



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

ANÁLISIS DEL PAPEL DE LA EXPANSINA ExI1 EN LA INFECCIÓN DE BACTERIAS DEL GÉNERO *Pectobacterium*, Y SU PARTICIPACIÓN EN LA INDUCCIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE EN PLANTAS.

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctor en Ciencias

PRESENTA:

DELIA ANGÉLICA NARVÁEZ BARRAGÁN

TUTOR PRINCIPAL:

DRA. CLAUDIA MARTÍNEZ ANAYA

Instituto de Biotecnología, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

DRA. ALEJANDRA ALICIA COVARRUBIAS ROBLES

Instituto de Biotecnología, UNAM

DR. MIGUEL ÁNGEL CEVALLOS GAOS

Centro de Ciencias Genómicas, UNAM

CUERNAVACA, MORELOS. DICIEMBRE 2020



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

'Gentlemen, it is the microbes who will have the last word.'

-Louis Pasteur.

AGRADECIMIENTOS

A mi familia: Mis padres, Oscar Narváez y Delia Barragán, por su apoyo, comprensión y amor incondicional e infinito, sin ustedes nada de esto hubiera sido posible, mis logros son suyos también. A mis hermanos Nadia, Carlos y Oscar por aligerar la carga del doctorado con su amor y ocurrencias. A Omar Tovar y Gatilla por ser mis compañeros en este viaje.

A mi tutora, la Dra. Claudia Martínez Anaya, por sus conocimientos, apoyo y dedicación, los cuales han sido fundamentales para mi formación y para la realización del presente trabajo.

A Mario Serrano y Martha Torres, por su amistad, su apoyo, motivación y por presentarme el maravilloso mundo de las interacciones planta-patógeno.

Al Dr. Lorenzo Segovia por su motivación y sus palmaditas en la espalda.

Al Dr. Ian Toth y la Dra. Sonia Humphries por recibirme de estancia, el apoyo brindado para la realización de este trabajo y la calidez con la que me trataron.

A mi comité tutorial: la Dra. Alejandra Covarrubias y el Dr. Miguel Ángel Cevallos (Aka Mac), por sus valiosas aportaciones, conocimientos y apoyo a lo largo de todo mi doctorado. Hicieron posible lo que creí imposible, que ansiara que llegaran los tutorales para discutir mis resultados.

A los integrantes de mi jurado evaluador: Dr. Christian Sohlenkamp, Dra. Georgina Hernández Delgado, Dr. Ayixon Sánchez Reyes, Dra. Helena Porta Ducoing y Dr. Miguel Lara Flores. Por sus conocimientos, correcciones y comentarios constructivos realizados para la finalización de esta tesis.

A los integrantes del laboratorio LS y la M. en C. Blanca Ramos por hacer el mejor ambiente de trabajo y hacer el doctorado más ligero.

A los integrantes del laboratorio MS por hacerme sentir parte de su laboratorio.

A mis amigos: Fernanda Rivera, Alyeri Bucio, Iris Bravo, Inci Bello, Rogelio Reyes, Arianna Arteaga, Raziél Valiño, Damien Formey, Sol Rodriguez, Guille Fernandez y Mayra López por ser parte de esta etapa de mi vida y hacerla aún mejor. Han hecho fácil lo difícil.

Así como a las instancias que me brindaron el financiamiento para la realización de este doctorado: DGAPA-PAPIIT (IN211116 and IN211019), CONACYT Ciencia Básica (252551), y Royal Society (Newton Mobility Grant NMGR2\170095).

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
CAPÍTULO I. GENERALIDADES	3
I. INTRODUCCIÓN	3
I.1 Expansinas bacterianas en la interacción planta-microorganismo	5
CAPÍTULO I.2	8
I.2 ANTECEDENTES GENERALES	8
CAPÍTULO II	10
II.JUSTIFICACIÓN	10
II.1 HIPÓTESIS	10
II.2 OBJETIVOS	10
II.2.1 GENERAL	10
II.2.2 PARTICULAR	10
CAPÍTULO III	11
III. MATERIALES Y MÉTODOS	11
III.1 Cepas y medios	11
III.2 Western Blot contra Exl1	11
III.3 Sobreexpresión de <i>PbExl1</i>	12
III.4 Mutante nula de expansina $\Delta exl1$	13
III.5 Ensayos de infección en vegetales	13
III.6 Microscopía confocal en plantas de papa	14
III.7 Cuentas en placa de bacterias inoculadas en tejidos de papa y cinéticas de crecimiento	15
III.8 Pruebas de sensibilidad a estrés oxidativo e hiperosmótico	15
III.9 Ensayo de unión a las raíces	16
III.10 Determinación de la actividad enzimática <i>in vitro</i>	16
III.12 Análisis de la expresión de genes que participan en la respuesta inmune de <i>A. thaliana</i>	18
III.13 Cuantificación de especies reactivas de oxígeno (ROS) intracelulares	19
III.14 Ensayos de movilidad de ‘swarming’ y nado	19
III.15 Cuantificación de la producción de exopolisacáridos y biofilm	20
CAPÍTULO IV	21
IV. LA EXPANSINA EXL1 DE <i>Pectobacterium</i> PARTICIPA EN LA PENETRACIÓN DE LAS BACTERIAS AL TEJIDO DEL HOSPEDERO	21
IV.1 ANTECEDENTES DIRECTOS CAPÍTULO IV	21
IV.2 RESULTADOS CAPÍTULO IV	24

IV.2.1 Exl1 se produce en la infección y su expresión está regulada por QS.....	24
IV.2.2 Contribución de Exl1 a la virulencia de <i>Pectobacterium</i>	26
IV.2.3 Mutante nula $\Delta exl1$ en <i>P. atrosepticum</i>	27
IV.2.4 La mutante nula $\Delta exl1$ de <i>P. atrosepticum</i> disminuye los síntomas de enfermedad, y este fenotipo es reestablecido por <i>PbExl1</i> pero no por <i>BsEXLX1</i>	29
IV.2.5 La mutante nula $\Delta exl1$ de <i>P. atrosepticum</i> está afectada en su capacidad de colonizar plantas de papa.....	31
IV.3. DISCUSIÓN CAPÍTULO IV.....	39
IV.4. CONCLUSIÓN CAPÍTULO IV.....	40
IV.5. PERSPECTIVAS CAPÍTULO IV.....	41
CAPÍTULO V.....	42
V. LA EXPANSINA <i>Exl1</i> DE <i>Pectobacterium</i> ES UNA PROTEÍNA EFECTORA QUE INDUCE RESPUESTAS DE DEFENSA EN <i>A. thaliana</i>.....	42
V.1 ANTECEDENTES DIRECTOS CAPÍTULO V.....	42
V.1. Expansinas en la respuesta inmune en plantas.....	42
V.2.2. La expansina <i>PbExl1</i> induce una respuesta inmune en la planta, en la que participan especies reactivas de oxígeno (ROS) y las vías de etileno (ET), ácido jasmónico (JA) y ácido salicílico (SA).....	47
V.3 DISCUSIÓN CAPÍTULO V.....	51
V.4 CONCLUSIÓN CAPÍTULO V.....	52
V.5 PERSPECTIVAS CAPÍTULO V.....	53
CAPÍTULO VI.....	55
VI. LA EXPANSINA <i>EXL1</i> de <i>P. atrosepticum</i> ESTÁ INVOLUCRADA EN LA MOVILIDAD BACTERIANA POR SWARMING.....	55
VI.1 ANTECEDENTES DIRECTOS CAPÍTULO VI.....	55
VI.2 RESULTADOS CAPÍTULO VI.....	56
VI.3 DISCUSIÓN CAPÍTULO VI.....	60
VI.4 CONCLUSIÓN CAPÍTULO VI.....	61
VI.5 PERSPECTIVAS CAPÍTULO VI.....	61
CAPÍTULO VIII. BIBLIOGRAFÍA.....	63
CAPÍTULO IX. APÉNDICES.....	73
IX.1 Expansin-like <i>Exl1</i> from <i>Pectobacterium</i> is a virulence factor required for host infection, and induces a defence plant response involving ROS, and jasmonate, ethylene and salicylic acid signalling pathways in <i>Arabidopsis thaliana</i>.....	73

IX.2 Movilidad y producción de exopolisacáridos (EPS) por las cepas de *P. brasiliense* BF20 y BF45, y su relación con el segundo mensajero c-diGMP.73

IX.2.1 Analysis of two Mexican *Pectobacterium brasiliense* strains reveals an inverted relationship between c-di-GMP levels with exopolysaccharide production and swarming motility.73

IX.3 Expansin-related proteins: biology, microbe-plant interactions and associated plant defense responses.73

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Esquema del modelo propuesto para la función de EXPB1 en paredes celulares de maíz	4
Figura 2.	<i>PbExl1</i> se localiza en el xilema de apio	22
Figura 3.	Solubilización de polisacáridos por <i>PbExl1</i> en tejido vascular	23
Figura 4.	La expansina de <i>P. atrosepticum</i> se expresa durante el proceso de infección y es parcialmente regulado por QS.....	23
Figura 5.	La expansina de <i>P. brasiliense</i> se produce a nivel de proteína y es regulado por QS	25
Figura 6.	La expresión de la expansina se correlaciona con los niveles de infección	27
Figura 7.	Mutante nula de expansina.....	28
Figura 8.	La mutante nula de expansina $\Delta exl1$ disminuye los síntomas de infección.....	30
Figura 9.	La mutante nula de expansina provoca una menor maceración de tejido.....	31
Figura 10.	Puntos de inoculación y zonas utilizadas para los cortes de plantas de papa	32
Figura 11.	Existe un menor número de bacterias de la cepa $\Delta exl1$ durante la infección de plantas de papa	33
Figura 12.	El número de bacterias silvestre es mayor que el número de bacterias de la mutante $\Delta exl1$ durante la infección de plantas de papa	34
Figura 13.	Las cepas de <i>P. atrosepticum</i> silvestre y mutante presentan una sensibilidad comparable al estrés oxidativo e hiperosmótico.....	35
Figura 14.	Crecimiento de las cepas silvestre y $\Delta exl1$ <i>in vitro</i> e <i>in planta</i>	37
Figura 15.	La actividad de las principales PCWDEs es comparable en la cepa silvestre y la mutante.....	38
Figura 16.	La adhesión a las raíces de papa es similar en las cepas silvestre y <i>Pa$\Delta exl1$</i>	38

Figura 17.	Representación del papel propuesto para la expansina Exl1 durante el proceso de infección	41
Figura 18.	<i>PbExl1</i> provee protección contra patógenos en apio y <i>A. thaliana</i>	46
Figura 19.	<i>PbExl1</i> induce la producción de ROS	48
Figura 20.	<i>PbExl1</i> induce la respuesta inmune en hojas de <i>A. thaliana</i>	50
Figura 21.	Las vías de JA y SA son necesarias para la inducción de la respuesta inmune por <i>PbExl1</i>	50
Figura 22.	Modelo propuesto para la función de la expansina Exl1 en la pared celular y la inducción de la respuesta inmune en <i>A. thaliana</i>	53
Figura 23.	La capacidad de nado es similar en las cepas silvestre y $\Delta exl1$ de <i>P. atrosepticum</i>	56
Figura 24.	La mutante $\Delta exl1$ presenta un retraso en la movilidad por swarming...	57
Figura 25.	La mutante $\Delta exl1$ presenta un retraso en la formación de los tendrils.	58
Figura 26.	La producción <i>in vitro</i> de exopolisacáridos y la formación de biofilm es similar en las cepas silvestre y $\Delta exl1$	59
Figura 27.	La matriz de EPS podría estar afectada en la mutante $\Delta exl1$ durante el proceso de swarming	60

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Lista de las diez bacterias más patógenas de plantas.....	6
-----------------	---	---

LISTA DE ABREVIATURAS

- CAZY: Carbohydrate-active enzymes database.
- CBM63: Familia 63 de módulos de unión a carbohidratos.
- CPs: Ceratoplataninas.
- CVP: Placas suplementadas con cristal violeta y pectina.
- DAMPs: Patrones moleculares asociados a daño.
- DCFH-DA: 2'7'-dicloro-dihidro-fluoresceína diacetato.
- DPBB: barril β doble- ψ .
- EPS: Exopolisacárido.
- ET: Etileno.
- ETI: Inmunidad activada por efectores.
- EXPA: α -expansinas.
- EXPB: β -expansinas.
- GAX: Glucoarabinoxilanos.
- GFP: Proteína verde fluorescente.
- HR: Respuesta hipersensible.
- hsGAX: Glucoarabinoxilanos de alto grado de sustitución.
- ISR: Resistencia sistémica.
- JA: Ácido jasmónico.
- LEM: Medio mínimo suplementado con pectina.
- LPS: Lipopolisacáridos.
- lsGAX: Glucoarabinoxilanos de bajo grado de sustitución.
- MLG: Glucanos de enlace mixto.
- OGs: Oligogalacturonidos.
- OHHL: Autoinductor *N*-(3-oxohexanoyl)-L-homoserina lactona.
- PAMPs: Patrones moleculares asociados a patrones.
- PCWDEs: Enzimas degradadoras de la pared celular de las plantas.
- PRRs: Receptores de reconocimiento de patrones.
- PTI: Inmunidad activada por patrones.

QS: Quorum sensing.

RFP: Proteína roja fluorescente.

ROS: Especies reactivas de oxígeno.

SA: Ácido salicílico.

SAR: Resistencia sistémica adquirida.

UF: Unidades de fluorescencia en pixeles/cm²

UFC: Unidades formadoras de colonias.

XyG: Xiloglicano.

RESUMEN

Las expansinas son proteínas no hidrolíticas que aflojan la pared celular de las plantas, lo que es importante durante diversos procesos de su desarrollo. En organismos distintos de las plantas, su papel biológico no ha sido caracterizado por completo, pero existe evidencia de que las expansinas participan durante la interacción planta-microorganismo. Estas proteínas están codificadas en el genoma de algunas bacterias fitopatógenas y actúan como factores de virulencia. *Pectobacterium* es un género diverso de fitopatógenos que causan pudrimiento blando en las plantas que infectan. En este trabajo, analizamos la expresión de la expansina Exl1 de *Pectobacterium brasiliense* y *Pectobacterium atrosepticum*. La expresión de Exl1 correlaciona con la virulencia del patógeno, y los síntomas de enfermedad se reducen en la cepa mutante $\Delta exl1$ de *P. atrosepticum*. Así mismo, $\Delta exl1$ exhibe menor maceración de tejido y se observa un menor número de bacterias en puntos distantes del sitio de inoculación. No obstante, las bacterias inoculadas directamente en el interior del tejido de la planta presentan una virulencia comparable con la silvestre, sugiriendo que el fenotipo de infección de $\Delta exl1$ se debe a alteraciones en la invasión inicial del tejido. Observamos que Exl1 actúa sobre el tejido de la planta, probablemente remodelando la composición de la pared celular o alterando su integridad. La infiltración de preparaciones puras de la proteína silvestre, pero no dos mutantes de Exl1 inactivas, inducen la respuesta inmune en *Arabidopsis thaliana*. Esta respuesta es consistente con la activación de una respuesta mediada por DAMPs, en la que se producen ROS y se inducen genes de las vías de ácido jasmónico, etileno y ácido salicílico. La respuesta de defensa inducida por Exl1 protege a *A. thaliana* contra el subsecuente reto con *P. brasiliense* y *Botrytis cinerea*, y este efecto de protección también es observado en otra especie de planta (apio).

Además, la movilidad por swarming de colonias crecidas en medio MacConkey se encuentra retrasada en la mutante $\Delta exl1$ en comparación con la silvestre.

ABSTRACT

Expansins are non-hydrolytic proteins with cell wall-loosening activity in plants, which is important during different plant developmental processes. In non-plant organisms, expansins biological role is not fully characterized but they seem to participate during plant-microbe interactions. Expansins are encoded in the genomes of some phytopathogenic bacteria and evidence indicates that they act as virulence factors for host infection. *Pectobacterium* is a diverse genus of phytopathogenic species that cause soft rot either to restricted or multiple plant hosts. Here we analyzed the expression of Exl1 by *Pectobacterium brasiliense* and *Pectobacterium atrosepticum*. Expression of Exl1 correlates with pathogen virulence, where symptoms are reduced in a $\Delta exl1$ mutant strain of *P. atrosepticum*. In addition to $\Delta exl1$ exhibiting less maceration of potato plants, fewer bacteria are observed at distances from the inoculation site. However, mutant bacteria infiltrated into the plant tissue are as virulent as the wild type, suggesting that the initial invasion of the tissue is affected by the mutant. We found that Exl1 acts on the plant tissue, probably by remodeling of a cell wall component or altering the barrier properties of the cell wall, as the infiltration of pure preparations of wild type protein, but not of two inactive expansin mutants, triggers an immune response in *A. thaliana*. This response is consistent with the activation of a DAMP-mediated response, in which ROS are produced, and genes involved in the jasmonate, ethylene and salicylic acid pathways are induced. The Exl1-induced defense response protects *A. thaliana* against a subsequent challenge with *P. brasiliense* or *Botrytis cinerea*, a response that is also observed in one other plant species (celery).

Additionally, swarming of colonies grown on MacConkey soft agar was delayed in the mutant $\Delta exl1$ in comparison to the wild type.

CAPÍTULO I. GENERALIDADES.

I. INTRODUCCIÓN.

Las expansinas son proteínas ampliamente distribuidas en el reino de las plantas donde se encuentran como familias multigénicas (1), a las que se han agrupado en cuatro familias: las α -expansinas (EXPA), las β -expansinas (EXPB), las expansinas tipo- α (EXLA) y las expansinas tipo- β (EXLB) (2).

Estas proteínas están conformadas por dos dominios compactos (D1 y D2). La estructura de D1 presenta un plegamiento de barril β doble- ψ (DPBB) semejante a las glicosil hidrolasas de la familia 45 (GH45), pero carente de algunos residuos requeridos en la catálisis. El D2 presenta plegamiento de β -sándwich clasificado en la familia 63 de módulos de unión a carbohidratos (CBM63) según la base de datos CAZy (Carbohydrate-active enzymes: www.cazy.org), con capacidad de unir celulosa mediante la interacción de tres residuos aromáticos (W125/W126/Y157 en BsEXLX1) con los anillos hidrofóbicos de piranosa de la celulosa (3–6).

Las expansinas EXPA se unen a la pared celular vegetal e inducen el aflojamiento y el desplazamiento de las paredes celulares primarias (2), sin producir hidrólisis u otra modificación enzimática (4,7). Su actividad está relacionada con el crecimiento celular, así como con procesos de su desarrollo asociados con la modificación de la pared celular (como la germinación, la abscisión, el ablandamiento de la fruta, entre otros). Sin embargo, el mecanismo por el cual llevan a cabo su función continúa sin elucidarse por completo (8).

En el caso de las EXPB, presentan una función que parece ser única entre las expansinas de plantas: facilitar la penetración del tubo polínico a través del estilo y el estigma para que se lleve a cabo la fecundación (9). La expansina de maíz EXPB1, induce el aflojamiento de las paredes celulares de la seda de maíz (10). La composición de estas paredes consiste de: celulosa (~20-60%), glucoarabinosilanos de alto (hsGAX) y bajo (lsGAX) grado de sustitución (~20-35%), glucanos (β -D(1-3) y β -D(1-4) glucanos de enlace mixto (MLG, ~5-20%),

xiloglicanos (XyG, ~2-10%) y otros polisacáridos (~5-10%, (10)). En el caso de los GAX, se ha reportado que la mayoría presentan residuos fenólicos, principalmente ácidos ferúlicos, que son detectables por absorción ultravioleta (UV). También se ha determinado que en la pared celular de estos tejidos (estilo y estigma de maíz) los lsGAX se unen a celulosa, mientras que los hsGAX no (11). Estudios previos demostraron que EXPB1 se une principalmente a GAX (y en un menor grado a celulosa (10)). En el 2011 Tabuchi y colaboradores, observaron que al incubar paredes celulares de seda de maíz e incubarlas con *ZmEXPB1*, se obtenía una señal a una absorbancia (A320) correspondiente a polisacáridos sustituidos con residuos de ácidos ferúlicos, y determinaron que la identidad del polisacárido era hsGAX por lo que concluyeron que *ZmEXPB1* solubiliza hsGAX de paredes celulares de estilo y estigma de maíz (9). El modelo propuesto es que *ZmEXPB1* disocia las uniones no covalentes entre hsGAX y lsGAX, resultando en la solubilización de hsGAX (10) (Figura 1).

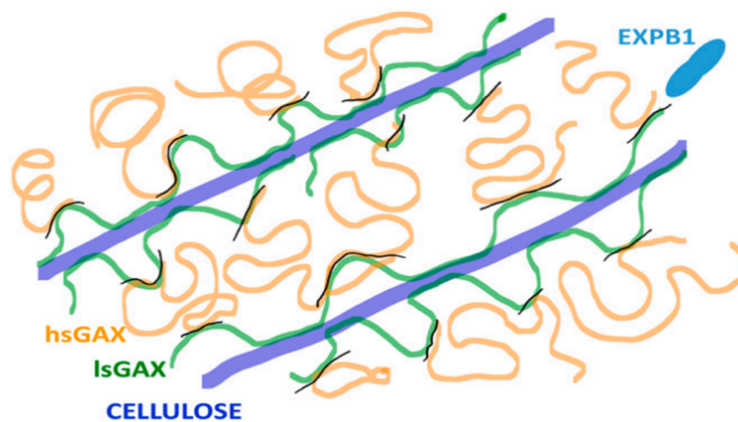


Figura 1. Esquema del modelo propuesto para la función de EXPB1 en paredes celulares de maíz. La expansina *ZmEXPB1* actúa en las paredes celulares de polen de maíz disociando los enlaces no covalentes entre los GAX de alto grado de sustitución (hsGAX) y los GAX de bajo grado de sustitución (lsGAX), solubilizando hsGAX. Figura tomada de (10).

Los genomas de plantas también contienen uno o más genes tipo-expansina: EXLA y EXLB, de los que se desconoce su función (2).

Existe una quinta familia de expansinas: EXLX, en la que se agrupan las expansinas de microbios (12), de los que inicialmente se propuso que fueron adquiridos por

transferencia horizontal a partir de las plantas (13). Sin embargo, estudios recientes sugieren que las expansinas inicialmente evolucionaron en microorganismos marinos antiguos que existieron antes de la aparición de las plantas (14). Con respecto a la función de las expansinas bacterianas, a pesar de que estas conservan los residuos necesarios para la función de aflojamiento de la pared celular (3,6), los niveles de actividad en el aflojamiento reportados para *BsEXLX1* en comparación con las expansinas de plantas, son diez veces menores (6,15). Se ha propuesto que las expansinas bacterianas están involucradas en la interacción planta-microorganismo (6,16). Sin embargo, la función biológica de estas proteínas continua sin elucidarse por completo.

I.1 Expansinas bacterianas en la interacción planta-microorganismo.

Muchas bacterias que interaccionan con las plantas necesitan realizar reordenamientos de la pared celular vegetal con la que interactúan para poder establecerse exitosamente. Esta interacción resulta ventajosa para las bacterias, ya sean patógenas, comensales o saprófitas (17). Trabajos recientes han sugerido que las bacterias utilizan sus propias expansinas para inducir estos reordenamientos en la pared celular de las plantas, con el fin de colonizar o infectar a su hospedero (18). Análisis filogenéticos de homólogos de expansinas canónicas demostraron que 301 especies de bacterias codifican expansinas, las cuales presentan diferentes modos de vida pero tienen en común algún tipo de relación con las plantas: 15% son patógenos de plantas, 13.95% son comensales, 46.2% son bacterias que habitan en los suelos, 11.96% son saprófitas, 7.3% son bacterias marinas, 1.3% de agua dulce, 1.7% de aguas termales, 0.6% de aguas residuales y 1.7% habitan el intestino (14).

Además, la alta frecuencia de aparición de genes de expansina en bacterias patógenas de plantas, sugiere que estas proteínas están involucradas en la interacción con plantas y pueden actuar como factores de virulencia (19). De hecho, de las diez bacterias consideradas como las más patógenas de plantas según la revista 'Molecular Plant Pathology' (20), siete de estas bacterias codifican expansinas (Tabla 1). Sugiriendo una contribución importante de esta proteína durante el proceso de infección (19).

Tabla 1. Lista de las diez bacterias más patógenas de plantas.

Las especies que codifican expansinas están marcadas en naranja. ^b: una o más especies en el mismo genero contienen expansinas. Tabla tomada y modificada de (19).

Rank	Bacteria	Reference
1	<i>Pseudomonas syringae</i> ^b	Hall C. (1902)
2	<i>Ralstonia solanacearum</i>	Yabuuchi <i>et al.</i> (1995) (89)
3	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Conn HJ. (1942)
4	<i>Xanthomonas oryzae</i>	Swings <i>et al.</i> (1990)
5	<i>Xanthomonas campestris</i>	Dowson W. (1939)
6	<i>Xanthomonas axonopodis</i>	Starr MP. <i>et al.</i> (1950)
7	<i>Erwinia amylovora</i> ^b	Winslow C. <i>et al.</i> (1920)
8	<i>Xylella fastidiosa</i>	Wells JM. <i>et al.</i> (1987) (95)
9	<i>Dickeya dadantii</i> , <i>Dickeya solani</i>	Samson R. <i>et al.</i> (2005) (96)
10	<i>Pectobacterium carotovorum</i>	Waldee E. (1945)

Además, se ha observado una relación de la presencia de genes de expansina en el genoma de bacterias fitopatógenas y la colonización del xilema de las plantas, sugiriendo que las expansinas confieren cierta ventaja a las bacterias que colonizan este tejido vascular (como *Xanthomonas*, *Clavibacter* (21), *Streptomyces* (22), *Xylella* y *Pectobacterium*), posiblemente mediante su unión a esta estructura para su posterior modificación durante el proceso de infección (4).

La relevancia de las expansinas bacterianas durante la interacción con sus hospederos, se ha determinado mediante los fenotipos de mutantes nulas de expansina. La eliminación del gen de la expansina *EXLX1* de *Bacillus subtilis* provocó la disminución en un 90% de su capacidad de colonizar raíces de maíz, en comparación con la cepa silvestre, sugiriendo que *BsEXLX1* participa en la interacción entre las bacterias y la superficie de las raíces (6). En el caso de los patógenos que invaden el xilema de las plantas como *R. solanacearum*, la mutante nula ΔR_sEXLX1 mostró una disminución de los síntomas de la infección en tomate, debido a que las células de la mutante se superadhieren a las raíces, evitando la colonización del tejido (16). En el caso del *Clavibacter michiganensis*, algunas cepas presentan dos expansinas. La eliminación de *CmEXLX1* (codificada en un plásmido) disminuye los síntomas de infección en plantas de tomate (23). En contraste, la eliminación de *CmEXLX2* (en ausencia de la expansina

plasmídica) incrementa los síntomas de infección, causando lesiones en peciolo distantes del sitio de inoculación (16). El agente causal de la enfermedad de Pierce en uvas, *X. fastidiosa*, codifica una expansina modular *EngXCA1* que también está involucrada en la virulencia, especialmente en las variedades de uva con un alto contenido de xiloglucanos. La eliminación de *EngXCA1* causa una reducción en los síntomas iniciales de la infección en el cultivar Chardonnay pero no en Cabernet Sauvignon, por lo que los autores sugieren que la reducción en la virulencia observada está relacionada con una mayor cantidad de xiloglucanos fucosilados presentes en el xilema del cultivar Chardonnay. Por lo que el dominio de expansina podría actuar entre los enlaces no covalentes de la celulosa y los xiloglucanos (24). En *Erwinia tracheiphila*, la eliminación del operón que incluye el gen *EtEXLX1* y otro de una glicosil hidrolasa GH5, provoca una disminución de los síntomas de infección en calabaza, debido a una reducción en la habilidad de las bacterias para colonizar sistémicamente el xilema. Resulta de interés, que este fenotipo está relacionado con la movilidad bacteriana, en la que se determinó que no participan los flagelos o el pili tipo IV (25).

Adicionalmente, en el caso del nemátodo patógeno de plantas *Heterodera avenae*, que presenta dos proteínas tipo expansina con los dominios invertidos (el D2 está en el N-terminal y el D1 en el carboxilo), se ha reportado que HaEXPB1 y HaEXPB2 inducen la respuesta inmune en *Nicotiana benthamiana*. La expresión transitoria de estas proteínas en hojas de *N. benthamiana* induce bajos niveles de muerte celular (26), que está relacionada con la activación de la respuesta hipersensible durante la respuesta inmune de las plantas (27). Este fenotipo depende de la actividad de la proteína (26), ya que la expresión transitoria de mutantes que carecen del CBM (D2) o del dominio de expansina (D1, ambos necesarios para la actividad de la proteína) no inducen muerte celular (26). La función de HaEXPB1 y HaEXPB2 está relacionada con el proceso de penetración y migración del nemátodo durante las fases iniciales del parasitismo, posiblemente facilitando la infección mediante la modificación de la pared celular del hospedero por un mecanismo aún desconocido (26).

CAPÍTULO I.2

I.2 ANTECEDENTES GENERALES.

Para entender la función de las expansinas durante el proceso de infección, en nuestro laboratorio usamos como modelo de estudio dos especies del fitopatógeno *Pectobacterium*, que son enterobacterias pectinolíticas que provocan pudrición en los tejidos vasculares de las plantas, incluyendo cultivos de interés comercial. *Pectobacterium* fue catalogada en el décimo lugar del Top 10 de las bacterias patógenas más importantes de plantas, según la revista *Molecular Plant Pathology* (20). *Pectobacterium* se encuentra en suelos y en la superficie de las plantas, y entra a los tejidos mediante aperturas naturales (como estomas o lenticelas) o es inoculado mediante heridas creadas por nemátodos o insectos. Posterior a su entrada, las bacterias se mueven al xilema de las plantas, que es su sitio de colonización, a través de un mecanismo desconocido (28,29). *Pectobacterium* produce una gran variedad de factores de virulencia, entre los mayores determinantes patogénicos se encuentran las enzimas degradadoras de la pared celular de las plantas (PCWDEs, por sus siglas en inglés) cuya expresión es dependiente de la densidad celular. Las PCWDEs incluyen pectato liasas, celulasas, xilanasas y proteasas que son responsables de los síntomas de enfermedad (pudrición blanda) en las plantas (30).

En el laboratorio, contamos con dos cepas de *Pectobacterium*. La primera corresponde a *Pectobacterium atrosepticum* SCRI 1043 (donada por el Dr. Ian Toth del instituto The James Hutton Institute de Reino Unido), que habita regiones templadas y es el agente causal de la enfermedad de la pata negra en papas, especie a la que su virulencia está casi completamente restringida (29).

Así como la cepa ambiental mexicana BF45 (aislada de tabaco, donada por el Dr. Oscar Mascorro Gallardo, de la Universidad Autónoma de Chapingo (31)) y que según nuestros estudios de genómica comparativa corresponde a *P. brasiliense* (32). *P. brasiliense* está ampliamente distribuida geográficamente y causa la enfermedad conocida como pudrición blanda en diversas especies susceptibles, entre las que se incluyen: apio, brócoli, zanahoria, acelga, remolacha, papa y col (28,32).

En los siguientes capítulos, correspondientes a diferentes temas abordados en este trabajo se indicarán los antecedentes directos a cada uno.

CAPÍTULO II.

II.JUSTIFICACIÓN

Varios microorganismos fitopatógenos (bacterias, hongos y oomicetos) de importancia económica codifican expansinas en sus genomas. Los estudios con mutantes nulas de esta proteína en algunas especies exhiben un cambio en el patrón de infección. Esto sugiere que las expansinas podrían tener un papel importante en la interacción planta-microorganismo, por lo que es indispensable conocer su función con vistas a diseñar estrategias de prevención o eliminación de las infecciones.

II.1 HIPÓTESIS

La expansina de *Pectobacterium* es un factor de virulencia que remodela la pared celular de las plantas, permitiendo a las bacterias moverse a través de la pared celular de especies susceptibles durante el proceso de infección.

II.2 OBJETIVOS

II.2.1 GENERAL

Determinar la contribución de la expansina de *Pectobacterium* en la infección de vegetales.

II.2.2 PARTICULAR

- Determinar si Exl1 se produce durante la infección, y si tiene relación con la virulencia de *Pectobacterium*.
- Generar una mutante nula $\Delta exl1$ en *Pectobacterium*, caracterizarla y determinar el fenotipo en la infección.
- Determinar el efecto de infiltrar la proteína pura PbExl1 en *Apium graveolens* y *Arabidopsis thaliana*.
- Determinar el efecto de Exl1 en la movilidad por swarming de *P. atrosepticum*.

CAPÍTULO III.

III. MATERIALES Y MÉTODOS.

III.1 Cepas y medios.

La cepa de *P. brasiliense* BF45 fue donada por el Dr. Oscar Mascorro de la Universidad de Chapingo. La cepa de *P. atrosepticum* SCRI 1043 fue donada por el Dr. Ian Toth de The James Hutton Institute de Escocia, Reino Unido. Estas cepas se crecieron en medio o placas de agar de Luria-Bertani (LB) al 1.5% (peso/volumen) a $28 \pm 2^\circ\text{C}$. En algunos experimentos se empleó el medio mínimo suplementado con pectina (LEM_{AG366}) compuesto de NaOH 1 M, MgSO₄ 1.5 mM, (NH₄)₂SO₄ 7.5 mM, K₂HPO₄ 5.7 mM y pectina AG366 al 0.17% (Agdia, Biofords), o placas del medio selectivo para cepas pectinolíticas: Cristal Violeta con Pectina (CVP) preparadas como se indica en (33), utilizando pectina AG366 (Agdia, Biofords).

III.2 Western Blot contra ExI1.

Para detectar la presencia de ExI1, se utilizó un anticuerpo policlonal que reconoce el epítoto GMNDIPIEFTDVKG que se encuentra en el dominio 2 de la expansina de *P. brasiliense*, y que fue producido por la compañía Genescript. Las muestras se obtuvieron de sobrenadantes de cultivos en medio LB o medio mínimo suplementado con pectina (LEM) o de ensayos de infección. El cultivo se centrifugó y se recuperó el sobrenadante. En algunos casos (indicados en la sección de resultados) se tomaron 500 μl y se incubó con 5 mg de Avicel (Sigma) a 30°C y 1000 rpm por una hora, posteriormente se centrifugó 10 min a 13000 rpm y la pastilla de Avicel se lavó tres veces con Buffer 1X TBS + Tween (Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, Tween al 0.001%, pH 7.5), para evitar las interacciones inespecíficas. La pastilla de Avicel se resuspendió en buffer de carga para proteínas 4X (glicerol 40%, Tris/HCl 240 mM a pH 6.8, SDS al 8%, azul de bromofenol al 0.04% y beta-mercaptoetanol al 5%) y se hirvió por 5 minutos. Las muestras se corrieron en geles de poliacrilamida al 12% y posteriormente se realizó una transferencia semi-seca a una membrana de 'polyvinylidene fluoride' (Immun-Blot PVDF Membrane, BioRad). La membrana se bloqueó por una hora con una solución de 1X TBST y 5% de leche en polvo baja en grasa. Posteriormente se lavó con 1X TBST

y se incubó por una hora con una dilución 1/40,000 del anticuerpo primario contra *PbExl1*, después de esta incubación la membrana volvió a lavarse tres veces con 1X TBST y se incubó durante una hora con una dilución 1/3,000 del anticuerpo secundario de cabra anti-IgG de conejo (H+L, THERMO Fisher Scientific Inc.); la membrana se lavó tres veces con 1X TBST y se reveló con el sustrato cromogénico Novex HRP (TMB, THERMO Fisher Scientific Inc.). Se utilizaron como controles de carga, geles de poliacrilamida al 12% teñidos con tricloroetanol (Sigma-Aldrich).

III.3 Sobreexpresión de *PbExl1*.

Se utilizó el plásmido pTB93F, que codifica la proteína verde fluorescente (GFP) bajo el control del promotor constitutivo de triptófano (Trp) de bacteria. Para linealizar el plásmido y remover la GFP, se realizó una doble digestión con las enzimas de restricción *XhoI* y *Sall* (THERMO Fisher Scientific Inc.). El gen *PbExl1* se obtuvo de la construcción previa pBBR1MCS2-*PbExl1* utilizando los oligonucleótidos *XhoI*-fw 5'-ctcgagtgcgcgccgcttaaagc-3' y *Sall*-rev 5'-gttgtgtcgcacttaagaaggagatatacat-3'. Posteriormente estos fragmentos se purificaron utilizando el kit 'Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System' (Promega, USA) y se ligaron en una proporción 3:1 inserto: vector utilizando la enzima T4 DNA Ligasa (THERMO Fisher Scientific Inc.) en un volumen final de 10 µl. Se utilizaron 5 µl de esta ligación para transformar células quimio competentes de *E. coli* DH5α, posteriormente se seleccionaron utilizando cajas Petri con medio LB con cloranfenicol 50 µg/ml como marcadores de selección, y se incubaron a 37°C durante toda la noche. Las colonias resultantes se inocularon en 3 ml de medio LB líquido con cloranfenicol 50µg/ml y se dejaron crecer durante toda la noche a 37°C en agitación constante (200 rpm). A partir de estos cultivos, se extrajo ADN utilizando el kit "GeneJet Plasmid Miniprep" (THERMO Fisher Scientific Inc.), que se sometió a una doble digestión con las enzimas *XhoI* y *Sall* (THERMO Fisher Scientific Inc.) para corroborar la clonación de los fragmentos y descartar colonias falsas-positivas; posteriormente se mandaron a secuenciar a la Unidad de Síntesis del IBT, UNAM. La sobreexpresión de *Exl1* se confirmó mediante Western blot.

III.4 Mutante nula de expansina *ΔexI1*.

Para generar la mutante nula de la expansina ExI1 de *P. atrosepticum*, se clonaron 590 pb de la región río arriba del gen de la expansina en el vector suicida pKNG101 (34), utilizando los oligonucleótidos *Xba*I-fw 5'-aaatctagaccagcagacatccgcagtc-3' y *Hind*III-rev 5'-aaaaagctgtttcacatccaatatgattc-3' y de la región río abajo utilizando los oligonucleótidos *Xho*I-fw 5'-aaactcgagtcgcccacaacttgaggac-3' y *Apa*I-rev 5'-aaagggcccgcacgctggctgatgctggc-3', y se transformó en células CC118λpir de *E. coli*. Esta construcción se transfirió mediante conjugación a la cepa SCRI 1043 de *P. atrosepticum* utilizando como cepa ayudadora de *E. coli* HH26. Para corroborar la integración de la construcción al cromosoma se verificó que las células transformadas mostraran la resistencia a 100 μg/ml de estreptomicina conferida por el vector pKNG101. Las células se sembraron en placas con medio mínimo (para 1 l: 20 ml de buffer de fosfatos 50x, 10 ml de (NH₄)₂SO₄ al 10%, 0.41 ml de MgSO₄ 1 M, 16 g de agar), adicionado con glucosa (10 ml al 20%) y conteniendo estreptomicina (100 μg/ml); las colonias co-integrantes resultantes, se seleccionaron y resembraron tres veces en el mismo medio. Para llevar a cabo el intercambio alélico y retirar el esqueleto del plásmido del cromosoma (que contiene el gen *sacB* y el casete de resistencia a estreptomicina), se crecieron tres co-integrantes en LB sin selección y se sembraron 50 μl de las siguientes diluciones: 0, 1/10, 1/100 y 1/1000 en placas de medio mínimo con alto contenido de sacarosa (para 1 l: 20 ml de Buffer de fosfatos 50x, 10 ml de (NH₄)₂SO₄ al 10%, 0.41 ml de MgSO₄ 1 M, 200 ml de sacarosa al 50% y 16 g de agar). Para confirmar la identidad de las mutantes y la integridad de la eliminación, se utilizaron los oligonucleótidos *Xba*I forward y *Apa*I reverse (mencionados anteriormente) para amplificar las regiones río arriba y río debajo de la expansina. También se utilizaron los oligonucleótidos: *Pba*_exp forward 5'-gcggtgtccgcattatgcgt-3' y *Pba*_exp reverse 5'-cggtgcccgtgatcaggtag-3' para amplificar el gen de la expansina. Estos fragmentos se secuenciaron para corroborar la eliminación del gen de la expansina.

III.5 Ensayos de infección en vegetales.

Para los ensayos de infección la cepa de *P. brasiliense* BF45 se inoculó a partir de una suspensión de células en medio LB, en el caso de *P. atrosepticum* las células se

centrifugaron por 4 minutos a 4000 rpm y la pastilla celular se resuspendió en MgSO_4 1 M. Los apios, brócolis y papas se desinfectaron con cloro al 5% por 20 min y se lavaron con agua destilada. Para la inoculación de los peciolo de apios, brócolis y papa, se realizó una incisión de ~5 mm y se inocularon con 10 μl de una dilución de bacterias ajustada a una DO_{600} de 0.1 (~ 10^8 células). En el caso de las hojas de papa, una gota conteniendo ~ 10^9 células, se colocó en la superficie del haz. Los tubérculos de papa se perforaron usando una punta amarilla e inoculados con 10 μl de ~ 10^8 células, el orificio se selló con vaselina comercial para retener la humedad. Los vegetales infectados se incubaron a 30°C en una cámara húmeda. La virulencia se cuantificó midiendo la pérdida de peso por maceración como sigue: se pesó el material vegetal, se retiró el tejido macerado manualmente y se volvió a pesar el vegetal. Se calculó la diferencia y se determinó en porcentaje respecto al peso antes de retirar el macerado. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el programa GraphPad Prism 6 (GraphPad Software Inc, San Diego, CA), primero mediante una prueba Kolmogorov Smirnov para determinar si la distribución de los datos era normal; posteriormente se realizó una prueba Mann-Whitney para comparar entre dos muestras o una prueba Kruskal-Wallis con corrección de Dunn's para la comparación de grupos de muestras.

III.6 Microscopía confocal en plantas de papa.

Las cepas de *P. atrosepticum* SCRI 1043 y Δexl1 se transformaron mediante electroporación con el vector pSB4C5-RFC, que codifica la proteína roja fluorescente (RFP) y confiere resistencia a cloranfenicol (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Los vegetales se inocularon con estas cepas como se mencionó en la sección III.2 y se incubaron 3 días a 30°C en una cámara húmeda. En el caso de los peciolo de papa se realizaron cortes en el sitio de inoculación (0 cm), así como cortes a 1 cm por arriba y por debajo del sitio de inoculación. En los tubérculos se realizaron cortes en el tejido a los 0.5 cm y 1 cm por debajo del sitio de inoculación. Estos cortes se observaron en un microscopio confocal (Olympus FV1000) utilizando los objetivos 10X y 20X. La RFP se excitó a 488 nm utilizando un láser de argón y un espejo de excitación dicróica dual HFT UV 488/543/633 nm. El valor de compensación se ajustó hasta no observar fluorescencia de fondo en el

control. Las imágenes se obtuvieron con el software LSM 510 versión 4.2 5PI (Carl Zeiss). Las imágenes se analizaron con el programa Fiji ImageJ (35).

III.7 Cuentas en placa de bacterias inoculadas en tejidos de papa y cinéticas de crecimiento.

Se realizaron cortes de peciolo y tubérculos de papa en las mismas condiciones y distancias que lo descrito en la sección III.6. En el caso de las hojas de papa, se inocularon completamente mediante vacío. Las muestras se molieron con 1 ml de solución Ringer 0.25X (NaCl 38.5 mM, KCl 38.5 mM, CaCl₂ 0.45 mM, NaHCO₃ 0.45 mM, pH 7). Se realizaron diluciones seriadas y se sembraron en placas de medio CVP, se incubaron 48 horas a 28°C y se determinaron las unidades formadoras de colonias (UFC). El cultivo con el que se inocularon inicialmente los vegetales también se sembró en placas de CVP y las UFC resultantes se usaron como control.

Las curvas de crecimiento de las cepas de *P. atrosepticum* SCRI 1043 y *Δexl1* se realizaron en 50 ml de LB con una DO₆₀₀ inicial de 0.02 y se crecieron a 30°C con agitación constante (200 rpm). La DO₆₀₀ se midió cada 2 horas por un periodo de 14 horas para la silvestre y 16 horas para la mutante.

III.8 Pruebas de sensibilidad a estrés oxidativo e hiperosmótico.

Los ensayos de viabilidad de las cepas de *P. atrosepticum* SCRI 1043 y *Δexl1* al peróxido de hidrógeno (H₂O₂) se realizaron siguiendo el protocolo de Macvanin *et al.*, (2013 (36)) con algunas modificaciones. Las células se crecieron en medio LB a 30°C con agitación constante (200 rpm) hasta alcanzar una DO₆₀₀ de 0.2-0.4 (fase exponencial). En este punto se agregaron 2.5 M, 4 mM o 750 μM de H₂O₂ y se tomaron muestras del cultivo a los 0, 5, 10 y 15 minutos. Se realizaron diluciones seriales y se sembraron en placas de LB que se incubaron toda la noche a 30°C y se determinó el número de UFC, utilizando el tiempo 0 (antes de agregar H₂O₂) como referencia.

Para determinar la capacidad de crecimiento de las cepas en condiciones de estrés hiperosmótico, las células se crecieron toda la noche y se ajustaron a una OD₆₀₀ de

0.05, y se realizaron diluciones seriadas para las pruebas de gota en placas en medio LB o LB adicionado con NaCl al 2.5% o 5 %. Después de incubar las placas a 30°C por 24 y 48 horas respectivamente, el crecimiento celular se observó utilizando el fotodocumentador Gel Doc XR+ System (Bio Rad), mediante el escaneo de las placas a 300 dpi en el modo de escala de grises.

III.9 Ensayo de unión a las raíces.

Las raíces de plantas de papa de 4 semanas se lavaron con agua estéril y se eliminó el exceso con toallas de papel. Un gramo de estas raíces (peso húmedo) se sumergieron en 10 ml de una suspensión de 10^8 células diluidas en PBS 1X de *P. atrosepticum* SCRI 1043 o $\Delta ex11$ por 1 hora con agitación (500 osc/min). Posteriormente, las raíces se lavaron tres veces por 5 min con 20 ml de PBS 1x en agitación (800 osc/min) para remover las bacterias no unidas al material vegetal. Las raíces se molieron en bolsas de extracción (BIOREBA) utilizando una máquina Homex. Los sobrenadantes obtenidos se diluyeron en PBS 1x y se sembraron diluciones en placas CVP, las cuales se incubaron 48 horas a 28°C y se determinaron las UFC.

III.10 Determinación de la actividad enzimática *in vitro*.

Las células de *P. atrosepticum* SCRI 1043 o $\Delta ex11$ se crecieron toda la noche en medio LB, se centrifugaron por 4 minutos a 4000 rpm y la pastilla celular se resuspendió en $MgSO_4$ 1 M a una concentración de 10^4 células. Una gota de 10 μ l se inoculó en el centro de placas suplementadas con diferentes sustratos y se incubaron a 28°C por 10 días. En el caso de las pectinasas, se utilizaron placas con extracto de levadura 0.1%, $(NH_4)_2SO_4$ 0.1%, $MgSO_4$ 0.001, glicerol 0.5%, ácido poli galacturónico (PGA) 0.5%, buffer de fosfatos 0.2x y agar al 1.6%. Para observar la actividad estas placas se inundaron con $Cu(CH_3COO)_2$ al 7.5% por 2 horas. Para las celulasas, las placas contenían extracto de levadura 0.5%, $(NH_4)_2SO_4$ 0.1%, $MgSO_4$ 0.001%, glicerol 0.2%, 0.5%, buffer de fosfatos 1x, carboximetil celulosa (CMC) 1% y agar al 1.6%. La actividad se observó inundando las placas con rojo Congo 0.2% por 20 minutos, posteriormente lavando con NaCl 1M por 15 minutos y finalmente inundando las placas con HCl 1M por 5 minutos. En el caso de las proteasas, las placas contenían medio LB adicionado con

gelatina 3% y agar al 1.6%. La actividad se observó inundando las placas con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 4M por 30 minutos, y se cuantificó midiendo el diámetro del halo de actividad.

III.11 Infiltración de Exl1 y reto con patógenos.

Se utilizaron peciolos maduros de apio y hojas de plantas de *A. thaliana* de cuatro semanas del ecotipo Columbia-0 (Col-0) o de las mutantes jar-1 (37), eds5 (38) o la línea transgénica NahG (39). La proteína purificada de *P. brasiliense* Exl1 silvestre o sus versiones mutadas D83A y Y125A/W126A/Y157A, así como EXLX1 de *B. subtilis* se obtuvieron como se indica en (Olarte *et al.*, 2014 (15)). Para las infiltraciones, la proteína se diluyó en glucosa 0.002%, se utilizaron las siguientes concentraciones de proteínas: 0, 1, 3.7, 8, 10 y 20 μM . En el caso de los peciolos de apio la infiltración se llevó a cabo con una jeringa de insulina y se incubaron en una cámara de humedad por 24 horas a 30°C. Posteriormente se inocularon con 10 μl de una suspensión de LB conteniendo 10^8 células de *P. brasiliense* BF45 y se incubaron por 24 horas en las condiciones antes mencionadas. Se cuantificó la maceración de tejido como porcentaje de pérdida de peso. Mientras que las hojas de *A. thaliana* se colocaron con el haz haciendo contacto con la solución de proteína purificada o mock y se infiltraron utilizando una bomba de vacío, sometiénolas a 1 minuto de vacío y 40 segundos de no vacío (bomba de vacío apagada) tres veces. Para las infecciones con *P. brasiliense*, las hojas se transfirieron a cajas de Petri con papel húmedo, se sellaron con parafilm y se incubaron por 24 horas. Posteriormente se inocularon con 6 μl de una suspensión de LB conteniendo 10^8 células de *P. brasiliense* BF45 y se incubaron por 24, 48 o 72 horas. Se cuantificó el porcentaje de incidencia que es el número de hojas infectadas con respecto al número total de hojas inoculadas. Para las infecciones con *Botrytis cinerea*, las hojas se transfirieron a cajas de Petri que contenían agar nutritivo, se sellaron con parafilm y se incubaron por 24 horas. Posteriormente se inocularon con 6 μl de una suspensión de 5×10^2 células de *B. cinerea* y se incubaron por 24 horas en oscuridad. Se cuantificó el porcentaje de área de infección de las hojas. Todas las incubaciones se realizaron en cámaras de humedad a $20 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ con luz continua. Los análisis

estadísticos se realizaron utilizando el programa GraphPad Prism 6 (GraphPad Software Inc, San Diego, CA), primero mediante una prueba Kolmogorov Smirnov para determinar si la distribución de los datos era normal; posteriormente se realizó una prueba ANOVA con corrección de Bonferroni para los datos que presentaron una distribución normal, y una prueba Kruskal-Wallis con corrección de Dunn's para los datos que presentan una distribución no normal.

III.12 Análisis de la expresión de genes que participan en la respuesta inmune de *A. thaliana*.

Para los ensayos de transcriptasa inversa y reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (RT-qPCR) de genes marcadores de la respuesta inmune de *A. thaliana*, se infiltraron hojas (8 por réplica, como se describió en la sección III.11) y se congelaron en nitrógeno líquido a los 5 minutos, 1 hora y 24 horas después de la infiltración, así como 24 horas después del reto con *P. brasiliense* BF45. El ARN total se extrajo utilizando el reactivo TRIzol (Invitrogen). El ADN complementario (ADNc) se sintetizó con 1 µg de ARN utilizando el oligonucleótido dT y el kit 'ProtoScript First Strand cDNA Synthesis' (New England Biolabs). Para los RT-qPCR se utilizaron los genes marcadores 'plant defensin 1.2' (PDF1.2, At5g44420, PDF-fw 5'-ccaagtgggacatggtcag-3' y PDF-rev 5'-acttgtgtgctgggaagac-3' (40)), el gen 'pathogenesis related 4' (PR4, At3g04720, PR4-fw 5'-gtaccaccgcgactactgt-3' y PR4-rev 5'-tggaggaataagcactcagc-3' (40)), el gen 'pathogenesis related 1' (PR1, At2g14610, PR1-fw 5'-ttcttcctcgaaagctcaa-3' y PR1-rev 5'-aaggcccaccagagtgtatg-3' (40)), el gen 'allene oxide synthase' (AOS, At5g42650, AOS-fw 5'-atccaaagatctcccgatcc-3' y AOS-rev 5'-gtggattctcggcgataaaa-3'(40)), el gen 'enhanced disease susceptibility 5' (EDS5, At4g39030.1, EDS5-fw 5'-gaatctaaacagtcgggcatacc-3' y EDS5-rev 5'-ggggctcgagaagatcagacaga-3' (40)) y el gen 'zinc finger 12' (ZAT12, At5g59820-s, ZAT12-fw 5'-atcaagtcgacggtggatgt-3' y ZAT12-rev 5'-acaaagcgtcgttggtaggc-3' (41)). Las reacciones de PCR se realizaron utilizando 1 µl del ADNc (diluido 1:40), 'Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix' 2x y 0.5 µM de cada oligonucleótido. Las condiciones de los PCR fueron: 95°C por 15 minutos, seguido de 45 ciclos a 95°C por 15 segundos, 60°C por 30 segundos y 72°C por 30 segundos. El gen de actina (At4g26410) fue utilizado como referencia para las

normalizaciones (At4g26410-fw 5'-gagctgaa^gtggcttccatgac-3' y At4g26410-rev 5'-gggccgacatacccatgatcc-3' (42)). Controles sin templado se incluyeron para cada juego de oligonucleótidos.

III.13 Cuantificación de especies reactivas de oxígeno (ROS) intracelulares.

La cuantificación de ROS se realizó siguiendo el protocolo previamente reportado (43). Las hojas de *A. thaliana* se infiltraron con las proteínas purificadas Exl1, D83A o Y125A/W126A/Y157A como se describió en la sección VI.11. A los 5 min o 1 hora después de la infiltración, las hojas se sumergieron en el colorante 2'7'-dicloro-dihidro-fluoresceína diacetato 60 mM (DCFH-DA, Sigma) y se incubaron por 30 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Posteriormente, se lavaron con agua destilada para eliminar el exceso de colorante. La fluorescencia se observó utilizando un microscopio de epifluorescencia Leica DMR con un filtro para GFP (excitación 480 nm, emisión 527 nm). Las imágenes obtenidas se procesaron con el programa Fiji ImageJ (35) para cuantificar la intensidad de fluorescencia en unidades arbitrarias (UF). Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el programa GraphPad Prism 6 (GraphPad Software Inc, San Diego, CA), primero mediante una prueba Kolmogorov Smirnov para determinar si la distribución de los datos era normal; posteriormente se realizó una prueba ANOVA con corrección de Bonferroni.

III.14 Ensayos de movilidad de 'swarming' y nado.

Se utilizó el protocolo previamente descrito para *P. atrosepticum* (44). El medio MacConkey al 0.4X suplementado con 0.5% de glicerol. Una vez que se vertió el agar en las cajas Petri se dejaron secar por 20 min sin tapar en la campana de flujo laminar. Posteriormente se inoculó una gota de 3 μ l de un cultivo ajustado a una DO₆₀₀ de 0.1 en el caso de las cepas de *P. atrosepticum* SCRI 1043 y Δ exl1, y 5 μ l a una DO₆₀₀ de 0.05 en el caso de las cepas de *P. brasiliense* BF20 y BF45. Las placas se dejaron secar por 20 min y se incubaron por 48 o 24 h respectivamente a 30°C en una cámara húmeda. El área de swarming se cuantificó marcando la silueta de crecimiento con la herramienta de dibujo de polígonos del programa Fiji ImageJ (35) en centímetros cuadrados.

Para evaluar la capacidad de nado de las cepas, se inocularon placas de LB al 0.3% con una colonia (recién estriada) utilizando una punta amarilla estéril. Las placas se incubaron a 30°C por 3 días.

III.15 Cuantificación de la producción de exopolisacáridos y biofilm.

Las cepas de *P. atrosepticum* SCRI 1043 y $\Delta exl1$ se crecieron toda noche en medio LB a 30°C en agitación constante (200 rpm), se ajustaron a una OD₆₀₀ de 1.2 y se estriaron en línea recta en placas de medio SOB (2% triptona 2%, extracto de levadura 0.5%, NaCl 10 mM, KCl 2.5 mM, Mg₂SO₄ 10 mM, agar al 1.5%) adicionado con glicerol al 2%. Las placas se incubaron por 3 días a 30°C. La producción de polisacáridos se determinó midiendo el ancho de la línea inoculada.

La producción de biofilm de las cepas de *P. atrosepticum* SCRI 1043 y $\Delta exl1$ se realizó utilizando el protocolo descrito por O'Toole en el 2011 (45). Se crecieron cultivos en medio LB toda la noche a 28°C en agitación (200 rpm), se ajustaron a una OD₆₀₀ de 1.2 y se diluyeron 1:100 en medio LB. Se colocaron 100 µl de esta dilución en placas de 96 pozos (Costar) y se incubaron a 28°C por 48 horas en una cámara húmeda. Posteriormente, las placas se lavaron dos veces con agua destilada. El biofilm se tiñó con 125 µl de cristal violeta al 0.1% por 10 minutos. Las placas se lavaron tres veces con agua destilada y se dejaron secar a temperatura ambiente toda la noche. El biofilm se solubilizó con 200 µl de etanol al 95% por 15 min. La formación de biofilm se cuantificó midiendo la absorbancia de 100 µl del biofilm solubilizado a 570 nm en un lector de placas (Bio Rad).

CAPÍTULO IV.

IV. LA EXPANSINA EXL1 DE *Pectobacterium* PARTICIPA EN LA PENETRACIÓN DE LAS BACTERIAS AL TEJIDO DEL HOSPEDERO.

IV.1 ANTECEDENTES DIRECTOS CAPÍTULO IV.

Como se mencionó anteriormente, los fenotipos de mutantes nulas en la bacteria promotora del crecimiento *B. subtilis* (6), o en fitopatógenas como *R. solanacearum* (16), *Clavibacter michiganensis* (16,23), *Erwinia tracheiphila* (25) y *Xyllela fastidiosa* (24), indican que las expansinas están involucradas en la interacción de la bacteria con su hospedero, pero se desconoce el detalle molecular de la interacción. Aunque se sabe que la celulosa es el blanco de las expansinas, falta determinar en qué contexto de la pared celular las expansinas se unen productivamente, lo que dificulta inferir su posible función. Dependiendo de su punto isoeléctrico (pI) y su carga neta, las expansinas bacterianas se dividen en ácidas (pI 4.5-5.96) o básicas (pI 8.2-9.8), correspondiendo la mayoría de las proteínas ácidas a bacterias Gram negativas con carga neta negativa como es el caso de *PbExl1*, y las básicas a Gram positivas con una carga neta positiva como la expansina de *EXLX1*, lo que impacta la manera en la que se unen al sustrato (46). Con respecto a esto, resultados recientes de nuestro grupo determinaron la localización de la expansina *Exl1* de *P. brasiliense* y *EXLX1* de *B. subtilis* en cortes de apio, observando mediante microscopía confocal ambas proteínas purificadas y marcadas con fluoróforos e incubadas con el material vegetal. *PbExl1* se localiza en el xilema de apio, específicamente en la región intercelular de los vasos del xilema y las células circundantes; esta zona corresponde a la lamela media que es rica en pectina. En cambio, la expansina de *B. subtilis* *EXLX1*, se localiza inespecíficamente en la pared celular de todos los tipos celulares del tejido de apio (47) (Figura 2). Además, se reportó que la expansina *Exl1* de *P. brasiliense* tiene la capacidad de solubilizar polisacáridos de tejido vascular de acelga (47) (Figura 3), de forma similar a lo reportado para *EXPB1* de maíz (9) a diferencia de la expansina de *B. subtilis* que no presenta esta capacidad de solubilización en las condiciones analizadas (47).

