

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE COSTA RICA

ESCUELA DE BIOLOGÍA

EXPLORACIÓN TAXONÓMICA Y DE FACTORES DE VIRULENCIA EN UNA CEPA DE *PHOTORHABDUS* SP
AISLADA EN COSTA RICA.

Informe presentado a la Escuela de Biología del
Instituto Tecnológico de Costa Rica como requisito parcial
para optar al título de Licenciado en Ingeniería en Biotecnología

Camilo Monge Cascante

Cartago, Agosto, 2017

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE COSTA RICA

ESCUELA DE BIOLOGÍA

EXPLORACIÓN TAXONÓMICA Y DE FACTORES DE VIRULENCIA EN UNA CEPA DE *PHOTORHADBUS* SP
AISLADA EN COSTA RICA.

Informe presentado a la Escuela de Biología del
Instituto Tecnológico de Costa Rica como requisito parcial
para optar al título de Licenciado en Ingeniería en Biotecnología

Camilo Monge Cascante

Cartago, Agosto, 2017

TEC | Tecnológico
de Costa Rica



Resumen

El género bacteriano entomopatógeno *Photorhabdus* ha captado interés como agente biocontrolador y productor de sustancias antimicrobianas pues posee una gran cantidad de factores de virulencia. Recientemente se aisló en Costa Rica la cepa *Photorhabdus sp.* CRCIA-P01, cuya descripción sugiere que es una nueva especie. El presente proyecto pretende explorar la posición taxonómica de esta cepa e inferir su potencial patogénico mediante genómica comparativa e identificación de elementos del genoma accesorio relacionados con virulencia. Se utilizaron la secuencia *draft* de la cepa CRCIA-P01, obtenida y secuenciada con tecnología Illumina, y las secuencias de genoma completo de las cepas de referencia *P. luminescens* TT01, *P. asymbiotica* ATCC43949 y *P. temperata thracensis* DSM1519. Se generaron alineamientos y dendrogramas para las secuencias de los genes *recA*, *dnaN*, *gyrB* y *gltX*, y de las mismas concatenadas. Se calcularon las distancias genoma-genoma utilizando GGDC; se determinaron el genoma *core* y elementos del genoma accesorio usando SPINE y AGEnt. Los elementos del genoma accesorio fueron curados manualmente, se les asignó función predicha, y se caracterizaron aquellos relacionados con virulencia, resistencia o síntesis de antibióticos. Dendrogramas generados a partir de los alineamientos de los genes *recA*, *dnaN*, *gltX* y las secuencias concatenadas ubicaron a la cepa *P. sp.* CRCIA-P01 en el mismo subclado que *P. luminescens* TT01, mientras que el análisis de la secuencia de *gyrB* ubicó a la cepa *P. sp.* CRCIA-P01 en el mismo subclado que *P. temperata thracensis* DSM1519. El cálculo de la distancia genoma-genoma sugiere que la cepa *P. sp.* CRCIA-P01 no pertenece a las mismas especies que las cepas de referencia. El genoma *core* más amplio se determinó al comparar la cepa CRCIA-P01 con *P. luminescens* TT01. Se identificaron 21 AGEs relacionados con virulencia no compartidos con ninguna de las cepas de referencia, de los cuales 8 se relacionan específicamente con resistencia. Se identificaron además múltiples elementos relacionados con sistemas toxina/antitoxina, motilidad, resistencia a antibióticos, etc., diferencialmente compartidos entre las cepas involucradas. Estos resultados sugieren que la cepa *Photorhabdus sp.* CRCIA-P01 es una nueva especie del género *Photorhabdus* cercana a *P. luminescens*, con alto potencial patogénico en eucariotas y AGEs relacionados con virulencia que no se comparten con las cepas de referencia utilizadas.

Palabras clave: *Photorhabdus*, factores de virulencia, genómica comparativa, taxonomía.

Abstract

The entomopathogenic bacterial genus *Photorhabdus* has captured interest as a biocontrol agent and producer of antimicrobial substances since it possesses a large number of virulence factors. Recently, strain *P. sp. CRCIA-P01* was isolated in Costa Rica, whose description suggests it is a new species. This project aims to explore the taxonomic position of this strain and to infer its pathogenic potential through comparative genomics and identification of accessory genome elements related to virulence. The draft sequence of strain CRCIA-P01, obtained and sequenced using Illumina technology, and the complete genome sequences of reference strains *P. luminescens* TT01, *P. asymbiotica* ATCC43949 and *P. temperata thracensis* DSM1519 were used. Phylogenetic trees from the alignment of the sequences of *recA*, *dnaN*, *gyrB* and *gltX* genes, as well as their concatenated sequences, were generated. Genome-genome distances were calculated using GGDC. Core and accessory genome elements were identified using SPINE and AGenT. Accessory genome elements were manually curated, putative function assigned to them, and those related with virulence, resistance or antibiotic synthesis were characterized. Dendograms generated from the alignment of *recA*, *dnaN*, *gltX* genes and the concatenated sequences located strain *P. sp. CRCIA-P01* in the same subclade as *P. luminescens* TT01, whereas the analysis of the *gyrB* sequence located strain *P. sp. CRCIA-P01* in the same subclade as *P. temperata thracensis* DSM1519. The genome-genome distance calculation results suggest that strain *P. sp. CRCIA-P01* does not belong to the same species as the reference strains. The broader core genome was determined by comparing the strains CRCIA-P01 and *P. luminescens* TT01. Twenty-one virulence-related AGEs not shared with any of the reference strains were identified, of which 8 are specifically related to resistance. Multiple AGEs related to toxin/antitoxin systems, motility, resistance to antibiotics, etc., were found to be differentially shared among the strains involved. These results suggest that strain *Photorhabdus* CRCIA-P01 is a new species of the genus *Photorhabdus* close to *P. luminescens* TT01, with high pathogenic potential in eukaryotes and virulence-related AGEs that are not shared with the reference strains used.

Keywords: *Photorhabdus*, virulence factors, comparative genomics, taxonomy.

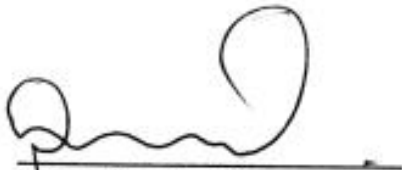
"EXPLORACIÓN TAXONÓMICA Y DE FACTORES DE VIRULENCIA EN UNA CEPA DE *PHOTORHABDUS SP.*
AISLADA EN COSTA RICA."

Informe presentado a la Escuela de Biología del
Instituto Tecnológico de Costa Rica como requisito parcial
para optar al título de Licenciado en Ingeniería en Biotecnología

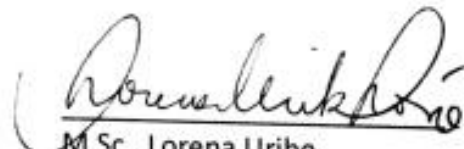
Miembros del Tribunal



MSc/ MBA. Raúl Trejos Espinosa
Profesor asesor ITCR



Ph.D. César Rodríguez
Asesor CIET



M.Sc. Lorena Uribe
Lectora

Dedicatoria

A mi esposa María Elena y a nuestro gato J'Zargo, mis mayores fuentes de confianza e inspiración.

Camilo

Agradecimientos

A los profesores asesores, cuyos consejos, paciencia y dedicación permitieron que este trabajo fuera uno que me llena de satisfacción. A M.Sc. Lorena Uribe, por su valioso tiempo y comentarios. A Ph. D. . Lidieth Uribe Lorio y M.Sc. Daniela Vidaurre Barahona, por su trabajo en el aislamiento y descripción del nemátodo hospedero y la bacteria. Y a todas las personas que mantienen en línea y trabajan constantemente para mejorar todas las herramientas informáticas de libre acceso que hacen posible este tipo de investigaciones científicas.

Índice General:

Resumen	3
Abstract	4
Dedicatoria	6
Agradecimientos	7
Índice de Cuadros	10
Índice de figuras	11
Introducción	12
Revisión de literatura:	14
<i>Photorhabdus</i> : Generalidades	14
Ciclo de Vida:	15
Genómica comparativa:	17
Hibridación ADN-ADN y distancia genoma a genoma.	18
Pangenoma, genoma core y genoma accesorio.	18
Genómica comparativa de <i>Photorhabdus</i>	19
Toxinas de <i>Photorhabdus</i>	20
Objetivo general	24
Objetivos específicos	24
Materiales y métodos	24
Cepas bacterianas y ADN genómico.	24
Análisis filogenético y de secuencias.	25
Obtención de comparaciones genómicas	25
Determinación de genoma core, elementos del genoma accesorio (AGEs) y reconocimiento de factores de virulencia asociados a AGEs	25

Identificación de islas genómicas por IslandViewer3.....	26
Resultados.....	26
Análisis filogenético y de secuencias.....	26
Determinación de genoma core, elementos del genoma accesorio (AGEs) y predicción funcional de loci asociados a AGEs.....	29
Discusión.....	41
Posicionamiento filogenético de la cepa CRCIA-P01.....	41
Elementos del genoma accesorio (AGEs) y reconocimiento de factores de virulencia asociados a AGEs.....	43
Interpretación de presencia de AGEs relacionados con virulencia con respecto a las diferentes especies de referencia. Posible nicho ecológico.....	55
Limitaciones técnicas.....	60
Conclusiones y recomendaciones.....	62
Conclusiones.....	62
Recomendaciones.....	62
Literatura citada.....	63

Índice de Cuadros

Cuadro I. Probabilidades de que la hibridación ADN-ADN in silico entre el genoma draft de la cepa <i>P. sp.</i> CRCIA-P01 y tres genomas de referencia de especies del mismo género sea mayor al 70% calculadas utilizando la aplicación GGDC.	28
Cuadro II. Comparación de los genomas core y accesorio y pangenoma de la cepa <i>P. sp.</i> CRCIA-P01 y tres cepas de referencia del género <i>Photorhabdus</i>	29
Cuadro III. Cantidad de secuencias codificantes (CDS) identificadas en el genoma accesorio de la cepa <i>P. sp.</i> CRCIA-P01 con respecto a cada especie de referencia después de realizar una curación manual.	30
Cuadro IV. Abundancia de AGEs y AGEs únicos cuya función parece estar relacionada con resistencia, síntesis de antibióticos y virulencia identificados en el genoma draft de la cepa <i>P. sp.</i> CRCIA-P01	30
Cuadro V. Detalle de los AGEs relacionados con virulencia identificados en la cepa <i>P. sp.</i> CRCIA-P01.	31
Cuadro VI. Detalle de los AGEs relacionados con resistencia identificados en la cepa <i>P. sp.</i> CRCIA-P01.	35
Cuadro VII. Detalle de los AGEs relacionados con síntesis de antibióticos en la cepa <i>P. sp.</i> CRCIA-P01.	37
Cuadro VIII. Detalle de los AGEs relacionados con función mixta en la cepa <i>P. sp.</i> CRCIA-P01. .	38

Índice de figuras

Figura 1. Árbol filogenético de máxima verosimilitud del género <i>Photorhabdus</i> y sus vecinos filogenéticos más cercanos, generado a partir del análisis de las secuencias concatenadas de los genes <i>recA</i> , <i>gyrB</i> , <i>dnaN</i> , <i>gltX</i> y <i>infB</i> . Fuente: Ferreira et al, 2014.	15
Figura 2. Ciclo de vida de <i>P. luminescens</i> . Adaptado de: Hinchliffem, Hares, Dowling, Ffrench-Constant, 2010,.....	16
Figura 3. Diagrama comparativo de las estructuras y dominios de las toxinas Mcf. Fuente: ffrench-Constant y Dowling, 2014.	22
Figura 4. Relación filogenética de la cepa <i>Photorhabdus sp.</i> CRCIA-P01 y las cepas de referencia <i>P. luminescens</i> TT01, <i>P. asymbiotica</i> ATCC43949 y <i>P. temperata thracensis</i> DSM1519 derivada del análisis de distancia de las secuencias codificantes de los genes <i>gltX (A)</i> , <i>dnaN (B)</i> , <i>gyrB (C)</i> y <i>recA (D)</i>	27
Figura 5. Relación filogenética de la cepa <i>Photorhabdus sp.</i> CRCIA-P01 y las cepas de referencia <i>P. luminescens</i> TT01, <i>P. asymbiotica</i> ATCC43949 y <i>P. temperata thracensis</i> DSM1519 derivada del análisis de distancia de las secuencias codificantes concatenadas de los genes <i>gltX</i> , <i>dnaN</i> , <i>gyrB</i> y <i>recA</i>	28

Introducción

Las plagas de plantas, incluidos insectos y nematodos, son causantes de grandes pérdidas económicas y continúan siendo una amenaza para la producción mundial de alimentos (Strange y Scott, 2005). El uso extensivo de pesticidas químicos para alcanzar los niveles de productividad y producción que demanda la agricultura moderna ha generado efectos negativos y la destrucción del ambiente (Kushwah y Somvashi, 2015). Esto, sumado al incremento en la conciencia ambiental, ha aumentado la demanda de biopesticidas a nivel mundial (Jallouli, Jaoua y Zouari, 2012), los cuáles ofrecen soluciones ante la resistencia a los insecticidas químicos y los problemas a nivel de salud pública que estos poseen (Kwak y Shin, 2015).

Aunque la luz central de este escenario ha sido típicamente ocupada por *Bacillus thuringiensis*, nuevas especies bacterianas han recibido considerable interés en los últimos años por su potencial de ser usados como controladores biológicos (Kumpferschmied, Maurhofer, Keel, 2013). El género *Photorhabdus* es una de las especies que ha captado el interés de varios equipos de investigación (Clarke, 2016). Este género agrupa bacterias bioluminiscentes Gram-negativas que viven en asociación mutualista con nematodos entomoparásitos. Durante su complejo ciclo de vida, *Photorhabdus* mantiene una infección monoxénica en su huésped, provoca la muerte del insecto atacado por el nemátodo, y evade su sistema inmune. Tal ciclo de vida sugiere que este género de bacterias produce una gran cantidad de factores de virulencia y de sustancias antimicrobianas (Orozco, Molnár, Bode, Stock, 2016).

En congruencia con esta predicción, estudios de secuenciación de genoma completo y de genómica comparativa han demostrado la presencia de una gran diversidad de toxinas, sistemas de secreción y genes para producción de moléculas pequeñas antibacteriales organizadas en islas de patogenicidad en los miembros de las tres especies reconocidas de *Photorhabdus*; a saber *P. luminescens*, *P. temperata* y *P. asymbiotica*, las cuales muestran alta toxicidad contra una gran variedad de larvas de insectos (Clarke, 2008; Rodou et al, 2010).

Este conocimiento también ha derivado en la clasificación de este género en tres especies distintas y múltiples subespecies con diferencias de secuencia importantes (Tobias et al, 2016). De hecho, en los últimos años se han reclasificado varias cepas pertenecientes a este género, cada una de ellas con interesantes variantes genéticas y loci de toxinas predichas previamente desconocidas, o no antes observadas en *Photorhabdus* (Tailliez et al., 2010). Particularmente se ha descrito que *P. temperata* y *P. luminescens* comparten una importante cantidad de genes relacionados con patogénesis en insectos tales como complejos de toxinas (TCs, por sus siglas en inglés) y sistemas de secreción tipo III y VI (Hurst et al., 2015). Así mismo se ha encontrado que *P. asymbiotica* posee una menor diversidad de toxinas insecticidas y de loci de síntesis de antibióticos, sin embargo, esta es la única cepa en la que se han identificado plásmidos, los cuales probablemente se relacionan con el hecho que esta es también la única que ha sido aislada en humanos o mamíferos en general (Wilkinson et al, 2009).

Recientemente se aislaron en nuestro país el nemátodo entomopatógeno *Heterorhabditis atacamensis* cepa CIA-NE07 y la bacteria *Photorhabdus* sp. CRCIA-P01, la descripción de los cuales sugiere que son en realidad especies nuevas (Vidaurre-Barahona, Uribe, Uribe-Lorío y Flores-Chaves, 2016). Este proyecto pretende, mediante genómica comparativa, explorar la posición taxonómica e inferir el potencial patogénico de esta cepa. Para determinar la clasificación de la cepa CRCIA-P01 se utilizó el método descrito por Gevers y colaboradores (2005), el cual se basa en concatenación de las secuencias de múltiples genes conservados. En este caso, se consideraron las secuencias de los genes *recA*, *gyrB*, *dnaN* y *gltX*, según criterios explicados en la metodología. Como criterio taxonómico adicional se determinaron las probabilidades de que la hibridación genoma-genoma fuera mayor al 70% entre la cepa CRCIA-P01 y las de referencia (Tindall, Rosselló-Móra, Busse, Ludwig y Kämpfer, 2010). Para explorar el potencial de virulencia de la cepa CRCIA-P01 se determinó su genoma core y accesorio con respecto al de *P. luminescens* subsp. *laumondii* cepa TTO1, *P. temperata* subsp. *thracensis* cepa DSM 15199 y *P. asymbiotica* cepa ATCC43949, utilizando métodos *in silico*. A las secuencias codificantes de los elementos accesorios encontrados se les asignó una probable función y se resaltaron aquellas relacionadas con virulencia. Con toda esta información se interpretó el posible rol ecológico de la cepa CRCIA-

P01 con el fin de usarla, en un mediano plazo, en control biológico clásico o mediante el clonaje de sus genes en plantas transgénicas.

Revisión de literatura:

Photorhabdus: Generalidades

Photorhabdus es un género de bacterias Gram-negativas miembro de la familia Enterobacteriaceae. Sus vecinos filogenéticos más cercanos son el género hermano *Xenorhabdus* y el género *Proteus* (Tailliez et al., 2010).

Photorhabdus y *Xenorhabdus* tienen un ciclo de vida muy similar; ya que ambos forman asociaciones simbióticas con nematodos entomopatógenicos de los géneros *Heterorhabditis* y *Steinernema*, respectivamente. Este hecho, sumado a que sus secuencias del gen que codifica para el ARNr 16S no logra discriminar las especies de ambos géneros, sugiere que podrían tener un ancestro común que colonizaba el mismo tipo de huésped (Tailliez et al., 2010; French-Constant & Dowling, 2014).

El género *Photorhabdus* comprende al menos tres especies: *P. luminescens*, *P. temperata*, y *P. asymbiotica* (Figura 1). Algunos autores reportan otra especie, *P. heterorhabditis* (Figura 1), sin embargo, esto está aún sujeto a discusión. Todas estas especies son simbiositos de nematodos que, hasta el momento, no han sido aislados en vida libre por métodos convencionales (Orozco et al, 2016), aunque *P. asymbiotica* también puede causar infecciones en humanos (Gerrard, Waterfield, Vohra y French-Constant, 2004).

