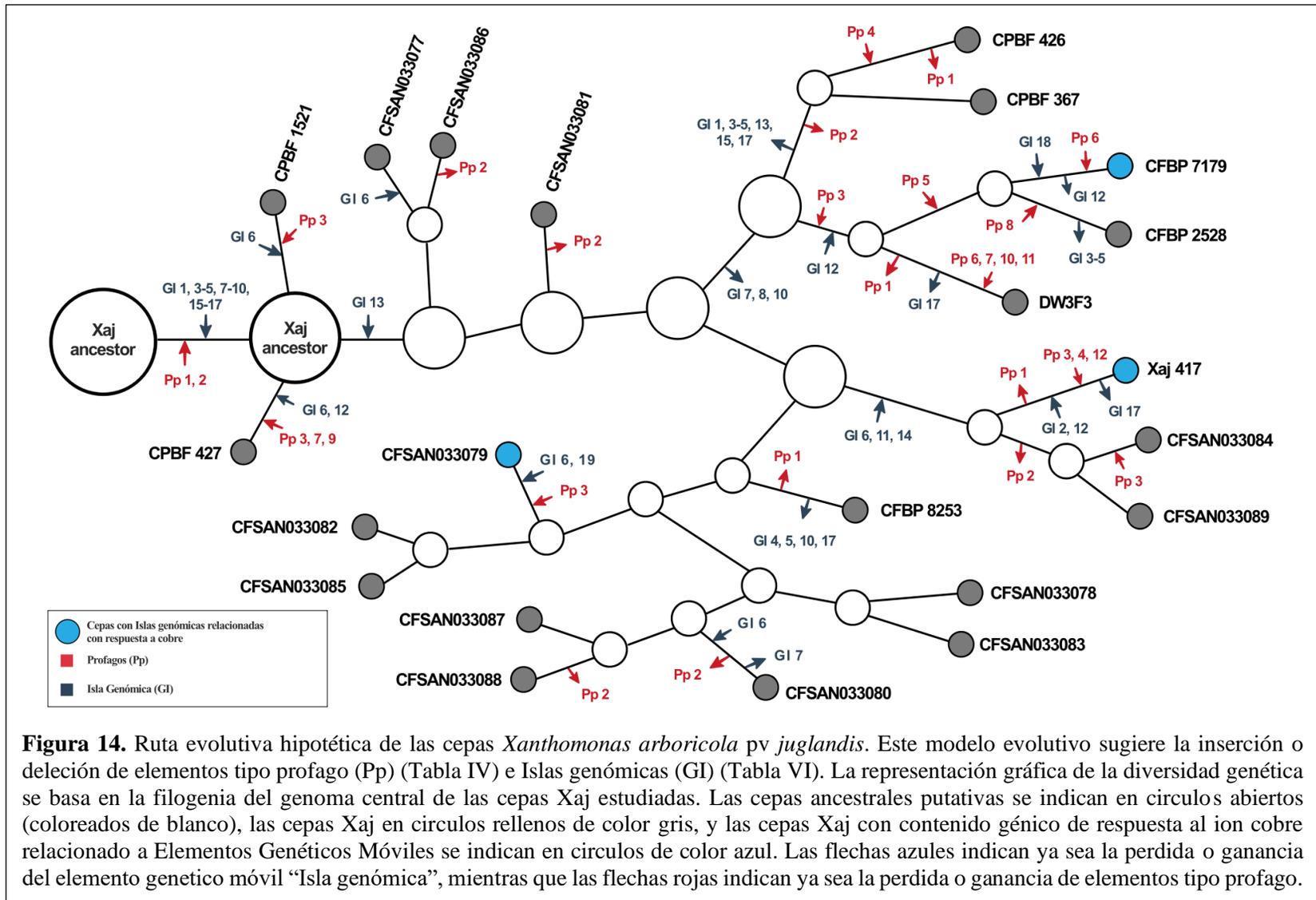
Nuevamente, se debe enfatizar la divergencia que existe entre las cepas CPBF 426 y CPBF 367 con el resto de las cepas estudiadas. Como se pudo observar, ambas cepas solo comparten dos de las 19 IGs con el resto, siendo estas, las IGs con más presencia en las 22 cepas. Sin embargo, estas cepas se incluyeron de igual manera en esta propuesta

hipotética, puesto que no se tienen argumentos para descartar que las IGs se hubiesen perdido o existieron en el genomas de estas dos cepas, lo que quedaría por determinar en futuros estudios que las involucren.

De igual manera, para los profagos más compartidos, Xantho y Stenot (Pp1 y Pp2, respectivamente) se consideró una probable temprana infección a un ancestro común de las cepas Xaj y la pérdida de elementos del profago a través de la historia evolutiva. Por otro lado, para los profagos menos prevalentes entre las cepas Xaj (profagos Pp3 a Pp12) se consideró la probable adquisición más contemporánea.

El objetivo de este análisis integrado es proponer que elementos como IGs y profagos, son actualmente potenciales factores de transmisión de determinantes de resistencia al cobre, o bien, de determinantes de otras aptitudes, como virulencia o resistencia a fármacos, contribuyendo en el *fitness* de las cepas Xaj.

Cabe destacar que la estabilidad de elementos genéticos móviles en el genoma bacteriano (profagos, IGs, plásmidos), esta influenciada por un equilibrio de costo-beneficio (Hallstrom & McCormick, 2015). La evidencia actual demuestra que cuando una especie bacteriana ya no hace uso de estos determinantes genéticos (asentamiento en el nicho ecológico), estos pueden perderse debido al alto costo energético que conlleva mantenerlos. Es más, son los mismos elementos como transposasas o integrasas los que reducen su estabilidad genética dentro del genoma y producirían su salida (Desiere et al., 2001; Dobrindt & Hacker, 2001; Hallstrom & McCormick, 2015), lo que explicaría los posibles saltos, transposición, inversiones, reintegraciones que sufren estos elementos en el genoma bacteriano (si su costo-beneficio es favorable para su mantención).



5.3 Pan-genoma y la relación con el Fenotipo de *Xanthomonas arboricola* pv *juglandis*

Se buscó identificar una posible relación entre el contenido genético de las cepas Xaj chilenas (número de genes relacionados al mecanismo de resistencia a cobre) y su fenotipo de resistencia al ion cobre. Se comparó el número de genes relacionados al mecanismo de resistencia al cobre (accesorios y *singletons*) con su grado de tolerancia al metal.

Los datos generados no mostraron algún tipo de relación entre estos dos puntos evaluados, puesto que no se observó ningún patrón en relación con la tolerancia a cobre y el contenido de genes asociados a cobre de las cepas nacionales (Tabla VII).

Una posible explicación en relación con la resistencia a concentraciones elevadas de cobre (fenotipo), es que esta estaría determinada tanto por genes codificados en el genoma central como en el genoma accesorio, y que la red de señalización, regulación y la propia resistencia es mucho más compleja de lo que se conoce hasta ahora, y posiblemente hay otros determinantes que no fueron considerados. Así mismo lo reporta un estudio reciente, en donde no se halló correlación entre los umbrales de tolerancia a cobre y el número o la presencia de genes en el genoma de cepas Xaj (Roach et al., 2020).

La visualización directa del genoma y comparación genómica, si bien podrían generar una falsa expectativa de un gen 100% funcional, estos estudios son necesarios y sumamente importantes, puesto que presiden todo tipo de análisis que se haga de aquí en adelante, ya sea experimentos de expresión génica en tiempo real y/o proteómica.

Otro punto que cabe mencionar es el hecho de no haber analizado la presencia de plásmidos en estas cepas. Trabajos previos han demostrado que plásmidos llevan consigo genes determinantes de resistencia a cobre y que una completa resistencia por parte de la especie bacteriana está determinada por la presencia de este (Behlau et al., 2011; Bender et al., 1990; Richard et al., 2017; A. E. Voloudakis et al., 1993). Sin embargo, este punto hasta hoy se mantiene ambiguo, puesto que pareciera que la resistencia en *Xanthomonas* no está determinada estrictamente en plásmidos (Roach et al., 2020). En el caso de este trabajo, tanto como en el de Assis y col. (2021), se utilizaron los genomas secuenciados de Xaj hasta la fecha, por lo que la presencia o no de plásmido depende del protocolo de extracción utilizado para cada genoma secuenciado.

5.4 Proyecciones

En las últimas décadas la selección de cepas resistentes, en particular aquellas tolerantes a cobre han aumentado su prevalencia e incidencia, en gran parte debido a un constante y cada vez más incidente ambiente selectivo. Las medidas de control basadas en la aspersión de antimicrobianos a base de cobre han generado este fenómeno, que no tan solo a la larga puede resultar catastrófico, sino que a corto plazo también, debido a la rápida transferencia de determinantes de resistencia vía EGMs.

Algunas proyecciones que surgen de este estudio, a sabiendas que existen potenciales elementos que pueden transferirse horizontalmente, es que se necesitarán mayores esfuerzos para monitorear constantemente estos elementos móviles en las diversas cepas de Xaj a nivel mundial. En otras palabras, una vigilancia activa de la resistencia a cobre

por parte de las cepas Xaj, con el fin de generar protocolos de control que sean más efectivos.

Para esto, se necesitará seguir estudiando y dilucidando los mecanismos de resistencia de fitopatógenos, cómo se mueven y adquieren estos determinantes, sobre todo vía elementos genéticos móviles.