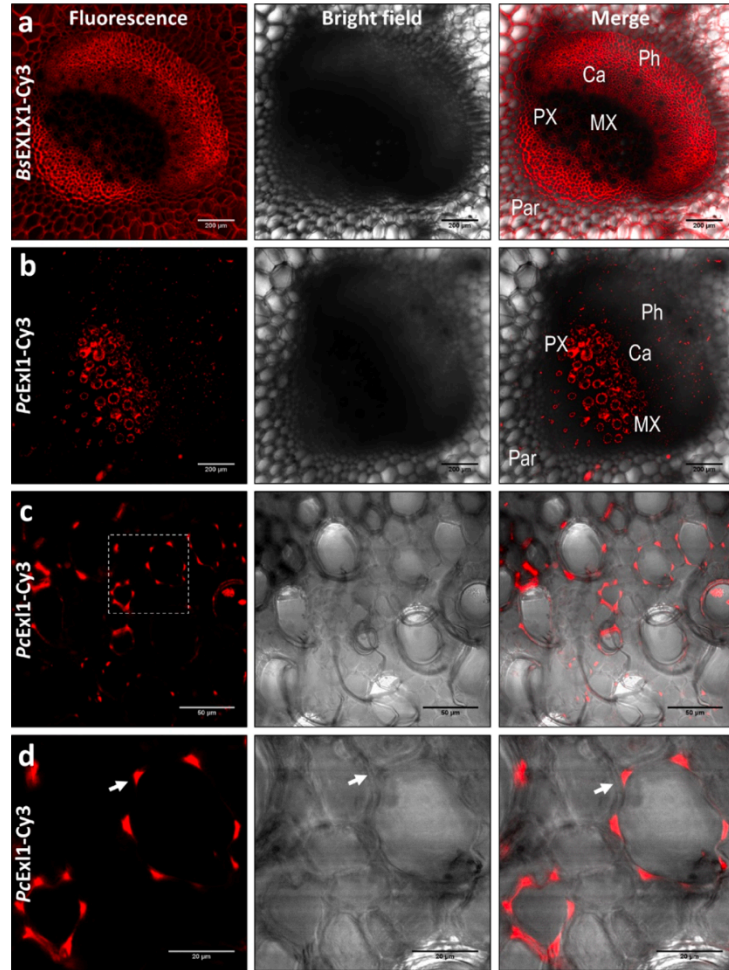


Figura 2. *PbExl1* se localiza en el xilema de apio. a) Localización de *BsExl1* marcada con Alexa 488. **b)** Localización de *PcExl1-Cy3* en el xilema del apio. **c)** y **d)** La fluorescencia de *PcExl1* se observa en la lamela media correspondiente al a región intercelular de las células que rodean los vasos del xilema. Figura tomada de (47).

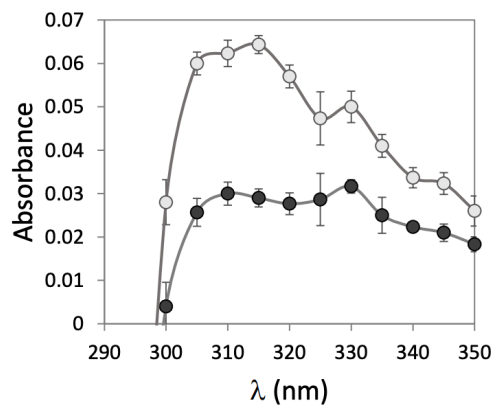


Figura 3. Solubilización de polisacáridos por *PbExl1* de tejido vascular. Escaneos UV-vis de los sobrenadantes de tejido vascular aislado de acelga, tratados con 300 μg (círculos negros) y 600 μg (círculos grises) de la expansina *PbExl1*. Se observa un pico de absorción entre 310 y 315 nm (posiblemente ácido p-cumárico). *BsEXLX1* no presenta señal. Figura tomada de (47).

Nuestro grupo observó la expresión transcripcional del gen de la expansina *exl1* de *P. atrosepticum* durante la infección. El gen *exl1* se expresa durante la infección de hojas de papa, mostrando una expresión basal durante las primeras 10 h después de la infección y aumentando 48 h después de la infección. La expresión del gen, al igual que la de los genes de las principales enzimas de degradación de la pared celular de *Pectobacterium* depende de la densidad bacteriana, ya que en una mutante nula de *P. atrosepticum* *expl* en la que no hay síntesis del autoinductor *N*-(3-oxohexanoil)-L-homoserina lactona (OHHL) (30), los niveles de transcrito son menores que en la cepa silvestre (Figura 4).

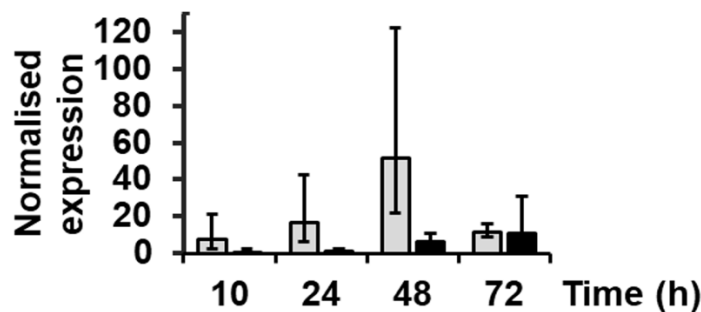


Figura 4. El gen *exl1* de *P. atrosepticum* se expresa durante la infección y es parcialmente regulado por QS. La expresión del gen *exl1* se observó mediante RT-qPCR a partir de RNA obtenido de hojas de papa infectadas con *P. atrosepticum*, se observa una mayor expresión de *exl1* 48 h después de la infección (barras grises). Al infectar las hojas de papa con la mutante de *P. atrosepticum* *exp1*- (afectada en la síntesis de OHHL), la expresión de *exl1* se ve afectada (barras negras), lo que indica que la expresión de *exl1* está regulada por QS. Figura tomada de (48).

IV.2 RESULTADOS CAPÍTULO IV.

IV.2.1 ExI1 se produce en la infección y su expresión está regulada por QS.

La información de la participación de expansinas en la patogénesis de diferentes especies ha sido documentada solo genéticamente. Por lo que investigamos si la proteína ExI1 de *P. brasiliense* y *P. atrosepticum* podía ser detectada mediante Western blot utilizando un anticuerpo policlonal contra el péptido GMNDIPIEFTDVKG del dominio 2 de esta proteína. Para este propósito utilizamos macerados de apio y brócoli infectados con *P. brasiliense*, debido a que estos vegetales se infectan en tiempos cortos (24 horas a 30°C) y están disponibles durante todo el año. El tejido vegetal macerado por la infección bacteriana, se colectó y se centrifugó para separar las fracciones soluble e insoluble (esta última, formada de bacterias y restos del tejido de la planta); analizamos ambas fracciones para determinar la presencia de la proteína ExI1. Observamos que *PbExI1* se encuentra tanto en los sobrenadantes como en el tejido macerado de apio (Figura 5A), confirmando que *PbExI1* también se traduce durante la infección. ExI1 no se observó en el tejido no infectado de apio o brócoli (Figura 5B), lo que indicó que el anticuerpo utilizado no cruza con las expansinas endógenas de los vegetales.

Cómo se mencionó antes, las enzimas digestivas de la pared celular de *Pectobacterium* están reguladas por sistemas de *quorum sensing* (QS) (30). Además, se ha sugerido que la expansina ExI1 de *P. atrosepticum* también se encuentra regulada por QS (48). Debido a esto, analizamos si ExI1 de *P. brasiliense* también está bajo el control de QS. Para esto la producción de ExI1 fue analizada a diferente densidad celular en cultivos de *P. brasiliense* BF45 crecidos en medio LB y medio mínimo adicionado con pectina (LEM). El medio LEM se utilizó para saber si productos derivados de la digestión de pectina son necesarios para la regulación de la expresión de ExI1 ya que *P. brasiliense* es una bacteria pectinolítica (49). Se tomaron muestras del cultivo y se centrifugaron para separar el sobrenadante de la pastilla de bacterias. Observamos mediante Western blot que en la pastilla de bacterias de medio LB y LEM, la producción de *PbExI1* se incrementó dependiendo de la densidad celular, con un pico antes de iniciar la fase estacionaria (Figura 5C y 5D). Esto sugiere que la regulación de *PbExI1* podría no estar

sujeta a la presencia de fragmentos de pectina, si no que depende de la presencia de un mayor número de células en el medio; esto es evidencia de que *PbExl1* también es regulado por QS, similarmente a lo que se reportó anteriormente para la *Exl1* *P. atrosepticum* mediante RT-qPCR (48). Sin embargo, son necesarios más experimentos para descartar por completo la participación de la pectina en la regulación de *Exl1*.

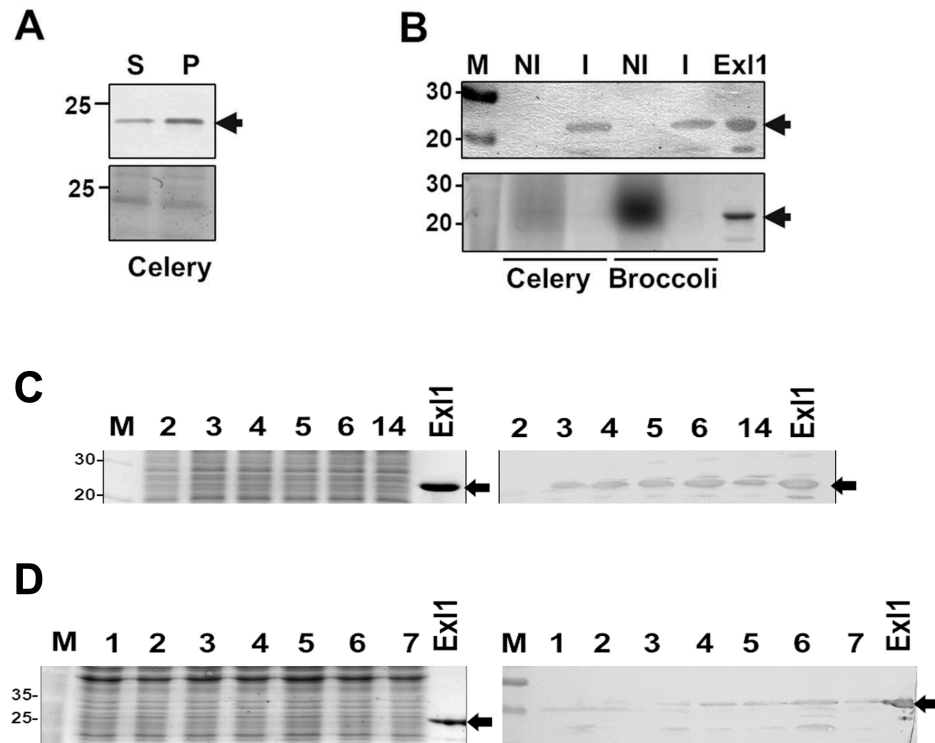


Figura 5. La expansina de *P. brasiliense* se produce a nivel de proteína y es regulada por QS. A) Detección de *PbExl1* (indicada con una flecha en el panel superior) mediante Western blot en el sobrenadante (S) y la fracción insoluble (pastilla, P) de apios infectados, en comparación con el gel de control de carga de las muestras antes de ser transferidas a la membrana para realizar el Western blot (panel inferior). **B)** El anticuerpo anti-*Exl1* es específico para *Exl1* de sobrenadantes de infección de *P. brasiliense* (I) ya que no presenta detección en sobrenadantes de apio y brócoli no infectados (NI). Controles de carga (panel izquierdo) y Western blots (panel derecho) de la inducción de *PbExl1* en medio **C)** LB líquido y **D)** medio mínimo suplementado con pectina. Los niveles de proteína a través del tiempo se indican con una flecha, alcanzando una máxima detección a las 6 h que corresponde a OD_{600} de 1.3 en el caso de C y 0.7 en D. M indica el marcador de peso molecular y *Exl1* indica el control de *PbExl1* purificada. Imágenes representativas de tres experimentos independientes.

IV.2.2 Contribución de Exl1 a la virulencia de *Pectobacterium*.

Debido a que se ha sugerido que las expansinas bacterianas podrían actuar como factores de virulencia (19,20), estudiamos si la expansina de *Pectobacterium* contribuye a una mayor virulencia en la infección. Primero comparamos los niveles de virulencia (medida como pérdida de tejido por maceración) entre *P. atrosepticum* y *P. brasiliense* BF45. Para esto, realizamos ensayos de pérdida peso en tubérculos de papa, debido a que *P. atrosepticum* está restringida a este hospedero, mientras que *P. brasiliense* presenta un amplio rango de hospederos, entre ellos papa (29,32). Observamos que *P. atrosepticum* es 75% menos virulenta en papas en comparación con *P. brasiliense*, incluso al realizar las incubaciones a 23°C que es la temperatura óptima para *P. atrosepticum* (Figura 6A). Posteriormente, decidimos comparar los niveles de expresión a nivel de transcrito entre la expansina de *P. brasiliense* y *P. atrosepticum* para determinar si la cepa más virulenta presenta mayor expresión de la expansina. Utilizamos RT-qPCR empleando la metodología previamente establecida para *exl1* (48) utilizando muestras obtenidas a partir del tejido macerado de hojas de papas infectadas con *P. brasiliense* o *P. atrosepticum*. Observamos que la cepa más virulenta correspondiente a *P. brasiliense*, que expresó niveles de transcrito 30 veces mayores de *exl1* durante la infección de hojas de papa en contraste con *P. atrosepticum* (Figura 6B). Debido a estos resultados, decidimos observar si la sobre-expresión de *exl1* provocaba una mayor virulencia en el tejido vegetal. Para esto transformamos la cepa de *P. brasiliense* con un plásmido que contiene el gen de la expansina bajo el promotor constitutivo PTR del plásmido pTB93F (pTB93F-Exl1). Mediante Western blots de sobrenadantes de medio LB, corroboramos que la cepa sobre-expresora presenta niveles de proteína 15 veces mayores que la silvestre (cuantificando la banda por densitometría, Figura 6C). Después se realizaron ensayos de infección en apio tanto con *P. brasiliense* silvestre y con la cepa sobre-expresora y observamos que la virulencia (medida como pérdida de tejido por maceración) fue 170% mayor en comparación con la cepa silvestre y un control que expresa el gen de la proteína verde fluorescente (GFP) bajo el promotor PTR del plásmido pTB93F (Figura 6D). En conjunto, estos resultados indican que Exl1 participa positivamente durante la infección de *Pectobacterium*, y que existe una correlación entre niveles más altos de Exl1 y una

mayor virulencia, que son características de los factores de virulencia, por lo que Exl1 puede ser considerado como tal.

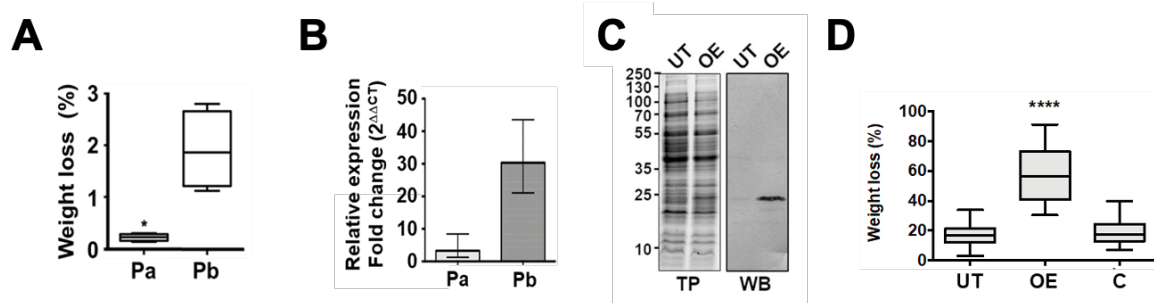


Figura 6. La expresión de la expansina se correlaciona con los niveles de infección. A) La cepa de *P. brasiliense* BF45 es más virulenta que la cepa de *P. atrosepticum* al ser inoculadas en papas e incubadas a 23°C (temperatura óptima de infección de *P. atrosepticum*) por tres días. Diferencias significativas $p < 0.01$ (*) calculadas con la prueba de Mann-Whitney ($n=30$). **B)** La expresión del gen *exl1* es mayor en *P. brasiliense* (Pb) en comparación con *P. atrosepticum* (Pa) en hojas de papa a las 24 horas después de la infección. RT-qPCR realizados como se indica en (48). Las barras de error corresponden a la desviación estándar de los experimentos. **C)** Western blot de la sobre-expresión (OE) del gen *exl1* de *P. brasiliense* BF45 comparado con la cepa BF45 no transformada (UT). Se observa el gel con las proteínas totales y el WB con un anticuerpo que detecta Exl1. **D)** La sobre-expresión del gen *exl1* (OE) provoca una mayor maceración de tejido de apio en comparación con la cepa silvestre (UT) y el control del plásmido que expresa el gen de la GFP (C). Las gráficas son el resultado de al menos tres experimentos independientes ($n=30$). Diferencias significativas $p < 0.0001$ (****) calculadas con la prueba de Kruskal-Wallis con la corrección de Dunn's.

IV.2.3 Mutante nula $\Delta exl1$ en *P. atrosepticum*.

Hasta la fecha, los reportes sobre la participación de las expansinas bacterianas durante la infección se basan en la generación de mutantes nulas de este gen (16,23,25). Por lo tanto decidimos obtener una cepa mutante nula de *exl1* de *Pectobacterium* para conocer más sobre la función de la expansina; no obstante, debido la resistencia natural a múltiples antibióticos que presenta *P. brasiliense* (32) se dificultó obtener una mutante de esta cepa a pesar de realizar diferentes intentos. Por lo que decidimos utilizar como modelo *P. atrosepticum* SCRI 1043, que es una cepa ampliamente estudiada, su genoma está completamente secuenciado y existe una amplia variedad de herramientas moleculares que pueden utilizarse en esta especie (30,50). Para la obtención de la mutante nula $\Delta exl1$ en *P. atrosepticum*, realizamos un intercambio

alélico utilizando el vector suicida pKNG101 (34), sin la inserción de un gen de resistencia. Verificamos la correcta construcción de la cepa mutante en el genoma mediante PCR utilizando oligonucleótidos que amplifican las regiones río arriba y río abajo del gen de la expansina, así como con oligonucleótidos que amplifican sólo el gen de la expansina (Figura 7A). Posteriormente verificamos la ausencia de ExI1 en esta mutante mediante Western blot. Determinamos que *P. atrosepticum* produce la expansina en bajos niveles durante la infección, tal y como se observó a nivel del transcrito, por lo que para poder observar PaExI1 en geles de proteína fue necesario realizar ensayos de ‘pull-down’ con celulosa de los sobrenadantes de papas infectadas, con la finalidad de concentrar la expansina presente en los sobrenadantes (Figura 7B). Estos resultados indican que contamos con una cepa mutante ($\Delta exI1$) que no produce la expansina.

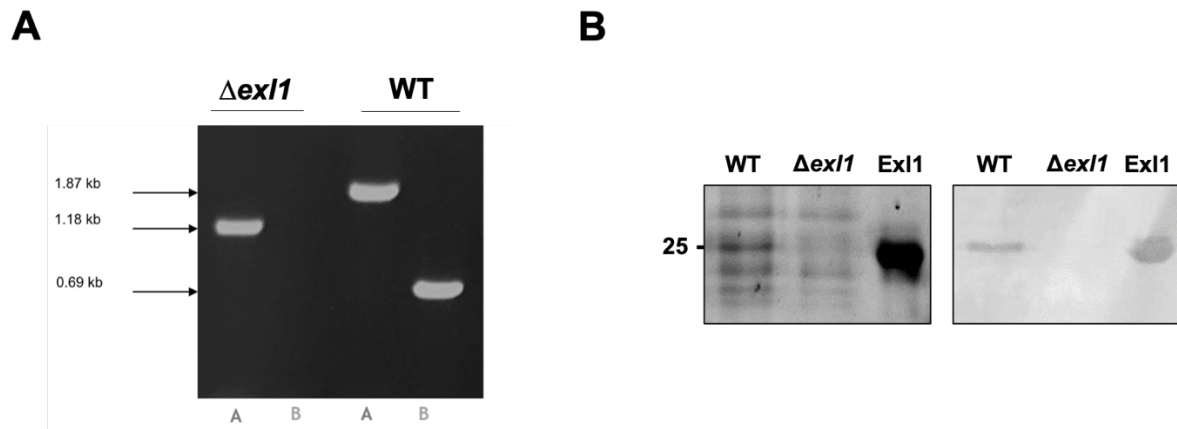


Figura 7. Mutante nula de expansina. A) PCR de las cepas silvestres (WT) y mutante nula de expansina ($\Delta exI1$) utilizando oligonucleótidos que amplifican el fragmento A de 1870 pb, correspondiente a las regiones río arriba y río debajo de la expansina, y el fragmento B de 690 pb, que amplifica el gen de la expansina. Se observa para $\Delta exI1$ que A posee un menor peso molecular y B no presenta amplificación. Gel de electroforesis al 1%. **B)** Gel con las proteínas totales (panel izquierdo) y Western blot anti-ExI1 (panel derecho) de la cepa silvestre y mutante. ExI1 indica el control de *PbExI1* purificada. SDS-PAGE al 12%. Imágenes representativas de al menos tres experimentos independientes.

IV.2.4 La mutante nula $\Delta ex11$ de *P. atrosepticum* disminuye los síntomas de enfermedad, y este fenotipo es reestablecido por *PbEx11* pero no por *BsEXLX1*.

Para determinar si el fenotipo de la mutante nula $\Delta ex11$ es similar a los previamente reportados en otras bacterias (16,23,25), analizamos la participación de la expansina de *P. atrosepticum* durante la infección. Inoculamos plantas de papa (que es la planta a la que *P. atrosepticum* está restringida) con la cepa silvestre y $\Delta ex11$ y observamos cualitativamente los síntomas de enfermedad provocados. En el caso de los tallos, observamos que en el sitio en el que se llevó a cabo la inoculación, la cepa silvestre provocó más síntomas de enfermedad (marchitamiento) en comparación con la mutante $\Delta ex11$. Además, observamos síntomas de enfermedad por encima del sitio de inoculación con la silvestre pero no con la mutante, sugiriendo un proceso de colonización más exitoso por parte de la cepa silvestre (Figura 8). Las hojas se inocularon colocando una gota de una suspensión de bacterias de *P. atrosepticum* silvestre o mutante, debido a que se ha reportado que esta bacteria puede entrar y colonizar los tejidos naturalmente a través de los estomas, nuevamente observamos que la cepa silvestre tuvo la capacidad de invadir el tejido y causar el marchitamiento del tejido, mientras que esto no sucedió con la mutante $\Delta ex11$ (Figura 8). Para cuantificar este fenotipo, realizamos ensayos de pérdida de peso en tubérculos de papa (debido a la disponibilidad del material vegetal, a diferencia de las plantas de papa) y determinamos que, en comparación con la cepa silvestre, la mutante $\Delta ex11$ presentó una capacidad 70% menor de macerar tejido (Figura 9). Posteriormente, para corroborar que el gen de la expansina fuera el responsable del fenotipo observado, decidimos complementar la cepa $\Delta ex11$ con el vector pTB93F-Ex11, que expresa la expansina de *P. brasiliense* Ex11 que es 98.5% idéntica a la expansina Ex11 de *P. atrosepticum*, y presenta solo tres aminoácidos distintos en las regiones que no parecen ser esenciales para la función de la proteína, por lo que inferimos que su función es la misma. Transformamos la mutante $\Delta ex11$ con esta construcción y observamos que la cepa $\Delta ex11$ -*PbEx11* recuperó la capacidad de macerar tejido de forma similar a la silvestre (Figura 9). Así mismo la cepa de *P. atrosepticum* silvestre transformada con el mismo vector (*WT-PbEx11*) provocó una ligera mayor maceración de tejido (aunque no

significativa, Figura 9) al compararla con las células silvestres y las transformadas con el plásmido control que codifica la proteína GFP (Figura 9). En estos ensayos decidimos incluir a la expansina *BsEXLX1* de *B. subtilis*, debido a que *BsEXLX1* es la expansina bacteriana más estudiada hasta la fecha (6) y además presenta características distintas a la expansina de *Pectobacterium* que pueden tener un impacto en su función. La expansina *BsEXLX1* es una expansina básica en comparación con *Exl1* que es una expansina ácida, y también se ha reportado que *PbExl1* tiene la capacidad de solubilizar polisacáridos del tejido vascular de acelga mientras que *BsEXLX1* no presenta esta capacidad (47). Al complementar la cepa $\Delta exl1$ con la construcción pTB93-*BsEXLX1* que expresa el gen de la expansina de *B. subtilis* no vimos la reversión del fenotipo mutante, es decir que la maceración de tejido fue muy similar al de la cepa $\Delta exl1$ (Figura 9). Esto sugiere que las diferencias antes mencionadas entre estas expansinas pueden ser determinantes para la función de cada una, y que la naturaleza ácida o la capacidad de solubilizar de polisacáridos de *PbExl1* podrían estar relacionadas con su función durante la infección.

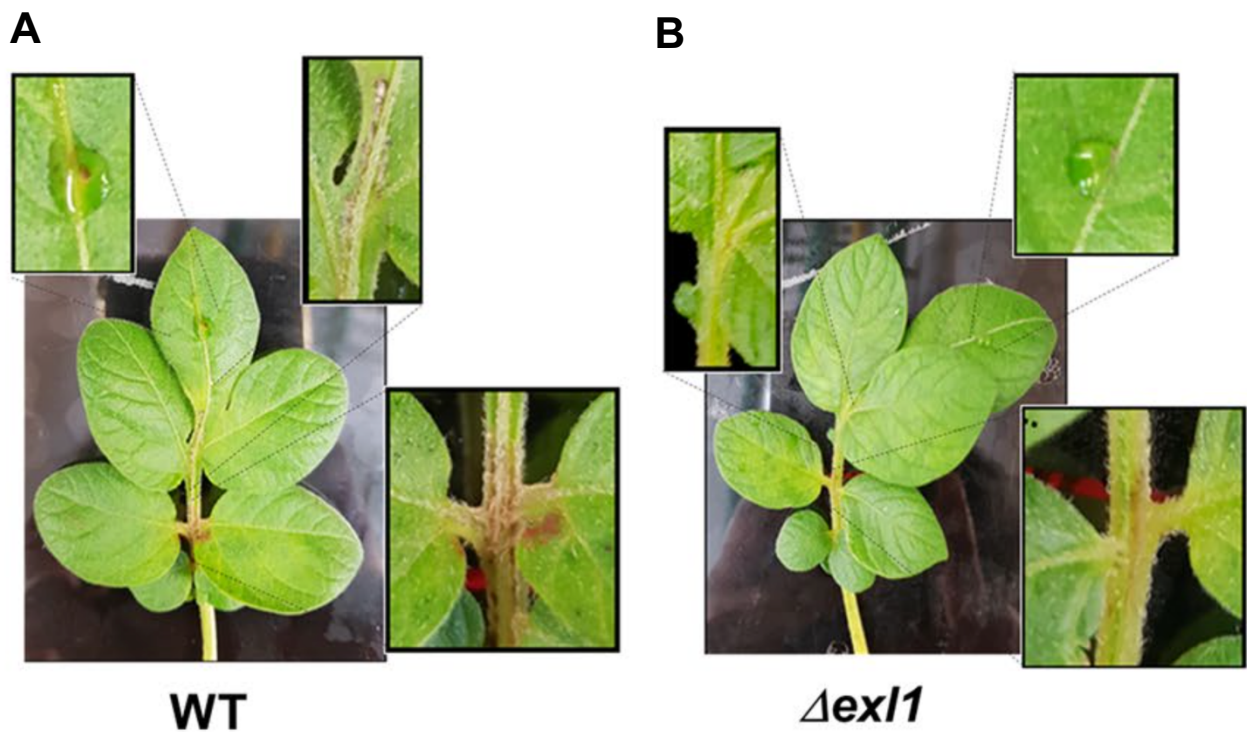


Figura 8. La mutante nula de expansina $\Delta exl1$ disminuye los síntomas de infección. Plantas de papa infectadas con **A)** *P. atrosepticum* silvestre y **B)** la mutante $\Delta exl1$. Determinación cualitativa en la

que se observa que la cepa silvestre induce mayores síntomas de infección (marchitamiento) en tallos y hojas. Los peciolo del segundo nódulo se inocularon con 1×10^3 células mediante una pequeña incisión. En el caso de las hojas, una suspensión conteniendo el mismo número de células se colocó en su superficie. Imágenes representativas de cuatro experimentos independientes.

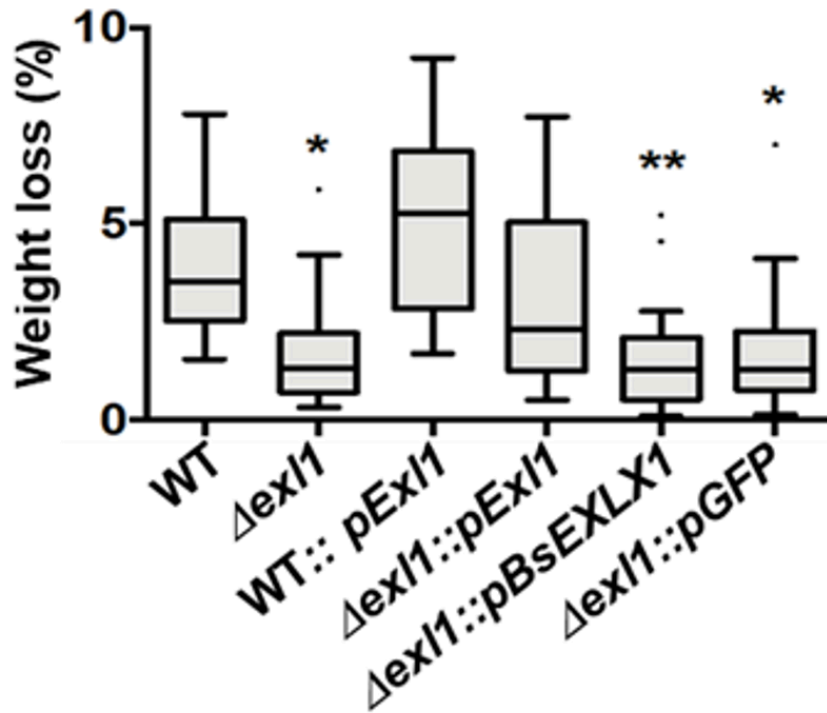


Figura 9. La mutante nula de expansina provoca una menor maceración de tejido. Ensayos de pérdida de peso en papa muestran que la mutante nula del gen de la expansina Exl1 de *P. atrosepticum* presenta una maceración de tejido 70% menor en comparación con la cepa silvestre. Esta reducción en la capacidad de macerar tejido es recuperada por la expansina Exl1 de *P. brasiliense* ($\Delta exl1::pExl1$) pero no por la expansina EXLX1 de *B. subtilis* ($\Delta exl1::pBsEXLX1$) que presenta niveles de maceración similares al plásmido control que codifica la proteína verde fluorescente ($\Delta exl1::pGFP$). Diferencias significativas $p < 0.01$ (*) y $p < 0.001$ (**) calculadas con la prueba de Kruskal-Wallis con la corrección de Dunn's. Los experimentos se realizaron en papas infectadas con la misma cantidad de células e incubadas a 30°C por siete días. Pruebas realizadas por triplicado, $n=30$.

IV.2.5 La mutante nula $\Delta exl1$ de *P. atrosepticum* está afectada en su capacidad de colonizar plantas de papa.

Para tratar de caracterizar las diferencias observadas entre la infectividad de *P. atrosepticum* silvestre y mutante, y debido a que se ha sugerido que la expansina en *R. solanacearum* podría participar en la colonización del tejido (16), decidimos analizar la

infección en tiempos tempranos (tres días después de la inoculación) de *P. atrosepticum* silvestre y $\Delta ex/1$. Transformamos ambas cepas con el plásmido pSB4C5-RFC que expresa constitutivamente el gen de la proteína roja fluorescente (RFP) e inoculamos plantas de papa para posteriormente observar las células fluorescentes mediante microscopía confocal. En el caso de los tallos, obtuvimos cortes del sitio de inoculación (denominado 0 cm), así como 1 cm por arriba (+ 1 cm) y 1 cm por debajo (- 1 cm) de este sitio (Figura 10). Observamos una mayor intensidad de fluorescencia en todos los cortes (0, + 1 y -1 cm) infectados con la cepa silvestre en comparación con $\Delta ex/1$ (Figura 11A). Además, en ambas cepas observamos mayor fluorescencia a + 1 cm de distancia del sitio de inoculación, probablemente por el flujo que siguen las bacterias para colonizar las partes aéreas de la planta (Figura 11A). Para las hojas, colocamos una suspensión de células en el haz (Figura 10) y observamos que la señal de fluorescencia fue mayor en las hojas inoculadas con la cepa silvestre en comparación con la mutante (Figura 11B). Resultados similares se obtuvieron en los tubérculos de papa en los cortes obtenidos a 0.5 cm y 1 cm del sitio de inoculación, donde nuevamente observamos mayor señal de fluorescencia en la silvestre que en $\Delta ex/1$ (Figura 11C).

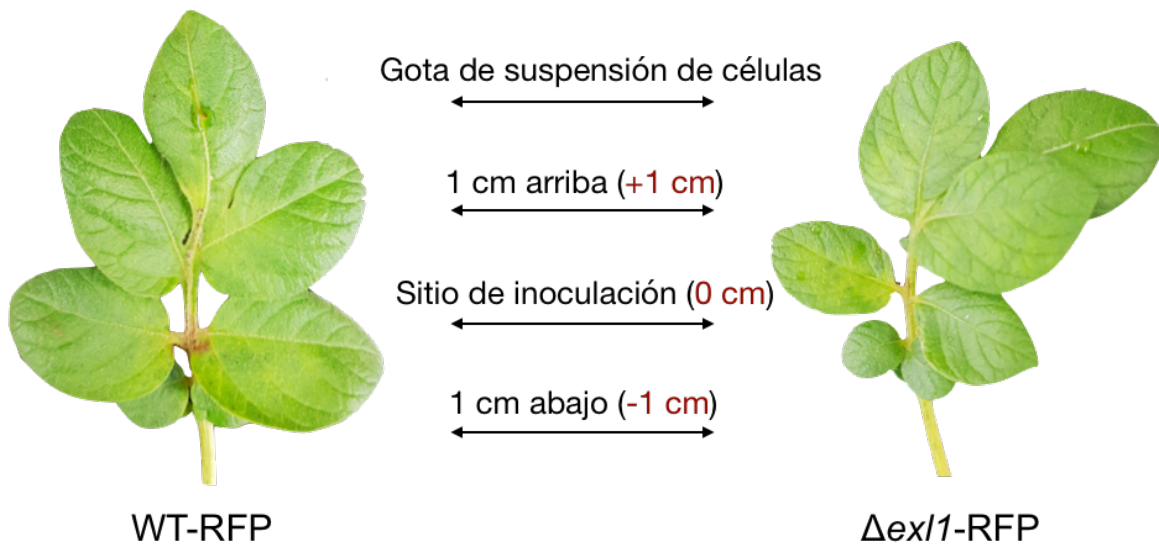


Figura 10. Puntos de inoculación y zonas utilizadas para los cortes de plantas de papa. Las plantas de papa se inocularon con las cepas WT-pSB4C5-RFC y $\Delta ex/1$ -pSB4C5-RFC. En el caso de las hojas se colocó una gota de suspensión de células y el corte se realizó en esta zona. Los peciolos se inocularon

mediante un pequeño corte en el segundo nódulo y los cortes se obtuvieron del sitio de inoculación (0 cm), 1 cm por arriba (+1 cm) y 1 cm por debajo (-1 cm) del sitio de inoculación.

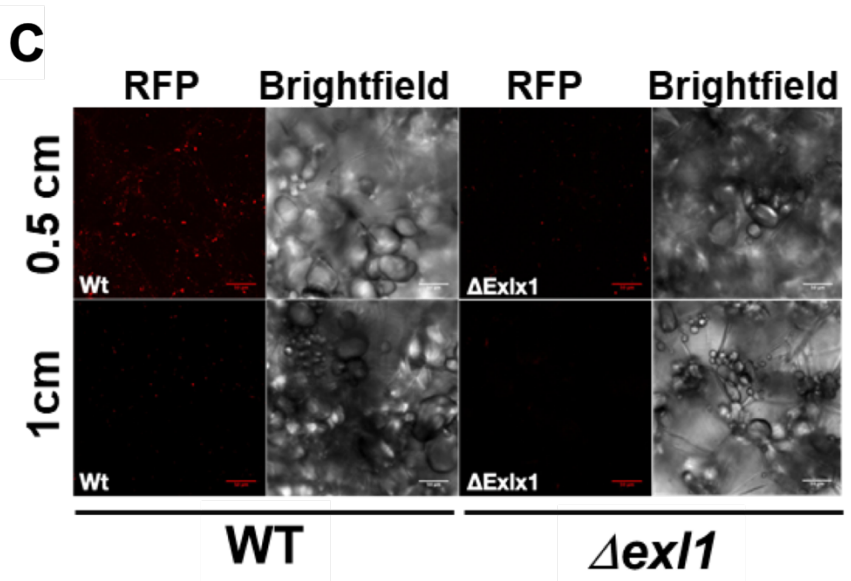
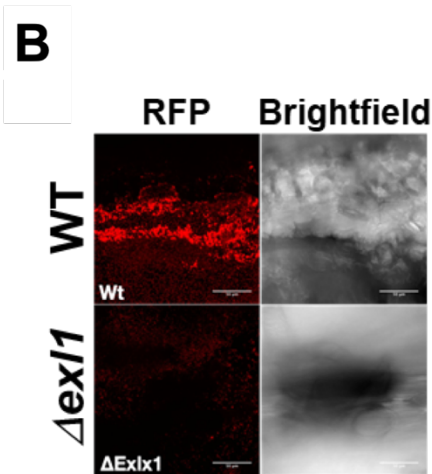
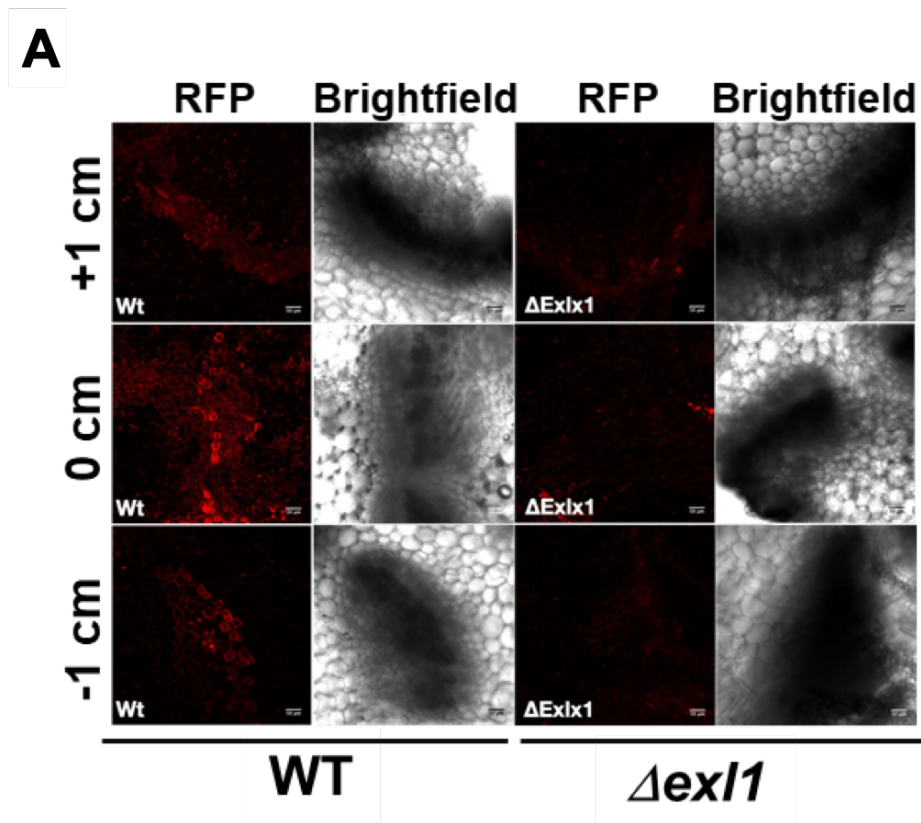


Figura 11. Existe un menor número de bacterias de la cepa $\Delta exl1$ durante la infección de plantas de papa. Mediante microscopía confocal se observaron las bacterias marcadas con la RFP en el tallo A) a los 0 cm, +1 cm y -1 cm del sitio de inoculación en la silvestre y la mutante $\Delta exl1$, observándose

menor intensidad de fluorescencia (lo que indica un menor número de bacterias) en la mutante. Al observar las bacterias en la hoja **B**) Se observa el mismo fenotipo en la zona de la hoja donde se colocó la gota conteniendo la suspensión de bacterias. **C**) En el caso de la infección del tubérculo, a los 0.5 cm y 1 cm del sitio de inoculación, también existe mayor intensidad de fluorescencia (y por lo tanto más número de bacterias) en la cepa silvestre en comparación con la mutante. Imágenes representativas de 3 experimentos independientes.

Para corroborar que la intensidad de fluorescencia observada en la microscopía confocal correspondiera con el mismo número de bacterias en el tejido, decidimos cuantificar las UFC utilizando las mismas distancias que en los cortes observados por microscopía (Figura 10 y 11). Para esto repetimos las infecciones en tallos y tubérculos utilizando las cepas de *P. atrosepticum* WT-pSB4C5-RFC y Δ *exl1*-pSB4C5-RFC y después de tres días de incubación observamos que los tejidos infectados con la cepa silvestre presentaron un número de UFC 10 veces mayor en tallos (Figura 12A) y 100 veces mayor en tubérculos (Figura 12B), en comparación con Δ *exl1* a pesar de que en ambos casos se inoculó con el mismo número de células. Concluimos que la mayor fluorescencia observada en la cepa silvestre corresponde con un mayor número de bacterias en las zonas analizadas en comparación con la mutante.

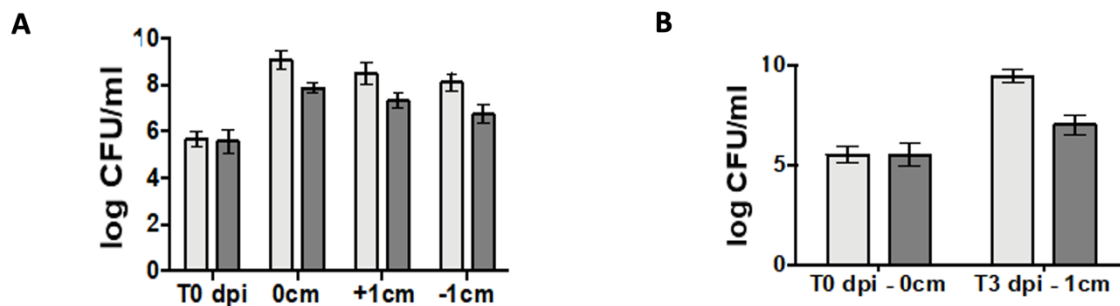


Figura 12. El número de bacterias silvestre es mayor que el número de bacterias de la mutante Δ *exl1* durante la infección de plantas de papa. A) Cuenta en placa de bacterias silvestres (barras grises claro) y Δ *exl1* (barras grises oscuro) provenientes de peciolo de papa a los 0 cm, + 1 cm y – 1 cm del sitio de inoculación a los 3 días después de la infección. T0 indica el número de células inoculadas inicialmente en el tejido. **B)** Cuenta en placa de bacterias silvestres (barras grises claro) y Δ *exl1* (barras grises oscuro) provenientes de tubérculos de papa en el momento de la inoculación (T0 dpi - 0 cm) y a

los tres días de la inoculación (T3 dpi - 1cm). Las barras de error corresponden a la desviación estándar de tres experimentos independientes.

Por lo tanto, para descartar que el menor número de células observado en la mutante se debiera a que la mutante $\Delta ex1$ fuera más susceptible a las defensas de la planta, tales como la producción de especies reactivas de oxígeno, decidimos determinar la sensibilidad de las cepas ante el estrés oxidativo, por lo que ambas cepas fueron crecidas en presencia de 2.5 M, 4 mM o 750 μ M de peróxido de hidrógeno (H_2O_2 , (36)). Determinamos la cinética de crecimiento de la cepa silvestre y de $\Delta ex1$ en medio LB al que se le agregó H_2O_2 en los tiempos 0, 5, 10 y 15 min y cuantificamos las UFC sobrevivientes. Observamos supervivencia de las bacterias solamente en presencia de 750 μ M de H_2O_2 , condiciones en las que las cepas silvestre y $\Delta ex1$ presentan una supervivencia comparable (Figura 13A), lo que sugiere que las defensas de la planta relacionadas con el estrés oxidativo no son las responsables del menor número de células que observamos durante la infección en la cepa mutante $\Delta ex1$ (Figura 11). Además, debido a que en el contexto genómico de la expansina se encuentra río arriba el gen OsmC que es inducible osmóticamente, evaluamos el crecimiento de las cepas silvestre y mutante en un medio hiperosmótico, para lo que sembramos diluciones seriadas de cultivos en placas de medio LB o LB conteniendo NaCl al 2.5 % o al 5%, y observamos que ambas cepas presentaron crecimiento comparable a las 24 h en las placas de medio LB, a las 48 h en las placas de LB + NaCl al 2.5 % (Figura 13B) y a las 72 h en las placas de LB + NaCl al 5 % (no mostrado), lo que indica que la mutante no es más sensible al estrés hiperosmótico.

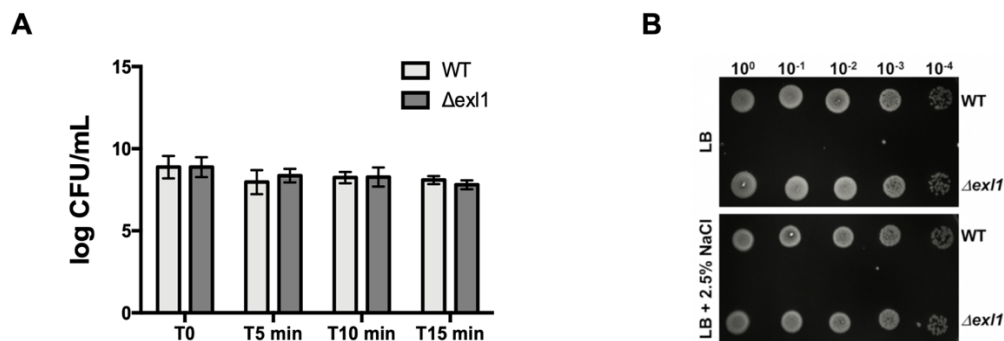


Figura 13. Las cepas de *P. atrosepticum* silvestre y mutante presentan sensibilidad comparable al estrés oxidativo e hiperosmótico. A) Cinética de supervivencia de la cepa silvestre (barras grises claro)

y $\Delta ex/1$ (barras grises oscuro). Las unidades formadoras de colonias de cada cepa se midieron a las 0, 5, 10 y 15 min después de la adición de H_2O_2 . Los datos provienen de tres experimentos independientes. Las barras de error corresponden a la desviación estándar de los experimentos. No se observaron diferencias significativas de acuerdo con la prueba t de Student. **B)** El crecimiento de las cepas silvestre (WT) y mutante ($\Delta ex/1$) se evaluó en placas de medio LB y LB suplementado con NaCl 2.5% por 24 horas en LB y 48 horas en el caso de las placas con sal. Imágenes representativas de al menos 3 experimentos independientes.

Posteriormente, decidimos determinar si el fenotipo del menor número de bacterias mutantes en la infección era debido a algún defecto en su crecimiento. Para contestar esto determinamos la cinética de crecimiento *in vitro* de las cepas de *P. atrosepticum* silvestre y mutante $\Delta ex/1$ en medio líquido LB (Figura 14A) y medio mínimo suplementado con pectina (Figura 14B), así como *in planta* utilizando hojas de papa inoculadas mediante vacío (que introduce a las bacterias al interior de las células vegetales, Figura 14C). Observamos que las cinéticas de crecimiento en ambos medios de cultivo y el número de bacterias dentro del tejido son comparables entre ambas cepas. Una observación importante fue que en los experimentos *in planta* no hubo diferencias en el grado de virulencia entre ambas cepas ya que las hojas infiltradas con ambas cepas se tornaron transparentes y al intentar tomarlas se deshacían debido al alto grado de maceración de tejido (no mostrado) a diferencia de lo observado en los ensayos de maceración previamente descritos en los que se permitió que las bacterias penetraran al tejido por sus propios medios (Figura 9). Debido a esto, decidimos estudiar si la actividad de las principales PCWDEs (29), era comparable entre las cepas silvestre y $\Delta ex/1$. Esto lo investigamos realizando ensayos de actividad en placa inoculando *P. atrosepticum* silvestre o mutante en placas de LB suplementadas con sustratos para celulasas, proteasas o pectinasas. Observamos que en todos los casos el halo de actividad (que corresponde a la actividad enzimática) fue similar en la silvestre y la mutante $\Delta ex/1$ (Figura 15), lo que sugiere que la capacidad enzimática para degradar la pared celular del hospedero de $\Delta ex/1$ no se encuentra afectada y es comparable a la silvestre. En conjunto, estos datos sugieren que el potencial infectivo de la cepa $\Delta ex/1$ está afectado en la fase de colonización del tejido, es decir en el mecanismo por el que la bacteria penetra a la

planta y la coloniza. Sobre esto, resultados similares se observaron en la mutante nula *RsΔEXLX* de *R. solanacearum*, que presenta una disminución de la infectividad al inocularla en las raíces, debido a que las células se super-adhieren a este tejido, sin embargo, la cepa mutante muestra síntomas de enfermedad similares a la cepa silvestre al ser directamente introducida en el xilema de tomate (16), lo que sugiere que otros mecanismos de virulencia no se encuentran afectados.

Debido a que en *R. solanacearum* la ausencia de la expansina afecta la interacción de las bacterias con las raíces, estudiamos si la mutante nula $\Delta exl1$ de *P. atrosepticum* presentaba hiper-adhesión a las raíces de papa. Las raíces se inocularon por una hora con una suspensión de células de la cepa silvestre o la mutante $\Delta exl1$ y cuantificamos las UFC que se adhirieron a las raíces. La cepa silvestre y la cepa $\Delta exl1$ se adhieren a las raíces de papa en una proporción similar, presentando un número semejante de UFC (Figura 16), lo que sugiere que la capacidad de adhesión a las raíces es comparable en la cepa silvestre y la mutante $\Delta exl1$.

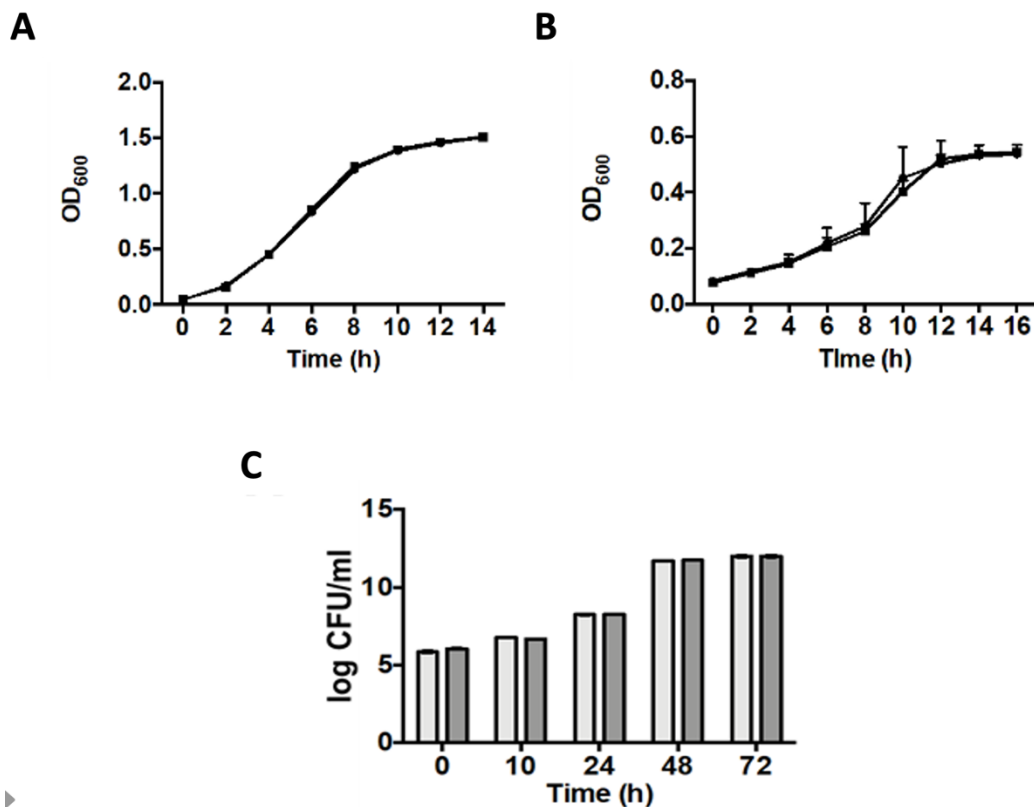


Figura 14. Crecimiento de las cepas silvestre y $\Delta ex11$ *in vitro* e *in planta*. Curvas de crecimiento de las cepas silvestre (círculo) y mutante (cuadrado) en **A)** medio LB y **B)** medio mínimo con pectina. Las barras de error corresponden a la desviación estándar de tres experimentos independientes. **C)** Cuentas en placa de bacterias silvestres (barras grises claro) y $\Delta ex11$ (barras grises oscuro) provenientes de hojas de papa infiltradas mediante vacío (que introduce las bacterias al interior del tejido) a los tres días después de la inoculación. Las barras de error corresponden a la desviación estándar de tres experimentos independientes. No se observaron diferencias significativas de acuerdo con la prueba t de Student.

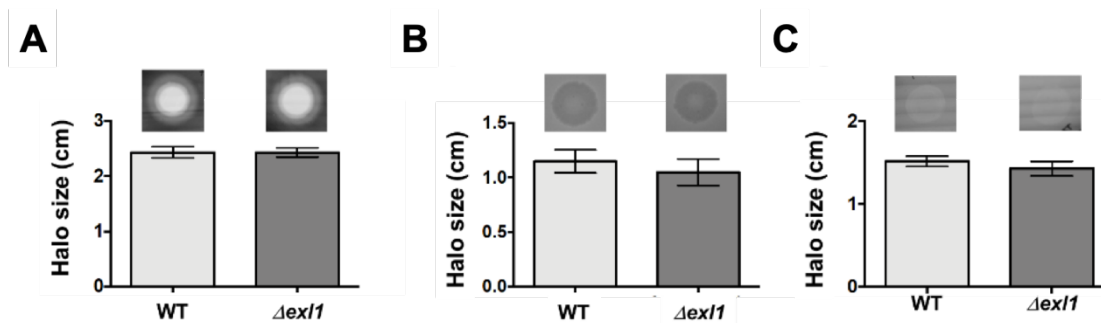


Figura 15. La actividad de las principales PCWDEs es comparable en la cepa silvestre y la mutante. La actividad de la cepa silvestre (barras grises claro) y $\Delta ex11$ (barras grises oscuro) se midió en placas con sustratos para **A)** celulasas, **B)** proteasas y **C)** pectinasas. Las barras de error corresponden a la desviación estándar de tres experimentos independientes. No se observaron diferencias significativas de acuerdo con la prueba t de Student. Imágenes representativas de las placas de actividad.

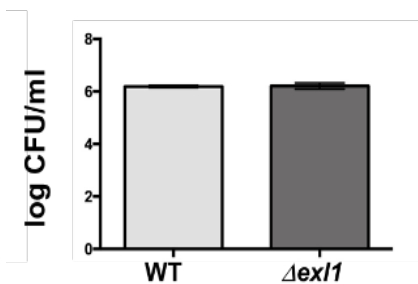


Figura 16. La adhesión a las raíces de papa es similar en las cepas silvestre y $\Delta ex11$. Las raíces de papa se incubaron con una suspensión de 10^4 células de *P. atrosepticum* silvestre (barras grises claro) y mutante (barras grises oscuro), posteriormente se lavaron y molieron. Las unidades formadoras de colonias adheridas a las raíces se calcularon de diluciones seriadas en placas de medio selectivo suplementado con pectina y cristal violeta. Las barras de error corresponden a la desviación estándar

de tres experimentos independientes. No se observaron diferencias significativas de acuerdo con la prueba t de Student.

IV.3. DISCUSIÓN CAPÍTULO IV.

Los factores de virulencia son moléculas producidas por los patógenos que aumentan la eficacia de la infección (51). En el caso del gen de la expansina, *ex11*, observamos que se expresa durante la infección de *P. brasiliense* y *P. atrosepticum*. Además, una mayor expresión de *ex11* está correlacionada con una mayor virulencia, mientras que la eliminación de este gen disminuye los síntomas de infección, por lo tanto, *ex11* puede ser considerado como un factor de virulencia.

Los resultados descritos en este capítulo indican que la mutante $\Delta ex11$ muestra una reducción en los síntomas de infección relacionada con una menor cantidad de bacterias en sitios distantes del sitio de inoculación comparada con la cepa silvestre. Sin embargo, cuando la mutante $\Delta ex11$ se infiltran directamente al interior de las hojas de papa (mediante vacío) presenta una maceración similar a la silvestre, concordando con la actividad de las principales PCWDEs que es comparable entre ambas cepas, lo que sugiere que la virulencia dependiente de enzimas digestivas de la mutante $\Delta ex11$ no se encuentra afectada. La capacidad de crecimiento de la mutante tampoco se encuentra afectada, como corroboramos en las cinéticas de crecimiento *in vitro* e *in planta*. En su conjunto, estos datos sugieren que la mutante $\Delta ex11$ se encuentra afectada en su capacidad de colonizar o penetrar los tejidos del hospedero. Esto coincide con lo reportado para la mutante *Rs Δ EXLX* de *R. solanacearum* que se superadhiera a las raíces previniendo la colonización del tejido (16), así como lo reportado para *E. tracheiphila* donde la mutante nula de expansina presenta menores síntomas de infección relacionados con un defecto en la movilidad de las bacterias (25) y con los reportes en el nemátodo *Heterodera avenae* que relacionan a la proteína tipo expansina *HaEXPB2* con la penetración y migración durante la infección (26). Esta participación de expansinas de bacterias y nemátodos en la penetración se asemeja a la función que presenta la expansina *EXPB1* de maíz, que permite la penetración del tubo polínico a través del estigma y el estilo (52,53).

Además, observamos que *PbExl1* tiene la capacidad de recuperar el fenotipo de infección de la silvestre mientras que *BsEXLX1* no, lo que podría estar relacionado con la capacidad de liberar polisacáridos que presenta *PbExl1* en contraste con *BsEXLX1*. Con respecto a esto, en el caso de *X. fastidiosa* se ha reportado que la actividad de la expansina durante la infección está relacionada con la cantidad de xiloglucanos fucosilados presentes en el xilema del hospedero, y se ha sugerido que la expansina podría actuar en entre los enlaces no covalentes de la celulosa y los xiloglucanos (24). Esto sugiere que, durante el proceso de infección, las expansinas podrían interaccionar y liberar un polisacárido de la pared celular de su hospedero. Dado que la expansina de *P. brasiliense* (*Exl1*) se localiza en una zona rica en pectina de las paredes del xilema, y que la señal detectada en el sobrenadante de tejido vascular de acelga incubados con *PbExl1* a 310 nm corresponde a un posible ácido fenólico esterificado a pectina, sugiere que el polisacárido liberado *in vivo* sea pectina, aunque no se descarta la posibilidad que pudiera ser hemicelulosa (47). En conjunto, estos datos sugieren que las expansinas de bacterias podrían tener un mecanismo similar a EXPB1 del polen de maíz que actúa sobre los enlaces no covalentes entre los hsGAX y lsGAX, liberando hsGAX y permitiendo así la penetración del tubo polínico (52,53). En el caso de las bacterias, las expansinas podrían liberar algún fragmento derivado de pectina o hemicelulosa permitiendo así la penetración del hospedero.

IV.4. CONCLUSIÓN CAPÍTULO IV.

Nuestros resultados sugieren que la expansina *Exl1* de *Pectobacterium* es un factor de virulencia que podría actuar de manera similar a las β -expansinas de plantas durante el proceso de infección, facilitando el movimiento de las bacterias a través del tejido vegetal (Figura 17).

