



**“Interacción entre la proteína de resistencia de yuca RXAM2 y efectores de  
*Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis*”**

**Lesly Ximena Silva Fernández**

11931913144

**Universidad Antonio Nariño**  
Programa Maestría en Bioquímica  
Facultad de Ciencias  
Bogotá, Colombia

2021

**“Interacción entre la proteína de resistencia de yuca RXAM2 y efectores de  
*Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis*”**

**Lesly Ximena Silva Fernández**

Proyecto de grado presentado como requisito parcial para optar al título de:

**Magíster en Bioquímica**

Ph.D. Paula Alejandra Díaz Tatis

Codirector

Ph.D. Edwin Alfredo Reyes Guzmán

Línea de Investigación:

Interacción Hospedero-Patógeno

Grupo de Investigación:

Ciencias Biológicas y Químicas

**Universidad Antonio Nariño**

Programa Maestría en Bioquímica

Facultad de Ciencias

Bogotá, Colombia

2021

**NOTA DE ACEPTACIÓN**

El trabajo de grado titulado

\_\_\_\_\_

Cumple con los requisitos para optar

Al título de \_\_\_\_\_.

\_\_\_\_\_

Firma del Tutor

\_\_\_\_\_

Firma Jurado

\_\_\_\_\_

Firma Jurado

Bogotá, 19 Octubre de 2021

## Contenido

	<b>Pág.</b>
<b>Resumen</b>	<b>14</b>
<b>Abstract</b>	<b>15</b>
<b>Introducción</b>	<b>16</b>
<b>Antecedentes</b>	<b>18</b>
<b>Objetivos</b>	<b>25</b>
<b>Justificación</b>	<b>26</b>
<b>Marco teórico</b>	<b>28</b>
4.1 ¿Cómo se defienden las plantas de patógenos?	28
4.2 ¿Qué aspecto tienen las proteínas de resistencia NLR?	30
4.2.1 Y ¿Cómo se activan las NLRs?	31
4.2.2 ¿Importa o no la estructura?	33
<b>5. Diseño Metodológico</b>	<b>38</b>
5.1 Modelamiento de las estructuras tridimensionales de RXAM2 y efectores de Xpm	38
5.1.1 Obtención de estructuras tridimensionales de RXAM2 y efectores de Xpm	38
5.1.2 Visualización y validación de estructuras tridimensionales de RXAM2 y efectores de Xpm	39
5.1.3 Análisis de dominios de la proteína de resistencia RXAM2	40
5.2 Acoplamiento Molecular	41
5.2.1 Acoplamiento Rígido	41
5.2.2 Acoplamiento Flexible	42
5.2.3 Visualización acoplamiento molecular	42
5.3 Identificación de Polimorfismos en efectores de Xpm	43
<b>6. Resultados y Análisis de resultados</b>	<b>45</b>
6.1 Modelamiento estructura tridimensional de RXAM2	45

6.1.1 Visualización y evaluación de calidad de la estructura tridimensional de RXAM2	49
6.1.2 Análisis de Dominios Conservados de RXAM2	53
6.2.1 Estructura del efector XopE1	56
6.2.2 Estructura del efector XopE4	60
6.2.3 Estructura del efector XopC2	65
6.2.4 Estructura del efector XopAK	69
6.2.5 Estructura del efector XopV	73
6.2 Acoplamiento Molecular	77
6.3 Polimorfismos en efectores de Xpm	109
<b>Conclusiones</b>	<b>126</b>
<b>Recomendaciones</b>	<b>128</b>
<b>Referencias Bibliográficas</b>	<b>129</b>
<b>Anexos</b>	<b>148</b>

## Lista de Figuras

	<b>Pág.</b>
<b>Figura 1:</b> Activación de una proteína NLR (Díaz Tatis, 2021 <i>in press</i> ).	33
<b>Figura 2:</b> Accesibilidad al solvente en RXAM2. Modelo de la estructura de RXAM2 obtenido con el servidor Robetta.	49
<b>Figura 3:</b> Diagrama de Ramachandran para el modelo de RXAM2 obtenido con el servidor Robetta.	52
<b>Figura 4:</b> Identificación de dominios en el modelo de RXAM2.	54
<b>Figura 5:</b> Comparación de estructuras entre el modelo RXAM2 obtenido con el servidor Robetta y las proteínas SCAB1 y ZAR1.	55
<b>Figura 6:</b> Accesibilidad de solvente. Modelo de la estructura de XopE1 obtenido con el servidor Robetta.	60
<b>Figura 7:</b> Diagrama de Ramachandran para el modelo de XopE1 obtenido con el servidor Robetta.	60
<b>Figura 8:</b> Accesibilidad de solvente. Modelo de la estructura de XopE4 obtenido con el servidor Robetta.	64
<b>Figura 9:</b> Diagrama de Ramachandran para el modelo de XopE4 obtenido con el servidor Robetta.	64
<b>Figura 10:</b> Accesibilidad de solvente. Modelo de la estructura de XopC2 obtenido con el servidor Robetta.	68
<b>Figura 11:</b> Diagrama de Ramachandran para el modelo de XopC2 obtenido con el servidor Robetta.	69
<b>Figura 12:</b> Accesibilidad de solvente. Modelo de la estructura de XopAK obtenido con el servidor Robetta.	72
<b>Figura 13:</b> Diagrama de Ramachandran para el modelo de XopAK obtenido con el servidor Robetta.	72
<b>Figura 14:</b> Accesibilidad de solvente. Modelo de la estructura de XopV obtenido con el servidor Robetta.	76
<b>Figura 15:</b> Diagrama de Ramachandran para el modelo de XopV obtenido con el servidor Robetta.	76
<b>Figura 16:</b> Acoplamiento rígido entre RXAM2 y XopE1.	81
<b>Figura 17:</b> Acoplamiento flexible entre RXAM2 y XopE1.	84

<b>Figura 18:</b> Acoplamiento rígido entre RXAM2 y XopE4.	87
<b>Figura 19:</b> Acoplamiento flexible entre RXAM2 y XopE4.	90
<b>Figura 20:</b> Acoplamiento rígido entre RXAM2 y XopC2.	92
<b>Figura 21:</b> Acoplamiento flexible entre RXAM2 y XopC2.	95
<b>Figura 22:</b> Acoplamiento rígido entre RXAM2 y XopAK.	99
<b>Figura 23:</b> Acoplamiento flexible entre RXAM2 y XopAK.	101
<b>Figura 24:</b> Acoplamiento rígido entre RXAM2 y XopV.	103
<b>Figura 25:</b> Acoplamiento flexible entre RXAM2 y XopV.	106
<b>Figura 26-1:</b> Logos: Sitios de selección positiva y negativa de XopE4.	115
<b>Figura 26-2:</b> Sitios de selección positiva y negativa de XopE4.	116
<b>Figura 27-1:</b> Logos: Sitios de selección negativa de XopE1.	118
<b>Figura 27-2:</b> Sitios de selección negativa de XopE1.	119
<b>Figura 28-1:</b> Logos: Sitios de selección positiva y negativa de XopC2.	120
<b>Figura 28-2:</b> Sitios de selección positiva y negativa de XopC2.	122
<b>Figura 29-1:</b> Logos: Sitios de selección positiva y negativa de XopV.	123
<b>Figura 29-2:</b> Sitios de selección positiva y negativa de XopV.	124

**Lista de tablas**

	<b>Pág.</b>
<b>Tabla 1:</b> Interacciones entre RXAM2 y XopE1 por acoplamiento rígido.	82
<b>Tabla 2:</b> Interacciones entre RXAM2 y XopE1 por acoplamiento flexible.	85
<b>Tabla 3:</b> Interacciones entre RXAM2 y XopE4 por acoplamiento rígido.	88
<b>Tabla 4:</b> Interacciones entre RXAM2 y XopE4 por acoplamiento flexible.	92
<b>Tabla 5:</b> Interacciones entre RXAM2 y XopC2 por acoplamiento rígido.	95
<b>Tabla 6:</b> Interacciones entre RXAM2 y XopC2 por acoplamiento flexible.	96
<b>Tabla 7:</b> Interacciones entre RXAM2 y XopAK por acoplamiento rígido.	99
<b>Tabla 8:</b> Interacciones entre RXAM2 y XopAK por acoplamiento flexible.	102
<b>Tabla 9:</b> Interacciones entre RXAM2 y XopV por acoplamiento rígido.	105
<b>Tabla 10:</b> Interacciones entre RXAM2 y XopV por acoplamiento flexible.	108
<b>Tabla 11:</b> Cepas de Xpm para los efectores XopE1, XopE4, XopC2, XopAK y XopV de diferentes regiones biogeográficas.	111



## Lista de Símbolos y Abreviaturas

<b>Abreviatura</b>	<b>Significado</b>
CAPRI	Critical Assessment of Predicted Interactions
CBB	Cassava Bacterial Blight
CBSD	Cassava brown streak disease
CC	Coiled-coil
CMD	Cassava Mosaic disease
dN	Non-synonymous substitutions
dS	Synonymous substitutions
ETI	Effector-triggered immunity
FEL	Fixed Effects Likelihood
FUBAR	Fast, Unconstrained Bayesian AppRoximation
HR	Hypersensitive response
LRR	Leucine-rich repeats
MAPK	Mitogen activated protein kinase
MEME	Mixed Effects Model of Evolution
NBS-ARC	Nucleotide-binding sites
NLR	Nucleotide binding and oligomerization domain (NOD)-like receptors
NO	Nitric Oxide
PAMP	Pathogen associated molecular pattern
PBL2	Putative serine/threonine-protein kinase
PRR	Pattern recognition receptors

PSVS	Protein Structure Validation Software Suite
PTI	PAMP-triggered immunity
QTL	Quantitative trait loci
RGC	Resistance Gene Candidate
RLK	Receptor like kinase
RMN	Resonancia magnética nuclear
RMSD	Root mean square deviation
ROS	Reactive oxygen species
STK	Serine/Threonine Protein Kinase
T3E	Type III effectors
T3SS	Type three secretion system
TAL	Transcription activator-like kinase
TIR	Toll/interleukin-like
<i>Xpm</i>	<i>Xanthomonas phaseoli</i> pv. <i>manihotis</i>

*A mi padre, madre y hermanos, que día a día dan sentido a mi vida. A mi por la paciencia y resiliencia en este trayecto.*

## Agradecimientos

En primer lugar a mis padres, por su esfuerzo constante para brindarme lo mejor de sí, por su apoyo constante e incondicional, sus múltiples palabras de aliento frente a las adversidades que presento en mi camino, por su contribución en mi formación como persona y sobretodo, por motivarme a conseguir las metas que me planteo día a día.

A Paula Alejandra Díaz Tatis, por su paciencia, preocupación, tiempo y sobre todo empatía durante este proyecto. Gracias por cada enseñanza, me permitió crecer como persona y profesional, me siento afortunada de haber estado bajo su dirección.

A Edwin Alfredo Reyes Guzmán, por sus enseñanzas, amabilidad, tiempo y contribución en la construcción de este proyecto.

A la Universidad Antonio Nariño, y docentes de la Maestría en Bioquímica, por su contribución en mi formación académica, especialmente a la profesora Vaneza Paola Loret Velásquez, por su disposición, preocupación y entrega como docente.

A la Fundación para la Promoción de la Investigación y la Tecnología del Banco de la República, por su apoyo financiero al proyecto No. 4.395: Estudio in planta de la interacción de la proteína de resistencia de yuca RXAM2 con proteínas efectoras de *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*.



## Resumen

La bacteriosis vascular de la yuca es una enfermedad ocasionada por la bacteria *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis* (*Xpm*) y se ha reportado en todas las regiones del mundo donde se cultiva la yuca. La estrategia más económica y efectiva para el manejo de la enfermedad es la utilización de variedades resistentes, pero han sido pocos los estudios encaminados a entender la base molecular de la resistencia de la yuca a este patógeno. Recientemente se identificó que la proteína NLR llamada RXAM2 confiere resistencia a diferentes cepas de *Xpm*. Sin embargo, se desconoce el mecanismo molecular que emplea esta proteína para reconocer efectores de *Xpm*. Este proyecto permitió la generación de la posible estructura tridimensional de RXAM2 y XopE1, XopE4, XopC2, XopAK y XopV efectores de *Xpm*, mediante modelado por homología. Se identificó principalmente al dominio LRR como el posible responsable del reconocimiento de los efectores, a través de acoplamiento rígido y flexible. Por otro lado, se logró identificar, sitios sujetos a selección negativa en 65 cepas de *Xpm*, lo que sugiere una alta conservación entre los efectores presentes en cepas de diferentes regiones biogeográficas.

**Palabras clave:** Inmunidad vegetal, bacteriosis vascular, modelamiento estructural acoplamiento molecular, polimorfismos.

### Abstract

The Cassava bacterial blight is a disease caused by the bacterium *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis* (*Xpm*) and has been reported in all regions of the world where cassava is cultivated. The most economical and effective strategy for the management of the disease is the use of resistant varieties, but there have been few studies aimed at understanding the molecular basis of the resistance of cassava to this pathogen. Recently it was identified that the NLR protein named RXM2 confers resistance to different strains of *Xpm*. However, the molecular mechanism used by this protein to recognize *Xpm* effectors is unknown. This project allowed the generation of the possible three-dimensional structure of RXAM2 and XopE1, XopE4, XopC2, XopAK and XopV effectors of *Xpm*, by homology modeling. The LRR domain was identified as the possible responsible for the recognition of the effectors, through rigid and flexible molecular docking. On the other hand, it was possible to identify sites under negative selection in 65 *Xpm* strains, which suggests a high conservation between the effectors present in strains from different biogeographic regions.

**Keywords:** Plant immunity, cassava bacterial blight, structural modeling, molecular docking, polymorphisms.

## Introducción

La yuca es una de las principales fuentes calóricas y de almidón a nivel mundial, sin embargo, la bacteriosis vascular de la yuca, ocasionada por *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis* (*Xpm*), es una enfermedad considerada como una limitante del cultivo de yuca (DANE, 2016). La identificación y caracterización de genes de resistencia en otras especies ha sido útil para el mejoramiento de enfermedades en cultivos de interés, y en el genoma de la yuca se ha identificado un gen que confiere resistencia a diferentes cepas de *Xpm*, denominado RXam2 (Díaz Tatis, 2021 *in press*). Sin embargo, se desconoce el mecanismo molecular que emplea la proteína de resistencia RXAM2 para reconocer efectores de *Xpm*, y así permitir la aproximación a técnicas de fitomejoramiento. No obstante, por medio de la metodología de doble híbrido de levadura, se han identificado diferentes interactores de los dominios NBS y LRR de la proteína RXAM2 con efectores de *Xpm* (Román Reyna, 2012). Debido a lo descrito anteriormente, el objetivo de este proyecto es evaluar la interacción entre la proteína de resistencia de yuca RXAM2 y efectores de *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis*, para lograrlo, se trazaron los siguientes objetivos específicos; la generación de un modelo de la estructura tridimensional de RXAM2 y de las proteínas efectoras de *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis*, a través de los servidores web Robetta y I-TASSER por modelo de homología. Se determinaron computacionalmente zonas de interacción entre la proteína RXAM2 y proteínas efectoras de *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis*, a través de acoplamiento rígido y acoplamiento flexible, y finalmente, la identificación de posibles polimorfismos para los genes efectores



reconocidos entre 65 cepas de *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis* y su importancia en la interacción con RXAM2, lo cual permitió una aproximación al mecanismo molecular de la resistencia a la bacteriosis vascular de la yuca mediada por RXAM2, así como el análisis estructural de los efectores XopV, XopE1, XopE4, XopAK y XopC2 y RXAM2.

## 1. Antecedentes

La yuca (*Manihot esculenta* Crantz) es una planta tropical que pertenece a la familia Euphorbiaceae. Esta familia se caracteriza por la presencia de vasos laticíferos compuestos por células secretoras que producen una secreción lechosa (Aristizábal & Sánchez, 2007) (Ramírez & Jiménez, 2015). Es una planta que crece en regiones tropicales y subtropicales, prospera en suelos fértiles, aunque su ventaja con otros cultivos más rentables es su capacidad para crecer en suelos pocos fértiles, con precipitaciones esporádicas o largos periodos de sequía (Aristizábal & Sánchez, 2007 (DANE, 2016).

La planta de yuca es uno de los productos agrícolas de vital importancia para la seguridad alimentaria. Es considerado como el componente básico de la dieta de millones de personas al día en el mundo (DANE, 2015) (FAO, 2014), ocupa el quinto lugar en la producción mundial, después del maíz, arroz, trigo y papa y es una fuente de caloría importante junto a la caña de azúcar en regiones tropicales (FAO, 2014). El cultivo de yuca presenta varios desafíos como el manejo de enfermedades y plagas causadas por hongos, ácaros, insectos, virus y bacterias, los cuales pueden causar la producción de manchas foliares, necrosis del tallo o pudriciones radicales, lo cual puede ocasionar pérdidas en el rendimiento del cultivo (DANE, 2016) (Ceballos, 2002). Dentro de las plagas de mayor importancia económica en la producción de yuca se encuentran: ácaros (*Mononychellus spp*), la mosca blanca (*Aleurotrachellus sociales*, *Aleurothrixus aepim*, *Bemisia tuberculata*) el gusano cachón (*Erinnys ello*), el chinche de encaje (*Vatiga illudens*, *V. manihotae* y *Amblystira machalana*), los trips (*Frankliniela williamsi*) y el chinche de la

viruela (*Cyrtomenus bergi*) (Ramírez & Jiménez, 2015) (DANE, 2016). En Colombia, las dos enfermedades de mayor importancia económica son la denominada superalargamiento ocasionada por el hongo *Sphaceloma manihoticola*; se reconoce por el enroscamiento de las hojas jóvenes y manchas blancas irregulares en las hojas con un alargamiento exagerado de los entrenudos del tallo (DANE, 2016), y la enfermedad ocasionada por el hongo *Phytophthora spp.*, la cual ocasiona la marchitez repentina de la planta y pudrición blanda de las raíces, ambas enfermedades pueden llegar a causar pérdidas hasta del 80% de la producción del cultivo (DANE, 2016).

A nivel mundial, las principales enfermedades que causan considerables pérdidas en el cultivo de yuca son: la enfermedad del mosaico de yuca (CMD del inglés: Cassava Mosaic disease) y la enfermedad del rayado marrón de la yuca (CBSD del inglés: Cassava brown streak disease). CMD es ocasionada por diferentes especies de virus del género Begomovirus, los síntomas incluyen distorsión foliar y crecimiento atrofiado de la planta (McCallum et al., 2017) CBSD es causada por dos especies de virus del género Ipomovirus, sus principales síntomas son clorosis foliar y rayas marrones en los tallos (McCallum et al., 2017). Finalmente, la bacteriosis vascular (CBB) ocasionada por *Xanthomonas phaseoli pv. manihotis (Xpm)* (DANE, 2016), considerada como la tercera más importante a nivel mundial.

La pérdida ocasionada por CBB, se ha estimado que puede llegar al 70-100% de la producción en tres ciclos de cultivo (DANE, 2016) (Sandino et al., 2015). *Xpm* es una bacteria gram negativa, flagelada, es un patógeno epífita, foliar y vascular, que presenta una amplia expresión de síntomas en la planta durante el proceso de infección (López et

al., 2006). Los síntomas que incluye son manchas angulares en las hojas, marchitamiento, exudados y lesiones en los tallos, en casos críticos puede ocasionar la muerte total de la planta (López et al., 2006). El proceso de infección comienza con la proliferación epífita y en consecuencia la penetración a la planta por los estomas o por heridas en la epidermis provocadas por insectos, por el ser humano, por lluvias (Sandino et al., 2015) (López et al., 2006). A continuación, la bacteria pasa por una fase de desarrollo intercelular en el mesófilo y en consecuencia lograr invadir el xilema, donde la infección se torna sistémica (Sandino et al., 2015). Los frutos infectados muestran manchas empapadas de agua y las semillas resultantes sufren necrosis del cotiledón y del endospermo, y deformación de la semilla (Boher et al., 1995) . Los síntomas se presentan de 11 a 13 días después de la infección (DANE, 2016).

En Colombia, con el objetivo de caracterizar la estructura de la población de *Xpm* en diferentes ecosistemas, se han realizado tres estudios, uno durante un periodo de cinco años en la década de 1990, otro en el periodo de 2008 a 2010 y finalmente uno en el período de 2013 a 2015 en la región del Caribe colombiano (Restrepo et al., 2004) (Trujillo et al., 2014) (Rache et al., 2019). Gracias a estos estudios se ha establecido que las poblaciones de *Xpm* presentan una alta tasa de variación genética tanto en el tiempo como en el espacio, probablemente como resultado a cambios ambientales, presión de selección por la utilización de variedades de yuca resistente y a la migración de poblaciones (Restrepo et al., 2004) (Trujillo et al., 2014). Comprender los mecanismos por los cuales las poblaciones bacterianas evolucionan para superar la resistencia de la planta es crucial para desarrollar estrategias de fitomejoramiento.

Investigaciones citoquímicas de la interacción entre la yuca y *Xpm* han permitido identificar que la defensa ocurre en los tejidos vasculares a través de respuestas de refuerzo de las paredes celulares, lo cual se presenta en plantas resistentes y susceptibles (Kpémoua et al., 1996). La diferencia de la interacción entre yuca-*Xpm* depende del grado de intensidad y velocidad en las cuales se desarrollan estas respuestas (Kpémoua et al., 1996), demostrando que la resistencia a *Xpm* es de tipo cuantitativa, poligénica y de herencia aditiva (Hahn et al., 1980) (Jorge et al., 2000).

Sin embargo, son pocos los estudios que explican los determinantes de la patogenicidad de cepas de *Xpm*. Actualmente a través de la secuenciación y con la anotación del genoma de la cepa CIO-151, se lograron identificar determinantes patogénicos importantes para la colonización de la bacteria (Arrieta Ortiz et al., 2013), estos resultados demostraron que la cepa CIO151 presenta diez grupos de factores de patogenicidad conservados dentro del género *Xanthomonas* y se encontraron 126 genes que son potencialmente exclusivos de *Xpm* (Arrieta Ortiz et al., 2013). Además, la secuenciación del genoma de 65 cepas de *Xpm* ha permitido la identificación de efectores tipo tres (T3E, del inglés Type III effectors) centrales entre las cepas de *Xpm* de diversos orígenes geográficos, indicando la posible adaptación de las cepas *Xpm* a las variedades regionales de yuca (Bart et al., 2012). Otro estudio ha permitido evaluar el papel de nueve de los 17 T3Es de *Xpm* en la virulencia y la inmunidad de las plantas. Los T3E estudiados cubren dos T3E centrales (XopN y XopV) y siete no centrales (AvrBs2, XopX, XopQ, XopZ, XopAO1, XopR y XopE4). Cuatro T3E (XopZ, XopX, XopAO1 y AvrBs2) son importantes para la virulencia completa y tres T3E (XopR, AvrBs2 y XopAO1) fueron

capaces de suprimir la PTI, además, dos (*XopE4* y *XopAO1*) fueron capaces de suprimir la ETI (Medina et al., 2018). En conjunto, estos resultados son útiles para la comprensión de los mecanismos moleculares de *Xpm* y para ayudar a guiar el desarrollo de variedades de yuca resistentes al CBB.

Con respecto a la yuca, se han logrado desarrollar estrategias encaminadas a la identificación de genes candidatos a resistencia o RGCs (Resistance Gene Candidates), gracias a la presencia de dominios conservados en las proteínas de resistencia. Algunos RGCs se han empleado y han co-localizado con loci de genes R o con QTLs asociados a resistencia (Ramalingam et al., 2003). En yuca, se han identificado varios RGCs, de los cuales, algunos se asociaron con QTLs de resistencia a *Xpm*. Gracias al diseño de primers a partir del gen *Xa21* de arroz se logró amplificar un fragmento en yuca, el cual se co-localizó con un QTL que explica el 13% de la resistencia a la cepa *CIO136* (López et al., 2007). Además, se logró identificar la secuencia completa de dicho gen, el cual codifica para una proteína de tipo RLK y se denominó *RXam1* (Resistencia a *Xpm* y ser el posible primer gen *R* en yuca) (López et al., 2007). Estudios han mostrado que *RXam1* es inducido por la cepa *CIO136* en la variedad resistente MBRA685 resistentes un pico de expresión a cinco días post-inoculación (dpi) (López et al., 2007). Además, se ha demostrado efectivamente la inducción de la expresión de *RXam1* en plantas de yuca inoculadas con la cepa *CIO151*, dejando en evidencia que este gen puede llegar a tener un rol de amplio espectro en la resistencia a varias cepas de *Xpm* (Contreras Nieto & López Carrascal, 2008). Por otro lado, se identificó que *RXam1* codifica una proteína con un dominio LRR extracelular y un dominio STK (del inglés: Serine/Threonine Protein

Kinase) citoplasmático y gracias a la técnica de doble híbrido de levadura se identificó que el dominio STK interactúa con una proteína denominada CRFE3-1 la cual posee dominios de las E3 ligasas, estos resultados sugieren que la degradación proteica es un mecanismo de regulación de RXAM1 (Gil & López Carrascal, 2019).

Otro gen candidato a resistencia de tipo NLR y asociado a un QTL explica el 62% de la resistencia a la cepa CIO151 (López et al., 2007) se logró identificar empleando primers degenerados (López et al., 2003) y en consecuencia se denominó *RXam2* (Resistencia a *Xpm* y ser el posible segundo gen *R* en yuca) (Contreras Nieto & López Carrascal, 2008). Para validar el rol del gen *RXam2*, se han realizado estudios empleando RNA de interferencia. Estos trabajos demostraron que las plantas en las cuales el gen fue silenciado fueron más susceptibles a diferentes cepas de *Xpm* (Díaz Tatis, 2021). Por otro lado, plantas transgénicas que sobreexpresan el gen, aumenta su resistencia a varias cepas de *Xpm*. Estos resultados han permitido concluir que *RXam2* juega un papel importante en la resistencia de amplio espectro de yuca frente a distintas cepas de *Xpm* (Díaz Tatis, 2021 *in press*) (Ochoa Cabezas, 2011). Además, con el fin de evaluar el efecto de la inducción de la expresión de *RXam2*, se han utilizado TAL (del inglés: Transcription activator-like kinase) artificiales (arTALs) previamente desarrollados para dirigirse a las regiones promotoras de *RXam2* y se encontró que la inducción de la expresión de *RXam2* se relaciona con mayor resistencia a una cepa de *Xpm* (Díaz Tatis, 2021). Actualmente, se cuenta con la disponibilidad del genoma de yuca en el portal Phytozome.

Específicamente para la identificación de las interacciones entre la proteína de resistencia RXAM2 de yuca, estudios de doble híbrido en levadura han demostradola

existencia de diferentes interactores de los dominios NBS y LRR de la proteína RXAM2. En particular se determinaron 14 interactores para el dominio NBS y 24 para el dominio LRR (Román Reyna, 2012) . Debido a lo descrito anteriormente, la identificación y caracterización de los genes de resistencia, presentes en las variedades resistentes, ha sido útil para el mejoramiento de cultivos de interés mundial como el arroz, trigo, maíz, papa, entre otros (Dangl et al., 2013), estos estudios, constituyen un punto de partida para la transferencia del gen de resistencia a variedades comerciales susceptibles, ya sea, mediante estrategias de mejoramiento genético convencional o por modificación genética. Por lo tanto, *RXam2* es de especial interés, ya que, confiere resistencia a diferentes cepas de *Xpm*, además, se ha identificado que interactúa con seis efectores diferentes, tres de los cuales están presentes en una gran cantidad de cepas de *Xpm*. Por consiguiente, es necesario confirmar la validez de estas interacciones antes de considerar la utilización de este gen en programas de fitomejoramiento. En consecuencia, este proyecto pretende identificar posibles sitios de interacción entre RXAM2 y cinco efectores de *Xpm*, así como sitios sujetos a selección positiva y negativa de efectores de *Xpm*, y la predicción de la posible estructura tridimensional de RXAM2 y de los cinco efectores de *Xpm*, lo cual permitirá una aproximación a los mecanismos moleculares de reconocimiento de una proteína NLR a efectores de patógenos, y por consiguiente el uso de programas de fitomejoramiento.



## 2. Objetivos

### **Objetivo General:**

Evaluar la interacción entre la proteína de resistencia de yuca RXAM2 y efectores de *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis*.

### **Objetivos específicos:**

Generar un modelo de la estructura tridimensional de RXAM2 y de las proteínas efectoras de *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis*.

Determinar computacionalmente zonas de interacción entre la proteína RXAM2 y proteínas efectoras de *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis*.

Identificar posibles polimorfismos para los genes efectores reconocidos entre diferentes cepas de *Xanthomonas* y su importancia en la interacción con RXAM2

### 3. Justificación

El cultivo de yuca es una fuente calórica y de almidón a nivel mundial, sin embargo, presenta grandes limitantes, como la bacteriosis vascular causada por *Xanthomonas phaseoli pv. manihotis*. La identificación y caracterización de genes de resistencia, presentes en las variedades resistentes, ha sido útil para el mejoramiento de cultivos de interés mundial como el arroz, trigo, maíz, papa, entre otros (Dangl et al., 2013). Estos estudios constituyen un punto de partida para la transferencia del gen de resistencia a variedades comerciales susceptibles, ya sea mediante estrategias de mejoramiento genético convencional o por modificación genética. En yuca, se ha identificado a *RXam2* como un gen de especial interés que confiere resistencia a diferentes cepas de *Xpm* (Díaz Tatis, 2021 *in press*), además, se ha identificado que interactúa con seis efectores diferentes, tres de los cuales están presentes en una gran cantidad de cepas de *Xpm* (Román Reyna, 2012) (Bart et al., 2012). Por lo tanto, es necesario confirmar la validez de estas interacciones de modo directo, antes de considerar la utilización de este gen en programas de fitomejoramiento. Por consiguiente, el conocimiento de la estructura de las proteínas tridimensionales es fundamental para responder este tipo de preguntas biológicas. Sin embargo, los enfoques experimentales no son rápidos ni baratos, y aunque el número de estructuras obtenidas experimentalmente aumenta constantemente, el número de genomas secuenciados, supera el número de estructuras dilucidadas experimentalmente (Ginalski, 2006) (Nikolaev et al., 2018), estas limitaciones exigen el desarrollo de métodos bioinformáticos confiables de predicción de estructuras computacionales. En

consecuencia, este proyecto permitió identificar posibles sitios de interacción entre RXAM2 y cinco efectores de *Xpm*, para ello, se realizó una aproximación de la estructura tridimensional de RXAM2 y efectores de *Xpm*. Por otro lado, se identificaron posibles sitios sujetos a selección positiva y negativa de efectores de *Xpm*, lo cual permitirá una aproximación a los mecanismos moleculares de reconocimiento de una proteína NLR a efectores de patógenos, y por consiguiente el uso de programas de fitomejoramiento, en un cultivo de interés comercial.

## 4. Marco teórico

### 4.1 ¿Cómo se defienden las plantas de patógenos?

Las plantas en su entorno natural coexisten en una estrecha relación con comunidades microbianas, como resultado, las plantas han desarrollado diferentes mecanismos de defensa, inducibles y regulados que median estas interacciones (Ramírez Prado et al., 2018) (Peng et al., 2018). Se ha propuesto un modelo para describir las respuestas inmunes de las plantas denominado “modelo en zigzag” representado en cuatro fases (Jones & Dangl, 2006). Bajo este modelo, el sistema inmune innato en plantas se basa, en una primera fase, en el reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos y/o microbios (PAMP/MAMP) y/o proteínas efectoras microbianas (Jones & Dangl, 2006). Los PAMPs se detectan mediante receptores de reconocimiento de patrones (PRR), que se utilizan para detectar patrones moleculares conservados de microorganismos (Peng et al., 2018), típicamente son receptores de tipo quinasas localizados en la superficie celular (Zhang & Zhou, 2010). La unión de PAMP a PRR desencadena una red compleja de cascada de señalización intracelular, que conduce a una serie de respuestas de defensa conocidas como inmunidad activada por PAMP (PTI del inglés: PAMP-triggered immunity) (Ramírez Prado et al., 2018) (Peng et al., 2018). La PTI abarca distintas respuestas fisiológicas, como el cierre de estomas para limitar la entrada de patógenos, la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y óxido nítrico (NO), la limitación de la transferencia nutricional del citosol al apoplasto, la deposición de callosa, la biosíntesis de metabolitos antimicrobianos y hormonas de defensa (Ramírez

Prado et al., 2018) (Bigeard et al., 2015). La fase dos consiste en que una vez se desencadena la PTI normalmente se previene la infección de patógenos no adaptados (Cui et al., 2015).

Debido a la larga historia co-evolutiva planta-patógeno, los patógenos adaptados han desarrollado medios para suprimir la PTI al enviar proteínas efectoras de virulencia dentro de las células huésped, resultando en una susceptibilidad inducida por efectores. Las proteínas efectoras son capaces de alterar el curso de una variedad de procesos celulares de la planta para lograr la supervivencia y proliferación del patógeno, y por consiguiente el desarrollo de la infección (Ramírez Prado et al., 2018) (Zhang & Zhou, 2010) (Cui et al., 2015). Para contrarrestar la acción de las proteínas efectoras, las plantas han desarrollado receptores inmunes citoplasmáticos, denominados proteínas de resistencia (R) (Zhang & Zhou, 2010), para detectar las proteínas efectoras secretadas por los patógenos de una manera específica. El reconocimiento de los efectores por proteínas de resistencia afines conduce la fase tres; la activación de la inmunidad activada por efectores (ETI del inglés: Effector-triggered immunity) (Peng et al., 2018), la cual es altamente específica y generalmente se asocia con la inducción de una muerte celular programada, proceso conocido como respuesta hipersensible (HR, del inglés hypersensitive response) (Zhang & Zhou, 2010). Finalmente, en la fase cuatro, la selección natural impulsa a los patógenos a evitar la ETI, a través de la diversificación o eliminación del gen efector reconocido, o adquiriendo efectores adicionales que suprimen la ETI. La selección natural da como resultado nuevas especificidades en las proteínas de resistencia para que la ETI pueda activarse nuevamente (Jones & Dangl, 2006). La

mayoría de las proteínas R pertenecen a la familia de receptores con repeticiones ricas en leucina y sitio de unión a nucleótidos (NLR, del inglés: Nucleotide binding and oligomerization domain (NOD)-like receptors) (Peng et al., 2018).