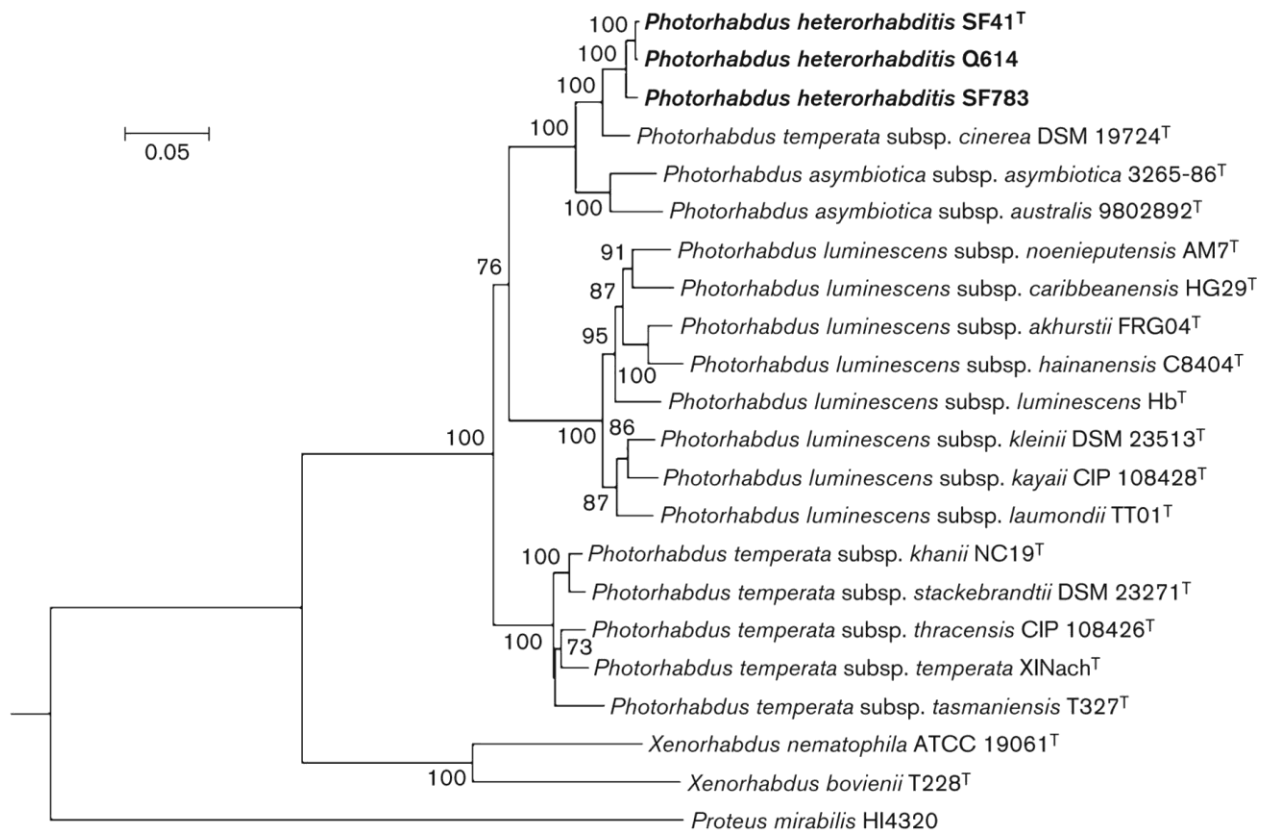


Figura 1. Árbol filogenético de máxima verosimilitud del género *Photorhabdus* y sus vecinos filogenéticos más cercanos, generado a partir del análisis de las secuencias concatenadas de los genes *recA*, *gyrB*, *dnaN*, *gltX* y *infB*. La barra representa % de divergencia en secuencia nucleotídica. Fuente: Ferreira et al, 2014.

Ciclo de Vida:

Las bacterias del género *Photorhabdus* poseen un ciclo de vida complejo, que alterna entre formas distintivamente patogénicas (P) y mutualistas (M) en insectos y nematodos huéspedes, respectivamente (Clarke, 2014). Inicialmente, la bacteria se encuentra en el lumen del tubo digestivo de los juveniles infectivos (JI) de los nematodos *Heterorhabditis*, la cual es la única forma de vida libre del nemátodo que sobrevive fuera de los insectos huésped en condiciones naturales (Hazir et al., 2016). Esta forma busca activamente larvas de insectos, ingresa en ellos a través de aperturas naturales o a través de la cutícula, y regurgita *Photorhabdus* al hemocoelo de su presa. Una vez dentro del insecto, *Photorhabdus* evade o resiste el sistema inmune, crece de forma exponencial y adquiere un fenotipo patogénico, produciendo factores de virulencia que provocan inmunosupresión, septicemia y la muerte del huésped, usualmente en 48 horas

(Eleftherianos, Joyce, Ffrench-Constant, Clarke y Reynolds, 2010). Esta bacteria también produce proteínas de inclusión cristalinas, denominadas CipA y CipB, que contienen aminoácidos esenciales requeridos para la reproducción del nematodo, y agentes antimicrobianos que protegen al cadáver de competidores (Blackburn, Crawford, Shapiro-Ilan, Adams, 2016). Los nemátodos se alimentan del cadáver y luego de dos o tres rondas de reproducción, una señal ambiental no caracterizada estimula el desarrollo de una nueva generación de JIs. *Photorhabdus* ingresa al nemátodo progenitor cuando este se alimenta del cadáver del insecto, adhiriéndose a la parte posterior del intestino. Seguidamente crece en el lumen intestinal e invade las células de las glándulas rectales, provocando lisis y pasando a la cavidad corporal materna, donde los JI se infectan con *Photorhabdus* en su lumen intestinal. En algunos casos esto es mediado por la retención de cierta cantidad de huevos por parte de los hermafroditas adultos, los cuales eclosionan dentro del útero provocando matricidio (endotoquia matricida) (Ciche, Kim, Kaufmann-Daszczuk, Nguyen y Hall, 2008; Waterfield, Ciche y Clarke, 2009). Una versión gráfica de este ciclo se presenta en la Figura 2.

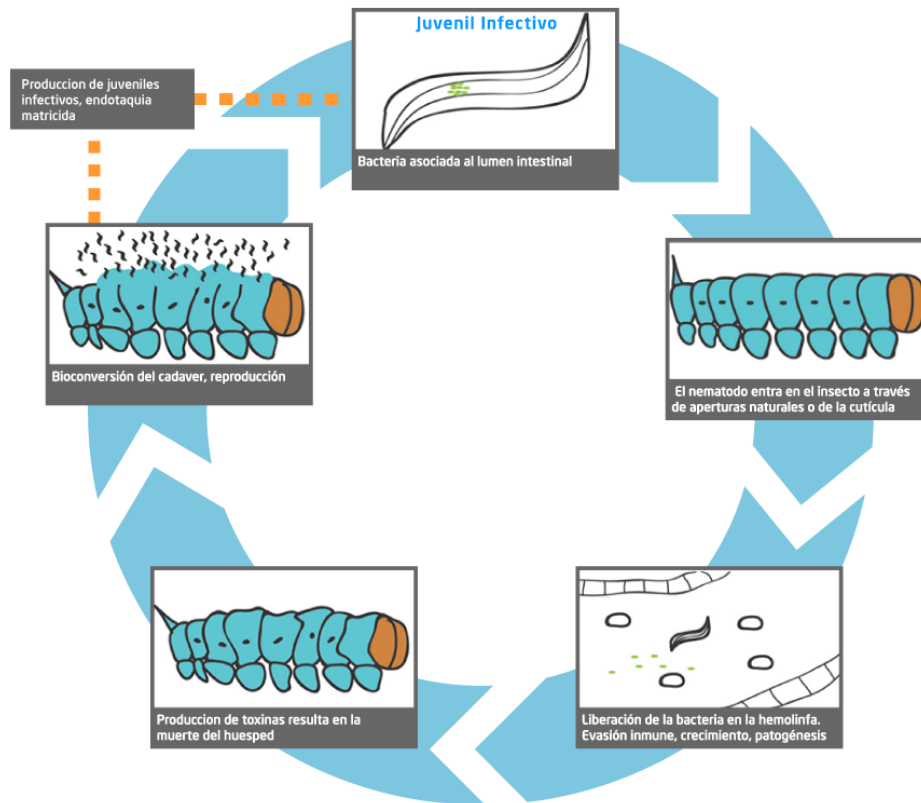


Figura 2. Ciclo de vida de *P. luminescens*. Adaptado de: Hinchliffem, Hares, Dowling, Ffrench-Constant, 2010,

La forma mutualista de *P. luminescens* (M) es más pequeña, no sintetiza CipA y CipB y produce la proteína de adhesión materna fimbrial (Mad), que le permite adherirse a la sección posterior del intestino materno. Se ha observado también que el cambio de la forma P a M correlaciona con la inversión del promotor *madswitch* de la orientación *OFF* a *ON* y, consecuentemente, la expresión del locus Mad que permite la colonización del intestino de los JI (Somvanshi et al, 2012).

Genómica comparativa:

La secuenciación por métodos de nueva generación ha permitido obtener secuencias de genomas completos en poco tiempo y a bajo costo. Es posible utilizar la homología de secuencias que resulta de alineamientos con el genoma curado de otros organismos -relacionados o no- para asignarle una función o identidad a secuencias de ADN o proteínas ya caracterizadas. Este proceso se conoce como anotación del genoma y puede realizarse con aplicaciones como Prokka (<http://www.vicbioinformatics.com/software/prokka.shtml>) o RAST (<http://www.nmpdr.org/FIG/wiki/view.cgi/FIG/RapidAnnotationServer>). La calidad de la anotación del nuevo genoma depende en alto grado de la calidad de la base de datos utilizada y de la distancia filogenética entre los organismos de referencia y el que se encuentra en estudio. Aun así, los sistemas informáticos suelen cometer errores, por lo que suele ser necesario curar manualmente el genoma anotado (Edwards y Holt, 2013).

Una de las aplicaciones de la genómica comparativa es describir similitudes y diferencias de distintas especies, subespecies o cepas y de esta forma deducir información sobre sus estrategias ecológicas. Esta comparación normalmente se realiza mediante el alineamiento de secuencias de genes, proteínas o genomas completos que permiten identificar duplicaciones o pérdida de genes, rearrreglos genómicos como inversiones o translocaciones, análisis de sintenia y proteínas con diferentes funciones. Todos estos factores ayudan a elucidar la evolución de los genes y el genoma entre las diferentes cepas comparadas (Ali et al., 2013). La visualización de la comparación permite observar de forma gráfica los genes compartidos y exclusivos de cada una de las cepas comparadas, curar manualmente la comparación, e identificar genes específicos con función de interés. Una aplicación para tal fin es la *Artemis Comparison Tool*, que marca en los genomas que se comparan las regiones de homología en diferentes colores según su orientación y grado de homología (Carver et al., 2005).

Hibridación ADN-ADN y distancia genoma a genoma.

Hoy en día las particularidades genómicas de los microorganismos pueden ser utilizadas para definir su posición taxonómica a nivel de especie o subespecie. Dado que las bacterias poseen múltiples particularidades metabólicas y morfológicas, cuya determinación experimental es compleja, las hibridaciones ADN-ADN (DDH, por sus siglas en inglés) se han convertido en una herramienta primordial para realizar esta tarea (Tindall *et al.*, 2010). Lamentablemente, esta técnica tiene varias limitaciones: (i) es laboriosa y se realiza en pocos laboratorios especializados; (ii) distintos métodos generan resultados diferentes; (iii) el procedimiento no genera información adicional que justifique los costos (Auch, von Jan, Klenk, Göker, 2010).

Desde cerca de 1970 han desarrollado métodos bioinformáticos para determinar los valores de DDH, basado en los principios que rigen la reasociación del ADN. Estos métodos funcionan realizando tres pasos: (i) determinando grupos de pares de segmentos con alto puntaje (HSP, por sus siglas en inglés) y/o correspondencias máximamente únicas (MUM, por sus siglas en inglés), (ii) calculando la distancia entre los grupos y (iii) convirtiendo estas distancias a porcentajes equivalentes a los resultados experimentales de DDH (Auch, Klenk, Göker, 2010). El calculador de distancia genoma-genoma es una aplicación en línea basada en estos principios que permite obtener información respecto a la clasificación taxonómica de un microorganismo por métodos *in silico* (Auch *et al.*, 2010) Se ha definido un valor umbral de >70% de DDH para asignar dos cepas a la misma especie, sin embargo, este valor no debe ser utilizado como un límite estricto, ya también deben utilizarse criterios fenotípicos para la delimitación taxonómica; por esta razón individuos de una misma especie pueden mostrar varias variantes genómicas (Tindall *et al.*, 2010).

Pangenoma, genoma core y genoma accesorio.

Las nuevas tecnologías de secuenciación también han permitido la obtención de múltiples genomas de aislamientos de una misma especie bacteriana. A este conjunto de datos, que representa todo el repertorio genético de un grupo de estudio y representa todos los estilos de vida que llevan los organismos que incluye, se le llama pangenoma o supragenoma (Medini *et al.*, 2005, Vernikos, Medini, Riley y Tettelin, 2014).

El pangenoma incluye al genoma *core* y accesorio. El primero corresponde a todos los genes presentes en todos los genomas estudiados de una especie particular (Rouli, Merhej, Fournier y Raoult, 2015) y el

accesorio contiene los genes que únicamente se presentan en algunas cepas de la especie, por lo que suelen representar adaptaciones específicas de nicho tales como factores de virulencia, genes de resistencia a drogas o de respuesta a estrés (Ali et al., 2013). El genoma *core* incluye genes relacionados con funciones básicas del organismo, tales como crecimiento y reproducción (Rouli et al., 2015). Por el contrario, los elementos de genoma accesorio (AGEs del inglés Accesory Genome Elements) suelen encontrarse intercalados con elementos *core* formando islas o islotes, como, por ejemplo, islas de patogenicidad (Ozer, Allen y Houser, 2014)

Existen diversas aplicaciones para delimitar el genoma *core* e identificar AGEs. El presente proyecto utilizará las denominadas Spine y AGEnt (Ozer et al, 2014). Brevemente, SPINE identifica el genoma *core* realizando alineamientos de genoma completo de varias cepas de referencia. El alineamiento resultante se convierte entonces en coordenadas genómicas de alineamiento. Seguidamente Spine retorna la secuencia de ADN y las coordinadas genómicas de las regiones presentes en los genomas de referencia. AGEnt, por su parte, utiliza la secuencia y coordenadas de salida de Spine para hacer un alineamiento NUCmer con el genoma de interés. Este alineamiento se usa como entrada para un *script* de NUCmer que identifica las regiones que no se alinean con el *core*, y produce una tabla de coordenadas con las regiones no *core* en el genoma de interés, y la secuencia de nucleótidos de cada una de estas regiones.

Genómica comparativa de *Photorhabdus*.

En los últimos 20 años se han depositado al menos 5 genomas de *Photorhabdus* con calidad *draft* en el NCBI (*National Center for Biotechnology Information* de estados unidos) para las distintas especies y subespecies de esta bacteria.

Usando genómica comparativa se ha encontrado que en su genoma de cerca de 5 Mb *Photorhabdus* posee una inmensa cantidad de genes que codifican para toxinas comprobadas o predichas, y se han identificado varias toxinas nuevas (ffrench-Constant & Dowling, 2014). Así mismo, el estudio del genoma de *P. asymbiotica*, ha ayudado a entender por qué el nematodo vector infecta al ser humano en ciertas ocasiones, y cómo la bacteria logra evadir el sistema inmune de este hospedero accidental (Wilkinson et al, 2009).

Como se mencionó anteriormente, el análisis filogenético utilizando la secuencia del gen que codifica para el ARNr16S no permite separar correctamente las especies y subespecies de *Photorhabdus*, probablemente debido a que estas secuencias no reflejan la radiación que resulta de su asociación con nematodos entomopatógenicos. Por esta razón, muchos autores líderes en el campo, como Tailliez y colaboradores (2010), han adoptado la metodología propuesta por Gevers y su equipo (2005), que compara la secuencia concatenada de varios genes no ligados conservados. Este acercamiento permite obtener árboles filogenéticos más robustos, incrementando la cantidad de caracteres filogenéticamente informativos (Tailliez et al., 2010).

También es importante mencionar que existe evidencia de que las bacterias de este género han adquirido una importante cantidad de factores de virulencia por transferencia lateral, probablemente a partir de bacterias entomopatógenas. Se ha encontrado una gran cantidad de elementos genéticos móviles, incluyendo transposones, secuencias enterobacteriales intergénicas repetitivas consenso (ERIC), o remanentes de los mismos, que refuerzan la idea de que el pangenoma de este género es abierto (Duchaud et al, 2003).

Toxinas de *Photorhabdus*

Las bacterias del género *Photorhabdus* producen al menos cuatro grupos de toxinas: los complejos de toxina (Tcs), toxinas binarias relacionadas con insectos (PirAB), toxinas “*makes caterpillars floppy*” (Mcf) y los cassetes de virulencia de *Photorhabdus* (PVC) (Rodou et al, 2010; French-Constant y Dowling, 2014). A continuación se describen cada uno de estos grupos en detalle:

Tcs:

Estos complejos de toxinas fueron identificados inicialmente en *P. luminescens*, y hoy existen 16 proteínas Tc anotadas en esta especie, entre 8 y 11 en *P. temperata* y 8 en *P. asymbiotica* (Tobias et al, 2016). Este tipo de toxina está conformada por grandes complejos proteicos de cuatro subunidades, y posee actividad oral sobre *Manduca sexta*. Inicialmente se aislaron cuatro complejos que fueron denominados TcA, TcB, TcC y TcD, y se asignaron a cuatro loci, convenientemente denominados *tca*, *tcb*, *tcc* y *tcd* (Bowen et al, 1998). Esta nomenclatura está en desuso pues se ha descubierto que cada locus tiene dos o tres marcos abiertos de lectura, y además que no se había delimitado un límite claro en la cantidad de loci *tc* en un genoma. Actualmente se conoce que para que el complejo sea activo debe existir una mezcla de subunidades A, B y C, y que B y C deben sintetizarse juntas en el citoplasma de la bacteria, por lo que aún en diferentes bacterias los diferentes loci se pueden identificar según codifiquen subunidades A, B o C (ffrench-Constant y Dowling, 2014)

Desde su descubrimiento en *Photobacterium*, se han encontrado genes de complejos similares en otras bacterias patógenas de insectos, como *Serratia entomophila*, *Yersinia entomophaga* y *Xenorhabdus nematophila*. Así mismo, se han encontrado similitud entre loci de esta toxina y el que codifica para las toxinas A y B de *Clostridium difficile*, lo cual sugiere que podrían tener un mecanismo de acción similar (Rodou et al, 2010).

Mcf:

Se conocen 2 toxinas Mcf, denominadas Mcf-1 y Mcf-2. Las toxinas Mcf están codificadas por genes que llevan el mismo nombre y que codifican por proteínas con 2929 residuos de aminoácidos, distribuidos en tres dominios (ver Figura 2). El dominio N-terminal, que es homólogo a un dominio Bcl2 tipo 3 (*BH3-like*), parece ser el encargado de producir apoptosis (Dowling et al, 2004). El segundo dominio es similar a la toxina B de *C. difficile* (rotulado como *cytotoxin B-like* en la Figura 2). El dominio C-terminal posee una región similar a repeticiones encontradas en toxinas similares a RTX (del inglés, *repeats in toxins*) de *Actinobacillus pleuropneumoniae* (ffrench-Constant y Dowling, 2014). La toxina Mcf-1 es responsable de generar un fenotipo

“blando” (*floppy*) en gusanos infectados por *Photorhabdus*, ya que causa apoptosis en las células del tracto intestinal y hemocitos de los insectos una vez que se inyecta (Daborn et al, 2002). El gen que codifica para Mcf-2 fue también encontrado en *Photorhabdus luminescens*, pero en la cepa W14. Este parece codificar una toxina larga con una estructura similar a Mcf-1, con la notable diferencia que el dominio N terminal de la primera es similar al gen de avirulencia en plantas secretado tipo III (HrmA, ver Figura 2) de *Pseudomonas syringae* (Waterfield et al, 2003). A pesar de sus diferencias estructurales, Mcf-1 y Mcf-2 tienen dominios que permiten su exportación a través de sistemas de secreción tipo I (descrito más adelante). Cuando estas proteínas se expresan en *Escherichia coli* recombinante le permiten a *E. coli* sobrevivir dentro de insectos y promover su muerte (Rodou et al, 2010).

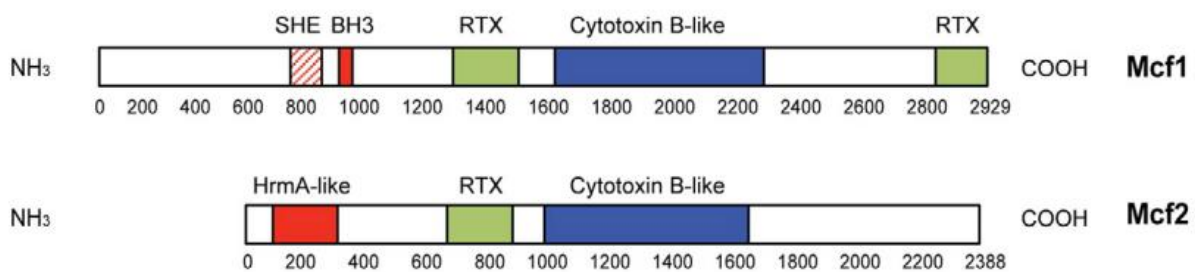


Figura 3. Diagrama comparativo de las estructuras y dominios de las toxinas Mcf. Los colores identifican dominios similares.

Fuente: ffrench-Constant y Dowling, 2014.

