

## Desarrollo de Orthocore e implementación de otras herramientas computacionales para entender el pangenoma de un linaje genómico.

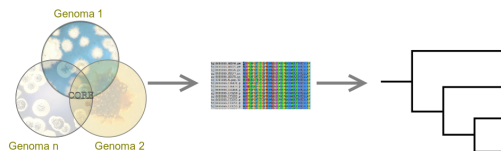


Figure 1: Orthocore calcula las familias génicas comunes de un linaje taxonómico. Después de un proceso de filtrado, alineamiento y curación, Orthocore concatena las secuencias de estas familias y entrega una reconstrucción filogenética.

La organización filogenética de un linaje genómico permite la observación de dinámicas de pérdida y ganancia de familias génicas en organismos cercanos. Si los organismos están desordenados taxonómicamente es difícil apreciar la dinámica genómica de aparición-desaparición de miembros de una familia génica. Ordenar los genomas de un linaje de acuerdo a su historia evolutiva facilita apreciar cambios en el número de copias de una familia. Esta consideración es relevante en el marco de esta tesis ya que cambios en los perfiles de promiscuidad pueden estar relacionados a copias extras de organismos cercanos. Como se explicó previamente en la introducción el pangenoma de un linaje taxonómico está dividido en el *core*, *shell* y *dispensable genome*. Orthocore es un algoritmo que se desarrolló para automatizar la obtención del *core conservado* de un linaje genómico. Con este *core* realiza una reconstrucción filogenética de los organismos del linaje Figure 1. En esta sección se explica el funcionamiento de Orthocore así como casos en donde fue utilizado, específicamente en casos de estudio de los órdenes *Actinomycetales*, *Micrococcales* y *Nostocales* y en la especie *Salmonella typhi*. Finalmente se describen otros métodos implementados para entender el pangenoma de un linaje genómico.

*Actinomycetales* permitió organizar filogenéticamente a este orden. Esta organización facilitó el entendimiento en cambios de promiscuidad de la familia enzimática PriA mediante la distinción de patrones de pérdida y ganancia de genes en las rutas de síntesis de histidina y triptófano. En la segunda aplicación cepas de *Salmonella typhi* fueron ordenadas filogenéticamente. La tercera aplicación permitió realizar una reconstrucción filogenética del orden *Nostocales* del phylum *Cyanobacteria* y comparar así patrones de presencia y ausencia de clusters de genes biosintéticos. Finalmente, en organismos del microbioma del tomate orthocore de utilizó para identificar genes marcadores que permitieran distinguir cepas de *Clavibacter michiganensis* de otras especies de *Micrococcales*.

### La distribución de la función metabólica de las familias del pangenoma depende de la variabilidad del linaje seleccionado.

El número de familias génicas presentes en el pangenoma, así como su distribución en el *core*, *shell* y *dispensable genome* depende de la elección de los genomas y del linaje genómico. Para entender esto se puede pensar en un ejemplo extremo, consideremos una bacteria de 1000 familias de genes de la cual se obtienen secuencias de diez genomas de la misma cepa. Estas secuenciaciones deberían ser prácticamente idénticas y en ese caso el *core genome* sería 1000 familias, el *shell* y el *dispensable genome* serían cero. En este caso, todo el metabolismo, tanto el central como el especializado estarían conservados dentro del *core genome*, ya que el *shell* y el *dispensable genome* se encuentran vacíos. Sin embargo, si variamos el linaje taxonómico, y ahora estudiamos el pangenoma de 10 especies distintas del género *Streptomyces* ahora el *core genome* estará compuesto por aproximadamente un tercio de su tamaño promedio, y dentro del *core genome* es donde se encontrarán muchos de las familias dedicadas al metabolismo central o conservado (por ejemplo, familias de la glicólisis o síntesis de aminoácidos). En cambio muchas de las familias dedicadas al metabolismo especializado y pertenecientes a clústers biosintéticos de productos naturales (BGCs) estarán en el *dispensable genome*.

pues *Streptomyces* es productor de una gran variedad de metabolitos especializados y cada especie suele tener su producto característico. Figure 2.