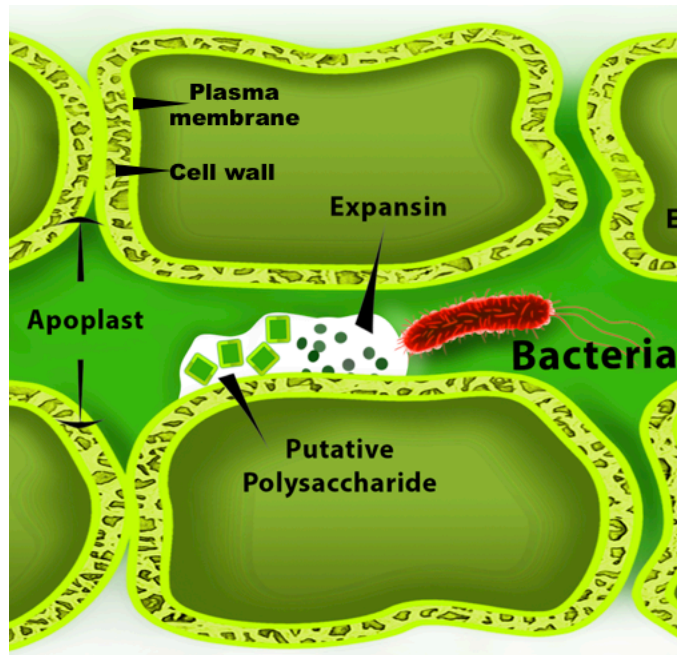


Figura 17. Representación del papel propuesto para la expansina Ex11 durante el proceso de infección. *Pectobacterium* secreta la expansina Ex11 lo que permite su movimiento posiblemente mediante la liberación de polisacáridos de la pared celular, lo que facilita la colonización del hospedero. Figura tomada de (17).

IV.5. PERSPECTIVAS CAPÍTULO IV.

Para corroborar la participación de la expansina durante la colonización del hospedero, se podrían realizar ensayos de seguimiento de célula única mediante microscopía de fluorescencia para observar su migración en los tejidos.

Además, valdría la pena analizar si otras expansinas bacterianas tienen la capacidad de solubilizar polisacáridos del tejido vegetal. Para estos ensayos, habría que considerar estudiar la actividad de las expansinas bacterianas teniendo en cuenta el rol ecológico de cada bacteria, así como la composición de la pared celular de los tejidos con los que interacciona en el hospedero.

- Por ejemplo, determinar si la expansina de *B. subtilis* que no presenta solubilización de polisacáridos en ensayos *in vitro* utilizando paredes celulares de haces vasculares de acelga, es capaz de solubilizar polisacáridos de raíces de maíz, que es el sustrato con el que interacciona naturalmente.

CAPÍTULO V.

V. LA EXPANSINA *Exl1* DE *Pectobacterium* ES UNA PROTEÍNA EFECTORA QUE INDUCE RESPUESTAS DE DEFENSA EN *A. thaliana*.

V.1 ANTECEDENTES DIRECTOS CAPÍTULO V.

V.1. Expansinas en la respuesta inmune en plantas.

Las plantas poseen un sistema inmune innato para detectar y responder contra el ataque de patógenos (54,55). Moléculas conservadas y esenciales de patógenos, tales como los lipopolisacáridos (LPS), el factor de elongación Tu (EF-Tu) o la flagelina son patrones que las plantas pueden detectar; estas moléculas son llamadas patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs (56–58)). Así mismo, para iniciar la infección, los patógenos invaden el tejido vegetal degradándolo, lo que causa que se liberen moléculas propias de la planta como polisacáridos de la pared celular o proteínas citosólicas, nucleótidos y aminoácidos que pueden ser detectadas como señales endógenas de daño, por lo que son llamadas patrones moleculares asociados a daño (DAMPs (59)). Los receptores transmembranales de reconocimiento de patrones (PRRs) perciben estos patrones exógenos o endógenos y desencadenan una cascada de respuesta que culmina en la inmunidad activada por patrones (PTI) para detener la infección (55). Por su parte, durante la infección, los patógenos secretan factores de virulencia o moléculas efectoras, que interfieren con los procesos celulares de la planta suprimiendo la respuesta inmune (60). Estas moléculas son reconocidas por receptores que presentan un dominio de unión a nucleótidos y repeticiones ricas en leucina (NB-LRR) desencadenando un segundo mecanismo de defensa llamado inmunidad activada por efectores (ETI) que generalmente activa la muerte celular programada en el sitio de infección conocida como respuesta hipersensible (HR) y la acumulación de ácido salicílico para inducir la resistencia sistémica (ISR) o la resistencia sistémica adquirida (SAR) en la planta y detener la infección (54,55,60).

Se ha reportado que las proteínas tipo expansinas *HaEXPB1* y *HaEXPB2* del nemátodo *Heterodera avenae* que presentan los dominios invertidos (D2-D1) activan la respuesta de defensa de *Nicotiana benthamiana* después del pretratamiento con la expansina. La infiltración de las expansinas purificadas EXPB1 y EXPB2 en hojas de *N. benthamiana* induce bajos niveles de muerte celular. Esta muerte celular es dependiente de la proteína silvestre, ya que versiones mutantes en las que se eliminó por completo el dominio D2 o el D1 (ambos necesarios para la actividad de la proteína) no inducen muerte celular, sugiriendo que la activación de las defensas de respuesta del hospedero es debida a la actividad de estas proteínas (26). Las ceratoplataninas (CPs), que son otras proteínas tipo-expansina que sólo presentan el dominio D1, han sido ampliamente estudiadas a nivel de la respuesta inmune que provocan en la planta, mostrando resultados similares en cuanto a la inducción de la muerte celular. Se ha reportado que la infiltración de las CPs de *Ceratocystis platani* (CP), *Ceratocystis populicola* (Pop1), *Magnaporthe oryzae* (MgSM1) y *Fusarium oxysporum* (FocCP1) activan la producción de ROS, las vías del ácido jasmónico (JA (61,62)) y de ácido salicílico (SA (61,63–65)) induciendo SAR (66) y la muerte celular (61–64,67,68) en las hojas de diferentes especies de plantas. En el caso de la infiltración de las CPs de *Verticillium dahlia* (VdCP1), *Trichoderma virens* (Sm1) y *Trichoderma atroviride* (Epl1) inducen ROS y las vías de JA y SA sin generar muerte celular en distintos hospederos (69–71). Estas respuestas de defensa activan un efecto de ‘priming’ en el hospedero, que es un proceso por el que se induce la resistencia de la planta, y está asociada con una mayor capacidad de inducir las vías de defensa y responder así de manera más rápida a futuras infecciones (72), lo que le provee protección contra diversos patógenos (61–65).

V.2 RESULTADOS CAPÍTULO V.

V.2.1 El pretratamiento de *Apium graveolens* y *Arabidopsis thaliana* con la expansina de *Pectobacterium* podría modificar la pared celular, resultando en la protección contra la infección de patógenos.

Como se mencionó anteriormente, la función de la expansina del polen de maíz EXBP1 participa en el crecimiento del tubo polínico, facilitando su penetración mediante la solubilización de glucoarabinoxilanos de la pared celular de seda de maíz (9).

En el capítulo IV de este trabajo se sugirió que la expansina de *Pectobacterium* podría presentar una función similar durante la infección, en la que podría ser necesaria la liberación de polisacáridos de la pared celular del hospedero para la penetración de las bacterias al tejido. Para determinar si *PbExl1* tiene la capacidad de modificar la pared celular de las plantas decidimos infiltrar la proteína *Exl1* purificada en tejidos vegetales, con el objetivo de observar si la actividad de la expansina reportada *in vitro* (solubilización de polisacáridos (47)) podía ser detectada *in planta*, lo que encendería los mecanismos de defensa de las plantas, de forma similar a como ha sido reportado para las proteínas tipo expansina de nemátodos (26).

Para estudiar esto, decidimos infiltrar peciolo de apio con 3.7 μ M de la expansina purificada de *PbExl1* o sólo con el buffer en el que la proteína es re-suspendida como control (mock), estos peciolo se incubaron por 24 horas y posteriormente los retamos con *P. brasiliense* BF45 (inoculando los peciolo e incubándolos por 24 horas más), los resultados se obtuvieron cuantificando la pérdida de peso de los peciolo. En estos ensayos, una posibilidad era que si la expansina modifica la pared celular como es nuestra hipótesis, la planta pretratada con *PbExl1* debería prender sus respuestas de defensa y por lo tanto sería más resistente a la infección en contraste con los peciolo no tratados. La otra posibilidad es que si *Exl1* solubiliza polisacáridos de la pared celular, el pretratamiento con esta proteína podría remodelar la pared celular y facilitar el acceso del patógeno haciendo a las hojas más susceptibles a la infección. Observamos una reducción del 60% en la maceración de tejido (medida como pérdida de tejido por maceración) en los peciolo pretratados con *PbExl1* en comparación con los apio control (Figura 18A), por lo que el pretratamiento con la expansina provocó un efecto de protección contra el patógeno. Para saber si este efecto de protección se debía a la actividad de la proteína, decidimos repetir los experimentos utilizando versiones mutadas de *PbExl1* que no presentan actividad: una está afectada en el residuo D83 que es necesario para la actividad de aflojamiento (D83A en el D1) y la otra presenta mutaciones en los tres aminoácidos necesarios para la unión al sustrato y por lo tanto la actividad de aflojamiento Y125A/W126A/Y157A (YWY en D2) (15). En ambos casos observamos el mismo nivel de maceración que el control mock, es decir, el pretratamiento con *PbExl1* mutantes no activas, no proporcionó protección a

los peciolos contra la infección de *P. brasiliense* (Figura 18A), lo que sugiere que la planta induce la protección sólo ante la actividad de la proteína.

Para poder analizar más a fondo cómo es que se activa la protección por *PbExl1*, decidimos utilizar una planta modelo que nos permitiera emplear una mayor cantidad de herramientas moleculares para caracterizar el fenotipo; en este caso usamos *A. thaliana*. Por lo tanto, infiltramos hojas de *A. thaliana* con 3.7 μM de la expansina purificada de *PbExl1* o el buffer control (mock), estas hojas se incubaron por 24 horas y posteriormente las retamos con *P. brasiliense* BF45 (inoculando las hojas con una gota conteniendo una suspensión de bacterias e incubándolas por 24 horas más), los resultados se obtuvieron cuantificando el porcentaje de incidencia, que es el número de hojas infectadas con respecto a las no infectadas. Observamos nuevamente que las hojas pretratadas con *PbExl1* proveyeron protección contra la infección a las 24 y 48 horas, y esta protección se empezó a perder a las 72 horas posteriores a la inoculación cuando posiblemente la población del patógeno sobrepasa la respuesta inmune de la planta, en comparación con el control que presentó 25% más incidencia desde las 24 horas (Figura 18B). En estos experimentos con hojas de *A. thaliana* también incluimos las mutantes no activas de *PbExl1* (D83A o YWY) y la expansina de *B. subtilis* *BsEXLX1* que se ha reportado que no presenta la capacidad de solubilizar polisacáridos (47). Observamos que las hojas pretratadas con *BsEXLX1*, D83A o YWY presentaron niveles de incidencia comparables con el control mock, por lo que no indujeron el efecto de protección contra el patógeno (Figura 18B).

Esto sugiere que la actividad de la expansina, posiblemente relacionada con su capacidad para solubilizar polisacáridos, más que la proteína misma (como es el caso de otras proteínas de origen bacteriano como flagelina) es detectada por la planta, resultando en la activación de la respuesta inmune y protegiendo a la planta contra la infección de *P. brasiliense*. Decidimos estudiar el efecto de concentraciones variables de expansina como una medida indirecta de la actividad de la expansina. Para lo cual infiltramos hojas de *A. thaliana* con diferentes concentraciones de *PbExl1* purificada y después del reto con *P. brasiliense* encontramos que hay una correlación entre la concentración de *PbExl1* infiltrada y el efecto de protección: a mayor concentración - y por lo tanto una mayor cantidad de proteínas actuando sobre la pared-, la protección

contra el patógeno se incrementa (Figura 18C). Estos resultados apoyan que la actividad de la expansina es necesaria para la inducción de la inmunidad de la planta. Posteriormente decidimos estudiar si el pretratamiento con *PbExl1* protegía contra otros patógenos cómo el hongo *Botrytis cinerea*. Las hojas de *A. thaliana* se infiltraron con *PbExl1* purificada, y después de 24 h se retaron con *B. cinerea* y se cuantificó el porcentaje del área de infección después de incubarlas por 24 h más. Observamos que después del reto, las hojas pretratadas con *PbExl1* presentaron un área de infección ~67% menor en contraste con las hojas pretratadas con el control (mock), indicando que la respuesta estimulada por *PbExl1* es una respuesta general e inespecífica que provee protección contra otro patógeno (Figura 18D). Todos estos datos en conjunto sugieren que la actividad de Exl1 es necesaria para inducir la respuesta inmune del hospedero, y probablemente esté relacionada con la solubilización de polisacáridos que serían reconocidos por la planta como DAMPs.

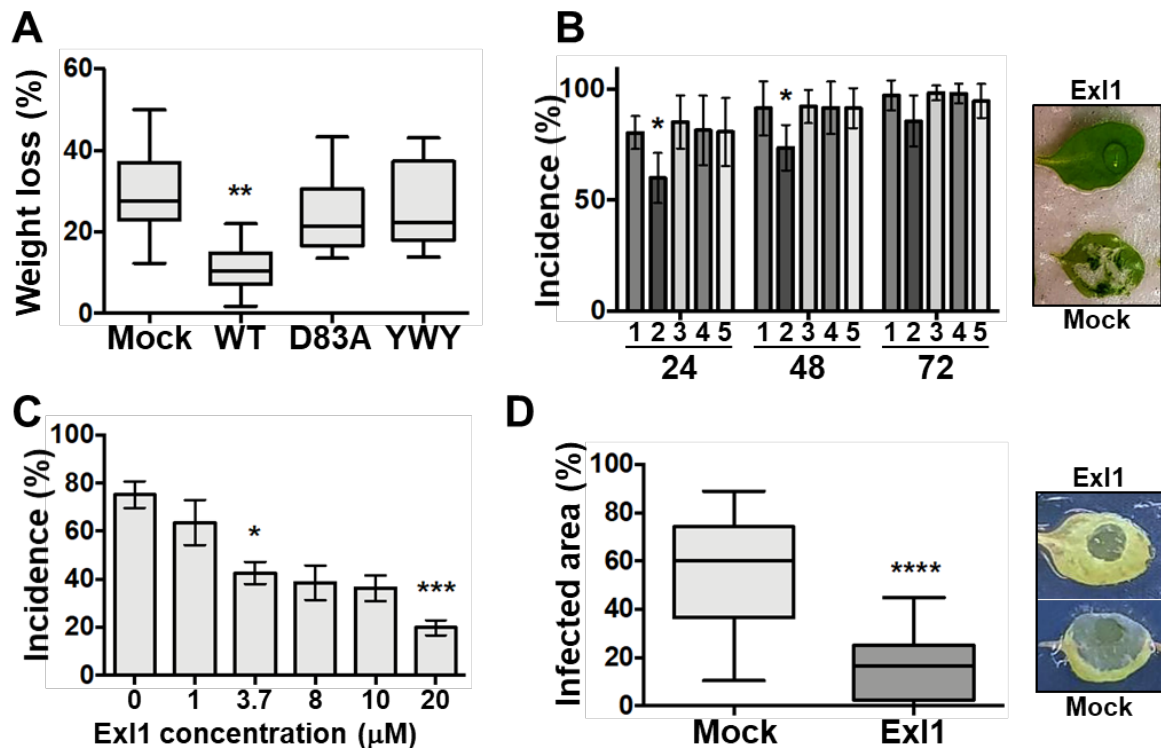


Figura 18. *PbExl1* provee protección contra patógenos en apio y *A. thaliana*. A) La maceración de tejido en peciolo de apio, previamente infiltrados con 3.7 μM de *PbExl1* pura, disminuye después de 48 h de su inoculación con *P. brasiliense* BF45, en comparación con la infiltración utilizando buffer

(mock) o las mutantes no activas D83A y Y125A/W126A/Y157A (YWY). Gráficas de caja obtenidas de tres experimentos independientes (n=35); $p < 0.001$ (**), diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Kruskal-Wallis para datos no paramétricos. **B)** La incidencia de hojas maceradas en *A. thaliana* también disminuye a las 24 h después del reto con el patógeno *P. brasiliense* BF45, en hojas previamente infiltradas e incubadas por 24 h con *PbExl1* (barra #2), a diferencia del buffer (barra #1), o de las hojas infiltradas con EXLX1 de *B. subtilis* (barra #3), la mutante D83A (barra #4) o YWY (barra #5). Esta protección se mantiene a las 48 h y se pierde a partir de las 72 h. Las barras de error indican la desviación estándar de tres experimentos independientes (n=105); $p < 0.01$ (*) diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Kruskal-Wallis para datos no paramétricos. **C)** La protección conferida por *PbExl1* es dependiente de la concentración de proteína infiltrada, mostrando mayor protección contra el reto con *P. brasiliense* a concentraciones más altas. Las barras de error indican la desviación estándar de tres experimentos independientes (n=60); $p < 0.01$ (*), $p < 0.001$ (**), diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Kruskal-Wallis para datos no paramétricos. **D)** Este efecto de protección en hojas de *A. thaliana*, también se observa contra la infección del hongo *Botrytis cinerea*. Las gráficas son el resultado de al menos tres experimentos independientes (n=43); $p < 0.0001$ (***), diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Kruskal-Wallis con corrección de Dunn's para datos no paramétricos.

V.2.2. La expansina *PbExl1* induce una respuesta inmune en la planta, en la que participan especies reactivas de oxígeno (ROS) y las vías de etileno (ET), ácido jasmónico (JA) y ácido salicílico (SA).

Como siguiente paso, decidimos caracterizar parte de la respuesta inmune que es inducida por la actividad de *PbExl1* en *A. thaliana*. Una de las primeras respuestas de defensa de la planta es la elevación de los niveles de ROS que se producen en olas de aumento y disminución de la concentración (ya que su acumulación resultaría tóxica para la planta), por lo tanto, decidimos evaluar la acumulación de ROS a los tiempos 30 y 90 min después de la infiltración de la proteína. Las hojas de *A. thaliana* se infiltraron con las proteínas purificadas *PbExl1*, EXLX1 de *B. subtilis* o la mutante YWY y se incubaron con el marcador fluorescente dicloro-dihidro-diacetato (DCFH-DA) que es un reportero de ROS intracelular. Observamos que a los 30 minutos de la infiltración la intensidad de fluorescencia fue ~50% mayor en las hojas pretratadas con *PbExl1*, a diferencia de las infiltradas con *BsEXLX1*, YWY o con el control (mock) (Figura 19A). A los 90 minutos de la infiltración vimos que la intensidad de fluorescencia seguía siendo ~40% mayor en las hojas infiltradas con *PbExl1* en

contraste con el control (Figura 19B), sin embargo la intensidad de fluorescencia a los 90 minutos fue menor que a los 30 minutos, lo que concuerda con la ola de producción de ROS por las plantas (73).

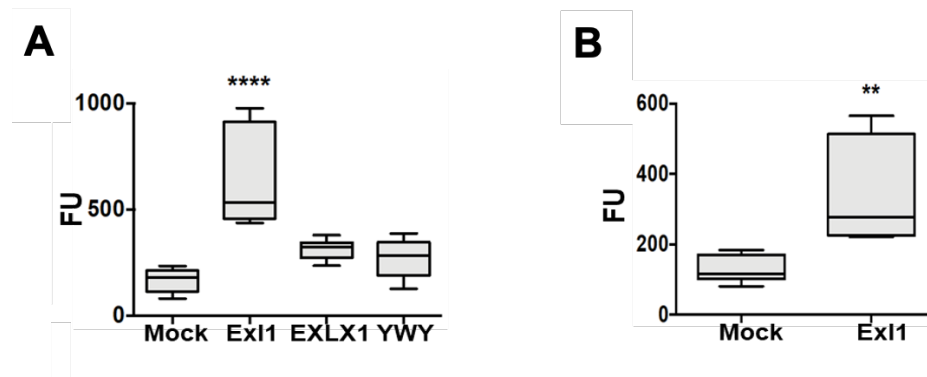


Figura 19. *PbEx11* induce la producción de ROS. A) La producción de ROS se observa a los 30 min después de la infiltración con 3.7 μ M de *PbEx11* en hojas de *A. thaliana* utilizando (DCFH-DA), en comparación con las infiltradas con buffer, *BsEXLX1* o la mutante YWY. **C)** A los 90 min después de la infiltración aún se observa fluorescencia en las hojas infiltradas con *PbEx11*, pero en menor proporción que a los 30 min. La producción de ROS se cuantificó mediante la medición del área de fluorescencia de las hojas, utilizando el software Fiji. FU corresponde a las unidades de fluorescencia en pixeles/cm². Gráficas de caja obtenidas de tres experimentos independientes (n = 12); p < 0.001 (**), p < 0.00001 (****), diferencias significativas de acuerdo con la prueba ANOVA de una vía.

Para identificar otras vías que pudieran participar en la respuesta activada por *PbEx11* utilizamos genes marcadores de las vías de ácido jasmónico (JA), etileno (ET) y ácido salicílico (SA) que participan en la respuesta a la infección de necrófitos (74) como *B. cinerea*, además se ha reportado que durante la infección por *P. carotovorum* se inducen las vías de JA y ET en *A. thaliana* (75), y cuantificamos su expresión mediante RT-qPCR. Para estos ensayos, extrajimos ARN total de hojas a los tiempos: 5 minutos, 1 hora y 24 horas después de la infiltración con *PbEx11*. Así mismo estudiamos el tiempo 24 horas después del reto con *P. brasiliense* BF45. Como control se utilizó ARN de hojas infiltradas solo con buffer en los mismos tiempos. La expresión de ambos tratamientos fue normalizada tomando como referencia la expresión del gen constitutivo de actina. Para saber si la vía de ácido jasmónico (JA) participaba, analizamos los genes marcadores 'Plant defensin 1.2' (*PDF1.2*) y 'Allene oxide synthase' (AOS). Se observó una fuerte inducción de los transcritos de ambos

genes a los 5 min y 1 hora después de la infiltración con *PbExl1* (Figura 20A-B). En el caso de AOS el nivel de transcrito también aumentó a las 24 horas del pretratamiento con *PbExl1* y se observó su inducción a las 24 horas de la interacción con el patógeno (Figura 20B). Con respecto a la vía de etileno (ET) evaluamos su participación utilizando el gen marcador 'Phatogenesis-related 4' *PR4*. Observamos una mayor acumulación de transcritos 5 min y 1 hora después de la infiltración de *PbExl1*, además, el perfil de expresión de *PR4* fue muy similar al observado para *PDF1.2* (Figura 20A), lo que concuerda con el sinergismo reportado en las vías de JA y ET durante la respuesta inmune en plantas (Figura 20C). Para estudiar la vía de ácido salicílico (SA) evaluamos los genes 'Phatogenesis-related 1' (*PR1*) y 'Enhanced disease suceptibility 5' (*EDS5*), para los que observamos inducción del transcrito de ambos genes una hora después del pretratamiento con *PbExl1* (Figura 20D, E). Estos datos en conjunto sugieren que las vías de JA, ET y SA participan en la respuesta inmune inducida por *PbExl1*.

Para confirmar que estas vías están involucradas en la respuesta a *Exl1*, utilizamos las mutantes de *A. thaliana jar-1* (37) y *eds5* (38), afectadas en las vías de JA y SA respectivamente, y la línea transgénica *nahG* (39) que es deficiente en la acumulación de SA. Las hojas de estas plantas se infiltraron con 3.7 μ M de *PbExl1* purificada *PbExl1* y posteriormente se realizó el reto con *P. brasiliense* BF45. Observamos que en los tres casos las plantas tratadas con *PbExl1* perdieron el efecto de protección, e incluso resultaron más susceptibles a la infección del patógeno (Figura 21), en contraste con lo observado anteriormente en plantas silvestres de *A. thaliana*. Lo que corrobora que las vías de JA y SA son necesarias para la activación de la respuesta inmune inducida por *PbExl1*.

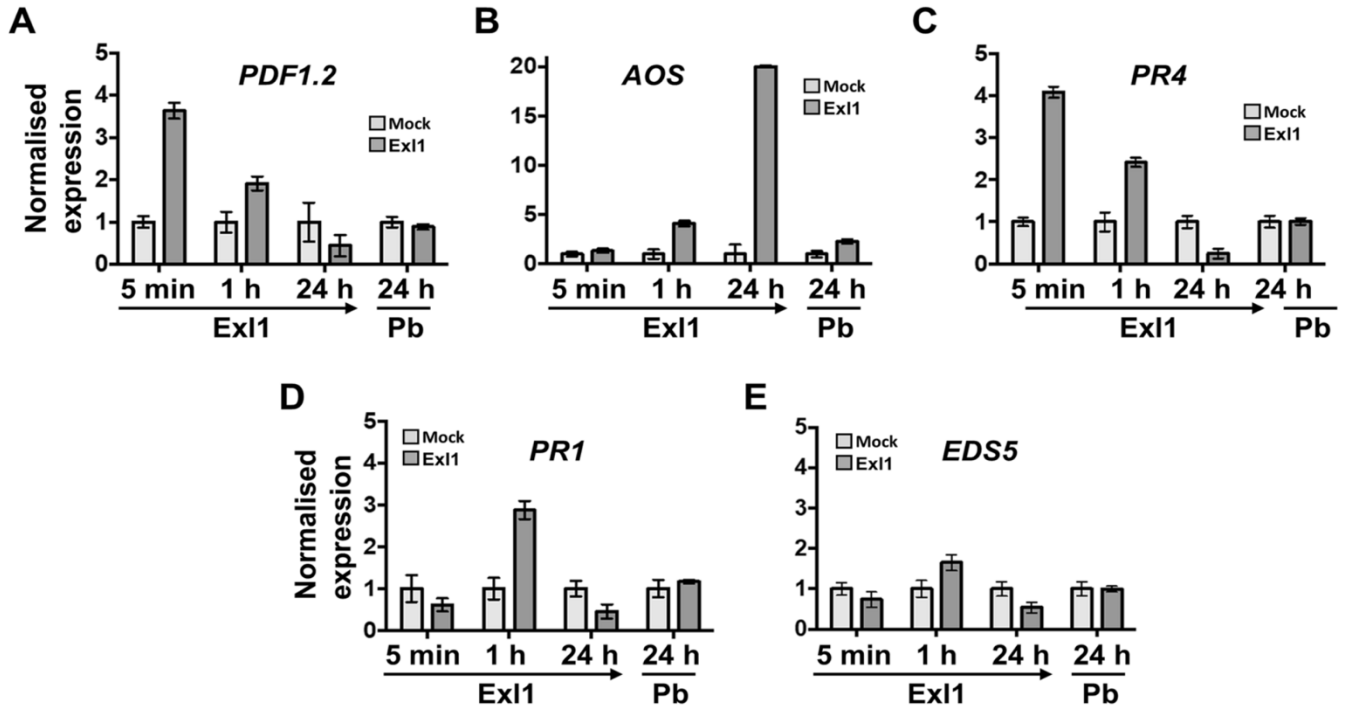


Figura 20. *PbEx11* induce la respuesta inmune en hojas de *A. thaliana*. Análisis de la expresión mediante RT-qPCR de los genes marcadores de: JA **A)** *PDF1.2* y **B)** *AOS*, ET **C)** *PR4* y SA **D)** *PR1* y **E)** *EDS5*. La expresión se observó en muestras a los 5 min, 1 h y 24 h después de la infiltración con 3.7 μ M de *PbEx11* (barras grises oscuro) o el buffer como control (barras grises claro). También se colectó una muestra a las 24 h después de la inoculación de las hojas con *P. brasiliense* BF45 (estas hojas se infiltraron previamente con *PbEx11* y se incubaron por 24 h antes del reto con el patógeno). Los datos se normalizaron utilizando el gen de actina como referencia. Resultados promedio de tres experimentos independientes.

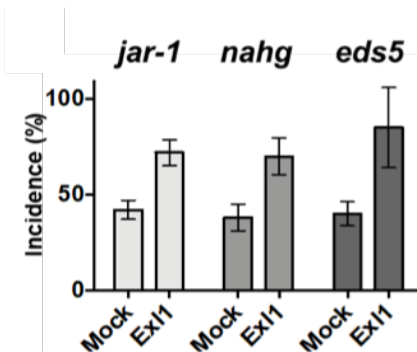


Figura 21. Las vías de JA y SA son necesarias para la inducción de la respuesta inmune por *PbEx11*. Las plantas de *A. thaliana* afectadas en las vías de JA (*jar-1*) y SA (*nahG* y *eds5*) pierden la protección conferida por la infiltración de *PbEx11*, e incluso se vuelven más susceptibles a la infección por *P. brasiliense* BF45, en comparación con las hojas infiltradas con el buffer (mock). La gráfica es el

resultado de al menos tres experimentos independientes (n=70). Las barras de error corresponden a la desviación estándar de los experimentos. No se presentaron diferencias significativas de acuerdo con la prueba Mann-Whitney para datos no paramétricos.

V.3 DISCUSIÓN CAPÍTULO V.

La actividad de *PbExl1* es necesaria para inducir el efecto de protección contra *P. brasiliense* y *B. cinerea* en dos hospederos diferentes apio y *A. thaliana*, mientras que las mutantes no activas D83A y YWY, así como la expansina *BsEXLX1* que no presenta la capacidad de solubilizar polisacáridos (47) no presentan protección en *A. thaliana*. Esto sugiere que la actividad de la proteína, de la que se sabe que tiene su blanco en la pared celular, podría provocarle algún tipo de modificación hasta ahora desconocido (48). Sin embargo, estudios previos de nuestro laboratorio han mostrado que en reacciones *in vitro* Exl1 libera un polisacárido a partir de haces vasculares aislados de acelga, por lo que podríamos extrapolar una modificación similar *in vivo*, en la que Exl1 libera o desplaza un polisacárido de su localización normal en la pared celular, que eventualmente sería detectado como un DAMP por algún receptor de patrones propios en la membrana de las células del hospedero, estímulo que activaría la inmunidad por la vía PTI. Con respecto a la identidad del posible polisacárido desplazado por *PbExl1*, se ha sugerido que en el caso de los haces vasculares de acelga, podría ser pectina (como se discutió en el capítulo IV.3) debido a que *PbExl1* se localiza específicamente en la lamela media que es una zona compuesta principalmente por pectina, además de que los sobrenadantes de tejidos vasculares de acelga incubados con *PbExl1* presentan un pico en el espectro de absorción a 310 nm que pudiera corresponder a algún ácido fenólico esterificado a pectina de las paredes celulares de acelga. Sin embargo, no se ha descartado que la naturaleza de este polisacárido sea hemicelulosa (47). Con respecto a esto, se ha reportado que los oligogalacturonidos (OGs) derivados de la fragmentación de pectina, activan ROS y las vías de JA, SA y ET, e inducen resistencia contra patógenos necrótrofos como *B. cinerea* (74), de forma similar a lo observado en este estudio para *PbExl1*. Resulta de interés que en el caso de fragmentos derivados de hemicelulosa (obtenidos a partir de pulpa de manzana), se ha reportado que inducen las vías de JA, SA y ET, sin embargo, no inducen ROS en *Vitis vinifera* y *A. thaliana* (76), lo que apoya la hipótesis

de que el polisacárido que es liberado en las paredes celulares como consecuencia de la actividad de *PbExl1* es pectina.

Otra posibilidad es que la modificación de la pared celular de la planta mediada por *PbExl1*, altere su integridad, y que este sea el estímulo que induzca la respuesta de defensa (77). Con respecto a esto, se sabe que la celulosa es un componente abundante e importante que determina en gran medida las propiedades mecánicas de la pared celular de las plantas, y que la reducción en la biosíntesis de celulosa induce alteraciones a la pared celular que son detectadas mediante un mecanismo desconocido, pero que dependen del receptor cinasa de tipo malectina THESEUS1 (78), e induce la acumulación de ROS, JA, ET y SA; y protege contra la infección de los patógenos *R. solanacearum* y *Plectosphaerella cucumerina* en *A. thaliana* (77,79,80). Por lo tanto, no podemos descartar que *Exl1* induzca cierto nivel de aflojamiento de la pared celular alterando las propiedades de la pared.

Además, en las mutantes de *A. thaliana* afectadas en las vías de JA y SA se observó la pérdida de la protección, lo que indica que estas vías son necesarias para activar la respuesta inmune e inducir el priming en la planta. Por otra parte, la vía de SA es fundamental para la inducción de ISR en las plantas (81). La inducción de los genes marcadores PR1 y EDS5, así como la pérdida del efecto de protección observado en las líneas de *A. thaliana NahG* y *eds5* afectadas en la vía de SA, sugieren que *Exl1* podría inducir una respuesta sistémica en *A. thaliana*.

V.4 CONCLUSIÓN CAPÍTULO V.

Los resultados obtenidos indican que *PbExl1* actúa sobre la pared celular de las plantas, liberando pectina posiblemente, que es detectada por el hospedero como un DAMP, induciendo ROS, así como las vías de JA, ET y SA (Figura 22). Lo que indica que *Exl1* es una proteína efectora, que además induce resistencia contra patógenos de interés comercial como *P. brasiliense* y *B. cinerea*, abriendo la posibilidad de explorar su potencial como un agente de biocontrol.

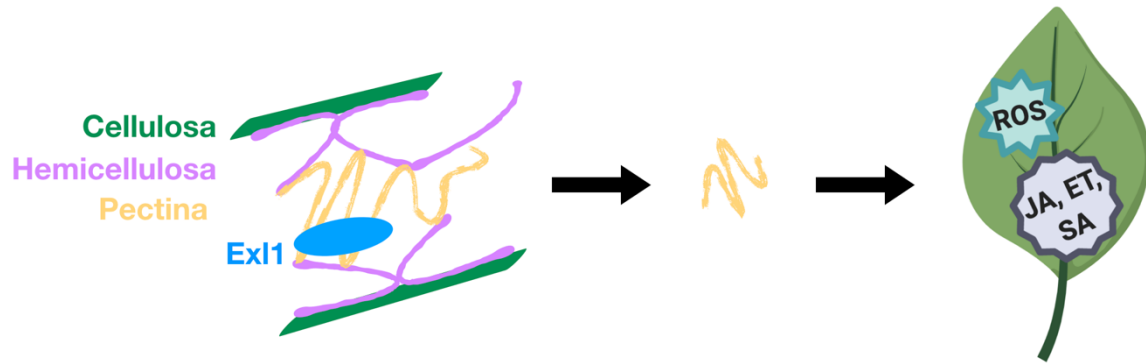


Figura 22. Modelo propuesto para la función de la expansina Exl1 en la pared celular y la inducción de la respuesta inmune en *A. thaliana*. Exl1 podría actuar sobre la pared celular liberando un polisacárido (posiblemente pectina), lo que es detectado por el hospedero como un DAMP, activando las respuestas de defensa en las que participan ROS y las vías de JA, ET y SA.

V.5 PERSPECTIVAS CAPÍTULO V.

Debido a que este es el primer reporte acerca de las expansinas bacterianas con respecto a la inducción de la respuesta inmune en plantas, valdría la pena analizar si otras expansinas bacterianas tienen la capacidad de provocar estas respuestas de defensa y compararlas con las reportadas en este trabajo.

Para demostrar que las expansinas liberan DAMPs, es necesario identificar la naturaleza del polisacárido que induce la respuesta inmune:

- Analizando directamente mediante HPLC y diversos estándares de polisacáridos, para identificar el posible polisacárido que se libera durante la interacción de la proteína y la pared celular.
- Infiltrando hojas de *A. thaliana* con sobrenadantes de ensayos *in vivo*, procedentes de la incubación de la proteína purificada con paredes celulares y determinar si se induce una respuesta en la hoja; y si estas son similares a las inducidas por los OGs.

Además, la identificación del receptor del estímulo provocado por la expansina en la planta es fundamental para determinar la naturaleza de las respuestas que se inducen. Este objetivo podría abordarse mediante enfoques tanto genéticos como bioquímicos.

- Mediante un proceso de selección para identificar otras mutantes insensibles que pierdan la capacidad de inducir la respuesta inmune después del pretratamiento con la expansina purificada. Así como un posterior mapeo para identificar el locus responsable del fenotipo insensible.
- Realizando un análisis de RNA-seq para identificar los cambios transcripcionales entre los perfiles de expresión de hojas pretratadas con la expansina silvestre y las mutantes no activas.

CAPÍTULO VI.

VI. LA EXPANSINA EXL1 de *P. atrosepticum* ESTÁ INVOLUCRADA EN LA MOVILIDAD BACTERIANA POR SWARMING.

VI.1 ANTECEDENTES DIRECTOS CAPÍTULO VI.

La movilidad permite a las bacterias escapar del estrés local, trasladarse a entornos nutricionales más favorables e invadir eficientemente los tejidos del hospedero. La movilidad por nado es considerada como un comportamiento individual de las bacterias en que el movimiento depende de la presencia de flagelos y un medio líquido. En cambio el swarming es un movimiento multicelular sobre superficies semi-sólidas que presentan algunas bacterias flageladas (82). El crecimiento de las bacterias de la colonia en medio con alta humedad conduce a la diferenciación de las células vegetativas en células llamadas swarmers que están hiperflageladas y generalmente son más largas que las células vegetativas (83). El swarming es más activo en la periferia de la colonia donde se observan las células swarmers, mientras que en el interior de la colonia las células son menos móviles y parecen desdiferenciarse a células vegetativas (83).

Uno de los requerimientos del swarming es la presencia de un surfactante principalmente compuesto por lipopolisacáridos (LPS), que están compuestos por el lípido A (que ancla los LPS a las células), oligosacáridos y polisacáridos (estos últimos llamados antígeno O). Además la movilidad por swarming ha sido relacionada con la patogénesis en bacterias, principalmente en bacterias que infectan el tracto urinario en humanos (84,85).

En 2013 se reportó por primera vez la capacidad de realizar swarming de *P. atrosepticum*. Este fenotipo se caracteriza macroscópicamente por las proyecciones conocidas como tendrils que presentan las colonias. Además, se ha reportado para *P. atrosepticum* que el swarming está regulado por QS y que para que se lleve a cabo es necesaria la biosíntesis del antígeno O (44).

VI.2 RESULTADOS CAPÍTULO VI.

Como se describió en el capítulo IV.2.4, la mutante $\Delta exl1$ de *P. atrosepticum* muestra un defecto en su capacidad de colonizar e infectar plantas de papa, por lo que como parte del estudio de los posibles mecanismos que pueden estar involucrados con este fenotipo, también evaluamos la movilidad de la mutante $\Delta exl1$, debido a que este proceso ha sido relacionado con la infectividad de algunas bacterias (85). Tomando en cuenta que la colonización de los tejidos de la mutante parece estar retrasada comparada con la silvestre, decidimos evaluar la capacidad de nado y de swarming de *P. atrosepticum* silvestre y $\Delta exl1$.

En el caso del nado, inoculamos colonias de *P. atrosepticum* silvestre o mutante en placas de LB al 0.3%, (ya que el nado depende de la presencia de agua), y medimos el halo de nado formado por cada cepa. El tamaño del halo fue comparable entre la silvestre y $\Delta exl1$ (Figura 23), sugiriendo que ambas cepas tienen la misma capacidad de nado.

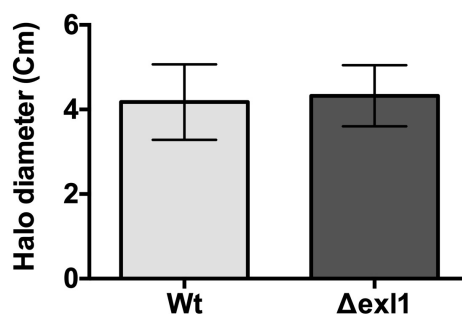


Figura 23. La capacidad de nado es similar en las cepas silvestre y $\Delta exl1$ de *P. atrosepticum*.

Los ensayos se realizaron inoculando la cepa silvestre o mutante en placas de LB al 0.3%. Después de 3 días se cuantificó el diámetro del halo de nado. Las barras de error corresponden a la desviación estándar de los experimentos. No se observaron diferencias significativas de acuerdo con la prueba t de Student (n=15 placas por cepa).

Analizamos entonces la capacidad de swarming de las cepas, ya que como se indicó en los antecedentes este es otro tipo de movimiento social. Inoculamos *P. atrosepticum* silvestre o $\Delta exl1$ en placas de medio MacConkey al 0.4x suplementado con 0.5% de glicerol, ya que estas son las condiciones reportadas para observar swarming en *P. atrosepticum* (44). Después de 48 horas observamos que la cepa silvestre presentó las proyecciones conocidos como tendrils características del

swarming en esta especie (Figura 24A), mientras que la cepa $\Delta exl1$ no lo hizo (Figura 24B), sino hasta después de 72 horas, y en menor cantidad que la silvestre (Figura 25). Estos datos muestran que la mutante presenta un retraso y disminución de tendrils con respecto a la silvestre. Para corroborar que la expansina contribuye al swarming y al fenotipo observado, decidimos sobre-expresar el gen de la expansina en la cepa silvestre, utilizando la construcción pTB93F-Exl1, con la que observamos un aumento en la producción de tendrils (Figura 24C), sugiriendo que los niveles de producción de la expansina correlacionan directamente con la capacidad de swarming de las bacterias. Al analizar la complementación del fenotipo silvestre utilizando la expansina de *P. brasiliense* mediante la construcción pTB93F-Exl1 (Figura 24D), y la expansina de *B. subtilis* con la construcción pTB93F-BsEXLX1 (Figura 24E, previamente utilizadas en la recuperación del fenotipo de infectividad), observamos que ambas expansinas recuperaron el fenotipo silvestre, más no así el control que contenía el plásmido pTB93F que codifica la GFP (Figura 24F).

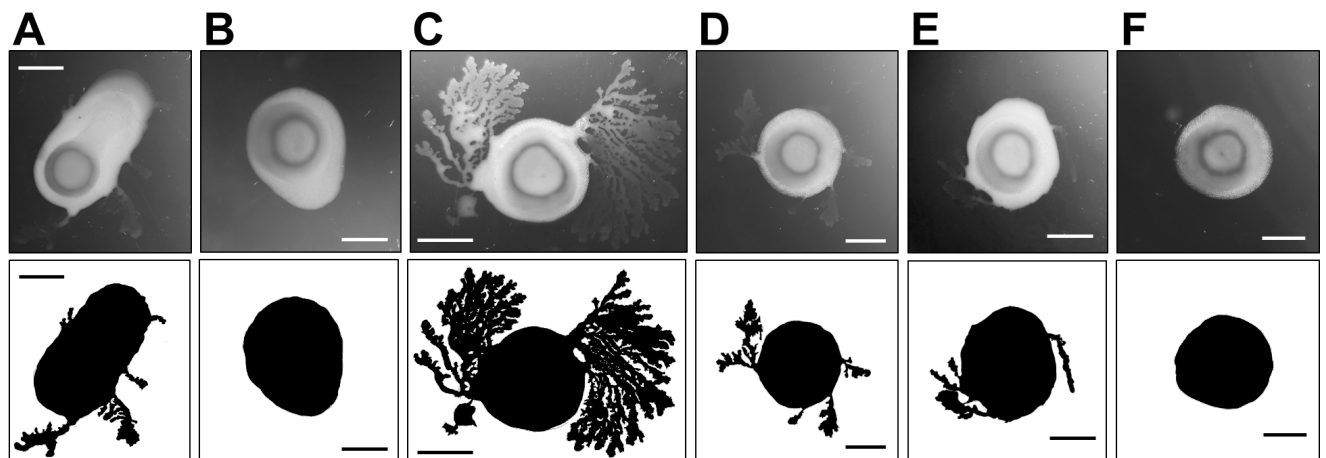


Figura 24. La mutante $\Delta exl1$ presenta un retraso en la movilidad por swarming. A) La cepa silvestre muestra formación de tendrils a las 48 h, **B)** a diferencia de la mutante $\Delta exl1$. **C)** La cepa silvestre que sobreexpresa la expansina muestra una mayor proyección de tendrils en el mismo tiempo. **D)** La mutante $\Delta exl1$ complementada con la expansina *PbExl1* recupera la capacidad de formar tendrils similar a la silvestre, **E)** al igual que la mutante $\Delta exl1$ complementada con la expansina *BsEXLX1*. **F)** El control de la mutante $\Delta exl1$ transformada con el vector vacío (pTB93F) muestra un fenotipo comparable con la mutante $\Delta exl1$. Las siluetas de las colonias y sus tendrils se muestran debajo de las fotografías para una mejor visualización. Barra= 295 pixeles. Las cepas se inocularon en medio

MacConkey al 0.4% adicionado con 0.5% de glicerol y se incubaron 48 h a 30°C. Imágenes representativas de al menos cinco experimentos independientes.

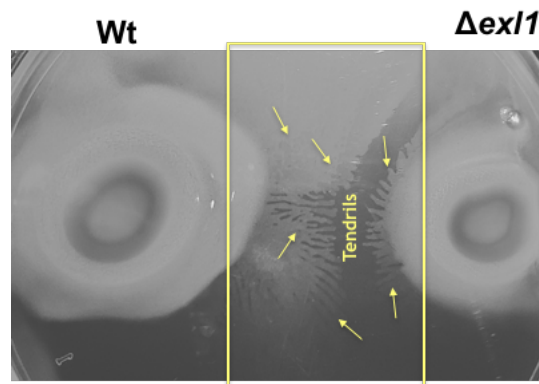


Figura 25. La mutante $\Delta ex11$ presenta un retraso en la formación de los tendrils. Al inocular las cepas silvestre y mutante $\Delta ex11$ se observa que 72 horas después de la inoculación, la cepa silvestre presenta una gran cantidad de tendrils, mientras que a este tiempo la mutante inicia a producirlos. Las cepas se inocularon en una placa de medio MacConkey al 0.4% adicionado con 0.5% de glicerol y se incubaron 48 h a 30°C. Imágenes representativas de al menos cuatro experimentos independientes.

Debido a que en *P. atrosepticum* el antígeno O (compuesto por polisacáridos) es importante para el swarming (44), analizamos si la mutante $\Delta ex11$ de *P. atrosepticum* presentaba algún defecto en la producción de exopolisacáridos (EPS) *in vitro*. Se sabe que algunas bacterias pueden producir EPS utilizando glicerol como sustrato, como es el caso de *P. brasiliense* (32,86) y además debido a que es el sustrato utilizado en las placas de swarming, inoculamos longitudinalmente placas de medio SOB suplementados con glicerol al 2% utilizando cultivos de *P. atrosepticum* silvestre o mutante y la producción de EPS se cuantificó midiendo el crecimiento (el ancho) de la línea inoculada. Los tamaños de las líneas producidas por la cepa silvestre y $\Delta ex11$ son iguales (Figura 26A). También determinamos la producción de biofilm de las cepas de *P. atrosepticum* silvestre, $\Delta ex11$ y sobreexpresante (pTB93F-Ex11), debido a que para la formación de biofilm es necesaria la producción de una matriz compuesta principalmente por EPS (87). El biofilm adherido a la placa de cultivo después de 48 h de crecimiento bacteriano se cuantificó como se indica en el capítulo III.15 midiendo la absorbancia a 570 nm. En todos los casos, se observaron valores de absorbancias similares entre las cepas (~0.12), indicando que producen niveles

comparables de biofilm (Figura 26B). En conjunto estos datos sugieren que la mutante $\Delta ex11$ no se encuentra afectada en la producción de EPS.

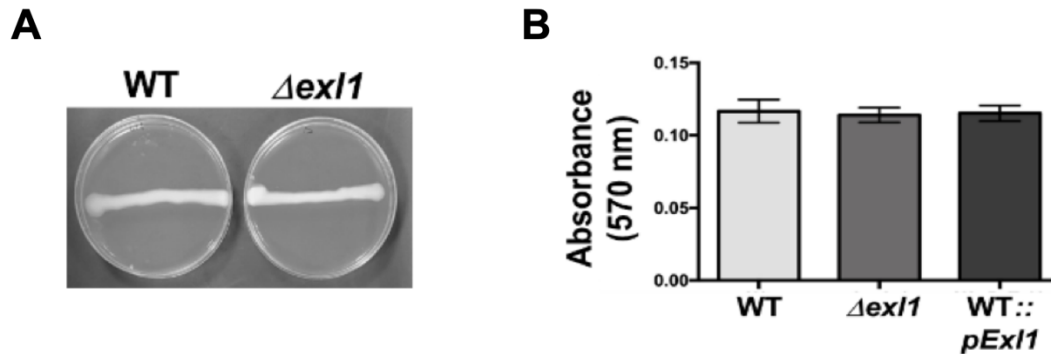


Figura 26. La producción *in vitro* de exopolisacáridos y la formación de biofilm es similar en las cepas silvestre y $\Delta ex11$. **A)** Producción de exopolisacáridos en medio SOB suplementado con glicerol. Imágenes representativas de al menos tres experimentos independientes (n=24 placas por cepa). **B)** Formación de biofilm por la cepa silvestre (barra gris claro), mutante $\Delta ex11$ (barra gris medio) y sobre-expresora de expansina (barra gris oscuro). Figura correspondiente a tres experimentos independientes con un total de 72 lecturas de absorbancia por cepa. Las barras de error corresponden a la desviación estándar de los experimentos. No se observaron diferencias significativas de acuerdo con la prueba t de Student.

Finalmente, ensayos preliminares utilizando un microscopio estereoscópico para observar el borde de los tendrils de colonias swarmers a las 72 horas, mostraron lo que podría ser la matriz de EPS, debido a que este borde es la única zona en la que no se observó la presencia de bacterias (vistas como parches en el interior de los tendrils). Resulta de interés que esta posible matriz fue más angosta en la mutante $\Delta ex11$ en contraste con la silvestre (Figura 27). Lo que sugiere que la integridad o la estructura de los EPS, más que su producción podría verse afectada en la mutante. Sin embargo, son necesarios más experimentos para corroborar esta hipótesis.

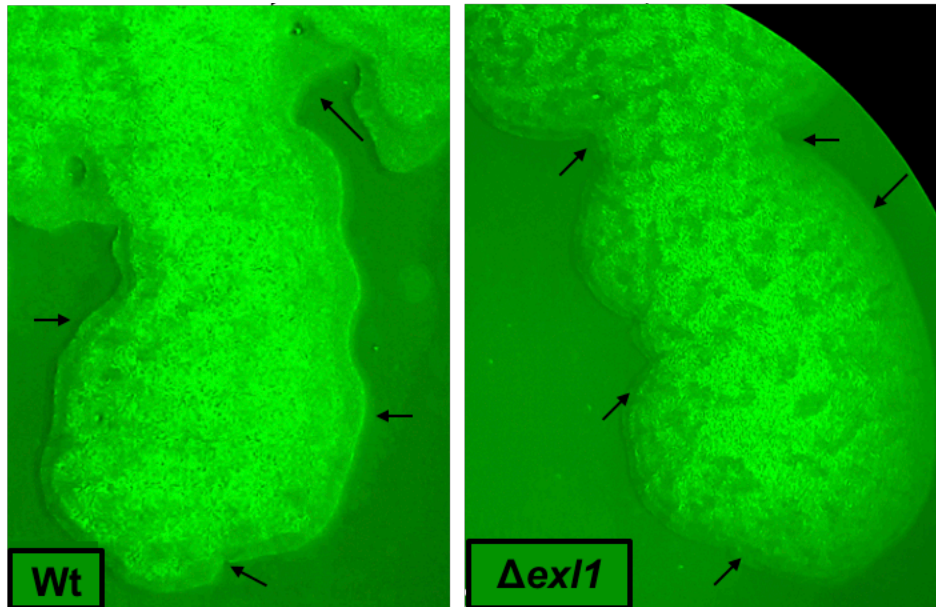


Figura 27. La matriz de EPS podría estar afectada en la mutante $\Delta exl1$ durante el proceso de swarming. Se observan los tendrils formados por *P. atrosepticum* Wt y $\Delta exl1$ durante el swarming. Las flechas negras señalan lo que podría ser la matriz de EPS de los tendrils en ambas cepas debido a que este borde es la única zona en la que no se observó la presencia de bacterias. Imagen representativa de dos experimentos independientes obtenida mediante un microscopio estereoscópico con un objetivo 100X.

VI.3 DISCUSIÓN CAPÍTULO VI.

La movilidad por swarming se ha asociado con una mayor virulencia en algunas bacterias patógenas (84), por lo que el hecho de observar que la mutante nula de expansina presenta una menor capacidad de swarming en comparación con la silvestre sugiere que este proceso podría también participar en la virulencia de *P. atrosepticum*. Sin embargo, tenemos resultados que parecerían ir en contra de esta conclusión debido a que el retraso en el swarming de la mutante $\Delta exl1$ es recuperado por la expansina Exl1 de *P. brasiliense* y también por EXLX1 de *B. subtilis*, mientras que EXLX1 de *B. subtilis* no recuperó la menor virulencia en los experimentos de infección de plantas de papa. Lo que sugiere que el swarming de esta especie podría no estar relacionado con la infección y que la participación de la expansina en el swarming podría ser independiente de la interacción con la planta.

A este respecto, debido a la reducción del tamaño de lo que parece ser una matriz de exopolisacáridos en los tendrils producidos por la mutante *Δexl1*, sugiere que Exl1 actúa sobre los polisacáridos de su propia matriz de exopolisacáridos en el momento de la extensión de los tendrils durante el swarming. Sin embargo, son necesarios más experimentos para determinar el papel de la expansina durante este proceso en *Pectobacterium*.

VI.4 CONCLUSIÓN CAPÍTULO VI.

La motilidad por swarming en *P. atrosepticum* no ha sido muy estudiada hasta la fecha. En este trabajo, observamos que Exl1 contribuye a este proceso, ya que su ausencia retrasa la producción de tendrils por al menos 24 h, mientras que su sobreexpresión aumenta la producción de tendrils. Una posibilidad es que Exl1 esté involucrada en el rearrreglo de los polisacáridos de la matriz de LPS presente en los tendrils, que es una función independiente de la interacción con la planta. Este es el primer reporte que muestra el requerimiento de una expansina en un proceso fisiológico propio de la bacteria e independiente de la interacción con las plantas, abriendo la pregunta a si las expansinas bacterianas podrían actuar o tener alguna función adicional (dual) en las bacterias.

VI.5 PERSPECTIVAS CAPÍTULO VI.

Debido a que la relación entre la expansina y el swarming sólo se ha estudiado en este trabajo, hay muchas perspectivas por cumplirse para poder determinar cuál es la función de Exl1 en este proceso. Sin embargo, las primeras que pudieran abordarse son:

- Determinar si la matriz de exopolisacáridos de los tendrils es realmente mayor en la cepa silvestre en contraste con la mutante nula de expansina.
- Determinar la expresión de Exl1 durante el proceso de swarming mediante el marcaje de esta proteína con proteínas fluorescentes o cuantificando mediante RT-qPCR la expresión de Exl1 en diferentes puntos de colonia de swarming.

- Determinar la composición de la matriz de exopolisacáridos extrayéndolos e identificándolos por HPLC.

CAPÍTULO VIII. BIBLIOGRAFÍA.

1. Li Y, Darley CP, Ongaro V, Fleming A, Schipper O, Baldauf SL, et al. Plant expansins are a complex multigene family with an ancient evolutionary origin. *Plant Physiol.* 2002; DOI: 10.1104/pp.010658
2. Sampedro J, Cosgrove DJ. The expansin superfamily. *Genome Biol.* 2005;6(12):1–11. DOI: 10.1186/gb-2005-6-12-242
3. Yennawar NH, Li L-C, Dudzinski DM, Tabuchi A, Cosgrove DJ. Crystal structure and activities of EXPB1 (*Zea m 1*), a beta-expansin and group-1 pollen allergen from maize. *Proc Natl Acad Sci.* 2006;103(40):14664–71. DOI: 10.1073/pnas.0605979103
4. Georgelis N, Nikolaidis N, Cosgrove DJ. Bacterial expansins and related proteins from the world of microbes. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2015;99(9):3807–23. DOI: 10.1007/s00253-015-6534-0
5. Georgelis N, Tabuchi A, Nikolaidis N, Cosgrove DJ. Structure-function analysis of the bacterial expansin EXLX1. *J Biol Chem.* 2011; DOI: 10.1074/jbc.M111.225037
6. Kerff F, Amoroso A, Herman R, Sauvage E, Petrella S, Filée P, et al. Crystal structure and activity of *Bacillus subtilis* YoaJ (EXLX1), a bacterial expansin that promotes root colonization. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(44):16876–81. DOI: 10.1073/pnas.0809382105
7. McQueen-Mason S, Cosgrove D. Expansin Mode of Action on Cell Walls. *Plant Physiol.* 1995;107(1):87–100.
8. D.J. C. Loosening of plant cell walls by expansins. *Nature.* 2000;407(September):321–6.
9. Tabuchi A, Li LC, Cosgrove DJ. Matrix solubilization and cell wall weakening by β -expansin (group-1 allergen) from maize pollen. *Plant J.* 2011;68(3):546–59. DOI: 10.1111/j.1365-313X.2011.04705.x
10. Wang T, Chen Y, Tabuchi A, Cosgrove DJ, Hong M. The Target of β -Expansin EXPB1 in Maize Cell Walls from Binding and Solid-State NMR Studies. *Plant Physiol.* 2016;172(4):2107–19. DOI: 10.1104/pp.16.01311
11. Wang T, Park YB, Caporini MA, Rosay M, Zhong L, Cosgrove DJ, et al. Sensitivity-enhanced solid-state NMR detection of expansin's target in plant cell walls. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110(41):16444–9. DOI:

10.1073/pnas.1316290110.

12. Georgelis N, Nikolaidis N, Cosgrove DJ. Biochemical analysis of expansin-like proteins from microbes. *Carbohydr Polym.* 2014;100:17–23. DOI: 10.1016/j.carbpol.2013.04.094
13. Nikolaidis N, Doran N, Cosgrove DJ. Plant expansins in bacteria and fungi: Evolution by horizontal gene transfer and independent domain fusion. *Mol Biol Evol.* 2014;31(2):376–86. DOI: 10.1093/molbev/mst206
14. Chase, William R.; Zhaxybayeva, Olga.; Rocha, Jorge.; Cosgrove, Daniel J.; Shapiro L. Global cellulose biomass, horizontal gene transfers and domain fusions drive microbial expansin evolution. *New Phytol.* 2020;(226):921–38. DOI: doi:10.1111/nph.16428
15. Olarte-Lozano M, Mendoza-Nuñez MA, Pastor N, Segovia L, Folch-Mallol J, Martínez-Anaya C. PcExl1 a novel acid expansin-like protein from the plant pathogen *Pectobacterium carotovorum*, binds cell walls differently to BsEXLX1. *PLoS One.* 2014;9(4):e95638. DOI: 10.1371/journal.pone.0095638
16. Tancos MA, Lowe-Power TM, Peritore-Galve FC, Tran TM, Allen C, Smart CD. Plant-like bacterial expansins play contrasting roles in two tomato vascular pathogens. *Mol Plant Pathol.* 2018;19(5):1210–21. DOI: 10.1111/mpp.12611
17. Narváez-Barragán DA, Tovar-Herrera OE, Segovia L, Serrano M, Martínez-Anaya C. Expansin-related proteins : biology , microbe-plant interactions and associated plant defense responses. *Microbiology.*
18. Chase, William R.; Zhaxybayeva, Olga.; Rocha, Jorge.; Cosgrove, Daniel J.; Shapiro L. From morphogenesis to pathogenesis: A cellulose loosening protein is one of the most widely distributed tools in nature. *bioRxiv.* 2019;637728.
19. Cosgrove DJ. Microbial Expansins. *Annu Rev Microbiol.* 2017;71(1):479–97. DOI: 10.1146/annurev-micro-090816-093315
20. Mansfield J, Genin S, Magori S, Citovsky V, Sriariyanum M, Ronald P, et al. Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology. *Mol Plant Pathol.* 2012;13(6):614–29. DOI: 10.1111/j.1364-3703.2012.00804.x
21. Davis MJ, Gillaspie AG, Vidaver AK, Harris RW. *Clavibacter*: a new genus containing some phytopathogenic coryneform bacteria, including *Clavibacter xyli* subsp. *xyli* sp. nov., subsp. nov. and *Clavibacter xyli* subsp. *cynodontis* subsp. nov., pathogens that cause ratoon stunting disease of sugarcane and Bermudagrass stunting disease. *Int J Syst Bacteriol.* 1984; DOI:

10.1099/00207713-34-2-107

22. Waksman SA, Henrici AT. The Nomenclature and Classification of the Actinomycetes¹. *J Bacteriol.* 1943; DOI: 10.1128/jb.46.4.337-341.1943
23. Jahr H, Dreier J, Meletzus D, Bahro R, Eichenlaub R. The endo-beta-1,4-glucanase CelA of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* is a pathogenicity determinant required for induction of bacterial wilt of tomato. *Mol Plant Microbe Interact.* 2000;13(7):703–14. DOI: 10.1094/MPMI.2000.13.7.703
24. Ingel B, Jeske DR, Sun Q, Grosskopf J, Roper MC. Xylella fastidiosa endoglucanases mediate the rate of pierce's disease development in *Vitis vinifera* in a cultivar-dependent manner. *Mol Plant-Microbe Interact.* 2019;32(10):1402–14. DOI: 10.1094/MPMI-04-19-0096-R
25. Rocha J, Shapiro LR, Kolter R. A horizontally acquired expansin gene increases virulence of the emerging plant pathogen *Erwinia tracheiphila*. *bioRxiv.* 2019;681643. DOI: <https://doi.org/10.1101/681643>
26. Liu J, Peng H, Cui J, Huang W, Kong L, Clarke JL, et al. Molecular Characterization of A Novel Effector Expansin-like Protein from *Heterodera avenae* that Induces Cell Death in *Nicotiana benthamiana*. *Sci Rep.* 2016;6:35677. DOI: 10.1038/srep35677
27. Ranf S. Sensing of molecular patterns through cell surface immune receptors. *Current Opinion in Plant Biology.* 2017. DOI: 10.1016/j.pbi.2017.04.011
28. Toth IK, Bell KS, Holeva MC, Birch PRJ. Soft rot erwiniae: from genes to genomes. *Mol Plant Pathol.* 2003 Jan;4(1):17–30. DOI: 10.1046/j.1364-3703.2003.00149.x
29. Pérombelon MCM. Potato diseases caused by soft rot erwinias: An overview of pathogenesis. *Plant Pathol.* 2002;51(1):1–12. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.0032-0862.2001.Shorttitle.doc.x>
30. Liu H, Coulthurst SJ, Pritchard L, Hedley PE, Ravensdale M, Burr T, et al. Quorum Sensing Coordinates Brute Force and Stealth Modes of Infection in the Plant Pathogen *Pectobacterium atrosepticum*. 2008;4(6):e1000093. DOI: 10.1371/journal.ppat.1000093
31. González-Rodríguez MÁ, Silva-Rojas HV, Mascorro-Gallardo JO. Ensayo In vitro del Péptido Antimicrobiano Melitina Contra Diferentes Bacterias Fitopatógenas. (Spanish). *Vitr assay Antimicrob Pept melittin against Differ phytopathogenic Bact.* 2005;23(2):176–82.