#### **4.2; Qué aspecto tienen las proteínas de resistencia NLR?**

En plantas, los NLR se dividen en dos subgrupos en función de la presencia de un dominio en la región N-terminal; TIR (del inglés, Toll/interleukin-like), que se encuentra principalmente en dicotiledóneas y CC (del inglés, Coiled-coil) que se encuentra en algunas plantas vasculares (Burdett et al., 2019) (Peng et al., 2018). Esta región actúa como módulo de señalización de muerte celular, sin embargo, para desencadenar este proceso algunos dominios TIR y CC requieren de dimerización (Burdett et al., 2019). Por ejemplo, en *Arabidopsis thaliana* la proteína NLR ZAR1, tras el reconocimiento del efector, se oligomeriza por el extremo N-terminal CC, formando un resistoma, que posteriormente se trasloca a la membrana celular de la planta y forma un canal iónico que permite la entrada de  $Ca^{++}$ , como respuesta a la inmunidad activada por efectores (Chen et al., 2021), asimismo, se ha identificado que SNC1, una NLR presente en *Arabidopsis thaliana*, con dominio TIR en el N-terminal, necesita de autoasociación para estimular la HR (Zhang et al., 2017).

Aunque se consideran las unidades de señalización predominantes de los NLR, los dominios TIR y CC son estructural y funcionalmente diferentes entre sí (Burdett et al., 2019). Los dominios TIR adoptan un pliegue conservado que consta de cinco hélices  $\alpha$  que rodean una lámina  $\beta$  de cinco cadenas (Bentham et al., 2018) (Ve et al., 2015). Por el contrario, los dominios CC son en gran medida proteínas helicoidales y existe cierto

debate sobre su estructura general, asimismo, la función en la señalización de los NLR sigue sin estar muy clara (Bentham et al., 2018).

Por otro lado, los NLR presentan un dominio central NB-ARC (del inglés: Nucleotide-binding sites), el cual tiene tres subdominios distintos: el dominio de unión a nucleótidos (NBD, del inglés Nucleotide-Binding Domain) y los subdominios ARC1 y ARC2 (Burdett et al., 2019) (Bentham et al., 2018) (Ve et al., 2015).

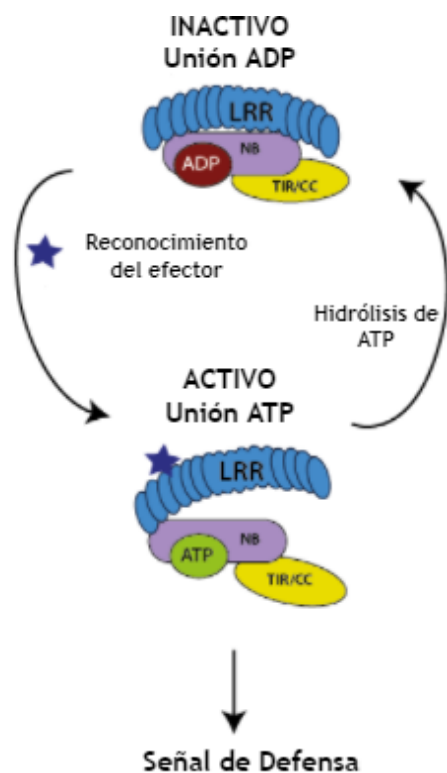
#### ***4.2.1 Y ¿Cómo se activan las NLRs?***

La regulación y activación de la señalización inmune de NLR en plantas se controla a través del dominio NB-ARC, principalmente a través de sus interacciones con otros dominios de proteínas NLR, que están influenciados por la unión de ADP y ATP (Burdett et al., 2019) (Jacob et al., 2013), y en el extremo C-terminal un dominio LRR (del inglés, Leucine-rich repeats), generalmente con forma de herradura, que hace contactos extensos con el dominio NB-ARC2 (Peng et al., 2018) (Burdett et al., 2019).

En ausencia de estimulación, la proteína NLR se encuentra en estado de reposo, en el cual el dominio LRR ejerce un papel de regulador negativo al estabilizar la unión a ADP, además, el dominio LRR actúa como el principal dominio de reconocimiento de las proteínas efectoras, este reconocimiento induce un cambio conformacional en el dominio NB-ARC que permite la liberación de ADP (Bent & Mackey, 2007). Posteriormente, la unión a ATP desencadena un segundo cambio conformacional liberando la señal de defensa. Este mecanismo de activación es regulado por la actividad de la proteína ATPasa, quien atenúa la respuesta de señalización y devuelve a la proteína NLR a su estado de reposo (Bent & Mackey, 2007). El motivo P-loop presente en el dominio NB-ARC,

corresponde a un bucle flexible rico en glicina y una lisina altamente conservada que coordina el  $\beta$ -fosfato del ADP, la mutación de esta lisina da como resultado la pérdida de función de algunos NLR en plantas, debido a la reducción en la capacidad de la proteína en unirse a ATP (Figura 1) (Tameling et al., 2002). Por otro lado, el motivo MHD, es uno de los más importantes y caracterizados de los NLR en plantas, las mutaciones de la histidina o aspartato conservados generalmente dan como resultado un fenotipo de ganancia de función *in planta*, se postula que las mutaciones en el motivo MHD liberan importantes interacciones autoinhibidoras entre los subdominios NB y ARC2 a través de afinidades reducidas con ADP y, al hacerlo, facilitan la preferencia por la unión de ATP (Burdett et al., 2019) (Williams et al., 2011).

**Figura 1.** Activación de una proteína NLR. Tomado de: Díaz Tatis, 2021 *in press*.





#### 4.2.2 ¿Importa o no la estructura?

El conocimiento de la estructura de las proteínas tridimensionales es fundamental para responder preguntas biológicas, por ejemplo, se conoce que ZAR1, una proteína NLR presente en *Arabidopsis thaliana*, interactúa indirectamente con proteínas efectoras, por medio del señuelo PBL2 y RSK1, que tras el reconocimiento del efector, forma un pentámero que luego se trasloca a la membrana plasmática, donde formará un canal iónico y permitir la entrada de  $Ca^{++}$  (Wang et al., 2019) (Chen et al., 2021), el conocimiento de su estructura permitió dilucidar, el método de reconocimiento de efectores y su función después de oligomerizarse. Las metodologías de difracción y resonancia magnética nuclear (RMN) permiten obtener estructuras de proteínas que varían de calidad media a alta. Sin embargo, los enfoques experimentales no son rápidos ni baratos, y aunque el número de estructuras obtenidas experimentalmente aumenta constantemente, el número cada vez mayor de genes y genomas secuenciados, supera con creces el número de estructuras determinadas experimentalmente (Ginalski, 2006) (Nikolaev et al., 2018), estas limitaciones exigen el desarrollo de métodos confiables de predicción de estructuras computacionales. Existen tres enfoques diferentes para la predicción de estructuras tridimensionales de proteínas: modelado ab initio, subprocesamiento y modelado por homología.

El método ab initio simula el espacio conformacional de la proteína utilizando una función energética, que describe la energía interna de la proteína y sus interacciones con el

entorno en el que se inserta, requiere tres elementos: (1) una representación geométrica de la cadena proteica, (2) una función potencial y (3) una técnica de búsqueda de superficie de energía (Dorn et al., 2014), sin embargo, la precisión del modelado ab initio es bajo y el éxito se limita a proteínas pequeñas (<100 residuos) (Lee et al., 2017) (Nikolaev et al., 2018). Los métodos de subprocesamiento utilizan estructuras proteicas tridimensionales conocidas como plantillas para secuencias de estructuras desconocidas, intentan identificar plantillas con pliegues similares con o sin relaciones evolutivas directas (analógicas) (Dorn et al., 2014) (Nikolaev et al., 2018), en este enfoque, la secuencia de aminoácidos de la proteína diana se "enhebra" en la estructura de una plantilla adecuada, luego se realizan la reordenación y optimización de la estructura local (Nikolaev et al., 2018).

Los métodos de subprocesamiento buscan optimizar una función de energía potencial midiendo la calidad de ajuste de una secuencia en una configuración tridimensional particular (Dorn et al., 2014), en resumen, consta de tres componentes: (1) construcción de una biblioteca de posibles pliegues o plantillas estructurales; (2) un esquema de puntuación para evaluar cualquier ubicación particular de una secuencia de interés en cada pliegue; (3) un método para buscar en el espacio posibles reemplazos entre cada secuencia y cada pliegue para encontrar el mejor conjunto que dé la mejor puntuación total (Dorn et al., 2014).

Finalmente, el modelado comparativo o por homología se basa en la construcción de la estructura tridimensional de la proteína de interés a partir de plantillas de estructuras de proteínas evolutivamente cercanas, es decir, que comparten una similitud de secuencia estadísticamente significativa (Ginalski, 2006) .

Ahora bien, cabe señalar que muchos enfoques de modelado comparativo, hoy en día también parten de plantillas identificadas mediante enfoques de subprocesamiento y utilizan técnicas de construcción de modelos más sofisticadas que los métodos por homología simple (Pearce & Zhang, 2021). Dentro de las estrategias exitosas para modelar proteínas de interés mediante homología se encuentran I- TASSER y RossetaCM (Pearce & Zhang, 2021).

Sin embargo, una gran parte de las funciones biológicas no están mediadas por proteínas aisladas sino por sus interacciones que permiten la formación de complejos proteicos, cuyas funciones son producto de la disposición geométrica específica de las subunidades a partir de las cuales se forman (Torchala et al., 2013) (Moal et al., 2018). La posición, orientación y conformación de cada subunidad se establece mediante la formación de contactos intermoleculares específicos que anclan la subunidad en su lugar y reducen la energía libre del estado ligado, (Moal et al., 2018), esta interpretación con detalles a nivel de átomo, pueden ser obtenidos por cristalografía de rayos X, sin embargo, es importante destacar que algunas de las interacciones importantes biológicamente, se producen en complejos transitorios y, por tanto, la determinación de la estructura experimental puede ser muy difícil. Por lo tanto, se han desarrollado métodos de acoplamiento computacional que, a partir de las estructuras de las proteínas componentes, intentan determinar la estructura de sus complejos con una precisión aproximada a la proporcionada por la cristalografía de rayos X (Kozakov et al., 2017).

Existen dos tipos de acoplamiento molecular: acoplamiento molecular proteína-ligando, usado principalmente para el diseño de fármacos y el acoplamiento

molecular proteína-proteína, desarrollado para la investigación de complejos moleculares (Toro et al., 2013).

El método de acoplamiento molecular proteína-proteína, tiene como objetivo predecir la estructura tridimensional de los complejos proteicos, a partir de las estructuras de sus componentes individuales, donde una de ellas se denomina “receptor” y la otra “ligando”, lo que permite el entendimiento de procesos biológicos celulares dados por dichas interacciones, así como, la determinación de interacciones de proteínas, cuya dilucidación experimental es limitada o nula (Bastard et al., 2011). En el acoplamiento proteína-proteína típico se encuentran tres componentes: una representación de las dos proteínas, con definición de los grados de libertad, un algoritmo para explorar el espacio conformacional y una función de puntuación para clasificar las predicciones obtenidas (Bastard et al., 2011), este último, considerado como esencial en el acoplamiento molecular, ya que, ayuda a distinguir las posturas de acoplamiento correctas de las incorrectas, se han utilizado diferentes funciones de puntuación con varios grados de sofisticación (Wong, 2008), entre ellos:

1. Campos de fuerza: Usa una suma de términos (flexión de ángulos, estiramiento de enlaces, rotación alrededor de enlaces, interacciones repulsivas y dispersivas e interacciones electrostáticas) para aproximar la energía de una molécula o complejo molecular (Wong, 2008), por ejemplo CHARMM.
2. Modelos empíricos: Expresan la energía en una suma de términos empíricos, cuyos parámetros se modifican a medida que varían una o más variables descriptivas por ejemplo, LUDI incluye términos para describir enlaces de hidrógeno, puentes de

sal, interacciones lipofílicas y pérdida de entropía debido a la rigidez de los enlaces rotativos al unirse (Wong, 2008).

3. Potencial basado en el conocimiento: Análisis de la frecuencia de observación de un tipo particular de átomo del receptor y un tipo específico de átomo del ligando, que están en contacto, una frecuencia más alta indica interacciones más fuertes (Wong, 2008).

Por otro lado, para determinar si la postura de acoplamiento con la mejor puntuación es correcta, es común calcular la raíz de la desviación cuadrada media (RMSD por sus siglas en inglés: root-mean-square deviation) entre la estructura de esta postura y la experimental. Por lo general, dentro de 2 Å se considera razonable (Wong, 2008). Ahora bien, el método de acoplamiento proteína-proteína puede ser de cuerpo rígido, que se basa en el supuesto de que las proteínas no sufren cambio conformacional tras su interacción, en donde, el receptor es rígido y el ligando se traslada, rota y flexiona hasta encontrar su mejor pose (Kotev et al., 2016) (Sotudian et al., 2021), sin embargo, se ha evidenciado, que se requiere la incorporación de la flexibilidad del receptor y el ligando, para un acoplamiento más preciso (Totrov & Abagyan, 2008).

## 5. Diseño Metodológico

### 5.1 Modelamiento de las estructuras tridimensionales de RXAM2 y efectores de *Xpm*

Antes de la obtención de la estructura tridimensional de RXAM2 y efectores de *Xpm*, se realizó un análisis de la estructura 2D de RXAM2 y los efectores de *Xpm* con el servidor PredictProtein <https://predictprotein.org/>. En primera instancia se obtuvo la secuencia de aminoácidos RXAM2 del portal Phytozome, y de los efectores de IMG/M. Las secuencias de aminoácidos de RXAM2 y efectores de *Xpm* se tomaron como archivos de entrada, en consecuencia, PredictProtein permitió identificar los porcentajes de aminoácidos enterrados, intermedios y expuestos al solvente, así como el porcentaje de hélices, bucles y hebras que conforman a RXAM2 y los efectores de *Xpm*.

#### 5.1.1 Obtención de estructuras tridimensionales de RXAM2 y efectores de *Xpm*

Para la obtención de la estructura tridimensional de RXAM2 y los efectores XopE4, XopE1, XopC2, XopAK y XopV, se utilizaron los servidores web I-TASSER y Robetta. En primera instancia se accedió al servidor web I-TASSER <https://zhanggroup.org/I-TASSER/>, se creó una cuenta gratuita para acceder al servidor, seguido se tomó la secuencia de aminoácidos de RXAM2 en formato FASTA como archivo de entrada, por defecto se dejaron los parámetros preestablecidos del servidor, el procedimiento se realizó siguiendo los mismos pasos para los efectores XopE4, XopE1, XopC2, XopAK y XopV. Para la obtención de las estructuras con el servidor Robetta, se

accedió al servidor <https://robeta.bakerlab.org/>, el archivo de entrada fue la secuencia de aminoácidos de RXAM2 en formato FASTA, luego se seleccionó la opción CM (modelado por homología, por sus siglas en inglés Comparative Modeling), el procedimiento se realizó con los mismos pasos para los efectores XopE4, XopE1, XopC2, XopAK y XopV. Con ambos servidores, se obtuvieron un total de cinco modelos para cada uno de los efectores de *Xpm* y para RXAM2.

### ***5.1.2 Visualización y validación de estructuras tridimensionales de RXAM2 y efectores de Xpm***

Una vez obtenidos los modelos obtenidos en I-TASSER y Robetta, se visualizaron en el programa UCSF Chimera, para identificar la conformación tridimensional y diferencias estructurales obtenidos con los servidores I-TASSER y Robetta para cada uno de los efectores de *Xpm* y RXAM2.

Los modelos obtenidos se analizaron teniendo en cuenta las medidas de validación de la estructura generada mediante el servidor PSVS (por sus siglas en inglés Protein Structure Validation Software Suite) <https://montelionelab.chem.rpi.edu/PSVS/>, basado en herramientas como PROCHECK, Molprobit, Verify3D, Prosa II, las cuales permiten el análisis de puntuación de calidad global y obtención de gráfico de Ramachandran. Para ello, el modelo de la estructura tridimensional de RXAM2 en formato pdb, fue el archivo de entrada en el servidor PSVS, se seleccionó la opción de modelo por homología y el parámetro de todos los residuos para el análisis, debido a que no se cuenta con más información de la proteína, los otros parámetros de dejaron por defecto. El proceso se

repitió con los modelos uno, obtenidos por I-TASSER y Robetta para los efectores XopE4, XopE1, XopC2, XopAK y XopV.

### ***5.1.3 Análisis de dominios de la proteína de resistencia RXAM2***

Para RXAM2 se realizó el análisis de dominios presentes en las proteínas NLR. Primero, se validó la presencia de los dominios CC N-terminal, NB-ARC y LRR C-terminal en la secuencia de aminoácidos de RXAM2 mediante el servidor Dominios Conservados de NCBI <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi> e Interpro <https://www.ebi.ac.uk/interpro/>. Para ello, la secuencia de aminoácidos de RXAM2 en formato FASTA fue el archivo de entrada en los dos servidores, gracias a la alineación múltiple de secuencias anotadas, matrices de puntuación y bases de datos como Pfam, el servidor Dominios Conservados de NCBI y el servidor Interpro, se delimitaron los dominios conservados presentes en RXAM2.

Una vez validada la presencia de los dominios, se realizó la búsqueda en PDB de estructuras tridimensionales de proteínas reportadas experimentalmente en plantas, que tienen los dominios conservados CC N-terminal, NB-ARC y LRR C-terminal, la búsqueda se realizó para cada uno de los dominios, seguido se identificó y señaló para el dominio CC N-terminal la proteína SCAB1 presente en *Arabidopsis thaliana* y para los dominios NB-ARC y LRR C-terminal la proteína ZAR1 presentes en *Arabidopsis thaliana*.



Tras la identificación de las estructuras tridimensionales de las proteínas reportadas experimentalmente en PDB, se realizó la comparación tridimensional entre los modelos de RXAM2 y cada uno de los dominios descargados de PDB, para ello, el modelo en formato pdb de RXAM2 y los dominios obtenidos de PDB, fueron los archivos de entrada en el programa UCSF Chimera, una vez abiertos los archivos en UCSF Chimera, se seleccionó la opción “MatchMaker” y se analizó la concordancia o superposición entre el modelo tridimensional de RXAM2 y las estructuras de los dominios presentes en las proteínas SCAB1 y ZAR1 de *Arabidopsis thaliana* obtenidos en PDB, el proceso se realizó con el modelo uno obtenido con el servidor I-TASSER y Robetta.

## **5.2 Acoplamiento Molecular**

El acoplamiento molecular se realizó mediante dos herramientas computacionales web gratuitas, una de ellas seleccionada por ser un servidor de acoplamiento molecular proteína-proteína de cuerpo rígido; ClusPro, y otra seleccionada por ser un servidor de acoplamiento molecular proteína-proteína de cuerpo flexible; SwarmDock, destacando que ambos servidores arrojan los mejores resultados, de acuerdo a lo descrito por la comunidad CAPRI (Kangueane & Nilofer, 2018).

### **5.2.1 Acoplamiento Rígido**

Para el acoplamiento de cuerpo rígido proteína-proteína a través de ClusPro, se creó una cuenta gratuita para acceder al servidor online: <https://cluspro.bu.edu/login.php>. Luego de acceder al servidor web, se procedió a subir al servidor el archivo en formato

pdb del receptor RXAM2 y del ligando efector de *Xpm*, señalando como cadena B al receptor y cadena A al ligando, ClusPro brinda opciones específicas, para acoplamientos donde se tiene mayor información, por ejemplo, atracciones y repulsiones, la opción “otros” si se conoce que la interacción participa en la transducción de señales, entre otros, sin embargo, como no se posee información sobre las propiedades del acoplamiento entre RXAM2 y efectores de *Xpm*, los parámetros se dejaron por defecto. El procedimiento se realizó con cada uno de los efectores de *Xpm*: XopAK, XopE4, XopE1, XopV y XopC2, y con el modelo uno generado por el servidor Robetta para cada proteína.

### ***5.2.2 Acoplamiento Flexible***

Para el acoplamiento de cuerpo flexible, se ingresó al servidor online: <https://bmm.crick.ac.uk/~svc-bmm-swarmdock/submit.cgi>, seguido se subió al servidor en formato pdb el receptor RXAM2 y el ligando efector de *Xpm*, la cantidad de modos para el receptor se dejó por defecto y el acoplamiento fue totalmente ciego, debido a que no se tiene conocimiento de los residuos participantes en el acoplamiento entre RXAM2 y los efectores de *Xpm*. El procedimiento se realizó con cada uno de los efectores de *Xpm*: XopAK, XopE4, XopE1, XopV y XopC2, con el modelo uno generado por el servidor Robetta para cada proteína.

### ***5.2.3 Visualización acoplamiento molecular***

Las interacciones de los acoplamientos moleculares arrojados por ClusPro y SwarmDock, fueron visualizados con el programa Discovery Studio Visualizer, para ello,

los acoplamientos moleculares obtenidos en formato pdb fueron los archivos de entrada. Para visualizar las interacciones, una vez abierto el archivo del acoplamiento molecular, se estableció a la estructura del receptor RXAM2 dentro del acoplamiento y el ligando efectores de *Xpm*, seguido se definieron las interacciones, identificando principalmente puentes de hidrógeno, fuerzas electrostáticas e interacciones hidrofóbicas. Debido a que los servidores arrojan varios acoplamientos, para ClusPro se eligió el primer modelo en la opción de balanceado y para SwarmDock el primer acoplamiento, que según lo reportado por Kozakov et al., 2017 y Torchala et al., 2013, presentan las energías más bajas y son los más recomendados cuando no se tiene información experimental.

### 5.3 Identificación de Polimorfismos en efectores de *Xpm*

En primera instancia, la secuencia de aminoácidos de cada uno de los efectores de *Xpm*: XopE1, XopE4, XopC2, XopAK y XopV fueron los archivos de entrada en el portal IMG/M (por sus siglas en inglés Integrated Microbial Genomes & Microbiomes) <https://img.jgi.doe.gov/>, y se seleccionó el organismo *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis*. Una vez indicado el organismo, se identificaron para cada efector de *Xpm*, un total de 65 cepas, se descargaron las secuencias de nucleótidos y aminoácidos en formato FASTA para las 65 cepas de cada uno de los efectores de *Xpm*.

Para la identificación de posibles sitios sujetos a selección positiva o negativa se utilizaron las herramientas FUBAR; recomendado para detectar la selección generalizada en sitios individuales en conjuntos de datos grandes (Murrell et al., 2013), FEL permite analizar conjuntos de datos de tamaño pequeño a mediano cuando solo se desea estudiar la

selección generalizada en sitios individuales (Kosakovsky Pond & Frost, 2005) y MEME único método en detectar la selección en sitios individuales, que considera la selección tanto generalizada como episódica (Murrell et al., 2012), herramientas del servidor web Datamonkey (<https://www.datamonkey.org>). Para cada FUBAR, FEL y MEME, el archivo de entrada fue la secuencia de nucleótidos sin codones de parada y se seleccionó la opción de código genético universal. Específicamente para FEL, una vez subido el archivo de entrada, se seleccionó la opción de “todas las ramas” para realizar el análisis.

Luego de identificar a través de las herramientas FUBAR, FEL y MEME los posibles sitios sujetos a selección positiva y negativa , se construyó el logo de secuencias para cada efector con el servidor web Seq2Logo 2.0 <http://www.cbs.dtu.dk/biotools/Seq2Logo/>, para ubicar y visualizar la posición de los posibles sitios de selección positiva y negativa en la secuencia de cada efector de *Xpm*. Para ello se cargó el multiFASTA de cada uno de los efectores en el servidor Seq2Logo 2.0, asimismo, a través del programa Discovery Studio se representó en la estructura tridimensional de los efectores de *Xpm*, los posibles sitios de selección negativa y positiva.

## 6. Resultados y Análisis de resultados

### 6.1 Modelamiento estructura tridimensional de RXAM2

Estudios previos han mostrado que la proteína NLR de yuca RXAM2 juega un papel importante en la resistencia a varias cepas de *Xpm*. Sin embargo, se desconoce el mecanismo molecular que emplea esta proteína para reconocer efectores de *Xpm*. Ensayos de doble híbrido en levadura sugieren que RXAM2 interactúa de forma directa con XopAK, XopV, XopC2, XopE4. En consecuencia, el conocimiento de la estructura de las proteínas tridimensionales es fundamental para responder este tipo de preguntas biológicas. Sin embargo, los enfoques experimentales no son rápidos ni baratos, y aunque el número de estructuras obtenidas experimentalmente aumenta constantemente, el número cada vez mayor de genes y genomas secuenciados, supera con creces el número de estructuras determinadas experimentalmente (Ginalski, 2006) (Nikolaev et al., 2018), es el caso de las proteínas NLR en plantas, donde son muy pocas las estructuras tridimensionales dilucidadas experimentalmente. Estas limitaciones exigen el desarrollo de métodos confiables de predicción de estructuras computacionales.

En este trabajo se realizó modelamiento por homología de la estructura tridimensional de RXAM2. Al emplear los servidores web I-TASSER y Robetta y realizar la búsqueda de plantillas de proteínas con estructura tridimensional experimentalmente reportada, se encontró que en ambos casos, *ZAR1* de *Arabidopsis thaliana* fue la proteína que presentó mayor identidad con RXAM2, con un porcentaje de 26% en el servidor I-TASSER y 22.49% con el servidor de Robetta, por consiguiente, se usó como plantilla

para el modelamiento de RXAM2, por otra parte, ZAR1 se caracteriza por poseer los tres dominios conservados propios de las proteínas NLRs y específicamente en la región N-terminal un dominio CC (Wang et al., 2019).

Cada servidor arrojó un total de cinco modelos para RXAM2. Con el fin de seleccionar el mejor modelo se realizó un análisis estereoquímico mediante el diagrama de Ramachandran con los cinco modelos obtenidos con I-TASSER y Robetta. El análisis estereoquímico mostró que los modelos construidos con I-TASSER, tuvieron unos valores de 58.5% para el modelo uno, 56.5% en el modelo dos, 57.0% para el modelo tres, 53.6% en el modelo cuatro y 57.5% para el modelo cinco. En los modelos construidos con Robetta, se obtuvieron valores de 85.4% en el modelo uno, 84.7% para el modelo dos, 84.5% en el modelo tres, 84.4% para el modelo cuatro y 81% en el modelo cinco. Por lo tanto, debido al mejor porcentaje favorable obtenido por el diagrama de Ramachandran, se seleccionó el modelo número uno obtenido por I-TASSER y Robetta.

Estudios previos indican que el gen *RXam2* codifica para una proteína que presenta 1186 aminoácidos (Díaz Tatis, 2021 *in press*). Para identificar la estructura secundaria de la proteína RXAM2 se utilizó el programa PredictProtein, el cual mediante la búsqueda en bases de datos de secuencias actualizadas, crea alineaciones y predice aspectos de una proteína en cuanto su estructura y función (Bernhofer et al., 2021). Se encontró que RXAM2 está conformada por hélices alfa en un 48.60% , destacándose su papel en la región N-terminal en el dominio CC, en donde se ha descrito su participación para la autoasociación de algunas NLR, como ZAR1 en *Arabidopsis thaliana* (Wang et al., 2019), Sr33 en *Triticum aestivum* (Casey et al., 2016) y MLA10 en *Hordeum vulgare* (Cesari et

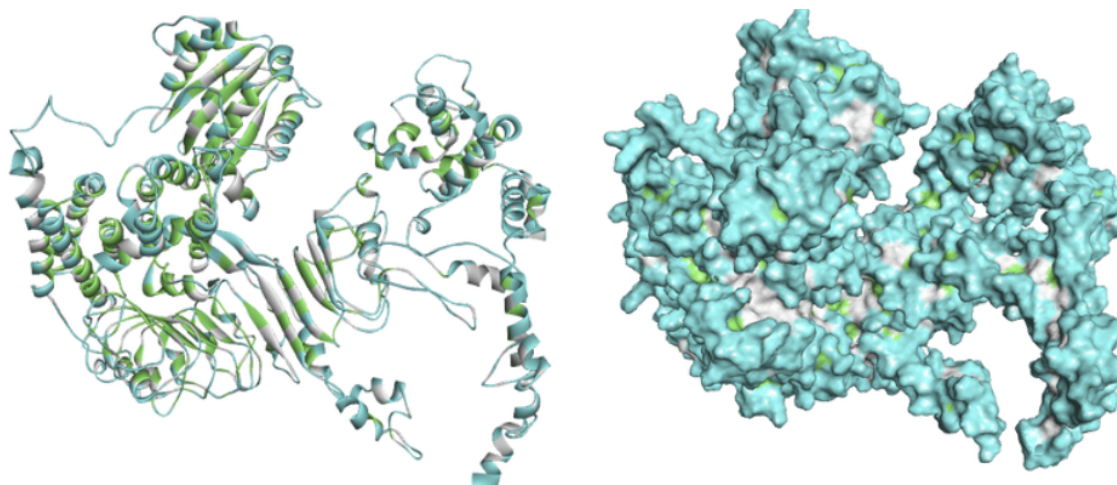
al., 2016) , hebras en un 7.90% y bucles en un 43.50% (Figura 3-1 y Figura 4-1), encontradas en el dominio LRR en la región C-terminal, donde las repeticiones LxxLxLxxNxL (L = leucina , N = asparagina , x = cualquier otro aminoácido) forman la estructura en forma de herradura, con bucles y hélices  $\alpha$  expuestas en la superficie convexa, y lámina  $\beta$  paralela ubicada en la superficie cóncava de la estructura (Kobe & Kajava, 2001). Esta estructura tiene una alta relación superficie-volumen, lo que la convierte en una plataforma adecuada para interacciones proteína-proteína (Burdett et al., 2019). Por lo tanto, predecir la estructura secundaria de RXAM2 permite entender su estructura tridimensional, así como su función en cuanto al reconocimiento de proteínas efectoras.

Por otro lado y dado que las proteínas de resistencia suelen presentar un localización citosólica, se evaluó la accesibilidad a solventes polares. Debido a que se ha postulado que se requiere un tráfico nucleocitoplasmático coordinado por algunas proteínas NLR en plantas, para la activación completa de la respuestas de defensa, lo que sugiere que una sola proteína NLR puede activar distintas vías de señalización en el citoplasma y el núcleo (Qi & Innes, 2013).

Otras NLR pueden transitar desde el citosol a la membrana plasmática de la célula de la planta, por ejemplo, ZAR1; tras el reconocimiento del efector AvrAC de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, y su posterior oligomerización, se trasloca a la membrana plasmática, formando un canal iónico que permite la entrada de  $\text{Ca}^+$  (Chen et al., 2021). Por lo tanto, conocer el porcentaje de aminoácidos expuestos y enterrados permite aproximarse a una localización celular de la proteína. Para esto, a través del

servidor PredictProtein se encontró que la proteína presenta 36.42% de aminoácidos expuestos, 50.93% de aminoácidos no expuestos y 12.65% de aminoácidos intermedios (Figura 2) lo que sugiere que RXAM2 es una proteína soluble en agua. Lo anterior está en concordancia con la predicción de la localización subcelular de RXAM2 realizada usando los programas LocTree3 (Goldberg et al., 201) y DeepLoc-1.0 (Almagro Armenteros et al., 2017), los cuales sugieren una localización citosólica de esta proteína.

**Figura 2.** Accesibilidad de solvente en RXAM2. Aminoácidos expuestos: azul, aminoácidos no expuestos: verde. Izquierda: representación en cintas. Derecha: representación en superficie.



Nota. La representación de los modelos fue generada en Discovery Studio (Dassault Systèmes BIOVIA, 2017).



### ***6.1.1 Visualización y evaluación de calidad de la estructura tridimensional de RXAM2***

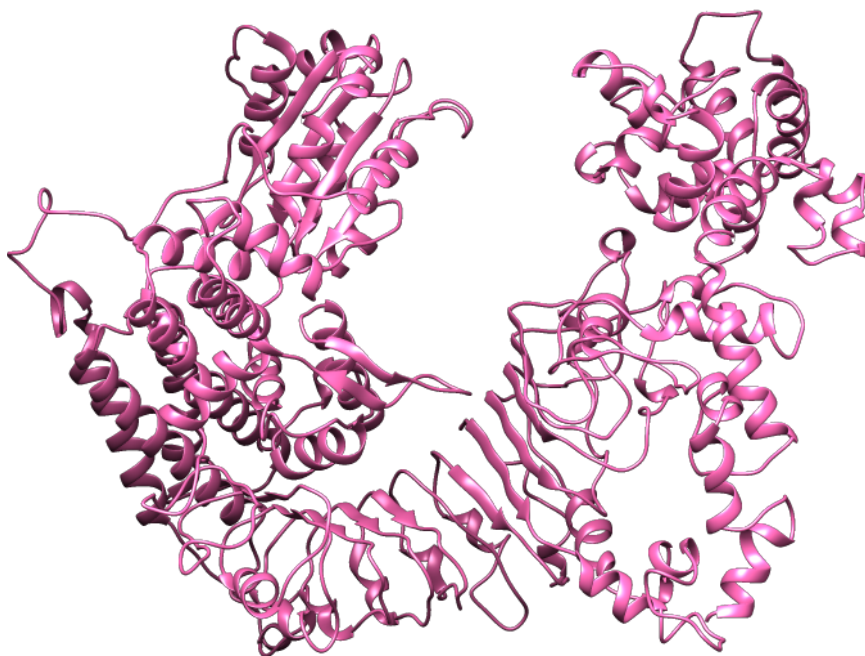
Los modelos de las estructuras tridimensionales obtenidos de los servidores I-TASSER y Robetta se sometieron a una evaluación de calidad de la estructura a través del servidor PSVS y estereoquímicamente mediante el diagrama de Ramachandran, mencionado anteriormente. Adicionalmente, se realizó la identificación de dominios previamente reportados para una proteína NLR. A continuación, se mostrará el modelo uno del servidor Robetta, el cuál es el que presenta una mejor calidad.

