

Omics applications in plant-microorganism interactions: A view from plant genomics

Aplicaciones Ómicas en la interacción Planta-Microorganismos: Una visión desde la genómica vegetal

June Simpson*, Emmanuel Avila de Dios, Alan D. Gómez Vargas, Arely V. Pérez-López, Andrea Castro Mexicano, Yoselin Meléndez Barraza, Laura Hernández Soriano, Laura Gálvez Sandré, M. Erendira López Rosas, Rocío Medina Chávez, Katia D.C. Gil-Vega, Departamento de Ingeniería Genética de Plantas, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados Unidad Irapuato, Instituto Politécnico Nacional, km 9.6 Libramiento Norte Carr. Irapuato-León, Irapuato, Guanajuato, CP 36821, México.

*Corresponding author: june.simpson@cinvestav.mx

Received: March 23, 2021.

Accepted: April 13, 2022.

Simpson J, Avila de Dios E, Gómez VAD, Pérez-López AV, Castro MA, Meléndez BY, Hernández SL, Gálvez SL, López RME, Medina CR and Gil-Vega KDC. 2022. Omics applications in plant-microorganism interactions: A view from plant genomics. *Mexican Journal of Phytopathology* 40(2): 263-269.

DOI: <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2202-7>

Primera publicación DOI: 28 de Abril, 2022.

First DOI publication: April 28, 2022.

Abstract. The advent of next generation sequencing has opened up the possibility to carry out detailed molecular genetic analysis on non-model species. Here we present strategies to carry out RNAseq analysis in *Agave tequilana* which for the first time have permitted the identification and characterization of genes involved in fructan metabolism and flowering time in *Agave* species. Based on *in silico* data, expression patterns for individual genes could be determined and

Resumen. El desarrollo de la secuenciación de nueva generación ha abierto la posibilidad de llevar a cabo análisis genéticos moleculares detallados en especies no-modelo. Aquí se presentan estrategias para llevar a cabo análisis de RNAseq en *Agave tequilana* que por primera vez han permitido la identificación y caracterización de genes involucrados en el metabolismo de fructanos y el tiempo de floración en especies de *Agave*. Basándose en datos *in silico*, los patrones de expresión de genes individuales fueron determinados y luego confirmados mediante qRT-PCR. Además, los cDNA's correspondientes a genes de interés fueron clonados y caracterizados funcionalmente en sistemas heterólogos como *Pichia pastoris* y *Arabidopsis thaliana*. También se presentan datos obtenidos por análisis de RNAseq del patosistema *C. lindemuthianum*-*P. vulgaris*. Usando cepas de *C. lindemuthianum* que expresan la proteína fluorescente verde, es sencillo dar seguimiento al proceso de infección y se llevó a cabo RNAseq en diferentes etapas del proceso inicial de infección por *C. lindemuthianum* en *P.*

later confirmed by qRT-PCR and cDNA's of genes of interest were cloned and functionally characterized in heterologous systems such as *Pichia pastoris* and *Arabidopsis thaliana*. We also present data obtained by RNAseq analysis of the *C. lindemuthianum*-*P. vulgaris* pathosystem. Using strains of *C. lindemuthianum* expressing the green fluorescent protein, the infection process can easily be followed. RNAseq was carried out at different time points during the initial stages of infection by *C. lindemuthianum* on *P. vulgaris* cultivar BAT93 using virulent or non-virulent races of *C. lindemuthianum* (Race 1088 and Race 256 respectively). Differentially expressed genes specific to compatible and non-compatible reactions could therefore be identified.

Key words: *Agave*, RNA-seq, cDNA cloning, *C. lindemuthianum/P.vulgaris*, infection process, virulence/avirulence

The development of affordable “new generation” sequencing methods and the bioinformatic capacity to analyze the large amounts of data obtained, have unleashed the potential to carry out detailed genetic analysis in non-model organisms which were previously inaccessible. Our model of study is *Agave tequilana*, however the strategy we used can be applied to most organisms including plant, fungal, bacterial or insect species. Although *A. tequilana* is an important crop in Mexico predicted to generate around 6 billion dollars in profit annually by 2024 from tequila production, the perennial, monocarpic life cycle of this species, the practice of removing immature inflorescences in the field and the strict control by the Tequila Regulatory Council over the germplasm grown have led to a situation where a single cultivar (*A. tequilana* Weber var. azul) is reproduced asexually and grown over 95,000 hectares in the 5 Mexican

vulgaris cultivar BAT93 usando razas virulentas o no virulentas de *C. lindemuthianum* (Raza 1088 y Raza 256 respectivamente). Por lo tanto, pudieron identificarse genes expresados diferencialmente y específicos para reacciones compatibles y no compatibles.