32. Narváez-Barragán DA, de Sandozequi A, Rodríguez M, Estrada K, Tovar-Herrera OE, Martínez-Anaya C. Analysis of two Mexican *Pectobacterium brasiliense* strains reveals an inverted relationship between c-di-GMP levels with exopolysaccharide production and swarming motility. *Microbiol Res.* 2020;235:126427. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126427>
33. Hélias V, Hamon P, Huchet E, Wolf J V.D., Andrivon D. Two new effective semiselective crystal violet pectate media for isolation of *Pectobacterium* and *Dickeya*. *Plant Pathol.* 2012;61(2):339–45.
34. Kaniga K, Delor I, Cornelis GR. A wide-host-range suicide vector for improving reverse genetics in Gram-negative bacteria: inactivation of the *blaA* gene of *Yersinia enterocolitica*. *Gene.* 1991;109(1):137–41.
35. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, et al. Fiji: An open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods.* 2012;9:676–682.
36. Macvanin M, Hughes D. Assays of sensitivity of antibiotic-resistant bacteria to hydrogen peroxide and measurement of catalase activity. *Methods Mol Biol.* 2010; DOI: 10.1007/978-1-60327-279-7_7
37. Andresen I, Becker W, Schlüter K, Burges J, Parthier B, Apel K. The identification of leaf thionin as one of the main jasmonate-induced proteins of barley (*Hordeum vulgare*). *Plant Mol Biol.* 1992;19(2):193–204.
38. Serrano M, Wang B, Aryal B, Garcion C, Abou-Mansour E, Heck S, et al. Export of salicylic acid from the chloroplast requires the multidrug and toxin extrusion-like transporter EDS5. *Plant Physiol.* 2013;162(4):1815–21.
39. Gaffney T, Friedrich L, Vernooij B, Negrotto D, Nye G, Uknes S, et al. Requirement of Salicylic Acid for the Induction of Systemic Acquired Resistance. *Science* (80-). 1993 Aug 6;261(5122):754–6.
40. Hael-Conrad V, Abou-Mansour E, Díaz-Ricci JC, Métraux JP, Serrano M. The novel elicitor AsES triggers a defense response against *Botrytis cinerea* in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Sci.* 2015;241:120–7. DOI: 10.1016/j.plantsci.2015.09.025
41. Rizhsky L, Davletova S, Liang H, Mittler R. The Zinc Finger Protein Zat12 Is Required for Cytosolic Ascorbate Peroxidase 1 Expression during Oxidative Stress in *Arabidopsis*. *J Biol Chem.* 2004; DOI: 10.1074/jbc.M313350200
42. Czechowski T, Stitt M, Altmann T, Udvardi MK, Scheible WR. Genome-wide identification and testing of superior reference genes for transcript

- normalization in arabidopsis. *Plant Physiol.* 2005;139(1):5–17. DOI: 10.1104/pp.105.063743
43. L’Haridon F, Besson-Bard A, Binda M, Serrano M, Abou-Mansour E, Balet F, et al. A permeable cuticle is associated with the release of reactive oxygen species and induction of innate immunity. *PLoS Pathog.* 2011;7(7):e1002148.
 44. Bowden SD, Hale N, Chung JCS, Hodgkinson JT, Spring DR, Welch M. Surface swarming motility by *Pectobacterium atrosepticum* is a latent phenotype that requires O antigen and is regulated by quorum sensing. *Microbiol (United Kingdom)*. 2013;159(PART11):2375–85. DOI: 10.1099/mic.0.070748-0
 45. O’Toole GA. Microtiter Dish Biofilm Formation Assay. *JoVE*. 2011;(47):e2437. DOI: doi:10.3791/2437
 46. Pastor N, Dávila S, Pérez-Rueda E, Segovia L, Martínez-Anaya C. Electrostatic analysis of bacterial expansins. *Proteins Struct Funct Bioinforma.* 2015;83(2):215–23. DOI: 10.1002/prot.24718
 47. Tovar-Herrera OE, Rodríguez M, Olarte-Lozano M, Sampedro-Guerrero JA, Guerrero A, Pinto-Cámara R, et al. Analysis of the Binding of Expansin ExI1, from *Pectobacterium carotovorum*, to Plant Xylem and Comparison to EXLX1 from *Bacillus subtilis*. *ACS Omega.* 2018;3(6):7008–18. DOI: 10.1021/acsomega.8b00406
 48. Narváez-Barragán DA, Tovar-Herrera OE, Torres M, Rodríguez M, Humphris S, Toth IK, et al. Expansin-like ExI1 from *Pectobacterium* is a virulence factor required for host infection, and induces a defence plant response involving ROS, and jasmonate, ethylene and salicylic acid signalling pathways in *Arabidopsis thaliana*. *Sci Rep.* 2020;10(1):1–14. DOI: 10.1038/s41598-020-64529-9
 49. Charkowski A, Blanco C, Condemine G, Expert D, Franza T, Hayes C, et al. The Role of Secretion Systems and Small Molecules in Soft-Rot *Enterobacteriaceae* Pathogenicity. *Annu Rev Phytopathol.* 2012;50(1):425–49. DOI: 10.1146/annurev-phyto-081211-173013
 50. Bell KS, Sebahia M, Pritchard L, Holden MTG, Hyman LJ, Holeva MC, et al. Genome sequence of the enterobacterial phytopathogen *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* and characterization of virulence factors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(30):11105–10. DOI: 10.1073/pnas.0402424101
 51. Cross AS. What is a virulence factor? *Critical care (London, England)*. 2008.

DOI: 10.1186/cc7127

52. Valdivia ER, Stephenson AG, Durachko DM, Cosgrove D. Class B β -expansins are needed for pollen separation and stigma penetration. *Sex Plant Reprod.* 2009; DOI: 10.1007/s00497-009-0099-y
53. Valdivia ER, Wu Y, Li LC, Cosgrove DJ, Stephenson AG. A group-1 grass pollen allergen influences the outcome of pollen competition in Maize. *PLoS One.* 2007; DOI: 10.1371/journal.pone.0000154
54. De Wit PJGM. How plants recognize pathogens and defend themselves. *Cellular and Molecular Life Sciences.* 2007. DOI: 10.1007/s00018-007-7284-7
55. Jones JDG, Dangl JL. The plant immune system. *Nature.* 2006. DOI: 10.1038/nature05286
56. Desaki Y, Miya A, Venkatesh B, Tsuyumu S, Yamane H, Kaku H, et al. Bacterial lipopolysaccharides induce defense responses associated with programmed cell death in rice cells. *Plant Cell Physiol.* 2006; DOI: 10.1093/pcp/pcl019
57. Felix G, Duran JD, Volko S, Boller T. Plants have a sensitive perception system for the most conserved domain of bacterial flagellin. *Plant J.* 1999; DOI: 10.1046/j.1365-313X.1999.00265.x
58. Kunze G, Zipfel C, Robatzek S, Niehaus K, Boller T, Felix G. The N terminus of bacterial elongation factor Tu elicits innate immunity in Arabidopsis plants. *Plant Cell.* 2004; DOI: 10.1105/tpc.104.026765
59. Hou S, Liu Z, Shen H, Wu D. Damage-associated molecular pattern-triggered immunity in plants. *Frontiers in Plant Science.* 2019. DOI: 10.3389/fpls.2019.00646
60. Rajamuthiah R, Mylonakis E. Effector triggered immunity activation of innate immunity in metazoans by bacterial effectors. *Virulence.* 2014. DOI: 10.4161/viru.29091
61. Yang Y, Zhang H, Li G, Li W, Wang X, Song F. Ectopic expression of MgSM1, a Cerato-platanin family protein from *Magnaporthe grisea*, confers broad-spectrum disease resistance in Arabidopsis. *Plant Biotechnol J.* 2009;7(8):763–77. DOI: 10.1111/j.1467-7652.2009.00442.x
62. Li S, Dong Y, Li L, Zhang Y, Yang X, Zeng H, et al. The Novel Cerato-Platanin-Like Protein FocCP1 from *Fusarium oxysporum* Triggers an Immune

Response in Plants. *Int J Mol Sci.* 2019; DOI: 10.3390/ijms20112849

63. Pazzagli L, Cappugi G, Cappugi G, Manao G, Manao G, Camici G, et al. Purification, Characterization, and Amino Acid Sequence of Cerato-platanin, a New Phytotoxic Protein from *Ceratocystis fimbriata* f. sp. *platani*. *Mol Biol.* 1999;274(35):24959–64. DOI: 10.1074/jbc.274.35.24959
64. Martellini F, Faoro F, Carresi L, Pantera B, Baccelli I, Maffi D, et al. Cerato-populin and cerato-platanin, two non-catalytic proteins from phytopathogenic fungi, interact with hydrophobic inanimate surfaces and leaves. *Mol Biotechnol.* 2013; DOI: 10.1007/s12033-012-9618-4
65. Frías M, González C, Brito N. BcSpl1, a cerato-platanin family protein, contributes to *Botrytis cinerea* virulence and elicits the hypersensitive response in the host. *New Phytol.* 2011;192(2):483–95. DOI: 10.1111/j.1469-8137.2011.03802.x
66. Frías M, Brito N, González C. The *Botrytis cinerea* cerato-platanin BcSpl1 is a potent inducer of systemic acquired resistance (SAR) in tobacco and generates a wave of salicylic acid expanding from the site of application. 2013;14:191–6. DOI: 10.1111/j.1364-3703.2012.00842.x
67. Fontana F, Santini A, Salvini M, Pazzagli L, Cappugi G, Scala A, et al. Cerato-platanin treated plane leaves restrict *ceratocystis platani* growth and overexpress defence-related genes. *J Plant Pathol.* 2008;90(2):295–306.
68. Lombardi L, Faoro F, Luti S, Baccelli I, Martellini F, Bernardi R, et al. Differential timing of defense-related responses induced by cerato-platanin and cerato-populin, two non-catalytic fungal elicitors. *Physiol Plant.* 2013; DOI: 10.1111/ppl.12041
69. Vargas WA, Djonović S, Sukno SA, Kenerley CM. Dimerization controls the activity of fungal elicitors that trigger systemic resistance in plants. *J Biol Chem.* 2008;283(28):19804–15. DOI: 10.1074/jbc.M802724200
70. Zhang Y, Gao Y, Liang Y, Dong Y, Yang X, Yuan J, et al. The *verticillium dahliae* snodprot1-like protein VdCP1 contributes to virulence and triggers the plant immune system. *Front Plant Sci.* 2017;8:1–13. DOI: 10.3389/fpls.2017.01880
71. Djonović S, Pozo MJ, Dangott LJ, Howell CR, Kenerley CM. Sm1, a Proteinaceous Elicitor Secreted by the Biocontrol Fungus *Trichoderma virens* Induces Plant Defense Responses and Systemic Resistance . *Mol Plant-Microbe Interact.* 2006; DOI: 10.1094/mpmi-19-0838

72. Conrath U, Pieterse CMJ, Mauch-Mani B. Priming in plant-pathogen interactions. *Trends in Plant Science*. 2002. DOI: 10.1016/S1360-1385(02)02244-6
73. Mittler R, Vanderauwera S, Suzuki N, Miller G, Tognetti VB, Vandepoele K, et al. ROS signaling: The new wave? *Trends Plant Sci*. 2011;16(6):300–9.
74. Decreux A, Thomas A, Spies B, Brasseur R, Cutsem P Van, Messiaen J. In vitro characterization of the homogalacturonan-binding domain of the wall-associated kinase WAK1 using site-directed mutagenesis. *Phytochemistry*. 2006;67(11):1068–79. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2006.03.009>
75. Hsiao PY, Cheng CP, Koh KW, Chan MT. The Arabidopsis defensin gene, AtPDF1.1, mediates defence against *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* via an iron-withholding defence system. *Sci Rep*. 2017;7(1):1–14. DOI: 10.1038/s41598-017-08497-7
76. Claverie J, Balacey S, Lemaître-Guillier C, Brulé D, Chiltz A, Granet L, et al. The cell wall-derived xyloglucan is a new DAMP triggering plant immunity in *vitis vinifera* and *arabidopsis thaliana*. *Front Plant Sci*. 2018;871(November):1–14. DOI: 10.3389/fpls.2018.01725
77. Engelsdorf T, Gigli-Bisceglia N, Veerabagu M, McKenna JF, Vaahtera L, Augstein F, et al. The plant cell wall integrity maintenance and immune signaling systems cooperate to control stress responses in *Arabidopsis thaliana*. *Sci Signal*. 2018;11(536). DOI: 10.1126/scisignal.aao3070
78. Hématy K, Sado P-EE, Van Tuinen A, Rochange S, Desnos T, Balzergue S, et al. A Receptor-like Kinase Mediates the Response of Arabidopsis Cells to the Inhibition of Cellulose Synthesis. *Curr Biol*. 2007 Jun;17(11):922–31. DOI: 10.1016/j.cub.2007.05.018
79. Bacete L, Mélida H, Miedes E, Molina A. Plant cell wall-mediated immunity: cell wall changes trigger disease resistance responses. *Plant J*. 2018; DOI: 10.1111/tpj.13807
80. Hernández-Blanco C, Feng DX, Hu J, Sánchez-Vallet A, Deslandes L, Llorente F, et al. Impairment of cellulose synthases required for Arabidopsis secondary cell wall formation enhances disease resistance. *Plant Cell*. 2007; DOI: 10.1105/tpc.106.048058
81. Choudhary DK, Johri BN. Interactions of *Bacillus* spp. and plants - With special reference to induced systemic resistance (ISR). *Microbiological Research*. 2009. DOI: 10.1016/j.micres.2008.08.007

82. Venieraki A, Tsalgatidou PC, Georgakopoulos DG, Dimou M, Katinakis P. Swarming motility in plant-associated bacteria. *Hellenic Plant Protection Journal*. 2016. DOI: 10.1515/hppj-2016-0002
83. Harshey RM. Bacterial Motility on a Surface: Many Ways to a Common Goal. *Annu Rev Microbiol*. 2003;57(1):249–73. DOI: 10.1146/annurev.micro.57.030502.091014
84. Kearns DB. A field guide to bacterial swarming motility. *Nature Reviews Microbiology*. 2010. DOI: 10.1038/nrmicro2405
85. Venieraki A, Tsalgatidou PC, Georgakopoulos DG, Dimou M, Katinakis P. Swarming motility in plant-associated bacteria. *Hell Plant Prot J*. 2016;9(1):16–27. DOI: 10.1515/hppj-2016-0002
86. Celik GY, Aslim B, Beyatli Y. Characterization and production of the exopolysaccharide (EPS) from *Pseudomonas aeruginosa* G1 and *Pseudomonas putida* G12 strains. *Carbohydr Polym*. 2008;73(1):178–82. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2007.11.021>
87. Bogino PC, Oliva M de las M, Sorroche FG, Giordano W. The role of bacterial biofilms and surface components in plant-bacterial associations. *Int J Mol Sci*. 2013 Jul 30;14(8):15838–59. DOI: 10.3390/ijms140815838
88. Hall CJJ van. Bijdragen tot de kennis der Bakteriele Plantenziekten. *Bijdragen tot de kennis der Bakteriele Plantenziekten. Inaugural Dissertation Amsterdam. Cooperatieve drukkerij-vereening "Plantijn"; 1902.* DOI: 10.5962/bhl.title.13492
89. Yabuuchi E, Yano I, Hotta H, Nishiuchi Y, Kosako Y. Transfer of Two Burkholderia and an Alcaligenes Species to Ralstonia Gen. Nov.: Proposal of *Ralstonia pickettii* (Ralston, Palleroni and Doudoroff 1973) Comb. Nov., *Ralstonia solanacearum* (Smith 1896) Comb. Nov. and *Ralstonia eutropha* (Davis 1969) Comb. Nov. *Microbiol Immunol*. 1995; DOI: 10.1111/j.1348-0421.1995.tb03275.x
90. Conn HJ. Validity of the Genus *Alcaligenes*. *J Bacteriol*. 1942; DOI: 10.1128/jb.44.3.353-360.1942
91. Swings J, Van Den Mooter M, Vauterin L, Hoste B, Gillis M, Mew TW, et al. Reclassification of the causal agents of bacterial blight (*Xanthomonas campestris* pv. *oryzae*) and bacterial leaf streak (*Xanthomonas campestris* pv. *oryzicola*) of rice as pathovars of *Xanthomonas oryzae* (ex Ishiyama 1922) sp. nov., nom. rev. *Int J Syst Bacteriol*. 1990; DOI: 10.1099/00207713-40-3-309

92. Dowson WJ. On the systematic position and generic names of the gram negative bacterial plant pathogens. Zentralblatt fuer Bakt etc II Abt. 1939;
93. MP S, C. G. El Agente Causante de la Gomosis Bacterial del Pasto Imperial en Colombia. Rev Fac Nac Agron. 1950;
94. Winslow C-EA, Broadhurst J, Buchanan RE, Krumwiede C, Rogers LA, Smith GH. THE FAMILIES AND GENERA OF THE BACTERIA FINAL REPORT OF THE COMMITTEE OF THE SOCIETY OF AMERICAN BACTERIOLOGISTS ON CHARACTERIZATION AND CLASSIFICATION OF BACTERIAL TYPES. J Bacteriol. 1920; DOI: 10.1128/jb.5.3.191-229.1920
95. Wells JM, Raju BC, Hung H-Y, Weisburg WG, Mandelco-Paul L, Brenner DJ. *Xylella fastidiosa* gen. nov., sp. nov.: Gram-Negative, Xylem-Limited, Fastidious Plant Bacteria Related to *Xanthomonas* spp. Int J Syst Bacteriol. 1987; DOI: 10.1099/00207713-37-2-136
96. Samson R, Legendre JB, Christen R, Fischer-Le Saux M, Achouak W, Gardan L. Transfer of *Pectobacterium chrysanthemi* (Burkholder et al. 1953) Brenner et al. 1973 and *Brenneria paradisiaca* to the genus *Dickeya* gen. nov. as *Dickeya chrysanthemi* comb. nov. and *Dickeya paradisiaca* comb. nov. and delineation of four novel species, *Dickeya dadantii* sp. nov., *Dickeya dianthicola* sp. nov., *Dickeya dieffenbachiae* sp. nov. and *Dickeya zeae* sp. nov. Int J Syst Evol Microbiol. 2005; DOI: 10.1099/ijs.0.02791-0
97. Waldee EL. Comparative studies of some peritrichous phytopathogenic bacteria. Iowa State J Sci. 1945;

CAPÍTULO IX. APÉNDICES

IX.1 Expansin-like ExI1 from *Pectobacterium* is a virulence factor required for host infection, and induces a defence plant response involving ROS, and jasmonate, ethylene and salicylic acid signalling pathways in *Arabidopsis thaliana*.

IX.2 Movilidad y producción de exopolisacáridos (EPS) por las cepas de *P. brasiliense* BF20 y BF45, y su relación con el segundo mensajero c-diGMP.

IX.2.1 Analysis of two Mexican *Pectobacterium brasiliense* strains reveals an inverted relationship between c-di-GMP levels with exopolysaccharide production and swarming motility.

IX.3 Expansin-related proteins: biology, microbe-plant interactions and associated plant defense responses.



OPEN

Expansin-like Exl1 from *Pectobacterium* is a virulence factor required for host infection, and induces a defence plant response involving ROS, and jasmonate, ethylene and salicylic acid signalling pathways in *Arabidopsis thaliana*

Delia A. Narváez-Barragán¹, Omar E. Tovar-Herrera^{1,4}, Martha Torres², Mabel Rodríguez¹, Sonia Humphris³, Ian K. Toth³, Lorenzo Segovia¹, Mario Serrano² & Claudia Martínez-Anaya¹✉

Expansins are encoded by some phytopathogenic bacteria and evidence indicates that they act as virulence factors for host infection. Here we analysed the expression of *exl1* by *Pectobacterium brasiliense* and *Pectobacterium atrosepticum*. In both, *exl1* gene appears to be under quorum sensing control, and protein Exl1 can be observed in culture medium and during plant infection. Expression of *exl1* correlates with pathogen virulence, where symptoms are reduced in a $\Delta exl1$ mutant strain of *P. atrosepticum*. As well as $\Delta exl1$ exhibiting less maceration of potato plants, fewer bacteria are observed at distance from the inoculation site. However, bacteria infiltrated into the plant tissue are as virulent as the wild type, suggesting that this is due to alterations in the initial invasion of the tissue. Additionally, swarming from colonies grown on MacConkey soft agar was delayed in the mutant in comparison to the wild type. We found that Exl1 acts on the plant tissue, probably by remodelling of a cell wall component or altering the barrier properties of the cell wall inducing a plant defence response, which results in the production of ROS and the induction of marker genes of the JA, ET and SA signalling pathways in *Arabidopsis thaliana*. Exl1 inactive mutants fail to trigger such responses. This defence response is protective against *Pectobacterium brasiliense* and *Botrytis cinerea* in more than one plant species.

Expansins are non-hydrolytic proteins with cell wall-loosening activity in plants. They are encoded in all land plants where they have a cell wall modifying activity, important during different developmental processes¹. In non-plant organisms, their biological role is not fully characterised but there is evidence that expansins are important for pathogenesis in some bacterial species^{2–4}. Because of their structural similarities, it was initially assumed that plant and bacterial expansins had the same effect on the plant cell wall, however, *in vitro* extensibility experiments show higher levels of activity of plant expansins in comparison to their bacterial homologues. Expansins are composed of two tightly packed domains: domain 1 (D1) that resembles glycosyl hydrolase family-45 (albeit lacking certain catalytic residues), and for which conserved amino acids for loosening activity

¹Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, 62210, Cuernavaca, Morelos, Mexico.

²Centro de Ciencias Genómicas, Universidad Nacional Autónoma de México, 62110, Cuernavaca, Morelos, Mexico.

³The James Hutton Institute, Invergowrie, Dundee, DD2 5DA, UK. ⁴Present address: Department of Biomolecular Sciences, The Weizmann Institute of Science, 7610001, Rehovot, Israel. ✉e-mail: cma@ibt.unam.mx

have been identified, e.g. Asp82 (in EXLX1 from *B. subtilis*) which is essential⁵; domain 2 (D2) is a family 63 carbohydrate binding module (CBM) according to the CAZY database with conserved aromatic amino acids for polysaccharide binding^{1,5–8}. Active plant expansins belong to the EXPA (or α -expansins) family with high levels of creep activity for cell wall extension⁹. In contrast, *Zea mays* EXPB1, a representative of the EXPB (or β -expansins) family, acts on maize silk cell walls loosening and solubilising highly substituted glucuronoarabinoxylan, with the possible function of facilitating the pollen tube penetration into the maize stigma and style^{10–13}. EXLA (expansin-like α) and EXLB (expansin-like β) are plant expansin-like proteins with no known function to date⁹. The EXLX family comprises all the expansin proteins from non-plant organisms, which seem to have evolved from the same ancestor as plant expansins^{14,15}. Although EXLX1 from *B. subtilis* is a structural homologue of plant β -expansins, they display different activities¹⁶. The surface of bacterial expansin proteins is highly charged and, according to their net charge at pH 7, they are either basic (with theoretical pI > 9) or acidic (with theoretical pI < 6). This feature correlates with the type of organism in whose genomes they are encoded, whereby basic expansins are mainly found in Gram-positive bacteria, while genes encoding acidic expansins are mainly found in Gram-negative bacteria¹⁷. Expansin-containing microorganisms inhabit diverse ecological niches, but many of them interact with plant and algae material either as saprophytes, mutualists or pathogens, supporting the idea that the substrate for microbial expansins could also be part of the plant cell wall¹⁵. Accordingly, *Pectobacterium brasiliense*¹⁸ (formerly named *P. carotovorum* subsp. *brasiliense*) expansin-like protein 1 (Exl1), preferably binds to the xylem secondary cell wall in celery petioles, whereas *Bacillus subtilis* EXLX1 binds to the cell wall of distinct cell types¹⁹. The consequences of lacking expression of EXLX family members may be detrimental to bacterial interactions with plant hosts: *B. subtilis* expansin null mutants lose their ability to colonise maize roots by more than 90%⁵; infection symptoms in tomato are also reduced both for an expansin null mutant of *Ralstonia solanacearum* and for *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* carrying a truncated form of the plasmid-borne gene lacking the expansin module. Contrarily, the deletion of *C. michiganensis* chromosomal expansin (Δ CmEXLX2) increased disease symptoms in tomato^{2,3}. Interestingly, of the very few bacteria (approximately 2% of all current annotated prokaryote genomes) with expansin genes, several are xylem-dwelling phytopathogens: *Pectobacterium*, *Ralstonia*, *Clavibacter*, *Xylella* and *Xanthomonas*, suggesting a role in adaptation to this plant structure. Consistent with this, expansin Exl1 from *P. brasiliense* binds a substrate surrounding the xylem vessels of celery¹⁹ and *Erwinia tracheiphila* expansin, along with a truncated GH5, are both necessary for proper infection through the xylem of squash⁴.

Members of the *Pectobacterium* genus are important expansin-possessing phytopathogens that cause economic losses worldwide and are found in the top ten plant pathogenic bacteria because of their economic impact and/or scientific importance²⁰. *P. brasiliense* causes soft rot disease in crops and vegetables during cultivation, transportation and storage. It is widely distributed geographically and has a broad host range, including celery, broccoli, carrot, chard, beetroot, potato, tobacco and cactus²¹. On the other hand, *P. atrosepticum*, an inhabitant of temperate regions, is the main cause of blackleg disease in potato, to which it is almost exclusively restricted^{20–22}. Despite these differences, both species share high similarity, with approximately 77% of the complete *P. atrosepticum* chromosome present in *P. brasiliense*²³, and with some similarities in the pathogenesis-related control of gene expression. Both species are present in the soil and on plant surfaces, penetrating the tissues through host natural openings (such as lenticels and stomata), or are inoculated into wounds by chewing nematodes or insects, from which they move to the xylem structures by an unknown mechanism^{21,22}. Within the tissue, and in a cell density-controlled manner, *Pectobacterium* species produce a variety of plant cell wall degrading enzymes (PCWDEs) including pectate lyases, cellulases, xylanases, polygalacturonases and proteases that are responsible for disease symptoms²⁴.

PCWDEs secreted by pathogens release molecules derived from the polymers of the plant cell wall (such as oligogalacturonides²⁵, cello-oligosaccharides²⁶ or xyloglucan oligosaccharides²⁷) named damage-associated molecular patterns (DAMPs) that trigger a plant defence response involving pattern recognition receptors (PRRs) and the induction of different signalling cascades^{28–30}. The fungal expansin-related proteins cerato-platanin and swollenin are proteins without catalytic properties that also act on the plant cell wall triggering a plant defence response. Cerato-platanin's single domain is similar to D1 of expansins and infiltration of this protein in tobacco leaves results in a systemic acquired resistance response protecting against infection by *B. cinerea* and *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* after a subsequent challenge^{31,32}. Swollenins are cellulose-acting proteins containing a CBM family 1 at the N-terminus and a C-terminal expansin-like domain. Previous infiltration of the swollenin CBM into cucumber leaves protects against infection with *B. cinerea* and *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*³³. In the case of the nematodes *Globodera rostochiensis* and *Heterodera avenae*, it was also reported that the expansin-like proteins GrEXPB2 and HaEXPB2 respectively, could act as effectors inducing cell death in their plant hosts^{34,35}. However, the mechanism by which these responses come about is not clear.

Here, we analyse the expression and regulation of expansin *exl1* in *P. brasiliense* BF45 and *P. atrosepticum* SCRI 1043. By altering the normal levels of *exl1* either by overexpression in *P. brasiliense* or in *P. atrosepticum*, or in a null mutant for *P. atrosepticum*, we identified Exl1 contribution to the infection of plant hosts. Our results suggest that Exl1 modifies the plant cell wall or its barrier properties, as the infiltration of pure preparations of wild type protein, but not of two inactive expansin mutants, triggers an immune response in *A. thaliana*. This response is consistent with the activation of a DAMP-mediated response, in which salicylic acid, ethylene and jasmonate pathway genes are induced. The Exl1-induced defence response protects *A. thaliana* against a subsequent challenge with *P. brasiliense* or *Botrytis cinerea* and is also observed in one other plant species (celery).

Results

***exl1* is expressed during plant infection and regulated by quorum sensing.** Phenotypes for expansin gene mutants in phytopathogenic bacteria have been reported but analysis of expansin expression has not been addressed. We investigated the expansin Exl1 of *P. brasiliense* BF45 and *P. atrosepticum* SCRI 1043 (we gave both proteins the same name as they are orthologues, with 98.5% identity at the amino acid level). Firstly, we used

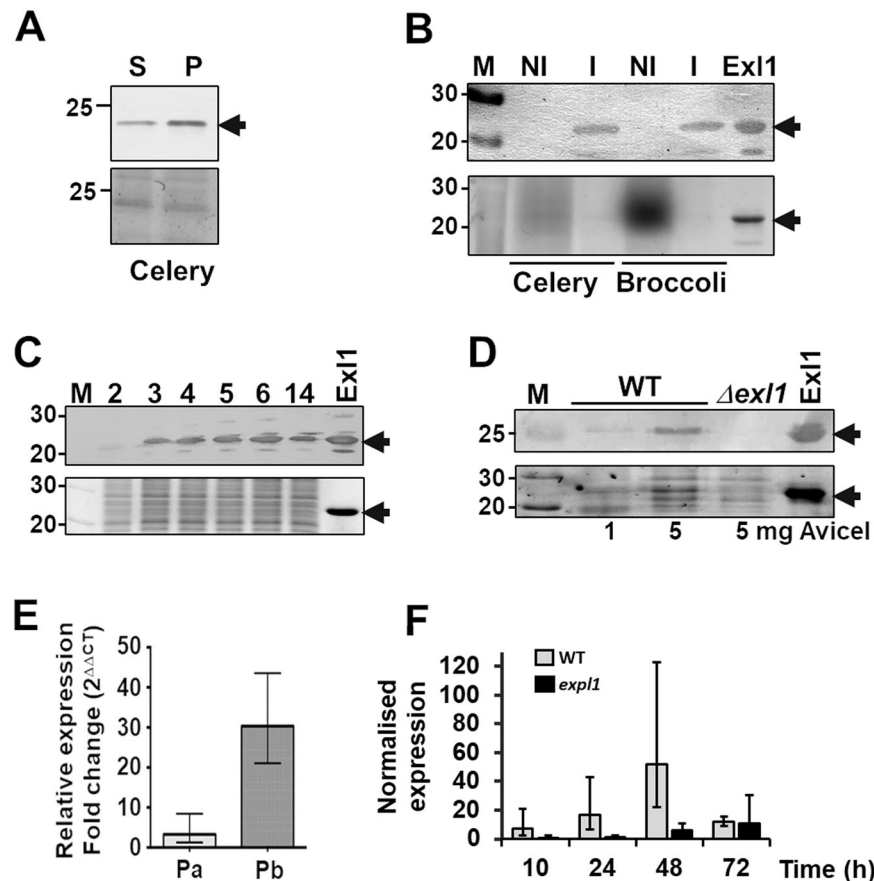


Figure 1. Expansin gene *exl1* is expressed during infection and is controlled by quorum sensing. (A) Western blot detection of Exl1 from infected celery (arrow, top panel), both in the supernatant (S) of the macerated tissue and in the insoluble fraction (P for pellet), in comparison to the protein loaded (bottom panel). (B) Anti-Exl1 antibody is specific for *P. brasiliense* Exl1, as it does not cross react with endogenous plant expansins (NI) vs. *P. brasiliense* BF45 infection (I). (C) Induction of Exl1 (arrow) through time is observed reaching a maximum at 6 h (≈ 1.3 OD₆₀₀). (D) *P. atrosepticum* SCRI 1043 Exl1 expression in wild type and $\Delta exl1$ strains grown in LB obtained by pull down with 1 mg and 5 mg of cellulose (Avicel); from B-D, top panel is the Western blot anti Exl1, and bottom panel is the loaded protein control containing 1 μ g of pure Exl1 (arrow). (E) Relative *exl1* gene expression level in *P. atrosepticum* SCRI 1043 (Pa) and *P. brasiliense* BF45 (Pb) infected potato leaves at 24 hpi. (F) Kinetics of relative *exl1* gene expression in *P. atrosepticum* wild type (grey bars) and a QS defective mutant (black bars) by RT-qPCR in infected potato leaves over a 72-h period. Error bars indicate \pm standard deviation of the average across three independent experiments ($n = 24$) (panels E and F). Complete Western blot membranes and protein gels are shown in Figs. S1 to S3.

P. brasiliense to analyse Exl1 expression during infection and in laboratory media. *P. brasiliense* infects several hosts, including celery and broccoli. Direct inoculation of the cells into celery petioles results in maceration after 24 h. Using an antibody against an epitope in D2, we detected Exl1 by western blot in both the soluble and insoluble fractions of the macerated tissue (Fig. 1A), but not in non-infected celery or broccoli (Fig. 1B), confirming the expression of *exl1* during infection by *P. brasiliense*. We then analysed for the presence of Exl1 protein in two conditions: (i) LB medium, in case *exl1* was regulated by population density; and (ii) in pectin-containing medium, in case pectin breakdown products were required³⁶. Exl1 was observed both in the supernatant (after pull-down with Avicel having concentrated it 5-fold) and in the pellet of centrifuged bacteria (where it was easily detected) in both growing conditions, increasing in a cell-density dependent manner with a peak just before entering the stationary phase, which is suggestive of quorum sensing (QS)-regulation (Fig. 1C and Fig. S2). The level of Exl1 in *P. atrosepticum* was lower in comparison to *P. brasiliense*, thus to detect the protein by western blot from cells grown in LB or pectin media bacteria had to be lysed and Exl1 pulled down with insoluble cellulose from the supernatant of these preparations (Fig. 1D). Indeed, RT-qPCR showed 30-fold greater expression of *exl1* in *P. brasiliense* in comparison to *P. atrosepticum* (Fig. 1E). Subsequently, we used RT-qPCR to determine the induction of *exl1* during infection of potato leaves by *P. atrosepticum*. We observed a basal expression level of *exl1* during the first 10 h post infiltration followed by an increase with maximal expression levels after 48 hours (Fig. 1F). We confirmed that in *P. atrosepticum* *exl1* regulation is under the control of QS because *exl1* transcripts are down-regulated by approximately 8, 9 and 6-fold at 10, 24 and 48 post inoculation, respectively in the *exl1* mutant, which

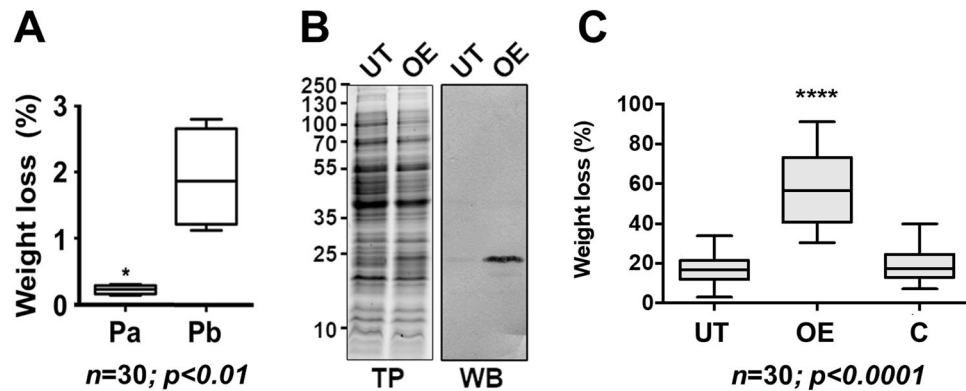


Figure 2. Expansin expression correlates with the level of infection. (A) *P. brasiliense* is more virulent than *P. atrosepticum* on potato tuber causing higher tissue maceration at 7 dpi/23 °C. Box plots (showing median and first and third quartiles and whiskers indicating the range of outliers) of three independent experiments ($n = 30$); significance $p < 0.01$ (*) was calculated with the Mann-Whitney test. (B) Western blot of the over-expression (OE) of *exl1* gene *P. brasiliense* BF45 compared to the untransformed strain (UT), and control of total protein (TP). Complete membranes with different contrasts can be found in the Supplementary materials. (C) Increased celery tissue maceration by *exl1* over-expression (OE) in *P. brasiliense* BF45 in comparison to untransformed *P. brasiliense* (UT) and to GFP overexpression as an irrelevant control (C). Box plots of three independent experiments ($n = 30$); significance $p < 0.0001$ (****) was calculated with Kruskal-Wallis tests for non-parametric data.

is defective in the synthesis of N-(3-oxohexanoyl)-L-homoserine lactone (OHHL)²⁴. However, other regulators might exist as a degree of expression was observed 72 h post-infiltration (Fig. 1F).

Higher levels of Exl1 correlate with increased virulence towards the hosts. We have determined that *P. brasiliense* produces a faster and greater extent of maceration (measured as tissue loss) in potato tubers compared to *P. atrosepticum* even at 23 °C (Fig. 2A), the temperature at which *P. atrosepticum* is most infective, which correlates with the level of expansin expressed by each species (Fig. 2A). We wished to determine whether modulating expansin expression could alter maceration of the host tissue. Due to difficulties in obtaining an expansin null mutant in *P. brasiliense*, the *exl1* gene was instead overexpressed in *P. brasiliense* under the control of the strong *TRP* promoter, achieving fifteen-fold greater expression in LB broth when compared to the wild type cells (Fig. 2B). This resulted in increased celery maceration (Fig. 2C). On the other hand, we created a null mutant of the expansin in *P. atrosepticum* ($\Delta exl1$) (Fig. 1D). Characterisation of this mutant showed that some phenotypes were indistinguishable from the wild type strain, including growth in LB and in minimal media containing pectin, the general activity of their PCWDEs (cellulases, pectinases and proteases), biofilm production and attachment to potato roots (Fig. S4). However, we observed a reduction of approximately three-fold tissue maceration in potato tubers with respect to the wild type strain (Fig. 3A). Inoculation of wounded potato petioles with the mutant strain also caused fewer symptoms than the wild type strain, which additionally showed tissue damage away from the inoculation site (Fig. 3B). When bacteria, either wild type or mutant, were allowed to enter the tissue through the natural openings of the plant (i.e. not creating a wound in the tissue), by placing a cell suspension drop on intact potato leaves, a dark mark appeared three days later in the case of infection with wild type cells but not with the mutant (Fig. 3B). The low maceration phenotype of $\Delta exl1$ was reversed and slightly increased by over-expression of *exl1*, similar to the wild type strain when also overexpressing *exl1* (Fig. 3A). We then asked whether *B. subtilis* EXLX1 (a basic expansin) could also complement the $\Delta exl1$ strain using a plasmid with the *BsEXLX1* gene under the control of the *TRP* promoter. Surprisingly, this construct was unable to recover the infectivity defect of the mutant (Fig. 3A), suggesting that either Exl1 and *BsEXLX1* have different activities or targets on the cell wall, possibly due to the relative difference in their electric charge. Another possible explanation would be that *BsEXLX1* was not properly folded in our *Pectobacterium* strains. Finally, as expected, overexpressing an irrelevant gene (*GFP*) did not rescue the mutant phenotype (Fig. 3A).

To further characterise the differences between the infectivity of *P. atrosepticum* wild type and $\Delta exl1$, we transformed both strains with a plasmid expressing the red fluorescent protein and observed the cells by confocal microscopy three days after inoculation in potato plants. We prepared cross-sections of the inoculation site (which corresponded to the second petiole node -designated as 0 cm) and from the tissue one centimetre above (+1 cm) and below (-1 cm) this site (Fig. 3B). The fluorescence was more intense in samples infected with the wild type strain at all locations (0, +1 and -1 cm) in comparison with the mutant (Fig. 3C) but in both cases the signal was weaker at -1 cm, in comparison to +1 cm, probably because cells tended to move to the upper part of the plant (Fig. 3C). When cells entered the leaves via the natural plant openings there was also a stronger fluorescent signal in the case of the wild type strain (Fig. 3D). Comparable results were obtained with inoculated potato tubers (Fig. 3E). The difference in fluorescence between wild type and mutant could be attributed to at least two factors: firstly, that the mutant cells are more susceptible to the plant defences, although measuring *in vitro* cell survival of the strains under stress in the presence of oxidative species (H_2O_2) or in hyperosmotic medium did not

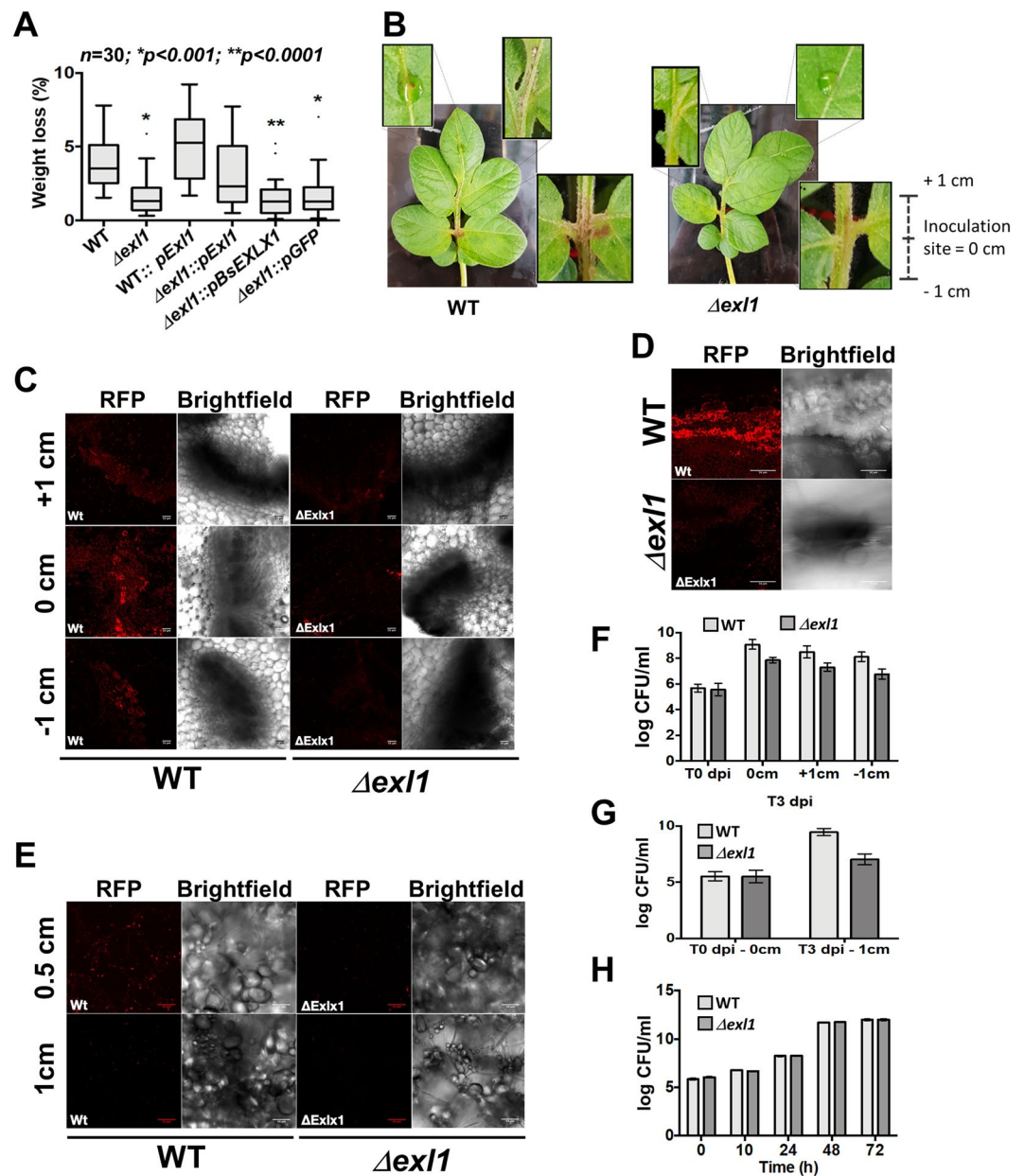


Figure 3. Expansin mutant of *P. atrosepticum*, $\Delta exl1$, has reduced infection symptoms. (A) Maceration levels of potato tubers is reduced in the expansin mutant in *P. atrosepticum* SCRI 1043 ($\Delta exl1$) compared to the wild type strain (WT) at 7 dpi/28°C. Phenotype is rescued by over-expression of *exl1* gene reaching similar levels to the overexpression in the WT strain, but not by over expression of *B. subtilis EXLX1* or *GFP* irrelevant control. Box plots of three independent experiments ($n=30$); significances $p < 0.0001$ (*) and $p < 0.0001$ (**) were calculated with Kruskal-Wallis tests for non-parametric data. (B) Early black leg infection symptoms induced in potato plants by inoculating *P. atrosepticum* WT or mutant $\Delta exl1$ in a small wound into the petiole at the second nodule, or by placing a cell suspension drop on the surface of intact leaves, observed at 72 hpi. (C–E) Confocal images of samples obtained at the inoculation site (0 cm) or 1 cm above (+1 cm) or below (–1 cm) of potato petioles at 72 hpi with wild type (WT) or $\Delta exl1$ cells expressing the red fluorescent protein (RFP) from petioles (C); leaves (D); and potato tubers at 0.5 cm and 1 cm from the potato surface (E). (F–H) Colony count of bacteria recovered from: potato petioles at 0 cm on the inoculation time (T0), and at 3 dpi at +1 cm or –1 cm (F); potato tubers at 0 cm, on the inoculation time (T0), and at 3 dpi at –1 cm (G); fully infiltrated potato leaves at 3 dpi (H). Error bars indicate the \pm standard deviation of the average of colony formation units (CFU) across three independent experiments ($n=6$) (panels F–H).

indicate any difference (Fig. S5); secondly, that the same number of cells were present but that the mutants lost the plasmid faster than the wild type strain. Cell counts (CFUs) at three-days post infection confirmed that there were indeed fewer cells in the $\Delta exl1$ mutant than the wild type strain, including at the inoculation site after starting the

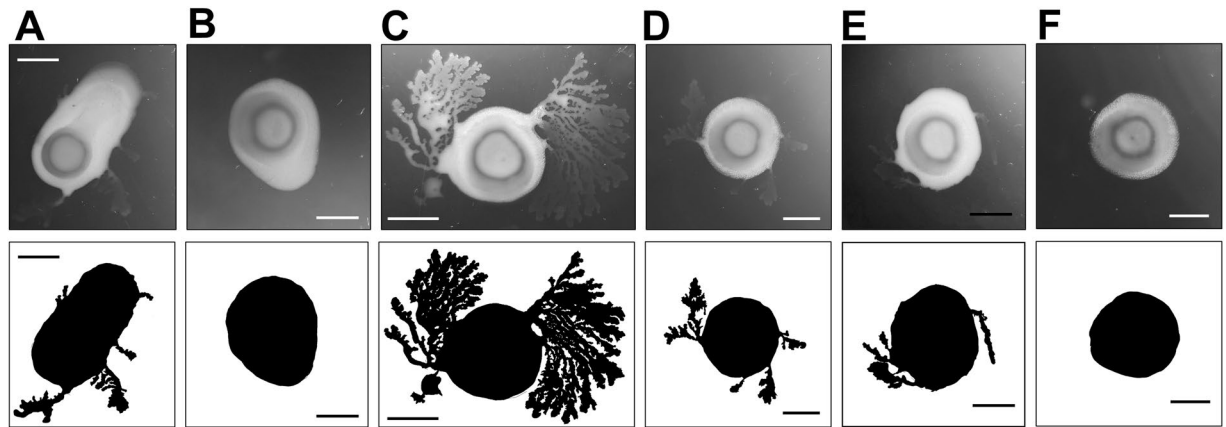


Figure 4. Exl1 is required for swarming motility in *P. atrosepticum*. Colonies, (and colonies silhouette at the bottom) growing in 0.4x MacConkey agar 48 h/28 °C, of: (A) *P. atrosepticum* wild type; (B) $\Delta exl1$ strain; (C) wild type *P. atrosepticum* over-expressing *exl1*; (D) $\Delta exl1$ strain over-expressing *exl1*; (E) $\Delta exl1$ strain over-expressing *BsEXLX1*; (F) $\Delta exl1$ strains over-expressing *GFP* as a control. Bar = 295 pixels.

experiment with equal numbers of cells, both in the petioles (Fig. 3F) and in tuber (Fig. 3G). In contrast, when mutant and wild type strains were infiltrated into the tissue of potato leaves under vacuum, we observed no difference in the number of bacteria counted for each strain, nor were there differences in the degree of maceration (Fig. 3H). This suggests that the virulence of $\Delta exl1$ cells is comparable to wild type *P. atrosepticum*, but that the mechanism by which the bacteria access the plant tissue is somehow affected.

Expression of *exl1* correlates with the swarming motility in *Pectobacterium atrosepticum*. We analysed whether the expansin mutant could have a motility defect. Indeed, mutant cells grown in soft MacConkey agar showed delayed swarming in comparison to the wild type, which under the same conditions managed to extend colony projections or tendrils composed of elongated and hyper-motile cells. The mutant strain eventually produced tendrils (approximately 24 h later than the wild type strain) but always in lesser quantities than the wild type, which in turn showed larger and more abundant tendrils that grew faster when overexpressing *exl1* gene (compare Fig. 4A to Fig. 4C). On the contrary, $\Delta exl1$ cells swam similarly to wild type cells (Fig. S6), which indicates that their flagella are normal. The swarming defect was recovered by complementing with both *exl1* and *BsEXLX1* genes (Fig. 4A–F), although at this point we are unable to correlate this plant-independent phenotype with the infectivity of the strains.

Infiltrated Exl1 affects the plant cell wall and protects against pathogens in *Apium graveolens* and *Arabidopsis thaliana*. We have previously reported that Exl1 binds to the secondary cell wall of xylem vessels and that incubation of isolated helical bundles with Exl1 releases an unidentified polysaccharide¹⁹. Thus, we asked whether Exl1 could also be modifying the cell wall *in planta*. For this, we infiltrated pure Exl1 protein in celery petioles, then challenged with *P. brasiliense* 24 h after infiltration and observed reduced maceration in comparison to the infiltration of the buffer (mock) (Fig. 5A). We repeated the experiment with the Exl1 activity-dead mutants D83A in D1 and the triple aromatic Y125 A/W126A/Y157A mutant (YWY) in D2, followed by a challenge with bacteria, after which we observed the same level of maceration as in the buffer control (Fig. 5A). These results suggest that Exl1 activity, rather than the protein, is being detected by the plant, probably activating a defence response. To further analyse this protective phenotype, we switched to using *Arabidopsis thaliana* as more powerful genetic tools exist for this species and it is also susceptible to *P. brasiliense* infection. Once more, we observed less maceration with Exl1 pre-infiltration followed by challenge with *P. brasiliense* (Fig. 5B), which was also dependent on the expansin activity as the inactive mutants failed to stimulate the protective response. Again, *B. subtilis* EXLX1 infiltration was unable to protect against infection with *P. brasiliense*. Exl1 protection was still significant after 48 h of Exl1 infiltration and evident after 72 h, when the pathogen population is large enough to surpass the plant immune system (Fig. 5B). The incidence of macerated *A. thaliana* leaves was dependent on the amount of infiltrated Exl1, which we considered an indirect measurement of the protein activity (Fig. 5C). Exl1 activity on *A. thaliana* leaves also reduced the symptoms of *B. cinerea* infection (Fig. 5D), indicating the onset of a general plant defence response against necrotrophs.

Exl1 triggers a ROS burst and plant defence responses dependent on JA and SA. Protection towards pathogens is the result of a priming event, in this case the presence of Exl1, due to the accumulation of ROS and the induction of defence pathways mediated by hormones such as salicylic acid (SA), jasmonic acid (JA) and ethylene (ET). We determined whether marker genes of these pathways were triggered by Exl1 in *A. thaliana* leaves using RT-qPCR analysis at the following timepoints: 5 minutes, 1 h and 24 h post infiltration with Exl1 only. We also performed the same analysis after a challenge of 24 h with *P. brasiliense*. ROS accumulation is among indicators of activation of plant defences and we thus evaluated the expression of *ZAT12*, a marker gene for ROS.

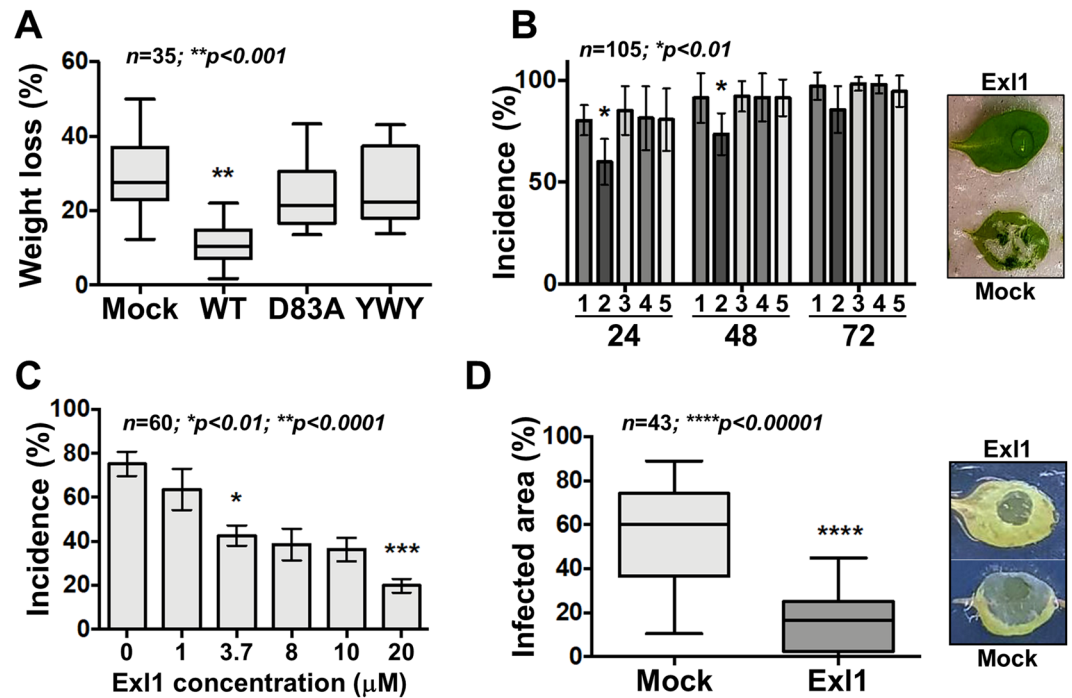


Figure 5. Exl1 activity protects from pathogens challenge in different hosts. (A) Maceration levels of celery petioles challenged with *P. brasiliense* BF45, 24 h after previous infiltration with buffer (Mock), or 3.7 μM pure Exl1 (WT), or expansin inactive D83A, and Y125A/W126A/Y157A (YWY). Box plots of three independent experiments ($n = 35$); significance $p < 0.001$ (**) was calculated with Kruskal-Wallis tests for non-parametric data. (B) Likewise, incidence of *Arabidopsis thaliana* leaf maceration levels challenged with *P. brasiliense* BF45, 24 h after previous infiltration with buffer (#1 bars), or 3.7 μM pure Exl1 (#2 bars), *B. subtilis* EXLX1 (#3 bars), D83A mutant (#4 bars), and YWY (#5 bars), over a 72-h period. An example of protected (Exl1) or macerated (Mock) leaves is shown on the right. Error bars indicate the \pm standard deviation of the average across at least three independent experiments ($n = 105$); significance $p < 0.01$ (*) was calculated according to a Kruskal-Wallis test for non-parametric data. (C) Dose-dependent protection conferred by infiltrated Exl1 in *A. thaliana* leaves treated 24 h previously, challenged with *P. brasiliense* BF45. Error bars indicate the \pm standard deviation of the average across at least three independent experiments ($n = 60$); significances $p < 0.01$ (*) and $p < 0.0001$ (***) were calculated according to a Kruskal-Wallis test for non-parametric data. (D) Exl1 protection to infection 24 h after previous incubation with the pathogenic fungus *Botrytis cinerea*. An example of protected (Exl1) or infected (Mock) leaves is shown on the right. Box plots of at least three independent experiments ($n = 43$); significance $p < 0.00001$ (****) was calculated according to a Mann-Whitney test for non-parametric data.

No induction of *ZAT12* was observed at any of the timepoints analysed and we even observed a 3.3-fold reduction at 24 h and again (five-fold change) 24 h after infection with *P. brasiliense* (Fig. 6A). Because ROS accumulate in a pulsating fashion³⁷, to determine their presence we used the fluorescent dye dichloro-dihydro-fluorescein diacetate (DCFH-DA) and found an increased signal at 30 min (Fig. 6B). This increase was still detectable 90 min post treatment with Exl1 (Fig. 6C), indicative of a wave-like dynamic in the production of ROS.

Then, we analysed marker genes for the JA, SA and ET pathways after infiltration with Exl1. The *PDF1.2* (a JA-induced plant defensin) was up-regulated by a 3.6-fold and 1.9-fold change during the early immune response after 5 min and one hour of treatment, respectively, but repressed by 2.2-fold at 24 h post Exl1 treatment (Fig. 7A). *ALLENE OXIDE SYNTHASE* gene (*AOS*- a biosynthetic JA gene) was 1.3-fold and 20-fold up-regulated at 1 h and 24 h, respectively, after infiltration of Exl1 (Fig. 7B). To monitor the ET-induced response, we analysed gene *PR4* that showed a 4-fold induction after 5 min and 2.4-fold induction at 1 h post Exl1 treatment, but it was 5-fold down-regulated after 24 h, showing a similar expression pattern to *PDF1.2* and in agreement with the synergism reported for ET and JA pathways³⁸ (Fig. 7C). The SA-responsive genes *PR1* and *EDS5* were 2.8 and 1.6-fold induced after 1 h but down-regulated at 24 h, respectively (Fig. 7D,E). These data indicate that SA-, JA- and ET-elicited responses are modulated at different times by the exogenous application of Exl1. To further confirm the involvement of JA and SA pathways, we used the *jar-1* and *eds5* *A. thaliana* mutants, impaired in the JA³⁹ and SA⁴⁰ pathways respectively, and also the transgenic *A. thaliana* line *NahG* which is deficient in SA accumulation⁴¹. In all cases, mutants treated with Exl1 lost the protective effect towards *P. carotovorum* BF45 infection, in contrast to the wild type *A. thaliana* (Fig. 7F). These data confirmed that the JA and SA pathways are involved in the immune response triggered by Exl1.