PVCs:

Los PVCs son sistemas de secreción similares a colas de fago, que exportan proteínas efectoras predichas. Están codificados por múltiples loci similares a prófagos esparcidos por el genoma de todas las especies conocidas de *Photorhabdus* (Yang et al. 2006). Cada loci tiene una estructura similar, caracterizada por presentar entre 12 y 15 marcos abiertos de lectura, que son seguidos de 2 a 4 loci de proteínas efectoras predichas, las cuales parecen ser variables, e incluyen a TccC, parte de Mcf1, LopT (homólogo de YopT de *Yersinia*) y el factor de necrosis de *Photorhabdus* (Pnf, homólogo de factor necrotizante citotóxico) (ffrench-Constant y Dowling, 2014). Estos loci se encuentran en diferentes localizaciones genómicas en las diferentes especies, lo que sugiere que son móviles; más aún, las proteínas efectoras predichas se encuentran flanqueadas por

transposones, lo que sugiere que podrían intercambiarse, sugiriendo que pertenecen al super grupo del sistema de toxinas polimórficas (Zhang et al, 2012). La estructura de este sistema de secreción se ha demostrado *in vivo* expresando PVCs en *E. coli*, y su efectividad se ha comprobado al inyectar larvas de *Galleria mellonella* con productos de PVCs (Yang et.al. 2006).

PirAB:

Debido a su similitud con las delta-endotoxinas de *Bacillus thuringensis* y a la proteína regulada por el desarrollo de *Leptinotarsa decemlineata*, los productos de los genes plu4093-plu4092 y plu4437-plu4436 de *Photorhabdus luminecens* fueron denominados toxinas relacionadas con insectos, o PirA y PirB, por sus siglas en inglés. Estas toxinas poseen la particularidad de ser binarias, es decir, únicamente poseen actividad oral contra larvas de mosquitos cuando se inyectan juntas (Waterfield, Kamita, Hammock y ffrench-Constant, 2005).

Metabolitos secundarios: Estilbeno y antraquinonas.

Los miembros del género *Photorhabdus* poseen un metabolismo secundario extenso. Sintetizan moléculas pequeñas con actividad antimicrobiana, entre los que destacan, el estilbeno y antraquinonas (Waterfield et al, 2009). Cabe mencionar que la activación del metabolismo secundario en éste género coincide temporalmente con la fase mutualista del ciclo de vida de la bacteria (Joyce, Lango y Clarke, 2011). Esto sugiere que durante la fase estacionaria se deben producir metabolitos relacionados con el mantenimiento del mutualismo, sin embargo, hasta muy recientemente solo el estilbeno parece tener esta característica (Clarke, 2016). Así mismo se ha reportado la producción de fotobactina (sideróforo con actividad antibiótica) (Ciche, Blackburn, Carney y Ensign, 2003) y la presencia de genes *cpm* de síntesis de carbapenemas (Derzelle, Duchaud, Kunst, Danchin y Bertin, 2002)

Objetivo general

Explorar la posición taxonómica e inferir el potencial de virulencia de una cepa de *Photorhabdus* aislada en Costa Rica a partir de una nueva especie de nematodo entomopatogénico.

Objetivos específicos

Aprovechar un árbol filogenético generado a partir de un alineamiento concatenado de genes esenciales para esclarecer si la cepa en estudio representa una nueva especie.

Comparar el genoma core y el pangenoma de la cepa en estudio con el de cepas conocidas de *Photorhabdus* para identificar genes posiblemente relacionados con virulencia, resistencia y síntesis de antibióticos.

Materiales y métodos

Cepas bacterianas y ADN genómico.

El genoma *draft* de la cepa de *Photorhabdus sp.* CRCIA-P01 fue provisto por la Universidad de Costa Rica. Esta secuencia fue generada mediante secuenciación por síntesis en un equipo Miseq (Illumina). Para el ensamblaje se usó la plataforma a5 (<https://omictools.com/a5-tool>), obteniendo un genoma de cerca de 5.1Mb con un contenido CG del 42,96%, características muy similares de otras cepas de *Photorhabdus*. Este ensamblaje se depositó en la base de datos Genbank bajo el código de acceso NMQR00000000 y se encuentra en proceso de revisión por el personal del NCBI, pendiente publicación. Para la anotación del genoma *draft* resultante se utilizó Prokka <http://www.vicbioinformatics.com/software.prokka.shtml> y una base de datos que contiene el genoma anotado de tres cepas de referencia: *P. luminescens* TT01 (NC_005126.1), *P. asymbiotica* ATCC43949 (NC_012962.1) y *P. temperata thracensis* DSM1519 (NZ_CP011104.1). Todos los genomas de las cepas de referencia fueron descargados a partir de los portales mantenidos por el NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/>).

Análisis filogenético y de secuencias.

Para el análisis filogenético se consideraron los genes *recA*, *gyrB*, *dnaN*, *gltX*, ya que son genes conservados no ligados, y que han sido anteriormente utilizados para este tipo de análisis en cepas de esta especie (Tailliez et al., 2010; Ferreira et al., 2014). Las secuencias de estos genes fueron extraídas manualmente a partir del ensamblaje a5 y los genomas de las cepas de referencia. Para generar el alineamiento concatenado se alinearon las secuencias de los genes mencionados de cada cepa utilizando CLUSTAL W en el software GENEious versión R10 (Biomatters, <http://www.geneious.com/>). Luego del alineamiento, las regiones en los extremos 3' y/o 5' de aquellos genes que estaban incompletos fueron truncadas para comparar secuencias nucleotídicas de igual longitud. Este alineamiento y el de las secuencias individuales fue usado para generar dendrogramas con el método de unión de vecinos descrito por Saitou y Nei (1987) usando el software mencionado anteriormente.

Como otro criterio para explorar la taxonomía de la cepa de interés se utilizó la distancia genoma-genoma calculada utilizando la aplicación GGDC del Instituto Leibniz DSMZ (disponible en <http://ggdc.dsmz.de/ggdc.php>). Dado que la secuencia de la cepa de interés no es circular, sino que corresponde a fragmentos concatenados, se consideró el valor generado con la fórmula 2 (Auch et al., 2010).

Obtención de comparaciones genómicas.

Se crearon archivos de comparación de genoma completo entre el genoma draft de la cepa de *Photorhabdus* y las cepas de referencia con la aplicación en línea Double Act v2 de la Agencia de Protección de la Salud del Reino Unido (http://www.hpa-bioinfotools.org.uk/pise/double_actv2.html). Para este fin se seleccionó el algoritmo tBlastx y la puntuación de corte establecida por defecto.

Determinación de genoma core, elementos del genoma accesorio (AGEs) y reconocimiento de factores de virulencia asociados a AGEs

Con el fin de identificar regiones únicas o compartidas con las tres especies de referencia, se extrajo el genoma core de las cuatro cepas utilizando la aplicación Spine (<http://vfsm spineagent.fsm.northwestern.edu/cgi-bin/spine.cgi>). Posteriormente se identificaron AGEs en el genoma de la cepa en estudio utilizando la herramienta AGEnt (<http://vfsm spineagent.fsm.northwestern.edu/cgi-bin/agent.cgi>). Estas predicciones fueron inicialmente curadas eliminando aquellos AGEs cuyo

porcentaje de representación en la secuencia de salida fuera <80%. Seguidamente, los archivos de comparación de genoma completo obtenidos en el punto anterior fueron visualizados con el software Artemis Comparison Tool (<http://www.sanger.ac.uk/science/tools/artemis-comparison-tool-act>). En caso de discrepancia entre los elementos señalados como no compartidos en ACT y compartidos en la comparación genómica, se tomó como punto de corte una identidad del 65% en la comparación genómica. Posteriormente se asignó función posible a los AGEs curados identificando manualmente su producto predicho o gen en las bases de datos Kegg (<http://www.genome.jp/kegg/pathway.html>), InterPro (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/>), UniProt (<http://www.uniprot.org/>), o literatura científica. Los loci fueron clasificados en loci relacionados con virulencia (así especificada en las bases de datos o literatura), resistencia (a antibióticos, bacteriocinas, o que promueven infección prolongada) o síntesis de antibióticos de acuerdo con sus productos génicos. Estos loci fueron descritos en cuanto a localización en el genoma draft, cantidad de secuencias codificantes, función predicha, gen y producto del principal efector, y si comparten total, parcialmente, o no comparten dichos loci con las tres especies de referencia.

Identificación de islas genómicas por IslandViewer3.

Con el fin de identificar islas genómicas en el genoma de la cepa CRCIA-P01 se utilizó la aplicación en línea IslandViewer3 (<http://www.pathogenomics.sfu.ca/islandviewer/>), la cual combina los métodos de predicción IslandPick, IslandPath-DIMOB, SIGI-HMM, y Islander (Bertelli *et al.*, 2017).

Resultados

Análisis filogenético y de secuencias.

Los árboles filogenéticos de unión de vecinos distribuyeron las secuencias de los genes *gltX*(A), *dnaN* (B), *gyrB* (C) y *recA* (D) en tres clados, uno de los cuales posee dos subclados (Figura 1). Las cepas de referencia se distribuyeron en clados distintos, con la cepa en estudio compartiendo el subclado con *P. luminescens* en tres casos (*gltX*, *dnaN* y *recA*) y con *P. temperata* en el restante (*gyrB*).

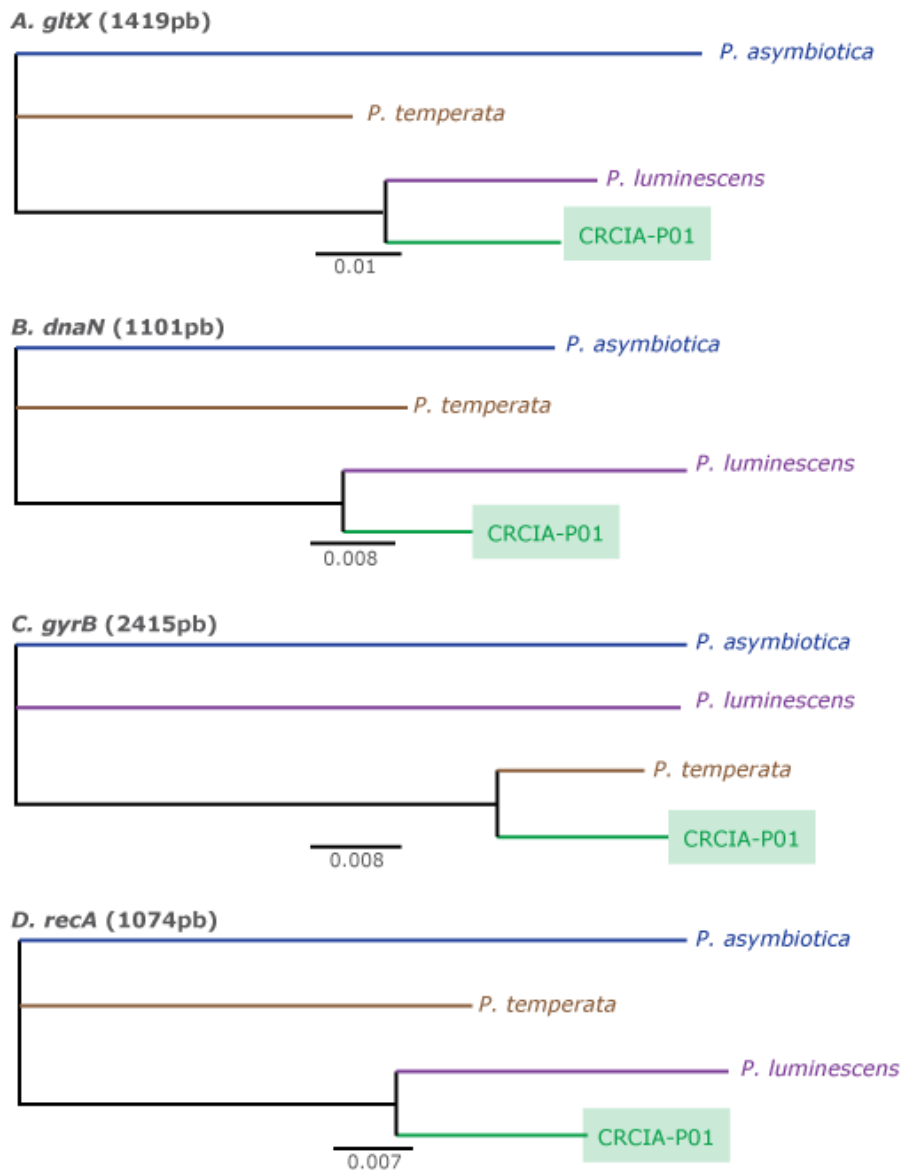


Figura 4. Relación filogenética de la cepa *Photorhabdus* sp. CRCIA-P01 y las cepas de referencia *P. luminescens* TT01, *P. asymbiotica* ATCC43949 y *P. temperata* thracensis DSM1519 derivada del análisis de distancia de las secuencias codificantes de los genes *gltX* (A), *dnaN* (B), *gyrB* (C) y *recA* (D), las cuales fueron derivadas de un alineamiento obtenido con el método de unión de vecinos. Las barras representan el porcentaje de divergencia de las secuencias nucleotídicas.

Al concatenar la secuencia de los genes estudiados se obtuvo la misma distribución cladística que la observada para las secuencias de los genes *gltX*, *dnaN* y *recA* (Figura 2). Nótese el alto valor de

bootstrap obtenido para el nodo que une el subclado de la cepa de interés con *P. luminescens*.

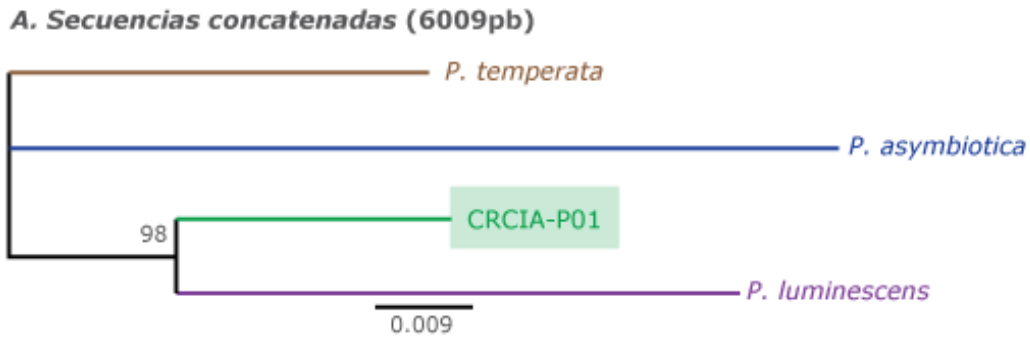


Figura 5. Relación filogenética de la cepa *Photobacterium* sp. CRCIA-P01 y las cepas de referencia *P. luminescens* TT01, *P. asymbiotica* ATCC43949 y *P. temperata thracensis* DSM1519 derivada del análisis de distancia de las secuencias codificantes concatenadas de los genes *gltX*, *dnaN*, *gyrB* y *recA*. Se utilizaron las distancias obtenidas de un alineamiento obtenido con el método de unión de vecinos. El valor de bootstrapping fue derivado a partir de 100 iteraciones y la escala representa el porcentaje de divergencia de las secuencias nucleotídicas.

En congruencia con los resultados anteriores, la hibridación ADN-ADN de la cepa en estudio y las de las cepas de referencia nunca superó el 70% necesario para deducir que las cepas pertenecen a la misma especie (Cuadro 1).

Cuadro 1. Probabilidades de que la hibridación ADN-ADN in silico entre el genoma draft de la cepa *P. sp.* CRCIA-P01 y tres genomas de referencia de especies del mismo género sea mayor al 70% calculadas utilizando la aplicación GGDC.

Especie de referencia	Probabilidad de que DDH>70% (%)
<i>P. luminescens</i> TT01	12.16
<i>P. temperata thracensis</i> DSM1519	0.51
<i>P. asymbiotica</i> ATCC43949	0.2

Determinación de genoma core, elementos del genoma accesorio (AGEs) y predicción funcional de loci asociados a AGEs

El genoma *core* más amplio, en cuanto a pares de bases y cantidad de secuencias codificantes, se determinó al comparar con *P. luminescens*. Según los mismos criterios, el genoma accesorio y pangenoma más amplio se obtuvo al comparar con *P. asymbiotica* (Cuadro II).

Cuadro II. Comparación de los genomas core y accesorio y pangenoma de la cepa *P. sp. CRCIA-P01* y tres cepas de referencia del género *Photorhabdus*.

Cepa de referencia usada en la comparación	Tipo de genoma	Cantidad de secuencia compartida (kb)	Número de secuencias codificantes
<i>P. luminescens</i> TT01	Core CRCIA-P01	4056	3537
	Accesorio CRCIA-P01	1262	1111
	Core referencia	4219	3512
	Accesorio referencia	1470	1203
	Pangenoma	6788	5851
<i>P. temperata</i>	Core CRCIA-P01	3007	2739
<i>thracensis</i> DSM1519	Accesorio CRCIA-P01	2311	1909
	Core referencia	3028	2687
	Accesorio referencia	2119	1597
	Pangenoma	7437	6245
<i>P. asymbiotica</i> ATCC43949	Core CRCIA-P01	2699	2421
	Accesorio CRCIA-P01	2619	2227
	Core referencia	2739	2429
	Accesorio referencia	2326	1917
Pangenoma	7644	6565	

Luego del proceso de curación, el número de secuencias codificantes presentes en el genoma accesorio de la cepa CRCIA-P01 disminuyó. No obstante, la cepa de referencia más cercana continuó siendo *P. luminescens*, seguida de *P. temperata* y finalmente *P. asymbiotica* (Cuadro III).

Cuadro III. Cantidad de secuencias codificantes (CDS) identificadas en el genoma accesorio de la cepa *P. sp. CRCIA-P01* con respecto a cada especie de referencia después de realizar una curación manual.

Cepa de referencia	Número de CDS
<i>P. luminescens</i> TT01	957
<i>P. temperata thracensis</i> DSM1519	1561
<i>P. asymbiotica</i> ATCC43949	1850

La cantidad total y de loci accesorios únicos relacionados con virulencia, agrupados según su función general, se detalla en el Cuadro IV. Nótese que la cepa cuenta con varios elementos de resistencia y virulencia que no se comparten con ninguna de las otras cepas, lo que coincide con los resultados arriba presentados.

Cuadro IV. Abundancia de AGEs y AGEs únicos cuya función parece estar relacionada con resistencia, síntesis de antibióticos y virulencia identificados en el genoma draft de la cepa *P. sp. CRCIA-P01*

Función Predicha	AGEs (n)	AGEs únicos (n)
Resistencia	TOTAL= 41 (23+19) *	8
Síntesis de antibióticos	TOTAL= 10 (5+5) *	0
Virulencia	TOTAL=75 (52+22) *	13

*Las dos cifras entre paréntesis corresponden, de izquierda a derecha, al número de loci con función única y función mixta (i.e. resistencia + antibióticos, resistencia + virulencia, etc).

Al clasificar los AGEs identificados según su función se obtuvo en total 52 loci exclusivamente relacionados con virulencia los cuales, en conjunto, incluyen 346 productos. En el caso de resistencia, 23 loci con 99 productos génicos se relacionaron con esta función. También se encontraron 5 loci de síntesis de antibióticos, que contienen 46 productos génicos, y 23 loci con función mixta, con 307 productos génicos.

Los cuadros V, VI, VII y VIII muestran algunas características de los AGEs relacionados con virulencia, resistencia, síntesis de antibióticos o varias de estas funciones. Para cada locus se detalla su localización, número de productos génicos, función anticipada de su principal efector, e información de su presencia total o parcial en las cepas de referencia analizadas.

En el caso de AGE relacionados con virulencia se encontraron 52 loci, de los cuales 11 no se comparten con ninguna de las otras cepas. Estos loci incluyen efectores como toxinas pertenecientes a módulos TA (*parE1*, *relE*, *vapC*, etc.) y otras relacionadas con infección, motilidad, y toxicidad (*ail*, *iucC*, *bvgS*, *mkrD*) etc. (Cuadro V).

Cuadro V. Detalle de los AGEs relacionados con virulencia identificados en la cepa *P. sp.* CRCIA-P01.