Palabras clave: *Agave*, ARN-seq, clonación cADN, *C. lindemuthianum/P.vulgaris*, proceso de infección, virulencia/avirulencia

El desarrollo de métodos accesibles de secuenciación de “nueva generación” y la capacidad bioinformática para analizar la gran cantidad de datos obtenidos han desencadenado el potencial para realizar análisis genéticos detallados en organismos no modelo que antes eran inaccesibles. Nuestro modelo de estudio es *Agave tequilana*. Sin embargo, la estrategia que utilizamos se puede aplicar a la mayoría de los organismos, incluyendo especies de plantas, hongos, bacterias o insectos. *Agave tequilana* es un cultivo importante en México que se prevé que genere alrededor de 6 billones de dólares en ganancias anuales para 2024 de la producción de tequila. Sin embargo, el ciclo de vida perenne y monocárpico de esta especie, junto con la práctica de eliminar las inflorescencias inmaduras en el campo y el estricto control ejercido por El Consejo Regulador del Tequila sobre el germoplasma cultivado, ha llevado a una situación en la que un solo cultivar (*A. tequilana* Weber var. azul) se reproduce asexualmente y se cultiva en 95,000 hectáreas en los cinco estados mexicanos autorizados para la producción de tequila con el certificado de “Denominación de Origen”. Se han implementado muy pocos programas de mejoramiento en especies de agave y no se han desarrollado cultivares mejorados ya sea en términos de rendimiento, producción de azúcar, control de floración o resistencia a plagas y patógenos. La resistencia a enfermedades y

states authorized under “Denomination of Origin” for tequila production. Very few breeding programs have been implemented in agave species and no improved cultivars have been developed either for yield in terms of sugar production, control of flowering or resistance to pests and pathogens. Disease and pest resistance are of particular importance given the practice of exploiting a single genotype over thousands of hectares making agave plantations extremely vulnerable to attack. Our initial omics analyses have focused on unraveling the genetics of sugar (fructan) metabolism and control of flowering in *A. tequilana*.

Strategy

For many crop plants such as corn, beans, tomato (Hirsch and Buell, 2013) among others, the determination of a whole genome sequence in order to carry out genetic analysis has been feasible, however, *A. tequilana* has a genome content of almost twice the size (4000Mb) (Palomino *et al.*, 2007) of corn and development and construction of a whole genome sequence is still technically challenging. Therefore, our initial strategy was to develop methods for transcriptome (RNAseq) analysis in agave species. Transcriptome analysis offers the advantages that less data needs to be generated and processed lowering costs. Additionally, data can be related to tissue types or developmental stages providing information on expression levels of specific genes under specific conditions. We have generated transcriptome data for *A. tequilana*, *A. deserti*, *A. striata* and *A. victoria-reginae* (Ávila de Dios *et al.*, 2015) and using this information have identified, cloned and characterized the cDNAs (coding sequences) responsible for the regulation of fructan metabolism and some members of a family of genes involved in the regulation of flowering time in *A. tequilana*.

plagas es de particular importancia dada la práctica de explotar un solo genotipo en miles de hectáreas, lo que hace que las plantaciones de agave sean extremadamente vulnerables a los ataques de patógenos. Nuestros análisis ómicos iniciales se centraron en estudiar a profundidad la genética del metabolismo del azúcar (fructano) y el control de la floración en *A. tequilana*.