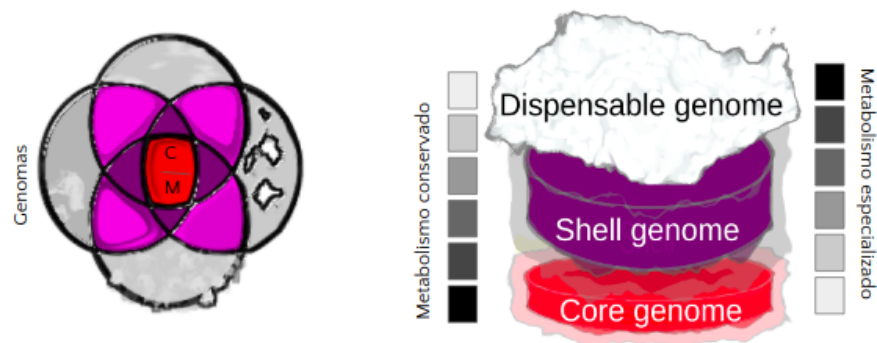


Figure 2: El pangenoma de un conjunto de genomas de un linaje puede ser clasificado en varios grupos. En este ejemplo, en el lado izquierdo de la figura se observa en gris el *genoma dispensable* compuesto por familias génicas presentes sólo en un genoma. En dos tonos de morado observamos el *shellgenome*, familias que están presentes en la mayoría de los genomas del linaje, en este en caso dos o tres genomas. Finalmente en rojo se muestra el *core*, aquellas familias presentes en todos los genomas del linaje. El *core* contiene tanto familias muy conservadas con una sola copia por genoma ( C ), como familias expandidas. Las familias marcadoras (M) pueden ser parte del *core* conservado o de las familias expandidas. Del lado derecho se muestra una representación del pangenoma para cualquier número de genomas. Familias de metabolismo conservado tenderán a estar concentradas entre el *core* y el *shell genome*, mientras que el metabolismo especializado tendrá más representantes en el dispensable que en el *coregenome*. Sin embargo tanto el tipo de metabolismo como el tamaño del *core*, *shell* y *genoma dispensable* pueden variar según la diversidad de los organismos seleccionados.

El *core genome* de un linaje, además de tener familias conservadas y prácticamente presentes en todo el dominio Bacteria también puede contener familias marcadoras Figure 3 . Estos genes marcadores permiten realizar pruebas de diagnóstico para colonizaciones bacterianas. A las familias que están presentes en el *core genome* de un linaje A, pero que están completamente ausentes de un linaje B se les llama marcadoras. Por ejemplo genes conservados en la especie *Streptomyces coelicolor* pero no conservados en *Streptomyces rimosus* son genes marcadores de *Streptomyces coelicolor* respecto de *Streptomyces rimosus*. Estos mismos marcadores tal vez no sean marcadores respecto de *Streptomyces lividans*, a pesar de la cercanía taxonómica entre estos organismos. La presencia de genes marcadores en el core depende de ambos linajes, por lo que es importante contar con algoritmos que permitan automatizar su cálculo.

El número de familias en el pangenoma, ya sea en el *core*, *shell* o *dispensable genome* no sólo depende de la divergencia o proximidad taxonómica de los organismos del linaje seleccionado, también depende de lo variable que sea el contenido génico en los genomas del linaje. A esta característica se le conoce como apertura. Hay especies, por ejemplo algunos patógenos, cuyo pangenoma se encuentra sumamente cerrado en el sentido de que no importa cuántos genomas se agreguen, el número de familias parece converger y ser asintótico rápidamente a una cota superior. En cambio especies o géneros que viven en una gran diversidad de hábitats suelen tener un pangenoma abierto. Esto significa que cada vez que se agrega un nuevo genoma aparecen otras familias que no estaban en los genomas anteriores. En los linajes con pangenoma abierto el número de familias nuevas al agregar un genomas seguirá una tendencia creciente y no asintótica.

Además de la apertura, existen otros intentos de cuantificar la diversidad génica de un linaje. Está por ejemplo la fluidez, definida como el promedio de familias únicas entre familias totales por pares de genomas. El pangenoma bacteriano total, es decir el total de familias génicas en el dominio Bacteria es considerado abierto.

Finalmente la distribución de las funciones metabólicas encontrada en los subconjuntos del pangenoma ( *core*, *shell* y *dispensable genome*) está relacionada a la proximidad filogenética de los organismos seleccionados en el estudio. Entre más diversos sean los organismos menos familias dedicadas exclusivamente a metabolismo especializado abundarán en el *core/shell genome*. La diversidad provocará que lo único que tengan los genomas de estos organismos en común sean funciones conservadas por una amplia variedad de especies