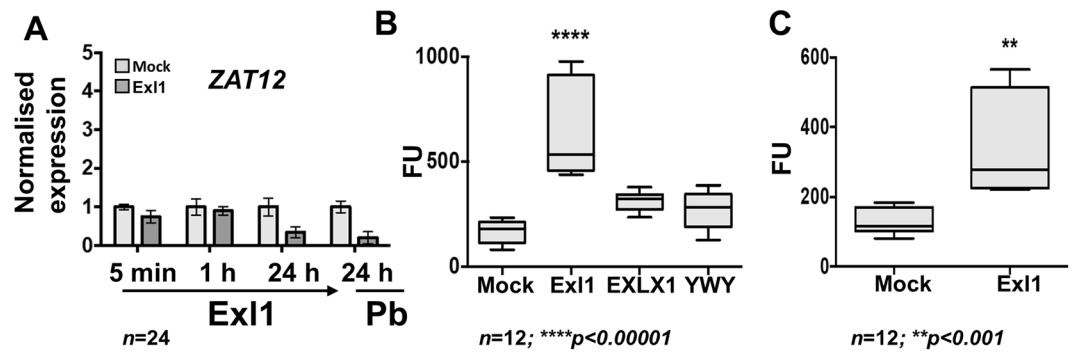


Figure 6. Exl1 infiltration triggers a burst of reactive oxygen species. (A) Relative expression level of ROS marker gene *ZAT12* by RT-qPCR. (B,C) Reactive oxygen species detected with dichloro-dihydro-fluorescein diacetate (DCFH-DA) in *A. thaliana* leaves 30 min (B) and 90 minutes (C) post infiltration with the indicated buffer (Mock), or 3.7 μ M proteins: Exl1, *B. subtilis* EXLX1 and the Exl1 triple mutant Y125A/W126A/Y157A (YWY). Fluorescent areas were determined using the Fiji software; FU are fluorescence units in pixels/cm². Box plots of at least three independent experiments ($n = 12$); significances $p < 0.001$ (**) and $p < 0.00001$ (****) were calculated according to an ordinary one-way ANOVA.

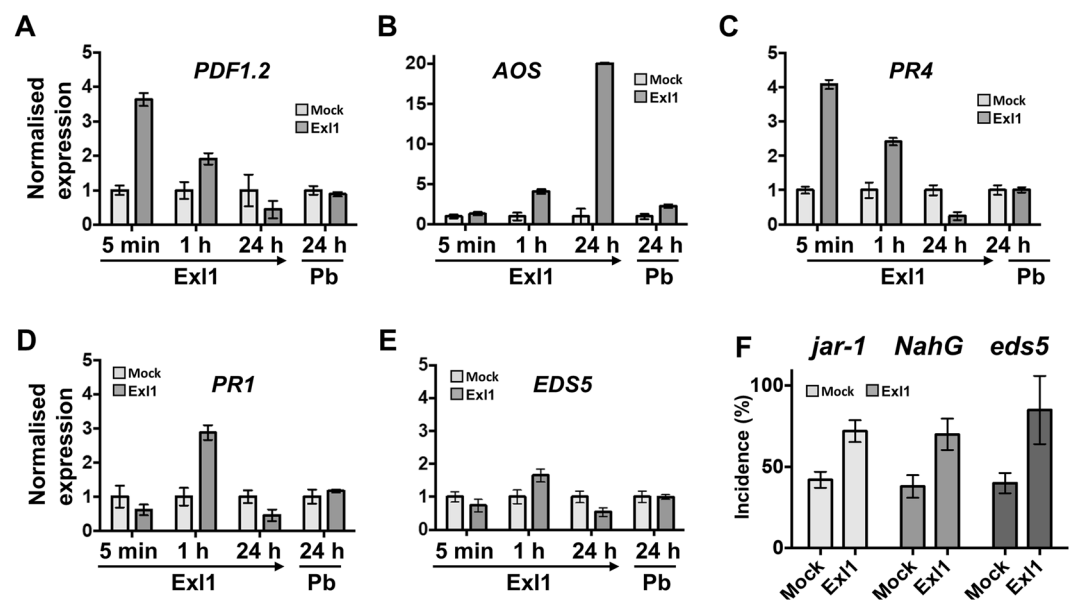


Figure 7. Exl1 activity triggers a plant defence response involving JA, ET and SA pathways in *A. thaliana* leaves. Normalised RNA expression levels by RT-qPCR of marker genes involved in the biosynthesis of plant defence hormones: jasmonic acid, *PDF1.2* (A) and AOS (B); ethylene, PR4 (C); salicylic acid, *PR1* (D) and *EDS5* (E). Expression was analysed 5 min, 1 h and 24 h and again 24 h after a challenge with *P. brasiliense* (Pb) previously treated with Exl1 for 24 h. (F) *A. thaliana* mutants impaired in the synthesis of JA (*jar-1*) and SA (*NahG* and *eds5*) previously treated (for 24 h) with Exl1 fail to confer protection and become more susceptible towards *P. brasiliense* BF45. Error bars indicate the \pm standard deviations of the average across three independent experiments ($n = 70$); no significant differences were determined with a Mann-Whitney test for non-parametric data.

Discussion

Here, we have shown that the expansin Exl1 protein is produced during infection by *P. brasiliense* and *P. atrosepticum*; that higher levels of Exl1 correlates with a more virulent phenotype and, conversely, absence of expansin produces less severe symptoms in potato. Thus, Exl1 can be considered as a virulence factor, which along with other pathogenesis-related genes (including those for the degradation of the plant cell wall), seems to be under QS-regulation. Previous work on QS-controlled genes important for pathogenesis in *P. atrosepticum* and *P. carotovorum* consistently identified gene ECA2220, annotated as a putative endocellulase^{42,43}, which corresponds to the *exl1* ortholog of *P. brasiliense*. ECA2220 and Exl1 differ in three residues in the mature protein (considering Gln24 in the complete sequence as Gln1 after the predicted site of the secretion signal peptide): S41N, D147N, and V151I in ECA2220 compared to Exl1. It was determined that ECA2220 is an acidic protein (pI of approximately 4) that is secreted through the TSS2 system in a similar fashion to the PCWDEs CelV, PelC and PrtW⁴².

Similarly to our findings, in *P. carotovorum* (*E. carotovora* subsp. *carotovora* strain MS20) ECA2220 expression is induced two-fold on addition of the quorum sensing autoinducer N-(3-oxo-hexanoyl)-L-homoserine lactone (OHHL) but its expression was not entirely dependent on OHHL, since some basal expression was observed in a mutant *carI*⁻ (*expI*) strain, unable to synthesize OHHL²⁴. In the same work, authors determined a 7.5 and 6.9-fold reduction of ECA2220 transcript by RT-qPCR at 12 and 20 h post-inoculation, respectively, in an *expI* mutant compared to the wild type *P. atrosepticum*, similarly to our results.

We found Exl1 protein in the supernatant of macerated tissue in celery, broccoli and potato following infection by *P. brasiliense* but, additionally, Exl1 was also found in the insoluble fraction containing digested plant material and bacterial cells, to which it must be bound. Exl1 binds cellulose and possibly other polysaccharides and, given that in LB medium (i.e. lacking plant cell walls) Exl1 is abundant in the pellet of non-lysed cells suggests that it could also bind exopolysaccharides (EPS) from the cell wall of *Pectobacterium*. Similarly, *B. subtilis* EXLX1 readily binds peptidoglycan⁵; however, the possibility of EXLX1 binding to the bacterial cells needs to be analysed, together with the effect this could have on the interaction with the plant roots given the drastic reduction in colonization of the expansin mutant strain. A possible effect of Exl1 binding to its own EPS would result in alterations to the amount produced or the structure of the EPS, but we observed that in the absence of Exl1 the quantity of biofilm in *P. atrosepticum* was not affected. However, quantification cannot discriminate the integrity of the biofilm between the mutant and the wild type if it existed. Our expansin mutant showed reduced disease symptoms and reduced cell counts in potato compared to the wild type control after wound inoculation, but this was not due to an increased sensitivity of the mutant to the plant defences because, when infiltrated directly into potato leaves, both mutant and wild type grew at comparable rates. Additionally, when challenged with oxidative or hyperosmotic stress *in vitro* the mutant strain was as resistant as the wild type (Fig. S5). Thus, we interpreted the low number of recovered mutant bacteria as a defect of this strain for colonization compared to the wild type, probably due to a reduced tissue penetration. Interestingly, when β -expansin activity is reduced (in a transposon insertion mutant in gene *EXPB1* or by RNA silencing in maize), a decreased efficiency of pollen tube penetration into the stigma and style tissue was also determined^{13,44}. *EXPB1* activity includes solubilisation of key polysaccharides from the middle lamella that cement neighbour cells; these polysaccharides can then be detected in the supernatant of reactions containing deproteinised walls^{11,12}. We have previously reported an *in vitro* polysaccharide solubilising activity for Exl1 from vascular bundles isolated from Swiss chard¹⁹, resembling the effects of *EXPB1* on maize silk, which could explain our observations in case the same effect of Exl1 occurred *in planta*. We hypothesise that Exl1 could be acting on the potato cell wall to allow cells to move through the plant tissue, because although symptoms are reduced, maceration of the tissue ensues given the normal expression of other PCWDEs. In support to this invasion/penetration phenotype of the expansin mutant, Rocha, *et al.*⁴ recently observed that an expansin and GH5 double mutant in *E. tracheiphila* is impaired in colonising sites distant to the inoculation point, and attributed this phenotype to a bacteria movement defect. Interestingly, the mutant Δ EXLX1 of *Ralstonia solanacearum* also shows wild-type virulence when directly introduced into the tomato vasculature, in contrast to inoculation in the soil where a less virulent phenotype was observed. This supports a requirement for expansins for optimal access into the host, although in this case it was due to hyper-attachment of the bacteria to tomato roots rendering them unable to enter the plant vasculature³. Other phenotypes have been found for expansin mutants in different bacteria, but it is not clear if accessibility to the host is involved. The expansin deletion mutant of *B. subtilis* for instance, shows very low colonization ability of maize roots but the underlying cause has not been analysed⁵. In contrast, our findings and others show that root attachment in *P. atrosepticum* and *C. michiganensis*³ was unaffected in the respective expansin mutants, indicating that expansin function is not involved in root attachment in these species.

We dismissed the possibility that the defect of our expansin mutant was due to flagellar defects, given that its swimming capacity was comparable to the wild type strain (Fig. S6), but surprisingly we found a difference in swarming on MacConkey soft agar. Swarming motility is an energetically costly displacement towards more nutrient rich sites, which includes cell differentiation of the swarmer cells that become elongated and hypermotile in comparison to non-swarmer cells^{45,46}. In different species, swarming correlates with virulence^{47,48}. We have determined that *Pectobacterium* swarmer cells are elongated and hypermotile⁴⁹, which are characteristics of a proportion of cells that we have found in the macerated tissue of infected vegetables, probably belonging to the population that travels away of the symptomatic site to invade other parts of the host. At this point we can only speculate on the role of Exl1 during swarming but it is possible that part of the exported protein remains attached to the EPS conferring electrostatic properties to the bacteria's surface that are important for cell movement on a hydrated matrix. Interestingly, a transposon insertion mutant in gene *EXPB1* of maize pollen has an aggregative phenotype and a dehydration defect that the authors attribute to altered hydrodynamic properties of the pollen coat or wall due to a lesser abundance of expansin on the pollen surface¹³. If *Pectobacterium* EPS is a target for Exl1, this could influence swarming and pathogenesis.

Our data show that Exl1 activity on the cell wall, and not the protein *per se*, stimulates a defence response reminiscent to the induced by damage associated molecular patterns (DAMPs)^{30,50} or by wall integrity alterations, such as reduction of cellulose biosynthesis^{51,52}. Both mechanisms involve JA, ET and SA pathways, ROS increase and resistance to pathogens. Indeed, Exl1 activity triggered a plant defence response resulting in resistance towards bacterial and fungal pathogens. We found induction of marker genes of the SA, JA and ET pathways and the protection provided by Exl1 was lost in JA- and SA-related mutants. Because the SA pathway is fundamental for acquisition of induced systemic resistance (ISR) in plants⁵³, we can hypothesize that Exl1 could also induce ISR in plants.

Our data cannot inform on the chemical nature of the elicitor molecule, but there is some evidence to support pectin involvement in Exl1 activity: i) our previous results of Exl1 polysaccharide-releasing capacity from the xylem of Swiss chard; ii) Exl1 preference for binding the intercellular spaces of the xylem vessels and the surrounding cells, which are enriched in pectin; iii) a negative surface electric charge of Exl1 that could serve

to repel and dissociate negatively charged pectin from cellulose; iv) production of ROS with pectin derivatives elicitation, but not with cello-oligosaccharides or xyloglucan oligosaccharides. There is, however, a limitation to this hypothesis regarding the size of the elicitor. Defence elicitation with pectic derivatives (oligogalacturonides -OGAs) depends on their polymerisation degree (DP) being 10–14 optimal. Larger DPs would be restricted to reach the plasma membrane by the cell wall but elicitation occurs in protoplasts or isolated membranes with large fragments⁵⁴. We hypothesize that if pectin was solubilised by Exl1 it could become the target of native plant polygalacturonases that would generate oligogalacturonides and trigger the defence response, assuming the presence of active pectin degradative enzymes at the time of Exl1 incubation. However, this might not be the case in our experiments given that in *A. thaliana* pectinases are found during leaf expansion⁵⁵, which does not correspond to the timing of Exl1 treatment, nor the treatment of celery petioles. Otherwise large detached fragments would need to be close enough to the membrane receptors to directly activate the response. Alternatively, Exl1 activity could be altering the barrier properties of the cell wall due to polysaccharides creep, as it has been shown for some bacterial and fungal expansins⁵⁶. Although creep levels by microbial expansins seem marginal in comparison to plant expansins, this might be sufficient for their biological function. Indeed, microcrystalline cellulose creep and reduced tensile stress of filter paper were demonstrated by Lior, *et al.*, 2016 for expansin *CclExl1* (as part of cellulosome fractions) from *Clostridium clariflavum*, even though *CclExl1* is expressed at low levels⁵⁷. Perturbations to the cell wall rigidity are sensed by a family of kinase receptors (malectine-like receptor kinases) on the cell membrane⁵⁸, such as FERONIA (FER) that additionally positively regulates pattern triggered immunity⁵⁹, and THESEUS1 (THE1) that participates on the response to cell wall damage during inhibition of cellulose biosynthesis⁶⁰. The ligand for THE1 upon cellulose synthesis inhibition remains obscure, although some authors speculate that it could be the cellulose synthetic complex itself or possibly a detached molecule. In the case that Exl1 provoked an alteration to the cell wall integrity, the plant response dependent on malectine-like receptor kinases could explain the observed reduced symptoms of the hosts after Exl1 treatment and a posterior pathogen challenge, since this pathway mediates ectopic lignin deposition. Still, the identity of the ligand for the receptor persists under this scenario. Finally, differently to our observations the *A. thaliana* mutant, *jar-1*, deposits more lignin than the wild type after treatment with cellulose synthase inhibitor isoxaben^{51,52}, whereas the same mutation became more sensible in our system.

Other microbial expansin-like proteins have shown immune responses in plants, but in contrast to the presence of cerato platanins (CP) from fungi⁶¹ or the nematode expansins *GrEXPB2*³⁴ and *HaEXPB2*³⁵ that cause plant necrosis (due to the hypersensitive response) Exl1 activity failed to produce cell death, in agreement with elicitation of pattern triggered immunity. This suggests that despite the similarities of these proteins they act in different ways and/or have different targets in the plant cell wall. Furthermore, we found that despite their predicted similar structure and conserved polysaccharide binding surface, Exl1 and *BsEXLX1* could have different roles or even different mechanisms of action, as we have not found a solubilising function for *B. subtilis*¹⁹ and it failed to prime the plant against *P. brasiliense* in our experimental conditions. Cell wall binding patterns between Exl1 and *BsEXLX1* differ due to distinct electric superficial charge, in which the unproductive binding through electrostatic interactions with the negative cell wall components dominates over the polysaccharide binding surface in *BsEXLX1*. This is reversed by mutation of the positive residues R173Q/K180Q/K183Q (RKK), which increases the productive binding of *BsEXLX1* onto cell wall microdomains⁶². These differences clearly provide an evolutionary advantage to different bacteria for successfully interacting with their host and it is possible that their structural similarities are unrelated from a biological point of view. Future work would tell whether *BsEXLX1* mutant RKK elicits a plant response and whether this affects the interaction of *B. subtilis* with its host, as the reason for the drastic difference in charge among bacterial expansins is yet unknown.

Conclusion

Due to the lack of hydrolytic catalysis of bacterial expansins their molecular mechanism has been elusive. By learning from the effects that they produce on plants, we may better understand their activity. Our results suggest that expansin Exl1 from *Pectobacterium* is a virulence factor that might be acting in a similar manner to β -expansins during the infection process, by facilitating bacterial movement through the plant tissue to reach the xylem. This activity makes Exl1 a novel protein effector that triggers an immune response dependent on salicylic acid, jasmonic acid, ethylene and ROS pathways. Furthermore, Exl1 induces resistance towards important bacterial and fungi phytopathogens, opening the possibility to explore its potential as a biocontrol molecule.

Material and methods

Media and strains. All strains were cultured on Luria Bertani (LB) agar or broth (with antibiotics when necessary) at $28 \pm 2^\circ\text{C}$ with aeration. For some experiments Liquid Enrichment Medium (LEM_{AG366}) composed of 1 mM NaOH, 1.5 mM MgSO₄, 7.5 mM (NH₄)₂SO₄, 5.7 mM K₂HPO₄ and 0.17% AG366 pectin from Agdia, Biofords, was used. *P. brasiliense* strain BF45 was kindly donated by Dr Oscar Mascorro from Universidad de Chapingo. *P. atrosepticum* SCRI 1043 and *exl1* mutant have been previously described²⁴. To create the expansin null mutant $\Delta exl1$, ~600 bp of the upstream and downstream regions of the expansin gene were PCR-amplified using the primers *XbaI*-fw, *HindIII*-rev, *XhoI*-fw and *ApaI*-rev described in Supplementary Table 1. To generate the marker exchange plasmid, this fragment lacking the expansin gene or a resistance gene cassette was cloned into the suicide vector pKNG101⁶³. The plasmid was introduced into *P. atrosepticum* SCRI 1043 by conjugation. The disruption of the gene was confirmed by PCR analysis, DNA sequencing and western blot.

Infection assays. Celery, broccoli, potato (leaves and tubers) were disinfected with 5% sodium hypochlorite and washed with distilled water. For the inoculation of celery and potato petioles a cut (~5 mm) was opened with a cutter and inoculated with 20 μl of a bacterial dilution adjusted to 0.1 OD₆₀₀ (10⁸ cells). A drop containing ~10⁹ cells was placed on the upper surface of potato leaves. Tubers were stabbed into the surface using a yellow pipette

tip and inoculated with 10 μ l of $\sim 10^8$ cells, and the orifice was sealed with Vaseline. Experiments were incubated at room temperature (RT) for three days in a humidity chamber. Plants were weighed before and after the macerated tissue was removed. Experiments were performed at least three times with sample numbers indicated in the corresponding figure legend (*n*). For data with non-Gaussian distributions (determined with a Kolmogorov-Smirnov normality test), statistical analyses were calculated according to the Mann-Whitney test (when comparing two samples) or the Kruskal-Wallis test for group comparison of non-parametric data, using GraphPad Prism version 6.04, GraphPad Software (La Jolla California USA).

Protein preparation for Western blot. Macerated tissue from infection with *P. brasiliense* BF45 was scooped out with a spatula and placed in clean 1 ml tubes, then centrifuged in a microcentrifuge at maximum speed at 4 °C. Protein concentration was determined in the supernatants with Protein Assay Dye Reagent Concentrate (BioRad) following the manufacturer's instructions. Six micrograms were run in SDS-PAGE. Pellets were resuspended in one volume of SDS-sample buffer and after boiling, 20 μ l were run in SDS-PAGE. Macerated tissue from potato tubers infected with *P. atrosepticum* wild type SCRI 1043 or Δ *exl1* strains, was collected and clarified by centrifugation and proteins quantified as indicated above, then 500 μ l of 5-fold concentrated supernatant (using Vivaspin filters with 10 kDa cutoff) containing 2.5 mg of protein were incubated with 5 mg Avicel (Sigma) 1 h/30 °C/1000 rpm, then centrifuged at maximum speed in a microcentrifuge, pellets were washed three times with 1x PBS. Proteins bound to Avicel were solubilised in 20 μ l of SDS-sample buffer and run in 10% SDS-PAGE. For Exl1 level analyses through the growth curve: cell cultures of *P. brasiliense* BF45 in LB or LEM_{AG366} media were initiated at 0.04 OD₆₀₀. One ml samples were taken every hour for the indicated times. Samples were centrifuged and pellets were resuspended sterile water volumes (μ l) according to a 130 relation volume:OD₆₀₀, then vortexed at maximum speed for 30 seconds at 4 °C and centrifuged again. Finally, 15 μ l of the supernatant were mixed with SDS-sample buffer, boiled and run in 10% SDS-PAGE. Five micrograms of protein from non-infected celery and broccoli were obtain after mechanical maceration of disinfected frozen tissue (using liquid nitrogen) in a mortar. Gels were incubated 1 min in 5% 2,2,2-trichloroethanol and visualised in a Gel Doc EZ Imager (BioRad) using the Stain-free tray.

Western blot. A polyclonal antibody developed in rabbit against the chemically synthesized peptide GMNDIPIEFTDVKG corresponding amino acids 167 to 180 of domain 2 of Exl1 was purchased from GeneScript. After SDS-PAGE, proteins were transferred to PVDF membranes (Millipore) and blocked with 5% skimmed milk. Anti-Exl1 primary antibody (diluted 1:40,000 in 1x PBS – 0.05% Tween 20) and secondary antibody (rat anti-rabbit-HRP 1:3000 -Invitrogen) were incubated 90 min each at room temperature with gentle shaking, followed by three washes with PBST, 5 min each after antibody incubation. Bands were developed with Novex HRP Chromogenic Substrate (TMB) (Thermo Scientific).

Quantitative RT-PCR. *exl1* expression. Potato leaves (4 per replica) were infiltrated with a bacterial suspension of *P. atrosepticum* wild type, Δ *exl1*, or Δ *exl1* (10^7 cells/ml) using a vacuum pump and 0.8 bar for 10 min. Infiltrated leaves were placed in plastic boxes with moist paper and incubated for 72 h at 22 °C. Samples were harvested at 0, 10, 24, 48 and 72 h and processed to determine the total number of bacterial cells (see below) or flash-frozen in liquid nitrogen for RNA extraction. Total RNA was isolated using the RNeasy Plant mini kit (Qiagen). Contaminant genomic DNA was digested in RNase-free DNase columns (Promega). cDNA was synthesized with 1 μ g of RNA using SuperScript III First Strand Synthesis System (Invitrogen). Primers for RT-qPCR are listed in Supplementary Table 1. PCR reactions were performed in a final volume of 12.5 μ l containing: 6.25 μ l of Sybr Green Master Mix 2 \times , 0.3 μ M of each primer, 1 μ l of diluted cDNA template (1:10) and 3.75 μ l of HPLC water. PCR conditions were 95 °C for 10 min followed by 40 cycles of 95 °C for 15 s and 60 °C for 1 min. Controls without template were included for each primer pair. Expression of gene *recA* was used as a reference.

***A. thaliana* immune response genes expression.** Quantitative RT-PCR of defence marker genes for *A. thaliana* was performed as follows: leaves (8 per replica) were frozen in liquid nitrogen and ground at the following times after Exl1 infiltration: 5 min, 1 h and 24 h; and 24 h following a challenge with *P. brasiliense* BF45. Total RNA was extracted using TRIzol reagent (Invitrogen). One μ g of RNA was used for the synthesis of cDNA using oligo dT and ProtoScript First Strand cDNA Synthesis Kit (New England Biolabs). PCR reactions contained 1 μ l of cDNA (diluted 1/40) in Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2 \times) (ThermoFisher Scientific) and 0.5 μ M of specific primers (described in Supplementary Table 1). PCR conditions were: 95 °C initial denaturation for 15 min, 45 cycles of 15 s/95 °C, 30 s/60 °C and 30 s/72 °C. Expression of gene At4g26410 was used as reference for normalization⁶⁴. All reactions were performed in 96-well plates using the Applied Biosystems StepOne and StepOnePlus Real-Time PCR System (ThermoFisher Scientific). Normalized gene expression was determined using the comparative $2^{-\Delta\Delta CT}$ method previously described⁶⁵.

Mutant complementation and *exl1* over-expression. Expansin gene was PCR-amplified from genomic DNA of *P. brasiliense* BF45 with primers XhoI-fw and SalI-rev (described in Supplementary Table 1) and cloned into pTB93F vector (kindly donated by Professor Sharon R. Long) between *SalI* and *XhoI* sites, and under the signal peptide with sequence MRRWRALLLAASVAVAPGLPATAA. Plasmids pTB93F-Exl1 and pTB93F (that express GFP as a control) were transformed by electroporation into BF45 strain competent cells. Briefly, cells were grown at 28 °C to mid-log phase between 0.7 and 0.8 OD₆₀₀ then chilled for 20 min on ice, and pelleted for 15 min/4000x g, washed 2x in 10% ice-cold glycerol and resuspended in 1/20 of the original culture volumes with 10% glycerol. Cells were electroporated in 0.1 cm cuvettes with 10 ng of plasmid by a pulse of 1.8 kV (Bio Rad). Cells were recovered in SOC medium for 1 h/28 °C/200 rpm shaking. Transformants were selected with 100 μ g/ml spectinomycin and 100 μ g/ml chloramphenicol. Exl1 levels were analysed in 5-fold concentrated supernatant of cultures grown at 28 °C overnight in LEM_{AG366} containing antibiotics by pull-down with 5 mg Avicel (Sigma),

and subsequent SDS-PAGE with 50 µg of total proteins and western blot. Band intensity was quantified by densitometry using the band detection and histogram tools of Fiji software⁶⁶.

Confocal microscopy. Plasmid pSB4C5-RFP was electroporated into *P. atrosepticum* SCRI 1043, and transformants were selected in LB agar with 20 mg/ml chloramphenicol. Three days post inoculation, cross sections of potato petioles were carefully taken from the inoculation site and 1 cm above or below this site. Slices of infected tubers were obtained at 0.5 and 1 cm below the inoculation site. Samples were placed on microscope slides and observed with an Olympus FV1000 confocal microscope with 10x and 20x objectives. Red fluorescent protein was excited at 488 nm using an argon laser and an HFT UV 488/543/633 nm dual dichroic excitation mirror with an NFT 490 Beam Splitter and a BP-500-530 IR emission filter for detection. The offset value was adjusted until no background fluorescence was observed. Images were obtained with LSM 510 Release Version 4.2 SP1 software (Carl Zeiss Macro- Imaging GmbH, R & D in collaboration with EMBL Heidelberg, Germany). Images were analysed with the Fiji software⁶⁶. Infection assays and cell confocal observation of RFP-transformed bacteria were performed at least four times.

Infection bacterial count. Sections of potato petioles or tubers at the indicated distances from the inoculation site were ground with 1 ml of 0.25x Ringer solution (38.5 mM NaCl, 1.4 mM KCl, 0.45 mM CaCl₂, 0.59 mM NaHCO₃, pH 7), 10³–10⁵ dilutions were plated onto crystal violet-pectin (CVP) plates to select for *Pectobacterium*⁶⁷ and determine the colony-forming units (CFU). The initial bacterial suspension was also plated and the resulting CFU were used as a control. Results show the average and standard deviation of the data. Experiments with a technical duplicate were performed by triplicate.

Swarming motility assays. The swarming phenotypes were studied as previously reported for *P. atrosepticum*⁴⁶. Briefly, freshly prepare plates of 0.4X MacConkey agar base (Sigma) supplemented with 0.5% glycerol were inoculated with 3 µl of ~1 × 10⁸ cells. Once the drop was completely dry the plates were incubated at 28 °C in a humidity chamber for 48 h. Experiments were performed at least five times.

Exl1 infiltration and pathogen challenge. Mature celery petioles and 4-week old leaves from *A. thaliana* strains (ecotype Columbia-0 (Col-0), or mutants *jar-1*⁶⁸ and *eds5*³⁹, and the transgenic line NahG⁴¹) were vacuum infiltrated with 0, 1, 3.7, 8, 10 or 20 µM of pure preparations of recombinant Exl1 (WT or mutants D83A and YWY prepared as indicated by Ollarte-Lozano *et al.*⁶⁹) and diluted in 0.002% glucose solution (mock). Experiments were incubated 24 hours at 20 °C ± 2 °C with continuous light in a humidity chamber, followed by inoculation of 6 µl of a LB suspension containing 10⁸ *P. brasiliense* BF45 cells and continuous incubation. After 24, 48 or 72 h, the incidence percentage (number of infected leaves) was calculated.

Intracellular ROS quantification. The ROS measurement was performed as previously reported⁷⁰. Briefly, *A. thaliana* leaves were infiltrated with the protein variants and after 5 min or 1 h were submerged in 60 mM of carboxy-2', 7'-dichloro-dihydro-fluorescein diacetate (DCFH-DA, Sigma) incubated for 30 min at RT in the dark, followed by a distilled water rinse to remove the dye excess. Fluorescence was measured using a Leica DMR epifluorescence microscope with a GFP filter (excitation 480/40 nm, emission 527/30 nm) and quantified from the acquired images with the Fiji software⁶⁶.

All figures were created with Power Point-Office 365 ProPlus (using the high-resolution export settings) and GIMP v 2.10.14 (<https://www.gimp.org/>) software.

Received: 13 September 2019; Accepted: 17 April 2020;

Published online: 08 May 2020

References

- Georgelis, N., Nikolaidis, N. & Cosgrove, D. J. Bacterial expansins and related proteins from the world of microbes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **99**, 3807–3823 (2015).
- Jahr, H., Dreier, J., Meletzus, D., Bahro, R. & Eichenlaub, R. The endo-beta-1,4-glucanase CelA of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* is a pathogenicity determinant required for induction of bacterial wilt of tomato. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* **13**, 703–714 (2000).
- Tanco, M. A. *et al.* Plant-like bacterial expansins play contrasting roles in two tomato vascular pathogens. *Mol. Plant Pathol.* **19**, 1210–1221 (2017).
- Rocha, J., Shapiro, L. R. & Kolter, R. A horizontally acquired expansin gene increases virulence of the emerging plant pathogen *Erwinia tracheiphila*. *bioRxiv* 681643 (2019).
- Kerff, F. *et al.* Crystal structure and activity of *Bacillus subtilis* YoaJ (EXLX1), a bacterial expansin that promotes root colonization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**, 16876–16881 (2008).
- Georgelis, N., Yennawar, N. H. & Cosgrove, D. J. Structural basis for entropy-driven cellulose binding by a type-A cellulose-binding module (CBM) and bacterial expansin. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **109**, 14830–14835 (2012).
- Yennawar, N. H., Li, L.-C., Dudzinski, D. M., Tabuchi, A. & Cosgrove, D. J. Crystal structure and activities of EXPB1 (*Zea m* 1), a beta-expansin and group-1 pollen allergen from maize. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103**, 14664–14671 (2006).
- Cosgrove, D. J. & Li, Z. C. Role of expansin in cell enlargement of oat coleoptiles (analysis of developmental gradients and photocontrol). *Plant Physiol.* **103**, 1321–1328 (1993).
- Sampedro, J. & Cosgrove, D. J. The expansin superfamily. *Genome Biol.* **6**, 1–11 (2005).
- Cosgrove, D. J., Bedinger, P. & Durachko, D. M. Group I allergens of grass pollen as cell wall-loosening agents. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **94**, 6559–6564 (2002).
- Tabuchi, A., Li, L. C. & Cosgrove, D. J. Matrix solubilization and cell wall weakening by β-expansin (group-1 allergen) from maize pollen. *Plant J.* **68**, 546–559 (2011).
- Wang, T., Chen, Y., Tabuchi, A., Cosgrove, D. J. & Hong, M. The target of β-expansin EXPB1 in maize cell walls from binding and solid-state NMR studies. *Plant Physiol.* **172**, 2107–2119 (2016).
- Valdivia, E. R., Stephenson, A. G., Durachko, D. M. & Cosgrove, D. Class B β-expansins are needed for pollen separation and stigma penetration. *Sex. Plant Reprod.* **22**, 141–52 (2009).

14. Nikolaidis, N., Doran, N. & Cosgrove, D. J. Plant expansins in bacteria and fungi: evolution by horizontal gene transfer and independent domain fusion. *Mol. Biol. Evol.* **31**, 376–386 (2014).
15. Chase, W. R. *et al.* Global cellulose biomass, horizontal gene transfers and domain fusions drive microbial expansin evolution. *New Phytol.* <https://doi.org/10.1111/nph.16428> (2020).
16. Kende, H. *et al.* Nomenclature for members of the expansin superfamily of genes and proteins. *Plant Mol. Biol.* **55**, 311–314 (2004).
17. Pastor, N., Dávila, S., Pérez-Rueda, E., Segovia, L. & Martínez-Anaya, C. Electrostatic analysis of bacterial expansins. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* **83**, 215–223 (2015).
18. Portier, P. *et al.* Elevation of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *odoriferum* to species level as *Pectobacterium odoriferum* sp. nov., proposal of *Pectobacterium brasiliense* sp. nov. and *Pectobacterium actinidiae* sp. nov., emended description of *Pectobacterium carotovorum* and. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **69**, 3214–3223 (2019).
19. Tovar-Herrera, O. E. *et al.* Analysis of the binding of expansin Ex11, from *Pectobacterium carotovorum*, to plant xylem and comparison to EXLX1 from *Bacillus subtilis*. *ACS Omega* **3**, 7008–7018 (2018).
20. Mansfield, J. *et al.* Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology. *Mol. Plant Pathol.* **13**, 614–629 (2012).
21. Toth, I. K., Bell, K., Holeva, M. C. & Birch, P. R. J. Soft rot erwiniae: from genes to genomes. *Mol. Plant Pathol.* **4**, 17–30 (2003).
22. Pérombelon, M. C. M. Potato diseases caused by soft rot erwinias: An overview of pathogenesis. *Plant Pathol.* **51**, 1–12 (2002).
23. Glasner, J. D. *et al.* Niche-specificity and the variable fraction of the *Pectobacterium* pan-genome. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **21**, 1549–1560 (2008).
24. Liu, H. *et al.* Quorum sensing coordinates brute force and stealth modes of infection in the plant pathogen *Pectobacterium atrosepticum*. *PLoS Pathog* **4**, e1000093 (2008).
25. Vorhölter, F.-J. *et al.* Involvement of bacterial TonB-dependent signaling in the generation of an oligogalacturonide damage-associated molecular pattern from plant cell walls exposed to *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* pectate lyases. *BMC Microbiol.* **12**, 239 (2012).
26. de Azevedo Souza, C. *et al.* Cellulose-derived oligomers act as damage-associated molecular patterns and trigger defense-like responses. *Plant Physiol.* **173**, 2383–2398 (2017).
27. Claverie, J. *et al.* The cell wall-derived xyloglucan is a new DAMP triggering plant immunity in *Vitis vinifera* and *Arabidopsis thaliana*. *Front. Plant Sci.* **9**, 1725 (2018).
28. Hamann, T. Plant cell wall integrity maintenance as an essential component of biotic stress response mechanisms. *Front. Plant Sci.* **3**, 1–5 (2012).
29. Keegstra, K. Plant cell walls. *Plant Physiol.* **154**, 483–486 (2010).
30. Davidsson, P. R., Kariola, T., Niemi, O. & Palva, E. T. *Pathogenicity of and plant immunity to soft rot pectobacteria*. **4**, 1–13 (2013).
31. Baccelli, I. *et al.* Cerato-platanin induces resistance in *Arabidopsis* leaves through stomatal perception, overexpression of salicylic acid- and ethylene-signalling genes and camalexin biosynthesis. *PLoS One* **9**, 1–11 (2014).
32. Frías, M., Brito, N. & González, C. *The Botrytis cinerea cerato-platanin BcSpl1 is a potent inducer of systemic acquired resistance (SAR) in tobacco and generates a wave of salicylic acid expanding from the site of application*. **14**, 191–196 (2013).
33. Brotman, Y., Briff, E., Viterbo, A. & Chet, I. Role of Swollenin, an expansin-like protein from *Trichoderma*, in plant root colonization. *Plant Physiol.* **147**, 779–789 (2008).
34. Ali, S. *et al.* Analysis of putative apoplastic effectors from the nematode, *Globodera rostochiensis*, and identification of an expansin-like protein that can induce and suppress host defenses. *PLoS One*. **10**, e0115042 (2015).
35. Liu, J. *et al.* Molecular Characterization of a novel effector expansin-like protein from *Heterodera avenae* that induces cell death in *Nicotiana benthamiana*. *Sci. Rep.* **6**, 35677 (2016).
36. Charkowski, A. *et al.* The role of secretion systems and small molecules in soft-rot *Enterobacteriaceae* pathogenicity. *Annu. Rev. Phytopathol.* **50**, 425–449 (2012).
37. Mittler, R. *et al.* ROS signaling: The new wave? *Trends Plant Sci.* **16**, 300–309 (2011).
38. Pré, M. *et al.* The AP2/ERF domain transcription factor ORA59 integrates jasmonic acid and ethylene signals in plant defense. *Plant Physiol.* **147**, 1347–1357 (2008).
39. Serrano, M. *et al.* Export of salicylic acid from the chloroplast requires the multidrug and toxin extrusion-like transporter EDS5. *Plant Physiol.* **162**, 1815–1821 (2013).
40. Hael-Conrad, V., Abou-Mansour, E., Díaz-Ricci, J. C., Métraux, J. P. & Serrano, M. The novel elicitor AsES triggers a defense response against *Botrytis cinerea* in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Sci.* **241**, 120–127 (2015).
41. Gaffney, T. *et al.* Requirement of salicylic acid for the induction of systemic acquired resistance. *Science*. **261**, 754–756 (1993).
42. Corbett, M. *et al.* Identification of a new quorum-sensing-controlled virulence factor in *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* secreted via the type II targeting pathway. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* **18**, 334–342 (2005).
43. Pemberton, C. L. *et al.* Novel quorum-sensing-controlled genes in *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*: identification of a fungal elicitor homologue in a soft-rotting bacterium. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* **18**, 343–353 (2005).
44. Valdivia, E. R., Cosgrove, D. J. & Stephenson, A. G. Role of accelerated style senescence in pathogen defense. *Am. J. Bot.* **93**, 1725–1729 (2006).
45. Yan, J., Monaco, H. & Xavier, J. B. The ultimate guide to bacterial swarming: an experimental model to study the evolution of cooperative behavior. *Annu. Rev. Microbiol.* **73**, 293–312 (2019).
46. Bowden, S. D. *et al.* Surface swarming motility by *Pectobacterium atrosepticum* is a latent phenotype that requires O antigen and is regulated by quorum sensing. *Microbiol.* **159**, 2375–2385 (2013).
47. Gu, Y. *et al.* Application of biochar reduces *Ralstonia solanacearum* infection via effects on pathogen chemotaxis, swarming motility, and root exudate adsorption. *Plant Soil.* **415**, 269–281 (2017).
48. Venieraki, A., Tsalgaidou, P. C., Georgakopoulos, D. G., Dimou, M. & Katinakis, P. Swarming motility in plant-associated bacteria. *Hell. Plant Prot. J.* **9**, 16–27 (2016).
49. Narváez-Barragán, D. A. *et al.* Analysis of two Mexican *Pectobacterium brasiliense* strains reveals an inverted relationship between c-di-GMP levels with exopolysaccharide production and swarming motility. *Microbiological Research* **235**, 126427 (2020).
50. Nuhse, T. Cell wall integrity signaling and innate immunity in plants. *Front. Plant Sci.* **3**, 280 (2012).
51. Denness, L. *et al.* Cell wall damage-induced lignin biosynthesis is regulated by a reactive oxygen species- and jasmonic acid-dependent process in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **156**, 1364–1374 (2011).
52. Caño-Delgado, A., Penfield, S., Smith, C., Catley, M. & Bevan, M. Reduced cellulose synthesis invokes lignification and defense responses in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **34**, 351–362 (2003).
53. Maruri-López, I., Aviles-Baltazar, N. Y., Buchala, A. & Serrano, M. Intra and extracellular journey of the phytohormone salicylic acid. *Front. Plant Sci.* **10**, 1–11 (2019).
54. Reymond, P., Grünberger, S., Paul, K., Müller, M. & Farmer, E. E. Oligogalacturonide defense signals in plants: large fragments interact with the plasma membrane *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **92**, 4145–4149 (1995).
55. Yang, Y., Yu, Y., Liang, Y., Anderson, C. T. & Cao, J. A Profusion of molecular scissors for pectins: classification, expression, and functions of plant polygalacturonases. *Front. Plant Sci.* **9**, 1208 (2018).
56. Georgelis, N., Nikolaidis, N. & Cosgrove, D. J. Biochemical analysis of expansin-like proteins from microbes. *Carbohydr. Polym.* **100**, 17–23 (2014).
57. Artzi, L., Morag, E., Shamshoum, M. & Bayer, E. A. Cellulosomal expansin: functionality and incorporation into the complex. *Biotechnol. Biofuels* **9**, 61 (2016).

58. Franck, C. M., Westermann, J. & Boisson-Dernier, A. Plant lectin-like receptor kinases: from cell wall integrity to immunity and beyond. *Annu. Rev. Plant Biol.* **69**, 301–328 (2018).
59. Stegmann, M. *et al.* The receptor kinase FER is a RALF-regulated scaffold controlling plant immune signaling. *Science*. **355**, 287–289 (2017).
60. Hématy, K. *et al.* A receptor-like kinase mediates the response of *Arabidopsis* cells to the inhibition of cellulose synthesis. *Curr. Biol.* **17**, 922–931 (2007).
61. Frías, M., González, C. & Brito, N. BcSpl1, a cerato-platanin family protein, contributes to *Botrytis cinerea* virulence and elicits the hypersensitive response in the host. *New Phytol.* **192**, 483–495 (2011).
62. Wang, T. *et al.* Sensitivity-enhanced solid-state NMR detection of expansin's target in plant cell walls. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **110**, 16444–16449 (2013).
63. Kaniga, K., Delor, I. & Cornelis, G. R. A wide-host-range suicide vector for improving reverse genetics in Gram-negative bacteria: inactivation of the blaA gene of *Yersinia enterocolitica*. *Gene* **109**, 137–141 (1991).
64. Czechowski, T., Stitt, M., Altmann, T., Udvardi, M. K. & Scheible, W. R. Genome-wide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **139**, 5–17 (2005).
65. Schmittgen, T. D. & Livak, K. J. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nat. Protoc.* **3**, 1101–1108 (2008).
66. Schindelin, J. *et al.* Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods* **9**, 676–682 (2012).
67. Hélias, V., Hamon, P., Huchet, E., Wolf, J. V. D. & Andrivon, D. Two new effective semiselective crystal violet pectate media for isolation of *Pectobacterium* and *Dickeya*. *Plant Pathol.* **61**, 339–345 (2012).
68. Andresen, I. *et al.* The identification of leaf thionin as one of the main jasmonate-induced proteins of barley (*Hordeum vulgare*). *Plant Mol. Biol.* **19**, 193–204 (1992).
69. Olarte-Lozano, M. *et al.* PcExl1 a novel acid expansin-like protein from the plant pathogen *Pectobacterium carotovorum*, binds cell walls differently to BsEXLX1. *PLoS One* **9**, e95638 (2014).
70. L'Haridon, F. *et al.* A permeable cuticle is associated with the release of reactive oxygen species and induction of innate immunity. *PLoS Pathog.* **7**, e1002148 (2011).

Acknowledgements

This project was financed by grants from DGAPA-PAPIIT (IN211116 and IN211019), CONACYT Ciencia Básica (252551), Royal Society (Newton Mobility Grant NMG/R2\170095) to C. M.-A, I. K. T. and S. H. DGAPA-PAPIIT (IA200218) to M.S. M.R. and O.E.T.-H. received postdoctoral fellowships, and D. N.-B. received a scholarship from CONACYT. Work at the James Hutton Institute was supported by a grant from the Scottish Government's Rural and Environmental Sciences and Analytical Services (RESAS) Division. We are grateful to Xochitl Alvarado from the Laboratorio Nacional de Microscopía Avanzada (LNMA, UNAM), Israel Maruri-López from CCG and Blanca Ramos-Cerrillo for technical assistance. And to Chris Wood and Andrés de Sandozequi for critical reading of the manuscript.

Author contributions

This study was conceived by C.M.A. and D.A.N.-B.; most experimental work was carried out by D.A.N.-B.; O.E.T.-H., M.T. and M.R. performed RT-qPCR of *exl1* expression, some *A. thaliana* experiments, and some QS experiments, respectively. S.H. and M.S. helped analyzing and interpreting RT-qPCR data. L.S. and I.K.T. discussed and helped interpreting results. All authors read and approved the final manuscript.

Competing interests

This work was approved by the Local Security and Protection Commission (Comisión Local de Seguridad y Protección -CLSyP) of the Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México. All methods were carried out in accordance with relevant guidelines and regulations of the CLSyP of the Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México.

Additional information

Supplementary information is available for this paper at <https://doi.org/10.1038/s41598-020-64529-9>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to C.M.-A.

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2020

IX.2 Movilidad y producción de exopolisacáridos (EPS) por las cepas de *P. brasiliense* BF20 y BF45, y su relación con el segundo mensajero c-diGMP.

ANTECEDENTES APENDICE IX.2

Como se ha mencionado, Exl1 podría estar involucrada en algún aspecto relacionado con la integridad o estructura de los exopolisacáridos producidos por *Pectobacterium*. Por esta razón aprovechamos que en el laboratorio contamos con dos cepas mexicanas de *P. brasiliense*: BF20 y BF45, de las cuales BF45 presenta un fenotipo muy evidente que es su capacidad de flocular a diferencia de la cepa BF20 (Figura 1) (1). Por lo tanto decidimos analizar si la floculación es debida a exopolisacáridos, como se ha reportado en otras especies, y también indagamos sobre otros procesos relacionados con la producción de EPS por estas cepas, tales como la producción de biofilm y el swarming.

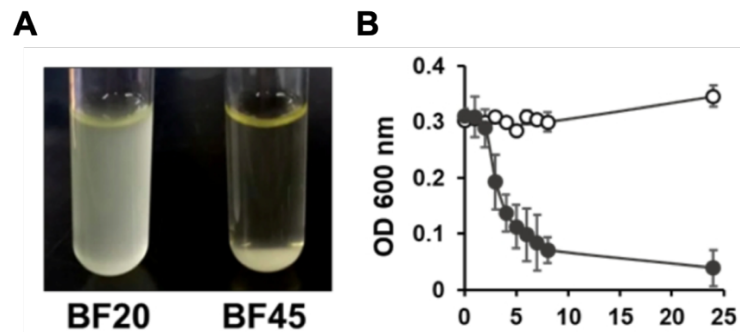


Figura 1. Floculación de la cepa de *P. brasiliense* BF45. A) Las cepas BF20 y BF45 crecidas sin agitación por 5 horas en medio LB líquido. B) Cinética de floculación de la cepa BF45 (círculos grises) en comparación con la cepa BF20 (círculos blancos) en medio LB líquido. La OD₆₀₀ se tomó cada hora por 8 h y después a las 24 h en cultivos sin agitación. Figura tomada de (1).

MATERIALES Y MÉTODOS ANEXO IX.2.

Cepas y Medios

Se realizaron conforme a lo descrito en la sección III.1

Ensayos de infección en vegetales.

Se realizaron conforme a lo descrito en la sección III.5

Cuantificación de la producción de exopolisacáridos y biofilm.

Las cepas de *P. brasiliense* BF20 y BF45 se crecieron toda noche en medio LB a 30°C en agitación constante (200 rpm), se ajustaron a una OD₆₀₀ de 1.2 y se estriaron en línea recta en placas de medio SOB (2% triptona 2%, extracto de levadura 0.5%, NaCl 10 mM, KCl 2.5 mM, MgSO₄ 10 mM, agar al 1.5%) adicionado con glicerol al 2%. Las placas se incubaron por 3 días a 30°C. La producción de polisacáridos se determinó midiendo el ancho de la línea inoculada.

La producción de biofilm se realizó utilizando el protocolo descrito por O'Toole en el 2011 (2) con algunas modificaciones. Para las diluciones del cultivo se utilizó medio mínimo M63 suplementado con glucosa al 0.2% y casaminoácidos al 0.5%. Las placas se incubaron a 30°C por 72 horas en una cámara húmeda. El biofilm se fijó con 100 µl de paraformaldehído al 4% por 20 minutos y posteriormente se lavó con agua destilada tres veces.

Ensayos de movilidad de 'swarming' y nado.

Se utilizó el protocolo previamente descrito para *P. atrosepticum* (3). El medio MacConkey al 0.4X suplementado con 0.5% de glicerol. Una vez que se vertió el agar en las cajas Petri se dejaron secar por 20 min sin tapar en la campana de flujo laminar. Posteriormente se inoculó una gota de 5 µl de un cultivo ajustado a una DO₆₀₀ de 0.05. Las placas se dejaron secar por 20min y se incubaron por 48 o 24 h respectivamente a 30°C en una cámara húmeda. El área de swarming se cuantificó marcando la silueta de crecimiento con la herramienta de dibujo de polígonos del programa Fiji ImageJ (4) en centímetros cuadrados.

Cuantificación de c-di-GMP

Para determinar la abundancia relativa de c-di-GMP de las cepas, se utilizó el biosensor pFY4535, donado por el Dr. David Zamorano del CCG, UNAM. Este plásmido se transformó por electroporación en las cepas de *P. brasiliense* BF20, BF45 y *P. atrosepticum* SCRI 1043, seleccionando las transformantes con 30 µg/ml de gentamicina. Estas cepas se co-transformaron con el plásmido pMPM-H3 (5) modificado para expresar la fosfodiesterasa pdeH-3XFLAG de *E. coli* (esta construcción

fue donada por la M.C. María Isidro-Coxca y el Dr. José Luis Puente del Instituto de Biotecnología, UNAM). Las células co-transformadas se seleccionaron utilizando 30 $\mu\text{g/ml}$ de gentamicina y 10 $\mu\text{g/ml}$ de tetraciclina. Posteriormente, las células se crecieron en medio LB con solo gentamicina o con gentamicina y tetraciclina a 30°C y agitación (200 rpm) hasta alcanzar una DO_{600} de 0.3. Se tomaron 100 μl de estos cultivos y se colocaron en microplacas negras (Thermo). La intensidad de fluorescencia se cuantificó con un lector de placas utilizando dos filtros, el primero con una longitud de onda de excitación de 420 y de emisión de 520 para la proteína AmCyan, y el segundo con una longitud de onda de excitación de 550 y de emisión de 580 para la proteína TurboRFP. La relación entre la intensidad de fluorescencia entre estas dos proteínas fluorescentes es directamente proporcional a los niveles de c-di-GMP en las células (6).

Se realizaron también estos ensayos en cajas de Petri, para los que se colocaron 5 μl de cultivos crecidos a una DO_{600} de 0.1 en medio en placas de LB con gentamicina. Se incubaron a 30°C por 48 horas. Las colonias se fotografiaron usando luz visible o luz UV.

RESULTADOS ANEXO IX.2.

Movilidad y producción de exopolisacáridos (EPS) por las cepas BF20 y BF45, y su relación con el segundo mensajero c-diGMP.

Caracterizamos la producción *in vitro* de EPS inoculando longitudinalmente placas de medio SOB suplementados con glicerol al 2% con las cepas BF20 y BF45, la producción de EPS se determinó midiendo el crecimiento (el ancho) de la línea inoculada. Observamos que la cepa BF45 presenta una mayor producción de EPS en contraste con la cepa BF20 (Figura 2A). Posteriormente cuantificamos la producción de biofilm de las cepas BF20 y BF45. Hubo mayor concentración de biofilm (medido como absorbancia a 570 nm, ~ 0.03) en la cepa BF45 en comparación con la cepa BF20, lo que sugiere que la cepa BF45 presenta una mayor capacidad de formar biofilm (Figura 2B), y este resultado concuerda con la mayor capacidad de producir EPS de BF45.

Posteriormente, evaluamos el nado y el swarming de las cepas de *P. brasiliense* BF20 y BF45. Determinamos que el diámetro de los halos de nado fue comparable entre ambas cepas (Figura 2C), lo que indica que BF20 y BF45 tienen la misma capacidad de nado. En el caso del swarming vimos que BF20 presentó un área de swarming ~60% mayor (Figura 2D) en comparación con la cepa BF45 (Figura 2E, F).

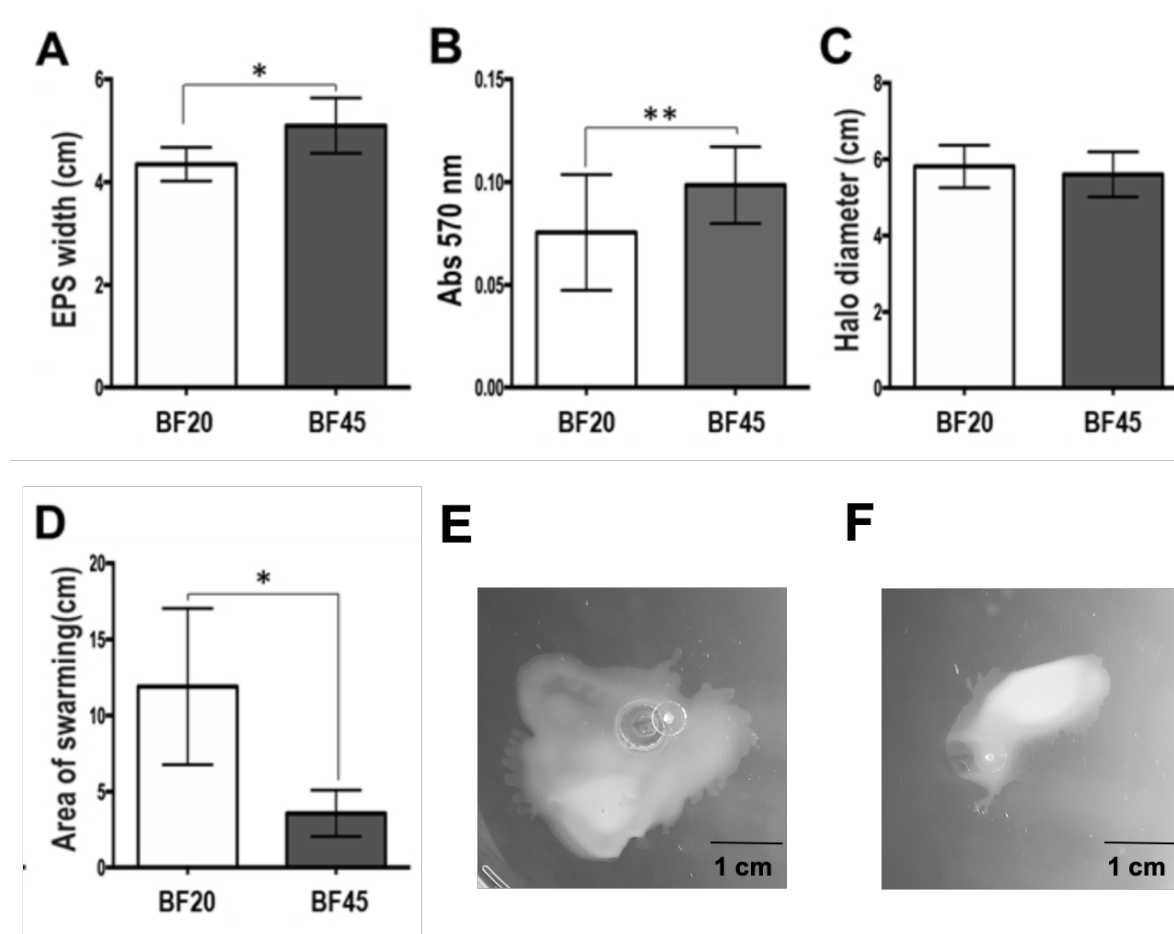


Figura 2. Producción de exopolisacáridos y movilidad de las cepas BF20 y BF45. **A)** La cepa BF45 produce más EPS en medio SOB con glicerol. **B)** La cepa BF45 presenta una mayor formación de biofilm de acuerdo con la determinación por tinción con cristal violeta. **C)** Ambas cepas presentan la misma capacidad de nado, medido por el diámetro del halo que producen en medio LB al 0.3%. **D)** La cepa BF20 presenta una mayor capacidad de swarming, el cual se observó en medio MacConkey 0.4x adicionado con glicerol al 0.5%. En todos los casos las barras de error indican la desviación estándar de al menos tres experimentos independientes; $p < 0.01$ (*), $p < 0.001$ (**), diferencias significativas de acuerdo con la prueba t de Student. Fenotipo de las cepas BF20 **E)** y BF45 **F)** durante el swarming. Imágenes representativas de al menos tres experimentos independientes.

El segundo mensajero intracelular dinucleótido cíclico (c-di-GMP), juega un papel importante en la transición entre las etapas móviles y sésiles de las bacterias (7). En general, altos niveles de c-di-GMP reducen la expresión y actividad de los flagelos y estimulan la expresión de adhesinas y EPS asociados con la formación de biofilm (6). Los niveles celulares de c-di-GMP están controlados por las diguanilato ciclasas (DGCs) que lo producen y las fosfodiesterasas (PDE) que degradan este segundo mensajero. La abundancia de estas enzimas y por lo tanto los niveles de c-di-GMP difieren entre bacterias (6). Para cuantificar los niveles de c-di-GMP en bacterias bajo condiciones específicas, el método estándar consiste en analizar extractos bacterianos por cromatografía líquida de alta resolución acoplada a masas en tándem (LC/MS/MS), sin embargo, debido a la complejidad y accesibilidad a esta técnica una alternativa es el estimar semicuantitativamente los niveles celulares de c-di-GMP utilizando biosensores fluorescentes que responden a fluctuaciones en los niveles de este segundo mensajero. En este trabajo utilizamos el biosensor pFY4535, que contiene dos proteínas reporteras fluorescentes: la AmCyan y la TurboRFP, codificadas bajo promotores diferentes. La expresión de AmCyan es constitutiva, mientras que la TurboRFP se encuentra controlada por tres riboswitches dependientes de c-di-GMP, por lo que su expresión aumenta dependiendo de la abundancia de este segundo mensajero en la célula (6,8). Por lo tanto transformamos mediante electroporación las cepas BF20 y BF45 con esta construcción, así como *P. atrosepticum* SCRI 1043 para ser utilizada como cepa de referencia debido a que en esta cepa se ha cuantificado previamente la concentración de c-di-GMP (9). Las tres cepas transformadas con el plásmido pFY4535 se crecieron primero en medio LB y transferimos 100 μ l de estos cultivos a microplacas y calculamos la relación entre la intensidad de fluorescencia de la AmCyan y la TurboRFP. La cepa BF20 presentó una mayor relación de fluorescencia en comparación con la cepa BF45 (Figura 7A), sugiriendo que la cepa BF20 presenta niveles mayores de c-di-GMP en estas condiciones. Para corroborar este fenotipo utilizamos una fosfodiesterasa de *E. coli* codificada en el plásmido pMPMT3-*pdeH*-3xFLAG y que degrada el c-di-GMP celular, por lo que esperábamos que al co-transformar con este plásmido las cepas que contienen el biosensor (BF20-pFY4535 y BF45-pFY4535) los niveles del segundo mensajero fueran menores. Repetimos estos

ensayos en medio líquido utilizando las cepas co-transformadas y observamos que los niveles de c-di-GMP se vieron disminuidos de manera significativa en ambas cepas que presentan la PDE, siendo más evidente para la cepa BF20 (Figura 3A).

Se ha reportado que los niveles de c-di-GMP fluctúan en respuesta a los estímulos físicos como es el contacto de las bacterias con superficies sólidas, y a estímulos químicos del entorno, lo que influye en su regulación intracelular (10). Debido a esto decidimos observar los niveles de este segundo mensajero en medio sólido utilizando las cepas BF20 y BF45 transformadas con el biosensor y co-transformadas con la PDE. Nuevamente vimos que la cepa BF20 presentó una mayor fluorescencia de la TurboRFP, incluso la colonia se observó naranja, y esta coloración se perdió en BF20 que expresaba la PDE, así como en la cepa BF45 (Figura 3B), sugiriendo que la cepa BF20 presenta mayores niveles de c-di-GMP también en medio sólido.

Posteriormente, estudiamos si estas diferencias en los niveles de c-di-GMP entre BF20 y BF45 tenían alguna relación con la floculación y los valores de biofilm y swarming que presentan ambas cepas.