Locus	Localización en el ensamblaje a5	Productos génicos (n)	Principal Efector (Gen/Locus tag)	Producto anticipado del principal efector	Compartido con <i>P. luminescens</i> TT01	Compartido con <i>P. asymbiotica</i> ATCC43949	Compartido con <i>P. temperata thracensis</i> DSM1519
2	32263-34113	2	<i>ail</i>	Precursor de proteína de locus de invasión y fijación	P	NC	NC
3	82878-100335	6	<i>chiA</i>	Precursor de quitinasa A	NC	NC	NC
4	116689-139550	28	PROKKA_00112	Proteína similar a Ycfa	NC	NC	NC
7	223514-225214	5	<i>parE1</i>	Toxina ParE1	P	NC	NC
8	277687-277899	1	PROKKA_00266	Proteína de virulencia	C	NC	NC
11	463379-477814	10	<i>iucC</i>	Aerobactina sintasa	C	NC	NC
13	548992-549514	2	<i>relE</i>	Interferasa de ARNm RelE	C	NC	NC

14	621920-622393	2	<i>VapD</i>	Endonucleasa específica de ARNt(fMet) VapD	NC	NC	NC
17	698219-722438	20	<i>bvgS</i>	Precursor de la proteína sensora de virulencia BvgS	P	P	P
19	798774-806325	7	<i>fimD</i>	Precursor de proteína portera de membrana externa FimD	P	NC	NC
20	1014145-1022991	1	<i>toxB</i>	Toxina B	NC	C	NC
22	1046004-1046635	2	<i>vapC</i>	Endonucleasa específica de ARNt(fMet) VapC	P	NC	NC
25	1144863-1155400	11	<i>focC</i>	Precursor de proteína de fimbria FocC	P	NC	P
26	1172692-1173545	2	PROKKA_01058	Toxina Zeta	NC	NC	NC
31	1471452-1480460	6	<i>mrkD</i>	Precursor de proteína adhesina de fimbria	P	P	P
33	1538380-1560179	3	PROKKA_01369	Proteína A 28.1kDa de plasmido de virulencia de <i>Salmonella</i>	C	NC	C
34	1610262-1610571	1	<i>higB-2</i>	Toxina higB-2	C	C	NC
39	1888197-1895824	7	<i>ptlH</i>	Proteína de sistema de secreción tipo IV PtlH	NC	P	NC
40	1925354-1927123	3	PROKKA_01695	Dominio activador de Rho de factor necrotizante citotóxico	NC	NC	NC
43	2088939-2095820	2	PROKKA_01808	Proteína de plásmido de virulencia de <i>Salmonella</i> 28.1kDa	NC	NC	NC
45	2220329-2222904	1	<i>ail</i>	Precursor de proteína de locus de invasión y unión	C	NC	NC
46	2230832-2242197	4	<i>chiA</i>	Precursor de quitinasa A	C	C	NC

48	2303262-2312494	9	<i>tagG</i>	Proteína permeasa de translocación de ácido teicóico TagG	NC	NC	NC
50	2341091-2341394	2	<i>relE</i>	Interferasa de ARNm RelE	C	NC	NC
52	2440442-2441488	1	PROKKA_02147	Polipéptido tóxico corto	C	NC	C
53	2541299-2543278	1	<i>cirA</i>	Precursor de receptor de colicina 1	C	NC	C
54	2649877-2656792	5	PROKKA_02335	Proteína DspF/AvrF	C	NC	P
56	2762609-2771271	9	<i>focC</i>	Precursor de proteína chaperona FocC	C	NC	NC
57	2787807-2795776	4	<i>mkaB</i>	Proteína de virulencia de 28.1kDa	C	NC	NC
59	2817602-2818607	3	PROKKA_02451	Proteína similar a YcfA	P	NC	P
60	2818850-2820553	4	PROKKA_2455	Proteína similar a YcfA	P	P	NC
63	2871397-2890658	19	<i>hlyD</i>	Proteína D de plásmido de secreción de hemolisina	P	NC	NC
64	2930346-2933155	4	<i>hpmA</i>	Precursor de hemolisina	C	NC	P
68	3153608-3155806	2	<i>mig-14</i>	Mig-14	NC	NC	NC
69	3158030-3171801	9	<i>epsH</i>	Glicosiltransferasa predicha EpsH	P	NC	P
70	3193680-3199494	7	<i>cvaA</i>	Proteína de secreción de colicina V	P	NC	NC
71	3216799-3217328	2	<i>yafQ/dinJ</i>	Interferasa de ARNm YafQ/Antitoxina DinJ	NC	NC	NC
73	3284757-3285638	2	<i>yafO</i>	Arnm interferasa YafO	NC	NC	C

78	3861805-3877797	14	<i>pvdA</i>	L-ornitina-5-monooxigenasa	C	P	P
80	4025035-4031465	5	<i>hlyA</i>	Precursor de hemolisina	NC	NC	NC
83	4171412-4179665	12	PROKKA_0367 2	Toxina predicha YafO	NC	NC	P
88	4381454-4392029	10	<i>smfA</i>	Proteína precursora de fimbria A	C	P	NC
89	4434533-4450937	14	<i>oppA</i>	Proteína relacionada con patogenicidad activada por PhoPQ	NC	P	P
91	4596072-4599201	5	<i>phxA</i>	Toxina photox	P	NC	P
92	4635691-4652555	26	<i>stp</i>	Serina treonina fosfatasa stp	P	NC	P
96	4809282-4811452	4	<i>yafQ/DinJ</i>	Interferasa de ARNm YafQ/Antitoxina DinJ	P	NC	P
97	4816811-4821422	4	<i>hlyC</i>	Lisina-aciltransferasa activadora de hemolisina	C	NC	C
98	4834892-4835487	2	PROKKA_0428 8	Proteína similar a YcfA	NC	NC	NC
99	4876538-4889132	9	<i>pulA</i>	Precursor de pululanasa	C	NC	P
10	5000719-5023556	22	PROKKA_0441 9	Multiplicación intracelular	P	P	P
10	5154660-5160673	6	<i>tcpE</i>	Proteína E de biosíntesis de pilus coregulada por toxina	C	NC	NC
10	5225828-5229128	4	<i>tcpT</i>	Proteína T de biogénesis de pilus coregulada por toxina	C	NC	NC

Se señala con un asterisco(*) los elementos identificados como islas genómicas por IslandViewer3, en negrita los loci que no son compartidos con ninguna de las 3 cepas de referencia. C= Compartido; P=Parcialmente compartido; NC=No compartido.

Se identificaron 23 AGEs relacionados con resistencia, de los cuales 6 no se comparten con las otras especies de referencia (Cuadro VI). Entre ellas se encuentran CDS relacionadas con resistencia a antibióticos (*emrB*, *stp*, *bcr*) y antitoxinas (*higA*, *vapB*, *hipB*) principalmente.

Cuadro VI. Detalle de los AGEs relacionados con resistencia identificados en la cepa *P. sp. CRCIA-P01*.

L o c u s	Localización en el ensamblaje a5	Productos génicos (n)	Principal Efector (Gen/Locus tag)	Producto anticipado del principal efector	Compartido con <i>P. luminescens</i> TT01	Compartido con <i>P. asymbiotica</i> ATCC43949	Compartido con <i>P.</i> <i>temperata thracensis</i> DSM1519
6	160215- 162081	6	<i>Imm</i>	Proteína de inmunidad a colicina-e3	P	P	P
9	405403- 406349	3	<i>higA</i>	Antitoxina HigA	P	NC	P
10	417552- 420151	2	<i>emrB</i>	Proteína de exportación multidrogas EmrB	NC	NC	P
15	634073- 646509	9	<i>stp</i>	Proteína de resistencia a multidrogas Stp	C	NC	NC
21	1029420- 1032816	3	PROKKA_00946	Beta-lactamasa	P	P	NC
27	1204715- 1210888	5	<i>stp</i>	Proteína de resistencia a multidrogas stp	NC	NC	NC
28	1306321- 1306810	2	PROKKA_01165	Aminoglicósido N(6')- acetiltransferasa tipo 1	C	NC	NC
35	1612055- 1610571	1	<i>hicB</i>	Antitoxina HicB	C	C	NC
36	1652604- 1652831	1	<i>vapB</i>	Antitoxina VapB	NC	NC	NC
37	1691939- 1692425	2	<i>Bcr</i>	Proteína de resistencia a biciclicomicina	P	P	P

44	2117411- 2122285	4	<i>mig-14</i>	Mig-14	NC	NC	NC
47	2299041- 2299298	1	<i>dinJ</i>	Antitoxina DinJ	NC	NC	C
51	2423202- 2429090	3	<i>arnA</i>	Proteína de resistencia a polimixina bifuncional ArnA	C	NC	NC
61	2830747- 2831700	1	PROKKA_0246 9	Proteína similar a Abi	NC	NC	NC
62	2845630- 2847227	3	<i>imm</i>	Proteína de inmunidad a colicina-E7	P	NC	NC
65	2953469- 2955844	1	<i>mrcB</i>	Proteína de unión a penicilina	NC	NC	NC
66	3109724- 3110608	1	PROKKA_0270 1	Proteína similar a Abi	NC	NC	NC
74	3296311- 3298555	5	<i>higA</i>	Antitoxina HigA	P	NC	P
76	3440347- 3441557	3	<i>mazE</i>	Antitoxina MazE	NC	P	NC
84	4260088- * 4268403	14	PROKKA_03726	Proteína similar a Abi	P	NC	P
86	4332223- 4348353	16	<i>hipB</i>	Antitoxin HipB	P	NC	P
87	4352640- 4363623	9	PROKKA_03816	Poliquétido sintasa similar a Snoal	P	NC	P
90	4554172- 4556298	4	PROKKA_03995	Barstar	P	NC	P

Se señala con un asterisco(*) los elementos identificados como islas genómicas por IslandViewer3, en negrita los loci que no son compartidos con ninguna de las 3 cepas de referencia. C= Compartido; P=Parcialmente compartido; NC=No compartido.

En el caso de AGE de síntesis de antibióticos se encontraron 5 loci cuyas características de muestran a continuación (Cuadro VII). Todos estos loci tienen contrapartes en alguna(s) de las otras especies comparadas.

Cuadro VII. Detalle de los AGEs relacionados con síntesis de antibióticos en la cepa *P. sp.* CRCIA-P01.

Locus	Localización en el ensamblaje a5	Productos génicos (n)	Principal Efector (Gen/Locus tag)	Producto anticipado del principal efector	Compartido con <i>P. luminescens</i> TT01	Compartido con <i>P. asymbiotica</i> ATCC43949	Compartido con <i>P. temperata thracensis</i> DSM1519
1	22561-22962	1	SnoaL-like domain protein	SnoaL-like domain protein	C	NC	C
32*	1498012-1517367	16	<i>neob</i>	L-glutamina:2-deoxi-siloinososa aminotransferasa	NC	NC	P
42	2055259-2065071	6	PROKKA_01788	Actinorodina poliquétido beta-cetoacil sintasa 1 predicha	C	NC	C
55	2695584-2740708	14	<i>grsB</i>	Gramicidina S sintasa 2	C	NC	NC
81*	4061427-4068854	9	<i>igrD</i>	subunidad D de gramicidina lineal sintasa	NC	NC	P

Se señala con un asterisco(*) los elementos identificados como islas genómicas por IslandViewer3. C= Compartido; P=Parcialmente compartido; NC=No compartido.

Se identificaron 23 loci con función mixta, de los cuales dos no se comparten con las otras cepas. Llama particularmente la atención la presencia de múltiples módulos toxina/antitoxina (*higB/higA*, *ccdB/ccdA*, *msqR/msqA*, etc).

Cuadro VIII. Detalle de los AGEs relacionados con función mixta en la cepa *P. sp.* CRCIA-P01.

L o c u s	Localización en el ensamblaje a5	Produc tos génicos (n)	Función predicha	Principal Efector (Gen/Locus tag) (Gen)	Producto anticipado del principal efector	Compartido con <i>P.</i> <i>luminescens</i> TT01	Compartido con <i>P.</i> <i>asymbiotica</i> ATCC43949	Compartid o con <i>P.</i> <i>temperata</i> <i>thracensis</i> DSM1519
12	545076- 545726	2	Virulencia/ Resistencia	<i>higB/higA</i>	Toxina HigB/Antitoxina HigA	C	NC	NC
16	689221- 694837	6	Virulencia/ Resistencia	<i>parD</i> /PROKKA _00660	Antitoxina ParD/Proteína antimicrobiana de grupo de <i>Bacillus cereus</i>	C	NC	P
18	730503- 782740	28	Virulencia/Sín tesis de antibióticos	<i>fitB/novN</i>	Toxina FitB/Decarbamoilnovobiocina carbamoiltransferasa	P	P	P
23	1065242- 1065795	2	Virulencia/ Resistencia	<i>ccdB/ccdA</i>	Toxina CcdB/Antitoxina CcdA	NC	NC	C
24	1085237- 1107900	8	Virulencia/ Síntesis de antibióticos	<i>shlB/igrB</i>	Precursor de proteína transportadora de hemolisina ShlB/Subunidad B de sintetasa de gramicidina lineal.	P	NC	NC
29	1372214- 1372927	2	Virulencia/ Resistencia	<i>mqsR/mqsA</i>	Arn interferasa MqsR/Antitoxina MqsA	NC	NC	C
30	1439929- 1462417	14	Resistencia/ Síntesis de antibióticos	<i>bepE/tycC</i>	Transportador de membrana bomba de eflujo BepE/ Tirosidina sintasa 3	P	P	NC
38	1800282- 1809433	9	Virulencia/ Resistencia	<i>mdtH</i> /PROKK A_01595	Proteína de resistencia a multidrogas MdtH/Proteína de dominio MAC/Perforina	C	P	P
41	2005545- 2034186	16	Virulencia/ Resistencia	<i>cmdD/yhel</i>	Condramida sintasa cmdD/Proteína predicha permeasa de unión a ATP transportador ABC resistencia multidrogas	P	NC	P

49	2335871-2337877	3	Virulencia/Resistencia	<i>parE4/parD1</i>	Toxina ParE4/Antitoxina ParD1	C	NC	NC
58	2804097-2807116	4	Virulencia/Resistencia	<i>higB/higA</i>	Toxina HigB/Antitoxina higA	P	P	NC
67	3115233-3115888	2	Virulencia/Resistencia	<i>fitB/fitA</i>	Toxina fitB/Antitoxina fitA	C	NC	NC
72	3235705-3236103	2	Virulencia/Resistencia	<i>vapC/vapB1</i>	endonucleasa específica de ARNt(fMet) VapC/Antitoxina VapB1	NC	NC	NC
75	3335061-3335912	2	Virulencia/Resistencia	<i>prfF/yhaV</i>	Antitoxina PrfF/Toxina YhaV	C	C	NC
77	3548658-3549163	2	Virulencia/Resistencia	<i>yoeB/yefM</i>	Toxina YoeB/Antitoxina YefM	C	NC	C
79	3882863-3886222	5	Virulencia/Síntesis de antibióticos	<i>pipB2/novN</i>	Proteína efectora secretada pipB2/decarbamoilnovobiocina carbamoiltransferasa	NC	NC	C
82	4113306-4152575	26	Virulencia/Resistencia	<i>spvB/vapB</i>	Mono (ADP-ribosil) transferasa SpvB/Antitoxina VapB	P	P	NC
85	4270688-4293375	24	Virulencia/Resistencia	<i>tcpT/ble</i>	Proteína T de biogénesis de pilus coregulada por toxina/ Proteína de resistencia a bleomicina	P	NC	P
93	4654054-4695621	47	Virulencia/Resistencia	<i>symE/albA</i>	Proteína toxica SymE/proteína de biosíntesis de subtilisina y bacteriosina antilisterial	P	P	P
94	4715518-4748876	41	Virulencia/Síntesis de antibióticos	<i>entD/igrA</i>	Componente fosfopantetenil transferasa del complejo multienzima enterovactina sintasa/subunidad A de sintetasa de gramicidina lineal	P	NC	P
95	4768121-4795860	19	Virulencia/Resistencia	<i>apx1B/mdtH</i>	proteína de unión a ATP translocadora de toxina RTX-I/ proteína de resistencia multidroga MdtH	P	P	P

10	4889716- 0 4924627	38	Virulencia/ Síntesis de antibióticos	<i>mbtB/aurF</i>	Feniloxazolina sintasa MbtB/p- aminobenzoato N-oxigenasa	P	P	P
10	5102542- 2 5106838	6	Virulencia/Re sistencia	<i>cmdD/ble</i>	Condramida sintasa cmdD/Proteína de resistencia a bleomicina	NC	NC	NC

Se señala con un asterisco(*) los elementos identificados como islas genómicas por IslandViewer3, en negrita los loci que no son compartidos con ninguna de las 3 cepas de referencia. C= Compartido; P=Parcialmente compartido; NC=No compartido.

Discusión

Posicionamiento filogenético de la cepa CRCIA-P01

Todos los árboles filogenéticos obtenidos separaron a cada una de las cepas de referencia en clados independientes. Este resultado contradice al obtenido por Tailliez y colaboradores (2010), quienes analizaron la secuencia codificante de diversos genes de 14 cepas del género *Photorhabdus*. Su análisis de *gltX* y *recA*, y de la secuencia concatenada de *gltX*, *recA*, *gyrB* y *dnaN* agrupó a *P. luminescens* y *P. temperata* en el mismo subclado y separó a *P. asymbiotica* en otro clado. Sin embargo, al analizar la secuencia del gen *gyrB* los autores encontraron a *P. luminescens* y *P. asymbiotica* en el mismo subclado, y en el árbol generado con las secuencias del gen *dnaN*, a *P. asymbiotica* y *P. temperata* en el mismo clado, con *P. asymbiotica* y *P. temperata* compartiendo otro clado. Estas diferencias pueden deberse en primer lugar a que los autores utilizaron CLUSTALW para realizar los alineamientos. Diferentes softwares de alineamiento producen matrices de puntaje distintas y por tanto diferentes distancias y diferentes árboles filogenéticos. El alineamiento aquí propuesto agrega un componente iterativo al proceso progresivo por pares que utiliza CLUSTALW. Desgraciadamente no es posible comparar la “calidad” de los alineamientos, ya que no están disponibles las probabilidades del alineamiento de Tailliez y colaboradores. Otra razón que existe para esta posible discrepancia es que los autores realizaron *bootstrapping* y los valores obtenidos para los nodos que unen las cepas pertenecientes a las especies de referencia fueron iguales o menores a 75 en todos los casos excepto para *gltX* (95). En el presente estudio no se realizó *bootstrapping* para las secuencias individuales debido a que el alineamiento es muy sencillo, sin embargo, es posible que el árbol mostrado tenga menor probabilidad y aún haya aparecido. Empero, el árbol generado a partir de la secuencia concatenada de los genes en estudio refuerza la idea de que cada especie pertenece a un clado distinto, pues se obtuvo un valor de *bootstrapping* de 98 para el nodo que une la especie en estudio con *P. luminescens*. La cepa en estudio se encontró en el mismo subclado que *P. luminescens* en tres de los cuatro árboles generados a partir de secuencias de genes individuales (*gltX*, *dnaN* y *recA*) y en el producido utilizando las secuencias concatenadas. Esta observación, sobre todo considerando el valor de *bootstrapping* para este nodo en el árbol con

las secuencias concatenadas sugiere que la especie en estudio es filogenéticamente más similar a *P. luminescens*, y que probablemente comparten un ancestro común. El hecho de que la cepa en estudio se encuentre en el mismo subclado que *P. temperata* en el árbol filogenético obtenido a partir de la secuencia del gen *gyrB* sugiere que probablemente este gen ha sido adquirido por transferencia horizontal (Pylro, Vespoli, Duarte y Yotoko, 2012). Si bien se considera que este gen no es susceptible de ser transferido lateralmente, tales eventos han sido reportados por algunos autores en este tipo de genes (Schouls, Schot y Jacobs, 2003; Acinas, Marcelino, Klepac-Ceraj y Polz) e incluso específicamente para *gyrB* (Dauga, 2002). En detrimento de esta hipótesis consta el hecho que no se identificó ningún producto génico relacionado con elementos móviles a 10000 pares de bases corriente arriba o debajo de *gyrB*, y en el gen no se encuentra en ninguna de las regiones identificadas por IslandViewer3. Sin embargo, esto puede deberse a las limitaciones del método de secuenciación, o a que la secuencia se encuentra cerca del fin de un *scaffold*, por lo que es posible que el ensamblaje analizado no tenga la región corriente abajo correcta. Así mismo, cabe mencionar que es posible que existan secuencias relacionadas con elementos móviles en las regiones flanqueantes que no hayan sido identificadas como islas por IslandViewer, por lo que en un futuro podría comprobarse de forma manual.