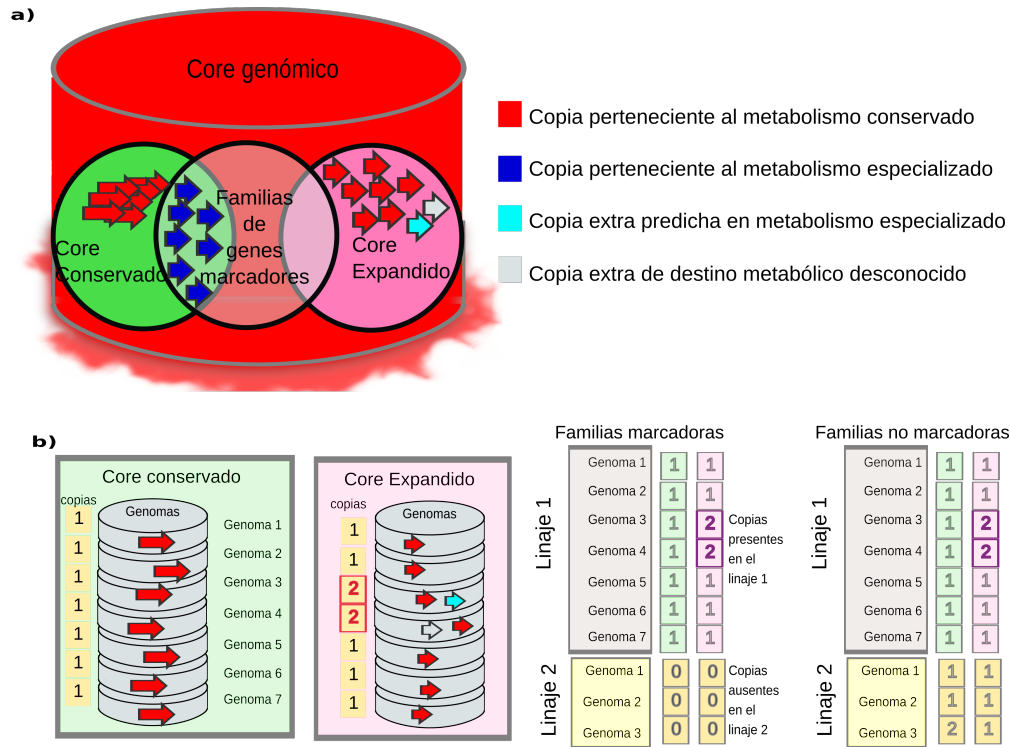


Figure 3: El core genome puede contener familias con funciones en distintos grupos metabólicos así como diversidad en el número de copias. Arriba se muestra que en el core pueden coexistir familias tanto de copia única como con expansiones. Las familias con funciones en el metabolismo conservado suelen concentrarse en el *core genome* (rojas), pero también dependiendo de los organismos seleccionados pueden encontrarse ya sea familias enteras o algunas copias dedicadas al metabolismo especializado (azul). No de todas las copias se conocerá su función, algunas pueden tener un destino metabólico desconocido (gris) o bien ser predichas por algún algoritmo como parte del metabolismo especializado (cyan). Abajo a la izquierda se comparan familias del *core conservado* con exactamente una copia por genoma contra familias del *core expandido*. Ambas pertenecen al *core*, pero en el *core expandido* hay dos genomas que tienen una copia extra en esta familia, una cyan y una gris, que podría dificultar la elección de los verdaderos ortólogos. A la derecha se ejemplifican familias de genes marcadores, útiles para identificar un linaje genómico. Tanto familias del *core conservado* como del *core expandido* pueden ser familias marcadores, siempre que exista al menos una copia de cada familia en el linaje 1 y ninguna copia en el linaje 2. Las familias dejan de ser marcadoras cuando el linaje dos contiene al menos una copia en algún genoma.

bacterianas. Ahora bien, muchas familias de metabolismo especializado provienen de reclutamientos de copias extra de familias de metabolismo conservado. Así pues aunque decrezca el número de familias con exclusividad en metabolismo especializado en el *core y shell genome*, estos subconjuntos del pangenoma aún pueden contener familias conservadas que tengan copias extra en proceso de reclutamiento para algún Cluster biosintético de genes (BGCs) de metabolismo especializado. Considerando las reflexiones anteriores, entre más diverso sea un linaje, más tenderá su *core genome* a contener exclusivamente familias de metabolismo conservado mientras que su dispensable genome estará formado mayormente por familias de enzimas del metabolismo especializado.

## El core conservado permite la reconstrucción de filogenias complicadas

Orthocore es el desarrollo bioinformático que realicé para calcular las familias génicas más conservadas del *core genome*. Dos genes son homólogos si poseen un ancestro común, entre los principales grupos de homólogos están ortólogos y parálogos. Los ortólogos provienen de eventos de especiación de un ancestro común mientras que los parálogos evolucionan por eventos de duplicación. Orthocore obtiene un subconjunto del *core genome*: el *core conservado*, es decir, familias de ortólogos presentes en todos los genomas del grupo y que además son libres de parálogos de difícil identificación. El *core conservado* facilita la organización en árboles filogenéticos de organismos de un linaje genómico.

La comparación de la variación molecular entre ortólogos ha sido utilizada para establecer relaciones filogenéticas entre organismos. Esta técnica ha dado lugar a grandes descubrimientos. Por ejemplo comparar la secuencia de la subunidad 16s del gene RNA ribosomal condujo a Woese al descubrimiento del dominio Archaea en 1977 [Woese\_phylogenetic\_1977]. Un árbol de especies suele hacerse con secuencias de familias que pertenecen al core genome de un Dominio, por ejemplo las familias 16s o RpoB en los Dominios Bacteria y Archaea. Algunos autores realizan árboles multilocus para mejorar la resolución de árboles de especies realizados mediante la comparación de secuencias de 16s. Los genes seleccionados para los árboles multilocus deben estar en todos los organismos y no tener copias extra tan parecidas que puedan confundirse y entorpecer la reconstrucción filogenética, es decir, las familias seleccionadas deben ser parte del *core conservado*. Orthocore automatiza la identificación de estas familias.

Entre los factores importantes para establecer las relaciones filogenéticas diferenciando entre Archaea y Bacteria están los siguientes: 1) la presencia conservada de la subunidad de 16s en los tres dominios mencionados, y 2) la suficiente divergencia entre estas secuencias en los organismos de dichos dominios. Ahora bien, establecer relaciones filogenéticas entre Archaea y Bacteria es en cierto sentido más sencillo que establecerlas entre organismos pertenecientes al mismo género o inclusive a la misma especie. En ocasiones, como en el caso del género *Streptomyces*, la secuencia de 16s por sí sola no posee la suficiente variación para resolver la filogenia [Labeda\_phylogenetic\_2017]. En *Streptomyces* la variación entre estas secuencias suele ser menor al 1%. Para resolver el problema de escasa variación en secuencias de 16s se pueden concatenar las secuencias de otros ortólogos, siempre que estos aparezcan en todos los organismos que se estén estudiando, es decir, siempre que sean parte del core genómico.