Crecimos las cepas BF20, BF45 y *P. atrosepticum* transformadas con el biosensor y la PDE en medio LB y transferimos 100 μ l de estos cultivos a microplacas que se incubaron en estático por 2:30 horas, debido a que en este tiempo se ha observado el inicio de la floculación de la cepa BF45 (1). Observamos que la relación entre la intensidad de la AmCyan y la TurboRFP fue mayor en la cepa BF20 en comparación con BF45 y los niveles del segundo mensajero disminuyeron en las cepas co-transformadas con la PDE (Figura 3C) presentando valores muy similares a lo observado en los cultivos en medio líquido que no se incubaron en estático (Figura 3A), lo que sugiere que el fenotipo de floculación podría no estar relacionado con los niveles de c-di-GMP al menos en tiempos tempranos. Sin embargo, al incubar cultivos de BF20 y BF45 silvestres y transformados con PDE por 24 horas en estático, observamos que la cepa BF20-PDE que contiene menores niveles de c-di-GMP, presenta una floculación parcial a diferencia de BF20 silvestre (Figura 3D) que no flocula naturalmente (1), esto sugiere que bajos niveles de c-di-GMP podrían estar involucrados al menos parcialmente en la regulación de la floculación en la cepa BF20.

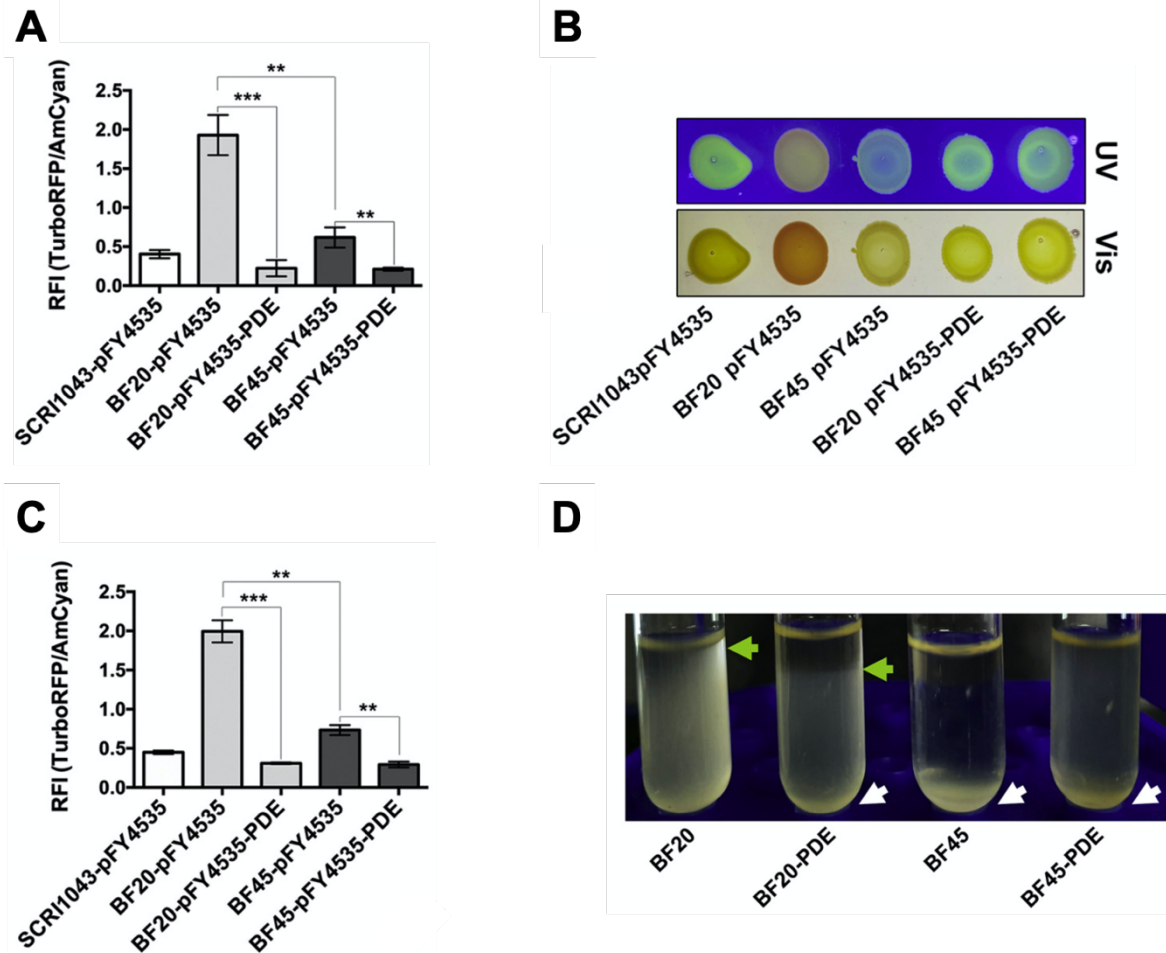


Figura 3. La cepa BF20 presenta mayor abundancia de c-di-GMP. Fluorescencia de las cepas BF20 y BF45 transformadas con el plásmido pFY4535 que codifica para un biosensor de c-di-GMP. En medio **A)** líquido crecido en agitación, **B)** en placa (luz visible y UV) y **C)** líquido crecido en agitación e incubado 2:30 horas en estático. Se observa que BF20 tiene una mayor concentración de este segundo mensajero. Al co-transformar con el plásmido pMPMT3 que contiene una fosfodiesterada (PDE), se observa que la concentración de c-di-GMP disminuye significativamente en ambas cepas. La cepa SCRI1043 de *P. atrosepticum* se utilizó como referencia. **D)** Imagen representativa de la floculación de las cepas BF20 y BF45 silvestres y transformadas con el plásmido PDE después de mantener los cultivos en estático por 24 horas. Las flechas verdes muestran la zona de floculación en BF20 y BF20-PDE, y las flechas blancas muestran las células en el fondo del tubo. Las barras de error indican la desviación estándar de al menos tres experimentos independientes; $p < 0.005$ (*), $p < 0.0004$ (**), diferencias significativas de acuerdo con la prueba t de Student.

Se ha reportado que altos niveles de c-di-GMP usualmente reducen la movilidad mediada por flagelos (11). Por lo que para determinar si los niveles de c-di-GMP están

relacionado con la movilidad de nuestras cepas, estudiamos el swarming de BF20 y BF45 transformadas con el biosensor y co-transformadas con PDE. Inoculamos placas de medio MacConkey al 0.4x suplementado con 0.5% de glicerol y las incubamos por 24 y 48 horas. Observamos que la cepa BF20 silvestre y BF20-PDE que presenta menores niveles de c-di-GMP, tuvieron una capacidad de swarming comparable (Figura 4A). En contraste la cepa BF45-PDE, que presenta niveles menores del segundo mensajero, mostró una reducción en su capacidad de swarming a las 24 y 48 horas en comparación con la silvestre (Figura 4B), sugiriendo que el c-di-GMP participa en la regulación de la movilidad por swarming en la cepa BF45.

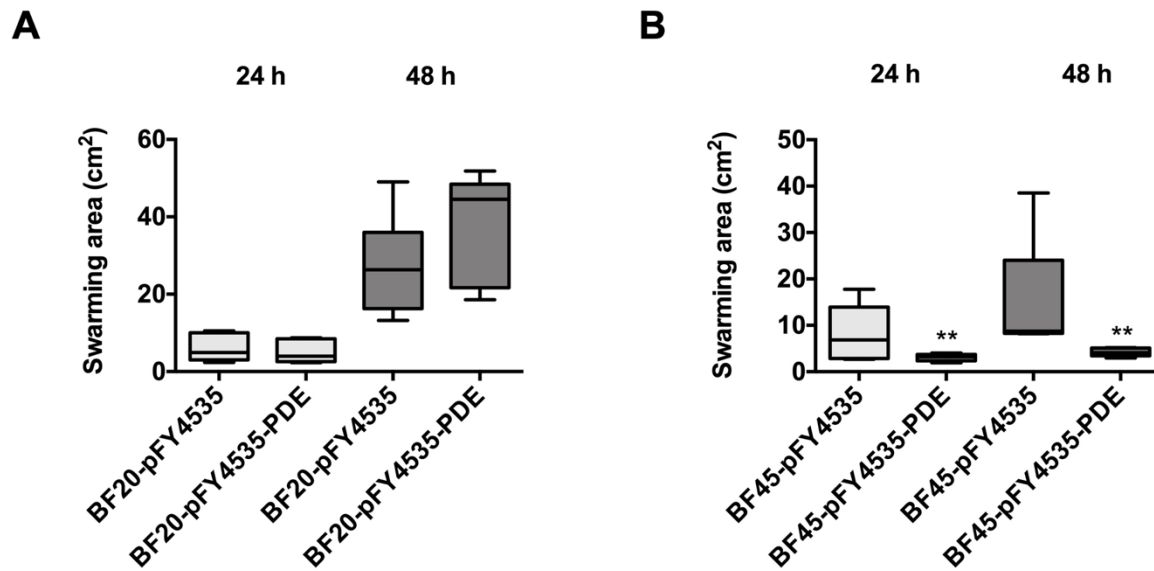


Figura 4. Existe una correlación entre el swarming y los bajos niveles de c-di-GMP en la cepa **BF45**. La capacidad de swarming de las cepas **A)** BF20 y **B)** BF45 con el biosensor (pFY4535) o co-transformadas con PDE fue cuantificada a las 24 o 48 horas. Gráficas de caja resultantes de tres experimentos independientes. $p < 0.001$ (**), diferencias significativas de acuerdo con la prueba t de Student.

DISCUSIÓN ANEXO IX.2

Observamos que la cepa BF45 presentó una mayor producción de EPS lo que concuerda con una mayor producción de biofilm. En contraste, la cepa BF20 mostró una mayor movilidad por swarming que BF45. Estos datos sugieren que algunos de los

mecanismos de regulación de producción de exopolisacáridos y movilidad en BF20 y BF45 podrían ser distintos.

Los reguladores en la formación de biofilm y swarming se comparten pero se expresan de manera antagonista en ambos procesos (7), siendo uno de los principales el segundo mensajero intracelular dinucleótido cíclico (c-di-GMP). Se ha reportado que por lo general en las bacterias, a mayor concentración de c-di-GMP se incrementa la formación de biofilm y se reduce la movilidad (12). Sin embargo, la cepa BF45 que presenta mayor formación de biofilm y menor movilidad por swarming presentó niveles más bajos de c-di-GMP en comparación con la cepa BF20. Este fenotipo observado, en el que nuestra cepa con mayor producción de biofilm y menor movilidad presentó menor abundancia de c-di-GMP, no es el primero reportado. En *P. atrosepticum*, la sobre-expresión de guanilato ciclasas o fosfodiesterasas, muestra niveles variables de adhesión celular, floculación y movilidad, que no siempre está relacionada con sus niveles de c-di-GMP (9). Así mismo, en un estudio con aislados de *Pseudomonas aeruginosa*, no se observó una correlación entre los niveles de c-di-GMP y su habilidad para formar biofilms o su movilidad, en la que la presencia o regulación de los efectores y sus moléculas blanco pueden estar involucradas (13). Sin embargo, al analizar este efecto de manera individual en las cepas, transformándolas con una fosfodiesterasa (PDE) que degrada a c-di-GMP y por lo tanto baja sus niveles intracelulares (14), observamos que en la cepa BF45, los niveles de c-di-GMP están asociados negativamente con la movilidad por swarming; una posibilidad es que el c-di-GMP sea necesario para la producción de EPS como se ha reportado en *Erwinia amylovora*, donde este segundo mensajero regula la secreción de su principal exopolisacárido (15), y por lo tanto a una menor producción de EPS podría afectar la matriz secretada durante el swarming y que es necesaria para llevar a cabo este proceso. Con respecto a la cepa BF20 las fluctuaciones de c-di-GMP no afectan la movilidad por swarming, sin embargo, menores niveles de este segundo mensajero provocan la floculación parcial de esta cepa, por lo que el segundo mensajero podría regular en cierta medida este proceso. Estas diferencias entre los procesos que son regulados por c-di-GMP en BF20 y BF45 podrían estar relacionadas con genes únicos del metabolismo del c-diGMP que se han reportado para ambas cepas (1). Sin embargo, muchos de los mecanismos de

regulación del c-di-GMP, así como sus blancos aún son desconocidos en muchas bacterias.

CONCLUSIÓN ANEXO IX.2.

A pesar de que las cepas BF20 y BF45 pertenecen a la misma subespecie, son fenotípicamente diferentes. La cepa BF45 presenta mayor producción de EPS y de biofilm, con respecto a BF20. Con respecto a los niveles de c-di-GMP, al disminuir los niveles de este segundo mensajero en la cepa BF45, su capacidad de swarming se vió disminuida, mientras que en BF20 los niveles de c-di-GMP parecen no participar en la regulación de este tipo de movilidad. Sin embargo, al aumentar los niveles de c-di-GMP en BF20 se observa una floculación parcial, lo que sugiere que este segundo mensajero podría estar involucrado en la regulación de este proceso.

PERSPECTIVAS ANEXO IX.2.

Estudiar más a fondo la regulación de c-di-GMP en los procesos fisiológicos de las bacterias. Esto podría abordarse mediante la generación de mutantes nulas de genes relacionados con la biosíntesis de este segundo mensajero para estudiar sus fenotipos. Sin embargo, como se mencionó anteriormente la generación de mutantes nulas en las cepas BF20 y BF45 de *P. brasiliense* ha sido todo un reto y después de diversos intentos aún no se ha podido establecer una técnica para obtener mutantes. Por lo que una de las perspectivas, sería determinar una técnica molecular para realizar mutantes en estas cepas.

BIBLIOGRAFÍA ANEXO IX.2

1. Narváez-Barragán DA, de Sandozequi A, Rodríguez M, Estrada K, Tovar-Herrera OE, Martínez-Anaya C. Analysis of two Mexican *Pectobacterium brasiliense* strains reveals an inverted relationship between c-di-GMP levels with exopolysaccharide production and swarming motility. *Microbiol Res.* 2020;235:126427. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126427>
2. O'Toole GA. Microtiter Dish Biofilm Formation Assay. *JoVE.* 2011;(47):e2437. DOI: [doi:10.3791/2437](https://doi.org/10.3791/2437)
3. Bowden SD, Hale N, Chung JCS, Hodgkinson JT, Spring DR, Welch M.

Surface swarming motility by *Pectobacterium atrosepticum* is a latent phenotype that requires O antigen and is regulated by quorum sensing. *Microbiol (United Kingdom)*. 2013;159(PART11):2375–85. DOI: 10.1099/mic.0.070748-0

4. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, et al. Fiji: An open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods*. 2012;9:676–682.
5. Mayer MP. A new set of useful cloning and expression vectors derived from pBlueScript. *Gene*. 1995; DOI: 10.1016/0378-1119(95)00389-N
6. Zamorano-Sánchez D, Xian W, Lee CK, Salinas M, Thongsomboon W, Cegelski L, et al. Functional Specialization in *Vibrio cholerae* Diguanylate. *MBio*. 2019;
7. Verstraeten N, Braeken K, Debkumari B, Fauvart M, Fransaer J, Vermant J, et al. Living on a surface: swarming and biofilm formation. *Trends in Microbiology*. 2008. DOI: 10.1016/j.tim.2008.07.004
8. Zhou H, Zheng C, Su J, Chen B, Fu Y, Xie Y, et al. Characterization of a natural triple-tandem c-di-GMP riboswitch and application of the riboswitch-based dual-fluorescence reporter. *Sci Rep*. 2016; DOI: 10.1038/srep20871
9. Tan H, West JA, Ramsay JP, Monson RE, Griffin JL, Toth IK, et al. Comprehensive overexpression analysis of cyclic-di-GMP signalling proteins in the phytopathogen *Pectobacterium atrosepticum* reveals diverse effects on motility and virulence phenotypes. *Microbiol (United Kingdom)*. 2014; DOI: 10.1099/mic.0.076828-0
10. Dahlstrom KM, Collins AJ, Doing G, Taroni JN, Gauvin TJ, Greene CS, et al. A multimodal strategy used by a large c-di-GMP network. *J Bacteriol*. 2018;200(8):1–19. DOI: 10.1128/JB.00703-17
11. Ryjenkov DA, Simm R, Römling U, Gomelsky M. The PilZ domain is a receptor for the second messenger c-di-GMP: The PilZ domain protein YcgR controls motility in enterobacteria. *J Biol Chem*. 2006; DOI: 10.1074/jbc.C600179200
12. Liang ZX. The expanding roles of c-di-GMP in the biosynthesis of exopolysaccharides and secondary metabolites. *Natural Product Reports*. 2015. DOI: 10.1039/c4np00086b
13. Yan J, Deforet M, Boyle KE, Rahman R, Liang R, Okegbe C, et al. Bow-tie signaling in c-di-GMP: Machine learning in a simple biochemical network. *PLoS Comput Biol*. 2017; DOI: 10.1371/journal.pcbi.1005677

14. Römling U, Gomelsky M, Galperin MY. C-di-GMP: The dawning of a novel bacterial signalling system. *Molecular Microbiology*. 2005. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2005.04697.x
15. Edmunds AC, Castiblanco LF, Sundin GW, Waters CM. Cyclic Di-GMP modulates the disease progression of *Erwinia amylovora*. *J Bacteriol*. 2013/03/08. 2013 May;195(10):2155–65. DOI: 10.1128/JB.02068-12



Analysis of two Mexican *Pectobacterium brasiliense* strains reveals an inverted relationship between c-di-GMP levels with exopolysaccharide production and swarming motility

Delia A. Narváez-Barragán^{a,1}, Andrés de Sandozequi^{a,1}, Mabel Rodríguez^a, Karel Estrada^b, Omar E. Tovar-Herrera^a, Claudia Martínez-Anaya^{a,*}

^a Departamento de Ingeniería Celular y Biotecnología, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. Universidad 2001, Chamilpa, 62210 Cuernavaca, Morelos, México

^b Unidad de Secuenciación Masiva y Bioinformática. Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. Universidad 2001, Chamilpa, 62210 Cuernavaca, Morelos, México

ARTICLE INFO

Keywords:

Pectobacterium
Virulence
Autoinducer
C-Di-GMP
Swarming

ABSTRACT

Pectobacterium is a diverse genus of phytopathogenic species from soil and water that cause infection either to restricted or multiple plant hosts. Phylogenetic analysis and metabolic fingerprinting of large numbers of genomes have expanded classification of *Pectobacterium* members. *Pectobacterium brasiliense* sp. nov has been elevated to the species level having detached from *P. carotovorum*. Here we present two *P. brasiliense* strains BF20 and BF45 isolated in Mexico from *Opuntia* and tobacco, respectively, which cluster into two different groups in whole genome comparisons with other *Pectobacterium*. We found that BF20 and BF45 strains are phenotypically different as BF45 showed more severe and rapid symptoms in comparison to BF20 in the host models celery and broccoli. Both strains produced similar levels of the main autoinducers, but BF45 shows an additional low abundant autoinducer compared to strain BF20. The two strains had different levels of c-di-GMP, which regulates the transition from motile to sessile lifestyle. In contrast to BF45, BF20 had the highest levels of c-di-GMP, was more motile (swarming), non-flocculant and less proficient in biofilm formation and exopolysaccharide production. Genomic comparisons revealed that differences in c-di-GMP accumulation and perhaps the associated phenotypes might be due to unique c-di-GMP metabolic genes in these two strains. Our results improve our understanding of the associations between phenotype and genotype and how this has shaped the physiology of *Pectobacterium* strains.

1. Introduction

Pectobacterium comprises a diverse group of species of the soft-rot *Enterobacteriaceae*, which are pathogens of economically important crops and ornamental plants worldwide (Gardan et al., 2003; Mansfield et al., 2012). Given its virulence and the ample range of crops it infects *Pectobacterium* is considered one of the most important phytopathogens by the scientific community (Mansfield et al., 2012). Classification of *Pectobacterium* has evolved through time, ultimately detaching from the genus *Erwinia* that originally contained all the phytopathogenic enterobacteria Hauben, 1998. Currently, there are twelve recognised species recently reclassified as: *P. atrosepticum*, *P. carotovorum*, *P. betavascularum*, *P. cacticida*, *P. wasabiae*, *P. aroidearum*, *P. actinidiae*, *P. brasiliense*, *P. odoriferum*, *P. peruviana*, *P. polaris*, and *P. versatile*, with

the recently reported *P. aquaticum*, *P. polonicum* and *P. zantedeschiae* sp. nov., adding to the heterogeneity of this genus (Portier et al., 2019; Pritchard et al., 2015; Zhang et al., 2016). In particular, *P. brasiliense* is highly aggressive and prevalent throughout the planet with cases reported in all continents (Lee et al., 2014; Nunes Leite et al., 2014; Panda et al., 2012; van der Merwe et al., 2010), thus understanding the mechanisms underlying the biology and pathogenesis of this species is significant.

Pectobacterium is transmitted by water, soil and transit during plant trading; once on a susceptible host, bacteria enter through wounds or natural openings such as stomata and lenticels, causing soft-rot due to digestion of pectin, other polysaccharides and proteins Toth, 2003. Dispersion, transmission and virulence mechanisms have been well studied in *Pectobacterium*, and it is known that important virulence

* Corresponding author.

E-mail address: cma@ibt.unam.mx (C. Martínez-Anaya).

¹ These authors contributed equally.

factors are controlled mainly by cell density (quorum sensing), including resistance to stress, antibiosis, host defense manipulation, secretion systems and ultimately degradation of the plant cell wall (Charkowski, 2018; Liu, 2008). Biofilm formation and motility are important processes for pathogenesis in *P. brasiliense* (Kubheka et al., 2013; Moleleki et al., 2016), and environmental factors (such as carbon source, temperature and metal ions) coordinate cell sessility and biofilm formation to subsequent motility through the regulation of flagella, pili and digestion of the polysaccharide matrix coordinated by the second messenger bis-(3'-5')-cyclic dimeric guanosine monophosphate (c-di-GMP). Synthesis and degradation of c-di-GMP depends on diguanylate cyclases (DGC) and phosphodiesterases (PDE), respectively, encoded by several genes for a variety of functions targeting many effectors with consequences in transcription or protein function (Valentini and Filloux, 2019). DGC and PDE act in concert to modulate the intracellular concentration of c-di-GMP, and although in general, higher levels of c-di-GMP repress cell motility and enhance biofilm formation (Bassis and Visick, 2010; Römling et al., 2005) Other outcomes of these phenotypes have been observed. For instance, in *P. atrosepticum* SCRI1043 when overexpressing different DGCs or PDEs, some of which locate to specific sites in the cell Tan et al., 2014. This indicates a complex control of c-di-GMP including local variations of concentration for possible regulation of specific effectors.

Here we investigate some virulence-related phenotypes of two Mexican *P. brasiliense* strains, BF20 and BF45, and explore their genome to search for genetic differences responsible for their distinct behaviours. The effect of quorum sensing on the virulence of the strains might not be significant as both BF20 and BF45 produce similar amounts and types of autoinducers, meanwhile, c-di-GMP was elevated in BF20 with respect to BF45. The presence and absence of genes encoding enzymes for modulation of c-di-GMP in BF45 and BF20, is maintained in members of the two clades that divide BF20 and BF45.

2. Materials and methods

Strains and media. *P. brasiliense* strains BF20 and BF45 were a kind donation from Dr. Oscar Mascorro from Universidad de Chapingo. These were grown in LB broth or 1.5 % agar at 30 °C, or in Liquid Enrichment Medium (LEM_{AG366}) composed of 1 mM NaOH, 1.5 mM MgSO₄, 7.5 mM (NH₄)₂SO₄, 5.7 mM K₂HPO₄ and 0.17 % AG366 pectin from Agdia, Biofords; single layer CVP media was prepared as indicated in (Hélias et al., 2012), using AG366 pectin, which has been used as a selective medium for *Pectobacterium* and *Dickeya* strains.

Genome sequencing, gene annotation and comparative genomics. Genome sequencing was done at the Unidad Universitaria de Secuenciación masiva y Bioinformática, Instituto de Biotecnología, UNAM. Illumina MiSeq system was used to generate draft genome sequences for *P. brasiliense* strains BF20 and BF45. One sample of each strain was sequenced on one paired-end MiSeq run, yielding paired reads of 300 bp each with 500 bp of insert size. *De novo* genome assemblies were performed following the workflow management system RAMPART (Mapleson et al., 2015) and comparisons with a published complete genome for *P. brasiliense* strain BC1 (chromosome: NZ_CP009769.1) allowed ordering and orientation of the contigs onto a scaffold based on the *P. brasiliense* BC1 (CP009769.1) assembly using software Mauve 2.4.0 (Darling et al., 2004). The metabolic profile of each genome was constructed using BlastKOALA and the KEGG database with 10⁻⁵ e-value threshold (Kanehisa et al., 2017). Sequencing statistics are shown in Table S1.

The genomes of the two strains were annotated with PROKKA v1.11 (Seemann, 2014) using default settings, and were enriched with a local pipeline similar to Trinotate (Haas et al., 2013). A BLASTp search (Altschul et al., 1990) was performed using predicted ORFs as the query and the SwissProt database (accessed 14th July 2017) as the target. Orthologous clusters were assigned using ProteinOrtho V.5.15 (Lechner et al., 2011). The HMMER (Finn et al., 2015, 2011) and Pfam (Punta

et al., 2012) databases were used to predict protein domains. SignalP 4.1 (Petersen et al., 2011) program was used to predict the presence of signal peptides, and this annotation was added with the GO term identifiers and KEGG terms associated to the proteins or domains found. GenBank accession for BF20 is BioProject: PRJNA381621; and for BF45, BioProject: PRJNA381622. The ANI value was calculated with the program OrthoANI algorithm using the nucleotide sequences of *P. brasiliense* strains BF20 (GCA_002250215.1) and BF45 (GCA_002250255.1). The genomes were analysed with the PATRIC suite (<https://www.patricbrc.org/>) for function, subsystem assignment and the visualization of the circular genomes Wattam et al., 2017. Genomes were also screened for virulence genes, prophages and genomic islands with the VRprofile 2.0 pipeline Li, 2018 and for PCWDEs with dbCAN2 server Yin, 2012; Zhang, 2018. The Venn diagram was constructed as previously described in Fouts, 2005. Predicted proteins of BF20, BF45, *P. atrosepticum* SCRI1043 (NC_004547) and *P. brasiliense* BC1 (NZ_CP009769.1) were compared against each other (all-vs-all BLAST) with the program Proteinortho v5.16 Lechner et al., 2011 with reported parameters (p-value < 10⁻⁵, identity > 35 %, and match lengths > 75 %).

Phylogenetic analysis. A maximum likelihood phylogenetic tree was inferred with the PATRIC Phylogenetic Tree Building Service (Wattam et al., 2017) using the CodonTree pipeline. This pipeline uses the program RaxML to analyse 500 random single-copy homologous genes from each strain using both protein and coding DNA sequences. Bootstrap values were calculated with 1000 iterations. The genome of *Dickeya dadantii* Ech703 was used as outgroup. The tree was visualized with iTOL (Letunic and Bork, 2019).

Plant infection. Chunks of approximately 30 g of the different vegetables (potato, celery and broccoli) were disinfected in 0.5 % sodium hypochlorite for 20 min, followed by several washes afterwards. A cut (~5 mm) was opened with a cutter, to inoculate with 10 µl of a suspension of overnight cultures in LB broth of strains BF20 or BF45 (wild type or co-transformed with plasmids pFY4535/pMPMT3-pdeH-3xFLAG), diluted to 0.1 OD₆₀₀ nm (~1 × 10⁸ cells). Chunks were wrapped in wet paper and plastic film to maintain a humid environment and incubated at 30 °C for 48 h. Weight loss was determined by the difference of weight before and after removing the macerated tissue due to the infection with either strain BF20 or BF45.

Biofilm quantification. The protocol was performed based on that reported by (O'Toole, 2011). Briefly, a 3 ml LB overnight culture was diluted to 0.1 OD₆₀₀ in LB broth, and then further diluted 1:100 with M63 minimal medium supplemented with 0.2 % glucose and 0.5 % casamino acids. Microtiter plates were added with 100 µl of the dilution per well and incubated at 30 °C for 72 h in a humidity chamber. After this time, the plate was turned over to remove the medium, and the biofilm was fixed with 100 µl of 4% paraformaldehyde and left at room temperature for 20 min. Paraformaldehyde was then discarded and the plate was washed by submerging it in water and dried at 50 °C for 20 min. A 0.1 % crystal violet solution (125 µl) was added per well and incubated at room temperature for 15 min, followed by two washes in water as before. After drying (20 min at 50 °C), crystal violet was solubilised with 125 µl of 30 % acetic acid for 15 min at room temperature, 100 µl were placed in a new plate and its absorbance determined at 570 nm in a plate reader (Bio Rad).

Quantification of exopolysaccharide (EPS) production. In solidSOBmedium. Overnight cultures of BF20 or BF45 were adjusted to 1.2 OD₆₀₀ and streaked out in a single line across SOB plates (2% tryptone, 0.5 % yeast extract, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgSO₄, 1.5 % Agar) supplemented with 2 % glycerol, and incubated for 3 days at 30 °C. The EPS production was measured by the width of line after this time. *In liquid cultures.* It was performed with a modification of the high-speed centrifugation method described in (Brown and Lester, 1980). Briefly, overnight cultures were grown in 100 ml LB medium in 250 ml flasks at 30 °C and 200 rpm agitation. Cell suspensions were adjusted to ~0.45 OD₆₀₀; 10 ml were transferred to 15 ml

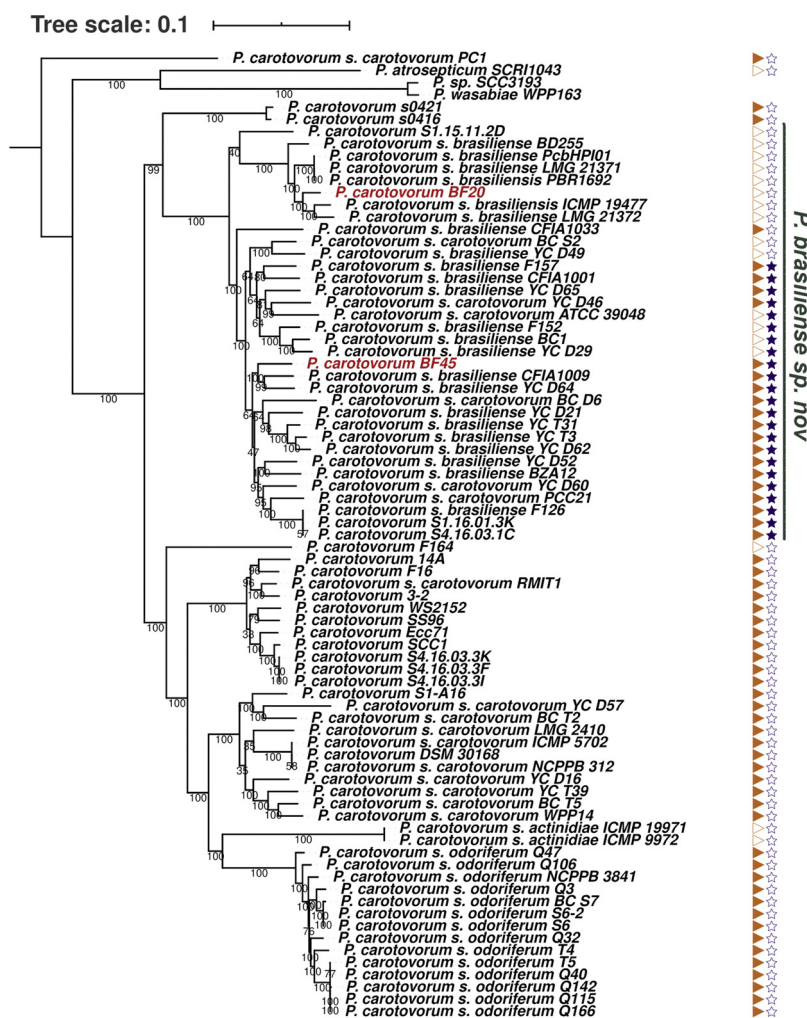


Fig. 1. Phylogeny of *P. brasiliense* strains BF20 and BF45, and comparison to *P. brasiliense* BC1 and *P. atrosepticum* SCRI1043. (A) A maximum likelihood phylogenetic tree was inferred for strains BF20 and BF45, both are *P. brasiliense* but belong to two different clades. The BF20 clade lacks the genes for a predicted diguanylate cyclase *P* (empty arrowhead), and a predicted phosphodiesterase *J* (empty star). Meanwhile most strains in the BF45 clade contain the same genes (full arrowhead and full star, respectively).

polypropylene tubes, that were left in static conditions at room temperature (~ 26 °C) for EPS quantification, whereas 3 ml were transferred to 10×1 cm test tubes to measure the absorbance at 600 nm without disturbing the flocculating bacteria. For EPS quantification, samples were centrifuged at low speed (2000xg) and the supernatant was discarded. The pellet was washed with PBS, and then resuspended in 5 ml PBS and centrifuged twice at high speed (15500xg) for 25 min to separate the extracellular polymers from the cells. The extracellular polysaccharides of 2 ml of the supernatant were determined by the phenol-sulfuric acid method (DuBois et al., 1956) and quantified using a glucose standard curve. **Cellulase treatment.** Flocculant 10-ml cell cultures (after at least 3 h of becoming static) were added with 2.5 % of a cellulase blend (Sigma Cat. SAE0020, described by the provider as a product that contains cellulases, β -glucosidases, and hemicellulases) corresponding to 28.75 μ g/ml of total protein according to the manufacturer, and incubated at room temperature. Cells were taken for observation after 30 min and 24 h after cellulase blend addition.

Swarming analysis. Cells were grown overnight in LB at 30 °C and 200 rpm agitation, the next day cells were diluted to 0.05 OD₆₀₀. A drop of 5 μ l was spotted on 0.4x MacConkey agar medium supplemented with 0.5 % glycerol (as described in Bowden et al., 2017) and let dry for 20 min. Plates were incubated at 30 °C in a humidity chamber for 24 h. The swarming area was quantified from pictures marking the colonies silhouette with the polygon drawing tool of Fiji

ImageJ software (Schindelin et al., 2012) having set the scale in cm using the Petri dish internal diameter. To determine their cell size and speed, cells were transformed with plasmid pTB93F to express GFP constitutively under the Trp promoter and selected with 100 μ g/ml chloramphenicol; cells were taken with an inoculation loop from the tendrils or from the colony centre and resuspended in 10 μ l 1x PBS to be observed with a 3i Marianas Spinning Disk Confocal microscope. Images were analysed with the program Fiji ImageJ using the Manual Tracking plugin (Schindelin et al., 2012).

Detection of autoinducers. Autoinducers from one ml culture supernatants of BF20 and BF45 grown to 1.25 OD₆₀₀ in LB medium at 30 °C and 200 rpm agitation were extracted 3 times with 500 μ l of ethyl acetate. After evaporating the solvent, autoinducers were resuspended in ethyl acetate and loaded onto HPTLC Silica gel 60 RP-18 plates (Millipore), and run in 60 % methanol:40 % H₂O for 8 h, then air dried. For the two-dimension HPTLC, the dried plate was run having rotated it 90°, in 70 % methanol:30 % H₂O for a further 8 h. The reporter strain *Agrobacterium tumefaciens* carrying plasmid pZLR4 was overlaid on the plate in soft agar containing 1 mg/ml X-gal and incubated at 30 °C overnight as described in (Cha et al., 1998).

Fluorescence quantification of a c-di-GMP-dependent biosensor. Plasmid pFY4535 was electroporated into strains *P. brasiliense* BF20, BF45 and *P. atrosepticum* SCRI1043, and selected in LB medium containing 30 μ g/ml gentamicin. Fluorescence intensity was measured

from cells grown to 0.3 OD₆₀₀ in 20 ml liquid LB with 200 rpm agitation, at which point 100 µl were placed in a black microplate and quantified in a microplate reader using two filters with excitation/emission wavelengths of 420/520 for AmCyan and 550/580 for TurboRFP. RFI is the ratio of the fluorescence intensity between TurboRFP and AmCyan, which is directly proportional to c-di-GMP levels in the cells. For plate assays, five microliters of cultures grown to 0.1 OD₆₀₀ in LB medium and 200 rpm agitation were spotted in LB agar, left to dry and incubated at 30 °C overnight. Colonies were photographed with either visible light or under UV illumination. Plasmid pMPM-H3-derivative (Mayer, 1995) carrying the *E. coli pdeH-3XFLAG* gene under the *lac* promoter (constructed and provided by Isidro-Coxca M.E. [unpublished] from Dr. José L. Puente Laboratory) was co-transformed in electrocompetent cells containing the pFY4535 plasmid and cells were selected in LB medium with 30 µg/ml gentamicin and 10 µg/ml tetracycline.

3. Results

3.1. Strains BF20 and BF45 belong to the species *P. brasiliense*

Pectobacterium brasiliense sp. nov BF20 and BF45 are two Mexican strains isolated from infected plants: cactus (*Opuntia*) and tobacco, respectively (González-Rodríguez et al., 2005). These strains show phenotypic overlap but also distinct physiological traits regarding growth in different media (Figure S1), and different virulence properties. To further evaluate the relationship between phenotype and genotype we obtained their draft genome sequence (Figure S2), identified and annotated genes and assigned protein function (Table S2). With this information we compared the two strains to each other and to other *Pectobacterium* at the gene level. Phylogenetic and whole genome comparisons of BF20 and BF45 to other 44 *Pectobacterium* (accession numbers in Table S3) showed a further subdivision of *P. brasiliense* in two groups, one containing the reference strain BC1 and BF45, and a second group containing BF20 (Fig. 1 and Figure S3), indicating significant genetic differences in our strains. With an all-against-all protein comparison we found a core of 3240 orthologous proteins shared between *P. brasiliense* strains BF20, BF45, BC1 and *P. atrosepticum* SCRI1043, corresponding to between 74–79 % of their genome. Our analysis revealed that strains BF45 and BC1 share the highest number of unique genes and the highest ANI value (194 genes, ANI of 97.20 %), from all the pairwise comparisons made. BF20 and BF45 shared 174 unique genes, and an ANI value of 96.21 %, while BF20 and BC1 shared 87 unique genes, and an ANI value of 95.91 % (Figure S4). Most unique genes in each strain are hypothetical. Approximately one third of genes for each strain (1577 out of 4240 total genes in BF20, and 1582 out of 4134 genes in BF45) could be assigned into subsystems (Figure S4) at comparable numbers with strain BC1 (1565 out of 4296 genes). Protein function could not be assigned as it is still unknown for more than half of the genes shared between all four strains and the unique genes in each relationship (Pie charts in Figure S4).

3.2. Strains BF20 and BF45 differ in virulence and plant cell wall degrading enzymatic activities

Opuntia cactus infection in laboratory conditions with both BF45 and BF20 produced variable levels of tissue maceration, therefore we decided to study BF20 and BF45 infectivity using susceptible hosts for both strains that produced consistent symptoms in short times. Celery complied with these requirements and was analysed in more detail, although the strains also caused soft rot on potato, broccoli, carrot, beetroot stalks, and wilting in Swiss chard. Using the same number of cells and under the same experimental conditions, inoculation with BF45 resulted in more extensive plant tissue maceration compared to inoculation with BF20 (Fig. 2A). The lesion produced by BF45 was evident 24 h post infection in experiments using celery petioles or

broccoli stalks. In contrast, it took 48 h for similar symptoms to occur after inoculation with BF20 (Fig. 2A). In solid medium containing pectin, single colonies of BF45 formed larger cavities than colonies of BF20 (Fig. 2B). Activity gels for cell wall digestive enzymes obtained from celery infection or pectin-containing agar plates showed different active bands in both strains (Figure S4B), where the clearest difference between strains was the presence of more CMCase bands in the extract of BF45 infected celery compared to extracts infected with BF20. Activity towards pectin was comparable, and almost undetectable towards xylan, for which we observed a high molecular weight faint band present in the extracts of pectin plates in the two strains that was also active with CMC and pectin. Finally, an active band towards starch was observed in the extracts of celery infection with BF45 only. However, the results with extracts of the plant infection need to be interpreted carefully, as our experiments cannot discriminate between microbial activity or activity derived from the host.

3.3. BF20 and BF45 strains produce comparable levels of acyl homoserine lactones

Population density controls the expression of many virulence factors in *Pectobacterium*, thus we asked whether the difference in virulence and plant cell wall digestive activity between BF20 and BF45 was due to differences in the production of quorum sensing autoinducers. We used ethyl acetate extracts from the supernatants containing soluble autoinducers of the strains grown to the late exponential growth phase (1.25 OD₆₀₀) and the sensitive *traG::lacZ* reporter system culture of *Agrobacterium tumefaciens* for the detection of acyl homoserine lactones (AHL) with several chemical structures coupled to high-performance thin layer chromatography (HPTLC) (Cha et al., 1998). We observed a small difference in the diameter of the blue halo formed by two different concentrations of the extracts of BF45 that was marginally larger (1.26 ± 0.14-fold) compared to BF20, with a major spot showing the same migration to the standard N-(3-oxohexanoyl)-L-homoserine lactone in both strains (Fig. 3A). In this condition we observed an additional small and less-polar spot that might represent an additional autoinducer that was more abundant in BF45 compared to BF20 (Fig. 3A). Also, two-dimensional HPTLC revealed a second spot with the same mobility to the main autoinducer in the first dimension, but less polar in the second dimension in both strains (Fig. 3B). This shows that BF20 and BF45 produce an autoinducer molecule with similar chemical properties compared to an N-(3-oxohexanoyl)-L-homoserine lactone and two additional autoinducers of lesser polarity, being slightly more abundant in BF45.

3.4. BF45 and BF20 have different cell flocculation, biofilm formation and motility phenotypes

Flocculation in liquid LB medium is a very distinctive characteristic of strain BF45 once the cultures become static, whereas BF20 cells remain suspended in the culture (Fig. 4A). BF45 flocculation occurred within five hours at room temperature when cultures of cells either in the exponential growth or late stationary phases became static (Fig. 4B), suggesting that flocculation is not regulated by growth state. BF45 flocculation associated with the formation of cell aggregates (Fig. 4C), thus we asked whether exopolysaccharide production was involved in cell aggregation, as in some cases cells seemed trapped in a fine extracellular mesh. Cellulose has been reported to contribute to flocculation and our genomic analysis revealed the presence of cellulose biosynthetic genes (the *bcs* gene cluster) in both strains, hence we analysed if addition of a cellulase enzymatic blend could result in dispersion of the cell aggregates. Cellulase blend treatment of BF45 static cultures resulted in the dispersion of cells that became highly motile and remained non-flocculant after 24 h (Fig. 4D). Clumps of flocculant cells at the bottom of the culture tube stained with Congo red (Fig. 4E) further supporting the presence of an EPS. We obtained the EPS from

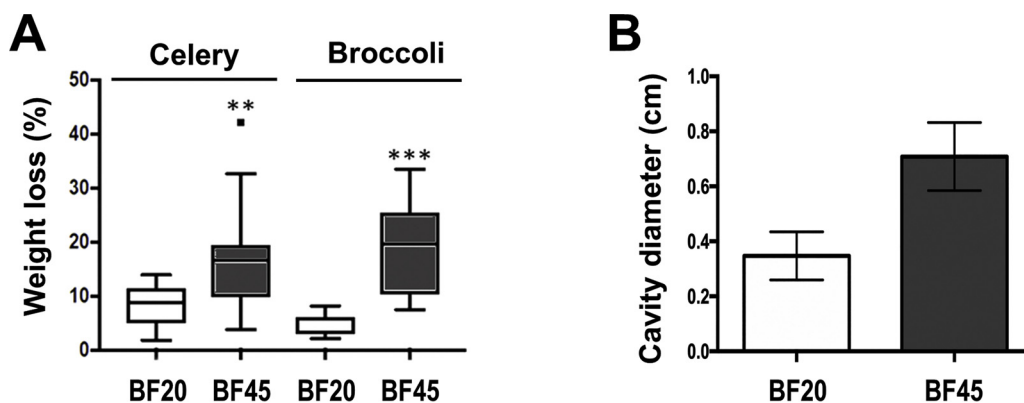


Fig. 2. Differences on plant tissue maceration, pectin degradation and enzymatic activity between *P. brasiliense* BF20 and BF45. (A) Vegetable rot in celery and broccoli 48 h after inoculation with 10^6 cells of BF45 and BF20; maceration was calculated weighing before and after removal of the rot tissue. (B) Average of pectin degradation was determined by measuring the cavity diameter in solid CVP AG366 pectin media. Asterisks indicate statistical significances with a Mann-Whitney test $p = 0.001$ (**); error bars correspond to the standard deviation.

cultures just removed from agitation (0 h) and after 3 h static to quantify by the acid-phenol method. We found very low and similar amounts of EPS in BF20 and BF45 at 0 h, however at 3 h BF45 had tripled the quantity of EPS in comparison to BF20 (Fig. 6D). Supplementation of LB liquid medium with either 0.5 % glycerol (the concentration used for swarming assays, see below) or 2.5 % glycerol (the final glycerol concentration after cellulase enzyme blend addition) also resulted in cell dispersion and high motility (Fig. 4F), but flocculation eventually reoccurred. We hypothesized that glycerol might be regulating flocculation due to its utilization as a carbon source. To evaluate whether easily assimilable carbon sources affected flocculation, we tested the effect of added glucose and fructose to the medium. Flocculation was prevented and cells became highly motile during the first 6 h of static conditions, but flocculation resumed 24 h after static incubation (Fig. 4F), presumably because of carbon source depletion. Together, these data point towards cellulose as being part of the EPS produced by BF45 and perhaps carbon source metabolism playing a role in the flocculation of BF45 cells.

We also analysed exopolysaccharide production on agar plates and observed higher amounts in strain BF45 compared to BF20 (Fig. 5A). This difference coincided with differences in biofilm formation, where BF45 produced a more abundant biofilm than BF20 (Fig. 5B). There is a fine balance between biofilm production and motility, thus we asked if motility (swimming and swarming) traits were different between BF20 and BF45. Swimming was comparable between our strains (Fig. 5C), but BF45 swarmed considerably less compared to BF20 in soft 0.4x MacConkey agar (Fig. 5D), although tendrils in BF45 were in general more defined compared to BF20 (Fig. 5E and 5 F). Cells were highly motile and elongated at the edge of the tendrils in comparison to cells from the centre of the colony in both strains (Fig. 5G and 5 H).

3.5. *P. brasiliense* BF20 contains higher levels of c-di-GMP than BF45

The intracellular second messenger c-di-GMP controls cellulose biosynthesis, exopolysaccharide production and motility in many bacterial species, leading us to speculate that BF20 and BF45 might have different basal levels of c-di-GMP. We analysed the relative abundance of c-di-GMP using the plasmid pFY4535 that encodes a c-di-GMP biosensor consisting of two fluorescent reporters: AmCyan with constitutive expression, and TurboRFP that is transcriptionally controlled by three c-di-GMP-dependent riboswitches; thus TurboRFP expression positively correlates with c-di-GMP abundance (Zamorano-Sánchez et al., 2019; Zhou et al., 2016). We compared the ratio of fluorescence intensity (RFI) between TurboRFP/AmCyan in cells grown in agitated cultures at 0.3 OD₆₀₀ in LB broth and after 3 h in static condition and found that BF20 expresses three-fold more TurboRFP than BF45 in both cases (Fig. 6A and 6B). In comparison to *P. atrosepticum* for which total c-di-GMP has been determined, both BF20 and BF45 showed almost 5-fold and 1.5-fold more RFI, respectively (Fig. 6A and 6B). Growing the strains on LB agar plates for 24 h also allowed readily observation of a red coloration of BF20 colonies (Fig. 6C) indicating that the concentration of c-di-GMP is higher in BF20 than in BF45 both in agitated or static liquid and in solid media.

To determine whether the red fluorescence reflects the intracellular concentration of c-di-GMP in our strains, we co-transformed cells carrying plasmid pFY4535 with another plasmid (pMPMT3-*pdeH*-3xFLAG, that we will call pPDE for simplicity) that constitutively expresses the phosphodiesterase *pdeH* gene from *E. coli*. This plasmid, either on its own or co-transformed with pFY4535, reduced the division rate of strain BF20 but not of BF45, thus starter cultures of BF20 pPDE were initiated 6 h before the others. Again, we analysed the levels of c-di-GMP in liquid LB immediately after agitation and 3 h of static culture,

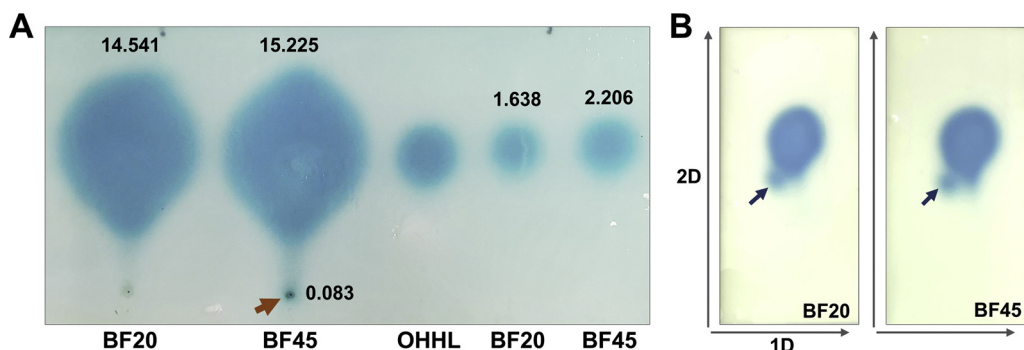


Fig. 3. *P. brasiliense* strains BF20 and BF45 produce different levels of autoinducers. (A) One-dimensional high-performance thin layer chromatography (HPTLC) coupled to auto-inducer reporter strain *Agrobacterium tumefaciens* carrying plasmid pZLR4, was run using two concentrations of ethyl acetate-extract from late log-phase (1.25 OD_{600}) cultures of BF20 and BF45: one ml of supernatant was extracted with ethyl acetate and after evaporation, the extract was dissolved in 10 μl (100x concentrated) and

loaded on the left side of the plate. An equivalent sample was dissolved in 100 μl (10x concentrated), from which 1 μl was loaded on the right side of the plate. A synthetic standard of N-(3-oxohexanoyl)-L-homoserine lactone (OHHL) was loaded in the centre of the plate. The high concentration extracted autoinducers shows an extra signal in BF45 (red arrow) that remained near the loading site, indicating low polarity. The number by the spots indicate the calculated area in cm^2 . (B) Two-dimensional HPTLC run with 2 μl of a 100x concentrated solution of extracted autoinducers, shows a main spot and a second less mobile spot (blue arrow) in both strains BF20 and BF45.

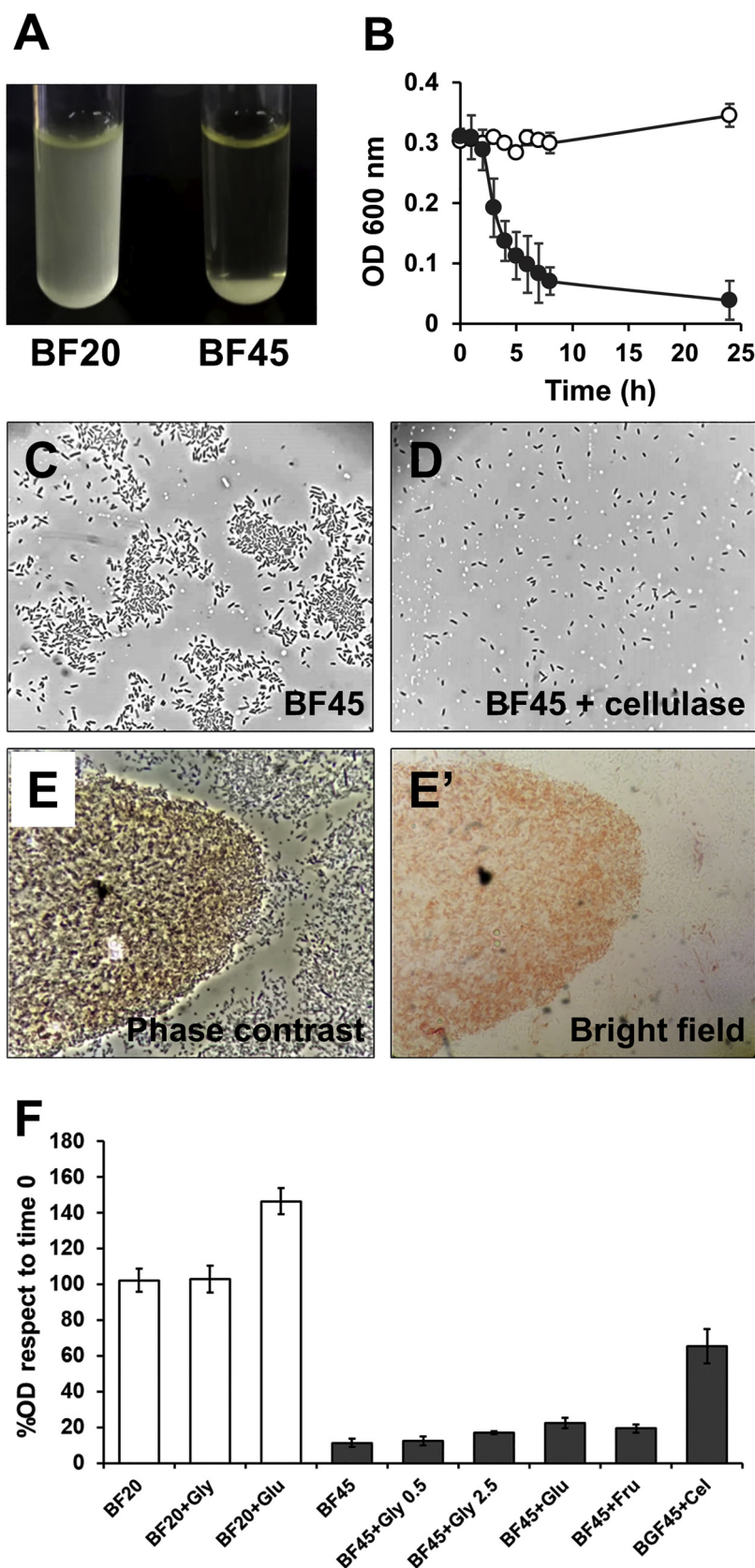


Fig. 4. Flocculation of *P. brasiliense* strain BF45. (A) Aspect of BF20 and BF45 strains in LB broth 5 h after becoming static. (B) Kinetics of flocculation by strain BF45 (black circles) in liquid LB medium in comparison with BF20 (white circles). OD₆₀₀ was taken immediately after LB liquid cultures were changed to static condition (time 0) and then every hour for 8 h, and a final measurement at 24 h. (C) Representative light microscopy images of aggregated BF45 from the middle of a flocculating culture, and a culture containing 28.75 µg/ml of cellulase blend. Cells taken for observation after 30 min of cellulase blend addition (D). A clump from the bottom of a flocculating culture of BF45 stained with Congo red observed under phase contrast microscopy (E) or bright field (E'). (F) Average clearing of the LB medium (containing the indicated carbon sources or cellulase blend) due to flocculation after cultures became static. This was determined as percentage by calculating the difference of OD₆₀₀ immediately after moving the cultures to static condition and after 24 h incubation at room temperature.

and in solid medium. As expected, the RFI was reduced and in the same proportion, 8.5-fold in BF20 and 2.9-fold in BF45, irrespective of the agitated/static conditions of the cultures (Fig. 6A and 6B), with corresponding differences in coloration in LB plates (Fig. 6C). We then

analysed the effect of reducing c-di-GMP levels in our strains on different phenotypes: EPS production, flocculation, swarming and virulence. We reasoned that if a low level of c-di-GMP induces EPS production and flocculation in BF45 static conditions, then lowering c-di-

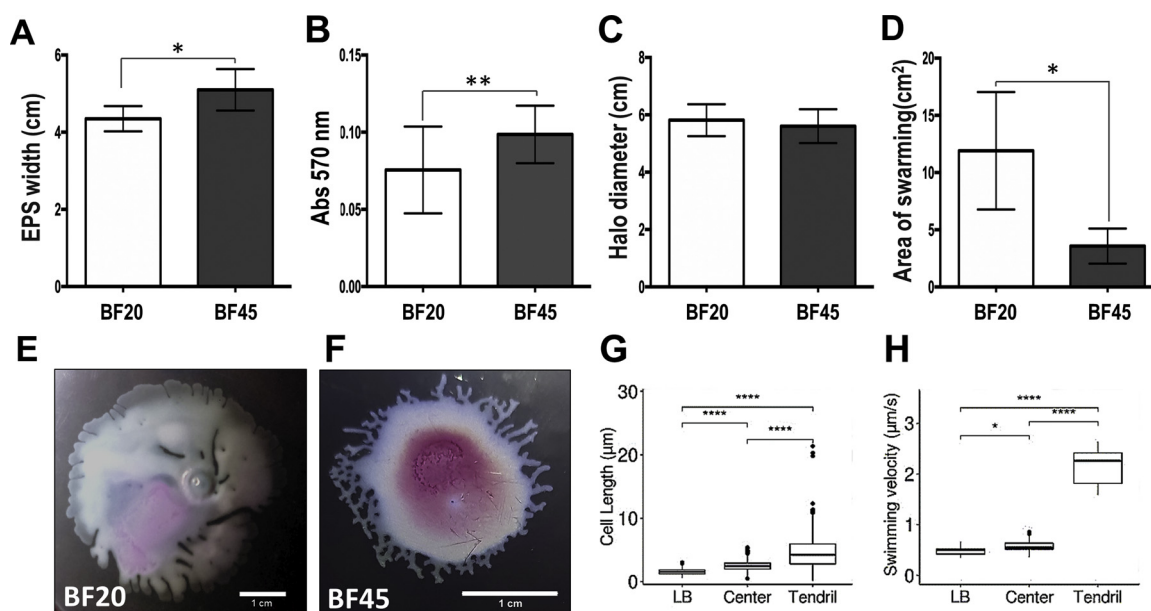


Fig. 5. Exopolysaccharide production and motility. (A) Exopolysaccharide (EPS) production of cells grown in SOB medium supplemented with 2 % glycerol. A line was streaked on the surface and its width measured 24 h later. (B) Biofilm produced by BF20 and BF45 was quantified from microcultures in M63 minimal medium (supplemented with 0.2 % glucose and 0.5 % casaamino acids), after staining with crystal violet. Absorbance was read at 570 nm. (C) Swimming capacity of BF20 and BF45 was determined by measuring the halo in 0.3x LB agar medium, after 24 h at 30 °C. (D) Swarming was observed in BF20 and BF45 in 0.4x MacConkey medium with 0.5 % glycerol after 24 h at 30 °C. Swarming areas were calculated using the image analysis software Fiji. Data are the average of at least three independent experiments. Significance $p < 0.01$ (*) and $p < 0.001$ (**) were calculated according to a Student's t-test. Error bars correspond to the standard deviation of the experiments. Representative swarmer colonies of strains BF20 (E) and BF45 (F). Tendrils can be seen projecting from the main body of the colony. (G) Elongated cells from the tendrils of BF20 (reaching up to 20 μm , with the media being approximately 5 μm), in comparison to cells from the centre of the colony or cells growing in LB medium (approximately 2 μm). (H) Cells from the tendrils and from the colony centre were resuspended in PBS to be observed under the microscope, in this condition swimming cells derived from the swarming area or the colony centre were individually tracked, and their velocity calculated. Hypermotile swimming at the tendrils of BF20 reach velocities of 2.5 $\mu\text{m/s}$, in comparison to less motile cells from the centre of the colony or LB agar (0.5 $\mu\text{m/s}$).

GMP in BF20 could promote similar phenotypes. We determined that this was partially true, as BF20 pPDE resulted in double amount of EPS production and flocculated to certain extent (Fig. 6D, 6E and 6F). Because the clarified area at the top of the liquid culture due to cell flocculation in BF20 pPDE was small, the OD_{600} remained unchanged in comparison to BF45 that has a larger clear area for light transmittance (Fig. 6E and 6F). The effect of low c-di-GMP in the swarming motility was different for each strain, since co-transformed BF20 was not affected either at 24 or 48 h (Fig. 7A), but it reduced the swarming ability of co-transformed BF45 (Fig. 7B). Finally, we analysed the virulence of the strains with low c-di-GMP by infecting celery and measuring weight loss by tissue rot. Low levels of c-di-GMP in co-transformed BF20 provoked similar maceration compared to BF20 only carrying plasmid pFY4535 (Fig. 7C), whereas a slight non-significant tendency towards less maceration was observed in co-transformed BF45.