Sin embargo, esto no sería posible a cabalidad si no se conoce con más profundidad los genomas de este fitopatógeno. Así, urge obtener prontamente secuencias completas y de calidad de los genomas, no solo de Xaj, si no de todas las especies bacterianas que pudieran estar emparentadas y que se sospeche puedan estar compartiendo determinantes de mejora del fitness y aptitud frente a ambientes selectivos vía EGMs.

Por último, cabe decir que será necesario dar énfasis en el contenido genómico diferido que puede existir entre las cepas patógenas y las no patógenas. Esto debido a que cepas patógenas tienen un contenido más diverso: un número mayor de secuencias de inserción, más transposasas, elementos de profagos, islas genómicas, factores de virulencia, etc. (Assis et al., 2021; Cesbron et al., 2015a; Liu et al., 2004).

6. CONCLUSIÓN

Los resultados del estudio de genómica comparativa de las cepas de *Xanthomonas arboricola* pv *juglandis* mostraron una baja diversidad genética, con un porcentaje de identidad de sus genomas en su mayoría $\geq 98\%$.

Xanthomonas arboricola pv *juglandis* tiene un pan-genoma abierto, debido a que este va en constante aumento a medida que se agregan genomas de más cepas.

En todas las cepas de *Xanthomonas arboricola* pv *juglandis* se identificaron elementos genéticos móviles: Islas genómicas y profagos.

Todas las cepas de *Xanthomonas arboricola* pv *juglandis* poseen algún determinante genético de resistencia al ion cobre, codificados tanto en su genoma indispensable (genoma central) como en elementos genéticos móviles (genoma accesorio).

El número de dichos determinantes genómicos que posee cada cepa analizada no explica las diferencias en cuanto al fenotipo de tolerancia a cobre que poseen las cepas Xaj chilenas.

7. REFERENCIAS

- Adaskaveg, J., Förster, H., Thompson, D., Connell, J., Buchner, R., Prichard, T., Hasey, J., Grant, J., & Wade, L. (2020). Epidemiology and management of walnut blight. *Walnut Research Reports*, 181–193.
- Argüello, J. M., Raimunda, D., & Padilla-Benavides, T. (2013). Mechanisms of copper homeostasis in bacteria. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 3, 73. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2013.00073>
- Ark, P. A. (1944). Pollen as a source of Walnut bacterial blight infection. *Phytopathology*, 34(3), 329-334 pp.
- Arndt, D., Grant, J. R., Marcu, A., Sajed, T., Pon, A., Liang, Y., & Wishart, D. S. (2016). PHASTER: a better, faster version of the PHAST phage search tool. *Nucleic Acids Research*, 44(W1), W16–W21. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw387>
- Assis, R. A. B., Varani, A. M., Sagawa, C. H. D., Patané, J. S. L., Setubal, J. C., Uceda-Campos, G., da Silva, A. M., Zaini, P. A., Almeida, N. F., Moreira, L. M., & Dandekar, A. M. (2021). A comparative genomic analysis of *Xanthomonas arboricola* pv *juglandis* strains reveal hallmarks of mobile genetic elements in the adaptation and accelerated evolution of virulence. *Genomics*, 113(4), 2513–2525. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2021.06.003>
- Aziz, R. K., Bartels, D., Best, A. A., DeJongh, M., Disz, T., Edwards, R. A., Formsma, K., Gerdes, S., Glass, E. M., Kubal, M., Meyer, F., Olsen, G. J., Olson, R., Osterman, A. L., Overbeek, R. A., McNeil, L. K., Paarmann, D., Paczian, T., Parrello, B., ... Zagnitko, O. (2008). The RAST Server: rapid annotations using subsystems technology. *BMC Genomics*, 9, 75. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-75>
- Basim, H., Minsavage, G. V., Stall, R. E., Wang, J. F., Shanker, S., & Jones, J. B. (2005). Characterization of a unique chromosomal copper resistance gene cluster from *Xanthomonas campestris* pv *vesicatoria*. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(12), 8284–8291. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.12.8284-8291.2005>
- Basim, H., Stall, R. E., Minsavage, G. V., & Jones, J. B. (1999). Chromosomal gene transfer by conjugation in the plant pathogen *Xanthomonas axonopodis* pv *vesicatoria*. *Phytopathology*, 89(11), 1044–1049. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.1999.89.11.1044>
- Behlau, F., Canteros, B. I., Jones, J. B., & Graham, J. H. (n.d.). Copper resistance genes from different xanthomonads and citrus epiphytic bacteria confer resistance to *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. *European Journal of Plant Pathology*, 133(4), 949–963. <https://doi.org/10.1007/s10658-012-9966-8>
- Behlau, F., Canteros, B. I., Minsavage, G. V., Jones, J. B., & Graham, J. H. (2011). Molecular characterization of copper resistance genes from *Xanthomonas citri* subsp. *citri* and *Xanthomonas alfalfae* subsp. *citrumelonis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(12), 4089–4096. <https://doi.org/10.1128/AEM.03043-10>
- Behlau, F., Hong, J. C., Jones, J. B., & Graham, J. H. (2013). Evidence for acquisition of copper resistance genes from different sources in citrus-associated xanthomonads. *Phytopathology*, 103(5), 409–418. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-06-12-0134-R>

- Belisario, A., Maccaroni, M., Corazza, L., Balmas, V., & Valier, A. (2002). Occurrence and etiology of brown apical necrosis on Persian (English) walnut fruit. *Plant Disease*, *86*(6), 599–602. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2002.86.6.599>
- Belisario, A., Zoina, A., Pezza, L., & Luongo, L. (1999). Susceptibility of species of *Juglans* to pathovars of *Xanthomonas campestris*. *European Journal of Forest Pathology*, *29*(1), 75–80. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0329.1999.00132.x>
- Bender, C. L., & Cooksey, D. A. (1986). Indigenous plasmids in *Pseudomonas syringae* pv tomato: Conjugative transfer and role in copper resistance. *Journal of Bacteriology*, *165*(2), 534–541. <https://doi.org/10.1128/jb.165.2.534-541.1986>
- Bender, C. L., Malvick, D. K., Conway, K. E., George, S., & Pratt, P. (1990). Characterization of pXV10A, a Copper Resistance Plasmid in *Xanthomonas campestris* pv vesicatoria. *Applied and Environmental Microbiology*, *56*(1), 170–175. <https://doi.org/10.1128/AEM.56.1.170-175.1990>
- Bertelli, C., Laird, M. R., Williams, K. P., Simon Fraser University Research Computing Group, Lau, B. Y., Hoad, G., Winsor, G. L., & Brinkman, F. S. L. (2017). IslandViewer 4: expanded prediction of genomic islands for larger-scale datasets. *Nucleic Acids Research*, *45*(W1), W30–W35. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx343>
- Blom, J., Kreis, J., Spänig, S., Juhre, T., Bertelli, C., Ernst, C., & Goesmann, A. (2016). EDGAR 2.0: an enhanced software platform for comparative gene content analyses. *Nucleic Acids Research*, *44*(W1), W22–8. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw255>
- Bradbury, J. F. (1986). *Guide to plant pathogenic bacteria*. CAB International.
- Buchner, R. P., Gilles, C., Olson, W. H., Adaskaveg, J. E., Lindow, S. E., & Koutsoukis, R. (2010). Spray timing and materials for walnut blight (*Xanthomonas campestris* pv *juglandis*, *Xanthomonas arboricola* pv *juglandis*) control in Northern California USA. *Acta Horticulturae*, *861*, 457–464. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2010.861.65>
- Cesbron, S., Briand, M., Essakhi, S., Gironde, S., Boureau, T., Manceau, C., Fischer-Le Saux, M., & Jacques, M.-A. (2015a). Comparative Genomics of Pathogenic and Nonpathogenic Strains of *Xanthomonas arboricola* Unveil Molecular and Evolutionary Events Linked to Pathoadaptation. In *Frontiers in Plant Science* (Vol. 6, p. 1126). <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2015.01126>
- Cesbron, S., Briand, M., Essakhi, S., Gironde, S., Boureau, T., Manceau, C., Fischer-Le Saux, M., & Jacques, M. A. (2015b). Comparative genomics of pathogenic and nonpathogenic strains of *xanthomonas arboricola* unveil molecular and evolutionary events linked to pathoadaptation. *Frontiers in Plant Science*, *6*(DEC). <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.01126>
- Colombi, E., Straub, C., Künzel, S., Templeton, M. D., McCann, H. C., & Rainey, P. B. (2017). Evolution of copper resistance in the kiwifruit pathogen *Pseudomonas syringae* pv *actinidiae* through acquisition of integrative conjugative elements and plasmids. *Environmental Microbiology*, *19*(2), 819–832. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/1462-2920.13662>
- Cooksey, D. A. (1993). Copper uptake and resistance in bacteria. *Molecular Microbiology*, *7*(1), 1–5. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1993.tb01091.x>