Para evaluar la calidad de la estructura tridimensional de los modelos de RXAM2 generados por I-TASSER y Robetta, varios criterios fueron tenidos en cuenta. Primero se usó el servidor PSVS (Bhattacharya et al., 2007) que se basa en un análisis estereoquímico de cada uno de los residuos de RXAM2. Para el modelo uno generado por el servidor I-TASSER, se obtuvo con la herramienta Verify3D, un puntaje medio de 0.11, indicando la relación entre la estructura 1D y 3D de RXAM2, en ProsaII de -0.08 para el pliegue de la proteína y MolProbity Clashscore de 14.45, indicando superposiciones estéricas, así mismo, no presenta contactos cercanos, definido como cercano para aquella distancia menor a 2.2Å para átomos pesados y 1.6Å para átomos de hidrógeno (Bagaria et al., 2012). Además, el servidor PSVS calcula la desviación cuadrática media de la distancia de enlaces covalentes, que se estableció en 0.015Å y para ángulos en 2.9°; esto obtenido según el promedio de los valores RMSD de todos los enlaces y los ángulos, relacionados con el valor estándar para aminoácidos (diccionario).

En la evaluación de la calidad del modelo arrojado por Robetta, se obtuvo con la herramienta Verify3D un puntaje medio de 0.18, en ProsaII de 0.35 y MolProbity Clashscore de 4.93, así mismo, no presenta contactos cercanos entre los átomos, y la desviación cuadrática media de la distancia de enlaces covalentes se estableció en 0.016Å y para ángulos en 2.2°; esto obtenido según el promedio de los valores RMSD de todos los enlaces y los ángulos, relacionados con el valor estándar para aminoácidos (diccionario).

En segundo lugar, se obtuvo el diagrama de Ramachandran que permite analizar las regiones energéticamente permitidas para los ángulos de torsión phi y psi (Ramachandran et al., 1963), entre los modelos obtenidos. En el modelo uno arrojado por I-TASSER (Figura Suplementaria 1) se obtuvo un porcentaje de 58.5% de residuos ubicados en regiones favorables, para el modelo uno arrojado por Robetta (Figura 2) se obtuvo un porcentaje de 85.4% de residuos ubicados en regiones favorables (Figura 3). Por lo tanto, según el análisis estereoquímico, se puede afirmar que el modelo que tiene una mejor calidad es el modelo uno modelado con el servidor Robetta, ya que, el 85,4% de aminoácidos se encuentran en regiones energéticamente permitidas para los ángulos phi y psi, en comparación con el modelo obtenido con I-TASSER.

**Figura 2.** Modelo de estructura tridimensional de RXAM2 obtenido con el servidor Robetta.



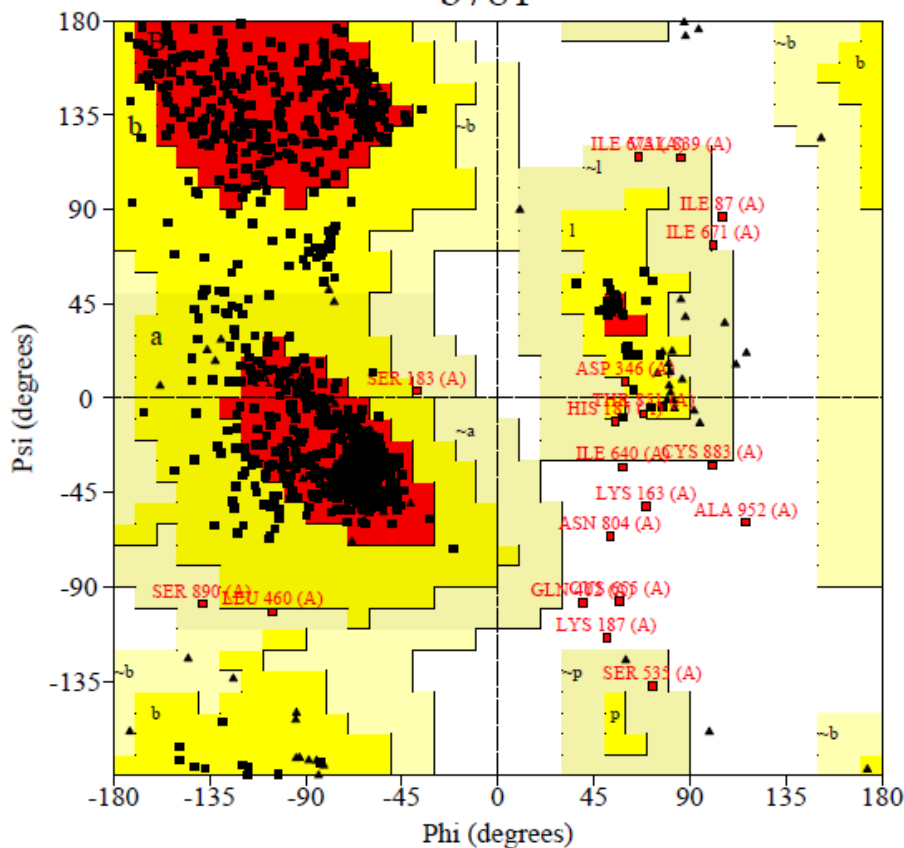
Nota. La representación del modelo fue generado en UCSF CHIMERA (Pettersen et al., 2004)

**Figura 3.** Diagrama de Ramachandran para el modelo de RXAM2 obtenido con el servidor Robetta.

PROCHECK

# Ramachandran Plot

b781



## Plot statistics

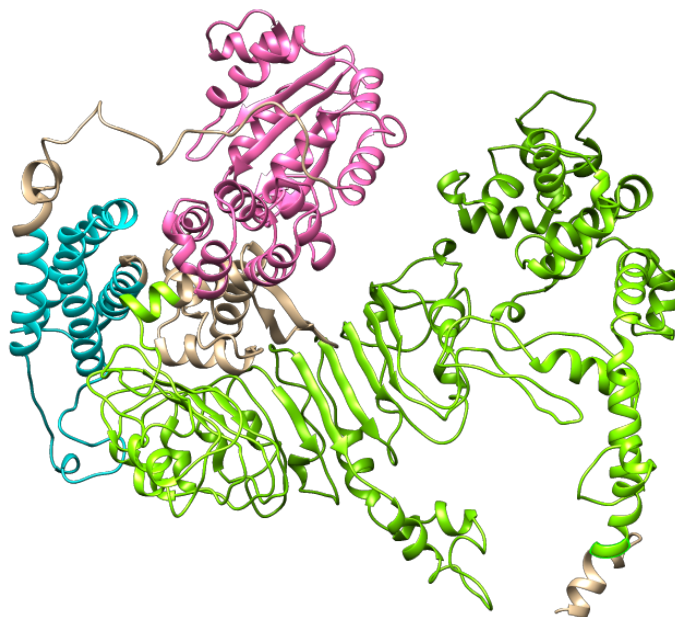
Residues in most favoured regions [A,B,L]	904	85.4%
Residues in additional allowed regions [a,b,l,p]	135	12.8%
Residues in generously allowed regions [-a,-b,-l,-p]	9	0.9%
Residues in disallowed regions	10	0.9%
-----		
Number of non-glycine and non-proline residues	1058	100.0%
Number of end-residues (excl. Gly and Pro)	2	
Number of glycine residues (shown as triangles)	73	
Number of proline residues	53	
-----		
Total number of residues	1186	

Based on an analysis of 118 structures of resolution of at least 2.0 Angstroms and R-factor no greater than 20%, a good quality model would be expected to have over 90% in the most favoured regions.

### 6.1.2 Análisis de Dominios Conservados de RXAM2

Las proteínas NLR se caracterizan por presentar tres dominios conservados, en la región N-terminal un dominio TIR o CC, un dominio central NB-ARC y un dominio en la región C-terminal LRR. Con el fin de verificar la presencia de dominios conservados en RXAM2, se identificó, a través de los servidores Dominios Conservados e Interpro, que RXAM2 presenta los dominios CC en el N-terminal desde el residuo ALA 5 hasta el residuo LEU 124, dominio NB-ARC desde el residuo ARG 169 hasta el residuo HIS 415 y el dominio LRR C-terminal desde el residuo TYR 503 hasta el residuo SER 1170 (Figura 4).

**Figura 4.** Identificación de dominios en el modelo de RXAM2 obtenido por el servidor Robetta. Dominio CC N-terminal color azul, dominio NB-ARC color rosado y dominio LRR C-terminal color verde.

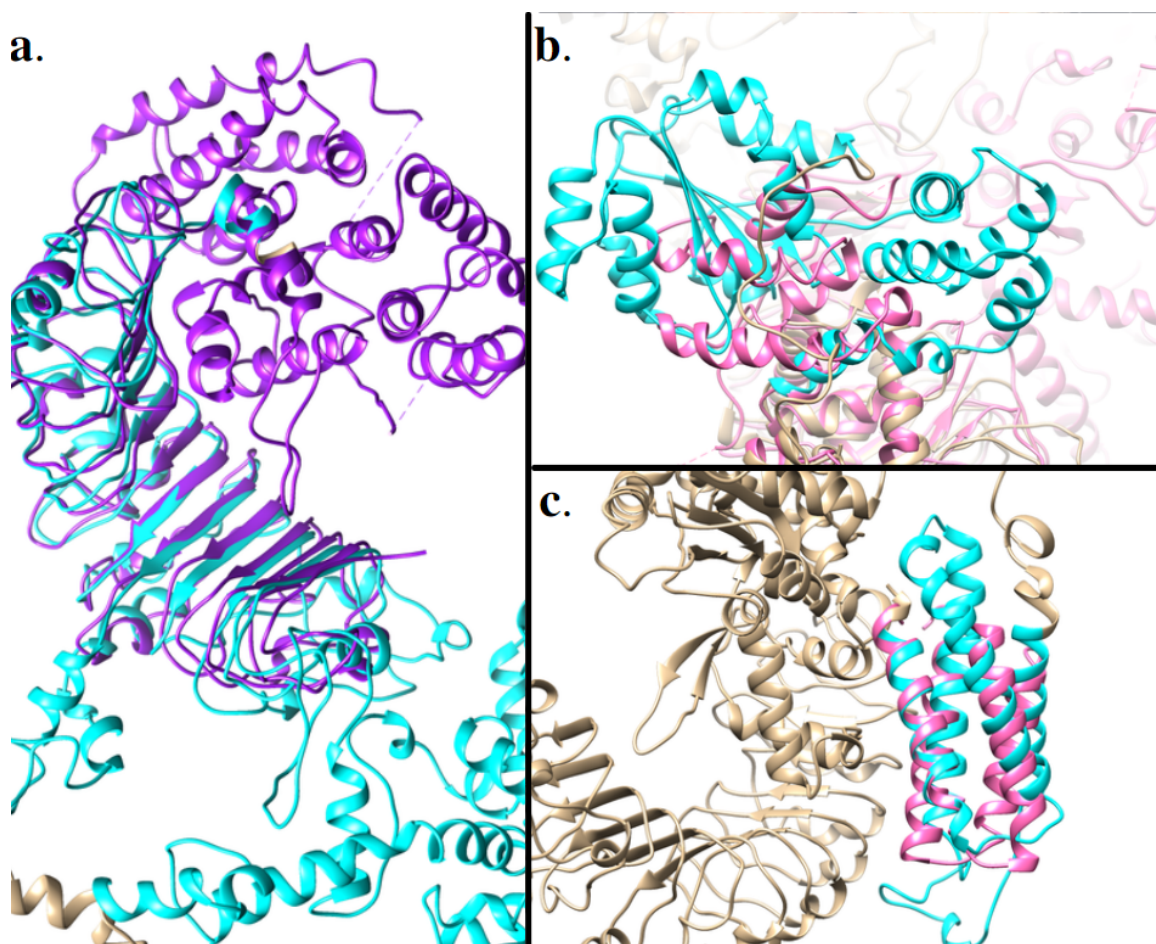


Nota. La representación del modelo fue generado en UCSF CHIMERA (Pettersen et al., 2004)

Estudios han mostrado que, los dominios de las NLRs presentan cierta conformación estructural característica. Se conoce que el dominio CC en la proteína Sr33 *Triticum aestivum* se caracteriza por estar formado por alfa hélices (Casey et al., 2016), al igual que ZAR1 y SCAB1 de *Arabidopsis thaliana* (Wang et al., 2019) (Zhang et al., 2012). En cuanto al dominio LRR de la región C-terminal, se ha descrito teóricamente que presenta forma de herradura y se puede observar en la proteína ZAR1 reportada experimentalmente (Wang et al., 2019). Con el fin de validar la conformación tridimensional de los dominios encontrados en RXAM2 en el modelo generado con Robetta y con el modelo obtenido por I-TASSER, se realizó una superposición de dominios con algunas proteínas dilucidadas experimentalmente, como ZAR1 y SCAB1. La superposición permitió identificar, principalmente en el modelo obtenido con el servidor Robetta, una mayor coincidencia tridimensional entre los dominios CC de SCAB1 y RXAM2 (Figura 5), y los dominios LRR y NB-ARC de ZAR1 con RXAM2, en comparación con el modelo obtenido con el servidor I-TASSER, modelo en el que los dominios de RXAM2 no coinciden tridimensionalmente con los dominios de las proteínas ZAR1 y SACB1. Por lo tanto, según el análisis de dominios, el modelo uno obtenido con Robetta se puede considerar como el modelo estructural más aproximado a la estructura tridimensional de RXAM2.

**Figura 5.** Comparación de estructuras entre el modelo RXAM2 obtenido con el servidor Robetta y las proteínas SCAB1 y ZAR1. a. Modelo de RXAM2 obtenido con el servidor Robetta (azul) comparado con dominio LRR C-terminal presente en ZAR1 (morado). b.

Modelo de RXAM2 obtenido con el servidor Robetta (azul) comparado con dominio NB-ARC presente en ZAR1 (rosado). c. Modelo de RXAM2 obtenido con el servidor Robetta (azul) comparado con dominio CC N-terminal presente en SCAB1 (rosado).



Nota. La representación de los modelos fueron generadas en UCSF CHIMERA (Pettersen et al., 2004).

## 6.2 Modelamiento de la estructura tridimensional de efectores de *Xpm*

Muchas especies del género *Xanthomonas* requieren un sistema de secreción de tipo III (T3SS) para causar patogenicidad en las plantas, por lo tanto, conocer la estructura de los efectores de T3 permite realizar una aproximación de cómo se trasladan a las células del huésped e interfieren con la respuesta inmune de la planta. Al igual que RXAM2, se modeló la estructura de los efectores de *Xpm* XopE1, XopE4, XopC2, XopAK y XopV con los servidores web I-TASSER y Robetta. Con el fin de seleccionar el mejor modelo, se realizó un análisis estereoquímico mediante el diagrama de Ramachandran con los cinco modelos obtenidos con I-TASSER y Robetta para los efectores XopE1, XopE4, XopC2, XopAK y XopV de *Xpm*. Además, dado que las proteínas efectoras T3 se translocan a diferentes organelos celulares (Lewis et al., 2009) (Varden et al., 2017), se evaluó la accesibilidad a solventes polares. Específicamente para *Xanthomonas spp* se ha postulado que sus compartimentos diana son la membrana celular, el núcleo y el citoplasma (Khan et al., 2017), sin embargo, son muy pocas las proteínas efectoras dilucidadas experimentalmente de *Xanthomonas*, así como la información teórica de su composición estructural.

### **6.2.1 Estructura del efector XopE1**

XopE1 es un efector de *Xpm* que está conformado por 399 aminoácidos, se caracteriza por poseer un motivo de miristoilación en la región N-terminal y se ha encontrado en 65 cepas de *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis* de diferentes regiones geográficas (Bart et al., 2012). El presente estudio, permitió identificar que XopE1 de *Xpm* posee hélices en un 39.60%, hebras en un 6.27% y bucles en un 54.14%, considerándose



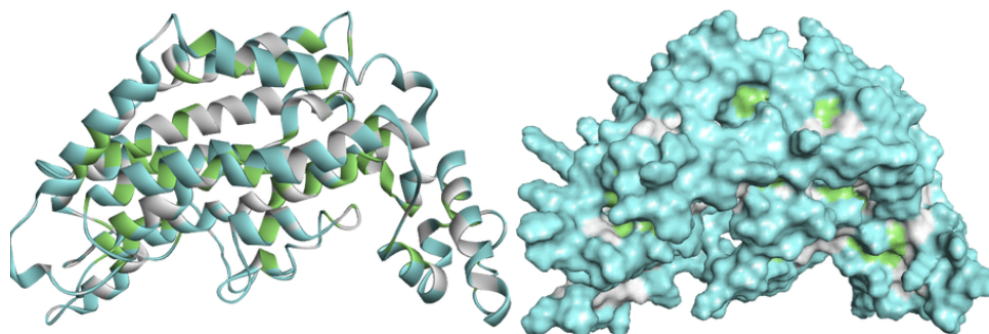
según su estructura secundaria, como una proteína mixta (Bernhofer et al., 2021) (Figura 6). En cuanto a la accesibilidad al solvente XopE1 presenta un 58.15% de aminoácidos expuestos necesarios para su establecimiento intracelular, 35.05% de aminoácidos no expuestos y 6.77% de aminoácidos intermedios. Estudios de microscopía confocal e inmunocitoquímica de XopE1 de *Xanthomonas campestris pv. vesicatoria* indican que esta proteína efectora se localiza en la membrana plasmática de *Nicotiana benthamiana*, en donde, el residuo glicina (G2A) en el motivo de miristoilación en la región N-terminal de XopE1, es necesario para su localización en la membrana (Thieme et al., 2007 y Salomon et al., 2011). Esta información coincide con lo obtenido con el servidor web DeepLoc-1.0, donde se clasifica a XopE1 de *Xpm* como una proteína poco soluble y posiblemente se localiza en la membrana celular (Almagro Armenteros et al., 2017).

Por otro lado, con el objetivo de evaluar la esteroquímica de los modelos, se obtuvo el diagrama de Ramachandran para XopE1. En el modelo uno obtenido por I-TASSER (Figura Suplementaria 2), donde se identifica un porcentaje de 76.9% de residuos ubicados en regiones favorables para el modelo uno, para el modelo dos 73.3%, modelo tres 69.5%, en el modelo cuatro 74.3% y en el modelo 5 71.0%. Por su parte, para el modelo uno generado por Robetta (Figura 6) se obtuvo un porcentaje de 90.7% (Figura 7), en el modelo dos 86.2%, modelo tres 88.6%, para el modelo cuatro 88.6% y el modelo cinco 88.3% de residuos ubicados en regiones favorables. Por lo tanto, se seleccionó al modelo uno de Robetta y de I-TASSER como los modelos estructurales más aproximados a la estructura tridimensional de XopE1 en *Xpm*, debido a que poseen un mayor puntaje de aminoácidos ubicados en regiones energéticamente favorables.

Con la finalidad de evaluar la calidad de los modelos de XopE1, se usó el servidor web PSVS. Para el modelo uno de XopE1, obtenido con el servidor I-TASSER, se concede un puntaje medio en Verify3D de 0.14, indicando la relación entre la estructura 1D y 3D de XopE1, en ProsaII de -0.09 para el pliegue de la proteína y MolProbity Clashscore de 26.61, indicando superposiciones estéricas, no presenta contactos cercanos entre átomos pesados y de hidrógeno, por lo tanto, la desviación cuadrática media de la distancia de enlaces covalentes se estableció en 0.015Å, y para ángulos en 3.1°; esto obtenido según el promedio de los valores RMSD de todos los enlaces y los ángulos, relacionados con el valor estándar para aminoácidos (diccionario).

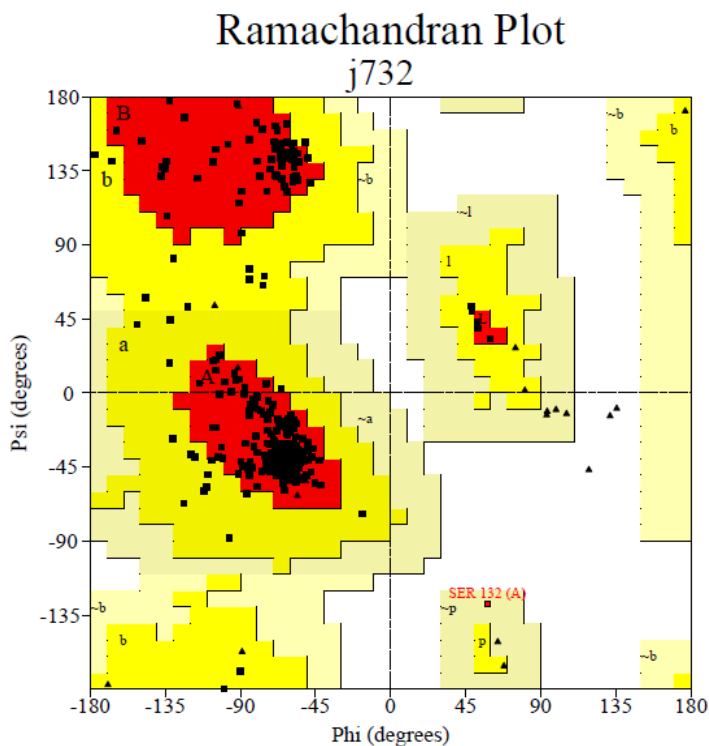
En el modelo arrojado por Robetta para XopE1, se puede observar un puntaje medio en Verify3D de 0.20, ProsaII de 0.27 y MolProbity Clashscore de 3.61, así mismo, no presenta contactos cercanos entre átomos pesados y de hidrógeno, por lo tanto, la desviación cuadrática media de la distancia de enlaces covalentes se estableció en 0.016Å, y para ángulos en 1.9°; esto obtenido según el promedio de los valores RMSD de todos los enlaces y los ángulos, relacionados con el valor estándar para aminoácidos (diccionario), por lo tanto, el modelo más aproximado a la estructura tridimensional de la proteína efectora XopE1 es el modelo uno modelado con el servidor Robetta, debido a que según su calidad, posee un mayor porcentaje de aminoácidos ubicados en regiones favorables energéticamente para los ángulos de torsión phi y psi al igual que los valores del servidor PSVS, ya que, para Verify3D el modelo debe tener más del 80% de los residuos de los aminoácidos con un puntaje mayor o igual 0,2 (Eisenberg et al., 1997) y para Molprobity entre más bajo el valor, presenta una mejor calidad (Chen et al., 2010).

**Figura 6.** Accesibilidad de solvente en XopE1. Modelo obtenido con el servidor Robetta. Aminoácidos expuestos: azul, aminoácidos no expuestos: verde. Izquierda: representación en cintas. Derecha: representación en superficie.



Nota. La representación del modelo fue generada en Discovery Studio (Dassault Systèmes BIOVIA, 2017)

**Figura 7.** Diagrama de Ramachandran para el modelo de XopE1 obtenido con el servidor Robetta.



#### Plot statistics

Residues in most favoured regions [A,B,L]	303	90.7%
Residues in additional allowed regions [a,b,l,p]	30	9.0%
Residues in generously allowed regions [-a,-b,-l,-p]	1	0.3%
Residues in disallowed regions	0	0.0%
	----	-----
Number of non-glycine and non-proline residues	334	100.0%
Number of end-residues (excl. Gly and Pro)	2	
Number of glycine residues (shown as triangles)	30	
Number of proline residues	33	
	----	
Total number of residues	399	

Based on an analysis of 118 structures of resolution of at least 2.0 Angstroms and R-factor no greater than 20%, a good quality model would be expected to have over 90% in the most favoured regions.

### 6.2.2 Estructura del efector XopE4

XopE4 es un efector de *Xpm* que está conformado por 363 aminoácidos. No se han realizado estudios funcionales de XopE4 en *Xpm*, sin embargo, está altamente conservado

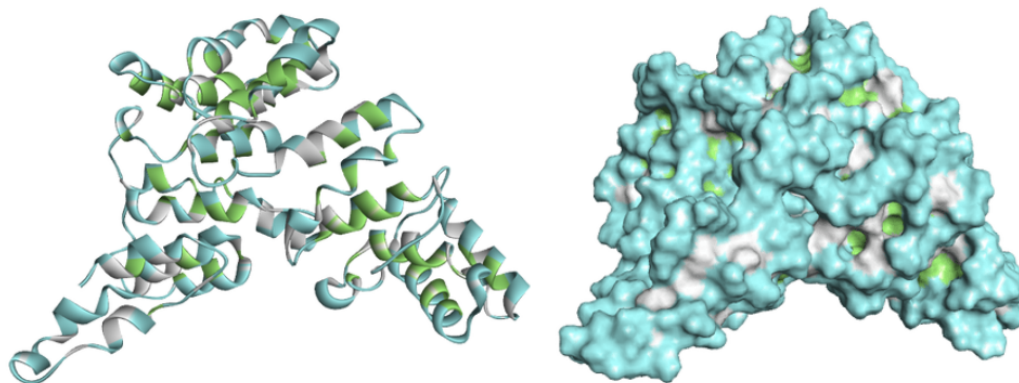
en 65 cepas secuenciadas de *Xpm* (Bart et al., 2012). Es capaz de suprimir la ETI, a diferentes concentraciones, inducida por HopA1 en *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi (Medina et al., 2017). El presente estudio, permitió identificar que XopE4 está conformado por hélices en un 36.36%, hebras en un 7.71% y bucles en un 55.92%, por su composición se clasifica como una proteína mixta (Bernhofer et al., 2021) (Figura 8). En cuanto a la accesibilidad al solvente polar, se encuentra 59.78% de aminoácidos expuestos necesarios para su establecimiento intracelular, 34.44% de aminoácidos no expuestos y 5.79% de aminoácidos intermedios. Sin embargo, para XopE4, aún no se cuenta con información experimental de su localización subcelular, según la aproximación realizada en el presente estudio con el servidor DeepLoc-1.0, XopE4 se puede clasificar como una proteína poco soluble y se encuentra posiblemente en la membrana celular (Almagro Armenteros et al., 2017).

Con el objetivo de realizar un análisis estereoquímico, se obtuvo el diagrama de Ramachandran para los modelos de XopE4. Para los modelos de I-TASSER se identificó en el modelo uno (Figura Suplementaria 3) un porcentaje de residuos ubicados en regiones favorables de 70.1%, en el modelo dos 59.8%, para el modelo tres 58.5%, en el modelo cuatro 37.4% y en el modelo cinco 54.7%. En los modelos construidos por Robetta se obtuvo un porcentaje de residuos ubicados en regiones favorables para el modelo uno de 91.0% (Figura 9), para el modelo dos 88.4%, en el modelo tres 87.5%, para el modelo cuatro 88.4% y en el modelo cinco 87.1%. Por lo tanto, según el porcentaje de aminoácidos ubicados en regiones favorables para los ángulos phi y psi, se seleccionó el modelo uno de Robetta (Figura 8) y I-TASSER.

Ahora bien, con la finalidad de evaluar la calidad del modelo uno de XopE4 obtenido con el servidor I-TASSER, se obtuvo un puntaje medio en Verify3D de 0.08, indicando la relación entre la estructura 1D y 3D de XopE4, en ProsaII de -0.30 para el pliegue de la proteína y MolProbity Clashscore de 18.14, indicando superposiciones estéricas, asimismo, no presenta contactos cercanos entre átomos pesados y átomos de hidrógeno, por lo tanto, la desviación cuadrática media de la distancia de enlaces covalentes se estableció en  $0.015\text{\AA}$ , y para ángulos en  $3.0^\circ$ ; esto obtenido según el promedio de los valores RMSD de todos los enlaces y los ángulos, relacionados con el valor estándar para aminoácidos (diccionario).

En cuanto al modelo uno obtenido por Robetta para XopE4, se obtuvo un puntaje medio en Verify3D de 0.17, ProsaII de 0.36 y MolProbity Clashscore de 3.48, así mismo, no presenta contactos cercanos entre átomos pesados y átomos de hidrógeno, por lo tanto, la desviación cuadrática media de la distancia de enlaces covalentes se estableció en  $0.017\text{\AA}$  y para ángulos en  $2.1^\circ$ ; esto obtenido según el promedio de los valores RMSD de todos los enlaces y los ángulos, relacionados con el valor estándar para aminoácidos (diccionario). Por lo tanto, el modelo que mejor se aproxima a una estructura tridimensional del efector XopE4 es el modelo uno construido por el servidor Robetta (Figura 8), ya que, tiene el mejor porcentaje de aminoácidos en regiones favorables energéticamente, así como el análisis estérico del servidor PSVS, ya que, para Verify3D el modelo debe tener más del 80% de los residuos de los aminoácidos con un puntaje mayor o igual 0,2 (Eisenberg et al., 1997) y para Molprobity entre más bajo el valor, presenta una mejor calidad (Chen et al., 2010).

**Figura 8.** Accesibilidad de solvente en XopE4. Modelo obtenido con el servidor Robetta. Aminoácidos expuestos: azul, aminoácidos enterrados: verde. Izquierda: representación en cintas. Derecha: representación en superficie.

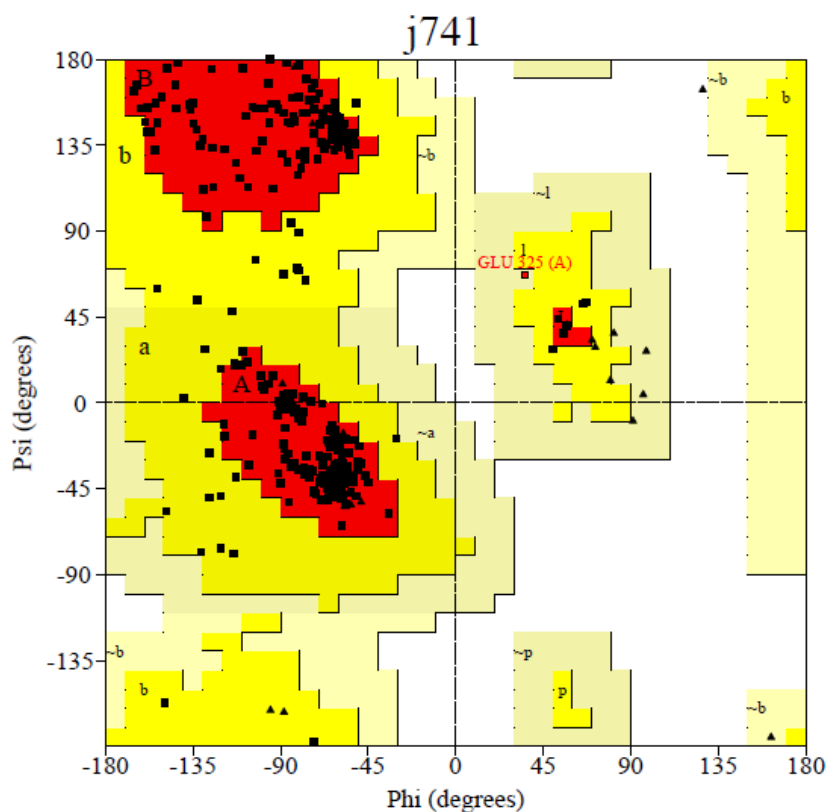


Nota. La representación del modelo fue generada en Discovery Studio (Dassault Systèmes BIOVIA, 2017)

**Figura 9.** Diagrama de Ramachandran para el modelo de XopE4 obtenido con el servidor Robetta.

PROCHECK

# Ramachandran Plot



## Plot statistics

Residues in most favoured regions [A,B,L]	283	91.0%
Residues in additional allowed regions [a,b,l,p]	27	8.7%
Residues in generously allowed regions [-a,~b,~l,~p]	1	0.3%
Residues in disallowed regions	0	0.0%
-----		
Number of non-glycine and non-proline residues	311	100.0%
Number of end-residues (excl. Gly and Pro)	2	
Number of glycine residues (shown as triangles)	24	
Number of proline residues	26	
-----		
Total number of residues	363	

Based on an analysis of 118 structures of resolution of at least 2.0 Angstroms and R-factor no greater than 20%, a good quality model would be expected to have over 90% in the most favoured regions.



### 6.2.3 Estructura del efector XopC2

El efector XopC2 de *Xpm* está formado 436 aminoácidos, con un 56.19% hélices, hebras en un 8.26% y bucles en un 35.55% (Figura 10), considerándose como una proteína mixta (Bernhofer et al., 2021), cercano a lo reportado por Mondal et al., 2020, en donde XopC2 de *Xanthomonas axonopodis* pv. *punicae* tiene confirmación de hélice 31,35%, bucle 48,11% y hebra 20,54%, además, se caracteriza por suprimir las respuestas de defensa como la deposición de callosa, la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y la activación de genes asociados a la resistencia en plantas (Mondal et al., 2020). En *Xpm*, XopC2 se ha encontrado en 65 cepas de diferentes regiones biogeográficas (Bart et al., 2012). En cuanto, a su accesibilidad a un solvente polar, se encuentra 48.39% de aminoácidos expuestos necesarios para su estabilidad intracelular en la planta, 43.81% de aminoácidos no expuestos y 7.80% de aminoácidos intermedios, como se observa en la Figura 10, por lo tanto, apoyado en el servidor DeepLoc-1.0 es una proteína soluble y posiblemente se encuentra en la mitocondria (Almagro Armenteros et al., 2017), comparado con XopC2 de *Xanthomonas axonopodis* pv. *punicae*, donde el 40,54% de residuos están enterrados, 50,81% expuestos y 8,65% de residuos intermedios y en *Nicotiana benthamiana* se ha localizado en la membrana celular mediante microscopía confocal (Mondal et al., 2020). A través de un análisis basado en STRING, se insinuó que XopC2 e *Xanthomonas axonopodis* pv. *punicae*, interactúa con múltiples proteínas de plantas localizadas en la membrana plasmática, incluido el regulador de transcripción de la familia CCR4-NOT, TTN que mantiene la estructura de los cromosomas y la isoforma de serina / treonina-proteína fosfatasa 2A (PP2A). La predicción de las interacciones con

proteínas presentes en la membrana plasmática, indican el posible rol de XopC2 en diferentes funciones y por tanto, suprimir la inmunidad en plantas (Mondal et al., 2020).