Para explorar aún más profundamente sobre la posible taxonomía de la cepa en estudio se determinó la probabilidad de que la hibridación ADN-ADN entre el genoma draft y los genomas de referencia sea mayor al 70% y 79%, criterios utilizados para definir dos cepas como pertenecientes a la misma especie y subespecie, respectivamente (Tindall *et al*, 2010). En congruencia con lo analizado a partir de los árboles filogenéticos se obtuvo una mayor probabilidad para la hibridación con *P. luminescens*, seguido de lejos por *P. temperata* (ver Cuadro I). Los autores recomiendan utilizar la fórmula 2 cuando se utilizan secuencias incompletas (Auch *et al.*, 2010), cuyos resultados indican que la cepa en estudio probablemente se trata de una especie nueva del género *Photorhabdus*. Esta observación, que se mantiene aun utilizando los valores obtenidos con las otras tres fórmulas que el *webserver* ofrece, es congruente con los dendogramas obtenidos excepto para *gyrB*, sin embargo, estos no esclarecen

si se trata de especies distintas o subespecies, en cuyo caso se recomienda utilizar el criterio de DDH (Tindall *et al*, 2010).

Elementos del genoma accesorio (AGEs) y reconocimiento de factores de virulencia asociados a AGEs

La cepa CRCIA-P01 comparte una mayor cantidad de pares de bases, segmentos genómicos generados por hibridación *in silico*, y secuencias codificantes con *P. luminescens*, lo cual concuerda con la distribución cladística y la distancia genoma-genoma obtenidas, seguido por *P. temperata*. Interesantemente, la diferencia en cuanto a número de segmentos no es tan grande como la que se obtiene al comparar la cantidad de secuencias codificantes, lo que sugiere que el estilo de vida de la cepa en estudio es más similar al de *P. luminescens*.

Es también interesante el hecho que el genoma accesorio de la cepa en estudio tiene un tamaño similar en comparación con *P. temperata* y *P. asymbiotica*, dado que esta última es la única de las especies de referencia que infecta seres humanos. Esta observación podría interpretarse de al menos dos maneras extremas: primero, si los productos génicos que pertenecen al genoma *core* con respecto a ambas especies son más “estructurales” o relacionados con metabolismo básico, existen una gran proporción de genes relacionados con el nicho de vida específico (presentes en el genoma accesorio) relacionados pues a patogenicidad en huéspedes específicos; alternativamente, que la cepa en estudio posea elementos accesorios relacionados con nichos ecológicos similares a los de *P. temperata* y *P. asymbiotica* en grado similar. Como se describirá más adelante, los resultados sugieren un punto intermedio entre estas dos hipótesis.

La noción de que la cepa CRCIA-P01 es una nueva especie se ve también evidenciada en la gran cantidad de elementos identificados como AGEs por el software AGENT, aún después de realizar la curación manual (ver cuadro V y VI). El haber encontrado una menor cantidad de elementos accesorios con respecto a *P. luminescens* que con las otras cepas de referencia refuerza la posible localización taxonómica propuesta en el apartado anterior. Esta importante cantidad de

elementos accesorios justifica la realización de más estudios a nivel genómico o proteómico que indaguen sobre la naturaleza de estos elementos y los relacionen con una función biológica.

En lo que respecta al proceso de curación, cerca del 30% de las CDS señaladas como no compartidas fueron reclasificadas como compartidas según los criterios establecidos en la Metodología. Cabe mencionar que algunas CDS en la secuencia de la cepa en estudio que poseían rasgos similares a otros en las secuencias de las cepas de referencia fueron marcados como no compartidos siempre y cuando tuvieran <65% de identidad; de igual forma algunas CDS anotados como producto o gen distinto, se consideraron compartidos si satisfacían el criterio anterior. Ocho AGEs relacionados con resistencia y trece relacionados con virulencia no se comparten siquiera parcialmente con las otras cepas de referencia. Estos elementos son discutidos a continuación en virtud de su novedad:

El primer locus no compartido relacionado con virulencia corresponde al número 3 en el Cuadro V. Éste contiene dos copias de su principal efector, el gen que codifica para el precursor de quitinasa A, un par de genes anotados por PROKKA como *spvA* y *spvB* y una proteína hipotética de 1378 aminoácidos. Podría parecer paradójico que una quitinasa no se comparta con *P. asymbiotica* y *P. temperata*, ya que estas ayudan a la colonización del insecto y a su bioconversión una vez que este muere, sin embargo, es importante considerar que existe gran diversidad de proteínas con este tipo de actividad (Heermann y Fuchs, 2008), por lo que es posible que esta no se encuentre en las cepas de referencia. La identificación de dos CDS relacionadas con virulencia originalmente descritas en *Salmonella* llama la atención. Si bien se desconoce su función exacta, se ha descrito que la actividad del gen *spvA* se relaciona con patogénesis en este género, mientras que el gen *spvB* codifica para una mono ADP-ribosil transferasa que actúa sobre la arginina 177 de la actina. Esta modificación evita su polimerización, lo que provoca desensamblaje del citoesqueleto y citotoxicidad en las células infectadas (Margarit, Davidson, Frego y Stebbins, 2006). Se desconocen al momento de redacción reportes de este gen en otras cepas de *Photorhabdus*, por lo que sería tentador suponer que dichas CDS se han obtenido por transferencia horizontal. Empero, este locus no contiene, ni se encuentra cerca, de elementos

móviles, ni fue identificado por IslandView3, por lo no existe evidencia que de soporte a esta hipótesis. Una explicación alternativa es que este locus en realidad sea un Tc. De hecho, SpvA y SpvB muestran considerable homología con TcdA1 y TcdB1 (Yang y Waterfield, 2013), y TccA y TcaC (Rodou, Ankrah y Stathopoulos, 2010), respectivamente. La proteína hipotética anteriormente mencionada tiene un tamaño similar a SpvA, y al realizarle un *blastp* mostró un 65% de homología con un componente de Tc de *Xenorhabdus nematophila*, el cual puede corresponder al Tc faltante para identificar el elemento completo. Sería interesante mapear los reads crudos Illumina contra diferentes Tc para corroborar si se pueden reconstruir y poner a prueba esta hipótesis *in vitro* mediante su expresión heteróloga. Como este tipo de elementos funcionan únicamente cuando se encuentran tres subunidades (A, B y C), se comprobaría su identidad si se observa el fenotipo de virulencia esperado en una cepa que exprese los tres productos. Si la inserción de los elementos individuales tuviera un efecto similar, sería probable que se trate de otro tipo de toxina.

El locus 43 podría tratarse de un caso similar. Este contiene únicamente a *spvA*, y corriente abajo se encuentra una proteína hipotética, seguida de una secuencia que codifica para una proteína identificada como SpvB. Al realizar un *Blastx* a toda esta región se encuentra un *hit* para para la proteína identificada como *spvA* que corresponde a un TcaA (score 2092, E-value 0, identidad 92%), uno para la proteína hipotética que corresponde a un TccB identificado en una cepa de *P. luminescens* no caracterizada (score 2140, E-value 0, identidad 92%), y uno para la proteína identificada como *spvB* que corresponde a TcaC (score 2875, e-value 0, identidad 95%). Todo esto sugiere que en ambos casos estas proteínas fueron incorrectamente anotadas, y que en realidad son parte de Tcs que no se comparten con las especies de referencia.

El segundo AGE no compartido con ninguna cepa de referencia, correspondiente al locus 4, parece ser un prófago, dado que incluye CDS relacionadas con componentes estructurales de cola, cabeza, cápside, y terminasas. Este hallazgo fue confirmado utilizando PHAST (aplicación para identificación de fagos disponible en www.phast.wishartlab.com/), la cual identifica el locus completo como un fago intacto, que contiene ocho genes presentes en el fago phiKO2 de

Klebsiella y otros de fagos de enterobacterias. Se conoce bien que numerosos factores de virulencia con diferentes mecanismos de acción están codificados en prófagos, y que estos favorecen el *fitness* de la cepa bacteriana (Wagner y Waldor, 2002; Abedon y LeJeune, 2005). En este caso en particular, el potencial profago posee CDSs relacionadas con virulencia, entre ellas una proteína de dominio de fibronectina tipo III (Henderson, Nair, Pallas y Williams, 2010), otra de familia NlpC/P60, que codifica por peptidoglicano hidrolasas (Parthasarathy et al., 2012) y una similar a la toxina YcfA (Jørgensen, Pandey, Jaskolska y Gerdes, 2008). No se encontraron reportes de genes relacionados con fibronectina tipo III en prófagos, sin embargo, se ha descrito el rol de éstos últimos en procesos de adhesión y subsecuente colonización (Matos *et al.*, 2013), por lo que es posible que la fibronectina contenida en este AGE se trate de una fibronectina presente en fagos aún no caracterizada. Por su parte, proteínas de la familia NlpC/P60 han sido identificadas en prófagos anteriormente (Vidová, Sramková, Tisáková, Oravkinová y Godány, 2014) y relacionados con virulencia en especies bacterianas de interés para salud pública, tales como *Mycobacterium tuberculosis* (Parthasarathy *et al.*, 2012) y *L. monocytogenes* (Yu, Yang y Guo, 2016). Su confirmación y estudio le podría dar a la especie un potencial médico/industrial, dado que las peptidoglicano hidrolasas son potencialmente utilizables como antimicrobianos o en control biológico. De forma similar, proteínas de la familia HicA (a la que pertenece YcfA) han sido reciente encontradas en prófagos de bacterias de importancia clínica, como *P. aeruginosa* (Li *et al.*, 2017) lo cual amplía la perspectiva de que los fagos contribuyen a la virulencia en esta especie particular. Empero, las toxinas de familia HicA se encuentran normalmente cerca de la antitoxina HicB, en sistemas toxina-antitoxina; la anotación automática realizada no identificó tal elemento en este AGE. Aunque es posible que la presencia únicamente del componente toxina de este TA esté relacionada con el cambio de fase lisogénica a lítica, es también factible que una de las 12 proteínas hipotéticas que se encuentran en el fago correspondan a la antitoxina faltante. El hecho que al realizar un *blastx* de la región no se encontraran *hits* para productos de este tipo resta peso a la última hipótesis.

El locus 14 contiene una toxina anotada como *VapD* y el gen que codifica para una proteína hipotética de 63 aminoácidos. Esta proteína pertenece a la familia Cas2, por lo que posee

actividad ribonucleasa, y se encuentra en módulos toxina-antitoxina (Kwon *et al.*, 2012; Mendes *et al.*, 2015). Dado que el locus no contiene la antitoxina, es posible que la proteína hipotética mencionada tenga esta función, sin embargo, al realizársele un *Blastp* sólo se encontró alta identidad con otras proteínas hipotéticas de cepas de *P. luminescens* no caracterizadas. Interesantemente, esta toxina se ha identificado principalmente en especies patógenas en mamíferos, tales como *Haemophilus influenzae* (Ren, Walker y Daines, 2012) y *Helicobacter pylori* (Kwon *et al.*, 2012).

El locus 26 tiene una distribución similar al anterior, esta vez con una toxina zeta (ζ) y una proteína hipotética de tamaño similar a una antitoxina épsilon (ϵ), los cuales usualmente forman módulos TA cromosomales altamente patogénicos (Mutschler y Meinhart, 2012). El *Blastp* de la secuencia de la proteína hipotética retorna secuencias de otras proteínas hipotéticas presentes en cepas de *P. luminescens*; esto no descarta que la proteína hipotética anotada en el genoma de la cepa CRCIA-P01 se trate de una antitoxina ϵ , pues es posible que la misma no haya sido identificada aún en ningún genoma. Se ha demostrado que los módulos TA ζ/ϵ estabilizan plásmidos de resistencia. Además, ζ fosforila a la UDP-N-acetilglucosamina, que a su vez inhibe a MurA, enzima involucrada en la síntesis de peptidoglicano, lo cual le confiere al módulo actividad bacteriotóxica (Mutschler, Gebhardt, Shoeman y Meinhart, 2011). Interesantemente, este módulo TA ha sido típicamente descrito en bacterias Gram-positivas (Zielenkiewicz y Ceglowski, 2005), sin embargo, su identificación en este genoma contribuye a la evidencia de que este tipo de TA también se encuentra en bacterias Gram-negativas (Rocker, 2015).

Los módulos toxina antitoxina se descubrieron en plásmidos, en los cuales aseguran que el mismo se conserve en la descendencia, ya que en caso de que exista segregación, la expresión de la toxina sin la antitoxina correspondiente resulta en arresto del crecimiento o muerte celular. Sin embargo, más recientemente se ha identificado gran cantidad de este tipo de módulo en los cromosomas bacterianos, para los cuales se han propuesto diversas funciones relacionadas con virulencia. Por ejemplo, se ha descrito su relación con procesos tales como: la sobrevivencia de la bacteria dentro de su huésped; regulación del crecimiento en respuesta a ambientes

desfavorables; muerte celular programada para aumentar la probabilidad de que parte de la población sobreviva; adaptación frente a ambientes hostiles, entre otros (Lobato-Márquez, Días-Orejas y García-del Portillo, 2016). La presencia de estos y otros módulos TA en la cepa CRCIA-P01 sugiere un importante potencial de virulencia.

El siguiente locus identificado que no se comparte con ninguna otra de las cepas de referencia contiene únicamente a la antitoxina *vapB*, que normalmente se encuentra en TA con *vapC* (Robson, Mckenzie, Cursons, Cook y Arcus, 2009). Esta observación es inesperada, ya que los TA normalmente se encuentran como operones (Chan, Balsa y Espinosa, 2015), y la toxina *vapB*, ni CDS similares, están anotados cerca del gen. Corriente abajo del gen (1500pb) se encuentra una región con varios ORFs sin anotar, sin embargo, al realizarle un Blastx a la región se identificó una secuencia que codifica para una antitoxina con dominio de unión a ADN de familia AbrB/MazE/SpoVT (identidad de 93%, E-value 1e-36), lo cual descarta la posibilidad de que la toxina esperada se encuentre en esta región. Tampoco es probable que esta situación de deba a un error de secuenciación pues no se encuentra cerca del fin de un *scaffold*, y en regiones circundantes se encuentran loci ordenados con funciones lógicas. Lo único adicional a esta observación es que el locus 77 contiene el TA completo, y de hecho no se comparte con las especies de referencia, así que al menos este loci cumple posiblemente una función.

El locus 40 codifica para tres proteínas que no se comparten con ninguna de las especies de referencia. Dos de estas corresponden a proteínas hipotéticas de *P. temperata*, mientras que la otra posee un dominio activador de Rho de factor necrotizante citotóxico. Este dominio permite a los factores citotóxicos necrotizantes desaminar la glutamina 63 de RhoA (o su homólogo estructural), lo cual inhibe su actividad GTPasa y lleva a una activación continua. Este cambio produce un genotipo característico en células de mamíferos relacionado con una modificación patológica de la actina del citoesqueleto, que produce aneuploidía, un fenotipo multinucleado, y necrosis (Knust y Schmidt, 2010). Se han descrito toxinas de esta familia en bacterias patógenas de humanos, tales como algunas cepas de *E. coli* (Fabbri, Travaglione y Fiorentini, 2010) y *Yersinia pseudotuberculosis* (Schweer *et al.*, 2013), y se ha observado que estas tienen efecto sobre las

células humanas. La identificación de este tipo de toxinas en la cepa en estudio nuevamente sugiere que esta posee potencial patogénico en otros eucariotas.

El locus 44 contiene 4 secuencias codificantes no compartidas con las cepas de referencia. De estas, *mig-14* y una peptidoglicano-O-acetiltransferasa se han relacionado particularmente con resistencia y patogenicidad (Sheng, Zhang, Xia, Xu, Xu y Huang, 2013; Moynihan, 2013). Se ha demostrado que la expresión de *mig-14* es inducida por sustancias antimicrobianas tales como polimixina B y protamina (Brodsky, Ernst, Miller, Falkow, 2002), y que esta promueve resistencia ante diversos péptidos antimicrobiales (Brodsky, Ghori, Falkow, Monack, 2005); esta proteína de membrana promueve la sobrevivencia de diversas especies del género *Salmonella* en macrófagos y persistencia en hospederos mamíferos (Sheng *et al.*, 2013). Por otro lado, las peptidoglicano-O-acetiltransferasas son proteínas integrales de membrana que O-acetilan el peptidoglicano, lo cual confiere resistencia a lisozima y por tanto aumentan la patogenicidad de las cepas en que se encuentra (Bera, Biswas, Herbert y Götz, 2006; Moynihan, 2013). Al realizar un *blastx* a la secuencia de la proteína hipotética se encuentra un *hit* para una proteína periplásmica de una cepa de *P. temperata* con dominio SGNH hidrolasa, el cual se encuentra en diversas acilhidrolasas relacionadas con virulencia en otras Gamma-proteobacterias, tales como *Mycobacterium bovis*, *S. enterica* y algunas especies del género *Vibrio* (Flores-Días, Mounturiol-Gross, Claire Naylor, Alape-Girón y Flieger, 2016). La presencia de estas secuencias sugiere nuevamente un importante potencial patogénico en otros eucariotas.

El siguiente locus no compartido (48) contiene nueve proteínas cuya relación no es clara. Contiene, en orden, una proteína con dominio similar a *SnoaL*, poliketido sintasa que participa en la síntesis de nogalamicina y otros antibióticos (Sultana *et al.*, 2005), una proteína anotada como fosfatasa de carbohidratos fosforilados, una proteína hipotética de 212 aminoácidos cuyo mejor *hit* corresponde a una proteína hipotética de *E. coli* (identidad 64%, E-value 6e-92, score 193), dos proteínas relacionadas con el metabolismo de ácido teicóico (TagH y TagG), una proteína de síntesis de lipopolisacáridos *Wave*, una dUMP fosfatasa (relacionada con la utilización de timina), una proteína bifuncional *GlmU* (relacionada con la síntesis de UDP-N-

acetilglucosamina), y una última proteína hipotética de 109 aminoácidos, con mejor *hit* a una proteína hipotética multiespecie del complejo *Enterobacter cloacae* (identidad 85%, E-value 4e-62, score 193). Quizá lo más paradójico de este locus es la presencia de proteínas relacionadas con síntesis y exportación de ácido teicóico, dado que esta modificación de pared celular sólo se ha descrito en bacterias Gram-positivas (Silhavy, Kahne y Walker, 2010). Existe reporte transportadores ABC de ácido teicóico (TagG) en bacterias Gram-negativas como *E. coli* (número de acceso WP_074477935.1) *Pantoea agglomerans* (WP_033767799.1) y *Yersinia enterocolitica* (WP_075337901.1), sin embargo, no se encontraron reportes de estudios funcionales o bioquímicos respecto a los mismos. Al realizar un *blastx* a toda la secuencia del locus se encuentra un panorama un poco distinto, pero que muestra una relación con el metabolismo y exportación de lipopolisacáridos de pared y cápsula celular. Se identificó una glicosil transferasa similar a BcbE, probablemente involucrada en biosíntesis de polisacáridos de cápsula (3,24e-41), una fosfatasa de familia HAD, relacionada con el transporte de carbohidratos (1,96e-23), una fosfodiesterasa de fosfolípidos y glicerofosfodiesteres (7,30e-42), una proteína transportadora de subfamilia KpsT/Wzt ABC, presuntamente involucrada en la exportación de polisacáridos capsulares o lipopolisacáridos (2,91e-66), una proteína con dominio TagG con función permeasa ABC involucrada en exportación de polisacáridos fosfato (9,55e-36), dos proteínas de síntesis de lipopolisacáridos WavE (9.59e-15 y 2.74e-30) que rodean una proteína identificada como YjjG (1.21e-08), enzima que corta nucleótidos con bases no canónicas, y finalmente una glicosil transferasa similar a BcbE (3.61e-57) que aparentemente se encuentran relacionadas con la biosíntesis de cápsula de polisacáridos. En relación con esto, es importante recordar que los lipopolisacáridos y la cápsula de polisacáridos se consideran factores de virulencia en otras enterobacterias, como *E. coli*, pues intervienen en procesos tóxicos y de resistencia (Nesper *et al.*, 2002; Goller y Seed, 2010).