- Cooksey, D. A. (1994). Molecular mechanisms of copper resistance and accumulation in bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 14(4), 381–386. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.1994.tb00112.x>
- Cooksey, D. A., Azad, H. R., Cha, J. S., & Lim, C. K. (1990). Copper resistance gene homologs in pathogenic and saprophytic bacterial species from tomato. *Applied and Environmental Microbiology*, 56(2), 431–435. <https://doi.org/10.1128/aem.56.2.431-435.1990>
- CORFO & Chilenut. (2010). *Manual de manejos productivos del nogal en Chile*.
- Darling, A. E., Mau, B., & Perna, N. T. (2010). progressiveMauve: multiple genome alignment with gene gain, loss and rearrangement. *PloS One*, 5(6), e11147–e11147. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011147>
- Delas, J. (1963). La toxicité du cuivre accumulé dans les sols. In *Agrochimica* (pp. 258–288).
- Desiere, F., McShan, W. M., Van Sinderen, D., Ferretti, J. J., & Brüßow, H. (2001). Comparative genomics reveals close genetic relationships between phages from dairy bacteria and pathogenic streptococci: Evolutionary implications for prophage-host interactions. *Virology*, 288(2), 325–341. <https://doi.org/10.1006/viro.2001.1085>
- Dhillon, B. K., Chiu, T. A., Laird, M. R., Langille, M. G. I., & Brinkman, F. S. L. (2013). IslandViewer update: Improved genomic island discovery and visualization. *Nucleic Acids Research*, 41(Web Server issue), W129–W132. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt394>
- Dobrindt, U., & Hacker, J. (2001). Whole genome plasticity in pathogenic bacteria. *Current Opinion in Microbiology*, 4(5), 550–557. [https://doi.org/10.1016/S1369-5274\(00\)00250-2](https://doi.org/10.1016/S1369-5274(00)00250-2)
- Dobrindt, U., Hochhut, B., Hentschel, U., & Hacker, J. (2004). Genomic islands in pathogenic and environmental microorganisms. *Nature Reviews Microbiology*, 2(5), 414–424. <https://doi.org/10.1038/nrmicro884>
- Dye, D. W., Bradbury, J. F., Goto, M., Hayward, A. C., Lelliott, R. A., & Schroth, M. N. (1980). International standards for naming pathovars of phytopathogenic bacteria and a list of pathovar names and pathotype strains. *Review of Plant Pathology*, 59(4), 153–168.
- Edgar, R. C. (2004). MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*, 32(5), 1792–1797. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh340>
- Essakhi, S., Cesbron, S., Fischer-Le Saux, M., Bonneau, S., Jacques, M. A., & Manceau, C. (2015). Phylogenetic and variable-number tandem-repeat analyses identify nonpathogenic *Xanthomonas arboricola* lineages lacking the canonical type III secretion system. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(16), 5395–5410. <https://doi.org/10.1128/AEM.00835-15>
- Esterio, M., Pérez, I., & Auger, J. (2007). Análisis de la variabilidad genética de cepas de " *Xanthomonas arboricola* pv *juglandis*" en Chile. *Fitopatología*, 42(3), 111–122.
- Felsenstein, J. (1989). PHYLIP-Phylogeny Inference Package (Ver. 3.2). *Cladistics*, 5, 164–166.
- Gal-Mor, O., & Finlay, B. B. (2006). Pathogenicity islands: A molecular toolbox for bacterial virulence. *Cellular Microbiology*, 8(11), 1707–1719. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2006.00794.x>

- Gardan, L., Brault, T., & Germain, E. (1993). Copper Resistance of *Xanthomonas Campestris* P_v Juglandis in French Walnut Orchards and Its Association With Conjugative Plasmids. In *Acta Horticulturae* (Issue 311, pp. 259–265). <https://doi.org/10.17660/actahortic.1993.311.33>
- Garita-Cambronero, J., Palacio-Bielsa, A., López, M. M., & Cubero, J. (2017). Pan-genomic analysis permits differentiation of virulent and non-virulent strains of *Xanthomonas arboricola* that cohabit *Prunus* spp. and elucidate bacterial virulence factors. *Frontiers in Microbiology*, 8(APR), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00573>
- Giovanardi, D., Bonneau, S., Gironde, S., Saux, M. F. Le, Manceau, C., & Stefani, E. (2016). Morphological and genotypic features of *Xanthomonas arboricola* pv juglandis populations from walnut groves in Romagna region, Italy. *European Journal of Plant Pathology*, 145(1). <https://doi.org/10.1007/s10658-015-0809-2>
- Goris, J., Konstantinidis, K. T., Klappenbach, J. A., Coenye, T., Vandamme, P., & Tiedje, J. M. (2007). DNA-DNA hybridization values and their relationship to whole-genome sequence similarities. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57(1), 81–91. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.64483-0>
- Hallstrom, K. N., & McCormick, B. A. (2015). Chapter 16 - Pathogenicity Islands: Origins, Structure, and Roles in Bacterial Pathogenesis (Y.-W. Tang, M. Sussman, D. Liu, I. Poxton, & J. B. T.-M. M. M. (Second E. Schwartzman (eds.); pp. 303–314). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397169-2.00016-0>
- Higuera, G., González-Escalona, N., Véliz, C., Vera, F., & Romero, J. (2015). Draft genome sequences of four *Xanthomonas arboricola* pv juglandis strains associated with walnut blight in Chile. *Genome Announcements*, 3(5), 1–2. <https://doi.org/10.1128/genomeA.01160-15>
- Johansson, M. H. K., Bortolaia, V., Tansirichaiya, S., Aarestrup, F. M., Roberts, A. P., & Petersen, T. N. (2021). Detection of mobile genetic elements associated with antibiotic resistance in *Salmonella enterica* using a newly developed web tool: MobileElementFinder. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 76(1), 101–109. <https://doi.org/10.1093/jac/dkaa390>
- Juhas, M., van der Meer, J. R., Gaillard, M., Harding, R. M., Hood, D. W., & Crook, D. W. (2009). Genomic islands: tools of bacterial horizontal gene transfer and evolution. *FEMS Microbiology Reviews*, 33(2), 376–393. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2008.00136.x>
- Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., Buxton, S., Cooper, A., Markowitz, S., Duran, C., Thierer, T., Ashton, B., Meintjes, P., & Drummond, A. (2012). Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 28(12), 1647–1649. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts199>
- Lamichhane, J. R., & Varvaro, L. (2014). *Xanthomonas arboricola* disease of hazelnut: CURRENT status and future perspectives for its management. *Plant Pathology*, 63(2), 243–254. <https://doi.org/10.1111/ppa.12152>
- Lamichhane, Jay Ram. (2014). *Xanthomonas arboricola* Diseases of Stone Fruit, Almond, and Walnut Trees: Progress Toward Understanding and Management. *Plant Disease*, 98(12), 1600–1610. <https://doi.org/10.1094/PDIS-08-14-0831-FE>
- Langille, M. G. I., Hsiao, W. W. L., & Brinkman, F. S. L. (2010). Detecting genomic islands using

- bioinformatics approaches. In *Nature reviews. Microbiology* (Vol. 8, Issue 5, pp. 373–382). <https://doi.org/10.1038/nrmicro2350>
- Lee, C.-N., Lin, J.-W., Weng, S.-F., & Tseng, Y.-H. (2009). Genomic characterization of the intron-containing T7-like phage phiL7 of *Xanthomonas campestris*. *Applied and Environmental Microbiology*, *75*(24), 7828–7837. <https://doi.org/10.1128/AEM.01214-09>
- Lee, C.-N., Tseng, T.-T., Chang, H.-C., Lin, J.-W., & Weng, S.-F. (2014). Genomic sequence of temperate phage Smp131 of *Stenotrophomonas maltophilia* that has similar prophages in xanthomonads. *BMC Microbiology*, *14*, 17. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-14-17>
- Lee, Y. A., Hendson, M., Panopoulos, N. J., & Schroth, M. N. (1994). Molecular cloning, chromosomal mapping, and sequence analysis of copper resistance genes from *Xanthomonas campestris* pv *juglandis*: Homology with small blue copper proteins and multicopper oxidase. *Journal of Bacteriology*, *176*(1), 173–188. <https://doi.org/10.1128/jb.176.1.173-188.1994>
- Liu, Y., Harrison, P. M., Kunin, V., & Gerstein, M. (2004). Comprehensive analysis of pseudogenes in prokaryotes: widespread gene decay and failure of putative horizontally transferred genes. *Genome Biology*, *5*(9), R64. <https://doi.org/10.1186/gb-2004-5-9-r64>
- Martin, H. L., Hamilton, V. A., & Kopittke, R. A. (2004). Copper tolerance in Australian populations of *Xanthomonas campestris* pv *vesicatoria* contributes to poor field control of bacterial spot of pepper. *Plant Disease*, *88*(9), 921–924. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2004.88.9.921>
- Melgarejo Nárdiz, P., García-Jiménez, J., Jordá Gutiérrez, M. C., López González, M. M., Andrés Yebes, M. F., & Duran-Villa, N. (2010). Patógenos de plantas descritos en España. In *Sociedad Española de Fitopatología*.
- Mills, S. D., Jasalavich, C. A., & Cooksey, D. A. (1993). A two-component regulatory system required for copper-inducible expression of the copper resistance operon of *Pseudomonas syringae*. *Journal of Bacteriology*, *175*(6), 1656–1664. <https://doi.org/10.1128/jb.175.6.1656-1664.1993>
- Moya-Elizondo, E., Auil, P., Oyarzúa, P., & Macarena Gerding, G. (2018). Resistance of *xanthomonas arboricola* pv *juglandis* to ion copper in walnut orchards in the Biobío Region. *Chilean Journal of Agricultural and Animal Sciences*, *34*(1), 3–11. <https://doi.org/10.4067/S0719-38902018005000201>
- Munson, G. P., Lam, D. L., Outten, F. W., & O'Halloran, T. V. (2000). Identification of a copper-responsive two-component system on the chromosome of *Escherichia coli* K-12. *Journal of Bacteriology*, *182*(20), 5864–5871. <https://doi.org/10.1128/JB.182.20.5864-5871.2000>
- Naushad, S., Adeolu, M., Wong, S., Sohail, M., Schellhorn, H. E., & Gupta, R. S. (2015). A phylogenomic and molecular marker based taxonomic framework for the order Xanthomonadales: proposal to transfer the families Algiphilaceae and Solimonadaceae to the order Nevskiales ord. nov. and to create a new family within the order Xanthomonadales, . *Antonie van Leeuwenhoek*, *107*(2), 467–485. <https://doi.org/10.1007/s10482-014-0344-8>
- Ninot, A., Aletà, N., Moragrega, C., & Montesinos, E. (2002). Evaluation of a reduced copper spraying program to control bacterial blight of walnut. *Plant Disease*, *86*(6), 583–587. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2002.86.6.583>