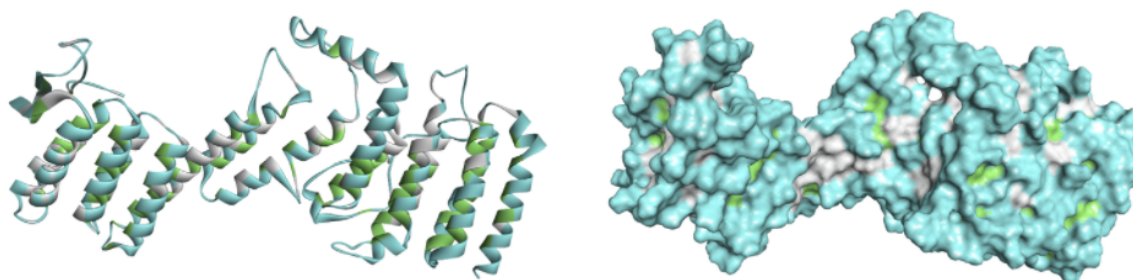
Con la finalidad de evaluar la calidad de los modelos obtenidos con los servidores I-TASSER y Robetta, para el modelo uno construido con el servidor I-TASSER (Figura Suplementaria 4), un puntaje medio en Verify3D de 0.10, indicando la relación entre la estructura 1D y 3D de RXAM2, en ProsaII de 0.20 para el pliegue de la proteína y MolProbity Clashscore de 21.02, indicando superposiciones estéricas, no presenta contactos cercanos entre átomos pesados y átomos de hidrógeno, por lo tanto, la desviación cuadrática media de la distancia de enlaces covalentes se estableció en 0.015Å y para ángulos en 2.7°; esto obtenido según el promedio de los valores RMSD de todos los enlaces y los ángulos, relacionados con el valor estándar para aminoácidos (diccionario).

Con el fin de validar la estereoquímica del modelo se empleó el diagrama de Ramachandran para XopC2, en los modelos obtenidos por I-TASSER se identificó un porcentaje de residuos ubicados en regiones favorables en el modelo uno de 72.2%, en el modelo dos 63.0%, para el modelo tres 59.1%, en el modelo cuatro 46.9% y en el modelo cinco 47.2%, para los modelos construidos por el servidor Robetta (Figura 10) se obtuvo un porcentaje de 94.3% de residuos ubicados en regiones favorables para el modelo uno (Figura 11), en el modelo dos 88.9%, para el modelo tres 90.7%, en el modelo cuatro 89.1% y finalmente para el modelo cinco 92.0%.

Ahora bien, para el modelo uno obtenido con Robetta de XopC2 (Figura 10), se obtuvo un puntaje medio en Verify3D de 0.17, ProsaII de 0.52 y MolProbity Clashscore

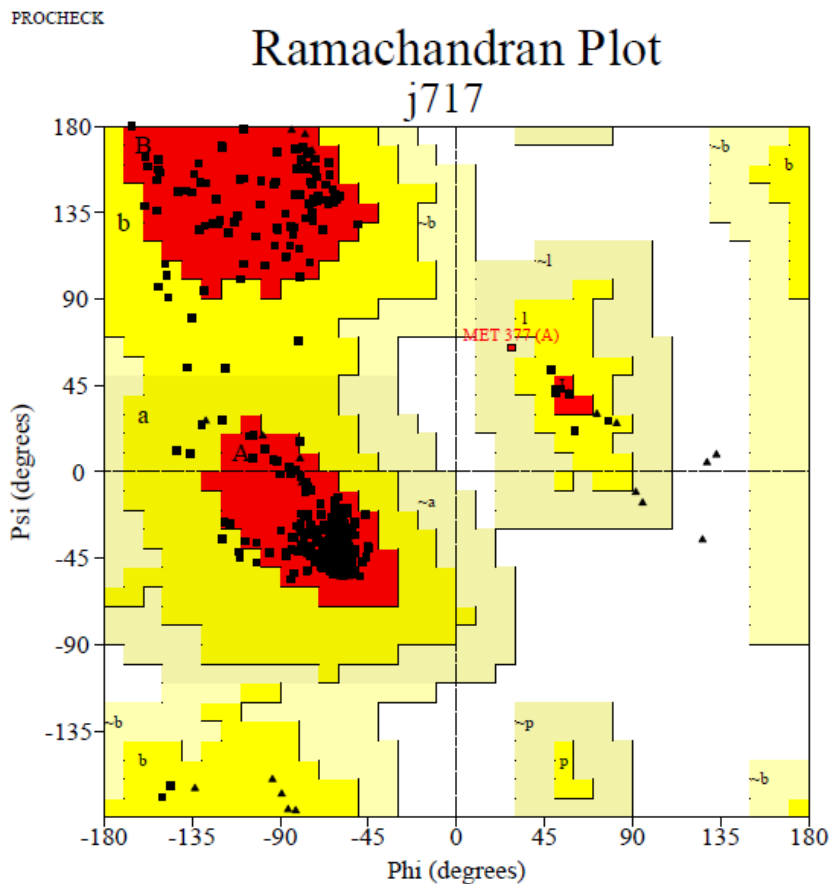
de 2.13, así mismo, no presenta contactos cercanos entre átomos pesados y átomos de hidrógeno, por lo tanto, la desviación cuadrática media de la distancia de enlaces covalentes se estableció en  $0.017\text{\AA}$  y para ángulos en  $1.7^\circ$ ; esto obtenido según el promedio de los valores RMSD de todos los enlaces y los ángulos, relacionados con el valor estándar para aminoácidos (diccionario). Por lo tanto, según el análisis estereoquímico, señalamos al modelo uno construido con Robetta, como el modelo más aproximado a la estructura tridimensional de XopC2, ya que, presenta el puntaje mayor en aminoácidos ubicados en regiones energéticamente favorables y según el análisis de PSVS, en donde, Verify3D el modelo debe tener más del 80% de los residuos de los aminoácidos con un puntaje mayor o igual 0,2 (Eisenberg et al., 1997) y para Molprobitry entre más bajo el valor, presenta una mejor calidad (Chen et al., 2010).

**Figura 10.** Accesibilidad de solvente en XopC2. Modelo obtenido con el servidor Robetta. Aminoácidos expuestos: azul, aminoácidos no expuestos: verde. Izquierda: representación en cintas. Derecha: representación en superficie.



Nota. La representación del modelo fue generada en Discovery Studio (Dassault Systèmes BIOVIA, 2017)

**Figura 11.** Diagrama de Ramachandran para el modelo de XopC2 obtenido con el servidor Robetta.



#### Plot statistics

Residues in most favoured regions [A,B,L]	364	94.3%
Residues in additional allowed regions [a,b,l,p]	21	5.4%
Residues in generously allowed regions [~a,~b,~l,~p]	1	0.3%
Residues in disallowed regions	0	0.0%
-----		
Number of non-glycine and non-proline residues	386	100.0%
Number of end-residues (excl. Gly and Pro)	2	
Number of glycine residues (shown as triangles)	31	
Number of proline residues	17	
-----		
Total number of residues	436	

Based on an analysis of 118 structures of resolution of at least 2.0 Angstroms and R-factor no greater than 20%, a good quality model would be expected to have over 90% in the most favoured regions.

#### 6.2.4 Estructura del efector XopAK

La proteína efectora XopAK de *Xpm* está formada por 297 aminoácidos, con 13.80% de hélices, hebras en un 18.86%, bucles en un 67.34% (Figura 12), considerada como una proteína mixta (Bernhofer et al., 2021), se ha encontrado en 65 cepas de *Xpm*, indicando su alta conservación en diferentes cepas de diferentes regiones biogeográficas (Bart et al., 2012). XopAK de *Xanthomonas euvesicatoria*, se caracteriza por poseer un dominio catalítico deamidasa en la región C-terminal (Teper et al., 2016), no se ha reportado con exactitud la posible localización celular de XopAK, sin embargo, en este estudio, se determinó que para la accesibilidad a un solvente polar, se encuentra 60.27% de aminoácidos expuestos posiblemente para su establecimiento intracelular en la célula de la planta, 34.34% de aminoácidos no expuestos y 5.39% de aminoácidos intermedios (Figura 12), siendo una proteína soluble y posiblemente se encuentra en el citoplasma, según el servidor DeepLoc-1.0 (Almagro Armenteros et al., 2017).

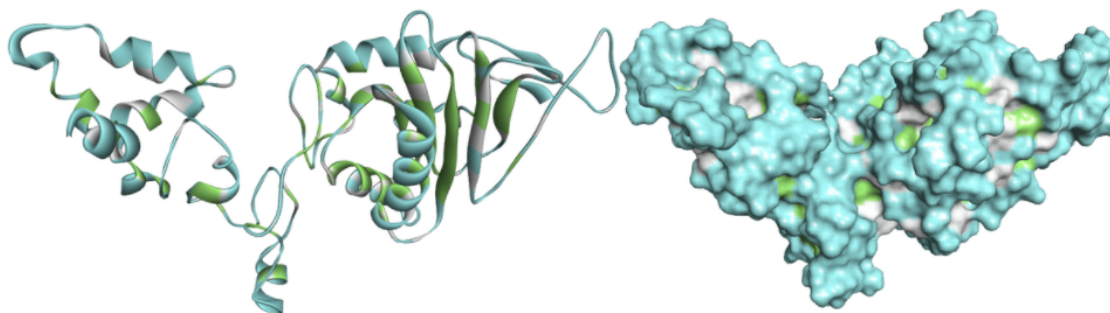
Ahora bien, con el fin de realizar un análisis estereoquímico, se obtuvo el diagrama de Ramachandran de XopAK, en los modelos obtenidos por I-TASSER (Figura Suplementaria 5) se identificó un porcentaje de 55.8% de residuos ubicados en regiones favorables para el modelo uno, en el modelo dos 39.6%, para el modelo tres 50.0%, en el modelo cuatro 48.8% y en modelo cinco 40.4%, en cuanto a Robetta (Figura 12) se identificó un porcentaje de 87.4% de residuos ubicados en regiones favorables para el modelo uno (Figura 13), en el modelo dos 82.0%, para el modelo tres 82.0%, en el modelo cuatro 80.0% y para el modelo cinco 81.6%. Por lo tanto, los modelos uno del servidores I-TASSER y Robetta son los más aproximados a la estructura tridimensional del efector

XopAK, ya que, poseen el mayor porcentaje de aminoácidos ubicados en regiones energéticamente favorables para los ángulos de torsión phi y psi. Con el fin de evaluar el modelo uno obtenido por I-TASSER, se obtuvo un puntaje medio en Verify3D de 0.18, indicando la relación entre la estructura 1D y 3D de XopAK, en ProsaII de 0.05 para el pliegue de la proteína y MolProbity Clashscore de 87.30 indicando superposiciones estéricas, así mismo, no presenta contactos cercanos entre átomos pesados y átomos de hidrógeno, por lo tanto, la desviación cuadrática media de la distancia de enlaces covalentes se estableció en  $0.019\text{\AA}$  y para ángulos en  $4.2^\circ$ ; esto obtenido según el promedio de los valores RMSD de todos los enlaces y los ángulos, relacionados con el valor estándar para aminoácidos (diccionario).

En cuanto al modelo uno obtenido por Robetta para XopAK (Figura 12), se obtuvo un puntaje en Verify3D de 0.23, ProsaII de 0.39 y MolProbity Clashscore de 5.05, así mismo, no presenta contactos cercanos entre átomos pesados y átomos de hidrógeno, por lo tanto, la desviación cuadrática media de la distancia de enlaces covalentes se estableció en  $0.017\text{\AA}$  y para ángulos en  $2.2^\circ$ ; esto obtenido según el promedio de los valores RMSD de todos los enlaces y los ángulos, relacionados con el valor estándar para aminoácidos (diccionario). Por lo tanto, el modelo más aproximado a la estructura tridimensional de XopAK en este estudio, es el modelo uno construido con el servidor Robetta, ya que presenta el puntaje mayor en aminoácidos ubicados en regiones energéticamente favorables y según el análisis de PSVS, en donde, Verify3D el modelo debe tener más del 80% de los residuos de los aminoácidos con un puntaje mayor o igual 0,2 (Eisenberg et al.,

1997) y para Molprobitry entre más bajo el valor, presenta una mejor calidad (Chen et al., 2010).

**Figura 12.** Accesibilidad de solvente en XopAK. Modelo obtenido con el servidor Robetta. Aminoácidos expuestos: azul, aminoácidos no expuestos: verde. Izquierda: representación en cintas. Derecha: representación en superficie.



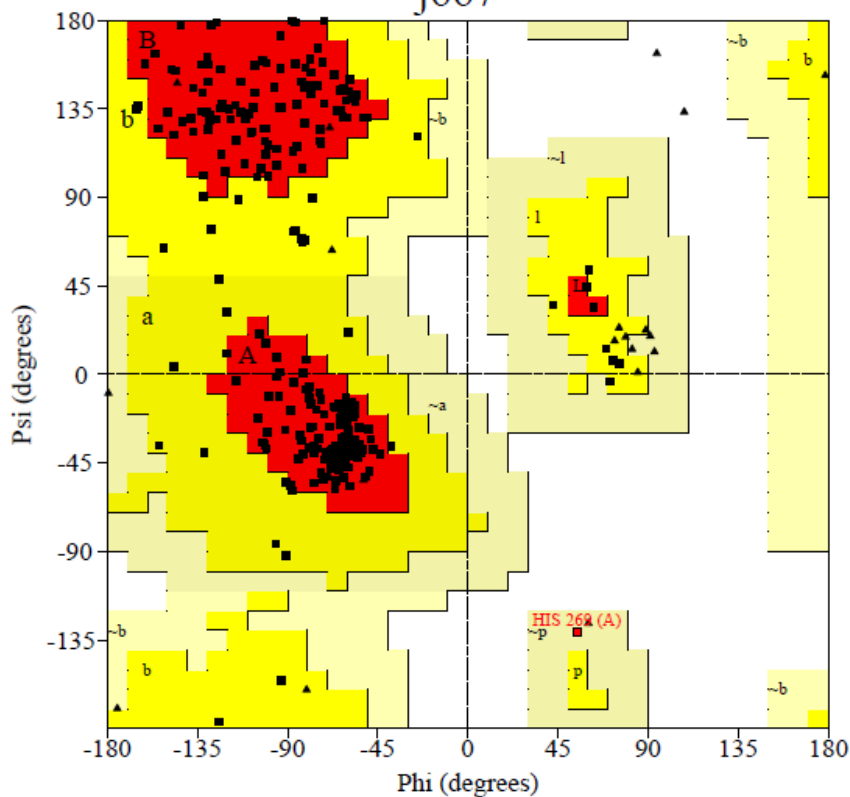
Nota. La representación del modelo fue generada en Discovery Studio (Dassault Systèmes BIOVIA, 2017)

**Figura 13.** Diagrama de Ramachandran para el modelo de XopAK obtenido con el servidor Robetta.

PROCHECK

## Ramachandran Plot

j667



## Plot statistics

Residues in most favoured regions [A,B,L]	218	87.2%
Residues in additional allowed regions [a,b,l,p]	31	12.4%
Residues in generously allowed regions [-a,-b,-l,-p]	1	0.4%
Residues in disallowed regions	0	0.0%
-----		
Number of non-glycine and non-proline residues	250	100.0%
Number of end-residues (excl. Gly and Pro)	2	
Number of glycine residues (shown as triangles)	24	
Number of proline residues	21	
-----		
Total number of residues	297	

Based on an analysis of 118 structures of resolution of at least 2.0 Angstroms and R-factor no greater than 20%, a good quality model would be expected to have over 90% in the most favoured regions.



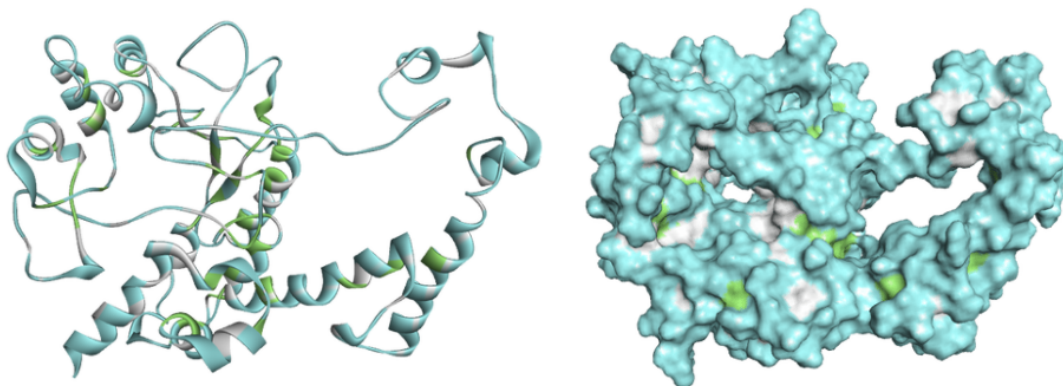
### 6.2.5 Estructura del efector XopV

Son muy limitados los estudios que se han realizado sobre el efector XopV, sin embargo, se ha identificado que XopV de *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* es capaz de suprimir la activación de MAPK desencadenada por peptidoglicano en arroz (Long et al., 2018). XopV de *Xpm* cuenta con 373 aminoácidos, en donde, 17.96% son hélices, hebras en un 13.40%, y bucles en un 68.63% (Figura 14), se ha encontrado en 18 cepas de *Xpm*, donde se identifica su conservación en cepas de diferentes regiones biogeográficas (Bart et al., 2012). Frente a la accesibilidad al solvente polar, se determinó que 68.63% de aminoácidos están expuestos, posiblemente importantes para su establecimiento intracelular en la planta, 26.01% de aminoácidos no expuestos y 5.36% de aminoácidos intermedios (Figura 14), siendo una proteína soluble y posiblemente se encuentra en el citoplasma según la predicción del servidor DeepLoc.1-0 (Almagro Armenteros et al., 2017).

Con el objetivo de realizar un análisis estereoquímico, se obtuvo el diagrama de Ramachandran para cada uno de los modelos obtenidos de XopV. En primera instancia, para el modelo uno obtenido por I-TASSER (Figura Suplementaria 6) se identificó un porcentaje de 59.6% de residuos ubicados en regiones favorables en el modelo uno, en el modelo dos 38.4%, para el modelo tres 34.0%, en el modelo cuatro 40.1% y para el modelo cinco 38.4%. En cuanto a los modelos construidos por Robetta (Figura 14), se obtuvo un porcentaje de 89.2% de residuos ubicados en regiones favorables para el modelo uno (Figura 15), en el modelo dos 79.1%, para el modelo tres 79.1%, en el modelo cuatro 84.5% y en el modelo cinco 83.8%. Con el objetivo de evaluar el modelo uno de

I-TASSER, se obtuvo un puntaje medio en Verify3D de 0.15, indicando la relación entre la estructura 1D y 3D de RXAM2, en ProsaII de -0.15 para el pliegue de la proteína y MolProbity Clashscore de 21.00, indicando superposiciones estéricas, así mismo, no presenta contactos cercanos entre átomos pesados y átomos de hidrógeno, por lo tanto, la desviación cuadrática media de la distancia de enlaces covalentes se estableció en  $0.015\text{\AA}$  y para ángulos en  $3.1^\circ$ ; esto obtenido según el promedio de los valores RMSD de todos los enlaces y los ángulos, relacionados con el valor estándar para aminoácidos (diccionario). En cuanto al modelo uno obtenido por Robetta (Figura 14), se puede obtener, un puntaje medio en Verify3D de 0.19, ProsaII de 0.04 y MolProbity Clashscore de 4.45, así mismo, no presenta contactos cercanos entre átomos pesados y átomos de hidrógeno, por lo tanto, la desviación cuadrática media de la distancia de enlaces covalentes se estableció en  $0.017\text{\AA}$  y para ángulos en  $2.3^\circ$ ; esto obtenido según el promedio de los valores RMSD de todos los enlaces y los ángulos, relacionados con el valor estándar para aminoácidos (diccionario). Por lo tanto, según el análisis estereoquímico, el modelo uno construido por el servidor Robetta, es el más aproximado para la estructura tridimensional del efector XopV en este estudio, ya que, presenta el puntaje mayor en aminoácidos ubicados en regiones energéticamente favorables y según el análisis de PSVS, en donde, Verify3D el modelo debe tener más del 80% de los residuos de los aminoácidos con un puntaje mayor o igual 0,2 (Eisenberg et al., 1997) y para Molprobity entre más bajo el valor, presenta una mejor calidad (Chen et al., 2010).

**Figura 14.** Accesibilidad de solvente en XopV. Modelo obtenido con el servidor Robetta. Aminoácidos expuestos: azul, aminoácidos no expuestos: verde. Izquierda: representación en cintas. Derecha: representación en superficie.

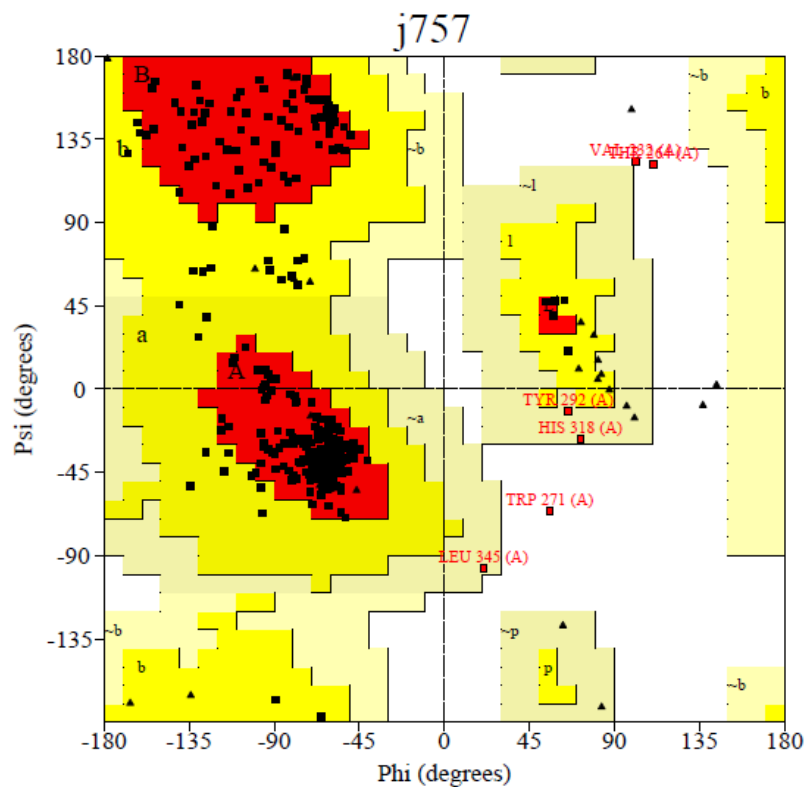


Nota. La representación del modelo fue generada en Discovery Studio (Dassault Systèmes BIOVIA, 2017)

**Figura 15.** Diagrama de Ramachandran para el modelo de XopV obtenido con el servidor Robetta.

PROCHECK

## Ramachandran Plot



### Plot statistics

Residues in most favoured regions [A,B,L]	265	89.2%
Residues in additional allowed regions [a,b,l,p]	26	8.8%
Residues in generously allowed regions [~a,~b,~l,~p]	3	1.0%
Residues in disallowed regions	3	1.0%
-----		
Number of non-glycine and non-proline residues	297	100.0%
Number of end-residues (excl. Gly and Pro)	2	
Number of glycine residues (shown as triangles)	35	
Number of proline residues	39	
-----		
Total number of residues	373	

Based on an analysis of 118 structures of resolution of at least 2.0 Angstroms and R-factor no greater than 20%, a good quality model would be expected to have over 90% in the most favoured regions.

A través del modelado por homología con los servidores Robetta y I-TASSER, se logró generar la posible estructura tridimensional de RXAM2 y los efectores XopE1,

XopE4, XopC2, XopAK y XopV. Según la calidad identificada con el servidor PSVS y el diagrama de Ramachandran de cada modelo generado, se logró determinar a los modelos construidos por el servidor Robetta como los más aproximados a la estructura tridimensional de las proteínas estudiadas. Sin embargo, es importante evaluar más la calidad de los modelos construidos computacionalmente, por ejemplo, mediante dinámica molecular y así poder analizar su comportamiento. De igual modo, se sugiere comparar con diferentes métodos de construcción de estructuras tridimensionales, ya que, si bien en RXAM2 hay una identidad con una proteína NLR, para los efectores de *Xpm*, las plantillas utilizadas por los servidores Robetta y I-TASSER, pertenecen a organismos poco relacionados con *Xpm*.

## 6.2 Acoplamiento Molecular

Varias bacterias gramnegativas fitopatógenas alteran la inmunidad del huésped utilizando el sistema de secreción tipo III, el cual trasloca proteínas efectoras de tipo III, asociadas a la virulencia directamente a la célula del huésped. Para protegerse contra las proteínas efectoras tipo III, las plantas han desarrollado mecanismos para detectar las proteínas efectoras, y así, desencadenar una respuesta inmune, denominada inmunidad activada por efectores (ETI). La ETI está mediada por proteínas de resistencia o NLR, que reconocen directa o indirectamente a las proteínas efectoras (Dangl et al., 2013)(Burdett et al., 2019). Con la finalidad de identificar posibles sitios de interacción entre RXAM2 y efectores de *Xpm*, y según lo obtenido mediante la técnica de doble híbrido, en donde se sugiere que RXAM2 interactúa con efectores de *Xpm* de forma directa (Román Reyna,

2012), se realizó acoplamiento molecular en dos pasos para su respectiva validación, primero un acoplamiento rígido con el servidor ClusPro y segundo un acoplamiento flexible con el servidor SwarmDock.

En el acoplamiento rígido, realizado con el servidor ClusPro, se obtuvo un total de 10 posibles modelos de acoplamientos para cada coeficiente de puntuación (balanceado, favorecido por electrostática, favorecido por hidrofobicidad y Van der Waals + electrostática). Para las interacciones entre RXAM2 y efectores de *Xpm*, no se posee información experimental, por lo tanto, y según lo reportado por Kozakov et al., 2017, se eligió para cada acoplamiento rígido entre RXAM2 y los efectores de *Xpm*, el modelo uno del coeficiente de puntuación balanceado.

Para el acoplamiento flexible, el servidor SwarmDock brindó un total de 10 posibles modelos de acoplamiento, al igual que el acoplamiento rígido y según Torchala et al., 2013, cuando no se posee información experimental de las posibles interacciones, se sugiere escoger el modelo uno obtenido con el servidor SwarmDock.

Las proteínas NLR se caracterizan por poseer tres dominios, un dominio central NB-ARC, un dominio en la región N-terminal CC/TIR y un dominio en la región C-terminal LRR. Para el dominio LRR, aún no se ha definido su papel específico, sin embargo, se ha descrito que puede participar en la detección de las proteínas efectoras (Dodds et al., 2006), en la autoinhibición y en algunos casos la activación de NLR (Moffett et al., 2002), además, es el dominio más variable de las proteínas, posiblemente debido a las presiones de selección diversificadas, dando especificidad a las proteínas NLR

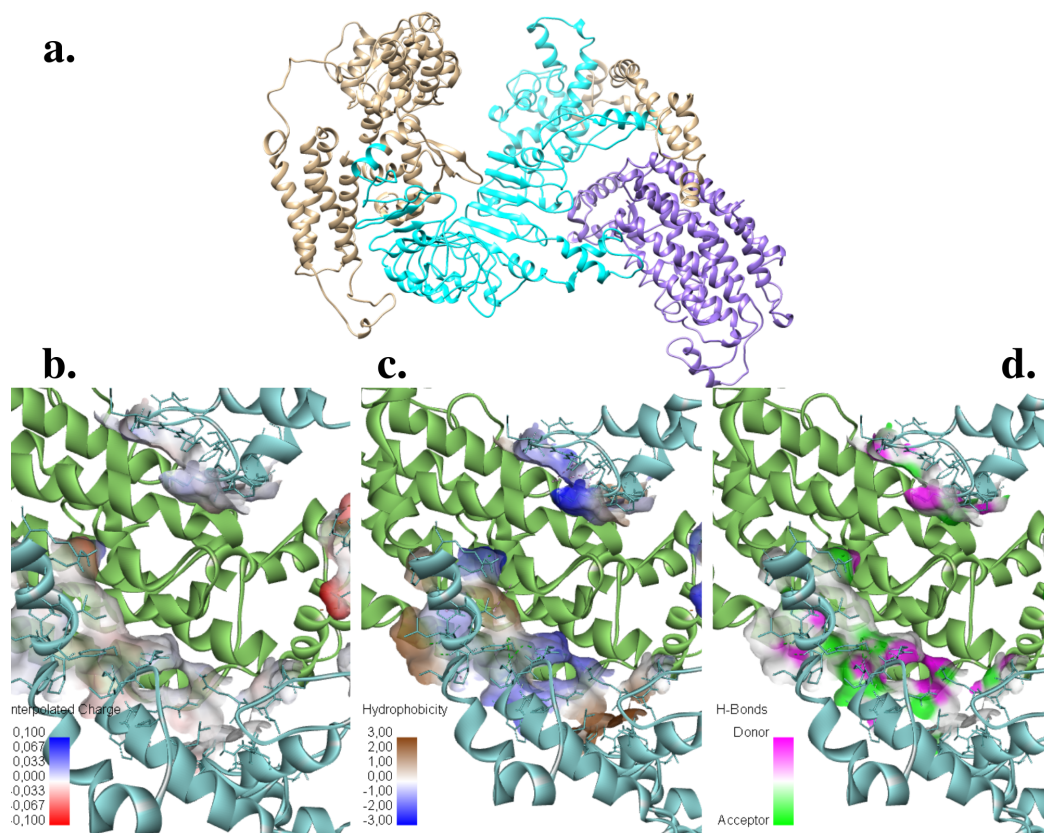
en las plantas (Burdett et al., 2019). En los posibles sitios de interacción de RXAM2 con los efectores de *Xpm*, se logró identificar que en tres de los efectores; XopE1 en acoplamiento rígido (Figura 16) (Tabla 1) y acoplamiento flexible (Figura 17) (Tabla 2), en XopE4 en acoplamiento rígido (Figura 18) (Tabla 3) y acoplamiento flexible (Figura 19) (Tabla 4) y XopC2 en acoplamiento rígido (Figura 20) (Tabla 5) y acoplamiento flexible (Figura 21) (Tabla 6), la interacción posiblemente ocurre a través del dominio LRR de RXAM2. Entre las interacciones encontradas se destacan principalmente interacciones de tipo puentes de hidrógeno, fuerzas electrostáticas e interacciones hidrofóbicas para XopE1 (Tabla 1 y Tabla 2), XopE4 (Tabla 3 y Tabla 4) y XopC2 (Tabla 5 y Tabla 6). Además, se identificó que en el acoplamiento entre RXAM2 y XopE1, participaron los residuos ARG91, ARG389, THR100 y TYR136 del efector XopE1 tanto para el acoplamiento rígido como flexible, y entre RXAM2 y XopC2, está participó el residuo TYR1092 de la proteína RXAM2 tanto para el acoplamiento rígido como flexible, posiblemente aminoácidos importantes para la interacción entre las dos proteínas.

Estudios han reportado algunas proteínas NLR que reconocen a los efectores por unión física, lo que ilustra el modelo receptor-ligando (Dodds & Rathjen, 2010) (Cesari, 2018), como lo hace posiblemente RXAM2 con los efectores de *Xpm*, sin embargo, se ha demostrado que el reconocimiento indirecto del efector mediado por NLR ocurre con mayor frecuencia (Dangl & Jones, 2001) (van der Hoorn & Kamoun, 2008). Este reconocimiento indirecto, puede ser mediante la percepción de modificaciones, mediadas por efectores de una proteína diana del huésped denominada guardián (Cesari, 2018).

En otros casos, las proteínas NLRs perciben modificaciones de una proteína “señuelo”, la cual imita una proteína diana del efector, esta proteína señuelo existe solo para permitir la detección indirecta de los efectores por las proteínas NLRs, y la posterior activación de la inmunidad en la planta (Cesari, 2018). Por ejemplo, en *Arabidopsis thaliana*, PBL2 actúa como un señuelo para la actividad enzimática del efector AvrAC de *Xanthomonas campestris* y esta actividad es reconocida por ZAR1. Específicamente, AvrAC uridila a PBL2, esta modificación es percibida por el complejo de la pseudoquinasa RKS1 y la proteína NLR ZAR1, este complejo estable recluta a PBL2, una vez uridilado por AvrAC, lo cual desencadena la inmunidad mediada por ZAR1 (Wang et al., 2015). Además, es probable que el reconocimiento indirecto del efector, haya evolucionado para permitir un amplio espectro de reconocimiento de patógenos con un repertorio limitado de proteínas NLR (Cesari, 2018).

**Figura 16.** Acoplamiento rígido entre RXAM2 y XopE1. a. Azul: Dominio LRR en RXAM2, morado: XopE1. b. Azul: RXAM2, verde: XopE1: Superficie electrostática RXAM2. c. Azul: RXAM2, verde: XopE1: Superficie hidrofóbica RXAM2. d. Azul: RXAM2, verde: XopE1 Superficie Puentes de hidrógeno entre RXAM2.