Los loci 61, 65 y 66 contienen un elemento relacionado con función predicha de resistencia que no se comparte con las especies de referencia: dos proteínas similares a Abi (61 y 66) y la proteína de unión a penicilina MrcB (65). Las proteínas Abi son metaloproteasas de membrana que confieren autoinmunidad a bacteriocinas, por medio de un mecanismo desconocido (Kjos,

Snipen, Salehian, Nes y Diep, 2010). Esta proteína podría por tanto estar involucrada en proteger a la cepa en estudio contra bacteriocinas. Por su parte MrcB es una proteína que participa en la formación de la pared celular cuyo dominio transglicosilasa es insensible a la penicilina (Sung *et al*, 2009), su presencia en la cepa podría conferirle cierto grado de resistencia frente a este antibiótico. Es importante mencionar que se ha reportado la presencia de *mrcB* en otras cepas de *P. luminescens* (accesión ENA: CAE13178.1).

Otra proteína mig-14 fue identificada en el locus 68, junto con una glicosil transferasa de familia 25. Este tipo de proteína participa en la síntesis de lipopolisacáridos, los cuales son componentes importantes de la pared celular relacionados con virulencia (Cross, 2008). Este arreglo ha sido observado y relacionado con síntesis de lipo y exopolisacáridos en *Pseudomonas alkylphenolia* (Veeranagouda, Lee, Cho, Cho y Lam, 2010).

Los loci 71 y 72 contienen los TA *yafQ/dinJ* y *vapC/vapB1*, los cuales parecen no compartirse con las especies de referencia. YafQ es una endoribonucleasa que corta selectivamente codones de ARNm posicionados en el sitio A del ribosoma, produciendo inhibición del crecimiento o incluso muerte celular. En condiciones normales la antitoxina DinJ forma un complejo estable con YafQ neutralizando su toxicidad. En condiciones de estrés, proteasas dependientes de ATP eliminan a DinJ, inhibiendo el crecimiento. (Liang, Gao, Zhang, Dong, Liu, 2014). Se ha descrito cómo YafQ incrementa la persistencia, involucrando este TA en la capacidad de generar infecciones persistentes (Hu, Kwan, Osbourne, Denedik y Wood, 2015). VapC y VapB1 pertenecen al tipo más prevalente de módulos TA presentes en bacterias y arqueas, la familia VapBC (McKenzie *et al.*, 2012). Las VapCs de diferentes especies de bacterias patógenas en humanos, tales como *M. tuberculosis*, *S. flexneri* y *H. influenzae*, parecen ejercer un efecto bacteriostático mediante el corte de varios ARNt, particularmente ARNt^{fmet} (Lopes *et al.*, 2014), el cual se relaciona también con sobrevivencia al estrés e infección latente (Cruz *et al.*, 2014). La presencia de estos dos módulos TA probablemente contribuyen a que la cepa en estudio sobreviva en el ambiente estresante del hemocoelo del insecto a colonizar.

El locus 80 contiene 5 CDSs no compartidas: un segmento anotado como el gen *yeeF*, otro como *hpmA*, que codifica para una hemaglutinina, y 3 proteínas hipotéticas de 38, 111 y 225 aminoácidos. El gen *yeeF*, identificado por primera vez en *B. subtilis*, codifica para una proteína con actividad ARNasa que probablemente inhibe el crecimiento de forma similar a YafQ y VapCAI; así mismo se cree que su actividad es neutralizada por la antitoxina YezG, sin embargo, este sistema no se ha caracterizado tan bien como los anteriormente mencionados (Holberger, Garza-Sánchez, Lamoureux, Low y Hayes, 2012). Es importante mencionar que la secuencia anotada como *hpmA* codifica únicamente para 157 aminoácidos, mientras que las hemaglutininas son proteínas más largas (1500-1600 aminoácidos). Probablemente esta anotación corresponde a la identificación de un dominio conservado DUF637 (identificado por *blastx*), encontrado en hemolisinas y hemaglutininas. Finalmente, al realizar *blastp* a la secuencia de las proteínas hipotéticas no se encuentra ningún *hit* con función conocida, aún más, únicamente la segunda parece poseer un dominio conservado, DUF600, el cual carece de función conocida. Este locus carece de una función clara, sin embargo, podría estar relacionado con virulencia por la presencia del dominio relacionado con hemaglutinina. Así mismo, podría estudiarse con mayor detalle la función del gen anotado como *yeeF*, ya que en el locus no se identificó su antitoxina, ni se reconocieron dominios que den indicio de su presencia al realizar un *blastx* a esta región.

El locus 98 también contiene una proteína que se supone pertenece a un módulo TA que no se comparte con las cepas de referencia. El locus tag PROKKA_04288 codifica para una proteína similar a YcfA, las cuales a su vez pertenecen a la familia de interferasas de ARNm HicA y se encuentran en este tipo de elementos (Jorgensen, Pandey, Jaskolska y Gerdes, 2008). Este locus posee además una proteína hipotética cuyo *blastp* no regresa *hits* con dominios o función conocida. Este mismo resultado se obtiene al realizar un *blastx* de toda la región. Para este elemento tampoco se identificó la antitoxina esperada. Esto puede deberse a que estos se encuentran menos caracterizados, por lo que las bases de datos disponibles para anotación de genomas no tienen gran capacidad para denotarlos.

El locus 101 contiene 22 productos génicos predichos, dos de los cuales son proteínas de multiplicación intracelular y muerte de macrófago humano y el resto corresponden a proteínas hipotéticas de función desconocida. El primer tipo de proteínas tienen dominios relacionados con lcmF, los cuales parecen tener función en cuanto a adherencia a células epiteliales, motilidad y frecuencia de conjugación en *V. cholerae* (Das, Chakraborty, Banerjee, Chaudhuri, 2002); además, se han relacionado con sistemas de secreción tipo VI en *Agrobacterium tumefaciens* (Ma, Lin, Lai, 2009). En congruencia con lo anterior, al realizar un *blastx* a esta región las secuencias identificadas como lcmFs muestran identidad cercana al 80% con el componente VskK de un sistema de secreción tipo VI de diferentes especies de *Photobacterium*. Interesantemente éstos son los dos únicos hits que se obtienen, ninguna de las proteínas hipotéticas genera hits con puntajes suficientemente altos para que se reporten, ni parecen poseer dominios conservados conocidos. La presencia de los lcmF en la cepa denota nuevamente una alta virulencia, y la de tal número de proteínas hipotéticas, un potencial que podría explorarse por otros métodos.

El locus 102 contiene 6 CDSs no compartidas que incluyen la antitoxina *higA*, la ADN invertasa *hin*, una proteína de resistencia a bleomicina, una secuencia anotada como condramida sintasa (*cmdD*), y dos proteínas hipotéticas. *higA* forma también parte de un módulo TA, sin embargo, su función parece ser distinta a la de los presentados anteriormente. Recientemente se demostró que la toxina de este módulo, HigB, disminuye la producción de pioquelinas y piocianinas (metabolitos secundarios con rol crucial en infección), la formación de biofilms y motilidad de *P. aeruginosa*; HigA funciona como una proteína antitoxina eliminando este efecto, por medio de un mecanismo desconocido (Wood y Wood, 2016). La anotación con PROKKA no identificó a *higB* junto a su antitoxina, sin embargo, al realizar *blastx* al locus se identificó un dominio de toxina ParE en la secuencia de una de las proteínas hipotéticas del locus, 100 pares de bases corriente abajo de la misma; considerando que se ha reportado similitud significativa entre las toxinas ParE y HigB (Gerdes, Christensen y Løbner-Olesen, 2005), es posible que en esta región se encuentre un elemento similar a ambos, pero lo suficientemente distinto para no ser identificado por la anotación con PROKKA. La invertasa o recombinasa Hin posee la capacidad de cortar el ADN en

una región específica y unirlo nuevamente. El corte con esta enzima promueve la inversión de un fragmento de cerca de 1kb entre dos sitios de recombinación *hix* del cromosoma de *Salmonella enterica*. Esta inversión genera un cambio de orientación en un protomor, promoviendo un cambio hacia fase flagelar (Kutsukake, Nakashima, Tominaga y Abo, 2006; Dhar, McLean, Heiss y Johnson, 2009). Como se mencionó en el marco teórico, un *switch* similar determina el cambio entre la forma patogénica y mutualista en *P. luminescens*, de forma tal que no es exagerado pensar que este gen esté relacionado con un proceso similar en la cepa en estudio. Corriente debajo de esta invertasa se encuentra una secuencia identificada como *ble*, gen que codifica para una proteína de resistencia a bleomicina. Este tipo de compuestos corresponden a oligopéptidos glicosilados que cortan el ADN o ARN, por lo que poseen actividad antibiótica y antitumoral (Hecht, 2013). La presencia de este gen se ha relacionado la presencia de *bla_{NDM-1}*, gen que confiere resistencia a antibióticos de tipo carbapenemas en *Enterobacterias* (Dortet, Nordmann y Poirel, 2012). Este gen no fue identificado por PROKKA ni por el *blastx* del locus, sin embargo, esto podría deberse a fallas en la anotación, por lo que sería factible estudiar este tipo de resistencia *in vitro*, ya que la resistencia a este tipo de antibióticos es un asunto de importancia para la Salud Pública (Lutgring y Limbago, 2016). Este locus también posee una secuencia anotada como *cmdD*. Las condramidas pertenecen a una familia de depsipeptidos con actividad antitumoral y antifúngica producidos por mixobacterias (Wenzel y Müller, 2010), por lo que su presencia en esta cepa es inesperada, sin embargo, algunas observaciones contradicen esta hipótesis. La proteína codificada por este gen en *Chondromyces crocatus* (Rachid *et al.*, 2006) es de 3912 aminoácidos, mientras que la región en la cepa de referencia codifica para solo 132. Al realizar *blastx* a la secuencia se identifica un dominio conservado de condensación (pfam00668) presente en enzimas que sintetizan péptidos antibióticos. Corriente arriba de este elemento se encuentra una proteína hipotética que contiene cerca de 30 aminoácidos reconocidos por *blastp* como el mismo tipo de dominio hacia el final de su secuencia, por lo que es posible que en realidad ambas anotaciones correspondan a una sola proteína de mayor tamaño con ésta función. Además, la proteína anotada como *cmdD* se encuentra hacia el final de un *scaffold*, por lo que es posible el ensamblaje tenga un error, la proteína continúe, y se trate de una anotación correcta o de una proteína con función similar.

Interpretación de presencia de AGEs relacionados con virulencia con respecto a las diferentes especies de referencia. Posible nicho ecológico.

De los 103 elementos accesorios potencialmente relacionados con virulencia identificados en la cepa CRCIA-P01 con respecto a todas las de referencia, 33 se comparten enteramente y 37 parcialmente con *P. luminescens* TT01, 12 se comparten completamente y 35 parcialmente con *P. temperata thracensis* DSM1519, y 4 se comparten completamente (3 de los cuales también se comparten con *P. luminescens*) y 20 parcialmente con *P. asymbiotica* ATCC43949. Este panorama general sigue el patrón que se observa en los otros apartados, sugiriendo que la cepa en estudio es más cercana y posiblemente tiene un nicho ecológico similar al de *P. luminescens* y *P. temperata*, es decir, entomopatógeno. Dicha observación se amplía en los subapartados siguientes.

Elementos compartidos con *P. luminescens* TT01.

Se encontraron 16 loci totalmente compartidos únicamente con *P. luminescens*, los cuales se relacionan fundamentalmente con virulencia.

De estos, el locus 11 parece estar relacionado con el metabolismo de hierro y virulencia por sideróforos, por la presencia de una permeasa de sistema de transporte de hemina (HmuU), una permeasa de sistema de transporte de sideróforo (YfhA), la reductasa de hierro férrico FhuF y una aerobactina sintetasa (*iucC*), la cual participa en la síntesis de aerobactina, sideróforo que se ha relacionado con virulencia en *E. coli* (Gao *et al.*, 2012) y *Klebsiella* (Russo *et al.*, 2014). El metabolismo del hierro ha sido relacionado con la virulencia de *P. luminescens* sobre insectos, lo cual refuerza esta observación (Watson, Millichap, Joyce, Reynold y Clarke, 2010) y la cercanía entre el nicho de esta cepa y la en estudio.

Otros 5 loci compartidos únicamente con esta cepa parecen contener componentes de TAs. El locus 12 contiene al TA *higA/higB* descrito anteriormente como parte de un TA; en este caso se encuentra la antitoxina y toxina en la cepa en estudio, sin embargo, estas se corresponden con dos elementos identificados como un regulador transcripcional y una proteína hipotética de

función desconocida. Considerando que esta región posee 72% de identidad, es posible que se traten de elementos en realidad no compartidos. Los loci 13 y 50 contienen a *relE* junto con una proteína hipotética en la cepa en estudio, y el primero una proteína de estabilización de plásmido en la cepa de referencia; esto también sugiere que probablemente alguno de los elementos está anotado incorrectamente. Por su lado, el locus 49 contiene el TA *parE4/parD1*, que, aunque posea actividad y nombre similar a *parDE* expuesto anteriormente, se trata de elementos diferentes cuyas antitoxinas no muestran actividad sobre la toxina del otro TA (Fiebig, Rojas, Siegal-Gaskins, Crosson, 2010). El locus 67 contiene a *fitBA*, módulo que en *N. gonorrhoeae* se ha relacionado con habilidad para atravesar la capa de células epiteliales y proliferación intracelular (Hopper, Vasquez y Merz, 2000) por lo que su presencia en el cromosoma de la cepa cumple una función similar de persistencia. El locus 7 comparte el mismo par que el locus 49, por lo que su función podría ser similar. Nuevamente se denota la presencia de una gran cantidad de elementos similares a TA que podrían tener un rol importante en generar infecciones persistentes y fenotipos resistentes, los cuales contribuyen a la virulencia de la cepa en estudio.

De los elementos restantes compartidos únicamente con esta cepa cabe destacar que facilitan el proceso de colonización (como *TcpE* en el locus 103, *TcpT* en el 104, *Ail* en el 2 y 45), toxicidad (*shlB* en el 24, *hlyD* en el 19 y *cvaA* en el 70) y competencia con otras bacterias una vez que el insecto perece (*stp* en el 15, *ArnA* en el 51, *grsB* en el 55) sugiere que esta cepa cumple con un nicho ecológico entomopatogénico similar al de *P. luminescens*.

Elementos compartidos con P. temperata thracensis DSM1519.

Se encontraron 5 loci completamente compartidos únicamente con la cepa de referencia *P. temperata thracensis* DSM1519, de los cuales 4 corresponden a o contienen parte de módulos TA. Específicamente los loci 6 y 9 contienen los TA *ccdB/ccdA* y *mqsA/mqsR*, respectivamente, los cuales han sido relacionados con persistencia y patogenicidad (Wen, Behiels, Devreese, 2014), igual que muchos de los TA descritos en el presente documento.

El locus 17 contiene otra anotación de la antitoxina *dinJ* que, en este caso, se encuentra en una región con 68% de identidad, tres puntos por encima del mínimo para considerarse compartida, con una proteína inducible por daño J, presente en *Yersinia pseudotuberculosis*. En la cepa de referencia esta proteína aparece junto al gen *relE*, mientras que en la cepa de referencia no existe ninguna toxina anotada en la vecindad, lo cual es atípico según lo explicado anteriormente. Esta observación puede explicarse pues RelB, antitoxina de RelE, pertenece a la misma familia (IPR007337) que DinJ; según la forma en que se presentan los módulos TA es probable que la proteína inducible por daño J se trate en realidad de RelB, y que este locus no se comparta en realidad. Para confirmar esta hipótesis sería necesario hacer un estudio a nivel de proteína o resecuenciar esta región.

El locus 25 tienen la particularidad de poseer un solo componente de un TA. En el caso del segundo contiene un segmento que codifica para una proteína anotada como YafO y una proteína hipotética corriente arriba, los cuales se corresponden con dos elementos anotados simplemente como antitoxina y toxina en la cepa de referencia. Esto sugiere que la proteína hipotética en realidad corresponde a la antitoxina del módulo y que quizá ambas se traten de YafN, la antitoxina del módulo. Esta proteína también corresponde a interferasa de ARN similar a VapD (Guglielmini y Melderer, 2011) por lo que probablemente que tiene un rol similar en persistencia.

El último locus compartido únicamente con *P. temperata* es el 79. Este contiene la proteína PipB2, que en *Salmonella enterica* afecta la distribución de endosomas tardíos (Knodler y Steele-Mortimer, 2005) y se ha relacionado con virulencia en el mismo género (Baisón-Olmo, Cardenal-Muñoz y Ramos-Morales, 2012), lo cual sugiere que ambas especies poseen un mecanismo que podría ayudar a evadir la respuesta inmune del insecto al que coloniza que no se comparte con las otras especies. Este locus además contiene dos segmentos anotados como *novN* que, sin embargo, codifican para productos considerablemente más cortos (336 y 168 aminoácidos) que esta proteína (677 aminoácidos en *Streptomyces niveus*) lo cual sugiere que se trata de una anotación incorrecta. Su función no se puede deducir en este momento.

El locus 32, compartido parcialmente con esta especie, contiene 8 genes aparentemente relacionados con síntesis de neamina (*btrB*, *btrL* y *btrP*) y neomicina (*neoB*). Sin embargo, es posible que se trate de una anotación incorrecta dado que no se encuentran todos los genes involucrados para la síntesis de dichos antibióticos.

Elementos compartidos con *P. asymbiotica* ATCC43949.

El único elemento completamente compartido sólo con *P. asymbiotica* ATCC43949 es una proteína similar a la toxina B de *Clostridioides difficile*. Esta toxina juega un papel primordial en la virulencia de dicha especie sobre mamíferos (Kuehne *et al.*, 2010) por lo que su presencia en *P. asymbiotica* tiene sentido, y podría sugerir que la cepa en estudio posee también esta capacidad. Sin embargo, las otras especies de referencia presentan un locus que codifica para una citotoxina con múltiples regiones con entre 55% y 80% de identidad, lo cual sugiere que en realidad todas las cepas poseen toxinas similares a TcdB. El hecho que en la secuencia de *P. asymbiotica* la toxina también se identifique como citotoxina y no específicamente como toxina B sustenta la segunda hipótesis.

Se encontraron dos loci parcialmente compartidos con *P. asymbiotica* ATCC43949 que no se comparten con las demás. El 39 contiene las secuencias compartidas que codifican para la proteína E de biosíntesis de pilus corregulada por toxinas (TcpE), la proteína E predicha de sistema de secreción tipo II (GspE), un precursor de lipoproteína de membrana externa (BfpB) y una proteína accesoria de pilina (PROKKA_01664). *tcpE*, *gspE* y *bfpB* han sido caracterizados y relacionados con virulencia en *V. cholerae*, (Lu *et al.*, 2013, Kolappan y Craig, 2013) y *E. coli* (Lieberman *et al.*, 2012). El único elemento que no se comparte se encuentra al principio del locus y corresponde a una proteína de sistema de secreción tipo IV (PtlH), en cuyo lugar se encuentra una transposasa de *P. asymbiotica* por lo que es posible que antes del locus se haya insertado un elemento transponible en la cepa de referencia de *P. asymbiotica*.

Por otro lado, el locus 76 contiene el módulo TA *parDE*. Las toxinas de este módulo muestran actividad inhibitoria sobre la ADN girasa, dándole el rol clásico de evitar la segregación de plásmidos; incluso en *V. cholerae* se ha observado esta función con respecto a la segregación de sus dos cromosomas (Yuan, Yamaichi y Waldor, 2010), sin embargo la presencia de este TA en el cromosoma de *M. tuberculosis* se ha relacionado recientemente con la función de dormancia, resistencia a antibióticos e infección prolongada descrita anteriormente (Gupta *et al*, 2016); dado que la cepa en cuestión no posee dos cromosomas, es probable que su función sea más similar a la que presenta en *M. tuberculosis*. Este locus incluye también el gen de la antitoxina *mazE* sin que se encuentre anotada a su toxina *mazF*, ni otra similar. Al realizar *blastx* de este locus se encuentran varios hits de toxinas y antitoxinas con dominio MazE de diversas cepas de *Photorhabdus* y otras enterobacterias.