- Overbeek, R., Olson, R., Pusch, G. D., Olsen, G. J., Davis, J. J., Disz, T., Edwards, R. A., Gerdes, S., Parrello, B., Shukla, M., Vonstein, V., Wattam, A. R., Xia, F., & Stevens, R. (2014). The SEED and the Rapid Annotation of microbial genomes using Subsystems Technology (RAST). *Nucleic Acids Research*, 42(Database issue), D206–D214. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1226>
- Palleroni, N. J., & Bradbury, J. F. (1993). *Stenotrophomonas*, a new bacterial genus for *Xanthomonas maltophilia* (Hugh 1980) Swings et al. 1983. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 43(3), 606–609. <https://doi.org/10.1099/00207713-43-3-606>
- Pierce, N. B. (1901). Walnut Bacteriosis. *Botanical Gazette*, 31(4). <https://doi.org/10.1086/328100>
- Puig, S., Rees, E. M., & Thiele, D. J. (2002). The ABCDs of periplasmic copper trafficking. *Structure*, 10(10), 1292–1295. [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(02\)00863-8](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(02)00863-8)
- Richard, D., Boyer, C., Lefeuvre, P., Canteros, B. I., Beni-Madhu, S., Portier, P., & Pruvost, O. (2017). Complete Genome Sequences of Six Copper-Resistant *Xanthomonas* Strains Causing Bacterial Spot of Solaneous Plants, Belonging to *X. gardneri*, *X. euvesicatoria*, and *X. vesicatoria*, Using Long-Read Technology. *Genome Announcements*, 5(8), e01693-16. <https://doi.org/10.1128/genomeA.01693-16>
- Richter, M., & Rosselló-Móra, R. (2009). Shifting the genomic gold standard for the prokaryotic species definition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(45), 19126–19131. <https://doi.org/10.1073/pnas.0906412106>
- Roach, R., Mann, R., Gambley, C. G., Shivas, R. G., Chapman, T., & Rodoni, B. (2020). Pathogenicity and copper tolerance in Australian *Xanthomonas* species associated with bacterial leaf spot. *Crop Protection*, 127, 104923. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cropro.2019.104923>
- Ronning, C. M., Losada, L., Brinkac, L., Inman, J., Ulrich, R. L., Schell, M., Nierman, W. C., & DeShazer, D. (2010). Genetic and phenotypic diversity in Burkholderia: contributions by prophage and phage-like elements. *BMC Microbiology*, 10(1), 202. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-10-202>
- Ross, A., Ward, S., & Hyman, P. (2016). More Is Better: Selecting for Broad Host Range Bacteriophages. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1352. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01352>
- Saravanan, U. (2007). *Copper sensitivity in Tasmanian populations of the walnut blight pathogen Xanthomonas arboricola pv juglandis* [University of Tasmania, Hombart, Australia]. https://eprints.utas.edu.au/21498/1/whole_SaravananUsha2008_thesis.pdf
- Scortichini, M. (2010). EPIDEMIOLOGY AND PREDISPOSING FACTORS OF SOME MAJOR BACTERIAL DISEASES OF STONE AND NUT FRUIT TREES SPECIES. *Journal of Plant Pathology*, 92.
- Shah, I. T., Sharma, E., & Ahmad, G. (2014). *Juglans regia* Linn: A Phytopharmacological Review. *World Journal of Pharmaceutical Sciences ISSN (Print ISSN, 2321–3310)*. <http://www.wjpsonline.com/>
- Shah, U. N., Mir, J. I., Ahmed, N., Zaid, A., Jan, S., Fazili, K. M., & Wani, S. H. (2018). Bio-

- techniques for improvement of qualitative and quantitative traits in walnut (*Juglans regia*). *Advances in Horticultural Science*, 32(1), 113–135. <https://doi.org/10.13128/ahs-21330>
- Silver, S., & Phung, L. T. (1996). Bacterial heavy metal resistance: New surprises. *Annual Review of Microbiology*, 50(January 2018), 753–789. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.50.1.753>
- Soucy, S. M., Huang, J., & Gogarten, J. P. (2015). Horizontal gene transfer: Building the web of life. *Nature Reviews Genetics*, 16(8), 472–482. <https://doi.org/10.1038/nrg3962>
- Sundin, G. W., & Wang, N. (2018). Antibiotic Resistance in Plant-Pathogenic Bacteria. *Annual Review of Phytopathology*, 56(1), 161–180. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080417-045946>
- Talavera, G., & Castresana, J. (2007). Improvement of phylogenies after removing divergent and ambiguously aligned blocks from protein sequence alignments. *Systematic Biology*, 56(4), 564–577. <https://doi.org/10.1080/10635150701472164>
- Teixeira, E. C., de Oliveira, J. C. F., Novo, M. T. M., & Bertolini, M. C. (2008). The copper resistance operon copAB from *Xanthomonas axonopodis* pathovar citri: Gene inactivation results in copper sensitivity. *Microbiology*, 154(2), 402–412. <https://doi.org/10.1099/mic.0.2007/013821-0>
- Timilsina, S., Potnis, N., Newberry, E. A., Liyanapathirana, P., Iruegas-Bocardo, F., White, F. F., Goss, E. M., & Jones, J. B. (2020). *Xanthomonas* diversity, virulence and plant–pathogen interactions. *Nature Reviews Microbiology*, 18(8), 415–427. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-0361-8>
- Timmer, L. W., Zitko, S. E., & Albrigo, L. G. (1998). Split applications of copper fungicides improve control of melanose on grapefruit in Florida. *Plant Disease*, 82(9), 983–986. <https://doi.org/10.1094/PDIS.1998.82.9.983>
- Varani, A. M., Monteiro-Vitorello, C. B., Nakaya, H. I., & Van Sluys, M. A. (2013). The role of prophage in plant-pathogenic bacteria. *Annual Review of Phytopathology*, 51, 429–451. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-081211-173010>
- Vauterin, L., Hoste, B., Kersters, K., & Swings, J. (1995). Reclassification of *Xanthomonas*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 45(3), 472–489. <https://doi.org/10.1099/00207713-45-3-472>
- Voloudakis, A. E., Bender, C. L., & Cooksey, D. A. (1993). Similarity between copper resistance genes from *Xanthomonas campestris* and *Pseudomonas syringae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(5), 1627–1634. <https://doi.org/10.1128/aem.59.5.1627-1634.1993>
- Voloudakis, Andreas E., Reignier, T. M., & Cooksey, D. A. (2005). Regulation of resistance to copper in *Xanthomonas axonopodis* pv *vesicatoria*. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(2), 782–789. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.2.782-789.2005>
- Voloudakis, Andreas E., Reignier, T. M., & Cooksey, D. A. (2005). Regulation of resistance to copper in *Xanthomonas axonopodis* pv *vesicatoria*. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(2), 782–789. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.2.782-789.2005>

- Wattam, A. R., Abraham, D., Dalay, O., Disz, T. L., Driscoll, T., Gabbard, J. L., Gillespie, J. J., Gough, R., Hix, D., Kenyon, R., Machi, D., Mao, C., Nordberg, E. K., Olson, R., Overbeek, R., Pusch, G. D., Shukla, M., Schulman, J., Stevens, R. L., ... Sobral, B. W. (2014). PATRIC, the bacterial bioinformatics database and analysis resource. *Nucleic Acids Research*, 42(Database issue), D581–D591. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1099>
- Woeste, K. E., McGranahan, G. H., & Schroth, M. N. (2019). Variation among Persian Walnuts in Response to Inoculation with *Xanthomonas campestris* pv *juglandis*. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 117(3), 527–531. <https://doi.org/10.21273/jashs.117.3.527>
- Yu, J., Blom, J., Glaeser, S. P., Jaenicke, S., Juhre, T., Rupp, O., Schwengers, O., Spänig, S., & Goesmann, A. (2017). A review of bioinformatics platforms for comparative genomics. Recent developments of the EDGAR 2.0 platform and its utility for taxonomic and phylogenetic studies. *Journal of Biotechnology*, 261, 2–9. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2017.07.010>

8. ANEXOS

Anexo I. Listado de cepas de *Xanthomonas arboricola* pv *juglandis* aisladas de distintas localidades chilenas.