Estrategia

En muchas plantas de cultivo como maíz, frijol, jitomate (Hirsch y Buell, 2013), entre otros, ha sido posible la determinación de la secuencia genómica completa para realizar análisis genéticos. Sin embargo, *A. tequilana* tiene un contenido genómico de casi dos veces el tamaño (4000Mb) (Palomino *et al.*, 2007) que el del maíz y el desarrollo y la construcción de su secuencia genómica completa sigue siendo un desafío técnico. Por lo tanto, nuestra estrategia inicial fue desarrollar métodos para el análisis del transcriptoma (RNAseq) en especies de agave. El análisis del transcriptoma ofrece la ventaja de que la necesidad de generar y procesar menos datos, reduce los costos. Además, los datos se pueden asociar con tipos de tejidos o etapas de desarrollo, proporcionando información sobre los niveles de expresión de genes específicos bajo ciertas condiciones específicas. Nosotros hemos generado datos transcriptómicos para *A. tequilana*, *A. deserti*, *A. striata* y *A. victoria-reginae* (Ávila de Dios *et al.*, 2015). Con esta información hemos identificado, clonado y caracterizado los ADNc (secuencias codificantes) responsables de la regulación del metabolismo de los fructanos y algunos miembros de una familia de genes involucrados en la regulación del tiempo de floración en *A. tequilana*.

Se identificaron un total de 15 genes implicados en el metabolismo de fructanos/sacarosa y se clasificaron como enzimas codificantes para la síntesis de

A total of 15 genes involved in fructan/sucrose metabolism were identified and classified as encoding fructan synthesizing enzymes, fructan degrading enzymes or invertases. Genetic transformation of agave species is still laborious and inefficient and therefore we are using heterologous systems such as *P. pastoris* and *A. thaliana* in order to functionally characterize the identified genes/enzymes. *In silico* expression patterns based on transcriptome data indicate which genes are expressed in specific tissues or during specific developmental stages indicating their relative importance in different processes or metabolism. Based on these data we have determined and compared expression patterns for each of the fructan metabolism genes and most of these *in silico* expression patterns have now been confirmed by qRT-PCR (Ávila de Dios *et al.*, 2019, Pérez-López *et al.*, 2021).

By employing a similar strategy, genes from several families known to be involved in the regulation of flowering time in the model system *A. thaliana* (FT, gibberellin metabolism, MYB factors) were also identified in *A. tequilana* and based on *in silico* expression patterns a working model for regulation of flowering in *A. tequilana* was proposed (Ávila de Dios *et al.*, 2019). Currently we are functionally characterizing in detail the *A. tequilana* FT family.

An example of preliminary omics analysis in *Colletotrichum lindemuthianum*

The *C. lindemuthianum* - common bean pathosystem involves a gene-for-gene interaction between resistance (R) genes in the common bean host cultivars and avirulence (avr) genes in the fungal pathogen. Previous work in our group identified many distinct *C. lindemuthianum* races based on the differential series of common bean cultivars (González *et al.*, 1998, Mendoza *et al.*,

fructanos, enzimas de degradación de fructanos o invertasas. La transformación genética de las especies de agave es todavía muy laboriosa e ineficiente, por lo tanto, se han utilizado sistemas heterólogos como *Pichia pastoris* y *Arabidopsis thaliana* para caracterizar funcionalmente los genes/enzimas identificados. Los patrones de expresión *in silico* basados en datos transcriptómicos indican cuales genes se expresan en tejidos específicos o durante etapas de desarrollo específicas, indicando su importancia relativa en diferentes procesos o en el metabolismo. Basados en estos datos, hemos determinado y comparado los patrones de expresión de cada uno de los genes del metabolismo de los fructanos. La mayoría de estos patrones de expresión *in silico* han sido confirmados por qRT-PCR (Ávila de Dios *et al.*, 2019, Pérez-López *et al.*, 2021).

Empleando una estrategia similar, con base en patrones de expresión *in silico*, se identificaron también en *A. tequilana* genes de varias familias que se sabe que están involucradas en la regulación del tiempo de floración en el sistema modelo *A. thaliana* (FT, metabolismo de giberelinas, factores MYB). Se propuso un modelo de trabajo para la regulación de la floración en *A. tequilana* (Ávila de Dios *et al.*, 2019). Actualmente se está caracterizando funcionalmente a detalle la familia *A. tequilana* FT.