La no identificación de otros genes que den indicio de patogenicidad ante mamíferos ayuda a confirmar el hecho que el nicho ecológico de la cepa en estudio probablemente no es ser el ser humano u otros mamíferos, como sucede con las otras dos cepas de referencia. Además, se identificaron secuencias que codifican para presuntos elementos relacionados con virulencia en general, que podrían hacerse adquirido de forma concomitante, o más bien que se hayan preservado en ambas cepas, y perdido en las demás.

El presente análisis confirma lo reportado por otros autores (Tobias *et al*, 2016) en cuanto a que, si bien *P. asymbiotica* se ha adaptado a infectar huéspedes humanos, aún comparte precursores de quitinasa (*chiA*), proteínas relacionadas con síntesis de antibióticos (NovN, TycC) y de resistencia a los mismos (betalactamasa (PROKKA_00946), Bcr, BepE), así como diversas toxinas relacionadas con la patogénesis en insectos, la competencia con otras bacterias por el cadáver del mismo, y el mantenimiento de una infección monoxénica en su huésped.

Como se muestra en los resultados, salvo en los casos de los loci 10, 81 y 83, en los que solo se comparten proteínas hipotéticas, los otros elementos compartidos parcialmente con esta cepa de referencia también se comparten con *P. luminescens* y se comparten más elementos con dicha

cepa de referencia, lo cual es congruente con su relación más cercana, y con que las cepas de referencia de *P. luminescens*, *P. temperata* y la CRCIA-P01 poseen un nicho ecológico entomopatogénico similar.

Limitaciones técnicas.

El presente proyecto representa un primer paso exploratorio en el genoma de la cepa aislada, ante la sospecha de que se trate de una nueva especie. La tecnología utilizada se eligió considerando una relación sensata entre calidad de la información generada, costo y tiempo, por lo cual tiene ciertas limitaciones que han de exponerse y discutirse, de forma tal que el resto del trabajo se interprete a la luz de sus características.

La secuencia utilizada para los análisis se obtuvo utilizando un equipo Illumina Miseq mediante secuenciación *shotgun* y ensamblando la secuencia con el programa a5. Este tipo de equipo genera lecturas con una longitud de 300pb, por lo que regiones repetitivas más largas se identifican como el mismo elemento. Este tipo de secuencia también tienden a generar problemas al ser identificadas como cercanas, uniendo regiones en realidad distantes en la secuencia (Zhong *et al*, 2003). También es importante mencionar que la unión de los fragmentos en *scaffolds* depende en gran parte de que se generen regiones que se traslapen, y esto a su vez depende del largo de las lecturas (Ekblom y Wolf, 2014). Si bien el equipo utilizado ha demostrado ser apropiado para realizar secuenciación de genomas pequeños (Clooney *et al.*, 2016) sigue siendo probable que existan ciertas discrepancias con respecto a la secuencia real, sin embargo, este sistema es apropiado para un primer acercamiento, y muchas veces suficiente para realizar una anotación de calidad.

A pesar de sus ventajas de ser rápido, local y bastante certero, PROKKA se basa en Prodigal para encontrar genes candidatos (Seemann, 2014), este sistema utiliza predicción *ab initio* con puntaje (Hyatt *et al*, 2010), el cual es muy sensible, pero aumenta la ocurrencia de falsos positivos, es decir, de identificar regiones como genes que no lo son. Para anotar los productos PROKKA compara la secuencia del producto génico con diversas bases de datos de forma jerárquica,

inicialmente una definida por el usuario, que se considera confiable y relevante para el genoma a anotar, luego usando las proteínas bacterianas presentes es UniProt, luego contra los genomas terminados de RefSeq para un género específico, y finalmente bases de modelo oculto de Márkov, como Pfam. Una vez que se encuentra un *hit* con $E < 10^{-6}$ se realiza la anotación y el proceso se detiene (Seemann, 2014). El valor de E describe la cantidad de *hits* que se puede esperar encontrar por casualidad al buscar en una base de datos de un tamaño particular, es decir, da idea del “ruido de fondo”. Un valor de E cercano a cero se interpreta como un resultado más “significativo”. Es importante considerar que este valor umbral es considerado significativo por *blast* del NCBI, sin embargo, es común encontrar valores de E del orden de 10^{-40} , por lo que el valor umbral de PROKKA no es particularmente estricto.

Al delimitar los elementos genómicos compartidos y no compartidos se encontraron varias anotaciones para el mismo gen, algunas compartidas y otras no, lo cual señala un error. Al comparar las secuencias de sus productos se visualizaron diferencias considerables en su secuencia de aminoácidos, y al realizarles *blast* se solía encontrar *hits* para genes o proteínas distintas, con dominios similares. Así mismo, elementos supuestamente compartidos según *spine* y comprobados por ACT (homología <65% por *blastx*) aparecían anotados como productos distintos, algunas veces no relacionados. Esta situación se debe probablemente a la calidad de los genomas de referencia que PROKKA utiliza para anotar, ya que este programa transfiere primero los mejores *hits* de *blast* y luego los de Uniprot, sin corroborar que las anotaciones funcionales de entrada sean correctas. Además, como la anotación no se basa en un alineamiento completo, la anotación del producto no es sensible al tamaño del mismo, es decir, si existe un fragmento similar en dos proteínas de diferente tamaño, el programa la anota como tal. Este problema se soluciona curando manualmente la anotación final, pero este es un proceso muy demandante de tiempo y escapaba a los objetivos del trabajo.

Conclusiones y recomendaciones

Conclusiones

- El análisis filogenético y de distancia genoma-genoma sugiere que la cepa en estudio se trata de una nueva especie del género *Photorhabdus*.
- La cepa en estudio posee una importante cantidad de genes relacionados con virulencia, algunos de los cuales no se comparten con ninguna de las cepas de referencia que se utilizaron en el estudio.

Recomendaciones

- Realizar una categorización taxonómica polifásica, que incluya criterios fenotípicos tales como morfología y caracterización quimiotaxonómica, además de los criterios genéticos ya presentados.
- Anotar manualmente el genoma y secuenciarlo con una tecnología que genere scaffolds más largos.
- Realizar estudios funcionales, genómicos y proteómicos para comprobar el potencial de virulencia reportado en el análisis in silico.

Literatura citada

- Abedon, S. T., & LeJeune, J. T. (2005) Why bacteriophage encode exotoxins and other virulence factors. *Evolutionary Informatics Online*, 1, 97–110.
- Acinas, S.G., Marcelino, L.A., Klepac-Ceraj, V., Polz, M.F. (2004) Divergence and redundancy of 16s rRNA sequences in genomes with multiple RRN operons. *Journal of Bacteriology*, 186:9, 2629-2635.
- Ahantarig, A., Chantawat, N., Waterfield, N.R., French-Constant, R., Kittayapong, P. (2009) PirAB toxin from *Photorhabdus asymbiotica* as a larvicide against dengue vectors. *Applied and Environmental Microbiology*, 75, 4627–4629.
- Ali, A., Soares, S.C., Barbosa, E., Santos, A.R., Bahr, D., Bakhtlar, S.M., Hassan, S.S. (...) Azevedo, V. (2013) Microbial comparative genomics: an overview of tools and insights in the genus *Corynebacterium*. *Bacteriology & Parasitology*, 4(2),
- Auch, A. F., Klenk, H.-P., & Göker, M. (2010) Standard operating procedure for calculating genome-to-genome distances based on high-scoring segment pairs. *Standards in Genomic Sciences*, 2:1, 142–148.
- Auch, A. F., von Jan, M., Klenk, H.-P., & Göker, M. (2010) Digital DNA-DNA hybridization for microbial species delineation by means of genome-to-genome sequence comparison. *Standards in Genomic Sciences*, 2(1), 117–134.
- Baisón-Olmo, F., Cardenal-Muñoz, E., Ramos-Morales, F. (2012) PipB2 is a substrate of the *Salmonella* pathogenicity island 1-encoded type III secretion system. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 423(2), 240-6.
- Bera, A., Biswas, R., Herbert, S., Götz, F. (2006) The presence of peptidoglycan O-acetyltransferase in various staphylococcal species correlates with lysozyme resistance and pathogenicity. *Infection and Immunity*, 74(8), 4598-604.
- Bertelli, C., Laird, M.R., Williams, K.P., SFU Research Computing Group, Lau, B.Y., Hoad, G.L., Winsor, G.L., and Brinkman, F.S.L. (2017) "IslandViewer 4: Expanded prediction of genomic islands for larger-scale datasets", *Nucleic Acids Research*, 2017 May 2.
- Blackburn, D., Crawford, B., Shapiro-Ilan, D.I., Adams, B.J. (2016). Environmental drivers of trait changes in *Photorhabdus luminescens*. *Biological Control*, 92, 145-152.
- Bowen, D., Rocheleau, T.A., Blackburn, M., Andreev, O., Golubeva, E., Bhartia, R., French-Constant, R.H., (1998) Insecticidal toxins from the bacterium *Photorhabdus luminescens*. *Science*, 280, 2129–2132.

- Brodsky, I.E., Ernst, R.K., Miller, S.I., Falkow, S. (2002) Mig-14 is a *Salmonella* gene that plays a role in bacterial resistance to antimicrobial peptides. *Journal of Bacteriology*, 184(12), 3203-13.
- Brodsky, I.E., Ghori, N., Falkow, S., Monack, D. (2005) Mig-14 is an inner membrane-associated protein that promotes *Salmonella typhimurium* resistance to CRAMP, survival within activated macrophages and persistent infection. *Molecular Microbiology*, 55(3), 954-72.
- Carver, T. J., Rutherford, K. M., Berriman, M., Rajandream, M., Barrell, B. G., & Parkhill, J. (2005). ACT: the Artemis comparison tool. *Bioinformatics*, 21(16), 3422-3423. doi:10.1093/bioinformatics/bti553
- Ciche, T. A., Blackburn, M., Carney, J. R., Ensign, J. C. (2003). Photobactin: a catechol siderophore produced by *Photorhabdus luminescens*, an entomopathogen mutually associated with *Heterorhabditis bacteriophora* nc1 nematodes. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(8), 4706-4713.
- Ciche, T.A., Kim, K., Kaufmann-Daszczuk, B., Nguyen, K.C.Q, Hall, D.H. (2008). Cell invasion and matricide during *Photorhabdus luminescens* transmission by *Heterorhabditis bacteriophora* nematodes. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(8), 2275-2287.
- Clarke, D.J. (2008) *Photorhabdus*: a model for the analysis of pathogenicity and mutualism. *Cellular Microbiology*, 10, 2159-2167.
- Clarke, D.J. (2014) The genetic basis of the symbiosis between *Photorhabdus* and its invertebrate hosts. *Advances in Applied Microbiology*, 88, 1 – 29.
- Clarke, D.J. (2016) The regulation of secondary metabolism in *Photorhabdus*. *Current Topics In Microbiology and Immunology* [Epub ahead of print].
- Clooney AG, Fouhy F, Sleator RD, O’ Driscoll A, Stanton C, Cotter PD, et al. (2016) Comparing apples and oranges?: next generation sequencing and its impact on microbiome analysis. *PLoS ONE* 11(2): e0148028.
- Cross, A. S. (2008). What is a virulence factor? *Critical Care*, 12(6), 196.
- Cruz, J. W., Sharp, J. D., Hoffer, E. D., Maehigashi, T., Vvedenskaya, I. O., Konkimalla, A., . . . Woychik, N. A. (2015). Growth-regulating *Mycobacterium tuberculosis* VapC-mt4 toxin is an isoacceptor-specific tRNase. *Nature Communications*, 6, 7480.
- Chan, W.T., Balsa, D., Espinosa, M. (2015). One cannot rule them all: Are bacterial toxins-antitoxins druggable? *FEMS Microbiology Reviews*, 39(4), 522–540.
- Daborn, P.J., Waterfield, N., Silva, C.P., Au, C.P., Sharma, S., ffrench-Constant, R.H. (2002) A single *Photorhabdus* gene, makes caterpillars floppy (*mcf*), allows *Escherichia coli* to persist

- within and kill insects. *Proceedings of the National Academy of Science U.S.A*, 99, 10742–10747.
- Das, S., Chakraborty, A., Banerjee, R., Chaudhuri, K. (2002) Involvement of in vivo induced *icmF* gene of *Vibrio cholerae* in motility, adherence to epithelial cells, and conjugation frequency. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 295(4); 922-928.
- Dauga, C. (2002) Evolution of the *gyrB* gene and the molecular phylogeny of *Enterobacteriaceae*: a model molecule for molecular systematic studies. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52, 531-547.
- Derzelle, S., Duchaud, E., Kunst, F., Danchin, A., Bertin, P. (2002) Identification, characterization, and regulation of a cluster of genes involved in carbapenem biosynthesis in *Photorhabdus luminescens*. *Applied Environmental Microbiology*. 68(8), 3780-9.
- Dhar, G., McLean, M.M., Heiss, J.K., Johnson, R.C. (2009) The Hin recombinase assembles a tetrameric protein swivel that exchanges DNA strands. *Nucleic Acids Research*, 37(14), 4743-56.
- Dortet, L., Nordmann, P., & Poirel, L. (2012). Association of the emerging carbapenemase ndm-1 with a bleomycin resistance protein in *enterobacteriaceae* and *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56(4), 1693–1697.
- Dowling, A.J., Daborn, P.J., Waterfield, N.R., Wang, P., Streuli, C.H., French-Constant, R.H. (2004) The insecticidal toxin Makes caterpillars floppy (Mcf) promotes apoptosis in mammalian cells. *Cellular Microbiology*, 6, 345–353.
- Duchard, E., Rusniok, C., Frangeul, L., Buchrieser, C., Givaudan, A., Taourit, S., ... Kunst, F. (2003). The genome sequence of the entomopathogenic bacterium *Photorhabdus luminescens*. *Nature Biotechnology*, 21, 1307-1313.
- Edwards, D.J., Holt, K.E. (2013) Beginner's guide to comparative bacterial genome analysis using next-generation sequence data. *Microbial Informatics and Experimentation*, 3(2), 2.
- Ekblom, R. and Wolf, J. B. W. (2014), A field guide to whole-genome sequencing, assembly and annotation. *Evolutionary Applications*, 7, 1026–1042.
- Eleftherianos, I., Joyce, S., French-Constant, R.H., Clarke, D.J., Reynolds, S.E. (2010) Probing the tri-trophic interaction between insects, nematodes and *Photorhabdus*. *Parasitology*, 137, 1695–1706.
- Fabbri, A., Travaglione, S., Fiorentini, C. (2010). *Escherichia coli* cytotoxic necrotizing factor 1 (cnf1): toxin biology, in vivo applications and therapeutic potential. *Toxins*, 2(2), 283–296.
- Ferreira, T., van Reenen, C.A., Endo, A., Taillez, P., Pages, S., Spröer, C., Malan, A.P., Dicks, L.M.T. (2014) *Photorhabdus heterorhabditis* sp. nov., a symbiont of the entomopathogenic

- nematode *Heterorhabditis zealandica*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 64, 1540-1545.
- French-Constant, R. H., y Dowling, A. J. (2014) Chapter Seven - *Photorhabdus* Toxins. En S. D. a. S. S. G. Tarlochan (Ed.), *advances in insect physiology* (Vol. 47, pp. 343-388): Academic Press.
- Fiebig A., Castro Rojas C.M., Siegal-Gaskins D., Crosson S. (2010) Interaction specificity, toxicity and regulation of a paralogous set of ParE/RelE-family toxin-antitoxin systems. *Molecular Microbiology*, 77:236-251.
- Flores-Díaz, M., Monturiol-Gross, L., Naylor, C., Alape-Girón, A., Flieger, A. (2016) Bacterial sphingomyelinases and phospholipases as virulence factors. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 80, 597–628.
- Gao, Q., Wang, X., Xu, H., Xu, Y., Ling, J., Zhang, D., . . . Liu, X. (2012). Roles of iron acquisition systems in virulence of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: salmochelin and aerobactin contribute more to virulence than heme in a chicken infection model. *BMC Microbiology*, 12(1), 143.
- Gerdes, K., Christensen, S. K., & Løbner-Olesen, A. (2005). Prokaryotic toxin–antitoxin stress response loci. *Nature Reviews Microbiology*, 3(5), 371-382.
- Gerrard, J., Waterfield, N., Vohra, R., French-Constant, R. (2004) Human infection with *Photorhabdus asymbiotica*: an emerging bacterial pathogen. *Microbes and infection / Institut Pasteur*, 6(2), 229 – 37.
- Gevers, D., Cohan, F. M., Lawrence, J. G., Spratt, B., Coenye, T., Feil, E. J., Stackebrandt, E., van de Peer, Y., Vandamme, P., Thomson, F. L., Swings, J. (2005) Re-evaluating prokaryotic species. *Nature Reviews Microbiology*, 3, 733-739.
- Goller, C. C., y Seed, P. C. (2010). Revisiting the *Escherichia coli* polysaccharide capsule as a virulence factor during urinary tract infection: Contribution to intracellular biofilm development. *Virulence*, 1(4), 333-337.
- Guglielmini, J., y Melderer, L. V. (2011). Bacterial toxin-antitoxin systems. *Mobile Genetic Elements*, 1(4), 283-306.
- Gupta, M., Nayyar, N., Chawla, M., Sitaraman, R., Bhatnagar, R., Banerjee, N. (2016). The chromosomal parde2 toxin–antitoxin system of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv: genetic and functional characterization. *Frontiers in Microbiology*, 7, 886.
- Hazir, S., Shapiro-Han, D.I., Bock, C. B., Hazir, C., Leite, L. G., Hotchkiss, M. W. (2016) Relative potency of culture supernatants of *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* spp. on growth of some fungal phytopatogens. *European Journal of Plant Pathology*, 146, 369-381.

- Hecht, S.M. (2013) Bleomycin group antitumor agents. En Cragg, G.M., Kingston, D.G.I. y Newman, D.J. (Eds.) Anticancer agents from natural products (pp. 451-478). Florida, CRC Press.
- Heermann, R., y Fuchs, T. M. (2008) Comparative analysis of the *Photorhabdus luminescens* and the *Yersinia enterocolitica* genomes: uncovering candidate genes involved in insect pathogenicity. BMC Genomics, 9, 40.
- Henderson, B., Nair, S., Pallas, J., Williams, M.A. (2011) Fibronectin: a multidomain host adhesin targeted by bacterial fibronectin-binding proteins. FEMS Microbiology Reviews, 35(1), 147-200.
- Hinchliffe, S. J., Hares, M.C., Dowling, A.J., Ffrench-Constant, R. H. (2013). Insecticidal toxins from the *Photorhabdus* and *Xenorhabdus* bacteria. The Open Toxinology Journal, 3(1), 101-118.
- Holberger, L.E., Garza-Sánchez, F., Lamoureux, J., Low, D.A., Hayes, C.S. (2012) A novel family of toxin/antitoxin proteins in *Bacillus* species. FEBS letters, 586(2), 132-136.
- Holland, I.B., Schmitt, L., Young, J. (2005) Type 1 protein secretion in bacteria, the ABC transporter dependent pathway. Molecular Membrane Biology, 22, 29–39.
- Hopper, S., Vasquez, B., Merz, A., Clary, S., Wilbur, J. S., & So, M. (2000). Effects of the immunoglobulin A1 protease on *Neisseria gonorrhoeae* trafficking across polarized T84 epithelial monolayers. Infection and Immunity, 68(2), 906-911.
- Hu Y, Kwan BW, Osbourne DO, Benedik MJ, Wood TK. (2015) Toxin YafQ increases persister cell formation by reducing indole signalling. Environmental Microbiology, 17(4):1275–85.
- Hurst, S., Rowedder, H., Michaels, B., Bullock, H., Jackobeck, R., Abebe-Akele, F., . . . Tisa, L. S. (2015). Elucidation of the *Photorhabdus temperata* genome and generation of a transposon mutant library to identify motility mutants altered in pathogenesis. Journal of Bacteriology, 197(13), 2201-2216. doi:10.1128/jb.00197-15
- Hyatt, D., Chen, G-L., LoCascio, P.F., Land, M.L., Larimer, F.W., Hauser, L.J. (2010) Prodigal: prokaryotic gene recognition and translation initiation site identification. BMC Bioinformatics, 11, 119.
- Jallouli, W., Jaoua, S., Zouari, N. (2012) Improvement of *Photorhabdus temperata* strain K122 bioinsecticide production by batch and fed-batch fermentations optimization. Bioprocess and Biosystems engineering, 35, 1505-1513.
- Jorgensen, M. G., Pandey, D. P., Jaskolska, M., & Gerdes, K. (2008). HicA of *Escherichia coli* defines a novel family of translation-independent mrna interferases in bacteria and archaea. Journal of Bacteriology, 191(4), 1191-1199.