Cepa	Año de aislamiento	Tejido de aislamiento	Localidad	Región
CFSAN033077	2014	ND*	Aguas Buenas	Región del Bio Bio
CFSAN033078	2014	Hoja	La Pintana	Región Metropolitana
CFSAN033079	2014	ND	Sin Información	Sin Información
CFSAN033080	2014	Hoja	Quillón	Región del Bio Bio
CFSAN033081	2014	Fruto	Quillón	Región del Bio Bio
CFSAN033082	2014	Fruto	Sin Información	Sin Información
CFSAN033083	2014	Hoja	La Pintana	Región Metropolitana
CFSAN033084	2014	Yema	La Perla	Región del Bio Bio
CFSAN033085	2014	ND	Peñaflor	Región del Bio Bio
CFSAN033086	2014	Hoja	La Perla	Región del Bio Bio
CFSAN033087	2014	Fruto	Miraflores	Región Metropolitana
CFSAN033088	2014	Hoja	Miraflores	Región Metropolitana
CFSAN033089	2014	Hoja	San Bernardo	Región Metropolitana

ND: No determinado

Anexo II. Características generales de los elementos tipo profagos predichos por la plataforma PHASTER

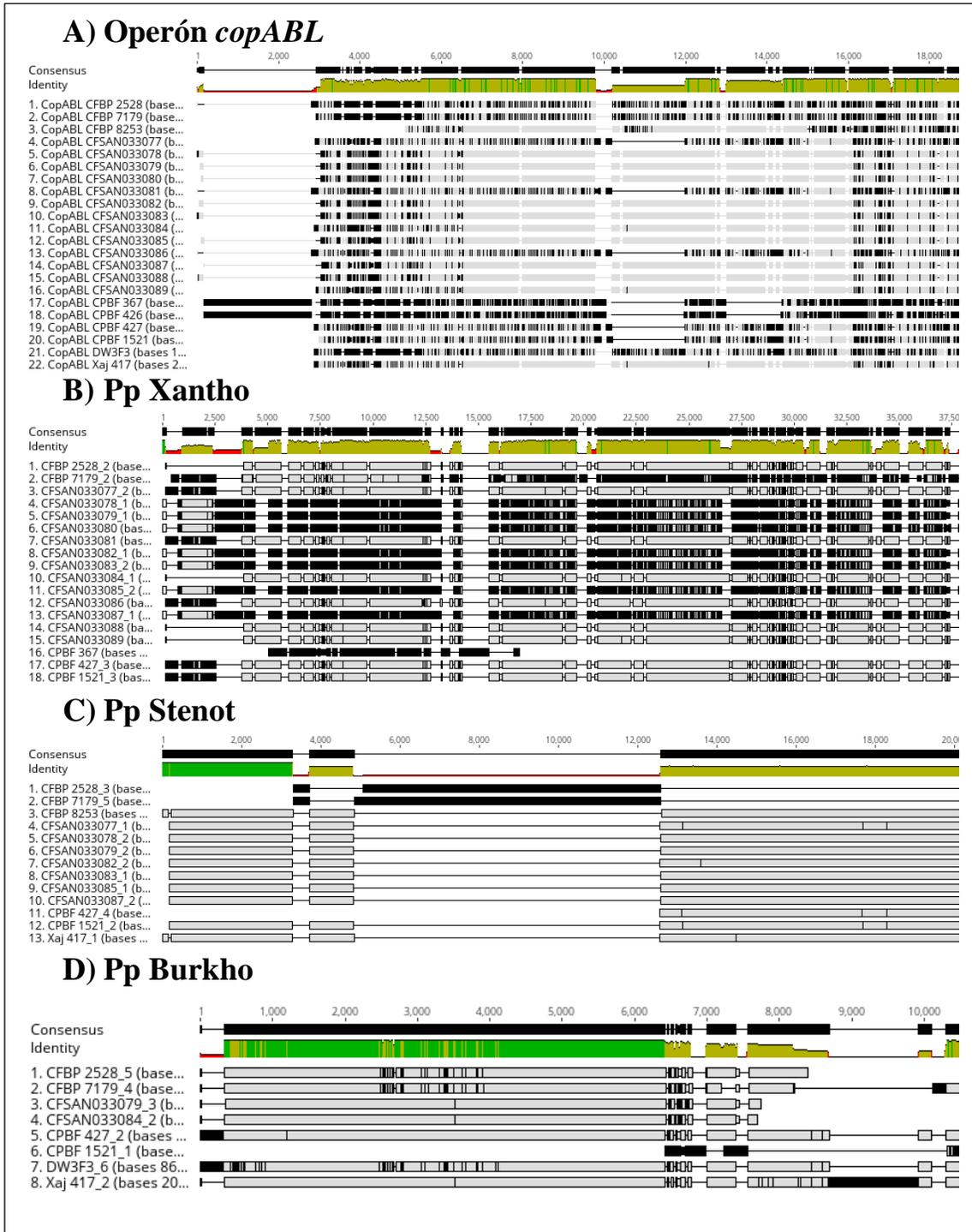
Cepa	Pp	Tamaño de región	Grado de completitud	Puntuación	Total CDS	Posición de región	Profago más común	%GC
CFBP 2528	5	34.4Kb	incompleto	60	12	781249-815673	Shigel_SfIV_ NC_022749(2)	61.38%
	1	34.5Kb	cuestionable	80	47	1157423-1191997	Xantho_phiL7_ NC_012742(7)	64.20%
	2	21.9Kb	intacto	140	21	51475-73410	Stenot_Smp131_ NC_023588(10)	66.59%
	8	31.6Kb	cuestionable	80	28	257159-288780	Pelagi_HTVC019P_ NC_020483(4)	60.56%
	3	7.9Kb	cuestionable	70	12	952913-960903	Burkho_phiE12_2_ NC_009236(3)	64.32%
CFBP 7179	5	14Kb	incompleto	50	15	38-14136	Shigel_SfIV_ NC_022749(2)	61.73%
	1	40.2Kb	intacto	100	55	16249-56530	Xantho_phiL7_ NC_012742(7)	64.38%
	6	37.5Kb	incompleto	60	27	256864-294394	Mesorh_phagevB_MloP_ Lo5R7ANS_ NC_025431(5)	61.02%
	3	7.9Kb	incompleto	60	11	922681-930648	Burkho_phiE12_2_ NC_009236(3)	64.48%
	2	20.7Kb	intacto	130	19	343423-364127	Stenot_Smp131_ NC_023588(9)	67.46%
CFBP 8253	2	26.7Kb	intacto	100	29	1-26778	Stenot_Smp131_ NC_023588(9)	61.04%
CFSAN033077	2	16.4Kb	cuestionable	90	19	1-16493	Stenot_Smp131_ NC_023588(10)	61.69%
	1	38.4Kb	intacto	100	55	66131-104546	Xantho_phiL7_ NC_012742(7)	64.23%

CFSAN033078	1	41Kb	intacto	110	46	111146-152152	Xantho_phiL7_ NC_012742(7)	64.27%
	2	16.3Kb	intacto	100	20	1-16385	Stenot_Smp131_ NC_023588(10)	61.70%
CFSAN033079	1	40.9Kb	intacto	110	47	1-40992	Xantho_phiL7_ NC_012742(7)	64.27%
	2	15.9Kb	cuestionable	90	19	28886-44827	Stenot_Smp131_ NC_023588(9)	61.67%
	3	7Kb	incompleto	60	11	17-7046	Burkho_phiE12_2_ NC_009236(3)	64.48%
CFSAN033080	1	41Kb	intacto	110	46	119396-160399	Xantho_phiL7_ NC_012742(7)	64.27%
CFSAN033081	1	38.4Kb	intacto	100	55	66131-104546	Xantho_phiL7_ NC_012742(7)	64.23%
CFSAN033082	1	40.9Kb	intacto	110	47	1-40992	Xantho_phiL7_ NC_012742(7)	64.27%
	2	16.3Kb	intacto	100	20	28745-45129	Stenot_Smp131_ NC_023588(10)	61.69%
CFSAN033083	2	16.3Kb	intacto	100	20	1-16385	Stenot_Smp131_ NC_023588(10)	61.70%
	1	40.9Kb	intacto	110	47	1-40992	Xantho_phiL7_ NC_012742(7)	64.27%
CFSAN033084	1	34.5Kb	cuestionable	80	47	19705-54279	Xantho_phiL7_ NC_012742(7)	64.20%
	3	6.9Kb	incompleto	60	11	7384-14365	Burkho_phiE12_2_ NC_009236(3)	64.55%
CFSAN033085	2	15.9Kb	cuestionable	90	19	445-16386	Stenot_Smp131_ NC_023588(9)	61.67%
	1	41Kb	intacto	110	46	30559-71565	Xantho_phiL7_ NC_012742(7)	64.27%
CFSAN033086	1	61.9Kb	cuestionable	90	51	5585-67580	Xantho_phiL7_ NC_012742(7)	64.00%