Un ejemplo de análisis ómico preliminar en *Colletotrichum lindemuthianum*

El patosistema *C. lindemuthianum* - frijol común implica una interacción gen por gen entre los genes de resistencia (R) en los cultivares hospedantes de frijol común y los genes de avirulencia (avr) en el patógeno fúngico. En trabajos previos de nuestro grupo identificamos muchas razas distintas de *C. lindemuthianum* basados en las series diferenciales de cultivares de frijol común (González *et al.*, 1998; Mendoza *et al.*, 2001; Rodríguez-Guerra *et*

2001, Rodríguez-Guerra *et al.*, 2003, González-Chavira *et al.*, 2004). We initiated a transcriptome strategy to compare the differential gene expression patterns at the early stages of infection on the common bean cultivar BAT93 inoculated with either a virulent or a non-virulent race (Race 1088 and Race 256 respectively) of *C. lindemuthianum* (Figure 1 and Table 1). Details of the experimental

et al., 2003; González-Chavira *et al.*, 2004). Nosotros iniciamos una estrategia de análisis transcriptómico para comparar los patrones diferenciales de expresión génica en las primeras etapas de la infección en el cultivar de frijol común BAT93 inoculado con una raza virulenta o no virulenta (Raza 1088 y Raza 256 respectivamente) de *C. lindemuthianum* (Figura 1 y Cuadro 1). Los detalles de la estrategia