## El algoritmo de Orthocore

Los ortólogos suelen identificarse por similitud de secuencia, pero si se realiza la identificación manualmente también se suelen capturar parálogos que pueden confundir la elucidación de eventos de especiación. Orthocore automatizó la búsqueda de ortólogos y el filtrado de parálogos en genomas procariontes mediante la generalización de la definición del mejor hit bidireccional (BBH por sus siglas en inglés) Figure 4. Dos secuencias son BBH si cada una es el mejor hit de un algoritmo de distancia (BLAST usualmente) en el genoma de origen de la otra. Una primera generalización para obtener el set de ortólogos de una familia del core es definir un genoma de referencia y tomar los BBH respecto a ese genoma. En la práctica, esta definición da como resultado distintos resultados según el genoma de referencia, haciendo que algunos parálogos no sea filtrados.

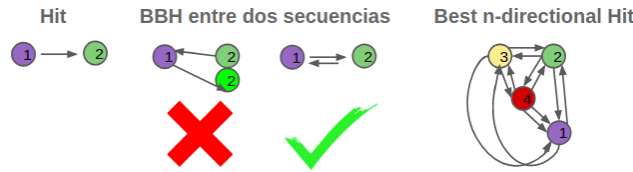


Figure 4: Orthocore utiliza los mejores hits n-direccionales para obtener grupos de ortólogos. Un hit es el mejor resultado de una secuencia en otro genoma. Un Bidireccional Best Hit es el mejor hit bidireccional. La secuencia 2 es el mejor hit de la secuencia 1 en el genoma 2 y recíprocamente, la secuencia 1 es el mejor hit de la secuencia 2 en el genoma 1. La existencia de una copia extra muy parecida a la secuencia 2 puede romper el BBH. Un mejor hit n-direccional debe ser BBH todos contra todos garantizando que estas secuencias están muy conservadas entre sí.

Para solventar esta dificultad se definió en Orthocore el concepto de mejores hits multidireccionales. Un conjunto de genes son mejores hits multidireccionales si todos entre sí son BBH por pares. Es decir si cada gen fuera un punto y ser mejor hit se expresara como una conexión con dirección todos los puntos estarían conectados por una flecha de ida y otra de regreso. Con este método se eliminó la dependencia de un genoma de referencia. Esta restricción también ocasiona que en grupos muy grandes por ejemplo más de 100 genomas de distintas especies, o muy diversos de distintos dominios, o muy fragmentados como con contigs de en promedio 3 Mbp, el core conservado puede quedar vacío.

### Componentes técnicos de Orthocore

Orthocore es un tubería escrita en perl que incorpora los hits multidireccionales permitiendo obtener y usar el core conservado para realizar una reconstrucción filogenética mediante los siguientes pasos:

- Obtiene el core conservado: los mejores n-direccional hits (blastp).
- Alinea cada familia del core conservado (MUSCLE).
- Cura automáticamente cada familia del core conservado (Gblocks).
- Concatena las familias del core conservado formando una matriz de aminoácidos.
- Realiza una reconstrucción filogenética de la matriz de aminoácidos (FastTree)
- Provee las funciones del core conservado según la anotación funcional de RAST.

Existen otros algoritmos como OrthoMCL, y fastOrtho que dividen pangenomas en clusters de familias de genes, get\_homologues y metaphor que obtienen el core y filtran buscando verdaderas relaciones de homología, y finalmente BPGA que hace reconstrucciones filogenéticas tanto según el core como según el pangenoma. Sin embargo Orthocore resolvió en su momento la necesidad específica de proporcionar una matriz concatenada de genes del core conservado lista para utilizarse en un árbol multilocus. Adicionalmente, como Orthocore fue diseñado para trabajar con la anotación de la plataforma RAST, también se obtiene la anotación funcional tanto de familias del core como del complemento.

Orthocore incorpora todas las dependencias en un contenedor de docker disponible en <https://github.com/nselem/orthocore>. Además en este contenedor está un script que permite bajar genomas de NCBI masivamente y posteriormente anotarlos en RAST desde la terminal. Los protocolos de uso se encuentran al final de este capítulo.

### Aplicaciones de Orthocore, identificación del core conservado y de familias de genes marcadores.

Cuatro aplicaciones de Orthocore serán presentadas en las siguientes secciones de este capítulo. En la primera aplicación el core conservado en *Actinomycetales* permitió organizar filogenéticamente a este orden. Esta organización facilitó el entendimiento en cambios de promiscuidad de la familia enzimática PriA mediante la distinción de patrones de pérdida y ganancia de genes en las rutas de síntesis de histidina y triptófano. En la segunda aplicación cepas de *Salmonella typhi* fueron ordenadas filogenéticamente. La tercera aplicación

permitió realizar una reconstrucción filogenética del orden *Nostocales* del phylum *Cyanobacteria* y comparar así patrones de presencia y ausencia de clusters de genes biosintéticos. Finalmente, en organismos del microbioma del tomate orthocore se utilizó para identificar genes marcadores que permitieran distinguir cepas de *Clavibacter Michiganensis* de otras especies de *Micrococcales*.