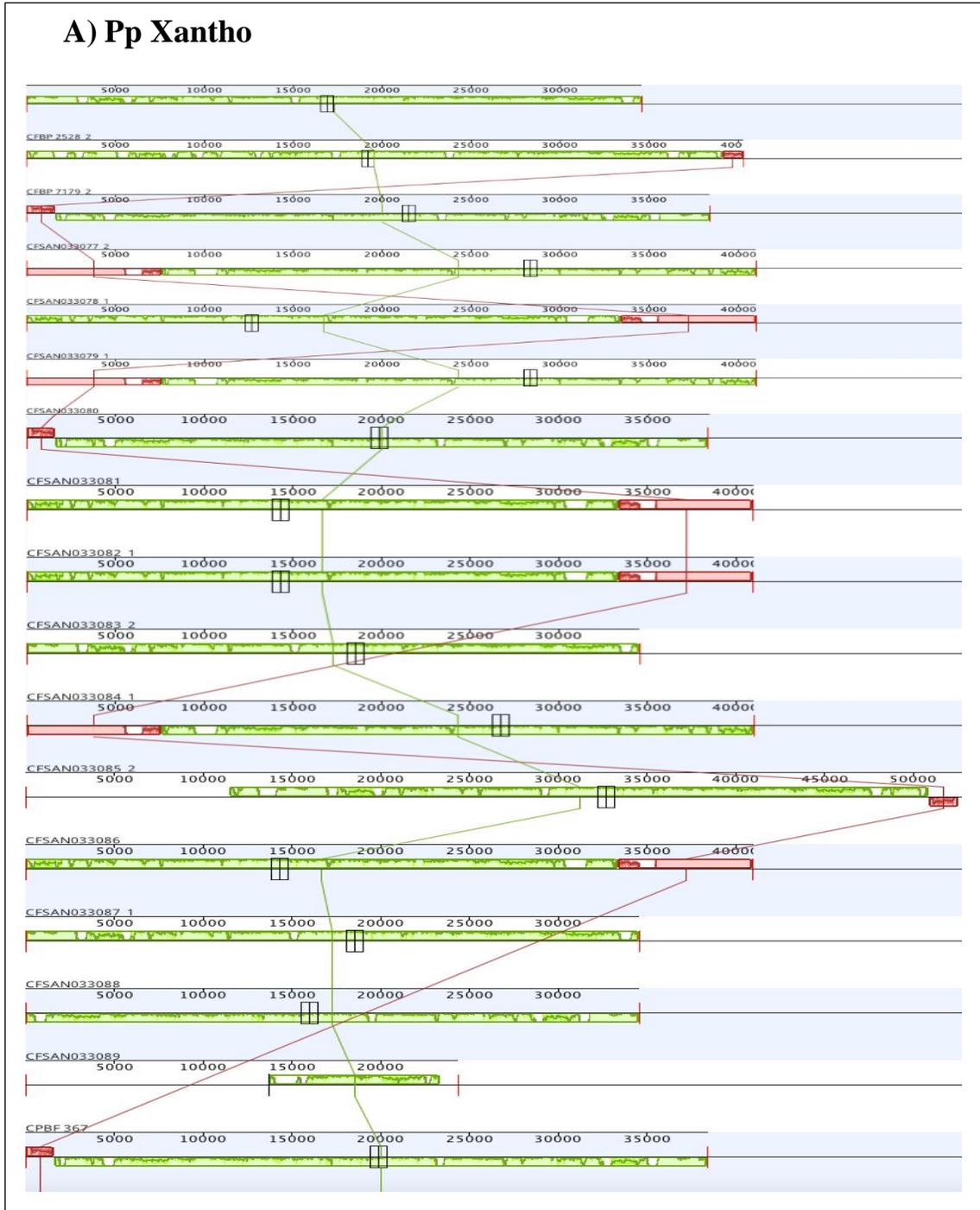
CFSAN033087	1	40.9Kb	intacto	110	47	1-40992	Xantho_phiL7_ NC_012742(7)	64.26%
	2	15.9Kb	cuestionable	90	19	28746-44687	Stenot_Smp131_ NC_023588(9)	61.67%
CFSAN033088	1	34.5Kb	cuestionable	80	47	18993-53567	Xantho_phiL7_ NC_012742(7)	64.20%
CFSAN033089	1	34.5Kb	cuestionable	90	48	36206-70780	Xantho_phiL7_ NC_012742(7)	64.20%
CPBF 1521	3	3.8Kb	cuestionable	70	6	1-3819	Burkho_ST79_ NC_021343(1)	61.72%
	2	15.9Kb	cuestionable	90	19	13276-29217	Stenot_Smp131_ NC_023588(9)	61.67%
	1	38.4Kb	intacto	100	55	71486-109901	Xantho_phiL7_ NC_012742(7)	64.23%
	2	12Kb	intacto	140	14	1-12042	Stenot_Smp131_ NC_023588(11)	65.14%
CPBF 367	1	24.3Kb	intacto	100	26	276832-301199	Xantho_phiL7_ NC_012742(6)	63.36%
CPBF 426	4	10.2Kb	incompleto	10	7	429338-439617	Arthro_Gordon_ NC_041952(2)	67.67%
CPBF 427	5	13.6Kb	cuestionable	70	15	1357698-1371324	Escher_RCS47_ NC_042128(2)	60.17%
	3	19.8Kb	intacto	140	21	1735442-1755254	Burkho_phiE12_2_ NC_009236(3)	62.93%
	1	38.4Kb	intacto	120	53	2715776-2754191	Xantho_phiL7_ NC_012742(6)	64.23%
	2	25Kb	intacto	150	30	3215072-3240138	Stenot_Smp131_ NC_023588(20)	63.66%
	9	22.5Kb	incompleto	30	15	5155952-5178530	Arthro_CaptnMurica_ NC_041951(2)	68.70%
DW3F3	10	33.1Kb	intacto	130	12	647063-680178	Pseudo_phiCTX_ NC_003278(3)	61.78%

	7	23.4Kb	incompleto	40	17	2443119-2466560	Escher_RCS47_ NC_042128(2)	68.80%
	2	14.6Kb	intacto	150	15	2469675-2484371	Stenot_Smp131_ NC_023588(10)	64.71%
	6	28.4Kb	cuestionable	70	26	561328-589753	Mesorh_phagevB_MloP_ Lo5R7ANS_ NC_025431(5)	62.22%
	11	11.1Kb	cuestionable	70	15	881214-892336	Mycoba_Panchino_ NC_031281(1)	60.03%
	3	25.2Kb	intacto	130	21	1247532-1272769	Burkho_phiE12_2_ NC_009236(3)	61.13%
Xaj 417	2	56.9Kb	intacto	150	54	735984-792913	Stenot_Smp131_ NC_023588(25)	61.42%
	3	20.3Kb	intacto	150	23	2673608-2693939	Burkho_phiE12_2_ NC_009236(3)	61.76%
	12	13.8Kb	cuestionable	70	14	3060813-3074649	Riemer_RAP44_ NC_019490(1)	59.76%
	4	22.3Kb	incompleto	30	16	4620398-4642743	Arthro_Gordon_ NC_041952(2)	68.69%

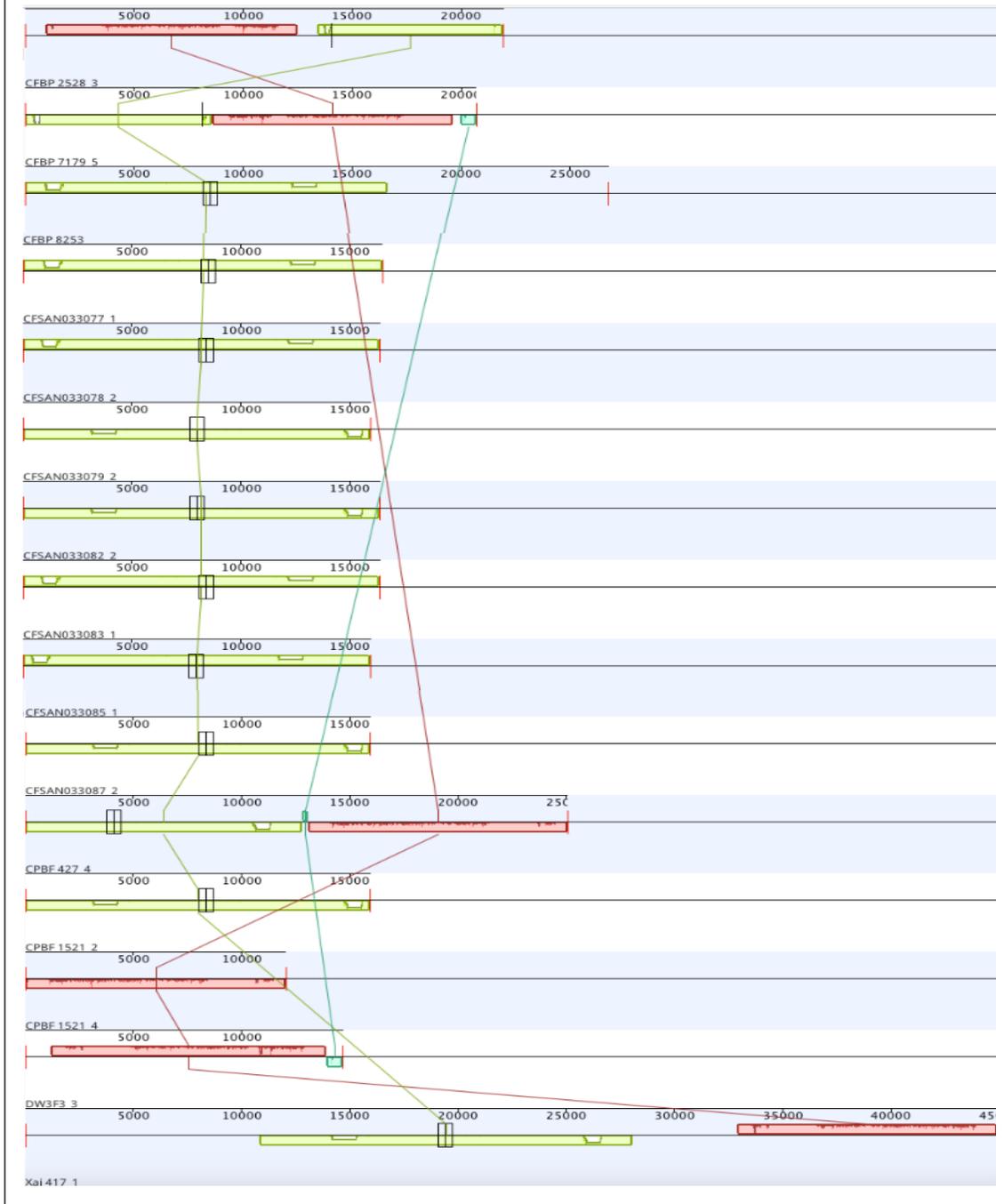
Anexo III. Alineamientos múltiples de secuencias genómicas de cepas *Xanthomonas arboricola* pv *juglandis*.