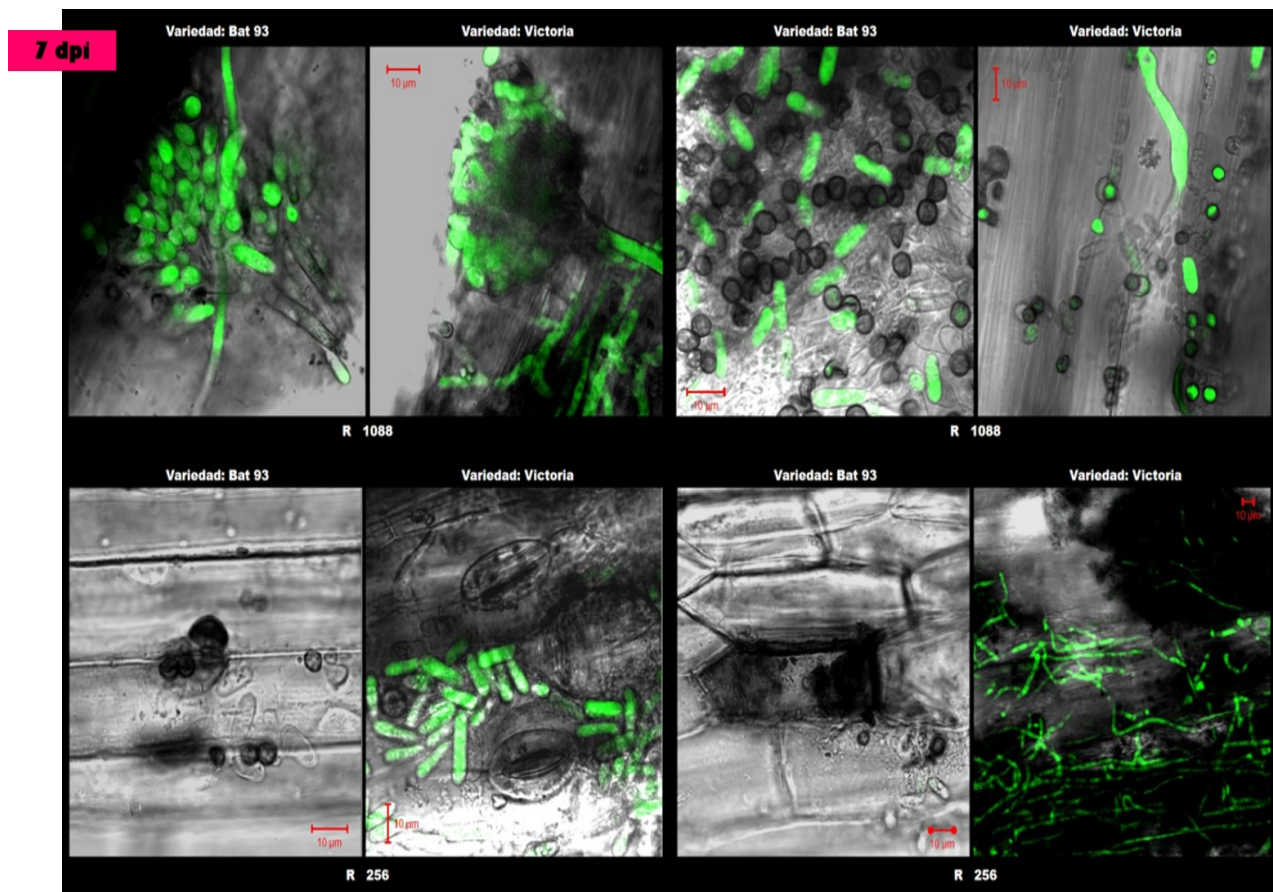


Figure 1. Microscopic analysis 7 days after inoculation of common bean seedlings with *Colletotrichum lindemuthianum*. In the upper left quadrant, the formation of reproductive structures (acervuli) by the pathogen is observed in the compatible interactions for both cultivars with strain 1088. On the right side for the same strain a large number of conidia and appresoria are shown. In the interactions with strain 256, a large number of hyphae are observed for the cultivar Victoria as well as the presence of young conidia on the necrotic tissue of the plant, whereas for the cultivar BAT 93, hypersensitive reactions caused by the defense response are observed with the localized death of cells in contact with the pathogen.

Figura 1. Análisis microscópico 7 días después de la inoculación de plántulas de frijol común con *Colletotrichum lindemuthianum*. En el cuadrante superior izquierdo se observa la formación de estructuras reproductivas (acérvulos) por parte del patógeno en las interacciones compatibles para ambos cultivares con la cepa 1088. Del lado derecho se muestra una gran cantidad de conidios y apresorios en la misma cepa. En las interacciones con la cepa 256 se observa gran cantidad de hifas del cultivar Victoria así como la presencia de conidios jóvenes sobre el tejido necrótico de la planta, mientras que, en el cultivar BAT 93 se observan reacciones de hipersensibilidad provocadas por la respuesta de defensa, incluyendo muerte localizada de células en contacto con el patógeno.

strategy are shown in Table 2. RNAseq was carried out on samples from each time point (samples from 4-96 hours were pooled) (Table 3) and the data was analyzed and compared in order to eventually identify genes expressed differentially during compatible and incompatible interactions (Medina-Chavez and Simpson unpublished).

Genomic and transcriptomic analyses are currently essential and cost-effective tools for

Table 1. Reactions of BAT93 and Victoria to inoculation of *C. lindemuthianum* Races 256 and 1088.
Cuadro 1. Reacciones de BAT93 y Victoria a la inoculación de *C. lindemuthianum* Razas 256 y 1088.

Cultivar	Race	Reaction	Infection level
BAT93	1088	Compatible	4
Victoria		Compatible	4
BAT93	256	Incompatible	0
Victoria		Compatible	4

Table 2. Summary of samples taken for RNAseq analysis.
Cuadro 2. Resumen de las muestras tomadas para el análisis de RNAseq.

Compatibility	Sample time 15 min	Compatibility	Sample time 15 min	Compatibility	Sample time 15 min
Incompatible	30 min	Compatible	30 min	Un-inoculated	30 min
	1 h		1 h		1 h
	2 h		2 h		2 h
	4 h		4 h		4 h
	8 h		8 h		8 h
	24 h		24 h		24 h
	48 h		48 h		48 h
	72 h		72 h		72 h
	96 h		96 h		96 h

genetic analysis and can easily be applied to plants and/or their pathogens. The *P. vulgaris*-*C. lindemuthianum* pathosystem is particularly amenable given the well -documented series of differential cultivars and corresponding *C. lindemuthianum* races. The recent release and ongoing analysis of several *P. vulgaris* genomes (Rendón-Anaya *et al.*, 2017) will greatly facilitate this research.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported in part by grants from the Basic Science program from CONACyT (Grant CB-2005-01 #49281 & CB-2013-01 # 220339) and by a Grant # 131 SEP

Table 3. Summary of RNAseq results.
Cuadro 3. Resumen de los resultados de RNAseq.

Compatibility	No. of reads	Total No. of Gb
Incompatible	33192887	230,040,125
	17997712	
	23569435	
	31022980	
	68634904	
30262460		
32000000		
Compatible	28907063	
	33087678	
	34510194	
	40019130	
Un-inoculated	32603263	195,579,782
	28756807	
	43056852	
	15635587	

CINVESTAV and all the students involved had a CONACyT Postgraduate Scholarship.