Perfiles de promiscuidad de PriA en el orden *Actinomycetales* se relacionan con la especiación. Para mejorar el entendimiento de los cambios en promiscuidad enzimática de PriA, se necesitaba entender filogenéticamente al orden *Actinomycetales*, un camino era obtener su core conservado. Orthocore fue diseñado para resolver este problema. Con el resultado de Orthocore se realizó un árbol de especies donde se observaron patrones de pérdida y ganancia de genes en la vecindad genómica del gen que codifica para PriA. Se encontró que hay clados de *Actinomyces* donde los genes correspondientes a la síntesis de histidina no estaban en la vecindad genómica de PriA, y mediante la realización de cinéticas enzimáticas se comprobó que la actividad de catalizar la reacción correspondiente a HisA estaba perdida en estos organismos. A estas enzimas se les llamó subTrpF ya que sólo poseían la capacidad de catalizar la reacción correspondiente a la familia TrpF. Del mismo modo existían clados que perdieron los genes de síntesis de triptófano en la vecindad de PriA y estas enzimas se subfuncionalizaron a la familia subHisA. De estos datos se observa que en estos organismos la especiación coincidió con el cambio de promiscuidad en la familia PriA, acorde a la pérdida y ganancia de genes vecinos. La promiscuidad puede co-ocurrir con variaciones en el contexto genómico, pudiendo estos cambios ser una marca para sugerir cambio funcional en una familia.

### **Genes de islas de patogenicidad de *Salmonella* en México están conservados en la mayoría de los genomas.**

Para estudiar la diversidad de *Salmonella* presente en alimentos en México, primero se ensamblaron y anotaron genomas secuenciados para el trabajo “distribución de los genes de la toxina VirB/D4 en plásmidos de bovino asociados a *Salmonella* no tifoidea”. Los genomas fueron ensamblados en Patrick y se desarrolló myRAST, una tubería previa a Orthocore para la anotación automática de genomas ensamblados en RAST. El protocolo de myRAST puede encontrarse al final de este capítulo.

Orthocore fue usado aquí para reconstruir filogenias de *Salmonella* y además fue integrado como parte de CORASON, el cual se reporta en el Capítulo 3, es el algoritmo que sirve para visualizar variantes de clusters organizados filogenéticamente. Los clusters de genes pueden ser biosintéticos, islas de patogenicidad, operones o cualquier región parcialmente sinténica de un genoma bacteriano centrada en un gen. En este caso se observó una alta conservación de toxinas tifoideas en islas de patogenicidad de *Salmonella*. Éstas fueron identificadas en 76% de las cepas analizadas y posteriormente visualizadas mediante CORASON.

### **Nostoc provenientes del metagenoma de cícadras se agrupan Cyanobacteria**

Las Cyanobacterias son un phylum de bacterias que se han adaptado a diversos ambientes. Aunque muchas de ellas son marinas algunas Cyanobacterias viven como simbioses de plantas. En particular las cícadras han desarrollado un tipo especial de raíz donde se sabe que vive como simbionte el género *Nostoc*. La presencia de *Nostoc* en la raíz coraloide de las cícadras es fácilmente distinguible por la formación de un anillo verde conocido como anillo cyanobacterial. En la Figure 5 se muestra la filogenia de 76 Cyanobacterias de 7 órdenes distintos construida con 198 proteínas del core conservado obtenidas por Orthocore. En esta reconstrucción se puede observar que los *Nostoc* asociados a plantas tienden a agruparse en la filogenia.

### **Identificación de genes marcadores de *Clavibacter michiganensis***

*Micrococcales* es un orden de Actinobacteria que contiene a *Clavibacter*, *Micrococcus* y *Microbacterium*, entre otros microorganismos. El género *Clavibacter* comprende especies que pueden causar enfermedades en diversas plantas. En particular la especie *Clavibacter michiganensis* es una bacteria causante de la enfermedad del cáncer del tomate. *Clavibacter michiganensis* ha sido frecuentemente aislada en compañía de otros *Micrococcales* morfológicamente parecidos. La distinción entre microorganismos debida a la comparación de

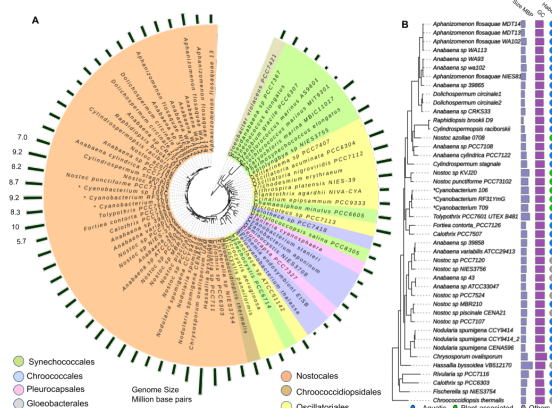


Figure 5: Reconstrucción de 76 taxa provenientes de 7 órdenes de Cyanobacteria. La matriz final incluyó 45,475 aminoácidos curados de 198 familias de proteínas pertenecientes al *core conservado*. A la derecha se muestra un zoom sobre el orden *Nostocales*. En este orden se incluyen algunas bacterias simbiotes de cicadas. Metadatos como el tamaño de genoma, contenido de GC y hábitat de origen muestran una posible tendencia de incremento de tamaño en los genomas provenientes del microbioma de plantas.

la secuencia de 16s no era suficiente para distinguir entre *Micrococcales* del microbioma del tomate, por lo que una prueba de diagnóstico se hacía necesaria. Se habían utilizado como marcadores genes como *tomA*, *ppaC* y *celA* entre otros, sin embargo estas elecciones en ocasiones resultaban en falsos positivos según árboles de especies de 16s, por lo que nuevos marcadores eran necesarios.