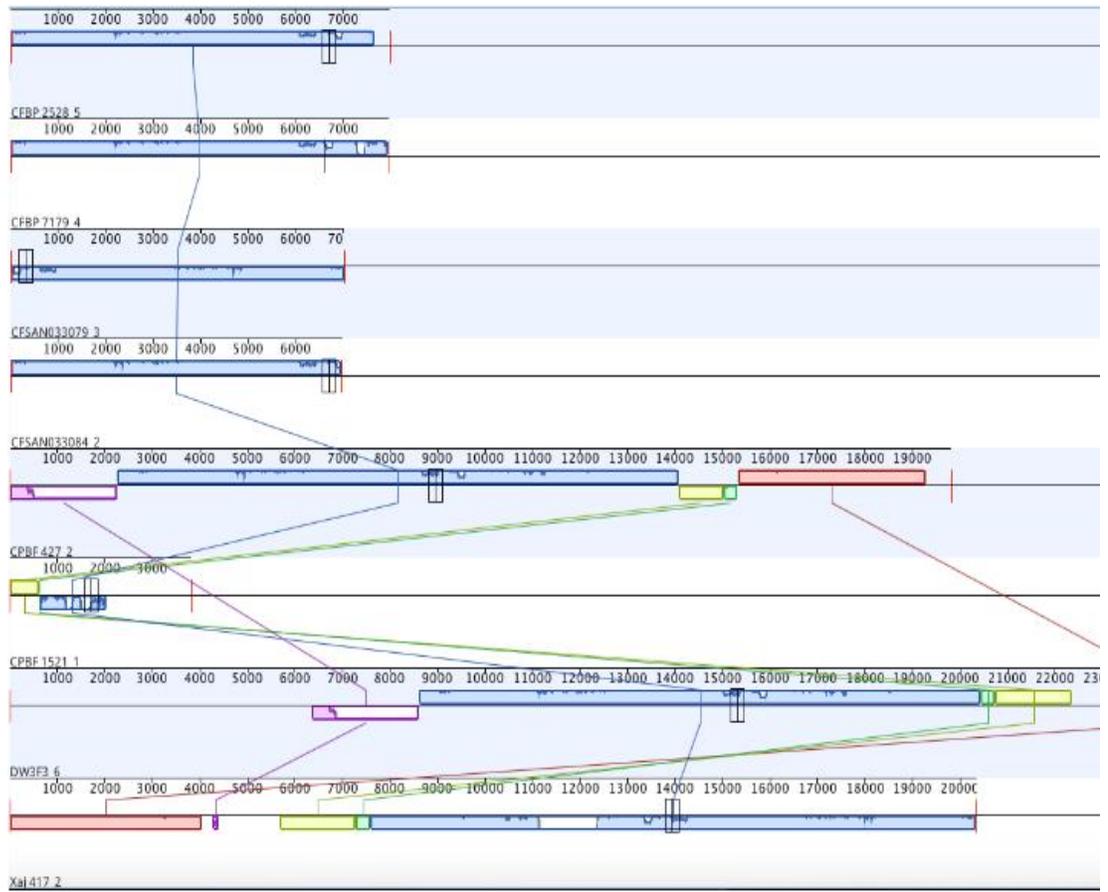
Anexo IV. Bloques co-linealmente localizados obtenidos del alineamiento MAUVE de las secuencias correspondientes a los 3 profagos mayormente compartidos por las cepas *Xanthomonas arboricola* pv *juglandis*