Because of these differences, we searched for genes encoding enzymes for the synthesis and breakdown of c-di-GMP in the genomes of BF20, BF45 and in other *Pectobacterium* strains, using the profile hidden Markov models (pHMM) of GGDEF domain (pfam entry PF00990) for diguanylate cyclases (DGC), and EAL (pfam entry PF00563) or HD-GYP (pfam entry PF13328) domains for phosphodiesterases (PDE). We found 13 shared GGDEF domain-encoding CDS, 7 CDS encoding for EAL, 4 for both GGDEF and EAL domains, and 2 for HD-GYP by strains BF20 and BF45 (Supplementary File 1). These results compare to those reported in *P. atrosepticum* (Römling et al., 2005). However, BF45 has one unique GGDEF (encoded by gene *P*) and one unique EAL (encoded by gene *J*), and in contrast BF20 has one unique EAL CDS. The distinct distribution of c-di-GMP metabolic genes in *Pectobacterium* species was conserved in clade members (Fig. 8A and 8B, and Fig. 1), where all strains in the BF20 clade lacked gene *P* and gene *J*, while in BF45 clade 77 % of the strains contained gene *P* and 88 % contained gene *J*. Most strains (90 %) outside the *P. brasiliense* group contained gene *P* but

lacked gene *J* (Fig. 1). In fact, EAL gene *J*, was present only in the BF45 clade. These results show that c-di-GMP signalling modules operate in strains BF20 and BF45 and that differences in c-di-GMP homeostasis might be explained by differences in the presence of unique c-di-GMP metabolic genes.

4. Discussion

Here we provide evidence of genetic and phenotypic differences between two strains of *P. brasiliense*; in particular, genetic differences related to the regulation of c-di-GMP levels shared among members of the clades to which BF20 and BF45 belong. This is important as the usable information currently available shows almost indistinguishable functional roles for genes and metabolic routes between BF20, BF45 and the reference genome of BC1, in which case identifying phenotypic characteristics that correlate with phylogeny is informative.

We found that flocculation is a distinctive feature of strain BF45, which also produces more exopolysaccharides and less swarming in comparison to BF20. It has been found that in most bacteria a high concentration of c-di-GMP correlates with increased biofilm formation and reduced motility. However, in our strains this correlation appears to be inverted, being BF20 the strain with the highest level of c-di-GMP but the one that made less biofilm and instead was more motile in swarming assays, and it was confirmed in BF45 that had a reduced swarming motility with lower levels of c-di-GMP. These results although counterintuitive are not without precedent, as a study of multiple *Pseudomonas aeruginosa* isolates did not find a correlation between c-di-GMP levels and the ability to form biofilms, swim or swarm (Yan et al., 2017). This behaviour was explained using a mathematical model proposing that selection across fluctuating environments is responsible for the evolvability of the circuits involving c-di-GMP signalling (Yan et al., 2017). Changes in the presence or regulation of effectors (and

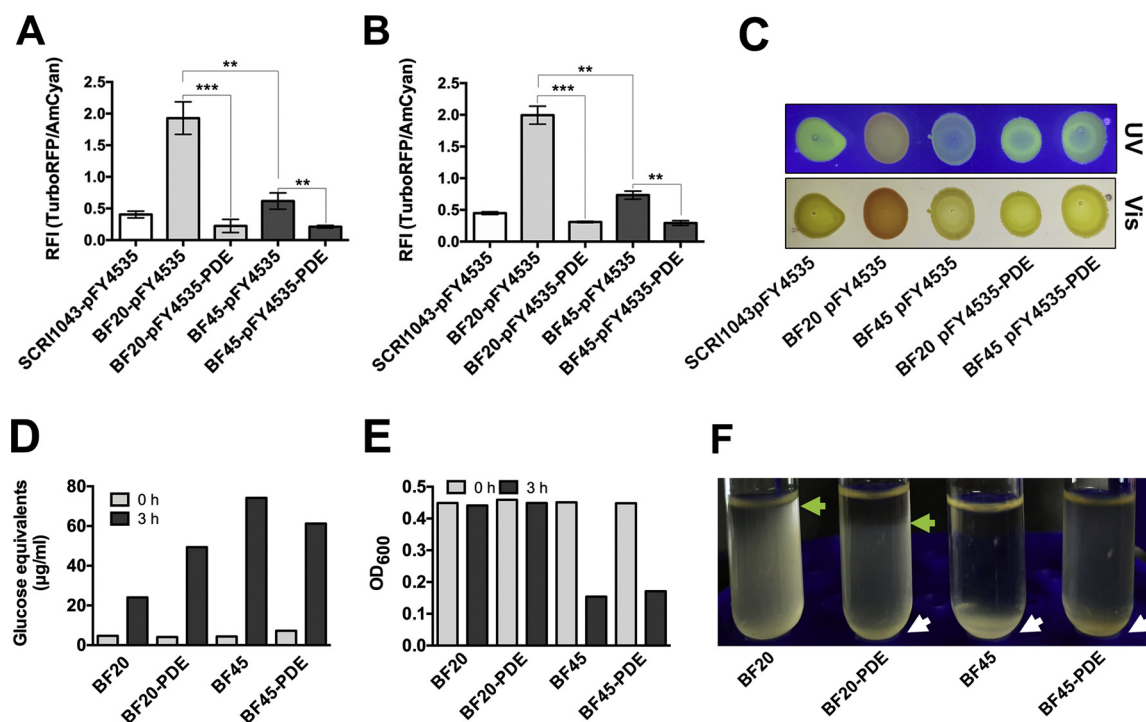


Fig. 6. Different levels of c-di-GMP in *P. brasiliense* strains BF20 and BF45. (A) Ratio of fluorescence intensity (RFI) between TurboRFP/AmCyan in strains *P. atrosepticum* SCRI1043, *P. brasiliense* BF20 and BF45, carrying plasmid pFY4535, or pFY4535 and pPDE (for the expression of the c-di-GMP-dependent biosensor and PDEH from *E. coli*, respectively) as indicated. (A) Cells were grown in agitated liquid LB broth to 0.3 OD₆₀₀ at which point 100 µl were transferred to black microplates; (B) a second culture of each strain was treated in the same manner, but fluorescence was measured 2.5 h after transferring to the microplates. Fluorescence of AmCyan and Turbo RFP was determined at their respective excitation/emission wavelengths. Data are the result of at least three independent experiments. Significances $p < 0.001$ (**) and $p < 0.0001$ (***) were calculated according to a Student's t-test. Error bars correspond to the standard deviation of the experiments. (C) *P. atrosepticum* SCRI1043, *P. brasiliense* BF20 and BF45 carrying plasmids pFY4535 or pFY4535 and pPDE were diluted to 0.1 OD₆₀₀ and 5 µl placed on the petri dish that was incubated 24 h/30 °C, to analyse the colour under UV light (top panel) and visible light (bottom panel). (D) EPS production by BF20 and BF45 untransformed or carrying plasmid pPDE was measured (after extraction and hydrolysis of extracellular polymers with acid phenol) immediately after agitation at 0.45 OD₆₀₀ or 3 h after static condition. EPS concentration was calculated as glucose equivalents extrapolating from a glucose standard curve. (E) Flocculation measured as medium clearance by OD₆₀₀ of static cultures and comparison to 3 h static of the same strains indicated in (D). (F) Representative images of LB medium clearance (green arrows) of a 24 h static culture due to flocculation of *P. brasiliense* BF20 and BF45 untransformed or carrying the plasmid pPDE. White arrows show the cell pellet at the bottom of the culture tube.

their targets) controlled by c-di-GMP could be responsible for the lack of apparent correlation between c-di-GMP abundance and the motile and sessile life-styles. This non-linear control of phenotypes was also experimentally demonstrated in *P. atrosepticum* when the over-expression of 23 predicted GGDEF, EAL or HD-GYP-domain proteins resulted in variable levels of cell attachment (flocculation) and motility that not always correlated with the level of c-di-GMP Tan et al., 2014. Metabolism of c-di-GMP is complex and requires the activity of many synthesizing and degrading enzymes for which the exact timing and location of their activity is still unknown in *P. brasiliense*. In the case of our strains, lowering the overall levels of c-di-GMP had a small effect on BF20, which besides increasing the production of EPS in static cultures with a small effect on flocculation, maintained the same motility and virulence levels, whereas BF45 motility was more sensitive, but its virulence was only slightly reduced, possibly due to the plasmid's instability during infection in the absence of selective pressure (antibiotics). We also determined that, as in other bacteria, preventing BF45 flocculation is associated with increased cell motility. In LB liquid static cultures BF45 flocculation was delayed by glycerol and prevented by glucose or fructose until possible depletion of these sugars by the cells, which eventually flocculate again. It seems that cell aggregation in liquid medium is at least partially due the production of cellulose, although at this moment we cannot discard that other components (other polysaccharides) or structures (pili or fimbriae) also contribute to flocculation. This fast control between aggregation and dispersion of BF45 could be advantageous for a successful host infection. It has been

reported that cell aggregates or biofilm-like structures of *P. brasiliense* strain 1692 provoke symptoms in a susceptible potato cultivar, while a tolerant cultivar contained planktonic cells possibly making bacteria more susceptible to the plant defence mechanisms (Kubheka et al., 2013; Moleleki et al., 2016). Cell aggregation in the case of BF45 could contribute to the faster plant symptom development in comparison to BF20, although as mentioned above an increased flocculation by low levels of c-di-GMP in BF20 did not increase its virulence. It could be interesting to determine the prevalence of the flocculating phenotype and the virulence in other strains of the BF45 clade. Our observation of the shared presence or absence of genes encoding for c-di-GMP-modulating enzymes among strains predicts a differential regulation of exopolysaccharide production and motility in different *Pectobacterium* species.

Genetic differences between BF20 and BF45 regarding their virulence were not evidently shared with other members of their respective clades. Thus, we analysed the distinct phenotypes between BF20 and BF45 that could allow a better understanding of their individual characteristics. Both strains infect all the plant hosts that were tested, and in all cases BF45 produced faster maceration or wilting. Our data on the production of AHL (very possibly N-(3-oxohexanoyl)-L-homoserine lactone, as this is the main autoinducer of *Pectobacterium* (Pemberton et al., 2005)) were non-conclusive, because both strains produce similar levels of autoinducers, being only marginally higher in BF45. Yet, because autoinducers are active at very low concentrations, we cannot discard that this small difference, and the low-level production of an

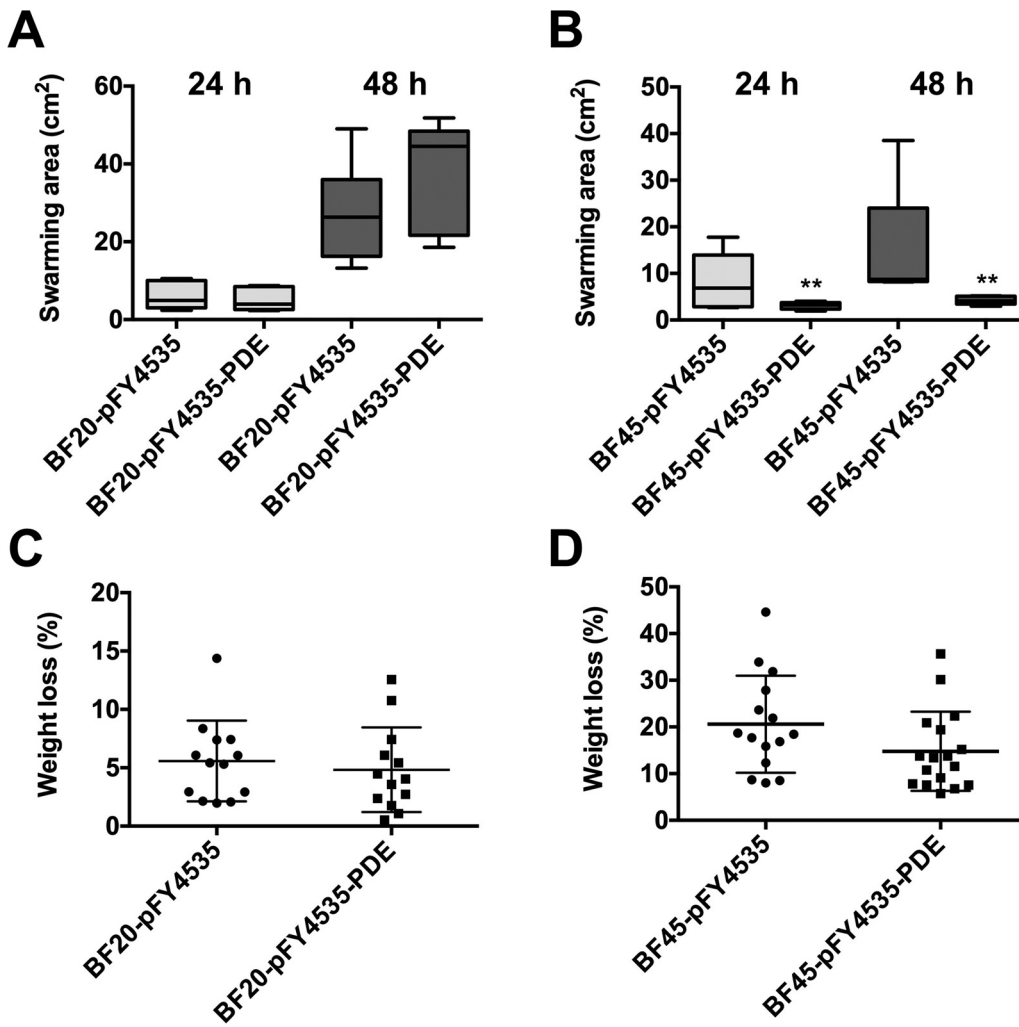


Fig. 7. Swarming and infection levels in BF20 and BF45 with low c-di-GMP levels. The swarming capacity of the strains BF20 (A) and BF45 (B) carrying plasmid pFY4535, or pFY4535 and pPDE was quantified by measuring the colonies area at 24 h and 48 h in 0.4x MacConkey agar. Maceration levels of celery petioles of strains BF20 (C) and BF45 (D) carrying plasmid pFY4535, or pFY4535 and pPDE inoculated with 10^6 cells and incubated for 24 h at 30 °C, were determined by weight loss. A slight but not significant tendency towards less maceration was observed in BF45 with low c-di-GMP. Data are the result of at least three independent experiments. Significance $p < 0.001$ (**) was calculated according to a Student's t-test. Error bars correspond to the standard deviation of the experiments.

extra less polar autoinducer, contribute to the more virulent phenotype of BF45. Our genomic search for AHL biosynthetic clusters found only one complete set (synthase and transcriptional regulator) in both strains and an extra orphan LuxR family transcriptional activator, so the chemical nature of the low concentration autoinducers might not be AHL. In our future work, we expect to investigate in more detail the

differences of QS inducers between our strains using adequate analytical techniques.

Our searches for genes of glycan acting enzymes (CAZY; www.csbl.bmb.uga.edu/dbCAN/) (Yin et al., 2012) found 137 and 136 genes in BF20 and BF45, respectively. Of those annotated as coding for activity on cell wall polysaccharides we found a gene *yesW* encoding a

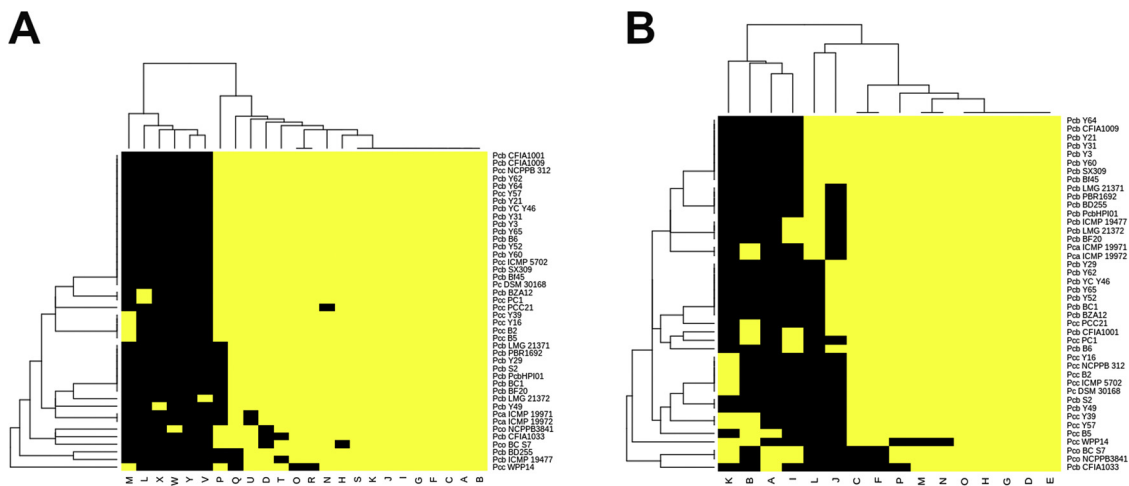


Fig. 8. Comparison of DGC and PDE encoding genes in different *P. brasiliense* strains. A) Genes encoding for GGDEF domain containing proteins, and (B) EAL domain containing proteins encoded in the genomes of 46 *Pectobacterium* species. Representation of gene presence (yellow) or absence (black) among 46 *Pectobacterium* strains used in this study. The whole set of gene identifiers used in this comparison is provided as Supplementary File 1.

rhamnogalacturonan endolyase (PL family 11) in BF45 but absent in BF20, which could account for the extent of maceration and more pectin degradation observed in BF45 in comparison to BF20. Interestingly, we found a high molecular activity band active against pectin, CMC, and xylan in extracts from BF45 grown in medium containing pectin, but only active against CMC and xylan in extracts from BF20. This band could correspond to a complex of enzymes with different activities that resisted the SDS denaturation during electrophoresis, or an enzyme with more than one specificity (Chen et al., 2012). A multifunctional feature in glycoside hydrolases (GHs) has been reported mainly from families GH1, GH5 and GH12 (Peng et al., 2016; Wang et al., 2017), where enzymes from the GH5 family usually exhibit activity against a broader range of substrates. Both BF20 and BF45 contain a set of ten GH1 and one GH5-CBM3 enzymes each (Figure S4), which might explain the multifunctionality of the high molecular activity band. Surprisingly this band appears to be absent in extracts from celery infection, but we cannot rule out the possibility that it remained bound to the insoluble fraction, and thus our analysis limit determining its role in the virulence of the strains. BF20 and BF45 also contain two genes predicted to encode glycogen or starch phosphorylases (family GT35) but we only found an active band against starch in the zymogram of BF45-infected celery. Starch degradation has been overlooked in *Pectobacterium*, but an active glycogen debranching enzyme GlgX with a molecular weight of 74 kDa, similar to the activity band observed here, was reported in *P. chrysanthemi* P35 (Lim et al., 2003) and *P. carotovorum* sp. *carotovorum* LY34 (Cho et al., 2007), although its role on the pathogenesis and the mechanisms that control it are unknown. We need to do more analysis to determine whether this band is of bacterial or plant origin, and in any case, its contribution to the virulence of *P. brasiliense*.

Authors statement

Delia Narváez-Barragán and Andrés de Sandozequi performed most experimental work; Andrés de Sandozequi and Karel Estrada performed bioinformatic analyses; Mabel Rodríguez and Omar Eduardo Tovar-Herrera set up different experimental conditions; and Claudia Martínez-Anaya conceived the idea for the project and wrote most of the paper. All authors reviewed and authorised the manuscript.

Authors contribution

D.N.-B. and A.D.S. performed most experimental work; A.D.S. and K.E. performed bioinformatic analyses; M.R. and O.E.T.-H. set up different experimental conditions; and C.M.-A. conceived the idea for the project and wrote most of the paper.

Ethics statement

None required.

Data accessibility

The datasets generated and analysed during this study are available from C.M.-A. on request.

Declaration of Competing Interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements

We are grateful to Dr. Oscar Mascorro from Universidad de Chapingo for his kind donation of *Pectobacterium* strains BF20 and BF45, Dr. I. Toth from The James Hutton Institute for the kind donation of *P. atrosepticum*SCRI 1043, Dr. S.R. Long and Dr. M. Barnett from

Stanford University for kindly providing plasmid PTB93 F, Dr. Miguel A. Ceballos and Dr. David Zamorano from CCG-UNAM for providing plasmids pZLR4 and pFY4535, respectively. To María Ines Isidro-Coxca and Dr. José Luis Puento from IBT-UNAM for providing plasmid pMPMT3-*pdeH*-3xFLAG. To Drs. David Zamorano, Lorenzo Segovia and Chris Wood for critical reading of this manuscript. Genome sequencing was performed by Ricardo Grande at Unidad Universitaria de Secuenciación Masiva y Bioinformática (IBT, UNAM). To Arturo Pimentel and Andrés Saralegui from Laboratorio Nacional de Microscopia Avanzada (LMNA, IBT-UNAM), and to Blanca Ramos Cerrillo and Ivana Blancas-Nava for technical assistance. D.N.-B., A.D.S., M.R. and O.E.T.-H. received financial support from CONACYT, México fellowships. This work was financed by CONACYT Ciencia Básica, México (166050 and 252551) and PAPIIT-DGAPA, México (IN211116 and IN211019) grants to C.M.-A.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary material related to this article can be found, in the online version, at doi:<https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126427>.

References

- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J., 1990. Basic local alignment search Tool.pdf. *J. Mol. Biol.* 215, 403–410.
- Bassis, C.M., Visick, K.L., 2010. The Cyclic-di-GMP phosphodiesterase BinA negatively regulates cellulose-containing biofilms in *Vibrio fischeri*. *J. Bacteriol.* 192, 1269–1278.
- Bowden, S.D., Hale, N., Chung, J.C.S., Hodgkinson, J.T., Spring, D.R., Welch, M., Welch, M., 2017. Surface swarming motility by *Pectobacterium atrosepticum* is a latent phenotype that requires O antigen and is regulated by quorum sensing. *Microbiology* 159, 2375–2385.
- Brown, M.J., Lester, J.N., 1980. Comparison of bacterial extracellular polymer extraction methods. *Appl. Environ. Microbiol.* 40, 179–185.
- Cha, C., Gao, P., Chen, Y., Shaw, P.D., Farrand, S.K., 1998. Production of acyl-homoserine lactone quorum-sensing signals by gram-negative plant-associated Bacteria. *Mol. Plant Microbe Interact.* 11, 1119–1129.
- Charkowski O., A., 2018. The changing face of bacterial soft-rot diseases. *Annual Review of Phytopathology* 56 (1), 269–288. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080417-045906>.
- Chen, Z., Friedland, G.D., Pereira, J.H., Reveco, S.A., Chan, R., Park, J.L., Thelen, M.P., Adams, P.D., Arkin, A.P., Keasling, J.D., Blanch, H.W., Simmons, B.A., Sale, K.L., Chivian, D., Chhabra, S.R., 2012. Tracing determinants of dual substrate specificity in glycoside hydrolase family 5. *J. Biol. Chem.* 287, 25335–25343.
- Cho, K.M., Kim, E.J., Math, R.K., Shah, M., Asraf, I., Hong, S.J., Kim, J.O., Shin, K.J., Lee, Y.H., Kim, H., Yun, H.D., 2007. Cloning of isoamylase gene of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* LY34 and identification of essential residues of enzyme. *J. Life Sci.* 17, 1182–1190.
- Darling, A.C.E., Mau, B., Blattner, F.R., Perna, N.T., 2004. Mauve: multiple alignment of conserved genomic sequence with rearrangements. *Genome Res.* 14, 1394–1403.
- DuBois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., Smith, F., 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28, 350–356.
- Finn, R.D., Clements, J., Eddy, S.R., 2011. HMMER web server: interactive sequence similarity searching. *Nucleic Acids Res.* 39, W29–W37.
- Finn, R.D., Clements, J., Arndt, W., Miller, B.L., Wheeler, T.J., Schreiber, F., Bateman, A., Eddy, S.R., 2015. HMMER web server: 2015 Update. *Nucleic Acids Res.* 43, W30–W38.
- Fouts E., D., et al., 2005. Major Structural Differences and Novel Potential Virulence Mechanisms from the Genomes of Multiple *Campylobacter* Species. *PLOS Biology* 3 (1), e15. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0030015>.
- Gardan, L., Gouy, C., Christen, R., Samson, R., 2003. Elevation of three subspecies of *Pectobacterium carotovorum* to species level: *Pectobacterium atrosepticum* sp. nov., *Pectobacterium betavasculorum* sp. nov. and *Pectobacterium wasabiae* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53, 381–391.
- González-Rodríguez, M., Autónoma, U., Uach, C., Agrícola, D.D.P., México-texcoco, C., Cp, D.M., Silva-rojas, H.V., Postgraduados, C., Semillas, P., De, E., 2005. Ensayo In Vitro Del Péptido Antimicrobiano Melitina Contra Diferentes Bacterias Fitopatógenas 23. pp. 176–182.
- Haas, B.J., Papanicolaou, A., Yassour, M., Grabherr, M., Blood, P.D., Bowden, J., Couger, M.B., Eccles, D., Li, B., Lieber, M., Macmanes, M.D., Ott, M., Orvis, J., Pochet, N., Strozzi, F., Weeks, N., Westerman, R., William, T., Dewey, C.N., Henschel, R., Leduc, R.D., Friedman, N., Regev, A., 2013. De novo transcript sequence reconstruction from RNA-seq using the Trinity platform for reference generation and analysis. *Nat. Protoc.* 8, 1494–1512.
- Hauben, L., et al., 1998. Phylogenetic Position of Phytopathogens within the *Enterobacteriaceae*. *Systematic and Applied Microbiology* 21 (3), 384–397. [https://doi.org/10.1016/S0723-2020\(98\)80048-9](https://doi.org/10.1016/S0723-2020(98)80048-9).
- Hélias, V., Hamon, P., Huchet, E., Wolf, J.V.D., Andrivon, D., 2012. Two new effective semiselective crystal violet media for isolation of *Pectobacterium* and *Dickeya*.

- Plant Pathol. 61, 339–345.
- Kanehisa, M., Furumichi, M., Tanabe, M., Sato, Y., Morishima, K., 2017. KEGG: new perspectives on genomes, pathways, diseases and drugs. *Nucleic Acids Res.* 45, D353–D361.
- Kubheka, G.C., Coutinho, T.A., Moleleki, N., Moleleki, L.N., 2013. Colonization patterns of an mCherry-tagged *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense* strain in potato plants. *Phytopathology* 103, 1268–1279.
- Lechner, M., Findeiß, S., Steiner, L., Marz, M., Stadler, P.F., Prohaska, S.J., 2011. Proteinortho: detection of (Co-)orthologs in large-scale analysis. *BMC Bioinformatics* 12, 124.
- Lee, D.H., Kim, J.B., Lim, J.A., Han, S.W., Heu, S., 2014. Genetic diversity of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense* isolated in Korea. *Plant Pathol. J.* 30, 117–124.
- Letunic, I., Bork, P., 2019. Interactive Tree of Life (iTOL) v4: recent updates and new developments. *Nucleic Acids Res.* 47, W256–W259.
- Li, J., et al., 2018. VRprofile: gene-cluster-detection-based profiling of virulence and antibiotic resistance traits encoded within genome sequences of pathogenic bacteria. *Briefings in Bioinformatics* 19 (4), 566–574. <https://doi.org/10.1093/bib/bbw141>.
- Lim, W.J., Park, S.R., Kim, M.K., An, C.L., Yun, H.J., Hong, S.Y., Kim, E.J., Shin, E.C., Lee, S.W., Lim, Y.P., Yun, H.D., 2003. Cloning and characterization of the glycogen branching enzyme gene existing in tandem with the glycogen debranching enzyme from *Pectobacterium chrysanthemi* PY35. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 300, 93–101.
- Liu, H., et al., 2008. Quorum Sensing Coordinates Brute Force and Stealth Modes of Infection in the Plant Pathogen *Pectobacterium atrosepticum*. *PLoS Pathogens* 4 (6), e1000093. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000093>.
- Mansfield, J., Genin, S., Magori, S., Citovsky, V., Sriariyanum, M., Ronald, P., Dow, M.A.X., Verdier, V., Beer, S.V., Machado, M.A., Toth, I.A.N., Salmond, G., Foster, G.D., Lipm, I.P., Tolosan, F.-C., 2012. Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology. *Mol. Plant Pathol.* 13, 614–629.
- Mapleson, D., Drou, N., Swarbrick, D., 2015. RAMPART: a workflow management system for de novo genome assembly. *Bioinformatics* 1824–1826.
- Mayer, M.P., 1995. A new set of useful cloning and expression vectors derived from pBlueScript. *Gene* 163, 41–46.
- Moleleki, L.N., Pretorius, R.G., Tanui, C.K., Mosina, G., Theron, J., 2016. A quorum sensing-defective mutant of *Pectobacterium carotovorum* ssp. *brasiliense* 1692 is attenuated in virulence and unable to occlude xylem tissue of susceptible potato plant stems. *Mol. Plant Pathol.* 1–13.
- Nunes Leite, L., de Haan, E.G., Krijger, M., Kastelein, P., van der Zouwen, P.S., van den Bovenkamp, G.W., Tebaldi, N.D., van der Wolf, J.M., 2014. First report of potato blackleg caused by *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense* in the Netherlands. *New Dis. Reports* 29, 24.
- O'Toole, G.A., 2011. Microtiter dish biofilm formation assay. *JoVE* e2437.
- Panda, P., Fiers, M.A.W.J., Armstrong, K., Pitman, A.R., 2012. First report of blackleg and soft rot of potato caused by *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense* in New Zealand. *New Dis. Reports* 26, 15.
- Pemberton, C.L., Whitehead, N.A., Sebaihia, M., Bell, K.S., Hyman, L.J., Harris, S.J., Matlin, A., Robson, N.D., Birch, P.R.J., Carr, J.P., Toth, I.K., Salmond, G.P.C., 2005. Novel quorum-sensing-controlled genes in *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*: identification of a fungal elicitor homologue in a soft-rotting bacterium. *Mol. Plant Microbe Interact.* 18, 343–353.
- Peng, X., Su, H., Mi, S., Han, Y., 2016. A multifunctional thermophilic glycoside hydrolase from *Caldicellulosiruptor owensensis* with potential applications in production of biofuels and biochemicals. *Biotechnol. Biofuels* 9, 98.
- Petersen, T.N., Brunak, S., von Heijne, G., Nielsen, H., 2011. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nat. Methods* 8, 785–786.
- Portier, P., Pédrón, J., Taghouti, G., Fischer-Le Saux, M., Caullireau, E., Bertrand, C., Laurent, A., Chawki, K., Oulgazi, S., Moumni, M., Andrivon, D., Dutrieux, C., Faure, D., Hélias, V., Barny, M.-A., 2019. Elevation of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *odoriferum* to species level as *Pectobacterium odoriferum* sp. nov., proposal of *Pectobacterium brasiliense* sp. nov. and *Pectobacterium actinidiae* sp. nov., emended description of *Pectobacterium carotovorum* and. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 69, 3214–3223.
- Pritchard, L., Glover, R.H., Humphris, S., Elphinstone, J.G., Elphinstone, J.G., Toth, I.K., 2015. Genomics and taxonomy in diagnostics for food security: soft-rotting enterobacterial plant pathogens. *Anal. Methods* 8, 12–24.
- Punta, M., Coghill, P., Eberhardt, R., Mistry, J., Tate, J., Boursnell, C., Pang, N., Forslund, K., Ceric, G., Clements, J., Heger, A., Holm, L., Sonnhammer, E., Eddy, S., Bateman, A., Finn, R., 2012. The Pfam protein families databases. *Nucleic Acids Res.* 40 (30), D290–D301 1–12.
- Römling, U., Gomelsky, M., Galperin, M.Y., 2005. C-di-GMP: the dawning of a novel bacterial signalling system. *Mol. Microbiol.* 57, 629–639.
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J.-Y., White, D.J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P., Cardona, A., 2012. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Meth.* 9, 676–682.
- Seemann, T., 2014. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics* 30, 2068–2069.
- Tan, H., West, J.A., Ramsay, J.P., Monson, R.E., Griffin, J.L., Toth, I.K., Salmond, G.P.C., 2014. Comprehensive overexpression analysis of cyclic-di-GMP signalling proteins in the phytopathogen *Pectobacterium atrosepticum* reveals diverse effects on motility and virulence phenotypes. *Microbiology* 160, 1427–1439.
- Toth K. I., et al., 2003. Soft rot erwiniae: from genes to genomes. *Molecular Plant Pathology* 4 (1), 17–30. <https://doi.org/10.1046/j.1364-3703.2003.00149.x>.
- Valentini, M., Filloux, A., 2019. Multiple roles of c-di-GMP signaling in bacterial pathogenesis. *Annu. Rev. Microbiol.* 73, 387–406.
- van der Merwe, J.J., Coutinho, T.A., Korsten, L., van der Waals, J.E., 2010. *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense* causing blackleg on potatoes in South Africa. *Eur. J. Plant Pathol.* 126, 175–185.
- Wang, Z., Hu, Y., Long, L., Ding, S., 2017. Characterization of a GH12 endoglucanase from *Volvariella volvacea* exhibiting broad substrate specificity and potential synergy with crude cellulase. *BioResources* 12, 9437–9451.
- Wattam, A.R., Davis, J.J., Assaf, R., Boisvert, S., Brettin, T., Bun, C., Conrad, N., Dietrich, E.M., Disz, T., Gabbard, J.L., Gerdes, S., Henry, C.S., Kenyon, R.W., Machi, D., Mao, C., Nordberg, E.K., Olsen, G.J., Murphy-Olson, D.E., Olson, R., Overbeek, R., Parrello, B., Pusch, G.D., Shukla, M., Vonstein, V., Warren, A., Xia, F., Yoo, H., Stevens, R.L., 2017. Improvements to PATRIC, the all-bacterial bioinformatics database and analysis resource center. *Nucleic Acids Res.* 45, D535–D542.
- Yan, J., Deforet, M., Boyle, K.E., Rahman, R., Liang, R., Okegbe, C., Dietrich, L.E.P., Qiu, W., Xavier, J.B., 2017. Bow-tie signaling in c-di-GMP: machine learning in a simple biochemical network. *PLoS Comput. Biol.* 13, e1005677.
- Yin, Y., et al., 2012. dbCAN: a web resource for automated carbohydrate-active enzyme annotation. *Nucleic Acids Research* 40 (W1), W445–W451. <https://doi.org/10.1093/nar/gks479>.
- Yin, Y., Mao, X., Yang, J., Chen, X., Mao, F., Xu, Y., 2012. dbCAN: a web resource for automated carbohydrate-active enzyme annotation. *Nucleic Acids Res.* 40, W445–W451.
- Zamorano-Sánchez, D., Xian, W., Lee, C.K., Salinas, M., Thongsomboon, W., Cegelski, L., Wong, G.C.L., Yildiz, F.H., 2019. Functional specialization in *Vibrio cholerae* diguanylate. *MBio* 10, 1–16.
- Zhang, H., et al., 2018. dbCAN2: a meta server for automated carbohydrate-active enzyme annotation. *Nucleic Acids Research* 46 (W1), W95–W101. <https://doi.org/10.1093/nar/gky418>.
- Zhang, Y., Fan, Q., Loria, R., 2016. A re-evaluation of the taxonomy of phytopathogenic genera *Dickeya* and *Pectobacterium* using whole-genome sequencing data. *Syst. Appl. Microbiol.* 39, 252–259.
- Zhou, H., Zheng, C., Su, J., Chen, B., Fu, Y., Xie, Y., Tang, Q., Chou, S.-H., He, J., 2016. Characterization of a natural triple-tandem c-di-GMP riboswitch and application of the riboswitch-based dual-fluorescence reporter. *Sci. Rep.* 6, 20871.

Microbiology

Expansin-related proteins: biology, microbe-plant interactions and associated plant defense responses --Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Full Title:	Expansin-related proteins: biology, microbe-plant interactions and associated plant defense responses
Article Type:	Review
Section/Category:	Host-microbe interaction
Corresponding Author:	Claudia Martinez-Anaya, Ph.D. Universidad Nacional Autónoma de México Campus Morelos Cuernavaca, Morelos MEXICO
First Author:	Delia Narváez-Barragán
Order of Authors:	Delia Narváez-Barragán Omar E. Tovar-Herrera Lorenzo Segovia Mario Serrano Claudia Martinez-Anaya, Ph.D.
Manuscript Region of Origin:	MEXICO
Abstract:	<p>Expansin-like proteins, cerato-platanins and swollenins (which we will henceforth refer to as expansin-related proteins) are a group of microbial proteins involved in microbe-plant interactions. Although they share very low sequence similarity, some of their composing domains are near-identical at the structural level. Expansin-related proteins have their target in the plant cell wall, in which they act through a non-enzymatic, but still uncharacterized, mechanism. In most cases, mutagenesis of expansin-related genes affects plant colonization or plant pathogenesis of different bacterial and fungal species, and thus, in many cases they are considered virulence factors. Additionally, plant treatment with expansin-related proteins activate several plant defenses resulting in the priming and protection towards subsequent pathogen encounters. Plant defense responses induced by these proteins are reminiscent of pattern-triggered immunity (PTI), followed by hypersensitive response in some cases. Plant immunity to expansin-related proteins could be caused by: i) protein detection by specific host cell receptors, ii) wall barrier properties modification by the proteins sensed by the host, iii) displacement of cell wall polysaccharides detected by the host. Expansin-related proteins may also target polysaccharides on the wall of the microbes that produced them under certain physiological instances. Here, we review biochemical, evolutionary and biological aspects of these relatively understudied proteins and different immune responses they induce in plant hosts.</p>
Opposed Reviewers:	
Author Comments:	This review was not commissioned, but we asked about the possibility to submit it here with Dr. Hilary Logan after she read the abstract and indicated that she feels this manuscript is in scope for the journal, especially if the focus was directed towards the microbiological aspects of these proteins.
Suggested Reviewers:	

Microbiology

1st July 2020. Cuernavaca, Mexico

Dear Editor,

In the last few years microbial expansins, and the related proteins cerato platanins (CP) and swollenins, have attracted attention from the research community due to their role in microbial infectivity to susceptible plants, either as symbionts or pathogens. Work with bacterial expansins has recently shown their importance as virulence factors. Although, CPs and swollenins have different structural architectures, they all conserve domain D1 of canonical expansins, which is responsible for host cell wall modification and, seemingly, on the cell wall of certain microorganisms. In this review we have analysed evolutionary, structural aspects, and host-interaction features mediated by these proteins, including plant defense responses to the presence of the proteins, from the perspective of their shared activity.

We believe that this article will be of interest of the scientific community dedicated to microbial physiology, protein analysis and plant-microbe interactions.

This manuscript has not been published in any other publication and is not being submitted simultaneously to any other journal.

Thank you in advance for considering our work.

Sincerely,

Claudia Martínez-Anaya, Ph.D

Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México.

e-mail: cma@ibt.unam.mx

Phone: (+52) 777 3291655

1 **Expansin-related proteins: biology, microbe-plant interactions**
2 **and associated plant defense responses**

3 Delia Narváez-Barragán¹, Omar E. Tovar-Herrera³, Lorenzo Segovia¹, Mario
4 Serrano² and Claudia Martínez-Anaya*¹

5 ¹Instituto de Biotecnología. Universidad Nacional Autónoma de México. 62110
6 Cuernavaca Morelos.

7 ²Centro de Ciencias Genómicas. Universidad Nacional Autónoma de México.
8 62110 Cuernavaca Morelos.

9 ³Department of Life Sciences, Ben-Gurion University of the Negev and the National
10 Institute for Biotechnology in the Negev, Marcus Family Campus, BeerSheva,
11 Israel.

12 *Corresponding author:

13 Claudia Martínez-Anaya: ORCID: 0000-0002-2483-6115

14 E-mail: cma@ibt.unam.mx.

15 Phone. +52-777-3291655

16

17 **Key words:** Expansin; Cerato-platanin; Swollenin; Plant-microbe interaction;
18 Exopolysaccharides.

19 **Abstract**

20 Expansin-like proteins, cerato-platanins and swollenins (which we will henceforth
21 refer to as expansin-related proteins) are a group of microbial proteins involved in
22 microbe-plant interactions. Although they share very low sequence similarity, some
23 of their composing domains are near-identical at the structural level. Expansin-
24 related proteins have their target in the plant cell wall, in which they act through a
25 non-enzymatic, but still uncharacterized, mechanism. In most cases, mutagenesis
26 of expansin-related genes affects plant colonization or plant pathogenesis of
27 different bacterial and fungal species, and thus, in many cases they are considered
28 virulence factors. Additionally, plant treatment with expansin-related proteins
29 activate several plant defenses resulting in the priming and protection towards
30 subsequent pathogen encounters. Plant defense responses induced by these
31 proteins are reminiscent of pattern-triggered immunity (PTI), followed by
32 hypersensitive response in some cases. Plant immunity to expansin-related proteins
33 could be caused by: i) protein detection by specific host cell receptors, ii) wall barrier
34 properties modification by the proteins sensed by the host, iii) displacement of cell
35 wall polysaccharides detected by the host. Expansin-related proteins may also target
36 polysaccharides on the wall of the microbes that produced them under certain
37 physiological instances. Here, we review biochemical, evolutionary and biological
38 aspects of these relatively understudied proteins and different immune responses
39 they induce in plant hosts.

41 Introduction

42 Besides the well-known mechanisms of microbial interaction with a host plant (1–3),
43 other less characterized elements may be important for a successful infection.
44 Recent and cumulative evidence indicates that proteins structurally similar to plant
45 expansins, which through a non-enzymatic mechanism modify the plant cell wall,
46 may influence the access of microbes into the host or their transit within tissues once
47 already inside the plant (4–7). These proteins include microbial expansins (EXLX
48 family (8)), cerato-platanins and swollenins (9,10), which we collectively name
49 expansin-related proteins. A large majority of reports of experiments with expansin-
50 related proteins mutant strains show defects in pathogenicity or reduction of
51 colonization (4–6,11–18), whereas on the contrary, overexpression results in greater
52 virulence of pathogenic species (6,11,18). Due to the absence of enzymatic activity,
53 progress towards understanding their activity upon cell wall polysaccharides at the
54 molecular and biochemical level has been relatively slow. Nevertheless, several
55 indirect approaches have proven useful and technically easy to perform, in contrast
56 to direct visualization of the cell wall, which given its enormous complexity requires
57 sophisticated analysis techniques unavailable (19) to many laboratories around the
58 world. One consequence of treating plants with purified preparations of expansin-
59 related proteins (or fragments of these proteins) is the stimulation of their immune
60 response, which in all cases appears to occur via the PTI (pattern-triggered
61 immunity) pathway (6,9,15,17,18,20–24). Simple protein infiltration experiments
62 provoke myriad plant defense and provide important information on the *in vivo*
63 effects of the proteins, and the possibility to identify participating pattern response

64 receptors (PRR) and the ligands responsible for their activation (15,25). Some
65 reports point to the protein itself being recognized as a microbe-associated
66 molecular pattern (MAMP), as observed during exposure to some CPs (reviewed in
67 (26)), whereas other reports show that immune responses are most likely triggered
68 by the damage-associated molecular pattern (DAMP) pathway being activated by
69 the host, molecules being displaced by the treatment or through a modification of
70 the barrier properties of host cell walls (6,7,21).

71 Other targets of expansin-related proteins may also exist outside the plant cell wall,
72 with physiological relevance for the microbe. This is expected given the capacity of
73 expansin-related proteins to bind, *in vitro*, non-cellulosic polysaccharides such as
74 chitin or peptidoglycan. Whether, in some microorganisms, multi-target expansin-
75 related proteins evolved to facilitate the efficiency of host interaction needs to be
76 confirmed.

77 **Origin of Expansin-related proteins**

78 **Evolution of expansins.** Expansins diversified from a common ancestor into four
79 distinct genetic subfamilies in vascular plants. Two of these subfamilies, the α and β
80 plant expansins, cause cell wall loosening (27). With the growth of sequence
81 databases, bacterial and fungal genes predicted to have similar structure to β -
82 expansins were identified, yet their function in non-Plantae organisms is still
83 unknown, especially for those that do not have cellulosic cell walls (28). However, *in*
84 *vitro* assays of host cell wall extensibility and filter paper wakening (both measured
85 by applying tensile force) upon microbial expansins treatment have detected low

86 activity levels (29–31). Chase *et al.* (28) have recently published a very thorough
87 analysis of microbial expansin evolution, observing a broader distribution of microbial
88 expansin genes across diverse lineages of bacteria, fungi and other eukaryotic
89 microbes than previously recognized. Expansins are found in red algae
90 (Rhodophyta), which use cellulose as their main cell wall structural carbohydrate,
91 and in the Glaucophyta genome sequence of *Cyanophora paradoxa* (32), a still
92 uncharacterized Archaeplastid group that apparently diverged before the split of the
93 red (Rhodophyta) and green (Chloroplastida) algal lineages (32). Expansin
94 homologs are present in Amoebozoa, Alveolates (*Vitrella brassicaformis*),
95 Haptophytes (*Emiliana huxleyi*) and *Stramenopiles*. The slime mold *Dictyostelium*
96 *discoïdum* (Amoebozoa) uses expansins to modify its structural cellulose (33). Many
97 Oomycetes also have expansins, but it is not known if they use expansins for
98 morphogenesis, interactions with plant cell walls, or both (28).

99 Bacterial expansins are virulence factors that facilitate colonization of plant hosts
100 (27). Chase *et al.* (28) showed that 28% of microbial species with expansins are
101 plant pathogens, 59% are described as plant commensals, soil inhabitants or
102 saprophytes, i.e. they interact non-pathogenically with live plants and/or decaying
103 plant matter (34). The distribution of non-plantae expansins shows that 61.3% of
104 microbial species are bacteria (none are found in archaea). The presence of
105 expansin genes in 85% of sequenced Myxobacteria supports their ecological
106 importance as saprophytes (35). There are many species having expansin genes
107 within the Actinobacterial genera *Streptomyces*, *Nocardia* and *Micromonospora*.
108 *Streptomyces* can be either plant growth promoters or pathogens, yet *Nocardia* and

109 *Micromonospora* are soil inhabitants with few (or no) described plant associations
110 (36).

111 Only 15% of the bacterial species that have expansin genes are phytopathogens
112 and belong to two betaproteobacterial lineages, *Xanthomonadaceae* and
113 *Enterobacteriaceae*. All these phytopathogens move through the xylem causing a
114 highly virulent phenotype compared to the localized lesions of most bacterial plant
115 pathogens (37). Only 31.5% of microbes with an expansin homolog are fungi and
116 almost all are described as plant pathogens, commensals or saprophytes, with a
117 higher proportion being phytopathogenic (52.3%) compared to the proportion of
118 bacteria that are phytopathogens (15%) (28).

119 Phylogenetic analysis of microbial expansins suggests that horizontal gene transfer
120 (HGT) has been determinant in the distribution of expansins among microorganisms
121 (28). Chase *et al.*, (28) identified a number of nodes, well-supported statistically, that
122 are incompatible with the expected taxonomic relationships. Two groups of
123 pathogenic gammaproteobacteria – the Xanthomonad and Enterobacterial plant
124 pathogens – group with Firmicutes suggesting that the ecological niche may be a
125 strong factor driving some expansin HGT events (38).

126 In a particular Bacteria–Eukaryote HGT event, the *Streptomyces acidiscabies* and
127 the actinobacterium *Hamadaea tsuonensis* expansin genes were recovered within a
128 group with *Stramenopiles* and not within plants, suggesting that a bacterium could
129 have acquired an expansin gene in a marine environment before the emergence of
130 land plants (39); in addition, none of the 491 microbial expansin genes group within

131 the Viridiplantae indicating that land plants were not the expansin gene donors to
132 bacteria and fungi (28).

133 The presence of expansin genes in most species within a group of Enterobacterial
134 plant pathogens suggests that the original acquisition of an expansin occurred before
135 these groups diversified (40). In several plant pathogens, the acquisition of an
136 expansin seems to be more recent (12). Expansins or expansin fusions, as they are
137 seldom found in microbes, are a potent virulence factor when acquired by bacteria
138 and fungi in simplified agro-ecosystem as shown by the high frequency of expansin
139 genes in many virulent fungal and bacterial plant pathogens. Fusions with
140 carbohydrate-active proteins also drive the functional evolution of microbial
141 expansins. There is a clear correlation between fusion to carbohydrate active
142 domains with a transition between pathogenicity and commensalism. In fungi, only
143 one fusion of an expansin to a CBM1 carbohydrate binding domain has been found
144 so far when expansin genes have probably fused multiple times independently with
145 a CBM2 domain in bacteria, and at least once to a GH5 domain in
146 Xanthomonadaceae (12). Most bacterial species with expansin fusions to GH5
147 and/or CBM2 domains are virulent phytopathogens when bacteria with unfused
148 expansin genes are generally not plant pathogens suggesting that expansin fusions
149 are more likely to function as a virulence factor (12). Their variety indicates that
150 multiple independent events of expansin to carbohydrate active domains fusions
151 have occurred both in bacteria and fungi.

152 Expansin-like proteins are also found in nematodes; however, they display a domain
153 architecture reversal being D2 at the N-terminus and D1 at the C-terminus,

154 compared to canonical expansins. These proteins are present in pathogenic and
155 non-pathogenic nematodes that were acquired via multiple independent horizontal
156 gene transfer events, followed by active evolution of the gene families. It seems that
157 a common ancestor of the Tylenchida and Aphelenchida clades acquired the
158 expansin D1 domain from bacteria. Nematodes also acquired a gene formed by a
159 cellulase and a CBM domain that suffered subsequent duplications repeatedly,
160 eventually, these events split the CBM and the cellulase domains, leading the CBM
161 to fuse to the expansin D1 domain (41).

162 **Evolution of Cerato-Platanins.** These proteins could have evolved independently
163 to expansins from an ancestor with a glycosyl hydrolase family 45 fold (8). CPs are
164 only found in filamentous fungi and their distribution is restricted to members of the
165 subkingdom Dikarya: Ascomycota and Basidiomycota (26,42). In Basidiomycota,
166 CPs are present only in Agaricomycetes, and perhaps CPs were lost in early
167 branches of the jelly fungi and fungi with yeast (or yeast-like) morphology in their life
168 cycle, suggesting a possible involvement of CP function in the sporocarp formation
169 (42). In Ascomycota, CPs are present only in the Pezizomycotina. A notorious
170 difference between these divisions is the high number of CPs genes in
171 Basidiomycota varying from 1 to 12 in different species, meanwhile most species of
172 Ascomycota encode only one CP, with few exceptions (42).

173 **Evolution of Swollenins.** There is much less information about the origin of
174 swollenins, but it is known that they are restricted to the phyla Ascomycota in fungi.
175 Phylogenetic analysis of the CBM of swollenins indicate an independent fusion to
176 the expansin-like domain (43).

177 **Expansin-related proteins structure**

178 **Expansins structure.** Structurally, expansins consist of two domains (D1 and D2)
179 connected by a short linker, where D1 shares homology with the GH45 family of
180 endoglucanases but lacks hydrolytic activity, while D2 is considered as a CBM63
181 with cellulose binding capacity. Plant expansin activity on the cell wall occurs by a
182 biophysical process causing breakage of the hydrogen bonds that hold together
183 cellulose and other polysaccharides and is indirectly measured by tension relaxation
184 of submerged young tissue fragments in expansin solution. Microbial expansins
185 show very low activity levels under the same experimental conditions, suggestive of
186 a different activity, and thus also a different biological role. Mutagenesis of specific
187 residues of EXLX1 from *B. subtilis* showed that the active center of the protein is
188 located on D1 and that activity resides on an Asp residue assisted by other polar
189 residues (Thr, Ser and Asp), belonging to a conserved shallow groove known as the
190 polysaccharide binding surface (PBS) (30),[4],[5]. Domain D2 is characterized by the
191 presence of three conserved aromatic residues (a combination of W and Y) which
192 are crucial for binding cellulose, which in turn is necessary for expansin activity (30)
193 (Figure 1A). Bacterial expansins also contain many residues charged either
194 positively or negatively at neutral pH, which groups them as examples with
195 theoretical $pI < 6$ or $pI > 9$. EXLX1 from *Bacillus subtilis* and Exl1 from *Pectobacterium*
196 *brasiliense* are representatives of each group, being BsEXLX1 a basic protein and
197 PbExl1 an acidic protein (at pH 7.5) (4,29). The difference in electrical charge
198 between these proteins has important implications on the so-called productive
199 binding to the substrate that occurs through the polysaccharide binding surface. In

200 addition, for basic proteins such as BsEXLX1, electrostatic interactions, driven by its
201 positive residues with the negative components of pectin and hemicellulose, result
202 in non-productive binding, while an acidic expansin seems to be repelled by the
203 same acid fraction of the wall,(4),(29),(44). For instance, experiments with
204 fluorophore-labelled proteins and confocal microscopy showed that whereas
205 BsEXLX1 bound cell walls of most cell types in celery petiole cross sections due to
206 the nonspecific electrostatic interaction, Exl1 signal was confined to the intercellular
207 spaces between xylem vessels and the surrounding cells. Exl1 localization in xylem
208 structures might be relevant as expansin genes are commonly found in the genomes
209 of xylem-colonizing pathogenic bacteria (46).

210 ***Cerato-platanins.*** The second group of expansin-related proteins, the cerato-
211 platanins (CPs (47)), are small (105-134 amino acids), single domain proteins with
212 structural homology to D1 of BsEXLX1, including the conserved residue Asp
213 (analogous to Asp82 in BsEXLX1 (48)) that is also necessary for their activity (Figure
214 1B). Similarly to expansins, CPs lack enzymatic activity (49,50) and can weaken
215 cellulosic substrates (21,50). Interestingly, unlike expansins, CPs cannot bind
216 cellulose (51,52), but instead they bind chitin (17,21,47,50,53). CPs bind N-
217 acetylglucosamine and chitin oligosaccharides through a flat and shallow surface
218 groove formed by polar (Asp, Gly, Ser) and aromatic (Trp, Tyr) residues, which are
219 well conserved among CPs (54). CPs are characteristically hydrophobic proteins
220 with a high degree of conservation of cysteine residues forming two disulfide bonds
221 important to maintain their conformation and activity (55), and the position of these
222 bonds are shared with those of plants and some microbial expansins (44). The

223 structural similarities of CPs to expansins suggest that they share similar biological
224 functions (56).

225 **Swollenins.** Initially discovered in *T. reesei*, swollenins are modular proteins formed
226 by a fungal-type cellulose-binding domain (CBM1) at the N-terminus connected
227 through a linker containing mammalian fibronectin type III-like repeats, to a C-
228 terminal region containing the expansin-like domain (10). Contrary to some bacterial
229 expansins and CPs, no tridimensional structures have been determined yet for
230 swollenins, but *in silico* analyses suggest that an Asp residue is in close proximity to
231 a Thr at the location equivalent to residues in the active center of expansins (43)
232 (Figure 1C). Furthermore, swollenins can swell cotton fibers (a substrate with a high
233 proportion of crystalline cellulose) and disrupt the cell walls of the green algae
234 *Valonia*, without detectable enzymatic activity, maybe promoting slippage of the
235 cellulose microfibrils in plant cell walls, similar to the activity of plant expansins of the
236 alpha family (57).

237 **Expansin-related proteins in plant-microbe interactions**

238 **Expansin biological role.** Although only a few expansin-containing bacteria are
239 phytopathogens, expansins could play a prominent role in xylem invasion (5,6,12,28).
240 Indeed, seven of the ten most important bacterial pathogens that invade xylem
241 (*Ralstonia solanaceum*, *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, *X. campestris* pathovars,
242 *X. axonopodis* pv. *manihotis*, *Xylella fastidiosa*, *Dickeya* [*D. dandantii* and *D. solani*]
243 and *Pectobacterium* [*P. carotovorum* and *P. atrosepticum*] (58)), encode expansins in
244 their genome, with their contribution to the infection process becoming more evident

245 through studies of expansin mutants of some of these species. The null mutant
246 $\Delta EXLX1$ for the only expansin gene of *R. solanacearum* (a vascular pathogen of a
247 broad host range (59)) decreased wilt symptoms in tomato due a root hyper-
248 attachment phenotype that prevents bacteria entering and colonizing the plant
249 vasculature (60). The genus *Pectobacterium* is the causal agent of soft rot in a wide
250 host range (61–63). *Pectobacterium* encodes one expansin in its genome (*Exl1*) that
251 increases host tissue maceration when over-expressed, whereas the expansin-like
252 deletion ($\Delta exl1$) in *P. atrosepticum* exhibited reduced infection symptoms and lesser
253 maceration in potato plants and delayed swarming motility in semisolid MacConkey
254 medium. These phenotypes could be related to alterations to the mechanism by which
255 bacteria enter the plant tissue; when vacuum was used to introduce *P. atrosepticum*
256 $\square exl1$ into potato leaves, maceration occurred at wild type levels (6). Similarly, *Erwinia*
257 *tracheiphila*, a Gram-negative bacterium responsible for cucurbit wilt, encodes an
258 expansin gene in an operon with a truncated glycoside hydrolase family 5. The double
259 mutant ($\Delta exl1-gh5$) showed fewer wilt symptoms than the wild type, due to a more
260 restricted ability to systemically colonize the xylem. The seemingly reduced motility of
261 expansin mutants of *P. atrosepticum* and *E. tracheiphila* appear to be unrelated to
262 flagellar or Type IV pili defects, but how exactly expansins participate in invasion has
263 yet to be determined (6,12). *Xylella fastidiosa*, a pathogen of several plant hosts
264 including grapevine (in which it provokes Pierce disease), contains a modular glycosyl
265 hydrolase fused to an expansin-like domain (*EngXCA1*). The *EngXCA1* deletion
266 ($\Delta engXCA1$) produces milder Pierce disease symptoms during the early stages of
267 infection in Chardonnay, but not in Cabernet Sauvignon, cultivars. The authors of this

268 study attribute the different phenotypes between grape cultivars to an increased
269 presence of fucosylated xyloglucans in the pit membranes of the xylem in Chardonnay,
270 which may be a better substrate for disrupting the cellulose and xyloglucans bonds by
271 the expansin (13). *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (*Cmm*) is a Gram-
272 positive xylem inhabitant (64), responsible for bacterial wilt and canker of tomato. *Cmm*
273 contains two expansin genes, one is a chimera encoding an expansin fused to an
274 active cellulase (CelA-EXLX1) in a virulence island in a plasmid, the second is a
275 canonical expansin gene located in the chromosome. Deletion of the expansin domain
276 of CelA-EXLX1 prevents wilting in tomato without affecting the endoglucanase activity
277 of CelA (14). In contrast, a *Cmm* strain cured of the plasmid and having the
278 chromosomal gene knocked-out (Δ EXLX2) showed more severe disease symptoms
279 and a more extensive distribution of the mutant population provoking lesions on distant
280 locations from the inoculation site in comparison to the wild type (5). Yet, as mentioned
281 before, expansins also participate in beneficial interactions between bacterial and
282 plants, such as in the case of *B. subtilis*, a Gram-positive soil bacterium that promotes
283 plant growth and is used as a biocontrol agent for fungi (4,65). The null mutant of the
284 single *B. subtilis* expansin gene (*EXLX1*⁻) shows a 90% reduced capacity for colonizing
285 maize roots, indicating that EXLX1 enhances the bacteria-root surface interaction (4).

286 Roles for expansins in plant interactions include those involving nematodes, despite
287 the reversal of D1 and D2 domain architecture compared to canonical expansin
288 structure (8). In *Heterodera avenae*, a cereal cyst parasite that causes severe crop
289 damage worldwide, *EXPB2* gene silencing reduced levels of leaf infection in
290 *Nicotiana benthamiana*, possibly due to a penetration or migration defect of the

291 nematode, since *HaEXPB2* could be modifying the cell wall at early infection stages
292 (7).

293 Most null mutant characterization reports find correlation between expansin activity
294 and host colonization, but the molecular basis for this relationship needs further
295 analysis. We recently showed that expansin Exl1 from *P. brasiliense* specifically
296 locates on cell-cell junctions between xylem vessels and the surrounding cells, which
297 is a pectin rich region (46). Additionally, after incubation of isolated vasculature of
298 Swiss chard with Exl1, a solubilized polysaccharide (possibly pectin or
299 hemicellulose) is detected. One interpretation of these results is that Exl1 mobilizes
300 a polysaccharide, possibly by negative-negative repulsion of the protein and the
301 substrate, loosening the cell wall for bacteria movement through the tissue (Figure
302 2). Similar scenarios could be occurring in expansin mutants of the above-mentioned
303 organisms that show reduced invasion or colonization defects.