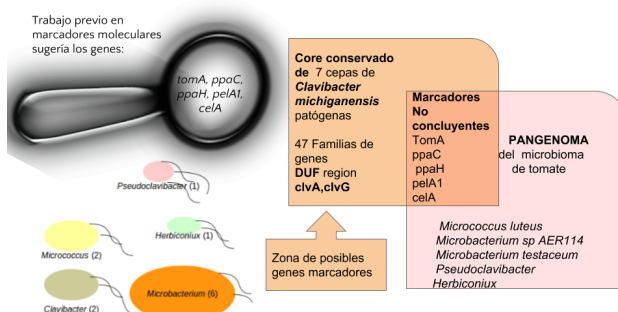


Figure 6: Los marcadores moleculares previos a este trabajo no permitían diferenciar correctamente a *Clavibacter michiganensis* respecto al microbioma del tomate en invernaderos mexicanos. Arriba a la izquierda se muestran los antiguos marcadores *tomA*, *ppaC*, *ppaH*, *pelA1*, *celA*. Abajo organismos pertenecientes al microbioma del tomate. Orthocore obtuvo el core conservado de siete cepas de *Cmm* patógenas, y este core se utilizó para definir nuevos marcadores. Aunque *tomA* pertenecía al core conservado de *Cmm*, estaba también incluido en el pangenoma del microbioma del tomate. Después de calcular la intersección core conservado de *Cmm* y pangenoma del microbioma se obtuvieron entre las familias marcadoras genes *clv* parte del cluster biosintético de clavidicina (michiganina).

Al analizar en RAST genomas de *Microbacterium* y *Micrococcus* aislados de tomate se encontró que en efecto, *tomA* y los otros marcadores propuestos previamente no eran exclusivos de *Clavibacter michiganensis* (*Cmm*). Al utilizar Orthocore en siete genomas de *Cmm* encontramos que varios genes del cluster biosintético de michiganina (BGC0000528 en MIBiG) codificado por los genes *clvAFGLKM* pertenecían al core conservado, pero que al agregar los genomas no *Cmm* del resto del microbioma del tomate los genes *clv* se pierden. El descubrimiento de que *clv* pertenecía al core de *Cmm* se realizó con secuencias de genomas muy fragmentados, en laFigure 6 se muestran las cepas originales que fueron analizadas.

Esta observación se corroboró con más genomas, Figure 7 en este caso se muestran como ejemplo 10 genomas de bacterias del microbioma del tomate, entre ellas siete *Clavibacter*, seis de tomates de invernadero y uno *Clavibacter* proveniente de tomate silvestre, *Clavibacter* RA1B que fue reportado en la tesis de maestría de



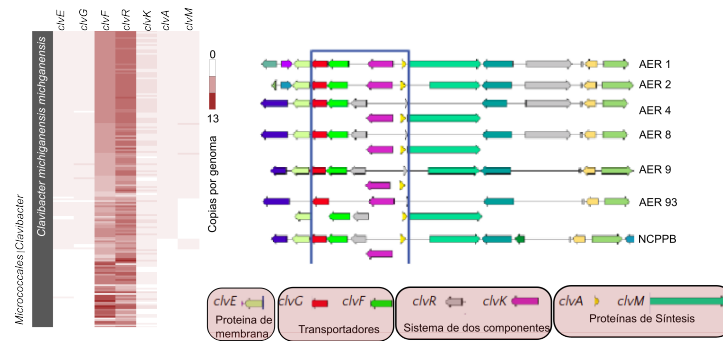


Figure 7: El Cluster *clv* es un marcador de la especie *Clavibacter Michiganensis* en el orden *Micrococcales*. Los genes *clvEGAM* que son una proteína de membrana, un transportador y dos proteínas de síntesis del BGC *clv* están muy conservados en la especie *Clavibacter Michiganensis*. *clvFRK*, es decir un transportador y el sistema de dos componentes están presentes en otros *Micrococcales* pero con baja identidad de secuencia y nunca en el contexto del BGC de clavidicina.

Yanez. Con Orthocore vemos que el tamaño del core decrece al ir agregando genomas de *Clavibacter* y decrece aún más rápido al agregar los genomas de *Micrococcus* y *Microbacterium*. La reconstrucción filogenética de este microbioma, ubica a *Clavibacter* RA1B cerca de los otros *Cmm* pero no en un clado junto con ellos. Una búsqueda por blast revela que los genes marcadores de *Cmm*: *clvF*, *clvR* son también marcadores de *Clavibacter* RA1B pero no así *clvA* y *clvG* que solamente están presentes en el core de *Cmm*. Sin embargo *clvF* y *clvR* no están en el contexto del cluster de michiganina en RA1B y su similitud de secuencia es menor que la que se observa entre los otros *Cmm*.