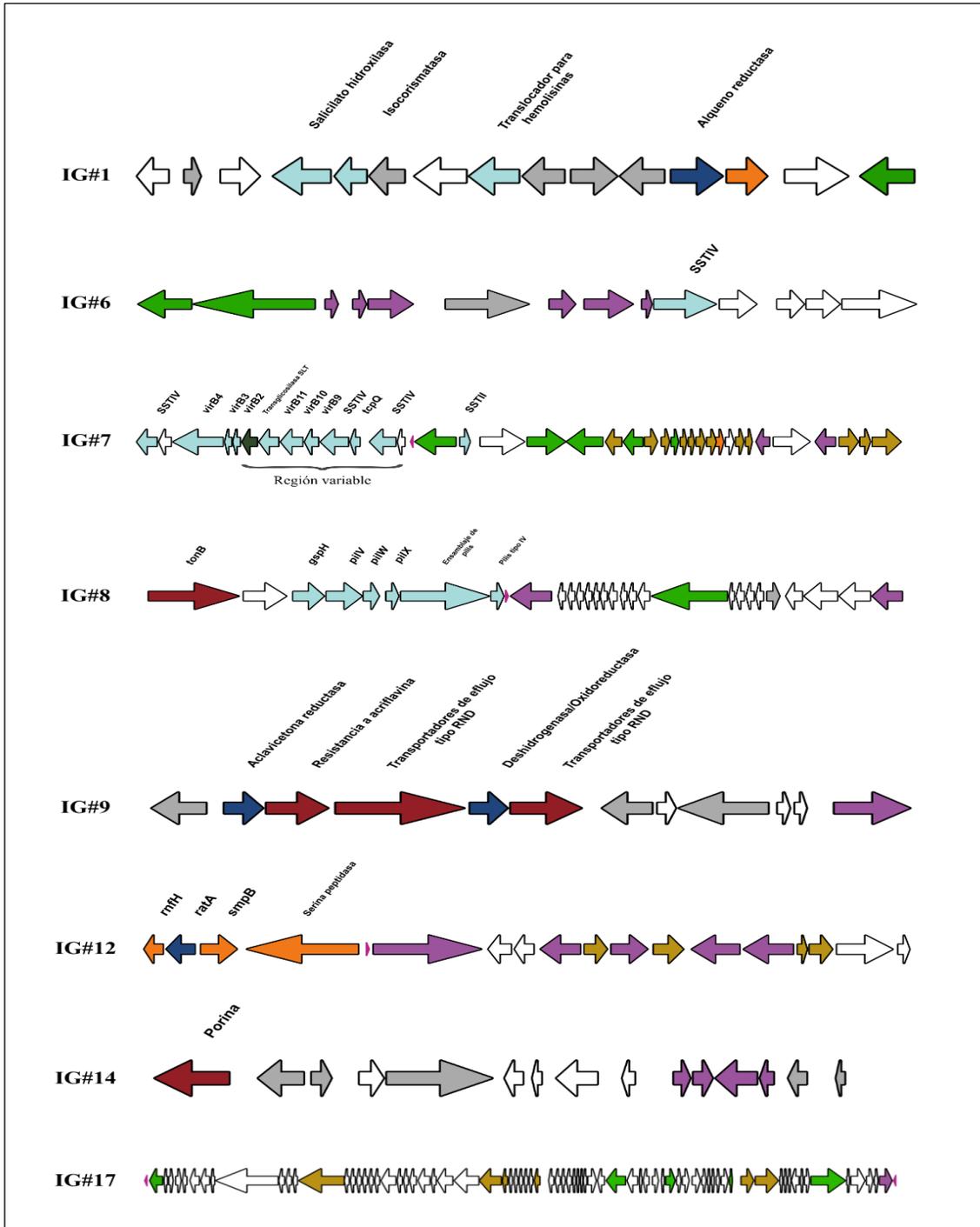
B) Pp Stenot



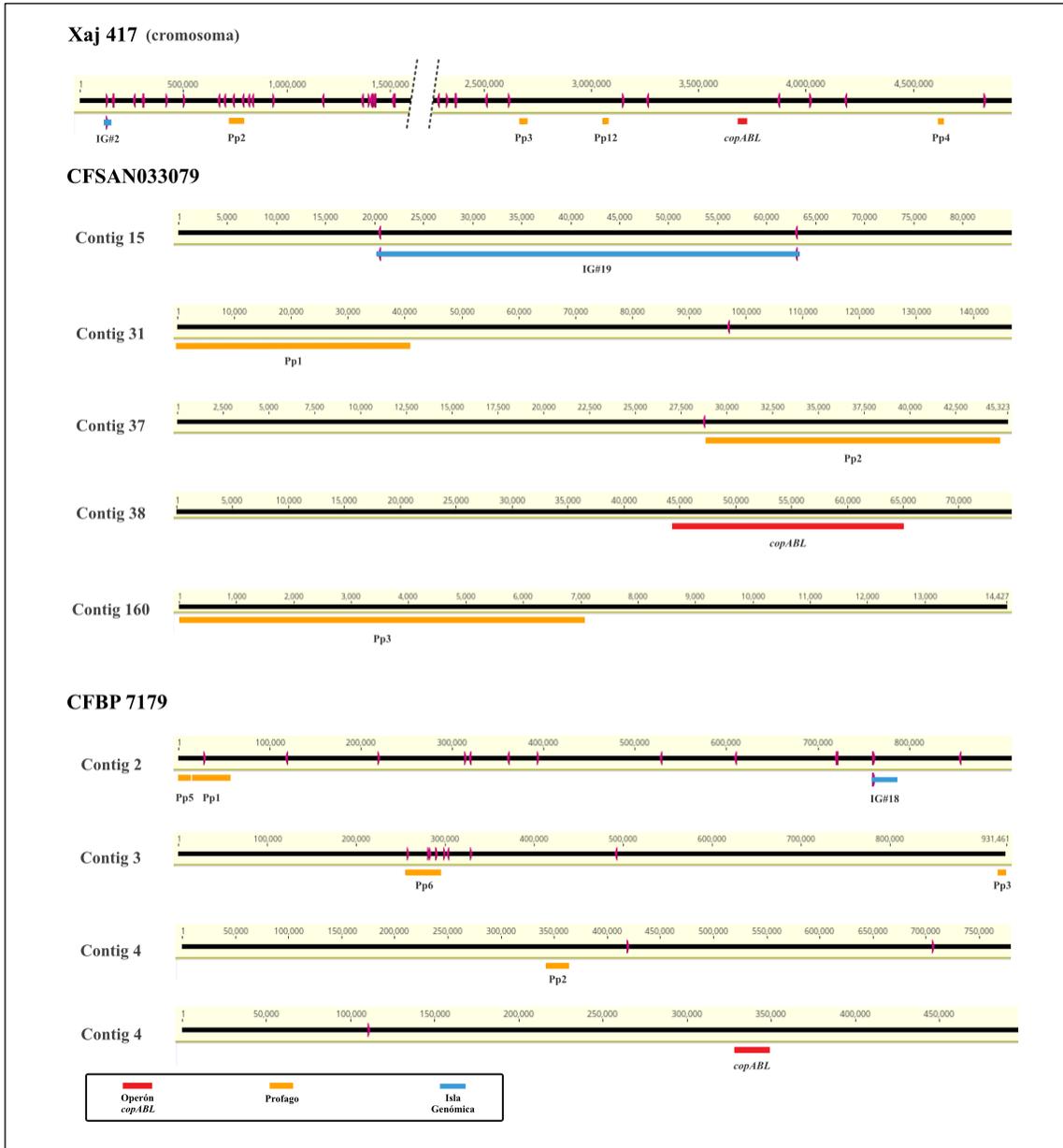
C) Pp Burkho



Anexo V. Resumen esquemático del resto de IGs halladas en las 3 cepas usadas como referencia (Xaj 417, CFSAN033079, CFBP 7179). Ver simbología en la figura 8.



Anexo VI. Representación esquemática e integrada del mapeo de las secuencias genéticas correspondientes a profagos (Pp), Islas genómicas (IG) relacionadas a cobre, y operón *copABL* de las cepas Xaj 417, CFSAN033079 y CFBP 7179. En cada mapeo de se indica con barras de colores (simbología indicada) cada una de las secuencias de los elementos genéticos indicados, y en el caso de corresponder a un genoma incompleto, se indica el número del contig correspondiente al mapeo.



Anexo VII. Porcentajes de la identidad por pares y el grado obtenidos en el análisis de sintenia de genes de elementos genéticos móviles. Resultados de la consulta blastn de los genes pertenecientes a las IG#2, IG#18 e IG#19 de las cepas de *Xanthomonas arboricola* pv *juglandis* Xaj417, CFBP 7179 y CFSAN033079 respectivamente.

Cepa referencia	Gen ortólogo	Cepa ortóloga (N° acceso de NCBI)	Pairwise Identity (%)	Grado (%)
CFSAN033079	<i>copA</i>	CP012251	98,8	98,8
	<i>copB</i>	CP012251	86,0	98,4
		AY536748	84,9	66,8
	<i>copC</i>	CP012251	78,7	98,8
	<i>copD</i>	CP012251	87,1	99,5
	<i>copF</i>	CP012251	79,3	99,4
		AY536748	72,8	66,8
		CP021768	79,2	85,1
	<i>cusA</i>	CP021768	84,1	89,3
		CP062259	84,1	89,2
		CP029773	84,1	89,3
		HE798556	84,1	88,9
		CP021768	79,7	71,6
	<i>cusB</i>	CP062259	79,4	71,8
		CP029773	79,7	71,8
		HE798556	79,7	71,3
CP021768		79,5	85,3	
<i>cusC</i>	CP062259	79,5	85,2	
	CP029773	79,4	87,4	
	HE798556	79,4	86,5	
	AY536748	85,8	69,9	
<i>copB</i>	CP060028	84,8	69,9	
	CP012900	84,8	69,9	
	CP026544	75,1	48,3	
<i>copC</i>	CP046333	75,1	48,3	
	AY536748	79,5	80,0	
<i>copF</i>	CP061497	79,3	83,8	
	CP060711	79,3	83,8	
	CP060028	79,5	79,9	
	<i>copG</i>	CP061497	78,6	85,9

		CP060711	78,4	84,7
<i>copL</i>		CP061497	83,9	21,9
		CP060711	83,9	21,9
<i>cusR</i>		HG999365	100	100
		CP055291	100	100
		CP060022	100	100
		CP006931	100	100
		CP023255	100	100
		CP024630	100	100
<i>cusS</i>		HG999365	100	100
		CP055291	100	100
		CP060022	100	100
		CP006931	100	100
		CP023255	100	100
		CP024630	100	100
<i>copA</i>		HG999365	100	100
		CP055291	100	100
		CP060022	100	100
		CP006931	100	100
		CP023255	100	100
		CP024630	100	100
<i>copB</i>		HG999365	100	100
		CP055291	100	100
		CP060022	100	100
		CP006931	100	100
		CP023255	100	100
		CP024630	100	100
<i>copC</i>		HG999365	100	100
		CP055291	100	100
		CP060022	100	100
		CP006931	100	100
		CP023255	100	100
		CP024630	100	100
<i>copD</i>		HG999365	100	100
		CP055291	100	100

CFBP 7179

	CP060022	100	100
	CP006931	100	100
	CP023255	100	100
	CP024630	100	100
	HG999365	100	100
	CP055291	100	100
	CP060022	100	100
<i>copF</i>	CP006931	100	100
	CP023255	100	100
	CP024630	100	100
	HG999365	100	100
	CP055291	100	100
	CP060022	100	100
<i>copK</i>	CP006931	100	100
	CP023255	100	100
	CP024630	100	100

Anexo VIII. Clasificación pan-genómica. Se listan el número de genes correspondientes para cada una de las clasificaciones de los tipos de genes en el que se subdivide el pan-genoma de una cepa Xaj.

Cepa	Genes (NCBI)	Pan-genoma	Genoma central	Genoma accesorio	Singletones
Xaj 417	4425			1314	27
CFBP 2528	4388			1277	110
CFBP 7179	4485			1374	193
CFSAN033077	4445			1334	0
CFSAN033078	4428			1317	0
CFSAN033079	4441			1330	4
CFSAN033080	4489			1378	12
CFSAN033081	4462			1351	0
CFSAN033082	4508			1397	4
CFSAN033083	4408			1297	0
CFSAN033084	4422			1311	2
CFSAN033085	4428	6970	3111	1317	0
CFSAN033086	4475			1364	3
CFSAN033087	4393			1282	1
CFSAN033088	4478			1367	3
CFSAN033089	4424			1313	3
CPBF 427	4463			1352	9
CFBP 8253	4238			1127	35
DW3F3	4390			1279	48
CPBF 1521	4503			1392	41
CPBF 426	4143			1032	196
CPBF 367	4162			1051	293

Anexo IX. Banco de genes relacionados con la respuesta a cobre o metales pesados en general. Se indica el producto para el cual se predice o informa la anotación en el genoma y su posible rol o función en la respuesta a cobre/metales pesados.

Gen	Producto	Rol/Función
<i>copA</i>	Proteína A de resistencia a cobre	Oxidasa multicobre de rescate y secuestro del cobre celular (citoplásmica)
<i>copB</i>	Proteína B de resistencia a cobre	Rescate y secuestro del cobre celular (periplásmica)
<i>copC</i>	Proteína C de resistencia a cobre	Proteína que une cobre periplásmico
<i>copD</i>	Proteína D de resistencia a cobre	Junto a <i>copC</i> capturan y secuestran cobre en el periplasma
<i>copF</i>	Proteína F de resistencia a cobre	ATPasa tipo P de translocación de metales pesados/cobre (<i>ctpA/CtpA</i>)
<i>copG</i>	Cobre amino oxidasa/reductasa	Reductasa, facilita exportación de Cu por bomba de eflujo (condiciones aeróbicas). Oxidasa, detoxifica de Cu (condiciones anaeróbica)
<i>copK</i>	Proteína K de resistencia a cobre	Proteína de unión a cobre periplásmico
<i>copL</i>	Proteína L de resistencia a cobre	Proteína reguladora de unión a metales/cobre
<i>copM</i>	Proteína M de resistencia a cobre	Proteína periplásmica de unión a cobre
<i>cusA</i>	Proteína CusA de homeostasis de cobre	Permeasa del transportador de eflujo RND de cationes de la familia CusA/CzcA
<i>cusB</i>	Proteína CusB de homeostasis de cobre	Subunidad adaptadora periplásmica del transportador de eflujo RND
<i>cusC</i>	Proteína CusC de homeostasis de cobre	Proteína de membrana externa de eflujo RND de metales pesados
<i>cusR</i>	Proteína CusR de homeostasis de cobre	Histidina quinasa sonda de metales pesados (Cu(+)/Ag(+))
<i>cusS</i>	Proteína CusS de homeostasis de cobre	Factor de transcripción regulador de respuesta de metales pesados

Anexo X. Modelos de los sistemas de operones de resistencia a cobre *cop* (*Pseudomonas syringae*) y *pco* (*Escherichia coli*)