LITERATURE CITED

- Ávila de Dios E, Gomez VAD, Damián SML and Simpson J. 2015. New insights into plant glycoside hydrolase family 32 in Agave species. *Frontier Plant Science* 6:594. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00594>.
- Ávila de Dios, E Delaye AL and Simpson J. 2019. Transcriptome analysis of bolting in *A. tequilana* reveals roles for florigen, MADS, fructans and gibberellins. *BioMed Central Genomics* 20:473 <https://doi.org/10.1186/s12864-019-5808-9>
- Hirsch CN and Buell CR. 2013. Tapping the promise of genomics in species with complex, nonmodel genomes. *Annual Review Plant Biology* 64:89-110. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050312-120237>
- González M, Rodríguez R, Zavala ME, Jacobo JJ, Hernández F, Acosta J, Martínez O and Simpson J. 1998. Characterization of Mexican isolates of *C. lindemuthianum* using differential cultivars and molecular markers. *Phytopathology* 88: 292-299. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.1998.88.4.292>
- González-Chavira M, Rodríguez GR, Hernández-Godínez F, Acosta-Gallegos JA, Martínez de la Vega O and Simpson J. 2004. Analysis of Pathotypes of *Colletotrichum lindemuthianum* Found in the Central Region of México and Resistance in Elite Germplasm of *Phaseolus vulgaris*. *Plant Disease* 88; 152-156. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2004.88.2.152>
- Mendoza A, Hernández F, Hernández S, Ruiz D, Martínez de la Vega O, De la Mora G, Acosta J and Simpson J. 2001. Identification of Co-1 Anthracnose Resistance and Linked Molecular Markers in Common Bean Line A193. *Plant Disease* 85: 252-255. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2001.85.3.252>
- Palomino G, Martínez J and Méndez I. 2007. Variación inter e intraespecífica en especies de *Agave* por citometría de flujo y análisis de sus cromosomas. Pp:41-65. In: Colunga-GarcíaMarín P, Larqué SA, Eguiarte L y Zizumbo-Villarreal D (eds.). *En lo Ancestral hay Futuro: Del Tequila, los Mezcales y otros Agaves*. CONACyT, CONABIO, INE, ISBN: 978-968-6532-18-0 CICY, Mexico. 402p. <https://twitter.com/conabio/status/1441461910898098177>
- Pérez-López AV, Simpson J, Clench MR, Gomez-Vargas AD and Ordaz-Ortiz JJ. 2021. Localization and Composition of Fructans in Stem and Rhizome of *Agave tequilana* Weber var. azul. *Frontier Plant Science* 11:608850 <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.608850>
- Rendón-Anaya M, Montero-Vargas JM, Saburido-Álvarez S, Vlasova A, Capella-Gutierrez S, Ordaz-Ortiz JJ, Aguilar OM, Vianello-Brondani RP, Santalla M, Delaye L, Gabaldon T, Gepts P, Winkler R, Guigó R, Delgado experimental se muestran en el Cuadro 2. RNAseq se llevó a cabo en muestras de cada punto temporal (se agruparon muestras de 4 a 96 horas) (Cuadro 3) y los datos se analizaron y compararon para eventualmente identificar genes expresados diferencialmente durante interacciones compatibles e incompatibles (Medina-Chávez y Simpson sin publicar).
- En conclusión, los análisis genómicos y transcriptómicos son actualmente herramientas esenciales y rentables para el análisis genético y pueden ser fácilmente aplicables a las plantas y/o sus patógenos. El patosistema *P. vulgaris*-*C. lindemuthianum* es particularmente susceptible a este tipo de análisis dada la bien documentada serie de cultivares diferenciales y sus correspondientes razas de *C. lindemuthianum*. Los estudios recientes y el análisis en curso de varios genomas de *P. vulgaris* (Rendón-Anaya *et al.*, 2017) facilitarán enormemente esta investigación.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se llevó a cabo apoyado por los FONDOS CIENCIA BÁSICA, CB-2005-01 #49281 y CB-2013-01 # 220339, y por el Fondo SEP CINVESTAV # 131 y todos los alumnos involucrados tuvieron beca de Posgrado de CONACyT.

~~~~~ Fin de la versión en Español ~~~~~

- Salinas A and Herrera-Estrella A. 2017. Genomic history of the origin and domestication of common bean unveils its closest sister species. *Genome Biology* 18: 60. <https://doi.org/10.1186/s13059-017-1190-6>
- Rodríguez-Guerra R, Ramírez-Rueda MT, Martínez de la Vega O and Simpson J. 2003. Variation in genotype, pathotype and anastomosis groups of *Colletotrichum lindemuthianum* isolates from México. *Plant Pathology* 52:228-235. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3059.2003.00808.x>