De hecho al considerar más genomas dentro del microbioma del tomate, la familia *clvF* no solo no está en el core conservado de *Microbacterium* y *Micrococcus*, sino que no está presente en ningún otro genoma distinto a *Clavibacter*. Con distintos niveles de conservación de secuencia los genes *clv* son un buen marcador para distinguir *Cmm* de otras especies, por esta razón estos genes aún se encuentran en uso como genes marcadores de *Cmm*. Esta misma conclusión se reporta en el trabajo de yasuhara, su observación de que las familias *clvA*, *clvF* y *clvG* son exclusivas de *Cmm* es independiente de la nuestra, fue hecha sin análisis genómicos y basada en evidencia experimental [yasuhara-bell\_genes\_2014]. Este descubrimiento ha permitido bajar los costos de identificación de *Clavibacter*, ya que ahora en lugar de enviar a secuenciar el genoma es suficiente identificar por PCR *clvF* en conjunto con otros marcadores.

Con Orthocore además de obtener los genes marcadores podemos obtener también la matriz del core conservado para realizar la reconstrucción filogenética de especies cercanas de *Clavibacter* Figure 8. Debido a que es importante para los agricultores conocer de dónde provienen las bacterias que infectan al tomate, una de las líneas de investigación del laboratorio de evolución de la diversidad metabólica, es la organización taxonómica de cepas de *Cmm* y de otras bacterias del microbioma de tomate. Por este motivo se han secuenciado y mantenido como datos privados unos doscientos genomas provenientes del microbioma del tomate. Orthocore colabora con esta investigación proporcionando matrices multilocus que pueden diferenciar entre cepas de *Clavibacter* de la misma o de diferente especie.

Debido al intercambio génico por transferencia horizontal en las bacterias, es posible que los genes marcadores actuales alguna vez aparezcan en otros organismos. También las bacterias pierden continuamente genes, por lo que es posible que algún gen marcador de *Cmm* se pierda en una cierta cepa. Esto hace que la definición de estar presentes en el core del grupo de interés y ausentes totalmente de cada uno de los genomas de otro linaje ya no funcione completamente. Sin embargo, en estas dos situaciones presentadas, ganancia de genes marcadores de organismos externos al linaje original o pérdida de genes marcadores en algunas cepas, se sigue cumpliendo que los ex genes marcadores, estarán presentes en la mayoría de los organismos del linaje de interés y ausentes de la mayoría de los organismos del linaje externo. Por ello, se pensó que esta definición de genes marcadores se podía generalizar clasificando a grupos de genes ortólogos acorde a sus porcentajes de ocurrencia. Esta idea se desarrolló en la herramienta clavisual, explicada en la siguiente sección.



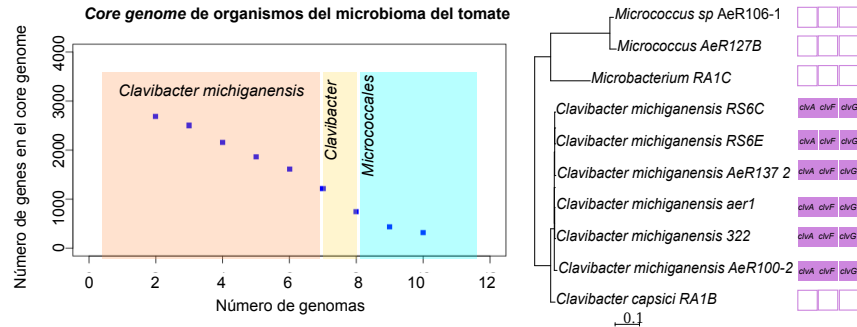


Figure 8: El *core genome* de *Micrococcales* ayuda a identificar genes marcadores. El *core genome* de siete organismos del microbioma del tomate muestra de

## Clavisual: Identificación de genes marcadores a un cierto porcentaje de grupos seleccionados

La idea de que Orthocore puede ser usado para obtener los genes marcadores de un grupo taxonómico frente a otro fue generalizada en el backend del software Clavisual. Ya se ha explicado previamente que el core puede salir vacío por diversas razones, entre ellas baja calidad de los genomas, o que éstos provengan de organismos muy divergentes, verdaderas razones biológicas como dinámica génica o un core no convergente. Así pues, es posible que si sólo se utiliza el core no se obtengan marcadores. Pero el core puede relajarse de varias maneras una de ellas es el Pseudocore, donde en lugar de multidireccional hits se toman BBH a un genoma de referencia. Otra forma es establecer un porcentaje de presencia /ausencia de interés.

El pseudocore consiste en utilizar información previa específica del core de un linaje para obtener los genes de y la metodología está depositada en github integrada en el repositorio clavigenomics. El blast fue optimizado cambiando hacer un blast todos contra todos por archivos genómicos individuales genomai\_vs\_genomaj.blast que luego son concatenados según se necesiten.

Los porcentajes de genomas son diferentes porque al no bastar los best bidireccional hits conservados, todo el pangenoma es decir todos los genes contenidos en los genomas del grupo de interés necesitan ser clasificados por familias, para de ahí obtener las familias que tienen presencia en un porcentaje %p y ausencia en un porcentaje a% del grupo externo. Estos perfiles fueron desarrollados para Clavisual Figure 9 utilizando FastOrtho para clasificar las familias y de ahí obtener los grupos. Con ellos se consiguieron marcadores para Kurtobacterium.