Nota: Las interacciones fueron visualizadas con el programa Discovery Studio (Dassault Systèmes BIOVIA, 2017)

**Tabla 1.** Interacciones entre RXAM2 y XopE1 por acoplamiento rígido.

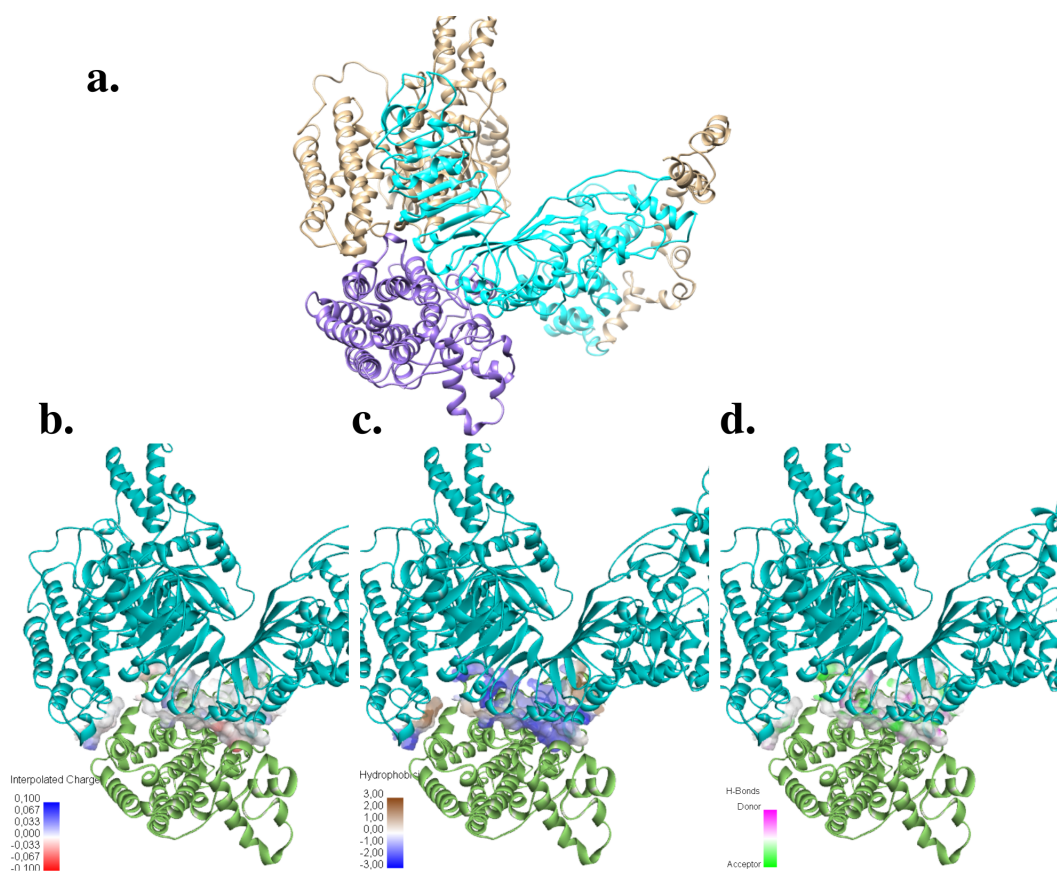
Interacción	RXAM2: Dominio LRR	XopE1
Electrostática	GLU840	ARG382
Electrostática	ASP837	ARG388
Electrostática	GLU845	ARG389
Electrostática	ASP850	ARG357
Electrostática	GLU840	ARG382

Electrostática	ASP837	ARG388
Electrostática	GLU845	ARG389
Puente de Hidrógeno	SER744	THR100
Puente de Hidrógeno	SER755	ARG91
Puente de Hidrógeno	GLU840	GLN383
Puente de Hidrógeno	CYS841	GLN383
Puente de Hidrógeno	CYS841	GLN383
Puente de Hidrógeno	CYS841	GLN383
Puente de Hidrógeno	SER843	ASP353
Puente de Hidrógeno	ARG844	THR384
Puente de Hidrógeno	ARG844	GLN383
Puente de Hidrógeno	ARG844	ASN380
Puente de Hidrógeno	GLN905	GLN248
Puente de Hidrógeno	SER1148	ASP251
Puente de Hidrógeno	GLN1150	ASP251
Puente de Hidrógeno	GLN1150	GLN248

<b>Interacción</b>	<b>RXAM2: Dominio LRR</b>	<b>XopE1</b>
Puente de Hidrógeno	HIS1176	GLU262
Puente de Hidrógeno	LEU1177	GLU262
Puente de Hidrógeno	PHE752	ARG85
Puente de Hidrógeno	GLU1183	TYR136

Puente de Hidrógeno	SER1148	ARG255
Puente de Hidrógeno	TYR1178	ARG255
Puente de Hidrógeno	SER1148	ARG255
Puente de Hidrógeno	GLN1150	ARG255
Puente de Hidrógeno	THR849	ARG357
Puente de Hidrógeno	CYS841	PHE385
Puente de Hidrógeno	GLN1145	ASP251
Hidrofóbico	VAL839	PHE385
Hidrofóbico	HIS1176	LEU259
Hidrofóbico	PHE797	TRP386
Hidrofóbico	PHE797	TRP386
Hidrofóbico	ILE1179	CYS140
Hidrofóbico	PRO1175	ALA258
Hidrofóbico	LEU945	ARG357
Hidrofóbico	HIS742	LEU96
Hidrofóbico	TRP758	ILE87
Hidrofóbico	TRP758	LEU96

**Figura 17.** Acoplamiento flexible entre RXAM2 y XopE1. a. Azul: Dominio LRR en RXAM2, morado: XopE1. b. Azul: RXAM2, verde: XopE1: Superficie electrostática RXAM2. c. Azul: RXAM2, verde: XopE1: Superficie hidrofóbica RXAM2. d. Azul: RXAM2, verde: XopE1 Superficie Puentes de hidrógeno entre RXAM2.



Nota: Las interacciones fueron visualizadas con el programa Discovery Studio (Dassault Systèmes BIOVIA, 2017)

**Tabla 2.** Interacciones entre RXAM2 y XopE1 por acoplamiento flexible.

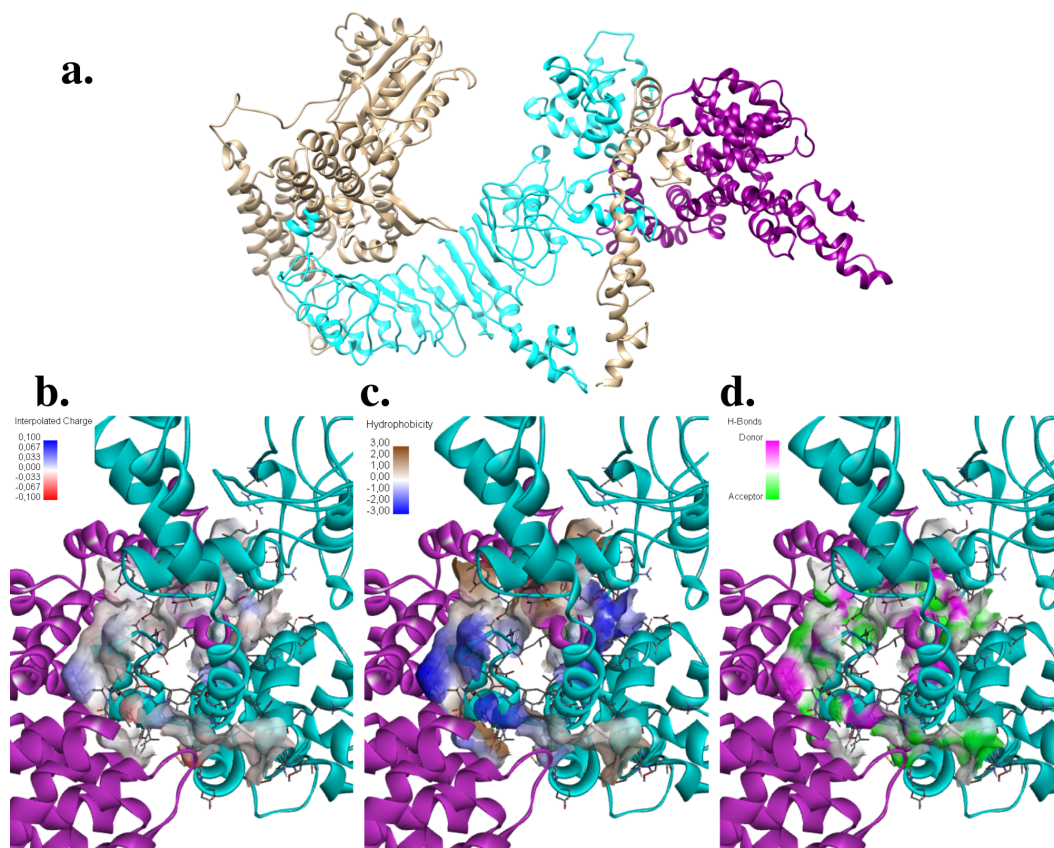
Interacción	RXAM2: Dominio LRR	XopE1
Electrostática	ARG686	GLU28
Electrostática	ARG686	ASP92
Electrostática	GLU684	ARG392
Electrostática	LYS829	TYR199

Electrostática	GLU637	ARG91
Electrostática	ASP457	ARG107
Electrostática	GLU1030	ARG192
Electrostática	GLU707	ARG340
Electrostática	GLU707	ARG392
Electrostática	GLU707	ARG392
Puente de Hidrógeno	SER687	ARG91
Puente de Hidrógeno	ALA706	ARG389
Puente de Hidrógeno	GLU707	ARG389
Puente de Hidrógeno	THR717	GLU101
Puente de Hidrógeno	TYR718	GLU101
Puente de Hidrógeno	ASN783	SER44
Puente de Hidrógeno	ASN804	PRO37
Puente de Hidrógeno	LYS814	CYS188
Puente de Hidrógeno	LYS829	TYR199
Puente de Hidrógeno	GLU715	SER27
Puente de Hidrógeno	VAL808	ARG50

<b>Interacción</b>	<b>RXAM2: Dominio LRR</b>	<b>XopE1</b>
Puente de Hidrógeno	VAL807	ARG50
Puente de Hidrógeno	ASN689	THR100
Puente de Hidrógeno	GLU455	GLU118

Puente de Hidrógeno	GLU455	SER119
Puente de Hidrógeno	GLU707	ARG392
Puente de Hidrógeno	GLU455	SER117
Puente de Hidrógeno	LEU22	SER132
Puente de Hidrógeno	TYR827	SER44
Hidrofóbico	TYR718	HIS104
Hidrofóbico	ALA661	ARG91
Hidrofóbico	PRO782	LEU36
Hidrofóbico	PRO782	PRO42
Hidrofóbico	LYS714	ALA32
Hidrofóbico	LEU690	ALA97
Hidrofóbico	LEU103	LYS145
Hidrofóbico	ILE811	LYS191
Hidrofóbico	PRO705	ARG389
Hidrofóbico	HIS781	LEU36
Hidrofóbico	HIS781	PRO42
Hidrofóbico	LYS24	TYR136

**Figura 18.** Acoplamiento rígido entre RXAM2 y XopE4. a. Azul: Dominio LRR en RXAM2, morado: XopE4. b. Azul: RXAM2, morado: XopE4: Superficie electrostática RXAM2. c. Azul: RXAM2, morado: XopE4: Superficie hidrofóbica RXAM2. d. Azul: RXAM2, morado: XopE4: Superficie Puentes de hidrógeno entre RXAM2.



Nota: Las interacciones fueron visualizadas con el programa Discovery Studio (Dassault Systèmes BIOVIA, 2017)

**Tabla 3.** Interacciones entre RXAM2 y XopE4 por acoplamiento rígido.

Interacción	RXAM2: Dominio LRR	XopE4
Electrostática	LYS971	ASP338
Electrostática	LYS971	ASP338
Electrostática	ARG1102	GLU86
Electrostática	ARG1102	GLU86
Electrostática	LYS1116	ASP338

Electrostática	LYS1116	ASP338
Electrostática	ARG1121	GLU172
Electrostática	ARG1102	GLU86
Electrostática	ARG1121	GLU172
Electrostática	HIS1105	ASP301
Puente de Hidrógeno	LYS943	GLN334
Puente de Hidrógeno	LYS943	ALA335
Puente de Hidrógeno	LYS943	GLN337
Puente de Hidrógeno	SER958	GLU341
Puente de Hidrógeno	ARG1102	VAL87
Puente de Hidrógeno	SER1118	SER174
Puente de Hidrógeno	SER1122	GLU172
Puente de Hidrógeno	SER1119	ARG173
Puente de Hidrógeno	SER977	ARG173
Puente de Hidrógeno	CYS981	ARG173
Puente de Hidrógeno	SER977	ARG173

<b>Interacción</b>	<b>RXAM2: Dominio LRR</b>	<b>XopE4</b>
Puente de Hidrógeno	ILE980	ARG173
Puente de Hidrógeno	ASP1115	SER174
Puente de Hidrógeno	GLN1097	ARG242
Puente de Hidrógeno	GLN1097	ARG242

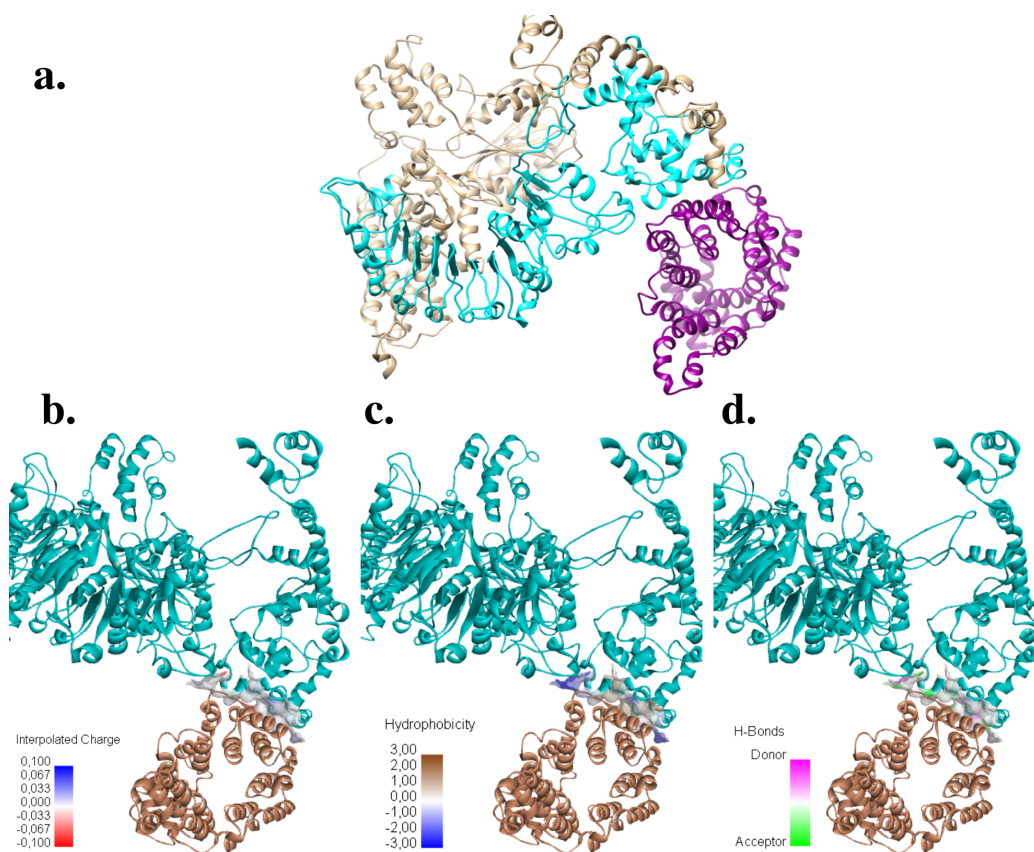


Puente de Hidrógeno	CYS1080	SER248
Puente de Hidrógeno	LEU1096	TYR278
Puente de Hidrógeno	CYS1104	ALA300
Puente de Hidrógeno	THR938	GLN332
Puente de Hidrógeno	LEU940	SER333
Puente de Hidrógeno	GLU970	GLN337
Puente de Hidrógeno	SER967	GLN337
Puente de Hidrógeno	GLU970	ASP338
Puente de Hidrógeno	HIS1105	SER342
Puente de Hidrógeno	SER957	GLU341
Puente de Hidrógeno	CYS1104	ASP301
Puente de Hidrógeno	SER1118	GLU172
Puente de Hidrógeno	ARG1102	THR88
Puente de Hidrógeno	PHE950	CYS363
Hidrofóbico	ARG844	PRO360
Hidrofóbico	LEU1096	MET245
Hidrofóbico	LEU937	PRO90

<b>Interacción</b>	<b>RXAM2: Dominio LRR</b>	<b>XopE4</b>
Hidrofóbico	ILE1101	ARG277
Hidrofóbico	CYS1104	ALA300
Hidrofóbico	LEU940	PRO331

Hidrofóbico	LEU951	CYS363
Hidrofóbico	PHE950	ALA335
Hidrofóbico	HIS1105	ALA339

**Figura 19.** Acoplamiento flexible entre RXAM2 y XopE4. a. Azul: Dominio LRR en RXAM2, morado: XopE4. b. Azul: RXAM2, café: XopE4: Superficie electrostática RXAM2. c. Azul: RXAM2, café: XopE4: Superficie hidrofóbica RXAM2. d. Azul: RXAM2, café: XopE4: Superficie Puentes de hidrógeno entre RXAM2.



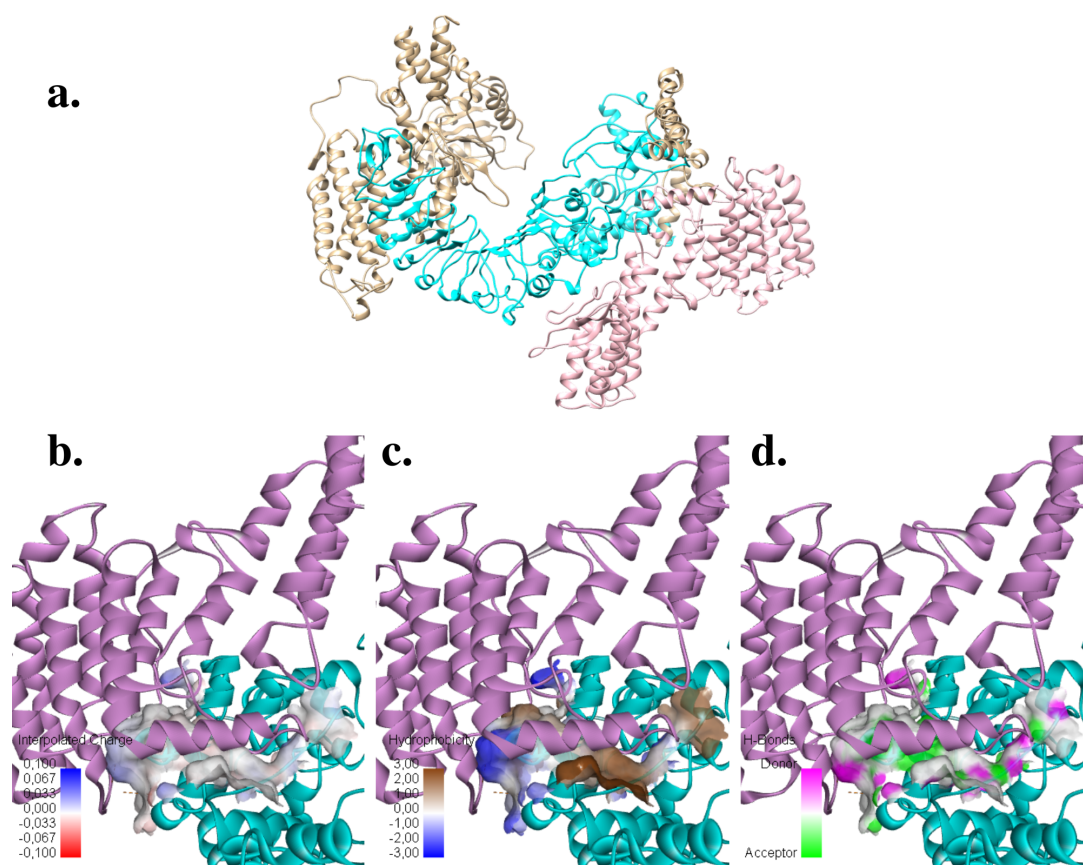
Nota: Las interacciones fueron visualizadas con el programa Discovery Studio (Dassault Systèmes BIOVIA, 2017)

**Tabla 4.** Interacciones entre RXAM2 y XopE4 por acoplamiento flexible.

<b>Interacción</b>	<b>RXAM2: Dominio LRR</b>	<b>XopE4</b>
Electrostática	LYS955	ASP117
Puente de Hidrógeno	THR851	GLY112
Puente de Hidrógeno	GLN852	ARG111
Puente de Hidrógeno	SER1037	ALA138
Puente de Hidrógeno	ASN1044	ASP117
Puente de Hidrógeno	ARG1067	ALA179
Puente de Hidrógeno	THR1033	LYS141
Hidrofóbico	TRP1066	LEU163
Hidrofóbico	ALA1040	ALA116
Hidrofóbico	ALA1040	LEU142
Hidrofóbico	PRO1057	VAL175
Hidrofóbico	ALA1071	MET148
Hidrofóbico	ALA1071	VAL152
Hidrofóbico	LEU1043	LYS115
Hidrofóbico	LEU1048	LYS141
Hidrofóbico	LEU1051	VAL144
Hidrofóbico	LEU1072	VAL152

Hidrofóbico	TRP1066	VAL144
Hidrofóbico	TRP1066	VAL144
Hidrofóbico	TRP1066	PRO166

**Figura 20.** Acoplamiento rígido entre RXAM2 y XopC2. a. Azul: Dominio LRR en RXAM2, rosado: XopC2. b. Azul: RXAM2, morado: XopC2: Superficie electrostática RXAM2. c. Azul: RXAM2, morado: XopC2: Superficie hidrofóbica RXAM2. d. Azul: RXAM2, morado: XopC2: Superficie Puentes de hidrógeno entre RXAM2.



Nota: Las interacciones fueron visualizadas con el programa Discovery Studio (Dassault Systèmes BIOVIA, 2017)

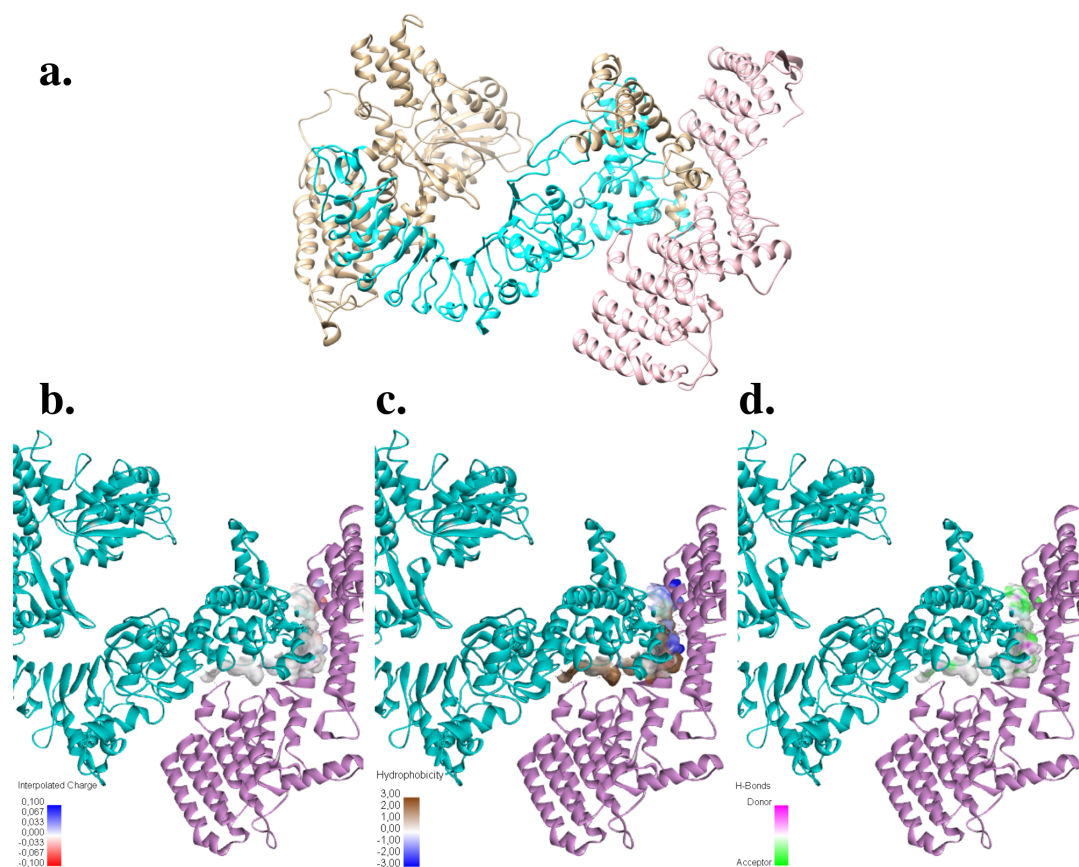
**Tabla 5.** Interacciones entre RXAM2 y XopC2 por acoplamiento rígido.

<b>Interacción</b>	<b>RXAM2: Dominio LRR</b>	<b>XopC2</b>
Electrostática	LYS1116	ASP222
Electrostática	LYS1116	ASP222
Electrostática	ASP765	ARG2
Electrostática	ARG1102	ASP317
Electrostática	ASP765	ARG2
Electrostática	TRP1113	ASP317
Puente de Hidrógeno	ARG703	ARG2
Puente de Hidrógeno	ARG703	ARG2
Puente de Hidrógeno	SER941	ASP222
Puente de Hidrógeno	LYS943	GLY224
Puente de Hidrógeno	LYS943	SER223
Puente de Hidrógeno	ARG1073	TYR308
Puente de Hidrógeno	ARG1073	TYR308
Puente de Hidrógeno	ARG1102	GLY369
Puente de Hidrógeno	ARG1102	HIS322
Puente de Hidrógeno	ARG1102	PHE320
Puente de Hidrógeno	ARG1102	GLY369

Puente de Hidrógeno	SER743	ARG12
Puente de Hidrógeno	SER743	ARG12
Puente de Hidrógeno	SER744	ARG12
Puente de Hidrógeno	CYS1104	ALA220

<b>Interacción</b>	<b>RXAM2: Dominio LRR</b>	<b>XopC2</b>
Puente de Hidrógeno	CYS1080	ASP309
Puente de Hidrógeno	ILE1101	SER276
Puente de Hidrógeno	GLY942	GLY224
Puente de Hidrógeno	SER743	ARG12
Hidrofóbico	LEU1099	PHE320
Hidrofóbico	TYR1092	PHE306
Hidrofóbico	ILE1101	LEU275
Hidrofóbico	CYS1104	ILE240
Hidrofóbico	CYS1104	ALA219
Hidrofóbico	LEU940	ALA220
Hidrofóbico	LEU937	ARG234
Hidrofóbico	LEU937	ALA238
Hidrofóbico	HIS1105	ALA219
Hidrofóbico	TRP1113	PRO315
Hidrofóbico	ARG1102	HIS322

**Figura 21.** Acoplamiento flexible entre RXAM2 y XopC2. a. Azul: Dominio LRR en RXAM2, rosado: XopC2. b. Azul: RXAM2, morado: XopC2: Superficie electrostática RXAM2. c. Azul: RXAM2, morado: XopC2: Superficie hidrofóbica RXAM2. d. Azul: RXAM2, morado: XopC2: Superficie Puentes de hidrógeno entre RXAM2.



Nota: Las interacciones fueron visualizadas con el programa Discovery Studio (Dassault Systèmes BIOVIA, 2017)

**Tabla 6.** Interacciones entre RXAM2 y XopC2 por acoplamiento flexible.

Interacción	RXAM2: Dominio LRR	XopC2
-------------	--------------------	-------

Electrostática	ARG1008	ASP128
Electrostática	ARG1073	ASP187
Electrostática	GLU845	LYS341
Electrostática	ARG1008	ASP128
Puente de Hidrógeno	SER1070	GLU203
Puente de Hidrógeno	TYR1092	ASP192
Puente de Hidrógeno	GLN1097	ASP115
Puente de Hidrógeno	THR1095	ARG159
Puente de Hidrógeno	CYS1080	LEU191
Puente de Hidrógeno	CYS1079	ASP192
Puente de Hidrógeno	CYS1080	ASP192
Puente de Hidrógeno	SER1076	THR193
Puente de Hidrógeno	SER1076	THR193
Puente de Hidrógeno	PHE950	ARG347
Hidrofóbico	CYS1080	LEU191
Hidrofóbico	LEU1096	LEU156
Hidrofóbico	LEU1096	LEU195
Hidrofóbico	LEU1083	ALA148
Hidrofóbico	LEU1096	ALA155
Hidrofóbico	ILE1077	PRO190
Hidrofóbico	LEU954	PRO202
Hidrofóbico	LEU1072	PRO202



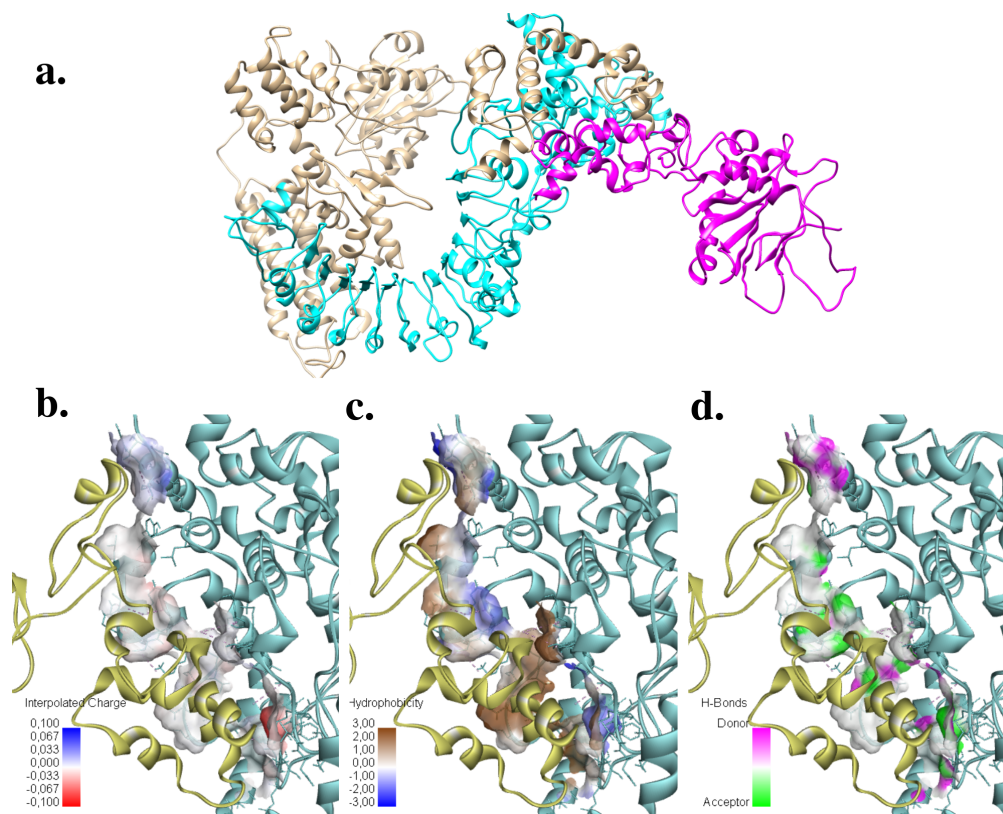
Hidrofóbico	LEU951	ALA349
Hidrofóbico	TYR1092	LEU200
Hidrofóbico	TRP1113	CYS118
Hidrofóbico	LEU1083	HIS121
Hidrofóbico	LEU1096	PHE199
Hidrofóbico	LEU954	PHE348

Por otro lado, para los efectores XopAK y XopV, si se encontró diferencias en los posibles sitios de interacción con RXAM2 en el acoplamiento rígido y el acoplamiento flexible. Específicamente en el acoplamiento rígido XopAK (Figura 22) (Tabla 7) y XopV (Figura 24) (Tabla 9), posiblemente son reconocidos por el dominio LRR de RXAM2, destacándose principalmente interacciones de tipo puentes de hidrógeno, fuerzas electrostáticas e interacciones hidrofóbicas para XopAK (Tabla 7 y Tabla 8) y XopV (Tabla 9 y Tabla 10). Sin embargo, para el acoplamiento flexible, XopAK muestra interacción con RXAM2 en el dominio CC (Figura 23) con interacciones de tipo puentes de hidrógeno, fuerzas electrostáticas e interacciones hidrofóbicas (Tabla 8). Estudios han mostrado que los dominios N-terminales de los NLR (TIR/CC) en plantas, también pueden funcionar en el reconocimiento de efectores, es decir, los dominios N-terminales de los NLR pueden ser responsables de controlar directamente las modificaciones inducidas por el efector de las proteínas diana (Lukasik & Takken, 2009). Por ejemplo, AVR-Pik interactúa directamente con el dominio CC de Pik del arroz (Kanzaki et al., 2012), o, alternativamente, colocar sus dominios LRR en la proximidad apropiada para una

vigilancia óptima (Lukasik & Takken, 2009). Por lo tanto, es necesario validar las interacciones de RXAM2 y los efectores de *Xpm*, identificando si el reconocimiento depende de un solo dominio o en conjunto, para después desencadenar la señal de defensa.