- Joyce, S.A., Lango, L., Clarke, D.J. (2011) The regulation of secondary metabolism and mutualism in the insect pathogenic bacterium *Photorhabdus luminescens*. *Advances in Applied Microbiology*, 76, 1 – 25.
- Kjos, M., Snipen, L., Salehian, Z., Nes, I.F., Diep, D.B. (2010) The Abi proteins and their involvement in bacteriocin self-immunity. *Journal of Bacteriology*, 192(8), 2068-79.
- Knodler L.A., Steele-Mortimer O. (2005) The *Salmonella* effector PipB2 affects late endosome/lysosome distribution to mediate Sif extension. *Molecular Biology of the Cell*, 16, 4108-4123.
- Knust, Z. y Schmidt, G. (2010). Cytotoxic necrotizing factors (CNFs)–a growing toxin family. *Toxins*, 2(1), 116–127.
- Kolappan, S., y Craig, L. (2013). Structure of cytoplasmic domain of TCPE from *Vibrio cholerae*. *Acta Crystallographica*, D69, 513-519.
- Kuehne, S.A., Cartman, S.T., Heap, J.T., Kelly, M.L., Cockayne, A., Minton, N.P. (2010) The role of toxin A and toxin B in *Clostridium difficile* infection. *Nature*, 467, 711-13.
- Kumpferschmied, P., Maurhofer, M., Keel, C. (2013) Promise for plant pest control; root associated pseudomonads with insecticidal activities. *Frontiers in Plant Science*, 4, 287
- Kushwah, J y Somvashi, V.S. (2015) *Photorhabdus*: a microbial factory of insect killing machines. En V.C. Kalin (Ed.), *Microbial factories: biodiversity, biopolymers, bioactive molecules: Volume 2* (pp. 235-239): Springer India.
- Kutsukake, K., Nakashima, H., Tominaga, H., Abo, T. Two DNA invertases contribute to flagellar phase variation in *Salmonella enterica* serovar typhimurium strain It2. *Journal of Bacteriology*, 188(3), 950-7.
- Kwak, Y. y Shin J. (2015) Complete genome sequence of *Photorhabdus temperata* subsp. *thracensis* 39-8^T, an entomopathogenic bacterium for the improved commercial bioinsecticide. *Journal of Biotechnology*, 214, 115-116.
- Kwon, A.-R., Kim, J.-H., Park, S. J., Lee, K.-Y., Min, Y.-H., Im, H., ... Lee, B.-J. (2012). Structural and biochemical characterization of HP0315 from *Helicobacter pylori* as a VapD protein with an endoribonuclease activity. *Nucleic Acids Research*, 40(9), 4216–4228.
- Li, G., Lu, S., Shen, M., Le, S., Shen, W., Tan, Y., . . . Li, M. (2017). Characterization and interstrain transfer of prophage pp3 of *Pseudomonas aeruginosa*. *Plos One*, 12(3). doi:10.1371/journal.pone.0174429
- Liang, Y., Gao, Z., Wang, F., Zhang, Y., Dong, Y., Liu, Q. (2014) Structural and functional characterization of *Escherichia coli* toxin-antitoxin complex dinj-yafq. *Journal of Biological Chemistry*, 289, 21191-202

- Lieberman, J. A., Frost, N. A., Hoppert, M., Fernandes, P. J., Vogt, S. L., Raivio, T. L., . . . Donnenberg, M. S. (2012). Outer membrane targeting, ultrastructure, and single molecule localization of the enteropathogenic *Escherichia coli* type IV pilus secretin BfpB. *Journal of Bacteriology*, 194(7), 1646-1658.
- Lobato-Márquez, D., Díaz-Orejas, R., García-del Portillo, F. (2016) Toxin-antitoxins and bacterial virulence. *FEMS Microbiology Reviews*, 40(5), 592-609.
- Lopes, A. P., Lopes, L. M., Fraga, T. R., Chura-Chambi, R. M., Sanson, A. L., Cheng, E., . . . Martins, E. A. (2014). VapC from the leptospiral VapBC toxin-antitoxin module displays ribonuclease activity on the initiator tRNA. *PLoS ONE*, 9(7).
- Lu, C., Turley, S., Marionni, S., Park, Y., Lee, K., Patrick, M., . . . Hol, W. (2013). Hexamers of the type II secretion ATPase GspE from *Vibrio cholerae* with increased ATPase activity. *Structure*, 21(9), 1707-1717.
- Lutgring, J.D., Limbago, B.M. (2016). The problem of carbapenemase-producing-carbapenem-resistant-*Enterobacteriaceae* detection. *Journal of Clinical Microbiology*, 54, 529–534.
- Ma, L., Lin, J., Lai, E. (2009) An icmf family protein, ImpLM, is an integral inner membrane protein interacting with ImpKL, and its Walker A motif is required for type VI secretion system-mediated Hcp secretion in *Agrobacterium tumefaciens*. *Journal of Bacteriology*, 191(13), 4316-29
- Margarit, S.M., Davidson, W., Frego, L., Stebbins, C.E. (2006) A steric antagonism of actin polymerization by a *Salmonella* virulence protein. *Structure*, 14:8, 1219-1229.
- Matos, R. C., Lapaque, N., Rigottier-Gois, L., Debarbieux, L., Meylheuc, T., Gonzalez-Zorn, B., . . . Serror, P. (2013). *Enterococcus faecalis* prophage dynamics and contributions to pathogenic traits. *PLoS Genetics*, 9(6). doi:10.1371/journal.pgen.1003539
- McKenzie, J.L., Robson, J., Berney, M., Smith, T.C., Ruthe, A., Gardner, P.P., Arcus, V.L., Cook, G.M. (2012) A VapBC toxin-antitoxin module is a posttranscriptional regulator of metabolic flux in *Mycobacteria*. *Journal of Bacteriology*, 194(9), 2189-2204.
- Medini, D., Donati, C., Tettelin, H., Massignani, V., Rappuoli, R. (2005) The microbial pan-genome. *Current Opinion in Genetics and Development*, 15, 589-594.
- Mendes, J. S., Santiago, A. D., Toledo, M. A., Rosselli-Murai, L. K., Favaro, M. T., Santos, C. A., . . . Souza, A. P. (2015). VapD in *Xylella fastidiosa* is a thermostable protein with ribonuclease activity. *Plos One*, 10(12). doi:10.1371/journal.pone.0145765
- Moynihan, P. Biochemical characterization of peptidoglycan o-acetyltransferases (Tesis de doctorado). Recuperado de la librería de la University of Guelph. <http://hdl.handle.net/10214/7759>

- Mutschler, H., Gebhardt, M., Shoeman, R.L., Meinhart, A. (2011) A novel mechanism of programmed cell death in bacteria by toxin–antitoxin systems corrupts peptidoglycan synthesis. *PLoS Biology* 9(3): e1001033.
- Nesper, J. (2002). Comparative and genetic analyses of the putative *Vibrio cholerae* lipopolysaccharide core oligosaccharide biosynthesis (*wav*) gene cluster. *Infection and Immunity*, 70(5), 2419-2433.
- Norton, J.P., Mulvey, M.A. (2012) Toxin-antitoxin systems are important for niche-specific colonization and stress resistance of uropathogenic *Escherichia coli*. *PLoS Pathology*, 8, e1002954.
- Orozco, R. Molnár, I, Bode, H., Stock, P. (2016) Bioprospecting for secondary metabolites in the entomopathogenic bacterium *Photorhabdus luminescens* subsp. *sonorensis*. *Journal of Invertebrate Pathology*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2016.09.008>
- Ozer, E.A., Allen, J.P., Hauser, A.R. (2014) Characterization of the core and accessory genomes of *Pseudomonas aeruginosa* using bioinformatics tools Spine and AGEnt. *BMC Genomics*, 15, 737.
- Parthasarathy, G., Lun, S., Guo, H., Ammerman, N.C., Geiman, D.E., Bishai, W.R. (2012) Rv2190c, an NlpC/P60 family protein, is required for full virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS ONE* 7(8): e43429.
- Pukatzki, S., Ma, A.T., Sturtevant, D., Krastins, B., Sarracino, D., Nelson, W.C., Heidelberg, J.F., Mekalanos, J.J. (2006) Identification of a conserved bacterial protein secretion system in *Vibrio cholerae* using the Dictyostelium host model system. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 103, 1528–1533.
- Pylro, V. S., Vespoli, L. D., Duarte, G. F., & Yotoko, K. S. (2012) Detection of horizontal gene transfers from phylogenetic comparisons. *International Journal of Evolutionary Biology*, 2012, 1-7.
- Rachid, S., Krug, D., Kunze, B., Kochems, I., Scharfe, M., Zabriskie, T. M., . . . Müller, R. (2006). Molecular and Biochemical Studies of Chondramide Formation—Highly Cytotoxic Natural Products from *Chondromyces crocatus* Cm c5. *Chemistry & Biology*, 13(6), 667-681.
- Ren, D., Walker, A.N., Daines, D.A. (2012) Toxin-antitoxin loci *vapBC-1* and *vapXD* contribute to survival and virulence in nontypeable *Haemophilus influenzae*. *BMC microbiology*, 12(263).
- Robson J., McKenzie J.L., Cursons R., Cook G.M., Arcus V.L. (2009) The *vapBC* operon from *Mycobacterium smegmatis* is an autoregulated toxin-antitoxin module that controls growth via inhibition of translation. *Journal of Molecular Biology*, 390, 353-367

- Rocker, A. (2015) Epsilon/Zeta toxin-antitoxin systems in Gram-negative bacteria (Tesis de Doctorado). Recuperado de Heidelberger Dokumentenserver. 10.11588/heidok.00019257
- Rodou, A., Ankrah, D., Stathopoulos, C. (2010) Toxins and secretion systems of *Phototribdus luminescence*. *Toxins*, 2, 1250-1264.
- Rouli, L., Merhej, V., Fournier, P.E., Raoult, D. (2015). The bacterial pangenome as a new tool for analyzing pathogenic bacteria. *New Microbes and New Infections*, 7, 72-85.
- Russo, T. A., Olson, R., Macdonald, U., Metzger, D., Maltese, L. M., Drake, E. J., & Gulick, A. M. (2014). aerobactin mediates virulence and accounts for increased siderophore production under iron-limiting conditions by hypervirulent (hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae*. *Infection and Immunity*, 82(6), 2356-2367.
- Schouls, L.M., Schot, C.S., Jacobs, J.A. (2003) Horizontal transfer of segments of the 16s rRNA genes between species of the *Streptococcus anginosus* group. *Journal of Bacteriology*, 185 (24), 7241-7246.
- Schweer, J., Kulkarni, D., Kochut, A., Pezoldt, J., Pisano, F., Pils, M. C., ... Dersch, P. (2013). The cytotoxic necrotizing factor of *Yersinia pseudotuberculosis* (CNFY) enhances inflammation and yop delivery during infection by activation of Rho GTPases. *PLoS Pathogens*, 9(11), e1003746.
- Seemann, T. (2014) Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics*, 30(14): 2068-2069.
- Sheng, X., Zhang, H., Xia, Q., Xu, S., Xu, H., Huang, X. (2013) Mig-14 plays an important role in influencing gene expression of *Salmonella enterica* serovar *Typhi*, which contributes to cell invasion under hyperosmotic conditions. *Reserch in Microbiology*, 164(9), 903-912.
- Silhavy, T. J., Kahne, D., & Walker, S. (2010). The bacterial cell envelope. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2(5), a000414.
- Somvanshi, V., Sloup, R.E., Crawford, J.M, Martin, A. R., Heidt, A. J., Kim, K., Clardy, J., Ciche, T.A. (2012) A single promoter inversion switches *Phototribdus* between pathogenic and mutualistic states. *Science*, 337, 88-92.
- Stathopoulos, C., Yen, Y., Tsang, C., Cameron, T. Protein secretion in bacterial cells. En *Bacterial physiology: a molecular approach*; Charoud, W.E., Ed.; Publisher: Springer-Verlag: Berlin, Alemania, 2008; pp. 129–154.
- Strange R.N. y Scott, P.R. (2005) Plant disease, a threat to global food security. *Annual Reviews Phytopathology*, 43, 83-116.

- Sultana, A., Kallio, P., Jansson, A., Wang, J.S., Niemi, J., Mäntsälä, P., Schneider, G. (2005) Structure of the polyketide cyclase Snoal reveals a novel mechanism for enzymatic aldol condensation. *EMBO J*, 23(9), 1911-21.
- Sung, M., Lai, Y., Huang, C., Chou, L., Shih, H., Cheng, W., Ma, C. (2009) Crystal structure of the membrane-bound bifunctional transglycosylase PBP1b from *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 106(22), 8824-8829
- Tailliez, P., Laroui, C., Ginibre, N., Paule, A., Pages, S., Boemare, N. (2010) Phylogeny of *Photorhabdus* and *Xenorhabdus* based on universally conserved protein-coding sequences and implications for the taxonomy of these two genera. Proposal of new taxa: *X. vietnamensis* sp. nov., *P. luminescens* subsp. *caribbeanensis* subsp. nov., *P. luminescens* subsp. *hainanensis* subsp. nov., *P. temperata* subsp. *Khanii* subsp. nov., *P. temperata* subsp. *Tasmaniensis* subsp. nov., and the reclassification of *P. luminescens* subsp. *thracensis* as *P. temperata* subsp. *thracensis* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60, 1921-1937.
- Tindall, B.J., Rosselló-Móra, R., Busse, H.-J., Ludwig, W., Kämpfer, P. (2010) Notes on the characterization of prokaryote strains for taxonomic purposes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60: 249-266.
- Tobias, N.J., Mishra, B., Gupta, D.K., Sharma, R., Thines, M., Stinear, T.P., Bode, H.B. (2016) Genome comparisons provide insights into the role of secondary metabolites in the pathogenic phase of the *Photorhabdus* life cycle. *BMC genomics*, 17:537.
- Uribe-Lorio, L., Mora-López, M., Stock, S.P. (2007) *Steinernema costaricense* n. sp. and *S. puntauvene* n. sp. (*Rhabditida: Steinernematidae*), two new entomopathogenic nematodes from Costa Rica. *Systematic Parasitology*, 68(3), 167-182.
- Veeranagouda, Y., Lee, K., Cho, A. R., Cho, K., Anderson, E. M. and Lam, J. S. (2011), Ssg, a putative glycosyltransferase, functions in lipo- and exopolysaccharide biosynthesis and cell surface-related properties in *Pseudomonas alkylphenolia*. *FEMS Microbiology Letters*, 315: 38–45.
- Vernikos, G., Medini, D., Riley, D. R., & Tettelin, H. (2015). Ten years of pan-genome analyses. *Current Opinion in Microbiology*, 23, 148-154.
- Vidaurre-Barahona, D., Uribe, L., Uribe-Lorío, L., Flores-Chaves, L. (2016). Caracterización molecular y morfológica del nematodo entomopatógeno cepa CIA-NE07 y descripción de la relación simbiótica con *Photorhabdus* sp. CRCIA-P01 mediante microscopía electrónica de transmisión y la técnica de hibridación fluorescente *in situ* FISH. Tesis de Maestría, Universidad de Costa Rica. Centro de investigaciones Agronomicas (CIA) laboratorio de microbiología agrícola.

- Vidová, B., Sramková, Z., Tisáková, L., Oravkinová, M., Godány, A. (2014) Bioinformatics analysis of bacteriophage and prophage endolysin domains. *Biologia*, 69(5), 541-556.
- Wagner, P. L., & Waldor, M. K. (2002) Bacteriophage Control of Bacterial Virulence. *Infection and Immunity*, 70(8), 3985–3993.
- Waterfield, N. R., Ciche, T., Clarke, D. (2009) *Photorhabdus* and a host of hosts. *Annual Reviews Microbiology*, 63, 557-574.
- Waterfield, N., Kamita, S.G., Hammock, B.D., ffrench-Constant, R. (2005) The *Photorhabdus* Pir toxins are similar to a developmentally regulated insect protein but show no juvenile hormone esterase activity. *FEMS Microbiology Letters*, 245, 47–52.
- Waterfield, N.R., Daborn, P.J., Dowling, A.J., Yang, G., Hares, M., ffrench-Constant, R.H. (2003). The insecticidal toxin Makes caterpillars floppy 2 (Mcf2) shows similarity to HrmA, an avirulence protein from a plant pathogen. *FEMS Microbiology Letters*, 229, 265–270.
- Watson, R. J., Millichap, P., Joyce, S. A., Reynolds, S., & Clarke, D. J. (2010). The role of iron uptake in pathogenicity and symbiosis in *Photorhabdus luminescens* TT01. *BMC Microbiology*, 10(1), 177.
- Wen, Y., Behiels, E., & Devreese, B. (2014). Toxin-Antitoxin systems: their role in persistence, biofilm formation, and pathogenicity. *Pathogens and Disease*, 70(3), 240-249.
- Wenzel, S.C., Müller, R. (2010) *Myxobacteria*-Unique microbial secondary metabolite factories. En Mander, L. N. (2010). *Comprehensive natural products II: chemistry and biology*. Amsterdam: Elsevier.
- Wilkinson, P., Waterfield, N. R., Crossman, L., Corton, C., Sanchez-Contreras M., Vlisidou, I., ..., ffrench-Constant, R. H. (2009) Comparative genomics of the emerging human pathogen *Photorhabdus asymbiotica* with the insect pathogen *Photorhabdus luminescens*. *BCM Genomics*, 10:302 doi:10.1186/1471-2164-10-302
- Wood, T., Wood, T.K. (2016) The HigB/HigA toxin/antitoxin system of *Pseudomonas aeruginosa* influences the virulence factors pyochelin, pyocyanin, and biofilm formation. *Microbiologyopen*, 5(3), 499-511.
- Yang, G., Dowling, A.J., Gerike, U., ffrench-Constant, R.H., Waterfield, N.R. (2006) *Photorhabdus* virulence cassettes confer injectable insecticidal activity against the wax moth. *Journal of Bacteriology*, 188, 2254–2261.
- Yang, G., Waterfield, N.R. (2013) The Role of TcdB and TccC Subunits in Secretion of the *Photorhabdus* Tcd Toxin Complex. *PLoS Pathogens*, 9(10): e1003644.
- Yu, M., Yang, J., Guo, M. 2016. Is the LysM domain of *L. monocytogenes* p60 protein suitable for engineering a protein with high peptidoglycan binding affinity? *Bioengineered*, 7(6).

- Yuan, J., Yamaichi, Y., Waldor, M. K. (2010). The three *Vibrio cholerae* chromosome II-encoded ParE toxins degrade chromosome I following loss of chromosome II. *Journal of Bacteriology*, 193(3), 611-619.
- Zhang, D., De Souza, R.F., Anantharaman, V., Iyer, L.M., Aravind, L. (2012). Polymorphic toxin systems: comprehensive characterization of trafficking modes, processing, mechanisms of action, immunity and ecology using comparative genomics. *Biology Direct* 7, 18.
- Zhong, L., Zhang, K., Huang, X., Ni, P., Han, Y., Wang, K., Wang, J., Li, S. (2003) A statistical approach designed for finding mathematically defined repeats in shotgun data and determining the length distribution of clone-inserts. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics*, 1(1), 43-51
- Zielenkiewicz, U., Ceglowski, P. (2005) The toxin-antitoxin system of the streptococcal plasmid pSM19035. *Journal of Bacteriology*, 187(17), 6094-6105.

El presente trabajo se licencia bajo *Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional*