Finalmente Clavisual despliega un árbol realizado con el Pseudocore respecto a un conjunto de genes de Cmm NCPP previamente seleccionados. En este árbol clavisual permite la visualización de metadatos, como año, género de la bacteria, estado de salud de la planta e invernadero donde fue aislada.

## El pangenoma de Clavibacter Michiganensis es abierto

Después de desarrollar métodos de identificación de genes marcadores y generalizarlo a obtener grupos con patrones de presencia/ausencia definidos por el usuario, quedaba por responder la pregunta cómo es el pangenoma de *Cmm*. Algunos autores consideran que el pangenoma de patógenos es reducido porque sus genomas suelen sufrir proceso de reducción de tamaño debido a la pérdida de genes. Como *Cmm* es un patógeno de planta quedaba por investigar cómo es su pangenoma. ¿Es posible saturar el contenido génico de *Cmm* con sólo secuenciar más genomas?. Aunque actualmente existen ya herramientas web para el análisis de pangenoma, en su momento se utilizó el software bpga que se corre desde la terminal. Para facilitar su instalación se desarrolló un docker que se describe más tarde en este capítulo en la sección de las descripciones técnicas. Como ejemplo de su funcionamiento, se analizó el pangenoma de los mismos diez genomas del pangenoma del tomate utilizados en la visualización de clavisual Figure 10 .

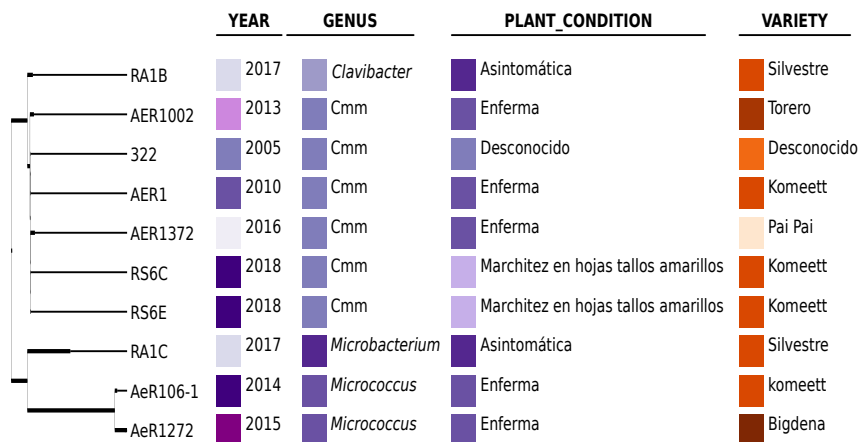


Figure 9: Clavisual organiza filogenéticamente cepas de *Clavibacter* y generaliza orthocore. Clavisual no se restringe a la búsqueda del core conservado, permite la identificación de familias conservadas sólo en un cierto porcentaje. Además puede filtrar estas familias permitiendo sólo las que estén ausentes en una proporción mínima de un grupo de genomas de interés. Además orthocore optimiza el funcionamiento de Clavisual ya que fue utilizado para proveer un conjunto de familias génicas conservadas en el género *Clavibacter*. Estas familias son buscadas cada vez que ingresa un genoma nuevo y con ellas se contruye un árbol filogenético. Los metadatos disponibles son desplegados al lado de la cepa correspondiente del árbol.

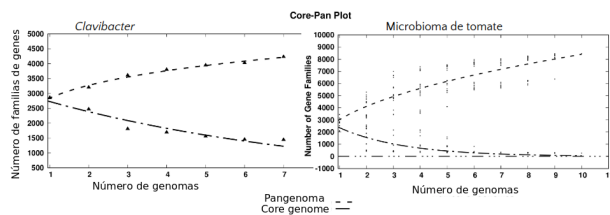


Figure 10: El pangenoma de *Clavibacter* es abierto según el análisis de BPGA. En este ejemplo el pangenoma de *Clavibacter* se mantiene creciente mientras que el core no alcanza el cero. En contraste, al ampliar el rango taxonómico el *core genome* sí se acerca a cero según BPGA

Tomando otros siete genomas del género *Clavibacter*, utilizando OrthoVenn tenemos la misma observación, el número de familias de genes agregadas al adicionar genomas, es después de siete genomas casi tan grande como su core Figure 11.



Figure 11: Diagrama de Venn del pangenoma de genomas selectos del género *Clavibacter*. Venn-Chart permite visualizar la distribución de las familias génicas mediante un diagrama de Venn siempre que sean pocos genomas. En la parte superior izquierda se muestra el número de familias compartidas entre distintos grupos de genomas. Por ejemplo existen 1678 familias génicas compartidas entre los seis genomas. Entre los grupos de cinco genomas, el más abundante es el que no contiene a RA1B con 243 familias, así pues RA1B es de los genomas más divergentes de este grupo.

## Relación entre genes marcadores, Orthocore y la promiscuidad enzimática.

Finalmente, al aplicar Orthocore para detectar genes marcadores se vuelve indirectamente reclutamientos al metabolismo especializado, cómo, pues porque dentro de los marcadores hay productos naturales como, PENDIENTE VER RESULTADOS RETRO-EVOMINING la clavidicina (michiganina). Ahí vemos que clvABCDEF participan en metabolismo secundario, las enzimas de metabolismo central de este cluster pueden presentar cierta promiscuidad.