304 **Cerato-platanins.** CPs are found mainly in plant pathogenic fungi, and studies of CP
305 gene mutants indicate their importance in the virulence of several species. *Botrytis*
306 *cinerea*, a necrotic fungus, is one of the top ten fungal plant pathogens (66) that affects
307 many plant species. Deletion of BcSpl1 gene ($\Delta bcspl1$) reduced the strain's virulence,
308 showing smaller lesions than the wild-type in tobacco leaves (15), possibly by BcSpl1
309 contributing to softening of the plant cell wall with its putative expansin-like activity
310 (51). *Verticillium dahliae* causes wilt in a wide host range, but attenuated virulence in
311 cotton plants ensues after knocking out VdCP1 gene ($\Delta vdcpl1$) (67). A similar
312 phenotype occurs in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*, in which the MSP1

313 deletion ($\Delta msp1$) displayed reduced disease symptoms along with a defect of fungal
314 proliferation *in planta*; it was suggested that MSP1 is necessary for the plant invasive
315 growth of *M. grisea* due to a reduced disease symptom development by *msp1-1* and
316 *msp1-2* mutant strains (16). CPs in these species may facilitate fungal penetration in
317 the host, but other cases show different results. In *Leptosphaeria maculans*, which
318 causes blackleg disease on canola, a null mutation of the CP gene ($\Delta sp1$) is as virulent
319 as the wild-type in canola cotyledons (68). Also, in *Fusarium graminearum*, the causal
320 agent of Fusarium head blight of wheat and barley (66), deletion of CPs genes
321 FgCPP1 and FgCPP2 ($\Delta fgcpp1$ and $\Delta fgcpp2$) produced strains with comparable
322 infection phenotypes to with the wild type in soybean and wheat spikes (69). Again, in
323 the plant growth promoting fungi *Trichoderma virens* and *Trichoderma atroviride*, CP
324 null mutants $\Delta sm1$ and $\Delta epl1$ and $\Delta epl2$ had phenotypes comparable with the wild
325 type strains, suggesting a dispensable CP activity in these cases (53,70).

326 **Swollenin in plant microbe interactions.** Swollenin's relevance to plant-microbe
327 interactions has been studied in a few fungi. *Trichoderma asperellum* and
328 *Trichoderma guizhouense* are growth-promoting, root-colonizing filamentous fungi,
329 and *T. asperellum* is used as a biological control agent. Reducing or preventing
330 swollenin expression in these species impedes colonization of cucumber roots,
331 whereas swollenin over-expression promotes root colonization, the proposed reason
332 being that plant cell wall disruption by TasSWO makes the substrate more
333 accessible to other enzymes aiding root colonization (18)(11).

334 A general picture for the activity of expansins, CPs and swollenins points to a
335 contribution for host invasiveness by cell wall modification (Figure 2), but whether
336 the molecular mechanisms underlying this outcome are shared for all types of
337 expansin-related proteins requires further investigation.

338 **Expansin-related proteins and plant immunity**

339 ***Expansin-triggered plant immunity.*** Several expansin-related proteins trigger
340 plant immune responses in some plant hosts. In the case of bacterial expansins, we
341 recently reported that infiltration of Exl1 from *P. brasiliense* in *A. thaliana* produced
342 a ROS burst and activates the jasmonate, salicylate, and ethylene pathways. Host
343 pretreatment with Exl1 induced immune priming that protected the target against
344 subsequent exposures to *P. brasiliense* and *Botrytis cinerea* in *A. thaliana* and in
345 celery (6). Triggering plant immunity required expansin activity rather than the
346 protein presence, because the defense responses depended on the wild type
347 protein, but not on inactive mutants D83A (single mutant of D1) and
348 Y125A/W126A/Y157A (triple mutant of D2). *In vitro* experiments showing that Exl1
349 releases a polysaccharide from secondary walls (46) may indicate that a similar
350 modification of the cell wall could also occur *in vivo*, triggering the plant response
351 observed, possibly *via* a pattern triggered immunity (PTI) mechanism (6). In some
352 cases, effector triggered immunity (ETI) also appears to be involved as a defense
353 mechanism to expansin treatment. For instance, infiltration of *H. avenae* expansins
354 EXPB1 and EXPB2 in *N. benthamiana* leaves induced cell death, which again
355 seemed dependent on the extracellular activity and substrate-binding capacity of the
356 proteins, since mutants lacking signal peptide, the expansin domain or the CBM

357 failed to show cell death (7). EXPB2 could participate in the penetration and
358 migration of the nematode, probably through cell wall modification, and this process
359 might be perceived by the plant and may contribute to the activation of host defense
360 responses. Contrasting results were obtained after *Globodera rostochiensis* EXPB1
361 infiltration in *N. benthamiana* displayed no cell death (71), although a more detailed
362 study of the host defense response to nematode expansins is required. It still
363 unknown why bacterial expansin did not display HR symptoms, in contrast to
364 nematode expansins; one possibility is that these proteins stimulate different
365 response pathways in plants. In fact, it is well described that the HR response is
366 characteristic of effector-triggered immunity (ETI) similar to that observed in
367 nematodes, while is suggested that *PbExl1* provoke PTI (6), therefore indicating that
368 these expansins might be recognized by different types of receptors in the plant.
369 Nematode EXLX could be perceived by the cytoplasm-localized specific resistance
370 proteins (R protein) triggering ETI, while the bacterial EXLX might be recognized by
371 a pattern recognition receptor (PRR) which will lead to PTI induction. The interaction
372 of these proteins with plant receptors has not been yet studied.

373 **Immunity to *Cerato-platanins*.** The best characterized immune responses induced
374 by expansin-related proteins have been described for CPs. Actually, the first CP
375 (from *Ceratocystis platani*) was initially discovered through its ability to induce
376 defense responses in tobacco leaves associated with tissue cell death, a symptom
377 characteristic of HR (47). Similarly, Pop1 from *Ceratocystis populicola*, MgSM1 from
378 *Magnaporthe oryzae* and FocCP1 from *Fusarium oxysporum* produced ROS and
379 induced cell death after protein infiltration in host leaves (9,20–22,24,72). Cell death

380 due to HR was confirmed by the expression of the gene markers HSR203J and HINI
381 after infiltration of Spl1 (from *B. cinerea*) into tobacco leaves (15), while HR also
382 occurred in the leaves of *A. thaliana* after transient expression of MSP1 from *M.*
383 *grisea* (22). In all these cases, HR was accompanied by MAPK signaling(20),
384 triggering of the salicylate and jasmonate pathways (9,15,21,22), (22,24), induction
385 of systemic acquired resistance (73), and callose deposition (24). Nematode proteins
386 EXPB2 (from *Globodera rostochiensis*) and EXPB1 (from *Pratylenchus penetrans*)
387 are annotated as family β family expansins, but as they lack domain D2 they more
388 closely resemble CP proteins. Accordingly, GrEXPB2 induced cell death in tomato
389 and potato and suppressed their defenses (71). Similarly, transient expression of *P.*
390 *penetrans* EXPB1 in *N. benthamiana* leaves provoked HR symptoms and induced
391 defense-related genes, such as orthologs of the late blight and the TMV resistance
392 protein, ethylene response factors, WRKY and NAC transcription factors, and
393 pathogenesis-related and LRR proteins, which resulted in host plant priming
394 providing protection towards the causal pathogen, and in some cases, towards
395 different pathogens (9,15,21,22,24). Meanwhile, two adjacent peptides of 40-
396 residues each (PepA and PepB), located in a highly conserved polysaccharide
397 binding surface of Spl1 (from *B. cinerea*), are sufficient to induce electrolyte leakage
398 and cytoplasm shrinkage leading to necrosis, either when applied together or
399 independently (25). This is possibly due to their direct binding to a membrane
400 glycosylated receptor for activation of PTI, given the involvement of the regulatory
401 protein BAK1/SERK3 (25) (15) (15). Another explanation for CPs triggering immune
402 responses is that, through their action on the host cuticle waxes or by increasing

403 plant permeability, DAMPs are produced and activate the PTI (21). The reason for
404 differential PTI or HR induction is still unknown, but they may be due to different
405 plant immunity mechanisms producing similar outcomes: induction of a general PTI
406 response followed by HR. For instance, EXPB1 (from *P. penetrans*) acts both as a
407 PAMP, directly activating PTI, and as an effector that is recognized by NB-LRR
408 proteins inducing the HR (74).

409 Interestingly, infiltration with different CPs (VdCP1 from *Verticillium dahlia*, Sm1 from
410 *T. virens* and Epl1 from *T. atroviride*) subsequently protected against *B. cinerea*, *P.*
411 *syringae*, *V. dahlia*, *Colletotrichum* sp. and *C. graminicola* (23,67,70). The
412 jasmonate and salicylate pathways were activated, and ROS and Green Leaf
413 Volatiles-(GLVs) (23,67,70) were generated, independently of cell death, although
414 VdCP1 induced HR markers genes HSR203J and HIN1 at high protein concentration
415 (up to 200 μ M), at which necrosis ensued (67). However, not all CPs activate a plant
416 response, as is the case for infiltration with CtCP from *Colletotrichum truncatum*,
417 MpCP1 from *Moniliophthora perniciosa* and snodprot from *Dactylellina cionopaga*,
418 which fail to induce cell death or any other type of immunity (50,75,76) possibly due
419 to the experimental design employed, or the proteins target not being reached (15).

420 **Immunity to swollenins.** To the best of our knowledge, there is only one reported
421 case of plant immunity to swollenins. TasSWO (from *T. asperellum*) CBM domain
422 infiltration in cucumber did not show phytotoxic symptoms, but did induce a plant
423 chitinase and a plant β -glucanase that protected leaves against *B. cinerea* and
424 *Pseudomonas syringae* infection (18). Because authors also used a synthetic 36-

425 mer peptide of the CBM that simulated the defense response, they concluded that it
426 was recognized by the plant as a MAMP, triggering PTI (18).

427 **Expansin-related proteins in microbial development**

428 **Expansins.** As mentioned before, expansin-related proteins are found in organisms
429 with different lifestyles, although most of them interact with plants at some point
430 during their life cycle (26,28). However, expansin-related function could be important
431 beyond plant-microbe interactions, as evidenced by a need for expansin-related
432 activity during microbial development (26). Furthermore, some microbes genomes
433 encode several expansin-related genes with developmentally-dependent expression
434 patterns (28,43).

435 In the case of bacterial expansins it is known that EXLX1 from *B. subtilis* binds
436 peptidoglycan apparently without modifying it, because the quantity and structure of
437 muropeptides are indistinguishable from the wild type strain, although peptidoglycan
438 breakdown promoted by EXLX1 may occur under certain circumstances as the
439 mutant cells are slightly more resistant to autolysis (4). Additionally, *Pectobacterium*
440 Exl1 protein seems to have a role during swarming motility observed in semisolid
441 MacConkey medium given the delay in tendrill projections showed by a mutant strain
442 in *P. atrosepticum*, while its overexpression results in faster invasion of the medium
443 (6). This observation, together with the protein being found in the pellet of cultured
444 cells after centrifugation, indicates an interaction of Exl1 with the bacterial exterior,
445 possibly with exopolysaccharides, and probably modifying the hydrodynamics of the
446 cell surface for proper swarming, a process with high humidity requirements. How

447 these phenotypes relate to the interaction with plant hosts is unclear, but the fact
448 that EXLX1 from *B. subtilis* and Exl1 from *Pectobacterium* are representatives of
449 basic and acidic expansins, which in turn are produced mainly by Gram positive or
450 Gram negative species, respectively, reinforces the idea that expansins have targets
451 in their own cell wall (44).

452 Fungal expansins, such as Exlx1 from *S. commune*, bind cellulose, birchwood xylan
453 and chitin. Some reports show that pre-treatment of chitin with ScExlx1 before
454 chitinase addition, enhanced the release of N-acetylglucosamine in contrast with
455 non-pretreated chitin, indicating that ScExlx1 is capable of modifying the chitin
456 polymer, and hence suggesting a role in remodeling their own cell wall (77). In the
457 case of the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor*, transcriptomic experiments
458 showed that Exp1 is expressed at early stages of ectomycorrhizal development (2-
459 4 weeks) and is located in the fungal cell wall of the Hartig net and mantle hyphae
460 formed during the mycorrhizal establishment, suggesting a possible activity on
461 fungal cell walls (78).

462 Developmental expression of expansins EXPB1 and EXPB2 was documented for
463 the plant parasite *H. avenae*. EXPB1 and EXPB2 are synthesized in the subventral
464 esophageal glands of the nematode (79), and between growth stages expansins are
465 differentially expressed: *HaEXPB1* transcripts were more abundant in pre-parasitic
466 second stage juveniles (80), whereas *HaEXPB2* was expressed at the stages of egg,
467 pre-parasitic second-stage juvenile and parasitic second-, third- and fourth-stage
468 juvenile, with highest expression levels in parasitic second-stage juveniles,

469 indicating that nematode expansins play important roles during the early stages of
470 parasitism (7).

471 ***Cerato-platanins***. Because of their chitin-binding activity, CPs could be involved in
472 the remodeling of the fungal cell wall, as they can be detected in the cell walls of
473 ascospores, conidia and hyphae (81), and also present strong expression during
474 hyphal growth (82). Most fungi (58.7%) encode only one CP gene, and species with
475 more may have between 2 to 12 genes (42,83). The single CP gene of certain fungi
476 is expressed at different growth phases, for instance spore formation and during
477 hyphal growth in *Ceratocystis Platani* (84), and traps and conidia phases in
478 *Dactylellina cionopaga* (76). VdCP1 from *Verticillium dahlia*, was expressed at basal
479 levels in un-germinated conidia, but increased during the early infection of cotton
480 stems, reaching higher levels at late infection stages (17). Fungi with multiple CP
481 genes express them at different stages and at different levels. In the case of *B.*
482 *cinerea*, the Spl1 gene is expressed during spore germination, mycelium growth and
483 initial infection symptoms, and peaks at late infection. The *B. cinerea* second CP
484 gene, Spl2, has undetectable expression (15). *T. atroviride* contains three genes,
485 EPL1, EPL2 and EPL3, with clear differential expression pattern: EPL1 during hyphal
486 growth, EPL2 during spore formation, with EPL3 remaining undetected (53). This
487 indicates a role for CPs in fungal growth and during plant interaction and suggests
488 that CPs could play particular functions during the fungus life cycle (Figure 4A).
489 *Moniliophthora pernicioso* represents an illustrative case for possible specialized
490 function for CPs, given that its 12 CPs seem to have evolved to accomplish distinct
491 functions during its life cycle (50): the MpCP1 transcript is exclusively expressed

492 during basidiocarp formation, MpCP4 and MpC11 during the basidiospore phase,
493 MpCP4, MpCP5, MpCP11 and MpCP12 in the slow-growing biotrophic phase, but
494 declining with the disease progression, at which phase, MpCP5 can block the NAG6-
495 induced plant defense response contributing to the successful plant colonization.
496 MpCP2, MpCP3 and MpCP7 were expressed at the necrotrophic stage where
497 MpCP2 loosens the plant cell wall and facilitates germination, and the MpCP2 and
498 MpCP3 genes were also expressed in necrotically-infected seeds and fruit. For
499 MpCP6, 7, 8, 9 and 10 no significant gene expression was detected. Nevertheless,
500 the function of each gene is not yet totally established (50) (Figure 4B). Finally, to this
501 date, no functions for swollenins on the fungal cell wall have been reported.

502 **Conclusions and outlook**

503 Microbial expansins, swollenins and cerato-platanins have attracted growing
504 attention during recent years due to their involvement in plant-microbe interactions.
505 The precise mechanisms of action of these proteins are yet to be fully described, but
506 it is likely that they employ their expansin domain to perform rearrangements on the
507 plant cell wall to facilitate microorganism's interaction with their hosts. It is worth
508 studying species with more than one gene of each of the expansin-related proteins
509 to determine whether these proteins have specialized functions, such as those of *M.*
510 *perniciosa* (50), and to determine how single gene species regulate different
511 developmental processes.

512 Perhaps an attractive feature of expansin-like proteins is the protective effect they
513 can provide to plants against pathogenic microorganisms by triggering plant immune

514 responses. Studying plant receptors involved in the perception of expansin-related
515 proteins effect will unravel their nature as MAMPs, or effectors that release DAMPs
516 during interaction with hosts cell wall, which has been subject of discussion in the
517 past years for CPs (26,56). Further research on this aspect of expansin-related
518 proteins could open the pathway towards exploiting their biotechnological potential
519 as possible biocontrol agents.

520 **Acknowledgments.**

521 D.N.-B. received a scholarship from CONACYT. C. M.-A. projects are financed by
522 grants from UNAM DGAPA-PAPIIT (IN211116 and IN211019) and CONACYT
523 Ciencia Básica (252551). MS laboratory is supported by funds from UNAM DGAPA-
524 PAPIIT (grant IN203720).

525 **Declaration of Competing Interest**

526 We declare no conflict of interest.

527 **References**

- 528 1. Hardoim PR, van Overbeek LS, Berg G, Pirttilä AM, Compant S, Campisano
529 A, et al. The Hidden World within Plants: Ecological and Evolutionary
530 Considerations for Defining Functioning of Microbial Endophytes. *Microbiol*
531 *Mol Biol Rev.* 2015 Sep;79(3):293–320. DOI: 10.1128/MMBR.00050-14
- 532 2. Phelan V V, Liu W-T, Pogliano K, Dorrestein PC. Microbial metabolic
533 exchange-the chemotype-to-phenotype link. *Nat Chem Biol.* 2012;8(1):26–

534 35. DOI: 10.1038/nchembio.739

535 3. Nadal Jimenez P, Koch G, Thompson JA, Xavier KB, Cool RH, Quax WJ.
536 The Multiple Signaling Systems Regulating Virulence in *Pseudomonas*
537 *aeruginosa*. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2012;1;76(1):46–65. DOI:
538 10.1128/MMBR.05007-11

539 4. Kerff F, Amoroso A, Herman R, Sauvage E, Petrella S, Filée P, et al. Crystal
540 structure and activity of *Bacillus subtilis* YoaJ (EXLX1), a bacterial expansin
541 that promotes root colonization. *Proc Natl Acad Sci U S A.*
542 2008;105(44):16876–81. DOI: 10.1073/pnas.0809382105

543 5. Tancos MA, Lowe-Power TM, Peritore-Galve FC, Tran TM, Allen C, Smart
544 CD. Plant-like bacterial expansins play contrasting roles in two tomato
545 vascular pathogens. *Mol Plant Pathol.* 2018;19(5):1210–21. DOI:
546 10.1111/mpp.12611

547 6. Narváez-Barragán DA, Tovar-herrera OE, Torres M, Rodríguez M, Hum S,
548 Ian KT, et al. Expansin-like Exl1 from *Pectobacterium* is a virulence factor
549 required for host infection, and induces a defence plant response involving
550 ROS, and jasmonate, ethylene and salicylic acid signalling pathways in
551 *Arabidopsis thaliana*. 2020;10(1):1–14. DOI: 10.1038/s41598-020-64529-9

552 7. Liu J, Peng H, Cui J, Huang W, Kong L, Clarke JL, et al. Molecular
553 Characterization of A Novel Effector Expansin-like Protein from *Heterodera*
554 *avenae* that Induces Cell Death in *Nicotiana benthamiana*. *Sci Rep.*

555 2016;(6):35677. DOI: 10.1038/srep35677

556 8. Georgelis N, Nikolaidis N, Cosgrove DJ. Bacterial expansins and related
557 proteins from the world of microbes. *Appl Microbiol Biotechnol.*
558 2015;99(9):3807–23. DOI: 10.1007/s00253-015-6534-0

559 9. Pazzagli L, Cappugi G, Cappugi G, Manao G, Manao G, Camici G, et al.
560 Purification, Characterization, and Amino Acid Sequence of Cerato-platanin,
561 a New Phytotoxic Protein from. *Mol Biol.* 1999;274(35):24959–64. DOI:
562 10.1074/jbc.274.35.24959

563 10. Santos CA, Ferreira-Filho JA, O'Donovan A, Gupta VK, Tuohy MG, Souza
564 AP. Production of a recombinant swollenin from *Trichoderma harzianum* in
565 *Escherichia coli* and its potential synergistic role in biomass degradation.
566 *Microb Cell Fact.* 2017;16(1):83. DOI: 10.1186/s12934-017-0697-6

567 11. Meng X, Miao Y, Liu Q, Ma L, Guo K, Liu D, et al. TgSWO from *Trichoderma*
568 *guizhouense* NJAU4742 promotes growth in cucumber plants by modifying
569 the root morphology and the cell wall architecture. *Microb Cell Fact.*
570 2019;18(1):148. DOI: 10.1186/s12934-019-1196-8

571 12. Rocha J, Shapiro LR, Kolter R. A horizontally acquired expansin gene
572 increases virulence of the emerging plant pathogen *Erwinia tracheiphila*.
573 *bioRxiv.* 2019;1;681643. DOI: <https://doi.org/10.1101/681643>

574 13. Ingel B, Jeske DR, Sun Q, Grosskopf J, Roper MC. *Xylella fastidiosa*
575 endoglucanases mediate the rate of pierce's disease development in *Vitis*

- 576 vinifera in a cultivar-dependent manner. Mol Plant-Microbe Interact.
577 2019;32(10):1402–14. DOI: 10.1094/MPMI-04-19-0096-R
- 578 14. Jahr H, Dreier J, Meletzus D, Bahro R, Eichenlaub R. The endo-beta-1,4-
579 glucanase CelA of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* is a
580 pathogenicity determinant required for induction of bacterial wilt of tomato.
581 Mol Plant Microbe Interact. 2000;13(7):703–14. DOI:
582 10.1094/MPMI.2000.13.7.703
- 583 15. Frías M, González C, Brito N. BcSpl1, a cerato-platanin family protein,
584 contributes to *Botrytis cinerea* virulence and elicits the hypersensitive
585 response in the host. New Phytol. 2011;192(2):483–95. DOI: 10.1111/j.1469-
586 8137.2011.03802.x
- 587 16. Jeong JS, Mitchell TK, Dean RA. The *Magnaporthe grisea* snodprot1
588 homolog, MSP1, is required for virulence. FEMS Microbiol Lett. 2007;
589 273(2):157-165. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2007.00796.x
- 590 17. Zhang Y, Gao Y, Liang Y, Dong Y, Yang X, Yuan J, et al. The verticillium
591 *dahliae* snodprot1-like protein VdCP1 contributes to virulence and triggers
592 the plant immune system. Front Plant Sci. 2017;8:1–13. DOI:
593 10.3389/fpls.2017.01880
- 594 18. Brotman Y, Briff E, Viterbo A, Chet I. Role of Swollenin, an Expansin-Like
595 Protein from *Trichoderma*, in Plant Root Colonization. Plant Physiol.
596 2008;147(2):779–89. DOI: 10.1104/pp.108.116293

- 597 19. Wang T, Park YB, Caporini MA, Rosay M, Zhong L, Cosgrove DJ, et al.
598 Sensitivity-enhanced solid-state NMR detection of expansin's target in plant
599 cell walls. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(41):16444–9. DOI:
600 10.1073/pnas.1316290110.
- 601 20. Lombardi L, Faoro F, Luti S, Baccelli I, Martellini F, Bernardi R, et al.
602 Differential timing of defense-related responses induced by cerato-platanin
603 and cerato-populin, two non-catalytic fungal elicitors. *Physiol Plant*. 2013;
604 149(3):408-421. DOI: 10.1111/ppl.12041
- 605 21. Martellini F, Faoro F, Carresi L, Pantera B, Baccelli I, Maffi D, et al. Cerato-
606 populin and cerato-platanin, two non-catalytic proteins from phytopathogenic
607 fungi, interact with hydrophobic inanimate surfaces and leaves. *Mol*
608 *Biotechnol*. 2013; 55(1):27-42. DOI: 10.1007/s12033-012-9618-4
- 609 22. Yang Y, Zhang H, Li G, Li W, Wang X, Song F. Ectopic expression of
610 MgSM1, a Cerato-platanin family protein from *Magnaporthe grisea*, confers
611 broad-spectrum disease resistance in *Arabidopsis*. *Plant Biotechnol J*.
612 2009;7(8):763–77. DOI: 10.1111/j.1467-7652.2009.00442.x
- 613 23. Vargas WA, Djonović S, Sukno SA, Kenerley CM. Dimerization controls the
614 activity of fungal elicitors that trigger systemic resistance in plants. *J Biol*
615 *Chem*. 2008;283(28):19804–15. DOI: 10.1074/jbc.M802724200
- 616 24. Li S, Dong Y, Li L, Zhang Y, Yang X, Zeng H, et al. The Novel Cerato-
617 Platanin-Like Protein FocCP1 from *Fusarium oxysporum* Triggers an

- 618 Immune Response in Plants. *Int J Mol Sci.* 2019; 20(10):2849. DOI:
619 10.3390/ijms20112849
- 620 25. Frías M, Brito N, González M, González C. The phytotoxic activity of the
621 cerato-platanin BcSpl1 resides in a two-peptide motif on the protein surface.
622 *Mol Plant Pathol.* 2014;15(4):342-351. DOI: 10.1111/mpp.12097
- 623 26. Pazzagli L, Seidl-Seiboth V, Barsottini M, Vargas WA, Scala A, Mukherjee
624 PK. Cerato-platanins: Elicitors and effectors. *Plant Sci.* 2014;(228):79–87.
625 DOI: 10.1016/j.plantsci.2014.02.009
- 626 27. Cosgrove DJ. Plant expansins: Diversity and interactions with plant cell
627 walls. *Curr Opin Plant Biol.* 2015;(25):162–72. DOI:
628 10.1016/j.pbi.2015.05.014
- 629 28. Chase, William R.; Zhaxybayeva, Olga.; Rocha, Jorge.; Cosgrove, Daniel J.;
630 Shapiro L. Global cellulose biomass, horizontal gene transfers and domain
631 fusions drive microbial expansin evolution. *New Phytol.* 2020;(226):921–38.
632 DOI: doi:10.1111/nph.16428
- 633 29. Olarte-Lozano M, Mendoza-Nuñez MA, Pastor N, Segovia L, Folch-Mallol J,
634 Martínez-Anaya C. PcExl1 a novel acid expansin-like protein from the plant
635 pathogen *Pectobacterium carotovorum*, binds cell walls differently to
636 BsEXLX1. *PLoS One.* 2014;9(4):e95638. DOI:
637 10.1371/journal.pone.0095638
- 638 30. Georgelis N, Tabuchi A, Nikolaidis N, Cosgrove DJ. Structure-function

- 639 analysis of the bacterial expansin EXLX1. *J Biol Chem.* 2011;
640 286(19):16814-16823. DOI: 10.1074/jbc.M111.225037
- 641 31. Georgelis N, Nikolaidis N, Cosgrove DJ. Biochemical analysis of expansin-
642 like proteins from microbes. *Carbohydr Polym.* 2014;(100):17–23. DOI:
643 10.1016/j.carbpol.2013.04.094
- 644 32. Price DC, Chan CX, Yoon HS, Yang EC, Qiu H, Weber APM, et al.
645 *Cyanophora paradoxa* genome elucidates origin of photosynthesis in algae
646 and plants. *Science.* 2012;843-847. DOI: 10.1126/science.1213561
- 647 33. Darley CP, Li Y, Schaap P, McQueen-Mason SJ. Expression of a family of
648 expansin-like proteins during the development of *Dictyostelium discoideum*.
649 *FEBS Letters.* 2003;546(2-3):416-418. DOI: 10.1016/S0014-5793(03)00598-
650 2
- 651 34. Lofgren LA, LeBlanc NR, Certano AK, Nachtigall J, LaBine KM, Riddle J, et
652 al. *Fusarium graminearum*: pathogen or endophyte of North American
653 grasses?. *New Phytol.* 2018;217(3):1203-1212. DOI: 10.1111/nph.14894
- 654 35. Neil RB, Hite D, Kelrick MI, Lockhart ML, Lee K. Myxobacterial biodiversity in
655 an established oak-hickory forest and a savanna restoration site. *Curr*
656 *Microbiol.* 2005;50(2):88-95. DOI: 10.1007/s00284-004-4406-4
- 657 36. Loria R, Kers J, Joshi M. Evolution of Plant Pathogenicity in *Streptomyces*.
658 *Annu Rev Phytopathol.* 2006;(44):469-487. DOI:
659 10.1146/annurev.phyto.44.032905.091147

- 660 37. Bae C, Han SW, Song YR, Kim BY, Lee HJ, Lee JM, et al. Infection
661 processes of xylem-colonizing pathogenic bacteria: possible explanations for
662 the scarcity of qualitative disease resistance genes against them in crops.
663 Theoretical and Applied Genetics. 2015.128(7):1219-1229. DOI:
664 10.1007/s00122-015-2521-1
- 665 38. Smillie CS, Smith MB, Friedman J, Cordero OX, David LA, Alm EJ. Ecology
666 drives a global network of gene exchange connecting the human
667 microbiome. Nature. 2011;(480):241-244. DOI: 10.1038/nature10571
- 668 39. Morris JL, Puttick MN, Clark JW, Edwards D, Kenrick P, Pressel S, et al. The
669 timescale of early land plant evolution. Proc Natl Acad Sci U S A. 2018;
670 115(10):E2274-E2283. DOI: 10.1073/pnas.1719588115
- 671 40. McDonald BR, Currie CR. Lateral gene transfer dynamics in the ancient
672 bacterial genus *Streptomyces*. MBio. 2017; 8 (3):e00644-17. DOI:
673 10.1128/mBio.00644-17
- 674 41. Kikuchi T, Li H, Karim N, Kennedy MW, Moens M, Jones JT. Identification of
675 putative expansin-like genes from the pine wood nematode,
676 *Bursaphelenchus xylophilus*, and evolution of the expansin gene family
677 within the Nematoda. Nematology. 2009;11(3):355-364. DOI:
678 10.1163/156854109X446953
- 679 42. Chen H, Kovalchuk A, Keriö S, Asiegbu FO. Distribution and bioinformatic
680 analysis of the cerato-platanin protein family in *Dikarya*. Mycologia.

- 681 2013;105(6):1479-1488. DOI: 10.3852/13-115
- 682 43. Nikolaidis N, Doran N, Cosgrove DJ. Plant expansins in bacteria and fungi:
683 Evolution by horizontal gene transfer and independent domain fusion. *Mol*
684 *Biol Evol.* 2014;31(2):376–86. DOI: 10.1093/molbev/mst206
- 685 44. Pastor N, Sonia D, Ernesto P, Segovia L, Mart C. Electrostatic analysis of
686 bacterial expansins. 2014;83(2):1–9. DOI: 10.1002/prot.24718
- 687 45. Silveira RL, Skaf MS. Molecular dynamics of the *Bacillus subtilis* expansin
688 EXLX1: interaction with substrates and structural basis of the lack of activity
689 of mutants. *Phys Chem Chem Phys.* 2016;(18):3510–21. DOI:
690 10.1039/C5CP06674C
- 691 46. Tovar-Herrera OE, Rodríguez M, Olarte-Lozano M, Sampedro-Guerrero JA,
692 Guerrero A, Pinto-Cámara R, et al. Analysis of the Binding of Expansin Exl1,
693 from *Pectobacterium carotovorum*, to Plant Xylem and Comparison to
694 EXLX1 from *Bacillus subtilis*. *ACS Omega.* 2018;3(6). DOI:
695 10.1021/acsomega.8b00406
- 696 47. Pazzagli L, Cappugi G, Manao G, Camici G, Santini A, Scala A. Purification,
697 characterization, and amino acid sequence of cerato- platanin, a new
698 phytotoxic protein from *Ceratocystis fimbriata* f. sp. platani. *J Biol Chem.*
699 1999; 274(35):24959-24964. DOI: 10.1074/jbc.274.35.24959
- 700 48. Luti S, Martellini F, Bemporad F, Mazzoli L, Paoli P, Pazzagli L. A single
701 amino acid mutation affects elicitor and expansins-like activities of cerato-

- 702 platanin, a non-catalytic fungal protein. PLoS One. 2017;12(5):1–18. DOI:
703 10.1371/journal.pone.0178337
- 704 49. De Oliveira AL, Gallo M, Pazzagli L, Benedetti CE, Cappugi G, Scala A, et al.
705 The structure of the elicitor cerato-platanin (CP), the first member of the CP
706 fungal protein family, reveals a double $\psi\beta$ -barrel fold and carbohydrate
707 binding. J Biol Chem. 2011;286(20):17560–8. DOI:
708 10.1074/jbc.M111.223644
- 709 50. de O. Barsottini MR, de Oliveira JF, Adamoski D, Teixeira PJPL, do Prado
710 PF V., Tiezzi HO, et al. Functional Diversification of Cerato-Platanins in
711 *Moniliophthora perniciosa* as Seen by Differential Expression and Protein
712 Function Specialization. Mol Plant-Microbe Interact. 2013; 26(11):1281-1293.
713 DOI: 10.1094/mpmi-05-13-0148-r
- 714 51. Baccelli I, Luti S, Bernardi R, Scala A, Pazzagli L. Cerato-platanin shows
715 expansin-like activity on cellulosic materials. Appl Microbiol Biotechnol.
716 2013;98(1):175–84. DOI: 10.1007/s00253-013-4822-0
- 717 52. Baccelli I. Cerato-platanin family proteins: One function for multiple biological
718 roles? Front Plant Sci. 2015;(5):2013–6. DOI: 10.3389/fpls.2014.00769
- 719 53. Frischmann A, Neudl S, Gaderer R, Bonazza K, Zach S, Gruber S, et al.
720 Self-assembly at Air/Water Interfaces and Carbohydrate Binding Properties
721 of the Small Secreted Protein EPL1 from the fungus *Trichoderma atroviride*.
722 J Biol Chem. 2013;288(6):4278–87. DOI: 10.1074/jbc.M112.427633

- 723 54. Chen H, Kovalchuk A, Keriö S, Asiegbu FO. Distribution and bioinformatic
724 analysis of the cerato-platanin protein family in Dikarya. *Mycologia*.
725 2013;105(6):1479–88. DOI: 10.3852/13-115
- 726 55. Carresi L, Pantera B, Zoppi C, Cappugi G, Oliveira AL, Pertinhez TA, et al.
727 Cerato-platanin, a phytotoxic protein from *Ceratocystis fimbriata*: Expression
728 in *Pichia pastoris*, purification and characterization. *Protein Expr Purif*. 2006;
729 49(2):159-167. DOI: 10.1016/j.pep.2006.07.006
- 730 56. Luti S, Sella L, Quarantin A, Pazzagli L, Baccelli I. Twenty years of research
731 on cerato-platanin family proteins: clues, conclusions, and unsolved issues.
732 *Fungal Biology Reviews*. 2019;34(1):13–24. DOI: 10.1016/j.fbr.2019.10.001
- 733 57. Saloheimo M, Paloheimo M, Hakola S, Pere J, Swanson B, Nyysönen E, et
734 al. Swollenin, a *Trichoderma reesei* protein with sequence similarity to the
735 plant expansins, exhibits disruption activity on cellulosic materials. *Eur J*
736 *Biochem*. 2002;(269): 4202-4211. DOI: 10.1046/j.1432-1033.2002.03095.x
- 737 58. Mansfield J, Genin S, Magori S, Citovsky V, Sriariyanum M, Ronald P, et al.
738 Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology. *Mol Plant*
739 *Pathol*. 2012;13(6):614–29. DOI: 10.1111/j.1364-3703.2012.00804.x
- 740 59. Hayward AC. Biology and Epidemiology of Bacterial Wilt Caused by
741 *Pseudomonas Solanacearum*. *Annu Rev Phytopathol*. 1991;29(1):65–87.
742 DOI: 10.1146/annurev.py.29.090191.000433
- 743 60. Tancos MA, Lowe-Power TM, Peritore-Galve FC, Tran TM, Allen C, Smart

- 744 CD. Plant-like bacterial expansins play contrasting roles in two tomato
745 vascular pathogens. *Mol Plant Pathol.* 2017;19(5):1210-1221. DOI:
746 10.1111/mpp.12611
- 747 61. Pérombelon MCM. Potato diseases caused by soft rot erwinias: An overview
748 of pathogenesis. *Plant Pathol.* 2002;51(1):1–12. DOI: 10.1046/j.0032-
749 0862.2001.Shorttitle.doc.x
- 750 62. Toth IK, Bell K, Holeva MC, Birch PRJ. Soft rot erwiniae: from genes to
751 genomes. *Mol Plant Pathol.* 2003;4(1):17–30. DOI: 10.1046/j.1364-
752 3703.2003.00149.x
- 753 63. Narváez-Barragán DA, de Sandozequi A, Rodríguez M, Estrada K, Tovar-
754 Herrera OE, Martínez-Anaya C. Analysis of two Mexican *Pectobacterium*
755 *brasiliense* strains reveals an inverted relationship between c-di-GMP levels
756 with exopolysaccharide production and swarming motility. *Microbiol Res.*
757 2020;(235):126427. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126427>
- 758 64. Tancos MA, Chalupowicz L, Barash I, Manulis-Sasson S, Smart CD. Tomato
759 Fruit and Seed Colonization by *Clavibacter michiganensis* subsp.
760 *michiganensis* through External and Internal Routes. *Appl Environ Microbiol.*
761 2013;79(22):6948–57. DOI: 10.1128/AEM.02495-13
- 762 65. Bais HP, Fall R, Vivanco JM. Biocontrol of *Bacillus subtilis* against Infection
763 of *Arabidopsis* Roots by *Pseudomonas syringae* Is Facilitated by Biofilm
764 Formation and Surfactin Production. *Plant Physiol.* 2004;134(1):307–19.

765 DOI: 10.1104/pp.103.028712

766 66. Dean R, Van Kan JAL, Pretorius ZA, Hammond-Kosack KE, Di Pietro A,
767 Spanu PD, et al. The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology.
768 Mol Plant Pathol. 2012;13(4):414–30. DOI: 10.1111/j.1364-
769 3703.2011.00783.x

770 67. Zhang Y, Gao Y, Liang Y, Dong Y, Yang X, Yuan J, et al. The *Verticillium*
771 *dahliae* SnodProt1-Like Protein VdCP1 Contributes to Virulence and Triggers
772 the Plant Immune System. Front Plant Sci. 2017;(8):1880. DOI:
773 10.3389/fpls.2017.01880

774 68. Wilson LM, Idnurm A, Howlett BJ. Characterization of a gene (sp1) encoding
775 a secreted protein from *Leptosphaeria maculans*, the blackleg pathogen of
776 *Brassica napus*. Mol Plant Pathol. 2002; 3(6):487-493. DOI: 10.1046/j.1364-
777 3703.2002.00144.x

778 69. Quarantin A, Glasenapp A, Schäfer W, Favaron F, Sella L. Involvement of
779 the *Fusarium graminearum* cerato-platanin proteins in fungal growth and
780 plant infection. Plant Physiol Biochem. 2016;(109):220-229. DOI:
781 10.1016/j.plaphy.2016.10.001

782 70. Djonović S, Pozo MJ, Dangott LJ, Howell CR, Kenerley CM. Sm1, a
783 Proteinaceous Elicitor Secreted by the Biocontrol Fungus *Trichoderma virens*
784 Induces Plant Defense Responses and Systemic Resistance. Mol Plant-
785 Microbe Interact. 2006;19(8):838-853. DOI: 10.1094/mpmi-19-0838

- 786 71. Ali S, Magne M, Chen S, Côté O, Stare BG, Obradovic N, et al. Analysis of
787 putative apoplast effectors from the nematode, *Globodera rostochiensis*,
788 and identification of an expansin-like protein that can induce and suppress
789 host defenses. *PLoS One*. 2015;10(1):e0115042. DOI:
790 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0115042>
- 791 72. Fontana F, Santini A, Salvini M, Pazzagli L, Cappugi G, Scala A, et al.
792 Cerato-platanin treated plane leaves restrict *ceratocystis platani* growth and
793 overexpress defence-related genes. *J Plant Pathol*. 2008;90(2):295–306.
794 DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0100959>
- 795 73. Frías M, Brito N, González C. The *Botrytis cinerea* cerato-platanin BcSpl1 is
796 a potent inducer of systemic acquired resistance (SAR) in tobacco and
797 generates a wave of salicylic acid expanding from the site of application.
798 2013;(14):191–6. DOI: 10.1111/j.1364-3703.2012.00842.x
- 799 74. Vieira P, Nemchinov LG. An Expansin-Like Candidate Effector Protein from
800 *Pratylenchus penetrans* Modulates Immune Responses in *Nicotiana*
801 *benthamiana*. *Phytopathology*. 2020;110(3):684–93. DOI: 10.1094/PHYTO-
802 09-19-0336-R
- 803 75. Bhadauria V, Banniza S, Vandenberg A, Selvaraj G, Wei Y. EST mining
804 identifies proteins putatively secreted by the anthracnose pathogen
805 *Colletotrichum truncatum*. *BMC Genomics*. 2011;(12)327. DOI:
806 10.1186/1471-2164-12-327

- 807 76. YU H, DUAN J, WANG B, JIANG X. The Function of Snodprot in the Cerato-
808 Platanin Family from *Dactylellina cionopaga* in Nematophagous Fungi. *Biosci*
809 *Biotechnol Biochem.* 2012;76(10):1835-1842. DOI: 10.1271/bbb.120173
- 810 77. Tovar-Herrera OE, Batista-García RA, Sánchez-Carbente MDR, Iracheta-
811 Cárdenas MM, Arévalo-Niño K, Folch-Mallof JL. A novel expansin protein
812 from the white-rot fungus *Schizophyllum commune*. *PLoS One.*
813 2015;10(3):1–17. DOI: 10.1371/journal.pone.0122296
- 814 78. Veneault-Fourrey C, Commun C, Kohler A, Morin E, Balestrini R, Plett J, et
815 al. Genomic and transcriptomic analysis of *Laccaria bicolor* CAZome reveals
816 insights into polysaccharides remodelling during symbiosis establishment.
817 *Fungal Genet Biol.* 2014;(72):168–81. DOI: 10.1016/j.fgb.2014.08.007
- 818 79. Qin L, Kudla U, Roze EHA, Goverse A, Popeijus H, Nieuwland J, et al. A
819 nematode expansin acting on plants. *Nature.* 2004;427(6969):30. DOI:
820 10.1038/427030a
- 821 80. Long H, Peng D, Huang W, Liu Y, Peng H. Identification of a putative
822 expansin gene expressed in the subventral glands of the cereal cyst
823 nematode *Heterodera avenae*. *Nematology.* 2012;14(5):571-577. DOI:
824 10.1163/156854111X614674
- 825 81. Boddi S, Comparini C, Calamassi R, Pazzagli L, Cappugi G, Scala A.
826 Cerato-platanin protein is located in the cell walls of ascospores, conidia and
827 hyphae of *Ceratocystis fimbriata* f. sp. *platani*. *FEMS Microbiol Lett.* 2004;

828 233(2):341-346. DOI: 10.1016/j.femsle.2004.03.001

829 82. Gaderer R, Bonazza K, Seidl-Seiboth V. Cerato-platanins: A fungal protein
830 family with intriguing properties and application potential. Appl Microbiol
831 Biotechnol. 2014;98(11):4795–803. DOI: 10.1007/s00253-014-5690-y

832 83. Nordberg H, Cantor M, Dusheyko S, Hua S, Poliakov A, Shabalov I, et al.
833 The genome portal of the Department of Energy Joint Genome Institute:
834 2014 updates. Nucleic Acids Res. 2014;42(Database issue):D26-D31. DOI:
835 10.1093/nar/gkt1069

836 84. Baccelli I, Comparini C, Bettini PP, Martellini F, Ruocco M, Pazzagli L, et al.
837 The expression of the cerato-platanin gene is related to hyphal growth and
838 chlamydospores formation in *Ceratocystis platani*. FEMS Microbiol Lett.
839 2012;327(2):155-163. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2011.02475.x

840

841 **Figure legends**

842 **Figure 1.** Representative structures of expansin-related proteins. **A)**

843 Tridimensional structure (PDB: 3D30) of EXLX1, a representative bacterial

844 expansin from *B. subtilis*. **B)** Tridimensional structure (PDB: 2KQA) of the cerato

845 platanin of *Ceratocystis platani*, a fungal representative of CPs. **C)** Tridimensional

846 model for swollenin SWO1 from *Trichoderma reesei*. Important residues are

847 emphasized: D1 shows active aspartate in red and neighboring polar residues in

848 purple; D2 shows aromatic residues involved in binding to cellulose in purple.

849 **Figure 2.** Diversity of expansin-related proteins in plant microbe interactions and
850 their suggested biological role. Depending of their lifestyle, microbes interact with
851 different parts of the plant, in which expansin-related proteins participate to
852 successfully colonize their tissues, stablishing beneficial, neutral or pathogenic
853 relationships with their hosts. The most studied examples of expansin-related
854 activity are from pathogens that colonize aerial parts of the plants. Where the
855 secreted expansin-like proteins (green dots among cells, right) allow movement of
856 the microorganisms through the apoplast, possibly by remodeling of the plant cell
857 wall.

858 **Figure 3.** Expansin-related proteins induce different plant responses. Plant
859 treatment with expansins (blue), CPs (white) or swollenin (yellow) has any of two
860 consequences: a) it provokes a type of immunity resembling ETI involving ROS,
861 ET-, JA- and SA-signaling pathways, in some cases followed by HR, and acquired
862 protection to pathogens, or b) fails to trigger immunity. (*) only the CBM domain of
863 TasSWO was studied in the induction of plant defense response.

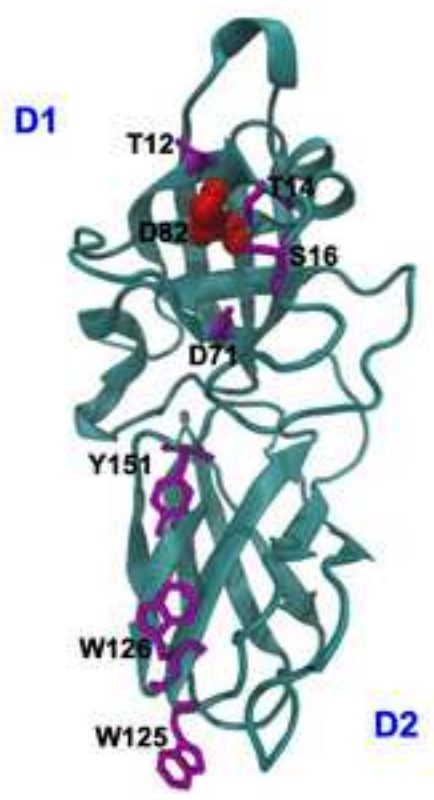
864 **Figure 4.** Cerato-platatin expression through fungal life cycles. **A)** Fungi that
865 encode up to three CPs, show differential gene expression at distinct
866 developmental stages. Some CPs are expressed independently of microbe
867 interaction with plants (for instance CP, snodprot, Epl1 and Epl2); other CPs are
868 expressed during fungal development and infection (BcSpl1, for example);
869 meanwhile some CPs are expressed only during infection (VdCP1), showing
870 variable levels of expression at different infection stages (indicated with an arrow).
871 **B)** *M. perniciosa* twelve CP genes are developmentally regulated: MpCP1 is

872 detected during basidiocarp formation, whereas MpCP4 and MpCP11 are
873 expressed in the basidiospore. During initial interaction with the host, MpCP4,
874 MpCP5, MpCP11 and MpCP12 are expressed. As infection progresses, MpCP2,
875 MpCP3 and MpCP7 expression follows. At late infection stage MpCP2 and MpCP3
876 are expressed.

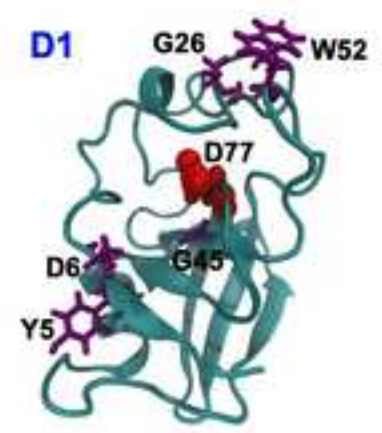
CONFIDENTIAL



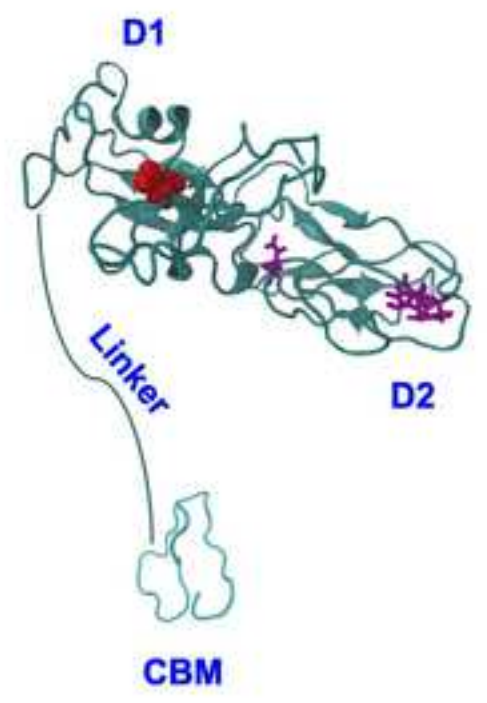
A

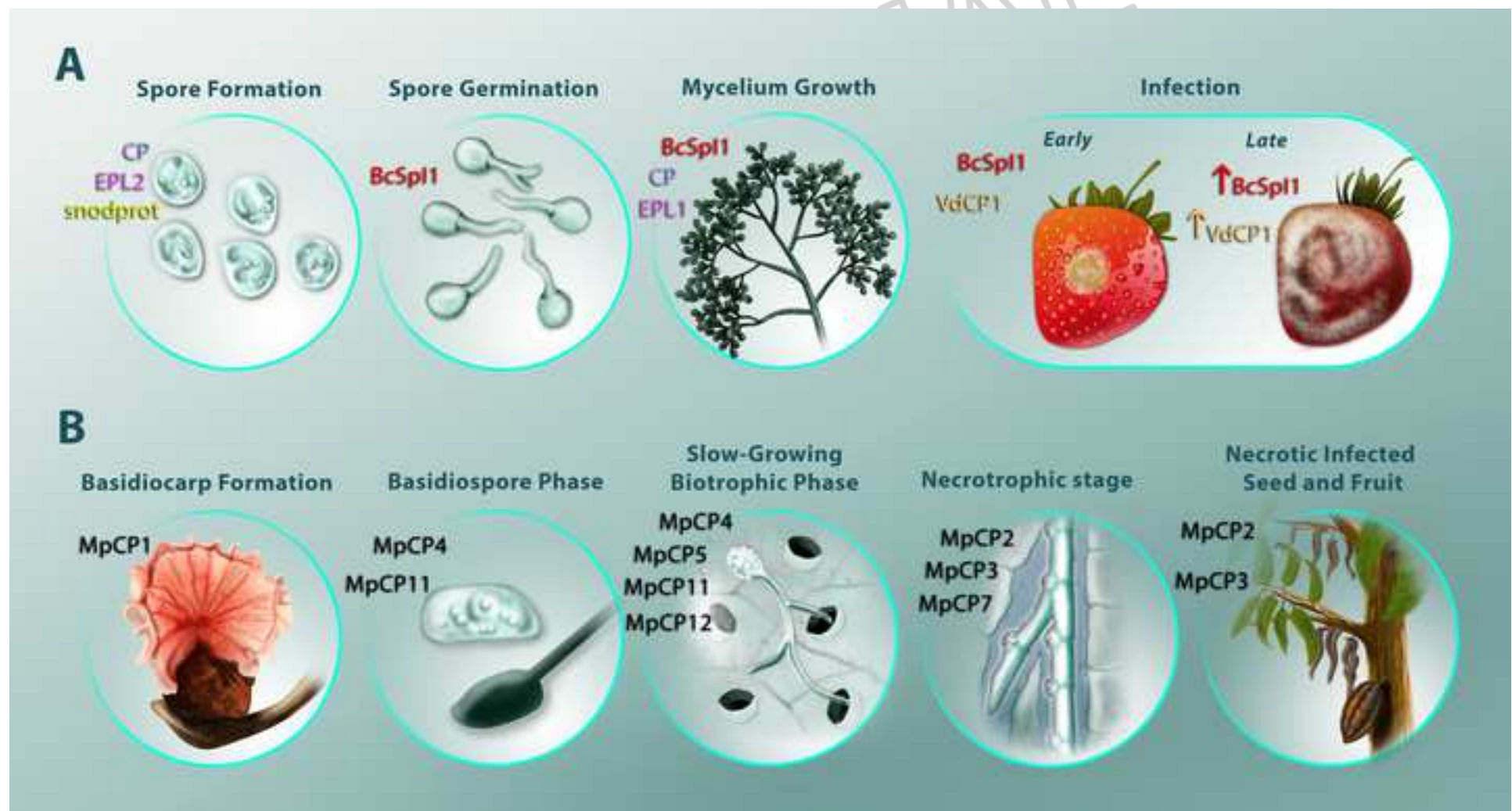


B



C





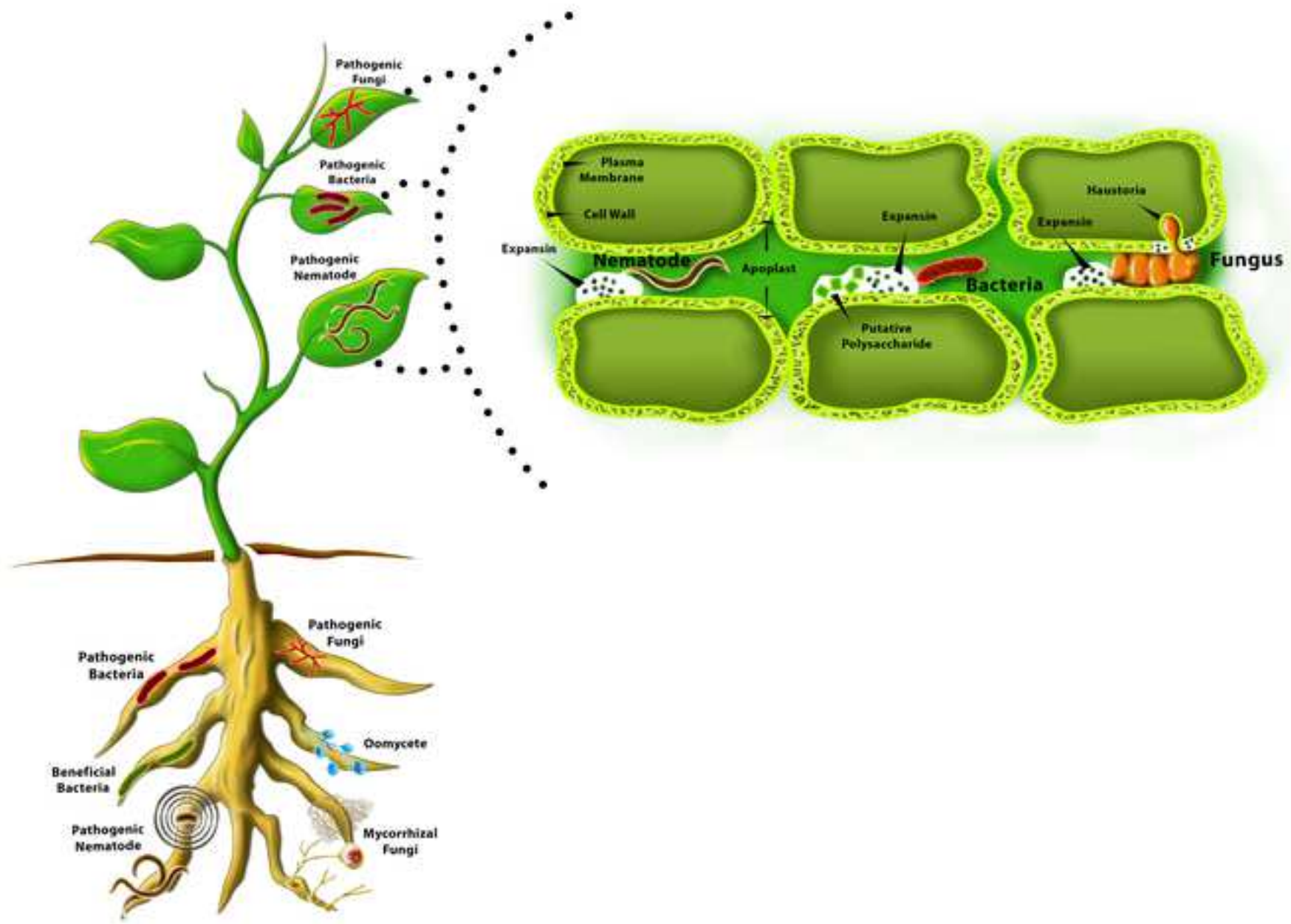


Figure 4.tif

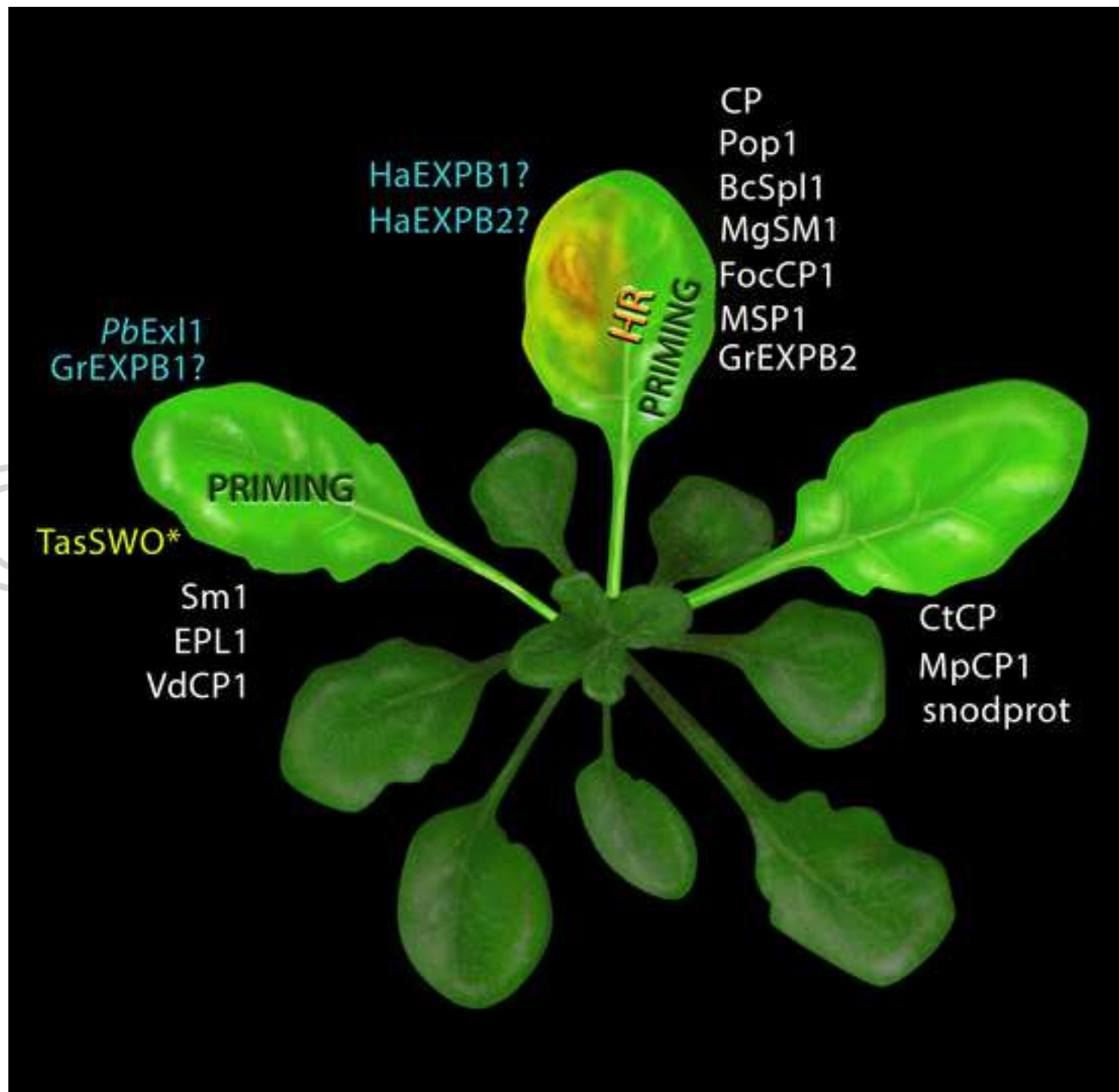


Fig. 2.tif