En el acoplamiento flexible entre RXAM2 y XopV (Figura 25), se identificó que posiblemente RXAM2 reconoce a XopV por el dominio NB-ARC, con interacciones de tipo puentes de hidrógeno, fuerzas electrostáticas e interacciones hidrofóbicas (Tabla 10). Resultado que coincide con lo reportado por Román Reyna, 2012, mediante la técnica de doble híbrido, donde XopV interactúa con el dominio NBS. Lo que se conoce hasta el momento del dominio NB-ARC es que actúa como el regulador de activación de las NLR, por medio del intercambio o hidrólisis de ADP por ATP. Por lo tanto, es necesario validar mediante co-inmunoprecipitación y BiFC las interacciones de RXAM2 y los efectores de *Xpm*, identificando si en el reconocimiento pueden participar más dominios de RXAM2.

**Figura 22.** Acoplamiento rígido entre RXAM2 y XopAK. a. Azul: Dominio LRR en RXAM2, rosado: XopAK. b. Azul: RXAM2, amarillo: XopAK: Superficie electrostática RXAM2. c. Azul: RXAM2, amarillo: XopAK: Superficie hidrofóbica RXAM2. d. Azul: RXAM2, amarillo: XopAK: Superficie Puentes de hidrógeno entre RXAM2.



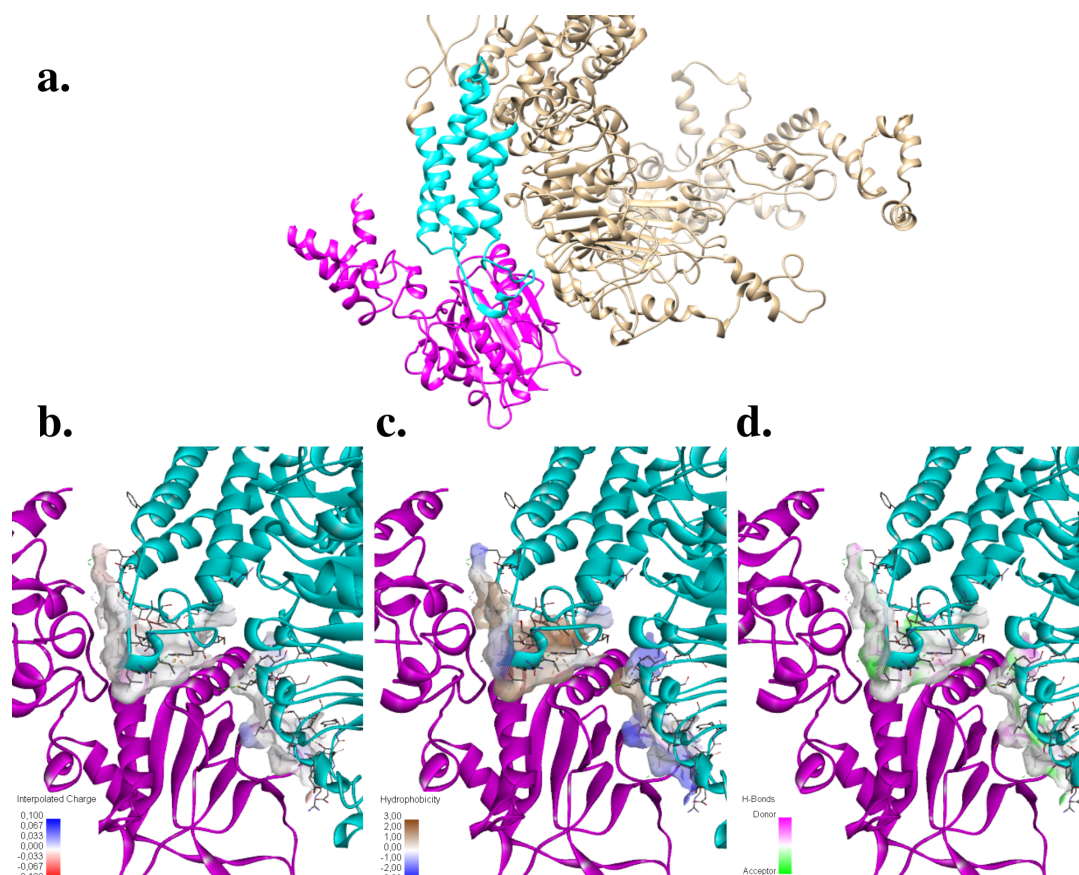
Nota: Las interacciones fueron visualizadas con el programa Discovery Studio (Dassault Systèmes BIOVIA, 2017)

**Tabla 7.** Interacciones entre RXAM2 y XopAK por acoplamiento rígido.

<b>Interacción</b>	<b>RXAM2: Dominio LRR</b>	<b>XopAK</b>
Electrostática	GLU840	MET1
Puente de Hidrógeno	CYS841	MET1
Puente de Hidrógeno	SER1070	ALA88
Puente de Hidrógeno	CYS1104	ALA
Puente de Hidrógeno	GLU840	GLN2

Puente de Hidrógeno	GLU840	GLN2
Puente de Hidrógeno	GLU840	SER5
Puente de Hidrógeno	SER903	ARG19
Puente de Hidrógeno	SER927	ARG19
Puente de Hidrógeno	ARG1102	ARG42
Puente de Hidrógeno	CYS1104	ARG42
Puente de Hidrógeno	ARG1102	ARG42
Puente de Hidrógeno	SER1070	ASP89
Puente de Hidrógeno	SER903	ARG19
Puente de Hidrógeno	THR938	SER46
Hidrofóbico	CYS841	MET1
Hidrofóbico	CYS1104	PRO43
Hidrofóbico	PRO902	ALA16
Hidrofóbico	LEU945	PRO55
Hidrofóbico	ILE1101	PRO69
Hidrofóbico	ARG1073	ALA88
Hidrofóbico	LEU1072	ALA91
Hidrofóbico	PHE950	ALA50
Hidrofóbico	PHE950	PRO55
Hidrofóbico	HIS1105	PRO69

**Figura 23.** Acoplamiento flexible entre RXAM2 y XopAK. a. Azul: Dominio CC en RXAM2, rosado: XopAK. b. Azul: RXAM2, morado: XopAK: Superficie electrostática RXAM2. c. Azul: RXAM2, morado: XopAK: Superficie hidrofóbica RXAM2. d. Azul: RXAM2, morado: XopAK: Superficie Puentes de hidrógeno entre RXAM2.



Nota: Las interacciones fueron visualizadas con el programa Discovery Studio (Dassault Systèmes BIOVIA, 2017)

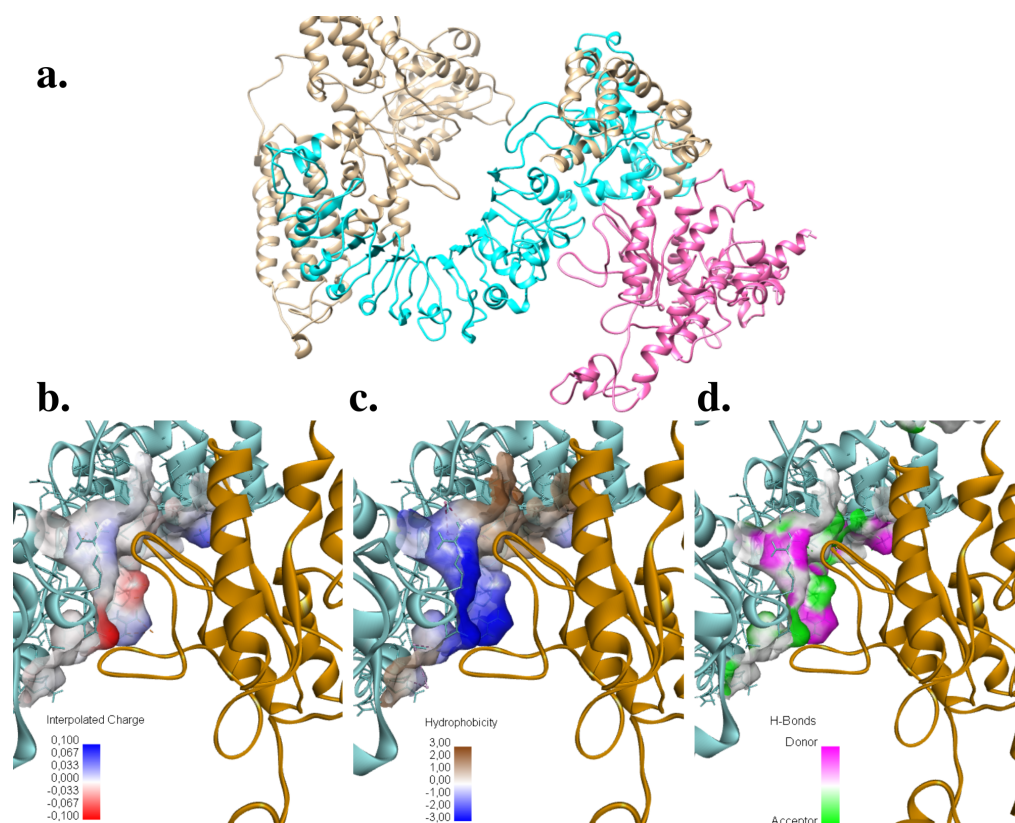
**Tabla 8.** Interacciones entre RXAM2 y XopAK por acoplamiento flexible.

Interacción	RXAM2: Dominio CC	XopAK
-------------	-------------------	-------

Electrostática	LYS24	GLU229
Electrostática	ARG458	GLU225
Electrostática	ARG643	GLU224
Electrostática	ARG643	GLU224
Electrostática	LYS662	ASP161
Electrostática	ARG458	GLU225
Electrostática	HIS93	ASP210
Electrostática	HIS93	ASP213
Electrostática	HIS665	GLU224
Puente de Hidrógeno	CYS29	ASP60
Puente de Hidrógeno	ASN30	ASP60
Puente de Hidrógeno	ASN641	ASP221
Puente de Hidrógeno	ASN689	VAL165
Puente de Hidrógeno	THR717	GLN170
Puente de Hidrógeno	SER687	ASP159
Puente de Hidrógeno	MET638	GLN209
Puente de Hidrógeno	HIS93	GLN212
Puente de Hidrógeno	GLY23	VAL227
Puente de Hidrógeno	LEU25	ASP260
Puente de Hidrógeno	HIS93	ASP210
Puente de Hidrógeno	SER102	ALA99
Puente de Hidrógeno	LYS662	ASP161

Puente de Hidrógeno	SER687	ASP162
Puente de Hidrógeno	SER102	SER79
Puente de Hidrógeno	LEU22	GLU228
Hidrofóbico	CYS29	PRO61
Hidrofóbico	ILE664	ILE164
Hidrofóbico	LEU28	PRO61
Hidrofóbico	LEU105	ALA99
Hidrofóbico	LEU103	ALA256
Hidrofóbico	LEU104	HIS259

**Figura 24.** Acoplamiento rígido entre RXAM2 y XopV. a. Azul: Dominio LRR en RXAM2, rosado: XopV. b. Azul: RXAM2, naranja: XopV: Superficie electrostática RXAM2. c. Azul: RXAM2, naranja: XopV: Superficie hidrofóbica RXAM2. d. Azul: RXAM2, naranja: XopV: Superficie Puentes de hidrógeno entre RXAM2.



Nota: Las interacciones fueron visualizadas con el programa Discovery Studio (Dassault Systèmes BIOVIA, 2017)

**Tabla 9.** Interacciones entre RXAM2 y XopV por acoplamiento rígido.

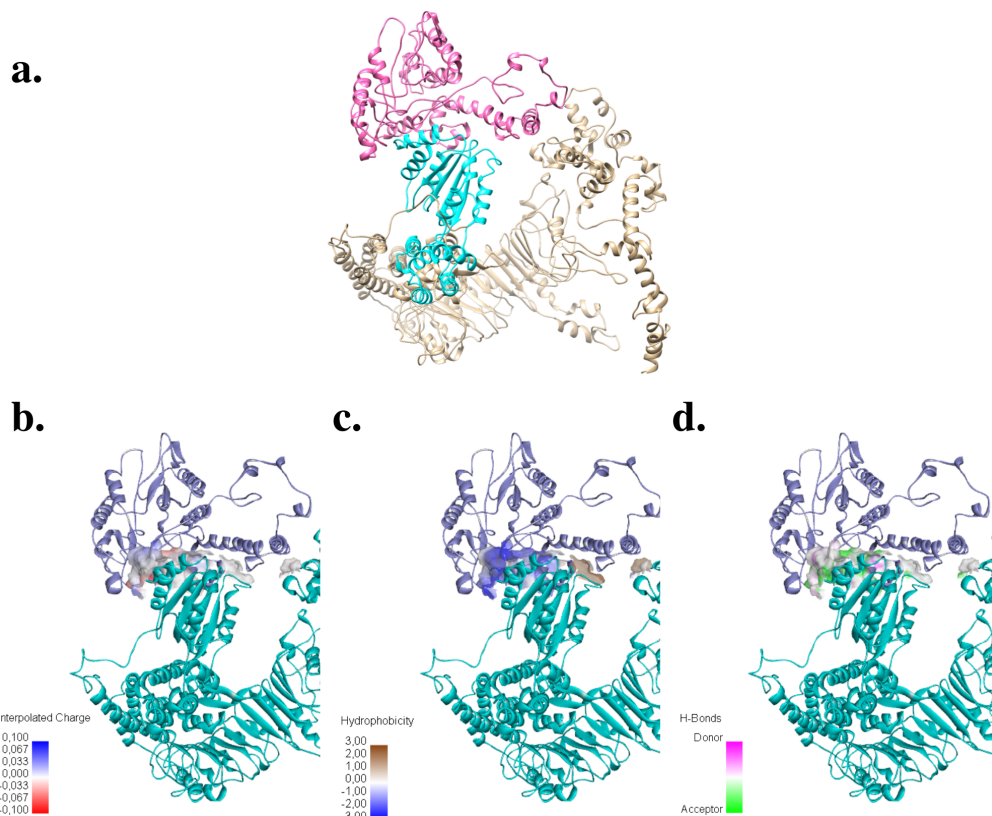
<b>Interacción</b>	<b>RXAM2: Dominio LRR</b>	<b>XopV</b>
Electrostática	LYS955	GLU244
Electrostática	LYS955	GLU244
Electrostática	GLU845	ARG280
Electrostática	ASP850	ARG286
Electrostática	ASP850	ARG286



Electrostática	ARG853	GLU284
Electrostática	ARG853	GLU284
Electrostática	ARG844	TRP271
Electrostática	ARG844	TRP271
Puente de Hidrógeno	ARG844	TRP271
Puente de Hidrógeno	ARG844	TRP271
Puente de Hidrógeno	THR851	VAL241
Puente de Hidrógeno	ARG853	LEU282
Puente de Hidrógeno	SER953	LEU242
Puente de Hidrógeno	LYS955	ASP243
Puente de Hidrógeno	ALA1040	ASP243
Puente de Hidrógeno	LEU951	VAL241
Puente de Hidrógeno	ASP850	GLN269
Puente de Hidrógeno	ASN947	TRP271
Puente de Hidrógeno	LEU951	GLN269
Puente de Hidrógeno	SER953	GLU244
Puente de Hidrógeno	SER1039	ASP243
Puente de Hidrógeno	GLU845	ARG280
Puente de Hidrógeno	THR849	TRP271
Hidrofóbico	LEU951	TRP271
Hidrofóbico	LEU945	TRP271
Hidrofóbico	GLU946	TRP271

Hidrofóbico	PRO803	MET281
Hidrofóbico	PRO803	LEU282
Hidrofóbico	LEU822	MET281
Hidrofóbico	LEU822	LEU282
Hidrofóbico	PRO854	LEU282
Hidrofóbico	ILE956	LEU242
Hidrofóbico	LEU1043	LEU242
Hidrofóbico	LEU819	VAL241
Hidrofóbico	LEU951	VAL241
Hidrofóbico	LEU951	TRP271

**Figura 25.** Acoplamiento flexible entre RXAM2 y XopV. a. Azul: Dominio NB-ARC en RXAM2, rosado: XopV. b. Azul: RXAM2, morado: XopV: Superficie electrostática RXAM2. c. Azul: RXAM2, morado: XopV: Superficie hidrofóbica RXAM2. d. Azul: RXAM2, morado: XopV: Superficie Puentes de hidrógeno entre RXAM2.



Nota: Las interacciones fueron visualizadas con el programa Discovery Studio (Dassault Systèmes BIOVIA, 2017)

**Tabla 10.** Interacciones entre RXAM2 y XopV por acoplamiento flexible.

<b>Interacción</b>	<b>RXAM2: Dominio NB-ARC</b>	<b>XopV</b>
Electrostática	LYS241	GLU193
Electrostática	LYS222	GLU245
Electrostática	ARG296	ASP19
Puente de Hidrógeno	ILE189	ASP65
Puente de Hidrógeno	LYS253	ALA139

Puente de Hidrógeno	LYS253	SER230
Puente de Hidrógeno	SER255	GLU193
Puente de Hidrógeno	SER262	ILE15
Puente de Hidrógeno	ARG296	ASP19
Puente de Hidrógeno	ARG296	ASP19
Puente de Hidrógeno	ASN1031	ARG75
Puente de Hidrógeno	GLU991	GLN91
Puente de Hidrógeno	GLU256	GLN194
Puente de Hidrógeno	GLU256	THR195
Puente de Hidrógeno	LYS250	TYR221
Puente de Hidrógeno	CYS252	LYS222
Puente de Hidrógeno	SER255	THR195
Puente de Hidrógeno	SER262	PRO14
Puente de Hidrógeno	GLN265	HIS17
Puente de Hidrógeno	GLU263	GLY141
Puente de Hidrógeno	GLN265	HIS17
Puente de Hidrógeno	PHE1018	GLN72
Hidrofóbico	PHE254	THR197
Hidrofóbico	LYS250	ILE225
Hidrofóbico	ARG251	LYS222
Hidrofóbico	CYS269	ILE147
Hidrofóbico	ILE188	ALA66

### 6.3 Polimorfismos en efectores de *Xpm*

Descifrar los mecanismos utilizados por los patógenos bacterianos para evolucionar y adaptarse a nuevos huéspedes, es importante para desarrollar estrategias de fitomejoramiento en plantas. Sin embargo, a pesar de la investigación intensiva y la información proporcionada de genomas secuenciados para comprender las interacciones entre patógenos bacterianos y sus huéspedes, aún quedan por identificar los factores moleculares que subyacen a la especificidad del huésped de los patógenos (Hajri et al., 2009). Esta evolución adaptativa puede ser direccional o no direccional. La selección direccional describe situaciones en las que el cambio sucesivo de la secuencia de aminoácidos hace que una proteína sea más eficiente para realizar una tarea en particular, la selección natural aprueba estas modificaciones y se conservan en linajes futuros (Creevey & McInerney, 2002). La selección no direccional describe un régimen selectivo en el que el entorno se modifica constantemente y en el que se requiere un cambio de secuencia sólo para mantener un nivel aceptable de aptitud (Creevey & McInerney, 2002).

En ambas situaciones, hay selección para sustituciones, ya sean sinónimas (dS) o no sinónimas (dN). Una proteína se considera bajo selección positiva cuando la tasa de dN excede la tasa de dS (Kimura, 1977). Por el contrario, se suele interpretar que la proteína evoluciona bajo selección negativa (purificadora) (es decir, está más conservada) cuando  $dN/dS < 1$ , porque la mayoría de las sustituciones no sinónimas son perjudiciales para la aptitud y, en consecuencia, tienen bajas probabilidades de fijación (Kimura, 1977).

Con el fin de identificar posibles polimorfismos y variaciones en secuencias de efectores de *Xpm* y así lograr determinar la posible conservación o variación de las secuencias de efectores entre diferentes cepas de *Xpm*, y poder adicionar evidencia al supuesto de la interacción directa con RXAM2, ya que, si hay variaciones en regiones de reconocimiento por RXAM2, se podría sugerir que hay selección positiva en esas regiones y por tanto, los efectores de *Xpm* evaden el reconocimiento por RXAM2. Para esto se usaron las secuencias de nucleótidos y aminoácidos disponibles de los efectores XopE1, XopE4, XopC2, XopAK y XopV en 65 cepas de *Xpm* (<https://img.jgi.doe.gov/>) (Bart et al., 2012) (Tabla 35). Con el fin de identificar posibles sitios sujetos a selección positiva o negativa se utilizaron tres programas, uno basado en máxima verosimilitud para detectar dN y dS denominado FEL (por sus siglas en inglés: Fixed Effects Likelihood), un segundo basado en una aproximación bayesiana llamado FUBAR (por sus siglas en inglés Fast, Unconstrained Bayesian AppRoximation) y un tercero basado en un método de máxima probabilidad para detectar sitios individuales sujetos a una selección de diversificación episódica denominado MEME (Mixed Effects Model of Evolution) (<https://www.datamonkey.org/>). Estas herramientas se utilizaron, ya que partimos del supuesto de que los sitios individuales están sujetos a una selección positiva o negativa, en toda la filogenia (65 cepas de *Xpm*) o en un subconjunto.

**Tabla 11.** Cepas de *Xpm* para los efectores XopE1, XopE4, XopC2, XopAK y XopV de diferentes regiones biogeográficas (Bart et al., 2012).

Cepa	País
------	------

IBSBF 1182, IBSBF 1411, IBSBF 1994, IBSBF 2345, IBSBF 2346, IBSBF 2538, IBSBF 2539, IBSBF 2665, IBSBF 2666, IBSBF 2667, IBSBF 2670, IBSBF 2672, IBSBF 2673, IBSBF 278, IBSBF 280, IBSBF 2816, IBSBF 2818, IBSBF 2819, IBSBF 2820, IBSBF 2821, IBSBF 2822, IBSBF 289, IBSBF 320, IBSBF 356, IBSBF 436, IBSBF 614, IBSBF 725, IBSBF 726, Xam669	Brasil
Xam672	Camerún
UA226, CFBP1851, CIO1, CIO151, ORST4, UA303, UA306, UA323, UA324, UA536, UA556, UA560, UA686	Colombia
Xam668	Indonesia
AFNC1360, IBSBF 285, NG1	Nigeria
ORST17	República del Congo
Xam678	República Democrática del Congo
Xam1134	Sin Registro
ThaiXam	Tailandia
ORST X27	Togo
UG21, UG23, UG24, UG27, UG28, UG39, UG43, UG44, UG45	Uganda
NCPPB 1159	USA
AT6B	Venezuela

Los efectores del sistema de secreción tipo tres, se caracterizan por ser proteínas bacterianas que se inyectan directamente dentro del citoplasma de la célula de la planta,

mediante un aparato molecular bacteriano T3SS. Este sistema se conserva entre la mayoría de las bacterias patógenas gram negativas de plantas, usando el T3SS, cada cepa bacteriana puede inyectar hasta 30 proteínas efectoras simultáneamente en la célula de la planta (Chang et al., 2005). Específicamente para el género *Xanthomonas*, una mutación en el T3SS afecta la capacidad de inyectar efectores a la planta huésped, como consecuencia, elimina la patogenicidad y la multiplicación *in planta* (Gürlebeck et al., 2006).

Algunos efectores inyectados en la célula de la planta, probablemente actúen colectivamente, ya que, las mutaciones en un solo efector rara vez afectan el fenotipo de virulencia de las cepas. Esto sugiere que entre los efectores inyectados en la célula de la planta, algunos tienen funciones redundantes de virulencia, por ejemplo, en *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis*, los efectores XopN y XopQ (Medina et al., 2017). Por otro lado, se ha demostrado que la función de virulencia y avirulencia de algunos efectores puede desacoplarse, es decir, se puede abolir el reconocimiento de efectores mientras se mantienen las funciones de virulencia a través de mutaciones específicas (Zhao et al., 2011).

Según los resultados obtenidos, para los efectores XopE1, XopE4, XopC2 y XopV se encontraron sitios de posible selección positiva y negativa entre las 65 cepas estudiadas. En XopE4 se identificaron dos sitios de posible selección negativa con el programa FEL y 12 sitios de selección positiva con los programas MEME y FEL, lo cual puede sugerir una diversificación para evadir el reconocimiento por RXAM2, los sitios sujetos a selección se encuentran principalmente en la región C-terminal (Figura 26).



Para XopE1 se encontraron 17 sitios sometidos a selección negativa con FEL, principalmente en la región C-terminal (Figura 27). En XopC2 se encontraron tres sitios de posible selección positiva, uno de ellos con el programa MEME, los otros dos y 14 sitios que están sujetos a selección negativa con FEL, en la región C-terminal (Figura 28). No se encontraron sitios bajo selección con la herramienta FUBAR, se puede deber, a que la herramienta se recomienda para datos medianos y grandes (Murrell et al., 2013).

En XopV dos sitios de posible selección positiva, uno de ellos con FUBAR y el otro con MEME, y ocho sitios de posible selección negativa con FEL, cuatro de ellos en la región N-terminal y los restantes en la región C-terminal, como se observa en la Figura 29. Finalmente, para el efector XopAK debido a su similitud del 100% con las secuencias de las 65 cepas, no se lograron identificar posibles sitios de selección positiva y negativa, esto sugiere una alta conservación en las secuencias de XopAK en las 65 cepas y por tanto, importante para su aptitud bacteriana.

Por lo tanto, los sitios de posible selección son pocos y en su mayoría sujetos a selección negativa. Lo que sugiere que hay una conservación de secuencias de los efectores entre las 65 cepas de *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis*. Según Hughes, 1999, esta conservación se puede deber a que la mayoría de las secuencias de proteínas están bien adaptadas para llevar a cabo sus funciones y el cambio no conduciría a la creación de una ventaja selectiva.

Los sitios sujetos a la selección negativa en los efectores de las 65 cepas de *Xpm*, se encuentran principalmente en la región C-terminal, y según Bart et al., 2012, esto podría

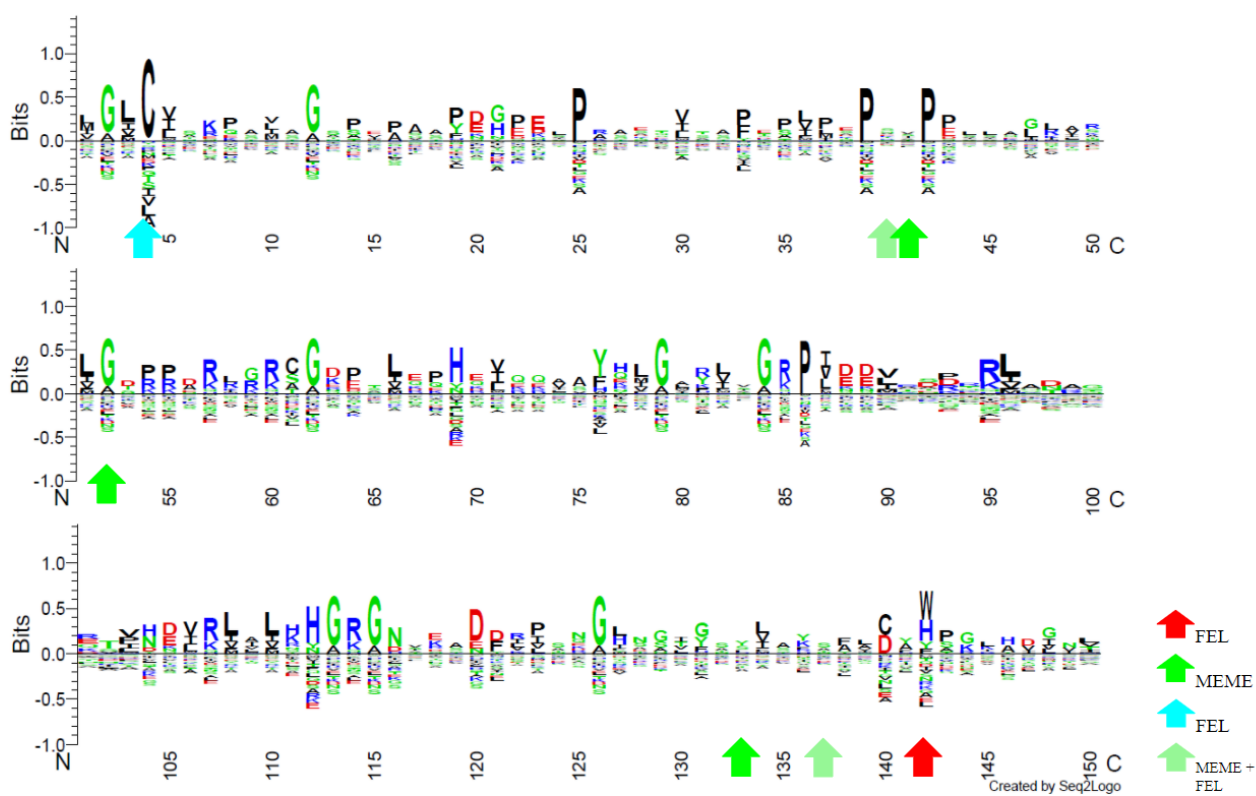
sugerir que son dominios necesarios para el mantenimiento de la función central, y por lo tanto son los más conservados en una población. Sin embargo, se puede suponer, que esta conservación de secuencias en los efectores de *Xpm* es útil para un reconocimiento directo por RXAM2.

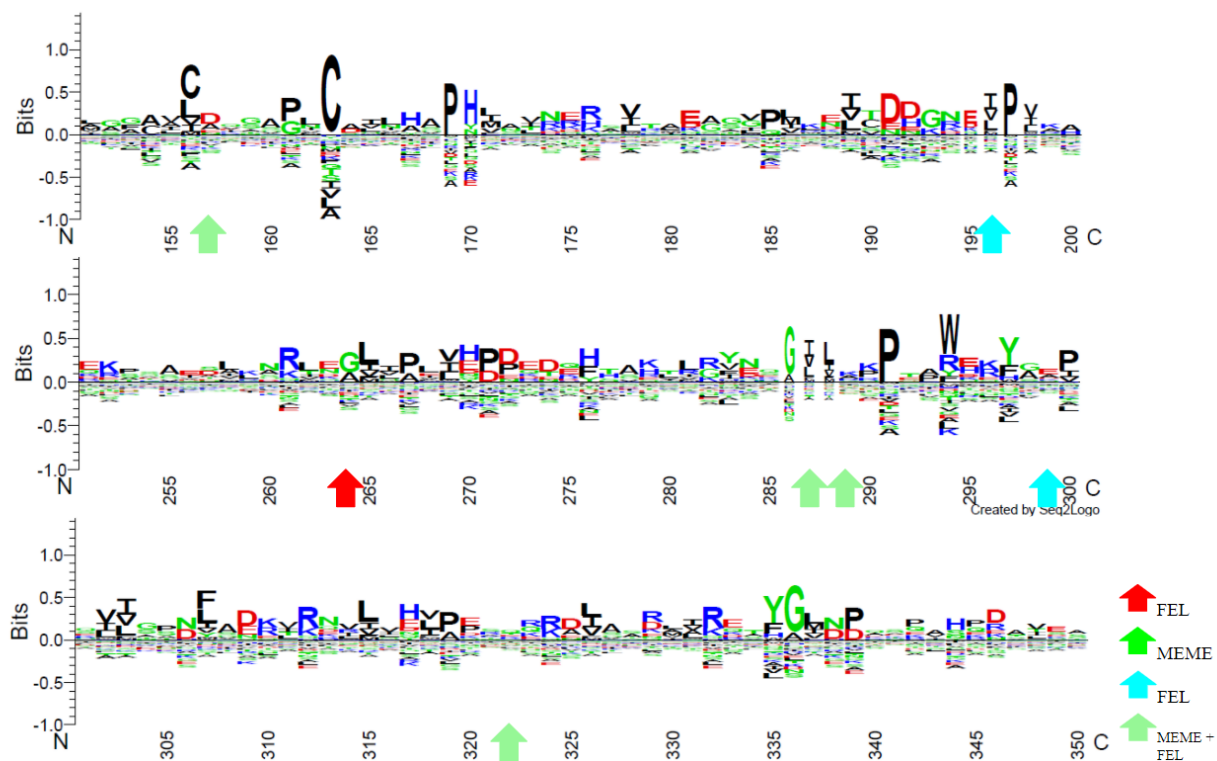
Por otro lado, de los sitios con posible selección positiva y negativa, se reconocieron algunos aminoácidos que participan en la posible interacción con RXAM2. Para XopE4 en el aminoácido LEU142, el cual fue encontrado en el acoplamiento flexible que interactúa con el residuo ALA1040 de RXAM2, se encontró sujeto a selección negativa, por lo tanto, se puede sugerir que su conservación es necesario para el reconocimiento directo por RXAM2.

Para XopE1 se encontraron los aminoácidos CYS140 y ARG388, sujetos a selección negativa y son sitios de interacción de acuerdo al acoplamiento rígido. Por otro lado, en el acoplamiento flexible PRO42 posiblemente esté sujeto a selección negativa. En XopC2, se encontró el residuo ASP317 sujeto a selección negativa, GLY224 y SER223 sujetos a selección positiva posiblemente para evadir el reconocimiento por RXAM2, estos sitios son de interacción de acuerdo al acoplamiento rígido.

Finalmente en XopV, no se identificaron aminoácidos sujetos a selección y que posiblemente participen en la interacción con RXAM2, sería interesante evaluar si los sitios identificados en el acoplamiento rígido y flexible y sujetos a selección positiva o negativa, son necesarios o no para la virulencia de los efectores de *Xpm*, y asimismo indispensables para la interacción con RXAM2.

**Figura 26-1.** Logos: Sitios de selección positiva y negativa de XopE4. Rojo: selección negativa con FEL. Verde: Selección positiva con MEME. Azul: Selección positiva con FEL. Verde claro: Selección positiva FEL + MEME.



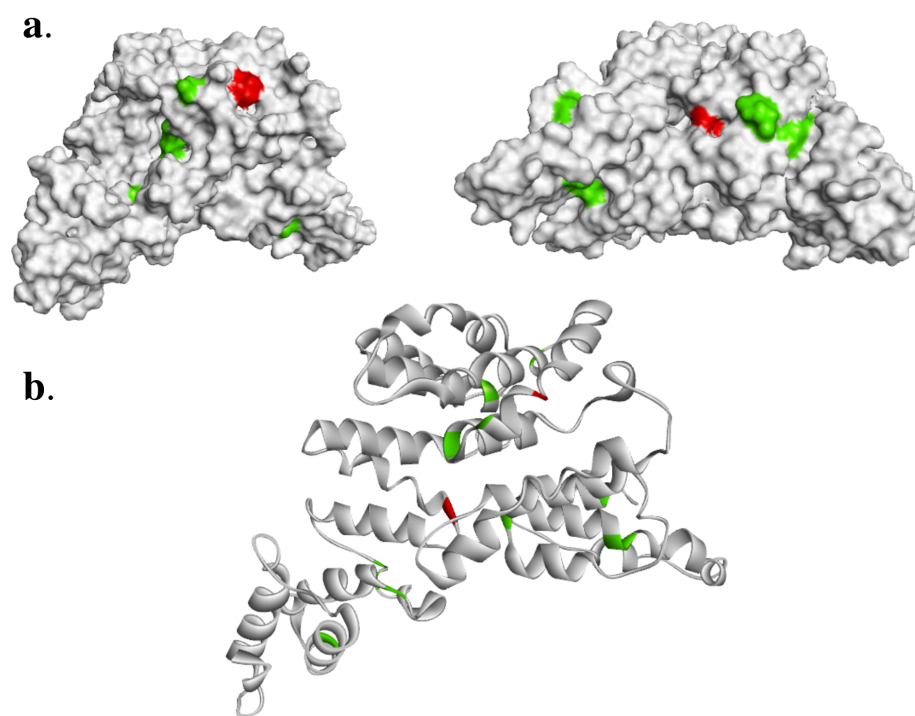


Nota: El logo de la secuencia de XopE4 se realizó con el servidor web Seq2Logo 2.0

(Frolund Thomsen & Nielsen, 2012)

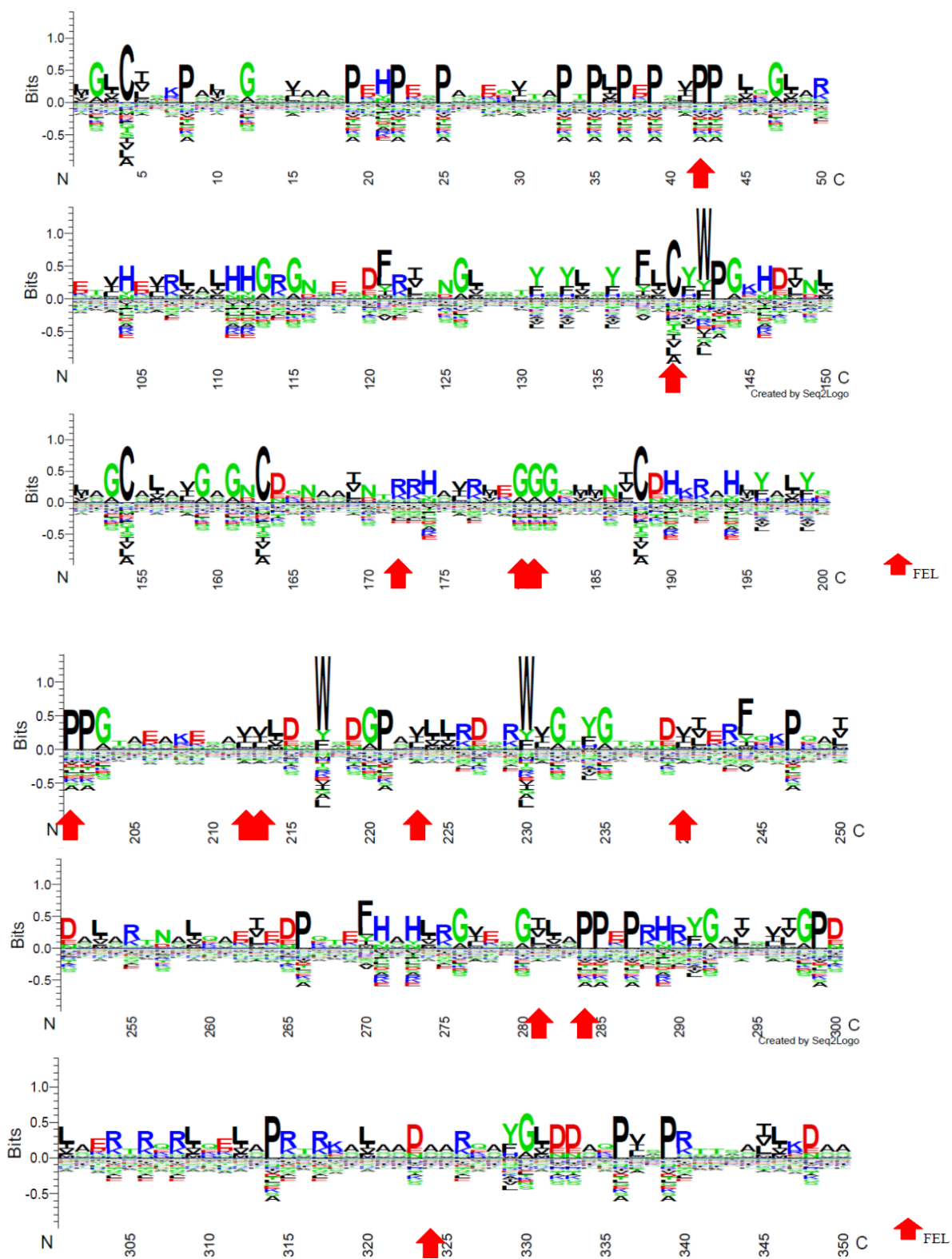
**Figura 26-2.** Sitios de selección positiva y negativa de XopE4. Rojo: selección negativa.

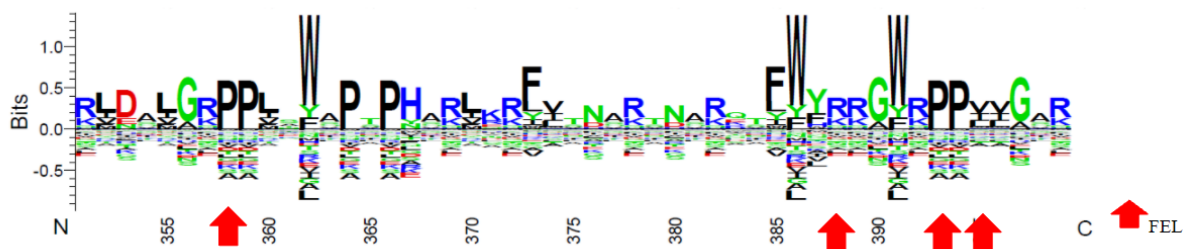
Verde: Selección positiva. a. Modelo en superficie. b. Modelo en cintas.



Nota: Los modelos fueron representados con el programa Discovery Studio (Dassault Systèmes BIOVIA, 2017)

**Figura 27-1.** Logos: Sitios de selección negativa de XopE1. Rojo: selección negativa con FEL.

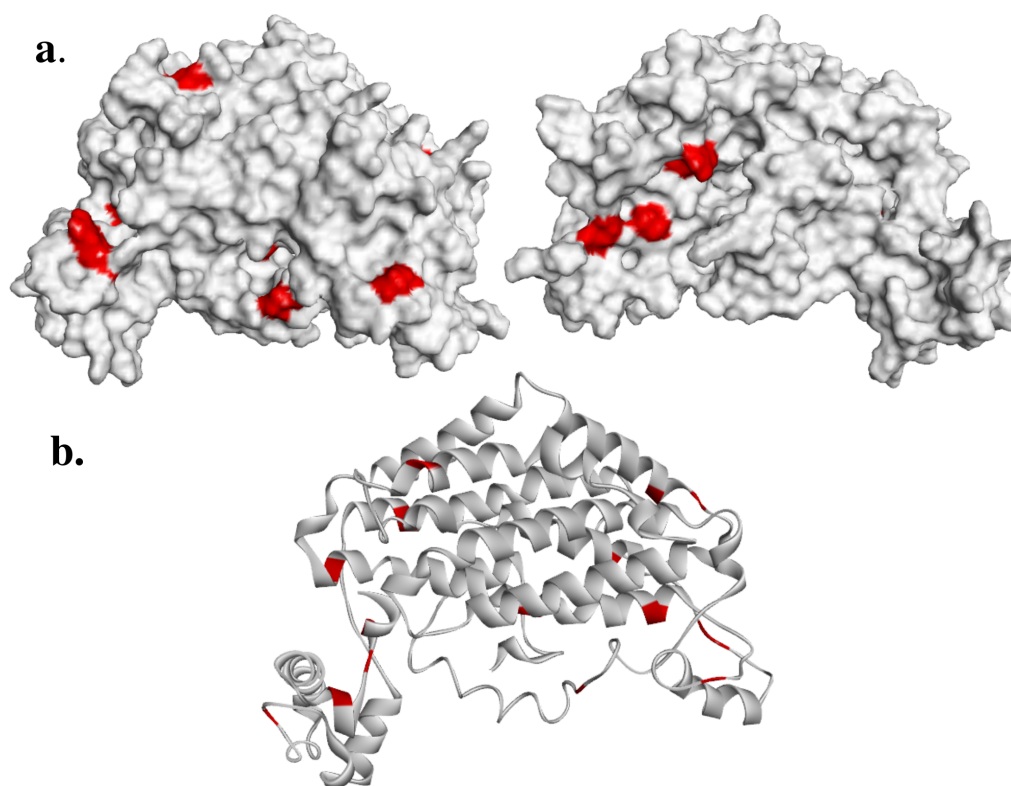




Nota: El logo de la secuencia de XopE1 se realizó con el servidor web Seq2Logo 2.0

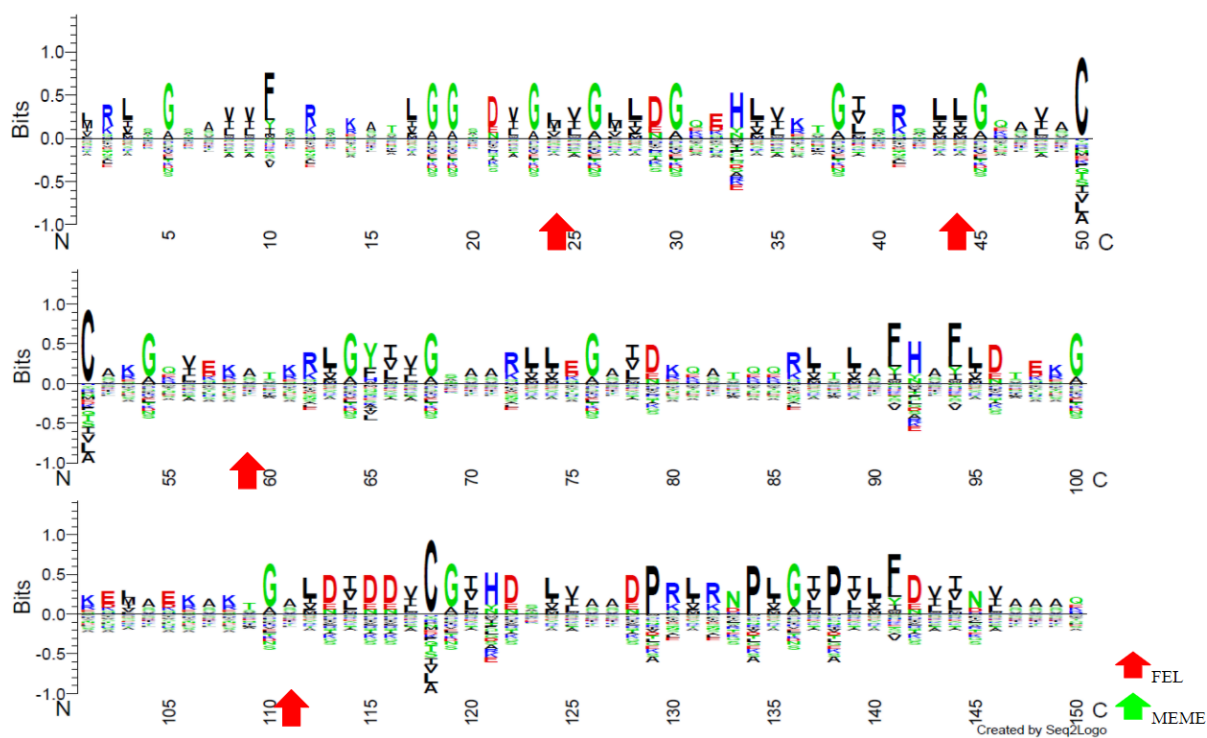
(Frolund Thomsen & Nielsen, 2012)

**Figura 27-2.** Sitios de selección negativa de XopE1. Rojo: selección negativa. a. Modelo en superficie. b. Modelo en cintas.

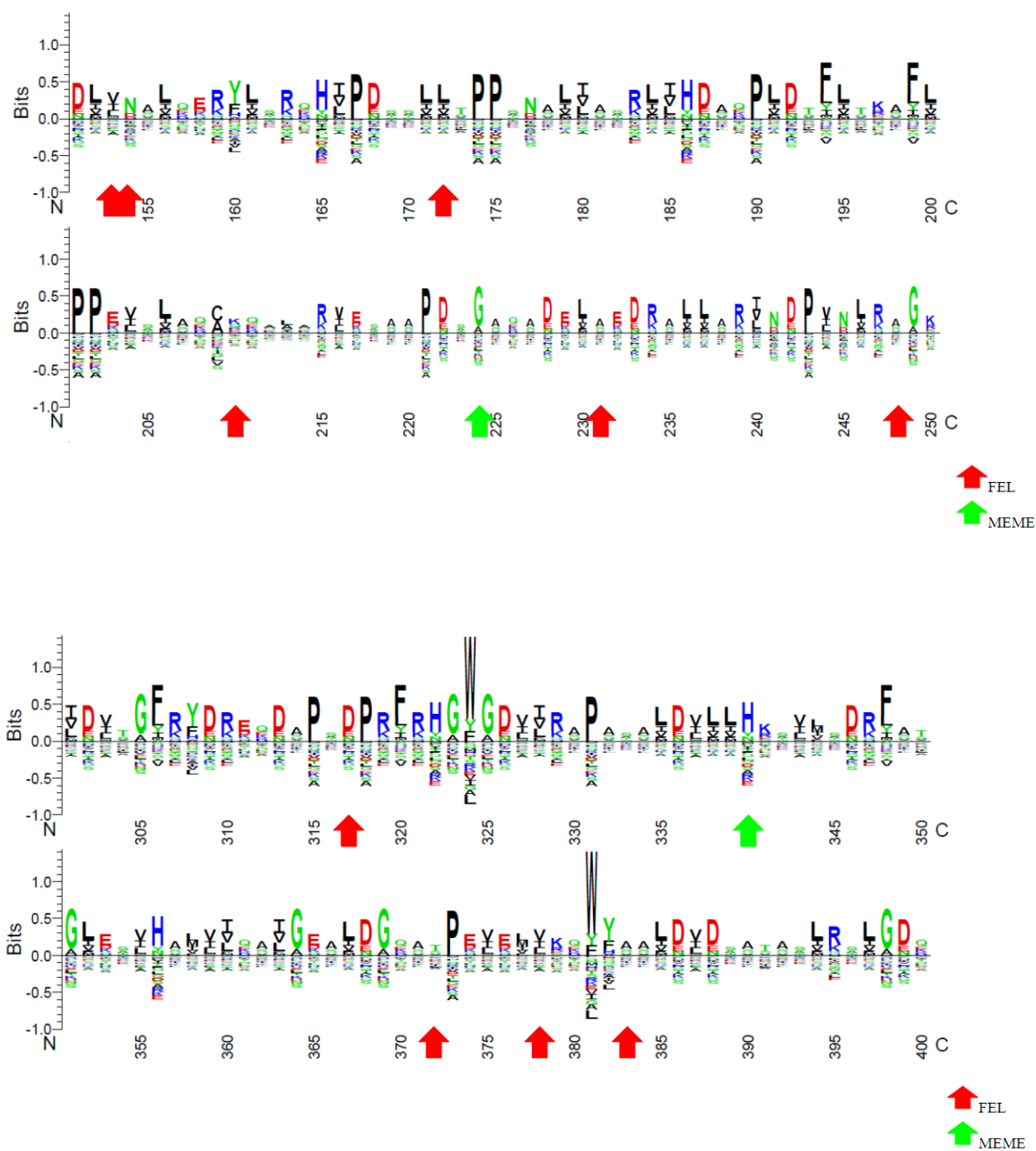


Nota: Los modelos fueron representados con el programa Discovery Studio (Dassault Systèmes BIOVIA, 2017)

**Figura 28-1.** Logos: Sitios de selección positiva y negativa de XopC2. Rojo: selección negativa con FEL. Verde: Selección positiva con MEME.



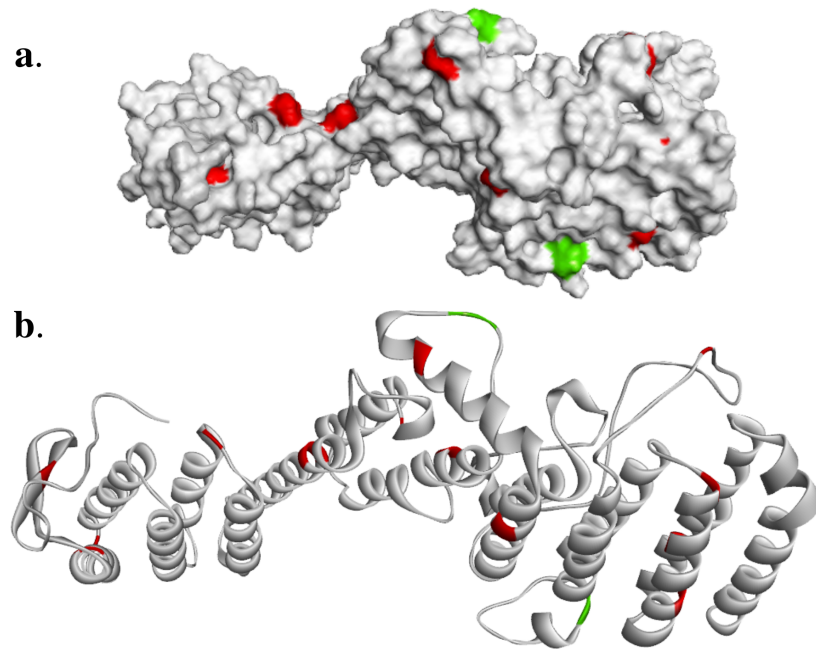




Nota: El logo de la secuencia de XopC2 se realizó con el servidor web Seq2Logo 2.0  
 (Frolund Thomsen & Nielsen, 2012)

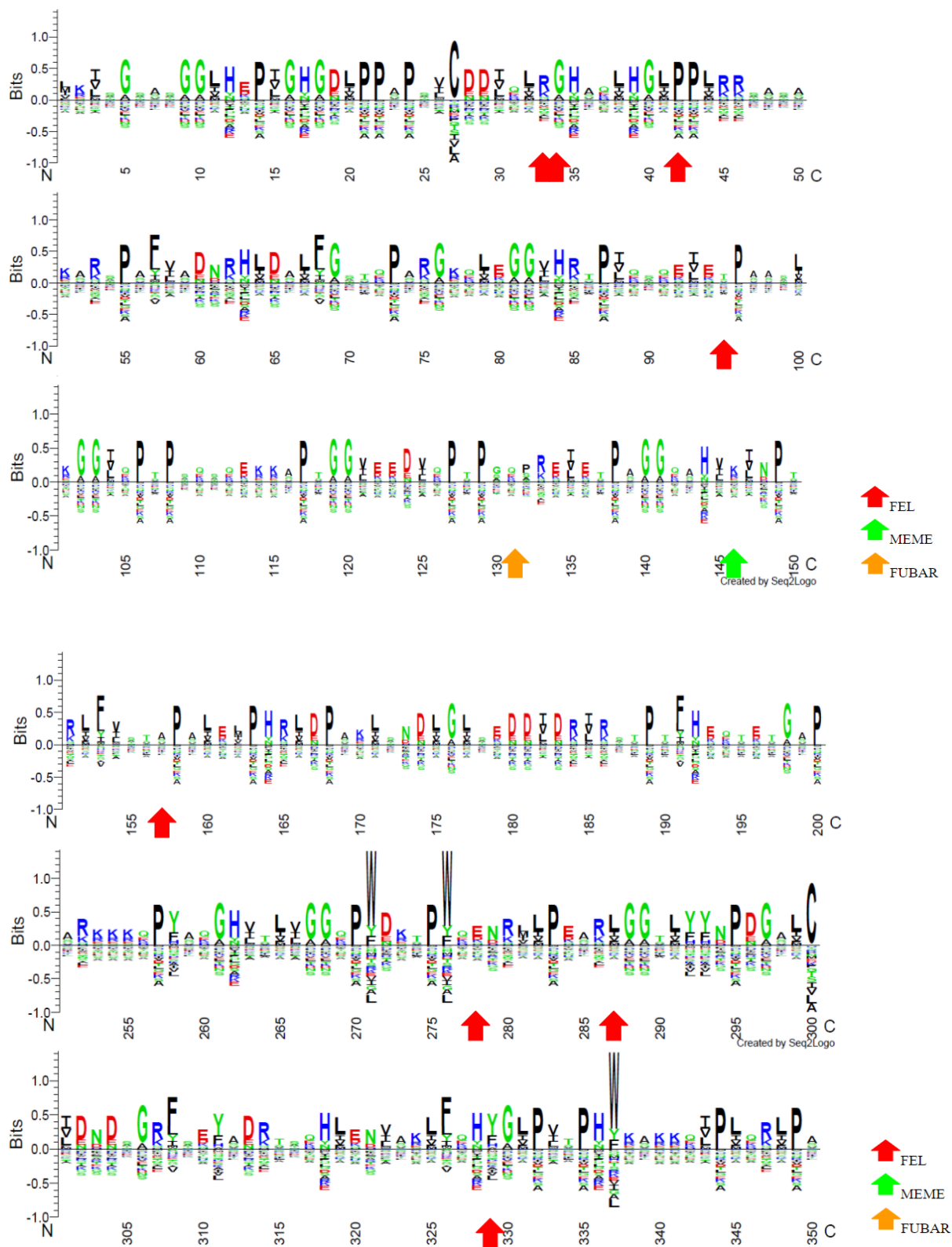
**Figura 28-2.** Sitios de selección positiva y negativa de XopC2. Rojo: selección negativa.

Verde: Selección positiva. a. Modelo en superficie. b. Modelo en cintas.



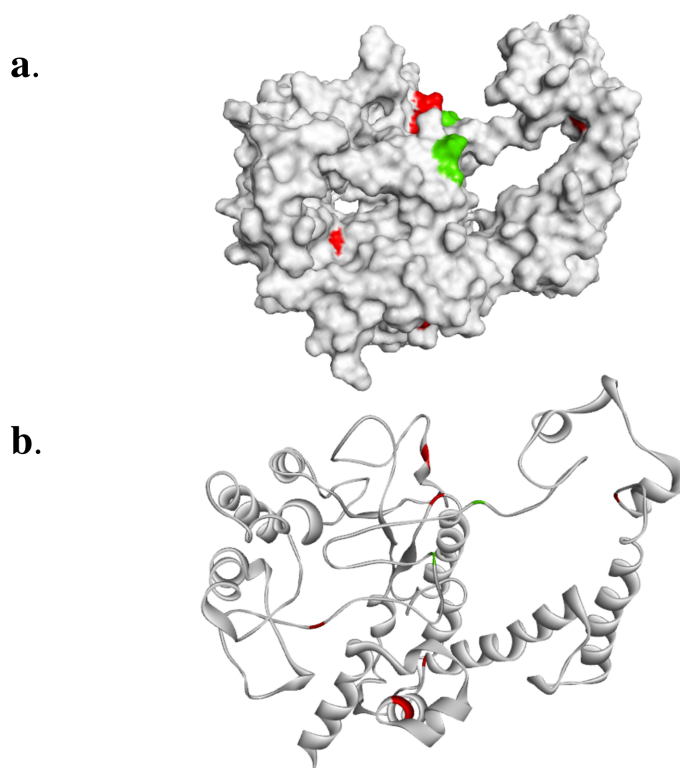
Nota: Los modelos fueron representados con el programa Discovery Studio (Dassault Systèmes BIOVIA, 2017)

**Figura 29-1.** Logos: Sitios de selección positiva y negativa de XopV. Rojo: selección negativa con FEL. Verde: Selección positiva con MEME. Naranja: Selección positiva con FUBAR.



Nota: El logo de la secuencia de XopV se realizó con el servidor web Seq2Logo 2.0 (Frolund Thomsen & Nielsen, 2012)

**Figura 29-2.** Sitios de selección positiva y negativa de XopV. Rojo: selección negativa. Verde: Selección positiva. a. Modelo en superficie. b. Modelo en cintas.



Nota: Los modelos fueron representados con el programa Discovery Studio (Dassault Systèmes BIOVIA, 2017).

Aunque los resultados aquí obtenidos, permite una aproximación del mecanismo molecular de RXAM2 y cinco efectores de *Xpm*, es importante validar la estructura tridimensional con otros métodos de modelado bioinformáticos, dinámica molecular y

experimentalmente, por metodologías de difracción y resonancia magnética nuclear (RMN).

Por otro lado, se sugiere la validación de la interacción de los dominios de RXAM2 con efectores de *Xpm*, por doble híbrido, co-inmunoprecipitación y BiFC (por sus siglas en inglés Bimolecular fluorescence complementation), determinando la posible participación de los dominios CC y NB-ARC de RXAM2 en el reconocimiento de los efectores de *Xpm*, además, del dominio LRR, así como la evaluación de aminoácidos indispensables para la interacción de RXAM2 con efectores de *Xpm*. Finalmente, se sugiere el uso de microscopía confocal para la co-localización subcelular de RXAM2 y efectores de *Xpm*.

## Conclusiones

A través del modelado por homología con los servidores Robetta y I-TASSER, se logró generar la posible estructura tridimensional de RXAM2. Se identificó la presencia de dominios conservados CC en la región N-terminal, NB-ARC y el dominio LRR en la región C-terminal, y se evaluó su similitud con proteínas reportadas experimentalmente como ZAR1 en *Arabidopsis thaliana*. Por otro lado, se sugiere que RXAM2 es una proteína soluble, de acuerdo a datos de exposición a solventes polares y posiblemente se encuentra en el citoplasma de la célula de la planta según la predicción realizada por los programas PredicProtein y DeepLoc-1.0. Para los efectores de *Xpm* XopE1, XopE4, XopC2, XopAK y XopV, se generó la posible estructura tridimensional, identificando que el modelo uno para cada efector, presenta una mejor calidad si es construido por homología con el servidor Robetta. Además, se identificó que posiblemente XopE1 y XopE4 son poco solubles al agua y se encuentran en la membrana de la célula de la planta, XopC2 soluble y posiblemente se encuentra en la mitocondria, XopV y XopAK solubles al agua y posiblemente se encuentran en el citoplasma de la planta según la predicción de DeepLoc-1.0.

Mediante acoplamiento rígido y flexible, y asumiendo posiblemente un reconocimiento directo apoyando el modelo receptor-ligando, se logró determinar que en tres de los efectores (XopE1, XopE4 y XopC2) la interacción con RXAM2 se da posiblemente por el dominio LRR en la región C-terminal. Sin embargo, para XopAK y XopV, se identificó una diferencia entre el acoplamiento rígido y el acoplamiento flexible,

para ambos efectores, en el acoplamiento rígido, posiblemente interactúan con el dominio LRR de RXAM2, pero para el acoplamiento flexible XopAK interactúa con RXAM2 mediante el dominio CC y XopV a través del dominio NB-ARC, información que debe ser validada experimentalmente.

A partir de la información obtenida de las secuencias de 65 cepas de *Xpm* de diferentes regiones biogeográficas, se logró identificar posibles sitios de selección positiva y negativa para cinco efectores de *Xpm*, en XopE4 se identificaron dos a sitios sujetos a selección negativa y 12 a selección positiva. Para XopE1, 17 sitios sujetos a selección negativa, indicando su alta conservación, al igual que XopAK donde no se identificaron sitios sujetos a selección en las 65 cepas. En XopC2, se identificaron tres sitios de sujetos a selección positiva y 14 a selección negativa. Finalmente para XopV, se identificaron dos sitios sujetos a selección positiva y ocho a selección negativa. Estos resultados sugieren una alta conservación de secuencias de efectores de *Xpm*, posiblemente necesaria para su aptitud bacteriana, y para su posible interacción directa con RXAM2.

## Recomendaciones

En el modelamiento de estructuras tridimensionales donde se cuenta con información experimental limitada, se recomienda el uso de la herramienta RoseTTAFold del servidor Robetta, basado en aprendizaje profundo, puede proporcionar modelos estructurales con una mayor calidad, que los obtenidos por modelamiento por homología, y por tanto una mejor aproximación a las estructuras tridimensionales. En el análisis estereoquímico con el diagrama de Ramachandran, se recomienda tener en cuenta todos los modelos obtenidos con los servidores Robetta o I-TASSER, ya que, no siempre el modelo uno puede tener el mayor porcentaje de aminoácidos ubicados en regiones energéticamente favorables para los ángulos de torsión phi y psi.

Para el acoplamiento molecular, se sugiere el uso de acoplamiento flexible, ya que, permite una mayor aproximación a la realidad biológica de las interacciones proteína-proteína.

Finalmente, para la identificación de sitios sujetos a selección positiva y negativa, se sugiere el uso de FUBAR cuando se tienen conjuntos de datos grandes, su algoritmo permite obtener menos falsos positivos.



### Referencias Bibliográficas

- Almagro Armenteros, J. J., Sønderby, C. K., Sønderby, S. K., Nielsen, H., & Winther, O. (2017). DeepLoc: prediction of protein subcellular localization using deep learning. *Bioinformatics*, 33(21), 3387-3395. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btx548>
- Aristizábal, J., & Sánchez, T. (2007). *Guía técnica para producción y análisis de almidón de yuca*. FAO. <http://www.fao.org/documents/card/es/c/cd9e42e3-7200-5990-b0a7-073d05bbcb2a/>
- Arrieta Ortiz, M. L., Rodríguez R, L. M., Pérez Quintero, Á. L., Poulin, L., Díaz, A. C., Arias Rojas, N., Trujillo, C., Restrepo Benavides, M., Bart, R., Boch, J., Boureau, T., Darrasse, A., David, P., de Bernonville, T. D., Fontanilla, P., Gagnevin, L., Guérin, F., Jacques, M. A., Lauber, E., ... Bernal, A. (2013). Genomic Survey of Pathogenicity Determinants and VNTR Markers in the Cassava Bacterial Pathogen *Xanthomonas axonopodis* pv. *Manihotis* Strain CIO151. *PLoS ONE*, 8(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0079704>
- Bagaria, A., Jaravine, V., Huang, Y. J., Montelione, G. T., & Güntert, P. (2012). Protein structure validation by generalized linear model root-mean-square deviation prediction. *Protein Science*, 21(2), 229-238. 10.1002/pro.2007
- Bart, R., Cohn, M., Kassen, A., McCallum, E. J., Shybut, M., Petriello, A., Krasileva, K., Dahlbeck, D., Medina, C., Alicai, T., Kumar, L., Moreira, L. M., Rodrigues Neto, J., Verdier, V., Santana, M. A., Kositcharoenkul, N., Vanderschuren, H., Gruissem, W., Bernal, A., & Staskawicz, B. J. (2012). High-throughput genomic sequencing

- of cassava bacterial blight strains identifies conserved effectors to target for durable resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *109*(28), 1972-1979. <https://doi.org/10.1073/pnas.1208003109>
- Bart, R. S., & Taylor, N. J. (2017). New opportunities and challenges to engineer disease resistance in cassava, a staple food of African small-holder farmers. *PLoS Pathog*, *13*(5). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006287>
- Bastard, K., Saladin, A., & Prévost, C. (2011). Accounting for Large Amplitude Protein Deformation during in Silico Macromolecular Docking. *International journal of molecular sciences*, *12*(2), 1316-1333. <https://doi.org/10.3390/ijms12021316>
- Bent, A., & Mackey, D. (2007). The New Paradigm and a Lifetime Supply of Questions. *Annual review of phytopathology*, *45*, 399-436. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.45.062806.094427>
- Bentham, A. R., Zdrzalek, R., De la Concepcion, J. C., & Banfield, M. J. (2018). Uncoiling CNLs: Structure/Function Approaches to Understanding CC Domain Function in Plant NLRs. *Plant and Cell Physiology*, *59*(12), 2398-2408. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcy185>
- Bernhofer, M., Dallago, C., Karl, T., Satakopam, V., Heinzinger, M., Littmann, M., Olenyi, T., Qiu, J., Schütze, K., Yachdav, G., Ashkenazy, H., Ben-Tal, N., Bromberg, Y., Goldberg, T., Kajan, L., O'Donoghue, S., Sander, C., Schafferhans, A., Schlessinger, A., ... Rost, B. (2021). PredictProtein - Predicting Protein Structure and Function for 29 Years. *Nucleic Acids Research*, *49*(1), 535-540. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab354>

- Bhattacharya, A., Tejero, R., & Montelione, G. T. (2007). Evaluating protein structures determined by structural genomics consortia. *Proteins*, *66*(4), 778-795. doi: 10.1002/prot.21165
- Bigeard, J., Colcombet, J., & Hirt, H. (2015). Signaling mechanisms in pattern-triggered immunity (PTI). *Molecular plant*, *8*(4), 521-539. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2014.12.022>
- Boher, B., Kpemoua, K., Nicole, M., Luisetti, J., & Geiger, J. P. (1995). Ultrastructure of interactions between cassava and *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis*: Cytochemistry of cellulose and pectin degradation in a susceptible cultivar. *Phytopathology*, *85*, 777-288.
- Burdett, H., Kobe, B., & Anderson, P. A. (2019). Animal NLRs continue to inform plant NLR structure and function. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *670*, 58-68. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2019.05.001>
- Casey, L. W., Lavrencic, P., Bentham, A. R., Cesari, S., Ericsson, D. J., Croll, T., Turk, D., Anderson, P. A., Mark, A. E., Dodds, P., Mobli, M., Kobe, B., & Williams, S. J. (2016). The CC domain structure from the wheat stem rust resistance protein Sr33 challenges paradigms for dimerization in plant NLR proteins. *PNAS*, *113*(45), 12856-12861. <https://doi.org/10.1073/pnas.1609922113>
- Ceballos, H. (2002). La yuca en Colombia y el mundo: nuevas perspectivas para un cultivo milenario. In *La yuca en el Tercer Milenio: Sistemas modernos de producción, procesamiento, utilización y comercialización* (pp. 1-13). CIAT. <https://hdl.handle.net/10568/55238>

- Cesari, S. (2018). Multiple strategies for pathogen perception by plant immune receptors. *New Phytologist*, 219(1), 17-24. <https://doi.org/10.1111/nph.14877>
- Cesari, S., Moore, J., Chen, C., Webb, D., Periyannan, S., Mago, R., Bernoux, M., Lagudah, E. S., & Dodds, P. N. (2016). Cytosolic activation of cell death and stem rust resistance by cereal MLA-family CC-NLR proteins. *PNAS*, 113(36), 10204-10209. <https://doi.org/10.1073/pnas.1605483113>
- Chang, J. H., Urbach, J. M., Law, T. F., Arnold, L. W., Hu, A., Gombar, S., Grant, S. R., Ausubel, F. M., & Dangl, J. L. (2005). A high-throughput, near-saturating screen for type III effector genes from *Pseudomonas syringae*. *PNAS*, 102(7), 2549-2554. <https://doi.org/10.1073/pnas.0409660102>
- Chen, J., Li, M., Liu, L., Chen, G., & Qing Fu, Z. (2021). ZAR1 resistosome and helper NLRs: Bringing in calcium and inducing cell death. *Molecular Plant*, 8(1), 1234-1236. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2021.06.026>
- Chen, V. B., Arendall, W. B., Headd, J. J., Keedy, D. A., Immormino, R. M., Kapral, G., Murray, L. W., Richardson, J. S., & Richardson, D. C. (2010). MolProbity: All-Atom Structure Validation for Macromolecular Crystallography. *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography*, 66(1), 12-21. [10.1107/S0907444909042073](https://doi.org/10.1107/S0907444909042073)
- Contreras Nieto, E., & López Carrascal, C. E. (2008). Expresión de dos genes candidatos a resistencia contra la bacteriosis vascular en yuca. *Acta Biológica Colombiana*, 13(2), 175-188. <https://revistas.unal.edu.co/index.php/actabiol/article/view/1542>

- Creevey, C. J., & McInerney, J. O. (2002). An algorithm for detecting directional and non-directional positive selection, neutrality and negative selection in protein coding DNA sequences. *Gene*, *300*, 43-51. 10.1016/S0378-1119(02)01039-9
- Cui, H., Tsuda, K., & Parker, J. E. (2015). Effector-Triggered Immunity: From Pathogen Perception to Robust Defense. *Annual review of plant biology*, *66*, 487-511.  
<https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050213-040012>
- DANE. (2015). *Censo Nacional Agropecuario* (Vol. 1).  
<https://www.dane.gov.co/files/images/foros/foro-de-entrega-de-resultados-y-cierre-3-censo-nacional-agropecuario/CNATomo1-Memorias.pdf>
- DANE. (2016). *Insumos y factores asociados a la producción agropecuaria*. DANE: Información para todos. [https://ciat.cgiar.org/wp-content/uploads/estacas\\_yuca](https://ciat.cgiar.org/wp-content/uploads/estacas_yuca)
- Dangl, J. L., Horvath, D. M., & Staskawicz, B. (2013). Pivoting the plant immune system from dissection to deployment. *Science*, *341*(6147), 746-751.  
10.1126/science.1236011
- Dangl, J. L., & Jones, J. D.G. (2001). Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature*, *411*, 826-833. <https://doi.org/10.1038/35081161>
- Dassault Systèmes BIOVIA. (2017). *Discovery Studio Modeling Environment* (San Diego: Dassault Systèmes, 2016.).  
<https://www.materials-studio.com/products/collaborative-science/biovia-discovery-studio/>

- Díaz Tatis, P. A. (2021). *Transference of RXam2 and Bs2 genes to confer resistance against cassava bacterial blight (CBB)* [in press]. Universidad Nacional de Colombia.
- Dodds, P. N., Lawrence, G. J., Catanzariti, A.-M., Teh, T., Wang, C.-I. A., Ayliffe, M. A., Kobe, B., & Ellis, J. G. (2006). Direct protein interaction underlies gene-for-gene specificity and coevolution of the flax resistance genes and flax rust avirulence genes. *PNAS*, *103*(23), 8888-8893. <https://doi.org/10.1073/pnas.0602577103>
- Dodds, P. N., & Rathjen, J. P. (2010). Plant immunity: towards an integrated view of plant–pathogen interactions. *Nature Reviews Genetics*, *11*, 539-548. <https://doi.org/10.1038/nrg2812>
- Dorn, M., e Silva, M. B., Buriol, L. S., & Lamb, L. C. (2014). Three-dimensional protein structure prediction: Methods and computational strategies. *Computational Biology and Chemistry*, *53*, 251-276. <https://doi.org/10.1016/j.compbiolchem.2014.10.001>
- Dorn, M., e Silva, M. B., Buriol, L. S., & Lamb, L. C. (2014). Three-dimensional protein structure prediction: Methods and computational strategies. *Computational Biology and Chemistry*, *53*, 251-276. <https://doi.org/10.1016/j.compbiolchem.2014.10.001>
- Eisenberg, D., Lüthy, R., & Bowie, J. (1997). VERIFY3D: assessment of protein models with three-dimensional profiles. *Methods in Enzymology*, *277*, 396-404. [10.1016/s0076-6879\(97\)77022-8](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(97)77022-8)
- FAO. (2014). *El estado de inseguridad alimentaria en el mundo: 2013*. FAO. <http://www.fao.org/3/i3434s/i3434s.pdf>

- Frolund Thomsen, M. C., & Nielsen, M. (2012). Seq2Logo: a method for construction and visualization of amino acid binding motifs and sequence profiles including sequence weighting, pseudo counts and two-sided representation of amino acid enrichment and depletion. *Nucleic Acids Research*, *40*(1), 281-287.  
<https://doi.org/10.1093/nar/gks469>
- Gay, N. J., & Keith, F. J. (1991). Drosophila Toll and IL-1 receptor. *Nature*, *351*(6325), 355-356. <https://www.nature.com/articles/351355b0>
- Gil, J., & López Carrascal, C. E. (2019). El dominio STK de la proteína de resistencia a la bacteriosis vascular de yuca RXAM1 interactúa con una E3 Ubiquitin Ligasa. *Acta Biológica Colombiana*, *24*(1), 139-149.  
<https://revistas.unal.edu.co/index.php/actabiol/article/view/70821>
- Ginalski, K. (2006). Comparative modeling for protein structure prediction. *Current Opinion in Structural Biology*, *12*(2), 172-177.  
<https://doi.org/10.1016/j.sbi.2006.02.003>
- Goldberg, T., Hamp, T., & Rost, B. (2012). LocTree2 predicts localization for all domains of life. *Bioinformatics*, *28*(18), 458-465. [10.1093/bioinformatics/bts390](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts390)
- Gürlebeck, D., Thieme, F., & Bonas, U. (2006). Type III effector proteins from the plant pathogen *Xanthomonas* and their role in the interaction with the host plant. *Journal of Plant Physiology*, *163*(3), 233-255. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2005.11.011>
- Hahn, S.K., Howland, A.K., & Terry, E.R. (1980). Correlated resistance of cassava to mosaic and bacterial blight diseases. *Euphytica*, *29*, 305-311.  
<https://doi.org/10.1007/BF00025127>

- Hajri, A., Brin, C., Hunault, G., Lardeux, F., Lemaire, C., Manceau, C., Boureau, T., & Poussier, S. (2009). A «Repertoire for Repertoire» Hypothesis: Repertoires of Type Three Effectors are Candidate Determinants of Host Specificity in *Xanthomonas*. *PLOS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006632>
- Hughes, A. L. (1999). *Adaptive Evolution of Genes and Genomes*. Oxford University Press.
- Jacob, F., Vernaldi, S., & Maekawa, T. (2013). Evolution and Conservation of Plant NLR Functions. *Frontiers in Immunology*, 4, 297.  
<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2013.00297>
- Jones, J. D., & Dangl, J. L. (2006). The plant immune system. *Nature*, 444, 323-329.  
<https://doi.org/10.1038/nature05286>
- Jorge, V., Fregene, M.A., Duque, M.C., Bonierbale, M.W., Tohme, J., & Verdier, V. (2000). Genetic mapping of resistance to bacterial blight disease in cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Theoretical and Applied Genetics*, 101, 865-872.  
<https://doi.org/10.1007/s001220051554>
- Kangueane, P., & Nilofer, C. (2018). Protein-Protein Docking: Methods and Tools. In *Protein-Protein and Domain-Domain Interactions*. Springer.  
[https://doi.org/10.1007/978-981-10-7347-2\\_14](https://doi.org/10.1007/978-981-10-7347-2_14)
- Kanzaki, H., Yoshida, K., Saitoh, H., Fujisaki, K., Hirabuchi, A., Alaux, L., Fournier, E., Tharreau, D., & Terauchi, R. (2012). Arms race co-evolution of *Magnaporthe oryzae* AVR-Pik and rice Pik genes driven by their physical interactions. *The Plant Journal*, 72(6), 894-907. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2012.05110.x>



- Khan, M., Seto, D., Subramaniam, R., & Desveaux, D. (2017). Oh, the places they'll go! A survey of phytopathogen effectors and their host targets. *The Plant Journal*, *93*(4), 651-663. <https://doi.org/10.1111/tpj.13780>
- Kimura, M. (1977). Preponderance of synonymous changes as evidence for the neutral theory of molecular evolution. *Nature*, *19*(267), 275-276. [10.1038/267275a0](https://doi.org/10.1038/267275a0)
- Kobe, B., & Kajava, A. V. (2001). The leucine-rich repeat as a protein recognition motif. *Current Opinion in Structural Biology*, *11*(6), 725-732. [https://doi.org/10.1016/S0959-440X\(01\)00266-4](https://doi.org/10.1016/S0959-440X(01)00266-4)
- Kosakovsky Pond, S. L., & Frost, S. D.W. (2005). Not So Different After All: A Comparison of Methods for Detecting Amino Acid Sites Under Selection. *Molecular Biology and Evolution*, *22*(5), 1208-1222. <https://doi.org/10.1093/molbev/msi105>
- Kotev, M., Soliva, R., & Orozco, M. (2016). Challenges of docking in large, flexible and promiscuous binding sites. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, *24*(20), 4961-4969. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2016.08.010>.
- Kozakov, D., Hall, D. R., Xia, B., Porter, K. A., Padhorny, D., Yueh, C., Beglov, D., & Vajda, S. (2017). The ClusPro web server for protein-protein docking. *Nature protocols*, *12*(2), 255-278. <https://doi.org/10.1038/nprot.2016.169>
- Kpémoua, K., Boher, B., Nicole, M., Calatayud, P. A., & Geiger, J. P. (1996). Cytochemistry of defense responses in cassava infected by *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis*. *Canadian Journal of Microbiology*, *42*(11), 1131-1143. [10.1139/m96-145](https://doi.org/10.1139/m96-145)

- Lee, J., Freddolino, P. L., & Zhang, Y. (2017). Ab Initio Protein Structure Prediction. In *From Protein Structure to Function with Bioinformatics* (Springer Science+Business Media B.V ed., pp. 3-25). Daniel J. Rigden. DOI 10.1007/978-94-024-1069-3\_1
- Lewis, J. D., Guttman, D. S., & Desveaux, D. (2009). The targeting of plant cellular systems by injected type III effector proteins. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 20(9), 1055-1063. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2009.06.003>
- Long, J., Song, C., Yan, F., Zhou, J., Zhou, H., & Yang, B. (2018). Non-TAL Effectors From *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* Suppress Peptidoglycan-Triggered MAPK Activation in Rice. *Frontiers in plant science*, 9, 1857. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01857>
- López, C., Restrepo, S., & Verdier, V. (2006). Limitations of Cassava Bacterial Blight: New Advances. *Acta Biológica Colombiana*, 11, 21-45. <https://revistas.unal.edu.co/index.php/actabiol/article/view/27154>
- López, C. E., Quesada Ocampo, L. M., Bohórquez, A., Duque, M. C., Vargas, J., Tohme, J., & Verdier, V. (2007). Mapping EST-derived SSRs and ESTs involved in resistance to bacterial blight in *Manihot esculenta*. *Genome*, 50(12), 1078-1088. <https://doi.org/10.1139/G07-087>
- López, C. E., Zuluaga, A. P., Cooke, R., Delseny, M., Tohme, J., & Verdier, V. (2003). Isolation of Resistance Gene Candidates (RGCs) and characterization of an RGC cluster in cassava. *Molecular genetics and genomics: MGG*, 269(5), 658-71. <https://doi.org/10.1007/s00438-003-0868-5>

- Lukasik, E., & Takken, F. L. (2009). STANDING strong, resistance proteins instigators of plant defence. *Current Opinion in Plant Biology*, *12*(4), 427-436.  
<https://doi.org/10.1016/j.pbi.2009.03.001>
- McCallum, E., Anjanappa, R. B., & Gruissem, W. (2017). Tackling agriculturally relevant diseases in the staple crop cassava (*Manihot esculenta*). *Current Opinion in Plant Biology*, *38*, 50-58. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2017.04.008>
- Medina, C. A., Reyes, P. A., Trujillo, C. A., Gonzalez, J. L., Bejarano, D. A., Montenegro, N. A., Jacobs, J. M., Joe, A., Restrepo, S., Alfano, J. R., & Bernal, A. (2017). The role of type III effectors from *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* in virulence and suppression of plant immunity. *Molecular plant pathology*, *19*(3), 593-606.  
<https://doi.org/10.1111/mpp.12545>
- Moal, I. H., & Bates, P. A. (2010). SwarmDock and the Use of Normal Modes in Protein-Protein Docking. *International journal of molecular sciences*, *11*(10), 3623-3648. <https://doi.org/10.3390/ijms11103623>
- Moal, I. H., Chaleil, R. A.G., & Bates, P. A. (2018). Flexible Protein-Protein Docking with SwarmDock. In *Methods in Molecular Biology* (pp. 413-428). N.J Clifton.  
[https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7759-8\\_27](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7759-8_27)
- Moffett, P., Farnham, G., Peart, J., & Baulcombe, D. C. (2002). Interaction between domains of a plant NBS-LRR protein in disease resistance-related cell death. *The EMBO Journal*, *21*, 4511-4519. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdf453>
- Mondal, K., Soni, M., Verma, G., Kulshreshtha, A., Mrutyunjaya, S., & Kumar, R. (2020). *Xanthomonas axonopodis* pv. *punicae* depends on multiple non-TAL (Xop) T3SS

- effectors for its coveted growth inside the pomegranate plant through repressing the immune responses during bacterial blight development. *Microbiological Research*, 240. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126560>
- Murrell, B., Moola, S., Mabona, A., Weighill, T., Sheward, D., Kosakovsky Pond, S. L., & Scheffler, K. (2013). FUBAR: A Fast, Unconstrained Bayesian AppRoximation for Inferring Selection. *Molecular Biology and Evolution*, 30(5), 1196-1205. [10.1093/molbev/mst030](https://doi.org/10.1093/molbev/mst030)
- Murrell, B., Wertheim, J. O., Moola, S., Weighill, T., Scheffler, K., & Kosakovsky Pond, S. L. (2012). Detecting Individual Sites Subject to Episodic Diversifying Selection. *PLOS Genetics*, 8(7), 1-10. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002764>
- Nikolaev, D. M., Shtyrov, A. A., Panov, M. S., Jamal, A., Chakchir, O. B., Kochemirovsky, V. A., Olivucci, M., & Ryazantsev, M. N. (2018). A Comparative Study of Modern Homology Modeling Algorithms for Rhodopsin Structure Prediction. *ACS Omega*, 3(7), 7555-7556. <https://doi.org/10.1021/acsomega.8b00721>
- Ochoa Cabezas, J. C. (2011). *Validación funcional del gen de resistencia candidato de yuca a bacteriosis vascular rxam2 por ARN de interferencia* [Tesis de Maestría]. Universidad Nacional de Colombia. <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/8620>
- Pearce, R., & Zhang, Y. (2021). Toward the solution of the protein structure prediction problem. *Journal Biological Chemistry*, 297(1). <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.100870>

- Peng, Y., van Wersch, R., & Zhang, Y. (2018). Convergent and Divergent Signaling in PAMP-Triggered Immunity and Effector-Triggered Immunity. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 31(4), 403-409.  
<https://doi.org/10.1094/MPMI-06-17-0145-CR>
- Pettersen, E., Goddar, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., Meng, E. C., & Ferrin, T. E. (2004). UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem*, 25(13), 1605-1612. 10.1002/jcc.20084
- Qi, D., & Innes, R. W. (2013). Recent advances in plant NLR structure, function, localization, and signaling. *Frontiers in Immunology*, 4, 348.  
<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2013.00348>
- Rache, L., Blondin, L., Flores, C., Trujillo, C., Szurek, B., Restrepo, S., Koebnik, R., Bernal, A., & Vernière, C. (2019). An Optimized Microsatellite Scheme for Assessing Populations of *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis*. *The American Phytopathological Society*, 109(5). <https://doi.org/10.1094/PHYTO-06-18-0210-R>
- Ramachandran, G. N., Ramakrishnan, C., & Sasisekharan, V. (1963). Stereochemistry of polypeptide chain configurations. *Journal of molecular biology*, 7, 95-99.  
[https://doi.org/10.1016/s0022-2836\(63\)80023-6](https://doi.org/10.1016/s0022-2836(63)80023-6)
- Ramalingam, J., Vera Cruz, C. M., Kukreja, K., Chittoor, J. M., Wu, J. L., Lee, S. W., Baraoidan, M., George, M. L., Cohen, M. B., Hulbert, S. H., Leach, J. E., & Leung, H. (2003). Candidate defense genes from rice, barley, and maize and their association with qualitative and quantitative resistance in rice. *Molecular*

*plant-microbe interactions : MPMI*, 16(1), 14-24.

<https://doi.org/10.1094/MPMI.2003.16.1.14>

Ramírez, L., & Jiménez, P. (2015). *Manual Técnico: El cultivo de yuca Manihot esculenta Crantz; para producción forrajera y su utilización en alimentos de bovinos.*

Universidad Nacional de Colombia.

[http://www.uneditorial.net/uflip/Manual-tecnico-el-cultivo-de-la-yuca-Manihot-esculenta-crantz-para-produccion-forrajera/pubData/source/Manual-tecnico-el-cultivo-de-la-yuca-Manihot-esculenta-crantz\\_Uflip.pdf](http://www.uneditorial.net/uflip/Manual-tecnico-el-cultivo-de-la-yuca-Manihot-esculenta-crantz-para-produccion-forrajera/pubData/source/Manual-tecnico-el-cultivo-de-la-yuca-Manihot-esculenta-crantz_Uflip.pdf)

Ramírez Prado, J. S., Abulfaraj, A. A., Rayapuram, N., Benhamed, M., & Hirt, H. (2018).

Plant Immunity: From Signaling to Epigenetic Control of Defense. *Trends in Plant Science*, 23(9), 833-844. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2018.06.004>

Restrepo, S., Velez, C. M., & Duque, M. C. (2004). Genetic structure and population dynamics of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* in Colombia from 1995 to 1999. *Applied and environmental microbiology*, 70(1), 255-261.

<https://doi.org/10.1128>

Román Reyna, V. (2012). *Identificación de interactores proteicos de RXam2, una proteína candidata de resistencia, implicados en la ruta de señalización de defensa contra la bacteriosis vascular de la yuca* [Tesis de Maestría]. Universidad Nacional de Colombia.

Salomon, D., Dar, D., Sreeramulu, S., & Sessa, G. (2011). Expression of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* Type III Effectors in Yeast Affects Cell Growth and

Viability. *The American Phytopathological Society*, 24(3), 305-314. 10.1094/  
MPMI -09-10-0196

Sandino, T., López Kleine, L., López, C., & Marquínez, X. (2015). Caracterización de la respuesta morfológica de variedades susceptibles y resistentes de yuca (*Manihot esculenta* Crantz) a la bacteriosis vascular causada por *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*. *Summa Phytopathologica*, 41(2), 94-100.

<https://doi.org/10.1590/0100-5405/2031>

Song, Y., DiMaio, F., Wang, R. Y.-R., Kim, D., Miles, C., Brunette, T., Thompson, J., & Barker, D. (2013). High-Resolution Comparative Modeling with RosettaCM.

*Structure*, 21(10), 1735-1742. <https://doi.org/10.1016/j.str.2013.08.005>

Sotudian, S., Desta, I. T., Hashemi, N., Zarbafian, S., Kozakov, D., Vakili, P., Vajda, S., & Paschalidis, I. C. (2021). Improved cluster ranking in protein–protein docking

using a regression approach. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 19, 2269-2278. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2021.04.028>

Tameling, W., Elzinga, S. D., Darmin, P. S., Vossen, J. H., Takken, F. L. W., Haring, M. A., & Cornelissen, B. J. C. (2002). The tomato R gene products I-2 and MI-1 are

functional ATP binding proteins with ATPase activity. *Plant Cell*, 14(11), 2929-2939. 10.1105/tpc.005793

Teper, D., Burstein, D., Salomon, D., Gershovitz, M., Pupko, T., & Sessa, G. (2016).

Identification of novel *Xanthomonas euvesicatoria* type III effector proteins by a machine-learning approach. *Molecular Plant Pathology*, 17(3), 398-411.

<https://doi.org/10.1111/mpp.12288>

- Thieme, F., Szczesny, R., Urban, A., Kirchner, O., Hause, G., & Bonas, U. (2007). New Type III Effectors from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* Trigger Plant Reactions Dependent on a Conserved N-Myristoylation Motif. *The American Phytopathological Society*, 20(10), 1250-1261. 10.1094 / MPMI -20-10-1250
- Torchala, M., Moal, I. H., Chaleil, R. A.G., Fernández Recio, J., & Bates, P. A. (2013). SwarmDock: a server for flexible protein–protein docking. *Bioinformatics*, 29(6), 807-809. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt038>
- Toro, Y., Hernandez Santoyo, A., Altuzur, V., Vivanco Cid, H., & Mendoza Barrera, C. (2013). Protein-Protein and Protein-Ligand Docking. In *Protein Engineering - Technology and Application* (p. 187). Tomohisa Ogawa. 10.5772/56376
- Totrov, M., & Abagyan, R. (2008). Flexible ligand docking to multiple receptor conformations: a practical alternative. *Current opinion in structural biology*, 18(2), 178-184. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2008.01.004>
- Trujillo, C. A., Ochoa, J. C., Mideros, M. F., Restrepo, S., López, C., & Bernal, A. (2014). A complex population structure of the cassava pathogen *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* in recent years in the Caribbean Region of Colombia. *Microbial Ecology*, 68(1), 155-167. <https://doi.org/10.1007/s00248-014-0411-8>
- van der Hoorn, R. A.L., & Kamoun, S. (2008). From Guard to Decoy: A New Model for Perception of Plant Pathogen Effectors. *The Plant Cell*, 20(8), 2009-2017. <https://doi.org/10.1105/tpc.108.060194>



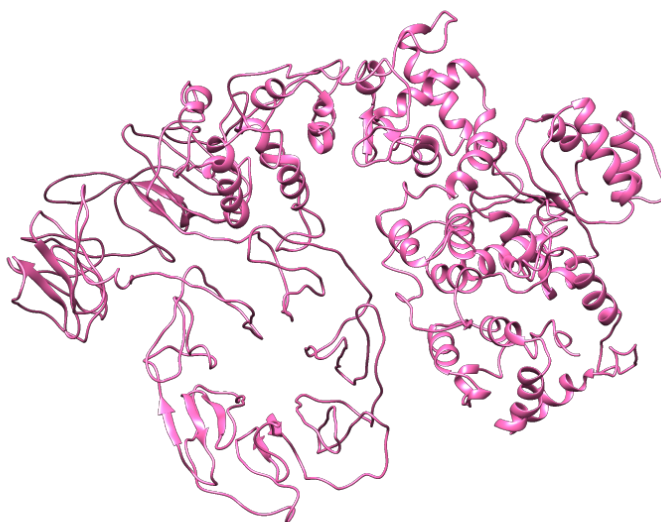
- Varden, F. A., De la Concepcion, J. C., Maidment, J. H., & Banfield, M. J. (2017). Taking the stage: effectors in the spotlight. *Current Opinion in Plant Biology*, 38, 25-33. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2017.04.013>
- Ve, T., Williams, S. J., & Kobe, B. (2015). Structure and function of Toll/interleukin-1 receptor/resistance protein (TIR) domains. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death*, 20(2), 250-261. <https://doi.org/10.1007/s10495-014-1064-2>
- Wang, G., Roux, B., Feng, F., Guy, E., Li, L., Li, N., Zhang, X., Lautier, M., Jardinaud, M.-F., Chabannes, M., Arlat, M., Chen, S., He, C., Noël, L. D., & Zhou, J.-M. (2015). The Decoy Substrate of a Pathogen Effector and a Pseudokinase Specify Pathogen-Induced Modified-Self Recognition and Immunity in Plants. *Cell Host & Microbe*, 18(3), 285-295. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2015.08.004>
- Wang, J., Wang, J., Hu, M., Wu, S., Qi, J., Wang, G., Han, Z., Qi, Y., Gao, N., Gao, N., Wang, H. W., Zhou, J. M., & Chai, J. (2019). Ligand-triggered allosteric ADP release primes a plant NLR complex. *Science*, 364(6435). [10.1126/science.aav5868](https://doi.org/10.1126/science.aav5868)
- Williams, S. J., Sornaraj, P., deCoursey - Ireland, E., Menz, R. I., Kobe, B., Ellis, J. G., Dodds, P. N., & Anderson, P. A. (2011). An Autoactive Mutant of the M Flax Rust Resistance Protein Has a Preference for Binding ATP, Whereas Wild-Type M Protein Binds ADP. *The American Phytopathological Society*, 24(8), 897-906. <https://doi.org/10.1094/MPMI-03-11-0052>

- Wong, C. F. (2008). Flexible ligand–flexible protein docking in protein kinase systems. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1784(1), 244-251. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2007.10.005>
- Yang, J., Yan, R., Roy, A., Xu, D., Poisson, J., & Zhang, Y. (2015). The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction. *Nature methods*, 12(1), 7-8. Yang, J., Yan, R., Roy, A., Xu, D., Poisson, J., & Zhang, Y. (2015). The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction. *Nature methods*, 12(1), 7–8. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3213>
- Zhang, J., & Zhou, J. M. (2010). Plant immunity triggered by microbial molecular signatures. *Molecular plant*, 3(5), 783-793. <https://doi.org/10.1093/mp/ssq035>
- Zhang, W., Zhao, Y., Guo, Y., & Ye, K. (2012). Plant Actin-binding Protein SCAB1 Is Dimeric Actin Cross-linker with Atypical Pleckstrin Homology Domain. *Protein Structure and Folding*, 287(15), 11981-11990. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.338525>
- Zhang, X., Bernoux, M., Betham, A. R., Newman, T. E., Ve, T., Casey, L. W., Raaymakers, T. M., Hu, J., Croll, T. I., Schreiber, K. J., Staskawicz, B. J., Anderson, P. A., Hoon Sohn, K., Williams, S. J., Dodds, P. N., & Kobe, B. (2017). Multiple functional self-association interfaces in plant TIR domains. *PNAS*, 114(10), 2046-2052. <https://doi.org/10.1073/pnas.1621248114>
- Zhao, B., Dahlbeck, D., Krasileva, K. V., Fong, R. W., & Staskawicz, B. J. (2011). Computational and biochemical analysis of the *Xanthomonas* effector AvrBs2 and

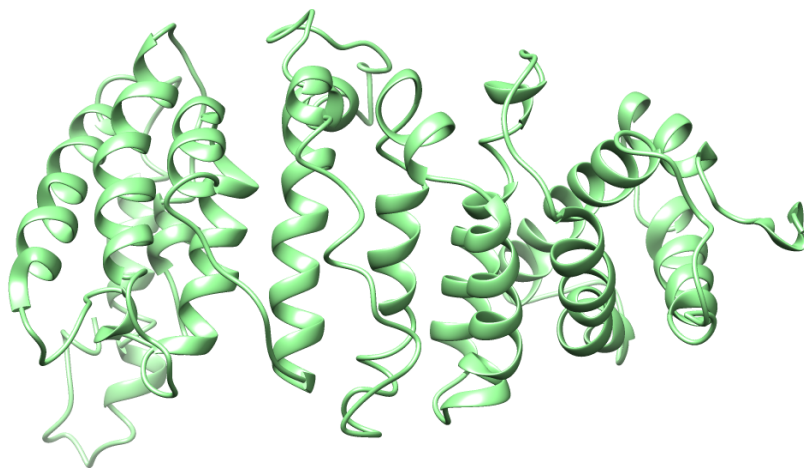
its role in the modulation of *Xanthomonas* type three effector delivery. *PLoS pathogens*, 7(12). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002408>

### Anexos

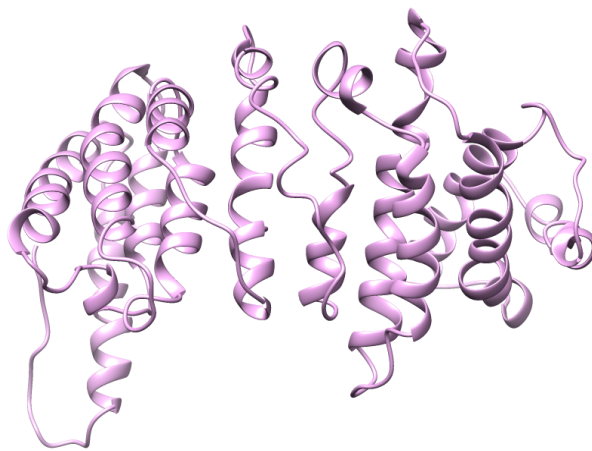
**Figura Suplementaria 1.** Modelo de la estructura de RXAM2 generado con el servidor I-TASSER.



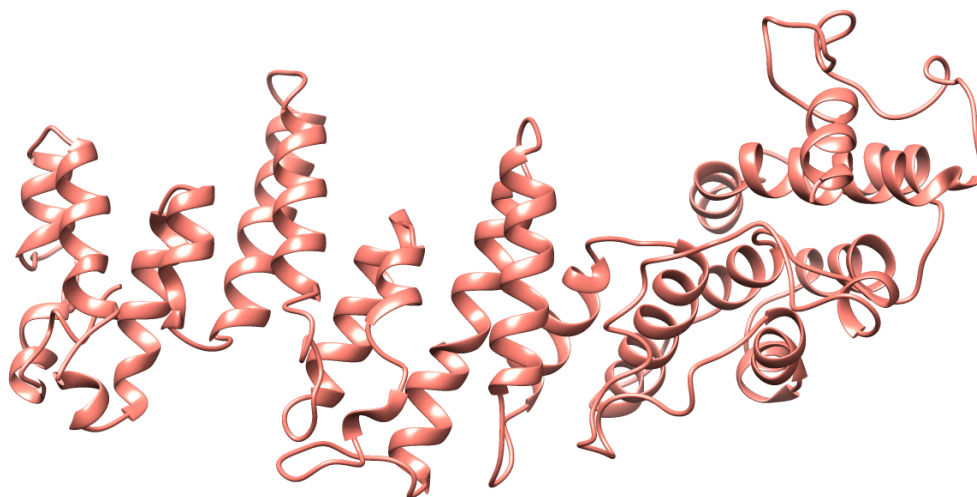
**Figura Suplementaria 2.** Modelo de la estructura de XopE1 generado con el servidor I-TASSER.



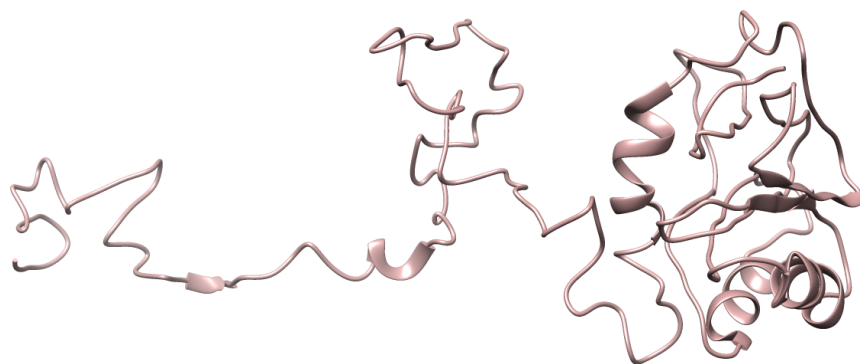
**Figura Suplementaria 3.** Modelo de la estructura de XopE4 generado con el servidor I-TASSER.



**Figura Suplementaria 4.** Modelo de la estructura de XopC2 generado con el servidor I-TASSER.



**Figura Suplementaria 5.** Modelo de la estructura de XopAK generado con el servidor I-TASSER.



**Figura Suplementaria 6.** Modelo de la estructura de XopV generado con el servidor I-TASSER.

